EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Zymomonas mobilis İLE LEVAN ÜRETİMİ VE ÜRETİM PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU

Mehmet Selim ŞILBIR

Tez danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bölüm Kodu: 614.01.00

Sunuş Tarihi: 24.01.2013

Bornova-İZMİR

2013

Mehmet Selim ŞILBIR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "***Zymomonas mobilis*** **ile Levan Üretimi ve Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu**" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24/01/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: **İmza**

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR .....

Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL .....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Seval DAĞBAĞLI .....

ÖZET

Zymomonas mobilis ile Levan Üretimi ve Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu

Şılbır, Mehmet Selim

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yekta Göksungur

2013, 64 sayfa

Levan, fruktoz ünitelerinin β-2,6 bağlarıyla bağlanmasından oluşan bir fruktoz polimeridir. Bu çalışmada, *Z. mobilis* suşları ile sentetik ortam kullanılarak levan üretimi gerçekleştirilmiş ve en yüksek levan üreten suş olan *Z. mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 ile levan biyosentezi üzerine başlangıç şeker konsantrasyonu, süre, sıcaklık, karıştırma-havalandırma, pH ve farklı azot kaynaklarının etkileri incelenmiş, bunlardan; başlangıç şeker konsantrasyonu (250-350g/L), fermentasyon süresi (24-48 saat) pH'nın (4.5-5.5) levan üretimine etkilerini incelemek ve bu parametrelerin optimum seviyelerini belirlemek amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılmıştır.

Şeker konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve pH'nın levan biyosentezi üzerine önemli bir etkiye sahip, regresyon modelinin önemli ($P<0.05$) ve modelin matematiksel uygunsuzluğundan kaynaklanan hatanın önemsiz ($P>0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Deneysel veriler kullanılarak bir matematik model oluşturulmuş ve bu verilerle modelden elde edilen verilerin uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu model yardımıyla proses için optimum koşullar olan 299.11 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda, 42.34 saat inkübasyon süresinde ve pH 6'da, modelin tahminlediği değer 42.6 g/L iken üretim sonunda 40.2 g/L konsantrasyonunda levan elde edilmiştir.

Zymomonas mobilis NRRL B-14023 hücreleri Ca-aljinat boncuklarında immobilize edilmiş ve dolgulu yatak biyoreaktörde sürekli sistemde levan üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. En yüksek levan üretimi, seyreltme hızının $0.14h^{-1}$ olduğu denemede 31.8 g/L olarak ve verimlilik 4.45 g L^{-1} h^{-1} olarak bulunmuştur. En yüksek verimlilik (6.55 g L^{-1} h^{-1}) ise seyreltme hızının 0.22 h^{-1} ve levan üretiminin 29.8 g/L olduğu denemede elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Levan, mikrobiyal polisakkarit, *Zymomonas mobilis*, Optimizasyon, İmmobilizasyon, Levansükraz, Cevap Yüzey Yöntemi, Dolgulu Yatak Biyoreaktör

ABSTRACT

Production of Levan by *Zymomonas mobilis* and Optimization of Process Parameters

Şılbır, Mehmet Selim

Msc. In Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Yekta Göksungur

2013, 64 pages

Levans are microbial fructose polymers with *β*- (2,6) linked fructose polymers. In this study, the production of levan from synthetic medium by *Z. mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 and the effects of initial sugar concentration, fermentation time, temperature, agitation-aeration, pH and different nitrogen sources on levan production was investigated and Response surface methodology was used to investigate the effects and optimum levels of three selected parameters; initial sugar concentration, (250-350 g/L), fermentation time (24-48 hour) and pH (4.5-5.5) on levan production.

Initial sugar concentration, fermentation time and pH had a strong linear effect on levan concentration. Regression model was significant ($P<0.05$) and lack of fit was insignificant ($P>0.05$).

Results of the statistical analysis showed that the fit of the model was good in all cases. Maximum levan concentration of 40.2 g/L was obtained when the predicted value was 42.6 g/L at the optimum levels of process variables (initial sugar concentration 299.11 g/L, fermentation time 42.34 hour, pH 6) . These values were obtained by fitting of the experimental data to the model equation.

The production of levan by *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 immobilized in Ca-alginate beads in packed bed bioreactor was studied using continous fermentation system. The highest levan concentration (31.8 g/L) was obtained at a dilution rate of 0.14 h-1 with a productivity rate of 4.45 g L^{-1} h^{-1}

And the highest productivity value (6.55 g L^{-1} h^{-1}), was obtained at a dilution rate of 0.22 h^{-1} with a levan production rate of 29.8 g/L.

Key words: Levan, microbial polysaccharide, *Zymomonas mobilis*, Optimization, İmmobilization, Levansucrase, Response Surface Methodology, Packed Bed Bioreactor

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü konuda değerli görüş ve tecrübelerini benimle paylaşan, yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR'a sabrı ve özverisi için,

Özellikle cevap yüzey yöntemini bana öğreten ve tezimde bu konuda karşılaştığım sorunları çözmemde yol gösteren Sayın Prof. Dr. Murat ELİBOL'a,

İhtiyaç duyduğum her durumda desteğini hissettiğim, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, karşılaştığım sorunların çözümünde yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Seval DAĞBAĞLI'ya,

TOVAG 110 O 079 nolu projeyi desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a,

Gösterdikleri destek ve sabır için sevgili arkadaşlarıma ve yüksek lisans ve doktora öğrencisi iş arkadaşlarıma özellikle de Kadriye ERGÜN'e ve Arş. Gör. Zafer ERBAY'a,

Hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili ailem; annem Asiye ŞILBIR ve kardeşlerim Ömer Faruk ŞILBIR, Murat ŞILBIR ve Muhammed Fatih ŞILBIR'a ve beni en güzel şekilde yetiştirip buralara gelmeme vesile olan rahmetli babam Prof. Dr. Yunus ŞILBIR'a TEŞEKKÜRLERİMİ SUNUYORUM.

x

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET……...v

ABSTRACT……...vii

TEŞEKKÜR……ix

ŞEKİLLER DİZİNİ……..xiv

ÇİZELGELER DİZİNİ……xvi

1. GİRİŞ……...……....1

2. LİTERATÜR ÖZETİ……..……....4

2.1 Levanın Yapısı Ve Özellikleri……...……....4

2.2 Levan Üretimi…….……...7

2.3 İmmobilizasyon…….……...11

2.4 Cevap Yüzey Yöntemi……14

2.4.1 İkinci dereceden modeller için kullanılan tasarımlar..…….17

2.4.2 Cevap yüzey yönteminin kullanıldığı çalışmalar……..18

3. MATERYAL VE YÖNTEM…….…….....20

3.1 Materyal…….……..……20

3.1.1 Mikroorganizma…….…….…20

3.1.2 Substrat……..……..20

3.2 Yöntemler…….…….…….21

3.2.1 Substratların hazırlanışı……...……..…21

3.2.2 Kesikli sistemde levan üretimi……...……..….21

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.2.3 *Zymomonas mobilis* hücrelerinin Ca- aljinatta immobilizasyonu…….23

3.2.4 Sürekli sistemde levan üretimi……..26

3.2.5 Granül levan üretimi……...……..28

3.3 Analiz Yöntemleri.……...28

3.3.1 Biyokütle(hücre) miktarı..……28

3.3.2 Mikrobiyal polisakkarit.……....28

3.3.3 İndirgen şeker..…….30

3.3.4 Toplam şeker……30

3.3.5 pH……..30

3.3.6 Levan üretimi verimlilik hesapları……..……...30

3.3.7 İstatistiksel analizler..……...31

4.BULGULAR VE TARTIŞMA……...34

4.1 Farklı *Zymomonas mobilis* Suşlarının Levan Üretimine Etkisi ……..34

4.2 Başlangıç pH Değerlerinin Levan Üretimi Üzerine Etkisi……..37

4.3 Karıştırma ve Havalandırmanın Levan Üretimine Etkisi…….38

4.4 Farklı Azot Kaynaklarının Levan Üretimine Etkisi…….39

4.5 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Levan Üretimine Etkisi..…….……40

4.6 Levan Üretiminin Optimizasyonu……42

4.7 Dolgulu Yatak Biyoreaktörde Levan Üretimi……..……49

5.SONUÇ…….……..52

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ…….……54

ÖZGEÇMİŞ……...63

EKLER……..……

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1 Levanın moleküler yapısı……..……4

2.2 *Zymomonas mobilis*……...…….……8

2.3 *B. polymyxa* ile levan üretimi…….11

2.4 Merkezi tümleşik tasarımın grafiksel gösterimi…….17

2.5 Yüzey merkezli tasarımın grafiksel gösterimi……18

3.1 *Zymomonas mobilis* bakterilerinin Ca-aljinat jelinde İmmobilizasyonu…….……...…24

3.2 Ca-aljinat boncuklarının elde edilmesi……..**.....**25

3.3 Ca-aljinat boncukları……..**.....**26

3.4 Dolgulu yatak biyoreaktör……..27

3.5 Levan üretimi şeması……..……29

4.1 *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B14023 ile levan üretimi kinetiği…….35

4.2 *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B14234 ile levan üretimi kinetiği…….35

4.3 *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B806 ile levan üretimi kinetiği……..……...36

4.4 Başlangıç pH değerlerinin levan üretimi üzerine etkisi…….……37

4.5 Karıştırma ve havalandırmanın levan üretimine etkisi……..….**.....**38

4.6 Farklı azot kaynaklarının levan üretimine etkisi…….……...40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.7 Farklı substrat konsantrasyonlarının levan üretimi üzerine etkisi.....41

4.8 Sabit substrat konsantrasyonlarında (300g/L) süre ve pH'nın İzohips eğrisi ve yüzey grafiği……..…...…46

4.9 Sabit pH'da (5.0), substrat konsantrasyonu ve sürenin İzohips eğrisi ve yüzey grafiği…….…...47

4.10 Sabit sürede (36 saat), substrat konsantrasyonu ve pH'nın izohips eğrisi ve yüzey grafiği…….…...….....48

4.11 Dolgulu yatak biyoreaktörde farklı seyreltme hızlarında levan üretimi…….……..…….50

4.12 Farklı seyreltme hızlarında levan üretim verimliliği…….……..51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1 Levan üreten mikroorganizmalar…….....5

2.2 Levanın kullanım alanları…….....7

3.1 Kullanılan kültür ortamı kompozisyonu……...…..……...21

3.2 Kullanılan üretim ortamı kompozisyonu…….……...21

3.3 Levan üretiminde kullanılan bazı azotlu maddelerin içerdikleri azot oranları ve fermantasyon ortamına ilave edilen miktarları…..…..22

3.4 Ca-aljinatta immobilize edilmiş *Zymomonas mobilis* ile levan üretiminde kullanılacak dolgulu yatak biyoreaktörün özellikleri…...…27

3.5 İncelenen parametreler ve seviyeleri…….....33

4.1 Deneysel tasarım ve cevapları……....42

4.2 İkinci dereceden model denklemi istatistiksel analizi……..……..43

4.3 Levan konsantrasyonları için tahmin edilen regresyon katsayıları……44

1.GİRİŞ

Levan, D-fruktofuranozillerin β-2-6 bağlarıyla bağlanan ve β-2-1 bağlarında dallanmalar yapmasıyla oluşmuş suda çözünür özellik gösteren bir polisakkarittir. Levan doğada bitkilerde, mayalarda, küflerde ve bakterilerde belirli oranlarda bulunmaktadır (Jang et al., 2002). Levan bazı otlarda (*Dactylis glomerata*, *Poa secunda*, and *Agropyron cristatum*) depo karbonhidratı olarak bulunurken (Pollock and Cairns, 1991), buğday, arpa, küf (*Aspergillus sydawi* and *A. versicolor*) ve mayalarda da iz miktarda bulunmaktadır (Han, 1990). Levan ayrıca hücre dışı polisakkarit olarak *Aerobacter levanicum, Bacillus licheniformis, Bacillus polymyxa, Corynebacterium laevaniformans, Pseudomonas aureofaciens,* ve *Zymomonas mobilis* gibi mikroorganizmalar tarafından da üretilebilmektedir (Emnova et al., 2009; Takeshita, 1973; Dias and Bhat, 1962;.Han and Clarke, 1990; Ghaly et al., 2007; Ananthalakshmy and Gunasekaran, 1999). Diğer mikrobiyal polisakkaritler gibi levan polimeri de fermantasyon yoluyla kontrollü miktarlarda ve mevsimsel değişikliklerden etkilenmeden üretilebilmektedir. Mikrobiyal levanın bitkisel levanlardan farkı daha uzun moleküler zincirlere sahip olmalarıdır. Bitkisel levanlar 8-10 fruktoz içeren zincirden oluşmakta iken mikrobiyal levanlar 1000-2000 molekülden oluşan zincir uzunluğuna sahip olabilmektedirler. Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* isimli Gram-negatif bir bakteridir ve bu bakteri glikoz, fruktoz ve sakkarozu Entner-Doudoroff yoluyla metabolize eder (Sturzoiu, et al., 2012). Entner- Doudoroff yolunu kullanan bakteri glikolizden veya pentoz fosfat yolundan(PPP) farklı bir dizi enzim kullanarak glikoz ve pürivatın katabolize olmasını sağlar. Buna rağmen birçok bakteri enerji metabolizmasında glikoliz ve pentoz fosfat yolunu kullanır. Bu metabolizma yolu ilk kez 1952'de Michael Doudoroff(1911–1975) ve Nathan Entner tarafından keşfedilmiştir (Entner and Doudoroff, 1952).

Kimyasal yapı olarak temelde B-2,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış fruktoz ünitelerinden oluşan bir polimer olan levan biyopolimeri, biyolojik olarak parçalanabilen, yağa dirençli, oksijen geçirmeyen ve toksik olmayan bir yapı göstermekte ve suda da çözünebilmektedir (Bekers et al., 2005).

Levan polimerine karşı son yıllarda artan ilginin en önemli nedenlerinden biri de iyi film oluşturma özelliği nedeniyle gıda maddelerinin paketlenmesinde ve kaplanmasında kullanılabilmesidir. Gıdanın tüketiciye sunumu sırasında gıdayı, besin değeri, mikrobiyal kalite açısından korumak gibi fonksiyonel özelliklere sahip ve direk olarak ürün ile birlikte tüketilebilen yenilebilir filmlerin üretiminde levan biyopolimeri de önemli alternatifler arasında yer almaktadır.

Levan, yenilebilen film üretimi dışında aroma maddelerini mikro enkapsüle edici ajan olarak, su ile bulamaç haline getirilerek yapıştırıcı olarak, kıvam arttırıcı ve stabilize edici ajan olarak ilaç tabletlerinde de kullanılabilmektedir (Han, 1990).

Cevap yüzey yöntemi (Response Surface Methodology) ise proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem ile parametrelerin prosese olan etkileri incelenmekte ve bu parametrelerin optimum seviyeleri belirlenmektedir (Myers and Montgomery, 1995). Bu yöntem son yıllarda biyoteknoloji alanında değişik faktörlerin ürün üretimine etkilerini açıklayan modellerin oluşturulmasında kullanılmaktadır (Liu et al., 2010; Göksungur, 2004). Bu metodun avantajları ise; daha az deney ile daha fazla bilgi elde edilebilmesi ve birden çok parametreyi ve interaksiyonlarının etkilerini birlikte inceleme fırsatı sunmasıdır. Bu metotta deneysel veriler matematiksel modeller oluşturmakta kullanılmakta, elde edilen model ile proses için optimum koşullar belirlenmektedir (Ürküt, 2007).

İmmobilizasyon, aktif olan enzim veya hücrelerin bir destek maddesi içerisinde veya üzerinde tutuklanması işlemidir. Bir başka deyişle, aktif olan enzim veya hücrelerin hareketli sıvı fazdan fiziksel olarak substrat ve ürün moleküllerinin fazlar arasında yer değiştirebileceği şekilde ayrılmasıdır (Kierstan and Coughlan, 1985; Rosevar,1984). İmmobilize hücrelerin başlıca avantajları; tekrar tekrar kullanılabilmeleri, sürekli sistemlerde de kullanılabilmeleri ve hücrelerin stabilitesini arttırmasıdır. Ca-aljinatta tutuklama yöntemi ise basitliği ve biyokatalizöre zarar vermemesi nedeniyle enzimlerin immobilizasyonunda

sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Roy and Gupta,2004; Rajagopalan and Krishan, 2008).

Bu çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada üç farklı *Zymomonas mobilis* suşu (*Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-806, B-14023, ve B-14234) kullanılarak levan üretimi yapılmış ve bu suşlar arasından en yüksek levan üretimini gerçekleştiren *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 suşu çalışmanın ileriki aşamaları için seçilmiştir. Seçilen *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 suşu ile levan üretiminde başlangıç substrat konsantrasyonu, farklı azot kaynakları, sıcaklık, pH, çalkalama ve süre parametrelerinin levan üretimine etkileri incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında levan üretimi üzerine en fazla etkiye sahip olduğu belirlenen üç parametrenin (fermantasyon süresi, pH ve başlangıç substrat konsantrasyonu) levan üretimine doğrusal, interaksiyon ve kuadratik etkileri cevap yüzey yöntemi (CYY, RSM) ile incelenmiş ve bu yöntem ile bir matematiksel model oluşturularak optimum seviyeleri bulunmuştur. *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 hücreleri Ca-aljinatta immobilize edilmiş dolgulu yatak biyoreaktör ile belirlenen optimum seviyelerde sürekli sistemde levan üretimi gerçekleştirilmiştir.

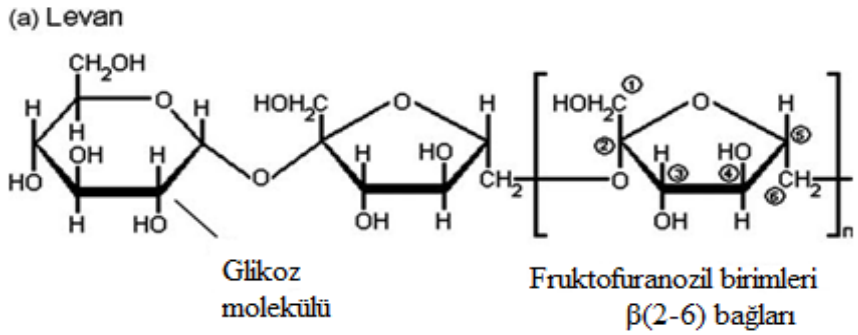
Yüksek yarayışlılık ve kullanım alanında yüksek çeşitliliğe sahip olan levan polimerinin üretimi biyoteknolojik bir prosesle gerçekleştirilmiştir. Levan üretiminde substrat olarak sakkaroz içeren sentetik bir besi yeri kullanılması nedeniyle hammadde maliyetinin yüksek olacağı öngörüsüyle, üretim parametrelerinin optimizasyonu ile üretimin verimlileştirilmesi ve ekonomikleştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında *Zymomonas mobilis* ile dolgulu yatak biyoreaktör ile sürekli sistemde levan üretimi gerçekleştirilmiş ve literatürde benzer başka çalışma bulunamamıştır. Bu sebeple, tez çalışmasının yapılacak diğer çalışmalara öncü olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma, TOVAG 110 O 079 nolu TÜBİTAK projesinin bir parçası olarak yürütülmüştür.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Levanın Yapısı Ve Özellikleri

Levan polimeri, fruktozun doğal bir homopolimeri olup fruktoz ünitelerinin β-2-6 ve β-2-1 bağlarıyla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Polimer β-2-1 bağlarında dallanma yapmaktadır (Arvidson et al., 2006). Şekil 1'de levanın moleküler yapısı görülmektedir.



Şekil 2.1. Levanın moleküler yapısı

Levanın bitkilerden elde edileninin ortalama molekül ağırlığı 2000-33000 Da arasında iken, bakteriyel levanın molekül ağırlığı ise bitkilerden elde edilen levandan daha fazladır ve 2×10^6-100×10^6 Da arasındadır (Arvidson et al., 2006). Levanın molekül ağırlığı ve dallanma derecesi üretimi gerçekleştiren mikroorganizmalara bağlı olarak da değişmektedir.

Mikrobiyal levan sakkaroz içeren üretim ortamlarında, *Bacillus subtilis, Bacillus polymyxa, Aerobacter levanicum, Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium laevaniformans, Zymomonas mobilis* gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir(Bergey et al., 1989). Çizelge 2.1'de levan üreten bazı mikroorganizmalar gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 Levan üreten mikroorganizmalar (Ghaly et al., 2007)

Mikroorganizma Adı	**Verim**
Acetobacter acetigenum	
Acetobacter pasteurianus	
Actinomyces viscosus	0.0245
Achromobacter sp.	
Aerobacter aerogenes	
Aerobacter levanicum	0.051
Arthrobacter ureafaciens	
Azotobacter chroococum	
Bacillus asterosporus	
Bacillus amyloliquefaciens	
Bacillus megaterium	
Bacillus mesentericus	
Bacillus polymyxa	0.45
Bacillus subtilis	0.285
Corynebacterium levaniformans	
Corynebacterium beticola	
Gluconobacter oxydans	
Leuconostoc mesenteroides	
Micbacterium laevaniformans	
Odontomyces viscosus	
Phytomonas pruni	
Pseudonomas aureofaciens	0.83
Pseudonomas chlororaphis	
Pseudonomas fluorescens	
Rothis dentocariosa	
Streptococcus sp.	
Streptocuccus salivarius	
Xanthomonas sp.	
Zymomonas mobilis	0.0063
Yeast	
Aspergillus sydawi	
Aspergillus versicolor	

Bu çalışmada kullanılan *Zymomonas mobilis* ise çubuk şekilli, eliptik, yuvarlak uçlu, genellikle çifler halinde bulunan 2-6 µm uzunluğunda, 1.0-1.4 µm genişliğinde olan Gram-negatif bir bakteridir. Fakültatif anaerobiktirler, bazı suşları zorunlu anaerobiktir. 1 mol glikoz veya fruktozu metabolize ederek yaklaşık 2 mol etil alkol, 2 mol CO_2 ve laktik asiti Entner-Doudorof metabolizma yoluyla üretirler (Bergey et al., 1989).

Levan suda ve yağlarda çözünebilir, aside, alkaliye ve ısıya karşı dayanıklı ve stabildir, film oluşturabilir, tuzlarla ve yüzey aktif maddelerle uyumludur, su ve kimyasal tutma kapasitesi vardır (Bekers et al., 2005). Levan biyolojik olarak parçalanabilir, film olarak iyi bir oksijen bariyeridir, organik çözgenlere dirençlidir, kurutulmuş granül formunda uzun süre depolanabilir (Arvidson et al.,2006). Uzun fruktan zincirlerine sahip olması nedeniyle levanın nötr bir tadı vardır. %20'nin altındaki konsantrasyonlarda levan newtonian akışkan özellikleri göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı levan, endüstriyel açıdan önemli bir biyopolimerdir ve sanayide kullanım potansiyeline sahiptir (Dağbağlı ve Göksungur, 2012).

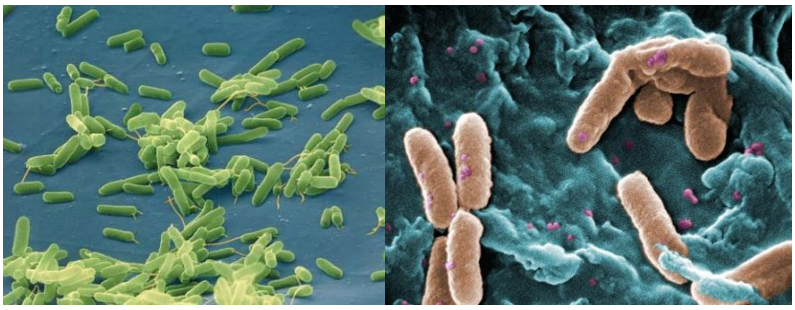
Levanın gıda sektöründe kıvam arttırıcı ve stabilizatör olarak uygulamaları bulunmaktadır. Aynı zamanda prebiyotik ve kandaki kolestrolü azaltıcı etkileri nedeniyle fonksiyonel gıdalarda kullanılabilmektedir. Eczacılık alanında ilaç kaplama malzemesi olarak da kullanılmaktadır. Tıpta ise, tümörlü hücrelerde hücre zarlarının modifikasyonunu sağlar, hücre zarlarından sitotoksik ajanların geçirgenliğini arttırarak ajanların tümörlü hücrelere karşı etkinliklerinin arttırmasına yardımcı olur. Levan, hücrelerin çoğalması, cildin nemlendirilmesi, deri tahrişlerinin hafifletilmesi üzerindeki mükemmel etkilerinden dolayı kozmetik ürünlerin formülasyonlarında da yer almaktadır. Sülfatlandırılmış, fosfatlandırılmış veya asetillendirilmiş levan türevlerinin, antitümor ajanları olduklarına dair çalışmalar vardır (Han, 1990). Çizelge 2.2'de levanın kullanım alanları gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 Levanın kullanım alanları (Ghaly et al., 2007)

Uygulama	Kullanım Şekli
Endüstriyel	Vizkozite arttırıcı
	Su ve kimyasal tutma kapasitesi
	Seçici tıkayıcı ajan (Selective plugging agent)
Medikal/Farmasetik	Kan plazmasını arttırıcı
	Kolesterol düşürücü ajan Hücre zarı yapısını değiştirici ajan (tümör hücreleri)
	Tablet bağlayıcı
Gıdalar	Tatlandırıcı
	Gıda dolgu materyali
	Kabartıcı ajan
	Arabik gam ikame materyali
Diğerleri	Emülsifiyer
	Formülasyona yardımcı ajan
	Stabilizer ve kıvam arttırıcı
	Yüzey düzleştirici ajan
	Enkapsülasyon ajanı
	Koku ve aroma taşıyıcı
	Kozmetik

2.2 Levan Üretimi

Biyoteknolojik üretimlerde mikroorganizma seçimi, düşük substrat maliyeti ve fermantasyon yönteminin seçimi proseslerin ekonomik bir şekilde gerçekleştirilmesi için önemli parametrelerdir (Borsari et al., 2006). *Zymomonas mobilis* büyük miktarlardaki levan üretimlerinde kullanılabilecek çok önemli bir bakteridir (Oliveira et al., 2007). Bu mikroorganizma, fakültatif anaerob, Gram negatif bir bakteridir. Sakkaroz içeren ortamda fruktooligosakkarit ve levan üretebilmektedir.



Şekil 2.2 *Zymomonas mobilis* (Anonymous, 2012a; Anonymous, 2012b)

Bu mikroorganizma aynı zamanda etil alkol üreten bir bakteridir. Sakkaroz konsantrasyonu ve sıcaklık, fruktooligosakkarit sentezini ve levan oluşumunu katalizleyen *Zymomonas mobilis* tarafından sentezlenen levansükraz enzim aktivitesi için önemli parametrelerdir (Bekers et al., 2002a). Yüksek sakkaroz konsantrasyonu ve yüksek sıcaklık, fruktooligosakkarit sentezini arttırmakta ve etil alkol üretim hızını azaltmaktadır (Borsari et al., 2006). Glikoz/fruktoz karışımlarının ya da bu monosakkaritlerin tek olduğu üretim ortamlarında gelişen *Z. mobilis*'in levan ürettiği gözlenmemiştir (Panesar et al., 2006). Bunun sebebinin glikoz/fruktozun levan üretimini inhibe edici etkisi olduğu sanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, şeker pancarı şurubunun levan üretimi için uygun bir hammadde olduğu bulunmuştur (Bekers et al, 2002a). 34ºC'nin üzerindeki sıcaklıkların *Z. mobilis* suşlarıyla levan üretimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Panesar et al., 2006).

Bekers et al., (2002b) yaptıkları çalışmada farklı üretim ortamlarında *Z. mobilis* ile etil alkol ve levan üretimini incelemişlerdir. Araştırmacılar, iyi birer azot kaynağı olarak da kullanılan maya ekstraktı, pirinç destilatı ve şeker pancarı melasını, sakkaroz içeren üretim ortamına ilave ederek levan ve etil alkol üretimine olan etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada en yüksek etil alkol ve levan üretimi sırasıyla melasın ve maya ekstraktının kullanıldığı ortamlardan elde edilmiştir.

Borsari et al., (2006) levan üretiminin optimizasyonu üzerine çalışmışlardır. Çalışmada, şeker kamışı suyunu, sakkarozu ve farklı fermantasyon proseslerini (kesikli ve yarı sürekli) bağımsız değişkenler olarak belirlemiş ve bu parametrelerle levan üretimini optimize etmişlerdir. Fermantasyon ortamına şeker

kamışı suyu ilave ettiklerinde oluşan levan miktarının artmadığını fakat biyokütle, sorbitol ve etil alkol miktarlarının arttığını gözlemişlerdir. *Z. mobilis* CP4 ile en yüksek levan üretimi (40.14 g/L), 150 g/L sakkaroz ortamında kesikli fermantasyon sistemi ile elde edilmiştir.

Melo et al., (2007) levan üretimi üzerine sıcaklık, karıştırma hızı, başlangıç sakkaroz konsantrasyonu ve maya ekstraktı konsantrasyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla faktöriyel deney tasarımı kullanmışlar ve araştırmalarının sonucunda, levan üretiminin başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve karıştırma hızına bağlı olduğunu ancak maya ekstraktı konsantrasyonuna bağlı olmadığını gözlemişlerdir. Çalışmada 50, 75 ve 100 rpm orbital karıştırma hızları kullanılmış ve 20 °C sıcaklıkta karıştırma hızını 50 'den 100 rpm'e doğru arttırmanın levan üretiminde artışa neden olduğunu (5.6 g/L), 30 °C sıcaklıkta ise karıştırmanın levan üretiminde önemli bir artışa neden olmadığını tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda levan üretimi için optimum koşulların 100 rpm karıştırma hızı, 20ºC sıcaklık ve 250 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonu olduğu belirlemişlerdir.

Oliveira et al., (2007) *Z. mobilis* ile levan üretimine farklı karbon kaynaklarının (ticari sakkaroz, melas ve şeker pancarı şurubu) ve fermantasyon ortamındaki diğer bileşenlerin etkilerini belirlemek amacıyla faktöryel deney tasarımı kullanmışlardır. Ticari sakkaroz ve şeker pancarı şurubu kullanarak gerçekleştirdikleri fermantasyona kıyasla melasta daha düşük levan konsantrasyonu elde etmişlerdir. Sakkaroz içeren ortamda, levan üretimi üzerine maya ekstraktı ve KH_2PO_4'ün, şeker pancarı şurubu içeren ortamda ise maya ekstraktı ve $MgSO_4$'ın önemli etkileri olduğunu bulmuşlardır.

Han (1989) topraktan izole ettiği *Bacillus polymyxa* bakterisi ile levan üretimini incelemiştir. En yüksek levan üretimi %8 sakkaroz içeren ortamda elde etmiştir. Ürünün hidrolizi ile polisakkaritin tamamiyle D-Fruktoz ünitelerinden oluştuğunu ve ^{13}C NMR spektroskopisi ile ürünün β-(2-6) fruktofuranozil bağlarıyla bağlı fruktoz moleküllerinden oluşan levan olduğunu belirlemiştir. Bu organizma ile bilinen diğer levan üreticilerinin üç katı (40 g/L) hücre dışı polisakkarit üretilmiştir.

Muro et al., (2000) tarafından yüksek miktarda levan üreten *Zymomonas mobilis* suşlarını N-metil-N-nitro-nitrozoguanidin ve kafein mutasyonu ile seçmişlerdir. Bu suşlar arasından en yüksek levan (41 g/L) üretimi, 200 g/L sakkaroz ve 0.5 g/L $(NH_4)_2SO_4$ içeren ortamda HL29 mutant suşu ile elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışma 7°C'de *Zymomonas mobilis* ile levan üretimi konusunda yapılan ilk çalışmadır.

Chiang et al., (2009) tarafından sürekli sistemde levan üretimi için *Zymomonas mobilis* levansükraz enzimi immobilize edilmiştir. Levansükrazı kitinin bağlayıcı kısmıyla birleştirmek için, *E. coli*' den çözünebilir formda hibrit protein üretilmiştir ve bu sayede hibrit proteinlerin kitin boncuklarına direk adsorpsiyonu sağlanmıştır. Yapılan analizlerle enzim ile kitin boncukları arasındaki bağın kararlı olduğu görülmüştür. %20 sakkaroz içeren besiyeri ile levan üretiminde % 41.5 sakkaroz dönüşüm verimi ile immobilize olmayan enzimlerle karşılaştırıldığında çok daha yüksek bir değer olan 83 g/L levan konsantrasyonu elde edilmiştir. İmmobilize enzimler 7 kez art arda kullanılarak 480 g/L levan üretimi sağlanmıştır.

Küçükaşık ve ark., (2011) çalışmalarında ön işlem uygulanmış şeker pancarı ve nişasta melaslarını uygun sakkaroz kaynağı olarak kullanmayı tercih etmişler ve 5 değişik ön işleme metodu ve bunların birbirleriyle kombinasyonlarını iki melas tipine de uygulamışlardır. Levan üretimi için *Halomonas* sp. AAD6 hücreleri kullanmışlar ve 30 g/L ön işlenmiş şeker pancarı melası kullanılarak yapılan üretim sonucu elde edilen biyokütle ve levan konsantrasyonlarını sırasıyla 6,09 g/L ve 12,4 g/L olarak bulmuşlardır.

Han and Clarke (1990) gerçekleştirdikleri çalışmada, erlenlerde aşı kültürü geliştirilmiş ve biyoreaktörde üretim yapılmıştır. Levan üretimi gerçekleştirildikten sonra ayırma ve saflaştırma işlemleri ile mikroorganizma uzaklaştırılmış ve mikroorganizma içermeyen fermantasyon ortamı elde edilmiştir. Elde edilen fermantasyon ortamından etil alkol kullanılarak levan polimeri çöktürülmüş, sonrasında su ile tekrar süspansiyon haline getirilmiş ve dondurularak kurutulmuştur. Şekil 2.3'te bu çalışmada kullandıkları *Bacillus polymyxa* ile levan üretiminin aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.3 *B. polymyxa* ile levan üretimi (Han and Clarke, 1990)

2.3 İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, aktif olan enzim veya hücrelerin bir destek maddesi içerisinde veya üzerinde tutuklanması işlemidir. Bir başka deyişle, aktif olan enzim veya hücrelerin hareketli sıvı fazdan fiziksel olarak substrat ve ürün moleküllerinin fazlar arasında yer değiştirebileceği şekilde ayrılmasıdır (Kierstan and Coughlan, 1985; Rosevar,1984).

Hücrelerin immobilize edilmesinin;

- tekrar kullanılabilme,
- hücre aktivitesini stabilize etme,
- sürekli yönteme uygunluk ve
- fermantasyon ortamından daha kolay ayrılabilme gibi avantajları vardır.

İmmobilizasyon, aktif olan enzim veya hücrelerin bir destek maddesi içerisinde veya üzerinde tutuklanmasıdır. İmmobilizasyon yöntemleri; adsorbsiyon, kovalent bağlama ve polimerik yapıda bir dayanak maddesi içerisinde hapsetme olarak 3 grup altında incelenebilir.

Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonda enzimler, katı faz ile sıvı faz arasındaki ara yüzeyde Van der Walls kuvvetleri, kuvvetli iyonik bağlar veya hidrofobik etkileşimlerle tutulurlar. Adsorpsiyon yöntemi, immobilizasyon için en basit tekniklerden biri olmakla beraber enzimlerin ya da hücrelerin kuvvetlice tutulamaması ve birim taşıyıcı başına sınırlı miktarda enzim veya hücre adsorbe edebilmesi gibi bazı dezavantajları vardır (Koshcheyenko and Sukhodolskaya, 1985).

Kovalent bağlama ile enzim veya hücre immobilizasyonu yönteminde aktive edilen dayanak maddesine enzim kimyasal olarak bağlanır. Bu teknikte enzimlerin immobilizasyonu oldukça zordur ve diğer yöntemlere göre daha fazla aktivite kaybı meydana gelir.

Dayanak maddesi içerisinde hapsetme yönteminde ise enzimler veya hücreler dayanak maddesine direkt bağlanmak yerine polimer matriksin içerisine tutuklanır. Bu yöntemde enzim bir membranın arkasında veya bir jel yapının içerisinde hapsedilir. İmmobilizasyon, enzimin bir monomer çözeltisiyle karıştırılıp, kimyasal bir reaksiyon veya sıcaklık değişikliği ile polimerizasyonu, bir membran arkasında tutuklanması ile ya da önceden oluşturulan bir polimerin jelleşmesi ile gerçekleştirilir (Ürküt, 2007).

Fruktozun glikoza dönüştürülmesinde veya L-amino asitlerin üretilmesinde enzimlerin kullanımı, nişastadan etil alkol elde edilmesinde veya yoğurt üretiminde aktif hücrelerin kullanımı gibi bir çok biyolojik veya kimyasal sentez ve dönüşüm, aktif hücre ya da enzimler kullanılarak yapılmaktadır. Bu gibi proseslerin büyük ölçekte sürdürülebilmesi için biyokatalistlerin konsantre formda ve tekrar kullanılabilir olması gerekmektedir. Bu amaç enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu ile sağlanmaktadır (Mchugh, 2003).

Bayramoğlu ve ark., (2004) tarafından yapılan çalışmada, α-amilaz enzimi poly(HEMA-GMA-1-3) membrana amid bağ oluşumu ile immobilize edilerek nişastanın hidrolizi incelenmiştir. İmmobilize α-amilazın sıcaklık nedeniyle inaktivasyona, serbest α-amilaza göre daha dayanıklı olduğu ve enzimim optimum pH'sının da immobilizasyon reaksiyonundan etkilenmediği gözlenmiştir.

Sanjay and Sugunan (2005) tarafından glukoamilaz enziminin montmorillont kile, adsorbsiyon ve kovalent bağlama ile immobilize edilmesiyle sabit yatak reaktörde nişastanın hidroliz profili incelenmiştir. 96 saat sonunda iki immobilize sisteminin de %100 aktivite gösterdiği fakat kovalent bağlama ile yapılan sistemin daha stabil olduğu belirlenmiştir.

Chakrabarti and Storey (1990) hidrofilik poliüretan sabuna (Hypol® 2002) amiloglukosidaz ve pullulanaz enzimlerinin immobilize edilmesinin nişastanın hidrolizi için uygun bir yaklaşım olduğunu ve immobilize amiloglukosidaz ve pullulanaz ile elde edilen glikoz veriminin sadece amiloglukosidazın immobilizasyonunda elde edilene göre 1.6 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Grote et al., (1980) *Zymomonas mobilis*'i Ca-aljinat ve K-karregenan ile immobilize ederek sürekli sistemde etil alkol üretmişler ve yaptıkları denemelerde 60 g/L etil alkol konsantrasyonu ve 50 g $L^{-1}h^{-1}$hacimsel verimlilik değeri elde etmişlerdir. 800 saat sürekli üretimden sonra immobilize hücrelerin aktivitelerinde %30'luk bir düşüş gözlemişlerdir.

Klein and Kresdorf (1983) yüksek etil alkol konsantrasyonlarına (74 g/L) ulaşmak için *Zymomonas mobilis* DSM424 suşunu Ca-aljinat jelinde immobilize etmişler ve üç aşamalı bir reaktör sistemi kurmuşlardır. Ca-aljinat boncuklarının boyutu küçüldükçe verimin arttığını gözlemişlerdir. Reaktör sürekli sistemde 65 gün boyunca çalıştırıldığında daha önceki çalışmalardan daha yüksek(56 g L^{-1} h^{-1}) verimlilik elde edildiğini ve şekerin de %98 dönüşüm verimi ile kullanıldığını belirtmişlerdir.

Margaritis et al., (1981) kütle transferini en az düzeyde tutmak ve immobilize hücre aktivitesini en yüksek seviyelere çıkarmak için *Zymomonas mobilis* hücrelerini 1mm çapındaki küçük Ca-aljinat boncuklarına immobilize etmişler ve küçük boncuk boyutu ve yüksek (58g kuru hücre/L) hücre konsantrasyonunu dolgulu yatak biyoreaktör sisteminde kullanarak yüksek etil alkol verimliliği sağlamışlardır. Sistem kararlı halde iken seyreltme hızları 0.4 h^{-1} ile 3.9 h^{-1} arasında değiştirilerek 100 g glikoz/L substrat konsantrasyonu ve %87 şeker dönüşümü ile en yüksek 102 g etil alkol L^{-1} h^{-1} verimliliği elde etmişlerdir. Biyoreaktörü 384 saat boyunca sürekli çalıştırmışlar ve kısa aralıklarla $CaCl_2$ uygulaması ile etil alkol verimliliğini en yüksek düzeyine (116 g etil alkol L^{-1} h^{-1}) ulaştırmışlardır.

2.4 Cevap Yüzey Yöntemi

Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, CYY) ilk olarak 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. Bu araştırmacıların öne sürdüğü yaklaşımlar, son 50 yılda mühendislerin, bilimcilerin ve istatistikçilerin endüstriyel proseslerin geliştirilmesine bakış açılarının tamamıyla değişmesine neden olmuştur. Bu çalışmada Box and Wilson (1951), Cevap Yüzey Yöntemi'nin temelini oluşturan eleme (screening), bölge araştırma (steepest ascent), işlemin/ürünün karakterize edilmesi ve optimizasyonunu kapsayan bir seri deneme felsefesini ortaya koymuştur. Ardından, Bradley (1958) ve Hunter (1959), Cevap Yüzey Yöntemi'nde kullanılan istatistiksel ve matematiksel bir takım teknikleri açıklamışlardır (Eren, 2004).

Cevap Yüzey Yöntemi (CYY), çeşitli araştırmacılar tarafından küçük farklılıklarla tanımlanmıştır. Box and Draper (1987), bu yöntemi tanımlarken "CYY, ampirik model geliştirmek ve bu modeli değerlendirmek için kullanılan bir grup istatistiksel teknikler topluluğudur. Dikkatlice dizayn ve analiz edilmiş deneylerle, bağımsız bir değişken ile onu etkileyen bir grup kontrol edilebilir değişken arasındaki ilişkiyi araştırır" ifadelerine yer vermiştir (Eren, 2004). Myers and Montgomery (1995) ise CYY'i " proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli bir takım istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntem" olarak tanımlamıştır.

Bu tanımdan yola çıkarak genel olarak, CYY uygulamalarının doğasını bir dizi istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birbiri ardına uygulanması ve her bir aşamada elde edilen verilerin bir sonraki aşamada kullanılması oluşturmaktadır. Öncelikle, bir takım fikirler öne sürülerek sistemi karakterize edebilecek performans ölçüleri (cevapların) ve bunlar üzerinde etkili olabilecek faktörlerin veya değişkenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu aşamada araştırmacının proses hakkında teknolojik bilgiye sahip olması, bu faktörlerin belirlenmesi ve işletme bölgesi (operating region) üzerinde bir deneme bölgesinin (region of interest) seçilmesi açısından büyük kolaylık sağlamaktadır. Birçok proseste bu faktörler oldukça kabarık bir liste oluşturur. Bu durumda, bir takım ön denemeler yapılarak bu faktörler arasından istatistiksel olarak en önemli olan birkaç tanesi seçilebilir. Bu denemeler "eleme (screening) denemeleri" olarak adlandırılır ve araştırmanın ilerleyen kısımlarında daha az sayıda deneme yapılarak maliyet ve zaman açısından önemli avantajlar sağlanmasına neden olur (Eren, 2004).

Önemli değişkenler ve deneme bölgesi belirlendikten sonra Cevap Yüzey Yöntemi'nin diğer aşamasına geçilir. İkinci aşamada amaç, bağımsız değişkenlerin deneme bölgesi içerisinde belirlenen seviyelerinin sistemin yanıtında oluşturdukları değerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlemektir. Optimum noktaya yaklaşıldıkça, oluşturulan yanıt yüzeydeki eğrilik doğal olarak daha belirgin hale gelmektedir. Dolayısıyla, CYY'in bu aşamasını birinci dereceden modeller kullanılarak bu eğriliğin test edilmesi oluşturmaktadır. Birinci dereceden modeller sistemin yanıtını belirlemede yeterli olursa, seçilen deneme bölgesinin sistemin optimum performansından uzakta olduğu anlaşılır ve yeni bir deneme bölgesi seçilerek faktör ayarlamaları yapılır. Bu işlem, oluşturulan yanıt yüzeydeki eğriliğin önemli olduğu bölgeler bulununcaya kadar devam eder. Bu işlem bölge tarama (region seeking) olarak adlandırılır. Cevap Yüzey çalışmasının üçüncü aşaması işlem optimum noktaya yaklaşıldığında başlar. Bu noktada araştırmacı, optimum nokta çevresinde gerçek yanıt fonksiyonunu doğru ve hassas bir şekilde tahminlemeye çalışır. Gerçek cevap fonksiyonu, optimum nokta etrafında önemli eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde genellikle ikinci dereceden polinomiyal modeller kullanılır. Bu modelde eğriliğin tahminlenebilmesi için bir önceki aşamada uygulanan deneysel tasarıma ilave deneysel noktaların eklenmesi

gerekmektedir (Central Composite Rotatable Dizayn). Uygun bir model elde edildikten sonra, bu model optimum noktanın araştırılmasında kullanılır.

Ancak pratikte bazı durumlarda, araştırmacının bir takım fiziksel kısıtlamalar nedeniyle, tasarım değişkenlerini belli aralıklar içerisinde incelemesi gerekmektedir. Diğer bir ifadeyle, deneme bölgesi (region of interest) ve işletme bölgesi aynıdır. Dolayısıyla, bölge taraması yapılması gerektiren bir durum yoktur. Bunula birlikte, araştırmacı proses hakkında daha önceden detaylı bilgiye sahipse bahsedilen bu aşamalardan bir veya birkaç tanesini kullanmayabilir. Bu sayede hem zaman hem de maliyet açısından önemli kazançlar sağlanmış olabilir.

Görüldüğü gibi CYY, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin cevabını ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan ampirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir. Dolayısıyla, denemelerin dizayn edilmesi, model geliştirilmesi (regresyon analizi), varyans analizi (ANOVA) ve optimizasyon CYY'nin başlıca kısımlarını oluşturmaktadır (Eren, 2004).

CYY, prosesteki bağımsız değişkenlerin, ayrı ayrı veya birlikte etkilerini ortaya koymaktadır. Bağımsız değişkenlerin etkilerinin incelenmesinin yanında, oluşturulan matematik modelle tüm proses de açıklanabilmektedir. CYY'de kullanılan matematiksel model denklem, ikinci derece polinomiyal denklemdir. Gıda proseslerinde gerçekleşen fiziksel ve kimyasal değişimlerin tamamını ikinci derece denklemlerle açıklamak mümkün olmamakla birlikte bağımsız değişkenlerin aralıklarının uygun bir şekilde seçilmesiyle CYY gıda proseslerinin incelenmesinde oldukça etkili bir yöntem haline gelmektedir. Ancak CYY ile elde edilen ikinci derece polinom modellenen sistemi her zaman için yüksek bir uyum ile tanımlayamamaktadır. Dahası, CYY ile elde edilen yüzey grafikleri deneysel veriler ile değil, elde edilen model eşitlik ile tahmin edilen veriler kullanılarak oluşturulmaktadır. Bu da elde edilen model eşitliğin yüksek bir uyuma sahip olmaması durumunda, yüzey grafiklerinin sistemin gerçek davranışını ifade etmemesi sonucunu doğurmaktadır (Dudak ve ark., 2005).

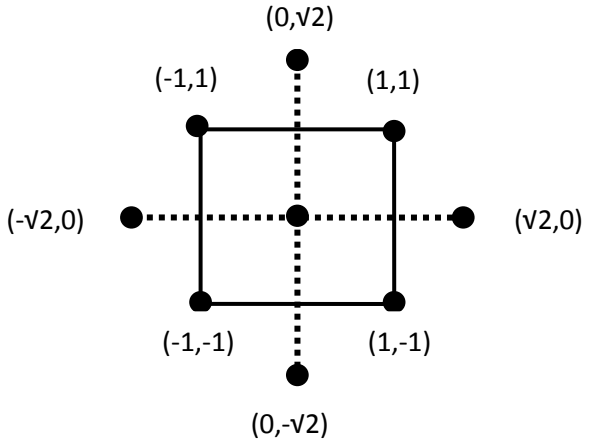
2.4.1 İkinci dereceden modeller için kullanılan tasarımlar

İkinci dereceden bir polinom [1+2n+n (n-1) ⁄2] adet (n: bağımsız değişken sayısı) parametre içermektedir. Deneysel tasarım en az polinomun içerdiği parametre sayısı kadar nokta kullanılarak oluşturulmalıdır. Her bağımsız değişken en az üç seviyede temsil edilmelidir. İkinci dereceden modeller için kullanılan iki deneysel tasarım aşağıda tanımlanmıştır (Myers and Montgomery, 1995).

2.4.1.1 Merkez-tümleşik tasarım

İki bağımsız değişken ile oluşturulmuş bir merkez-tümleşik tasarım, bir dairenin çevresinde eşit uzaklıklarda bulunan sekiz nokta ve merkezinde bir veya daha fazla noktadan oluşmaktadır. Üç bağımsız değişken olduğu durumlarda ise bir kürenin yüzeyinde bulunan 14 nokta ve merkezinde 1 veya daha fazla noktadan oluşmaktadır. Şekil 2.3'de iki bağımsız değişkenden oluşan bir merkez tümleşik tasarım gösterilmektedir (Myers and Montgomery, 1995).

Merkez-tümleşik tasarımın en büyük özelliği eksenel mesafenin ve merkezde yapılan tekrarların sayısının belirlenebilmesidir.

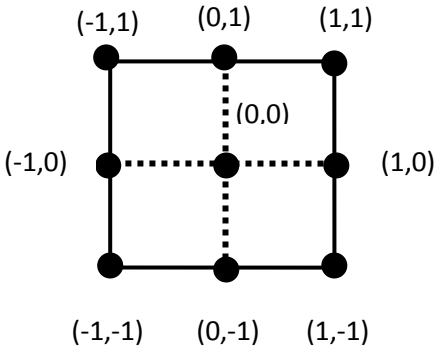


Şekil 2.4. Merkez tümleşik tasarımın grafiksel gösterimi

2.4.1.2 Yüzey merkezli tasarım

Yüzey merkezli tasarım, iki parametreli bir tasarım için eksenel noktaların kare kenarlarının orta noktalarına kaydırılması sonucu elde edilmektedir (Şekil 2.5).

Araştırmacı ya da mühendis için ön denemelerle belirlenen bölge dışındaki noktalarda deney yapmak anlamlı olamayabilir. Merkez-tümleşik tasarımda çalışılmak istenen aralıkların dışında dört adet nokta daha bulunmaktadır. Bazı durumlarda bu noktalarda deney yapmak anlamsız ya da imkansız olabilmektedir. Bu durumda yüzey-merkezli tasarımın kullanılması daha uygun olmaktadır (Myers and Montgomery, 1995).



Şekil 2.5. Yüzey merkezli tasarımın grafiksel gösterimi

2.4.2 Cevap yüzey yönteminin kullanıldığı çalışmalar

Cevap yüzey yönteminin fermantasyon proseslerinde kullanımına ait pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmında sadece ortam kompozisyonunu oluşturan besiyeri bileşenlerinin optimizasyonu, diğer çalışmalarda ise fermantasyonu etkileyen parametreler arasındaki ilişki incelenerek proses optimizasyonu sağlanmıştır. Cevap yüzey yöntemi kullanılarak *Zymomonas mobilis* ile şeker kamışı melasından sorbitol (Cazetta et al., 2005), şeker pancarı melasından kitozan (Göksungur, 2004), ksilitol (Faveri et al., 2004),

şeker pancarı melasından laktik asit (Kotzamanidis et al., 2002), kitinaz enzimi (Nawani and Kapadnis, 2005), karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde, sentetik üretim ortamında pullulan (Göksungur ve ark., 2005), immobilize hücreler ile pullulan (Ürküt ve ark., 2007), farklı fermantasyon koşullarında β-galaktosidaz enzimi (Dağbağlı ve Göksungur, 2008, 2009), atık nisaşta kullanılarak pullulan (Göksungur ve ark., 2011) üretimlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma

Çalışmada levan üretiminde Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilen *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-806, *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 ve *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14234 kullanılmıştır. Bunlardan en çok levan üretebilen suş olan *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 çalışmanın daha sonraki aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Mikroorganizmalar kültür besiyeri ortamında +4ºC'de saklanmış ve her 5 haftada bir taze ortama ekim yapılarak kültür yenilenmiştir. Taze kültür ortamına ekilen mikroorganizma 28°C'de 1 gün boyunca geliştirilmiştir. Gelişen mikroorganizmalar yeniden kullanılana kadar depolanmak üzere +4ºC'deki buzdolabına yerleştirilmiştir.

3.1.2 Substrat

Çalışmada substrat olarak kullanılan besiyeri sakkaroz ağırlıklı bir üretim ortamıdır. Üretim için iki farklı besiyeri hazırlanmıştır. Bunların biri üretim ortamı diğeri ise kültür ortamı olarak adlandırılmıştır. Üretim ve kültür ortamlarının bileşenleri aynı kimyasallar olup sadece amaca yönelik olarak miktarları faklıdır. Öncelikle mikroorganizmanın geliştirilmesi için kültür ortamı hazırlanmıştır. Bu ortamın kompozisyonu üretim ortamının kompozisyonuna benzemekle birlikte, koşullar mikroorganizmanın geliştirilmesi için uygun şekilde ayarlanmıştır. Kültür ortamında mikroorganizma geliştirilmiş ve daha sonra üretim ortamlarına aşılanmıştır. Azot kaynağı olarak maya ekstraktı, pepton, tripton ve mısır ıslatma suyu sırayla denenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Substratların hazırlanışı

Zymomonas mobilis hücrelerinin üretilmesinde kullanılan kültür ortamı kompozisyonu ve levan üretiminde kullanılacak üretim ortamı kompozisyonu sırasıyla Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kültür ortamının kompozisyonu: (pH= 5).

Bileşen	**Miktarı (g/L)**
Sakkaroz	50
Maya Ekstraktı	7.0
KH_2PO_4	2.5
$(NH_4)_2SO_4$	1.6
$MgSO_4.7H_2O$	1.0

Çizelge 3.2 Kullanılan üretim ortamı kompozisyonu: (pH= 5).

Bileşen	**Miktarı (g/L)**
Sakkaroz	150-300
Maya Ekstraktı	2.5
KH_2PO_4	1.0
$(NH_4)_2SO_4$	1.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.5

Substrat konsantrasyonunun levan üretimine etkisini incelemek için 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 g/L sakkaroz içeren üretim ortamları hazırlanmıştır. Daha sonraki optimizasyon aşamaları için daha yüksek levan üretiminin sağlandığı 150-300 g/L sakkaroz konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

Azot kaynağının levan üretimine etkisini incelemek için maya ekstraktı, pepton, tripton ve mısır ıslatma suyu içeren üretim ortamları kullanılmıştır. Denenen azot kaynakları %0,25 maya ekstraktı ile eşit azot temelinde kullanılmıştır. Bu amaçla ortama, azot oranları belirlenen maddelerin 2,5 g/L

maya ekstraktı ile aynı oranda azot verecek miktarları 150 g/L sakkaroz içeren başlangıç substart konsantrasyonundaki fermantasyon ortamına ilave edilmiştir. Çizelge 3.3'te denenen azot kaynakları, içerdikleri azot oranları ve fermantasyon ortamına ilave edilen miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.3 Levan üretiminde kullanılan bazı azotlu maddelerin içerdikleri azot oranları ve fermantasyon ortamına ilave edilen miktarları

Azot kaynağı	**Azot (%)**	**Ortama ilave edilen miktar (g/L)**
Maya ekstraktı	9.80	2.5
Mısır ıslatma suyu	6.44	3.8
Pepton	14	1.75
Tripton	12.70	1.95

Yukarıda belirtilen kompozisyonlardaki ortamlar hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra soğutularak fermantasyona hazır hale getirilmiştir. Ortam pH'ı sterilizasyondan önce ortama 0,1 N NaOH ilave edilerek ayarlanmıştır.

3.2.2 Kesikli sistemde levan üretimi

Levan üretimi, ilk olarak sıcaklık kontrollü inkübatörde çalkalama yapılmaksızın, içerisinde 100 ml üretim ortamı bulunan 250 ml'lik erlenlerde statik kültür olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle stok kültür ortamından taze kültür ortamına öze ile aşılanmış ve 28°C sıcaklıkta 24 saat boyunca mikroorganizmanın gelişmesi sağlanmıştır. Kültür ortamında geliştirilen mikroorganizma, fermantasyon başlangıcında aseptik koşullarda %5 (v/v) oranında, hazırlanan üretim ortamına inoküle edilmiştir. Levan üretiminin ilk aşamasında, başlangıç substrat konsantrasyonunun levan üretimine etkisini belirlemek için 100-350 g/L arasında sakkaroz içerecek şekilde fermantasyon

ortamları hazırlanmış ve fermantasyon süresince her 12 saatte bir örnek alınarak biyokütle, levan ve kalan şeker miktarları belirlenmiştir. Fermantasyon denemeleri iki paralel halinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları alınmıştır.

Levan üretiminin ikinci aşamasında, levan üretimine etki eden parametreler olan başlangıç substrat konsantrasyonu, fermantasyon süresi ve pH değişkenlerinin levan üretimine olan lineer, kuadratik ve interaksiyon etkileri cevap yüzey yöntemi (CYY) kullanılarak incelenmiş ve bu parametrelerin maksimum levan üretimini sağlayacak optimum seviyeleri belirlenmiştir. Bu amaçla MINITAB Release 13.20 istatistik paket programı kullanılarak deneme planı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler kullanılarak bir matematik model oluşturulmuş ve elde edilen bu model yardımıyla proses için optimum koşullar belirlenmiştir. Belirlenen bu koşullarda *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 hücreleri Ca-aljinatta tutuklanmış ve dolgulu yatak biyoreaktör ile sürekli sistemde levan üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 *Zymomonas mobilis* hücrelerinin Ca-aljinatta immobilizasyonu

Şekil 3.1'de gösterilen immobilizasyon yönteminde ilk olarak 25 ml % 4'lük sodyum aljinat (Sigma, A-2033) çözeltisi hazırlanmıştır. Yığın oluşumunu engellemek için, manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan saf suya toz haldeki sodyum aljinat azar azar ilave edilmiş ve çözünmeyi sağlamak için karıştırma yarım saat kadar devam ettirilmiştir. Oluşan hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için bir süre dinlendirilen çözelti 120 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon ile zor çözünen sodyum aljinatın aynı zamanda tam olarak çözünmesi de sağlanmıştır. Sterilize edilip soğutulan sodyum aljinat çözeltisi, *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 bakterilerini içeren kültür ortamı ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılmıştır.

Hücre süspansiyonu + % 4 steril sodyum aljinat (1:1,v/v)

↓

Sürekli karıştırılan % 2 $CaCl_2$ çözeltisine damla damla besleme

↓

2.0 - 2.4 mm çapında kalsiyum aljinat boncukları

↓

Fizyolojik su (% 0.85 NaCl) ile boncukların yıkanması

↓

Üretim ortamı ve şartlarında aktivasyon

↓

+ 4 °C'de % 0.2 maya ekstraktı çözeltisinde saklama

↓

Fermantasyon

Şekil 3.1 *Zymomonas mobilis* bakterilerinin Ca-aljinat jelinde immobilizasyonu

Şekil 3.2'de gösterilen immobilizasyon düzeneğinde hücre süspansiyonu ile % 2 sodyum aljinat içeren karışım (1:1 oranında karıştırıldığı için derişim %2'ye düşer), peristaltik pompa kullanılarak 1 ml'lik standart plastik mikropipet ucundan 1 litre, % 2'lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatılmıştır. Damlalar $CaCl_2$ ile temas ettikleri anda katılaşmış ve içlerinde *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 hücreleri barındıran Ca-aljinat boncukları elde edilmiştir (Şekil 3.3). Sürekli

karıştırılan $CaCl_2$ çözeltisinde 30 dakika daha tutularak sertleşmeleri sağlanan boncuklar, fazla kalsiyum iyonlarını ve hapsedilmemiş serbest haldeki hücreleri uzaklaştırabilmek için steril fizyolojik su ile (% 0.85 NaCl) yıkanmıştır.

İmmobilize bakterileri içeren kalsiyum aljinat boncukları, üretim ortamında 28 °C'de çalkalamalı inkübatörde 12 saat tutularak aktive edilmiştir. Fermentasyon öncesi yapılan bu aktivasyon işlemi ile tutuklanan hücre popülasyonu arttırılmıştır (Audet ve ark.,1988;Audet ve ark.,1989;Tuli et al.,1985). Kalsiyum aljinat boncukları kullanılıncaya kadar steril % 0.2 maya ekstraktı içeren sıvıda +4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2 Ca-aljinat boncuklarının elde edilmesi (solda: hücre süspansiyonu+ Na-aljinat çözeltisi karışımı, sağda: boncukların oluşmaya başladığı %2'lik $CaCl_2$ çözeltisi)



Şekil 3.3 *Z.mobilis* hücrelerini içeren Ca-aljinat boncukları

Şekil 3.2'de tutuklanmış *Zymomonas mobilis* hücrelerini içeren Ca-aljinat boncukları gösterilmiştir.

3.2.4 Sürekli sistemde levan üretimi

Çalışmada kalsiyum aljinatta immobilize edilen *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 hücrelerini içeren boncuklar dolgulu yatak biyoreaktöre, sürekli sistemde levan üretimini gerçekleştirme denemeleri için doldurulmuştur.

İmmobilize hücre ile dolu olan dolgulu yatak biyoreaktöre (Şekil 3.4), CYY ile belirlenen optimum koşullarda hazırlanan sentetik üretim ortamı farklı debilerde alttan verilmiş, üst kısmından da levan içeren fermantasyon sıvısı alınmıştır. Daha sonra bu sıvıdan alt akım işlemleriyle levan ayrılmış ve kurutma/öğütme işlemleri ile granül haline getirilmiştir.



Şekil 3.4 Dolgulu yatak biyoreaktör

Çizelge 3.4'te de çalışmada kullanılan dolgulu yatak biyoreaktörün özellikleri verilmiştir.

Çizelge 3.4 Ca-aljinatta immobilize edilmiş *Zymomonas mobilis* ile levan üretiminde kullanılacak dolgulu yatak biyoreaktörün özellikleri.

Dolgu Maddesi	Ca-aljinat boncukları
İç Çap	1.57 cm
Kolon Yüksekliği	49 cm
Toplam Reaktör Hacmi	95 ml
Yatak Hacmi	85 ml
Boş Hacim	22 ml

3.2.5 Granül levan üretimi

Fermantasyon ortamından alınan fermantasyon sıvısı santrifüj edilerek biyokütle ayrılmış, kalan sıvı kısım 3 hacim etil alkol ile muamele edilmiş ve pH 10'a ayarlanarak levanın çökmesi sağlanmıştır.

Son santrifüj ile alkolü uzaklaştırılan mikrobiyal polisakkarit, hava sirkülasyonlu ortamda 28 °C'de 1 hafta kurutulmuştur. Kurutulan polisakkarit çekiçli değirmenden geçirilerek granül haline getirilmiştir.

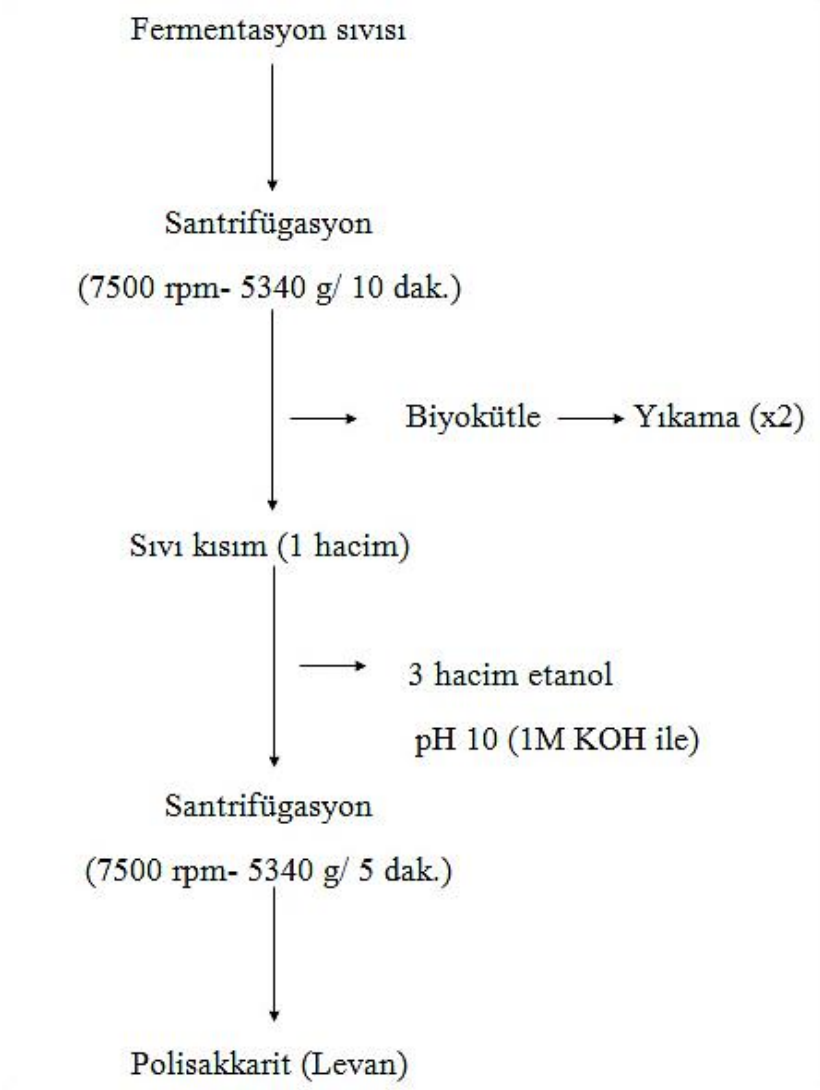
3.3 Analiz Yöntemleri

3.3.1 Biyokütle (hücre) miktarı

Fermantasyon sıvısından alınan 50 ml örnek 5340 g (7500 rpm)'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve saf su ile iki defa yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 80ºC'de sabit tartıma kadar kurutularak kuru hücre ağırlığı belirlenmiştir ve tekrar sulu çözeltisi hazırlanarak 590 nm'de spektrofotometrede okunarak kalibrasyon eğrisi çıkartılmıştır (Bekers et al., 2002a).

3.3.2 Mikrobiyal polisakkarit

Şekil 3.5'te fermantasyon sıvısındaki levanı elde etmek için kullanılan yöntem verilmiştir. Biyokütlesi ayrılan fermantasyon sıvısına 3 hacim etil alkol ilave edilmiş ve 1 M KOH ile pH 10'a getirilerek polisakkaritin çökmesi sağlanmıştır. (Viikari, 1984).



Şekil 3.5 Levan üretimi şeması (Viikari, 1984)

Etil alkol ekledikten ve pH'sını ayarladıktan sonra çöken polisakkariti üst fazdan ayırmak için biyokütle içermeyen fermantasyon sıvısı 5340 g (7500rpm)'de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çöken polisakkaritteki levan miktarının belirlenmesi için ise, elde edilen polisakkarit aynı miktardaki 0.1 M HCl ile 100˚C'de 60 dakika hidrolize uğratılmıştır. Fruktoz birimi, DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Levan miktarı, fruktoz birimi olarak hesaplanmıştır.

3.3.3. İndirgen şeker

Levan tayininde belirtilen indirgen şeker(fruktoz) miktarının saptanması için, uygun oranda seyreltme yapıldıktan sonra dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi (Ghose, 1984) kullanılmıştır. Buna göre 0.09, 0.18, 0.27, 0.36 mg/mL fruktoz içeren standart çözeltiler kullanılmıştır ve okumalar spektrofotometrede (Analyticjena Spekol-1300) 540 nm dalga boyunda yapılmıştır.

3.3.4 Toplam şeker

Bölüm 3.3.2'de belirtildiği şekilde polisakkarit etil alkolle çöktürülerek ayrıldıktan sonra, kalan sıvı kısımdan örnek alınmış ve kalan şeker miktarının belirlenmesi için örnekler uygun oranda seyreltilip Fenol-Sülfirik Asit yöntemine göre toplam şeker tayin edilmiştir (Dubois et al., 1956). Bu yöntemde 20, 40, 60, 80, 100 mg/L sakkaroz içeren standart çözeltiler kullanılmış ve okumalar spektrofotometrede (Analyticjena Spekol-1300) 490 nm dalga boyunda yapılmıştır.

3.3.5 pH

Örneklerde pH okumaları WTW Series pH 720 marka pH metre ile yapılmıştır. Cihazın kalibrasyonu düzenli aralıklarla standart pH tampon çözeltileri ile yapılmıştır.

3.3.6 Levan üretimi verimlilik hesapları

Dönüşüm verimi, elde edilen levanın fermantasyonda harcanan sakkaroz miktarına yüzdesel oranı şeklinde tanımlanmıştır. Bu değer fermantasyonda kullanılan substratın (sakkaroz) ne kadarının levan üretimi için harcandığını göstermektedir. Substrat, ürünün (levan) yanı sıra biyokütle oluşumu için de harcandığı için, harcanan substrat başına oluşan ürünün hesaplandığı bu terim önem kazanmaktadır.

Dönüşüm verimi, %= P / S_0-S

P: Fermantasyon sonunda oluşan levan, g/L

S_0: Başlangıçta ortamda bulunan sakkaroz, g/L

S: Fermantasyon sonunda kullanılmadan kalan sakkaroz, g/L

Efektif Verim= P/S_0

P: Fermantasyon sonunda oluşan levan, g/L

S_0: Başlangıçta ortamda bulunan sakkaroz, g/L

Kesikli sistemde hacimsel verimlilik, birim zamanda oluşan levan miktarı olarak tanımlanmıştır ve levan oluşum hızını göstermektedir.

Verimlilik ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$)= P_t / t

P_t: belirli bir t saatinde ortamda bulunan levan konsantrasyonu

t: süre (saat)

Sürekli sistemde hacimsel verimlilik;

Verimlilik ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$)= D (h^{-1}) × P ($g\ L^{-1}$)

D: Sürekli sistemde seyreltme hızı (h^{-1})

P: Sürekli sistemde belirli bir seyreltme hızında, denge halinde elde edilen ürün konsantrasyonu ($g\ L^{-1}$)

3.3.7 İstatistiksel analizler

Levan üretiminde kullanılan deneysel tasarım ve istatistiksel analizinde Minitab Statistical Software (Release 13.20) kullanılmıştır. Levan üretiminin optimizasyonu için deneysel tasarımda kullanılan parametreler (bağımsız değişkenler) ve bu parametrelerin ön denemeler sonucunda seçilen seviyeleri Çizelge 3.5'te listelenmiştir. Çalışmada, 20 deneysel noktadan (14 farklı kombinasyona sahip ve merkezde altı tekrarlı) oluşan ve üç değişken ile oluşturulan yüzey merkezli istatiksel tasarım (face central statistical design, α=1) kullanılmıştır. Her deneme paralel yapılmış ve denemelerin standart sapması 1.7 ile 3.1 arasında değişmiştir. Seviyeler, 0 merkez noktası olmak üzere, –1, 0 ve +1'dir. Her faktörün merkez noktasındaki gerçek seviyesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kodlanmış değer} = \frac{\text{Gerçek seviye} - (\text{yüksek seviye} + \text{düşük seviye})/2}{(\text{yüksek seviye} - \text{düşük seviye})/2}$$

Proses değişkenlerinin levan üretimine etkisini tahminleyen ikinci derece polinomiyal denklem aşağıda verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

Burada, β_0, β_1, β_2……..β_{23} regresyon katsayılarını, X_1, X_2, X_3 bağımsız değişkenleri ifade etmektedir.

Oluşturulan bu modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, quadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güvenlik seviyesinde Fischer (F testi) uygulanarak bulunmuştur. Her bir etki için hesaplanan F_{cal} ile tablo F_{tab} değerleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelden çıkarılmıştır. Bir model sistemin gerçek cevaba uygun

bir yaklaşım olup olmadığına uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz olması ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun %95 güvenlik seviyesinde önemli olması koşulu ile karar verilmiştir.

Çizelge 3.5'te levan üretiminin optimizasyonu için kullanılan başlangıç substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve pH seviyeleri verilmiştir.

Çizelge 3.5 İncelenen parametreler ve seviyeleri

			Değişken seviyeleri		
Faktörler	Bağımsız değişkenler	Semboller	-1	0	+1
X_1	Substrat konsantrasyonu (g/L)	SK	250	300	350
X_2	İnkübasyon süresi (saat)	T	24	36	48
X_3	pH	pH	4.5	5.0	5.5

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

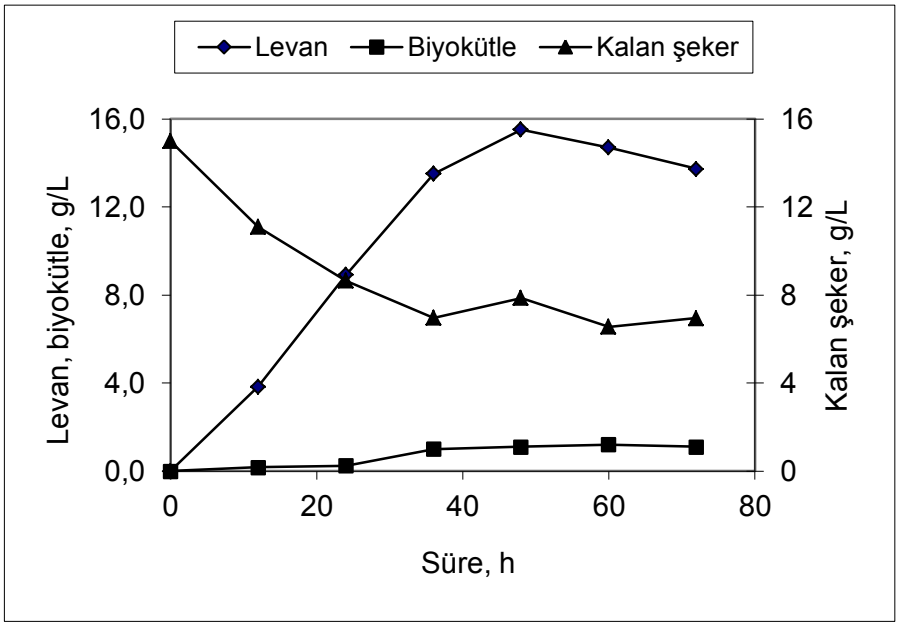
4.1 Farklı *Zymomonas mobilis* Suşlarının Levan Üretimi Üzerine Etkisi

Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilen *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-806, *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 ve *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14234 suşlarının levan üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacı ile başlangıç şeker konsantrasyonu 150 g/L olan fermantasyon ortamı hazırlanmış ve 28°C'deki inkübatörde biyokütle, kalan şeker ve levan üretiminin kinetikleri belirlenmiştir.

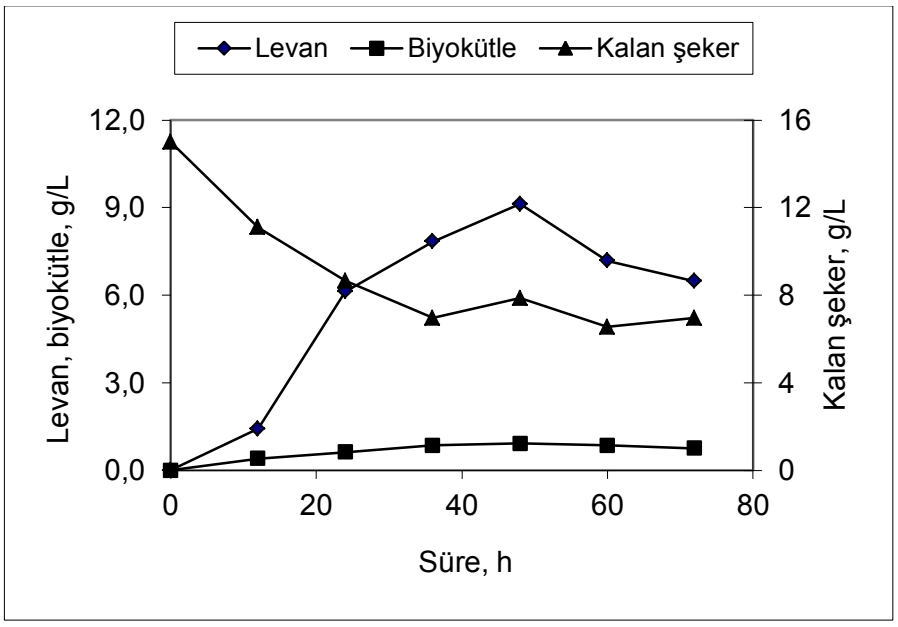
Şekil 4.1, 4.2. ve 4.3'de görüldüğü gibi polisakkarit konsantrasyonu fermantasyonun 48. saatine kadar artmış, daha sonra azalmaya başlamıştır. Levan konsantrasyonundaki bu düşüş, fermantasyonun ileri aşamalarında mikroorganizma tarafından üretilen levanı yıkma özelliğine sahip bir enzim ile levanın hidrolizinden kaynaklanabilir.

Elde edilen en yüksek levan üretimleri fermantasyonun 48. saatinde *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 ile 15.52 g/L (Şekil 4.1), *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14234 ile 9.12 g/L (Şekil 4.2) ve *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-806 ile 7.48 g/L (Şekil 4.3) olarak bulunmuştur.

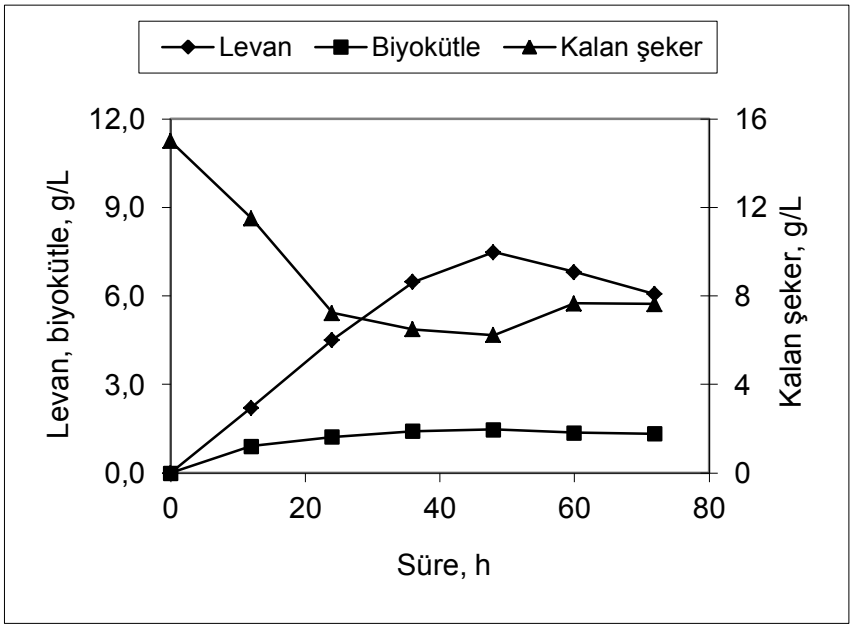
Muro et al. (2000), farklı üretim ortmalarında farklı *Zymomonas mobilis* mutant suşlarının levan üretimine etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında, *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ATCC 10988, *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* FloB3, *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* 10J14 suşları ile *Zymomonas mobilis* subsp. m*obilis* HL9, *Zymomonas mobilis* subsp. m*obilis* HL11 ve *Zymomonas mobilis* subsp. m*obilis* HL29 suşlarını kullanmışlardır. En yüksek levan üretimi (41g/l), 200 g/l başlangıç substrat konsantrasyonu ve HL29 suşu kullanılarak elde etmişlerdir. Fermantasyon sonunda elde edilen levan miktarının, kullanılan mikroorganizmanın suşuna ve substratın kimyasal kompozisyonuna bağlı olduğunu belirlemişlerdir.



Şekil 4.1 *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 ile levan üretiminin kinetiği. (T=28 ˚C, pH=5.0,Başlangıç substrat konsantrasyonu=150 g/L)



Şekil 4.2 *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14234 ile levan üretiminin kinetiği. (T=28 ˚C, pH=5.0, Başlangıç substrat konsantrasyonu=150 g/L)



Şekil 4.3. *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-806 ile levan üretiminin kinetiği. (T=28 ˚C, pH=5.0, Başlangıç substrat konsantrasyonu=150 g/L)

Zymomonas mobilis subspecies *mobilis* NRRL B-14023 ile fermantasyonda en yüksek ürün dönüşüm verimi 48. saatte % 21.74 bulunmuştur. En yüksek efektif verim fermantasyonun 48. saatinde % 10.3 olarak bulunmuştur. Fermantasyonun 36. saatinde en yüksek verimlilik ise 0,375 g L^{-1} h^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Zymomonas mobilis subspecies *mobilis* NRRL B-14234 ile gerçekleştirilen fermantasyonda en yüksek ürün dönüşüm verimi 48. saatte %12.77 olarak bulunmuştur. En yüksek efektif verim, fermantasyonun 48. saatinde % 6.08 olarak hesaplanmıştır ve en yüksek verimlilik ise 0.255 g L^{-1} h^{-1} olarak 24. saatte elde edilmiştir.

Zymomonas mobilis subspecies *mobilis* NRRL B-806 ile gerçekleştirilen levan üretiminde en yüksek ürün dönüşüm verimi fermantasyonun 60. saatinde %9.29 olarak hesaplanmıştır. Yani kullanılan sakkarozun % 9.29'u levana dönüşmüştür. En yüksek efektif verim 48. saatte % 4.98 olarak hesaplanmış, en yüksek verimlilik ise 0.188 g L^{-1} h^{-1} olarak 24. saatte elde edilmiştir.

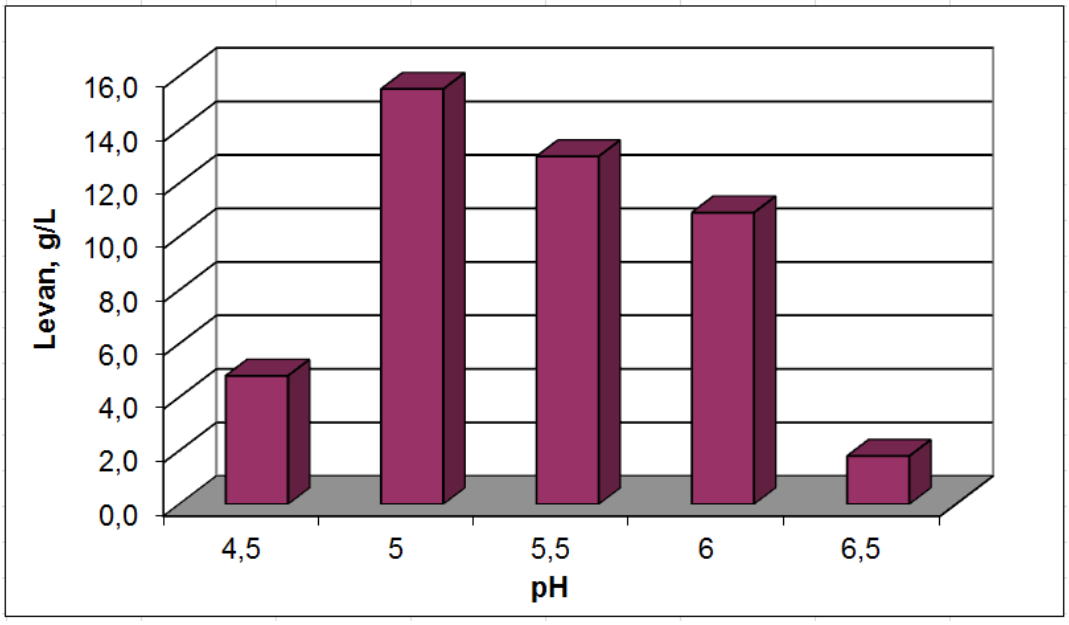
Zymomonas mobilis subspecies *mobilis* NRRL B-14023, *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14234 ve *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-806'nın spesifik üreme hızları sırasıyla 0.0593, 0.0235 ve 0.0133 h^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın diğer aşamalarında, en yüksek levan üretimini gerçekleştiren suş olan *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 kullanılmıştır.

4.2 Başlangıç pH Değerlerinin Levan Üretimi Üzerine Etkisi

Zymomonas mobilis NRRL B-14023 suşu ile sentetik ortamlardaki farklı başlangıç pH değerlerinin levan üretimine olan etkisini görmek için, 28ºC sıcaklıkta pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5 başlangıç değerlerinde denemeler yapılmıştır.

Elde edilen levan miktarları Şekil 4.4'de verilmiştir. Görüldüğü gibi en yüksek levan miktarı başlangıç ortam pH'sı 5 (15.52 g/L) olduğunda elde edilmiştir pH 4.5, 5.5, 6 ve 6.5 değerlerinde ise levan miktarı sırasıyla 4.8, 13, 8.9 ve 1.8 g/L olarak bulunmuştur.

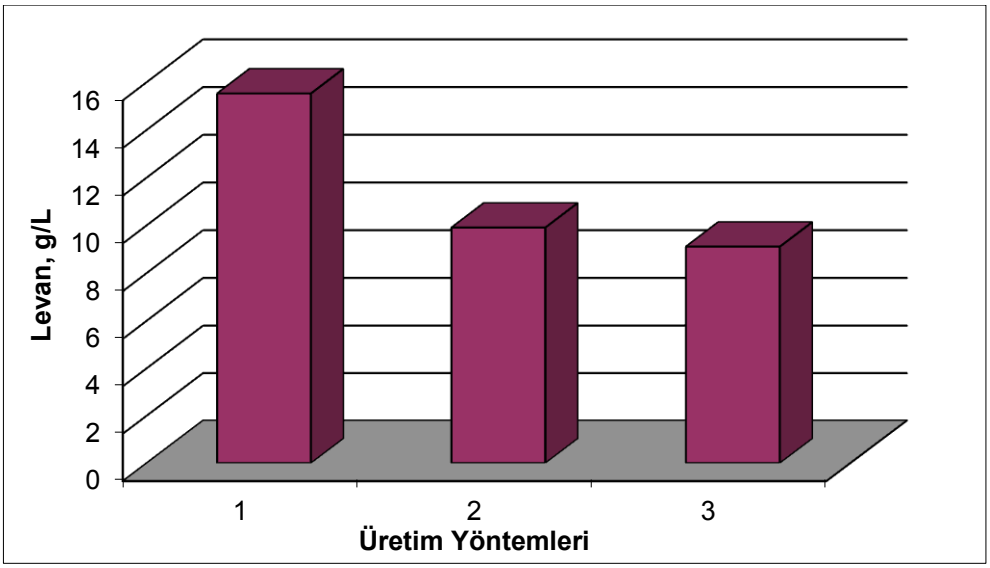


Şekil 4.4. Başlangıç pH değerlerinin levan üretimine etkisi (*Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023. T=28 ˚C, Başlangıç substrat konsantrasyonu = 150 g/L)

Ananthalakshmy and Gunasekaran (1999), *Zymomonas mobilis* B-4286 suşu ile farklı başlangıç pH koşullarının levan üretimi etkisi üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar en yüksek levan üretimini 150 g/L sakkaroz konsantrasyonunda ve pH 5'de 14.5 g/L olarak belirlemişlerdir. pH 4'ün altında mikrobiyal gelişme çok düşük olduğu için levan üretimi gözlenmemiş, pH 7'nin üzerinde levan üretiminin azaldığını tespit etmişlerdir. Levan oluşturma aktivitesine sahip levansükraz enzimi pH 5'in üzerinde sakkaroz hidroliz aktivitesini yitirmeye başlamıştır (Crittenden and Doelle, 1994). Levansükraz enziminin levan sentezi için optimum noktası pH 5'tir. Bu noktanın üzerindeki pH değerlerinde oligosakkaritin, levandan daha fazla oluştuğu belirlenmiştir (Yanase et al., 1992).

4.3 Karıştırma ve Havalandırmanın Levan Üretimine Etkisi

Karıştırma ve havalandırmanın levan üretimi üzerine etkisini incelemek için 48 saatlik üretim, karıştırmalı ve ilk 8 saat karıştırmalı daha sonra karıştırmasız olarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5'te de görüldüğü gibi levan üretimi 28ºC'de 48 saat boyunca karıştırmasız olarak gerçekleştirildiğinde en yüksek miktarda levan (15.52 g/L) elde edilmiştir. Karıştırmalı (150 rpm) ve ilk 8 saati karıştırmalı olarak gerçekleştirilen levan üretimlerinde ise sırasıyla 9.9 ve 9.1 g/L levan üretilmiştir.



Şekil 4.5 Karıştırma ve havalandırmanın levan üretimine etkisi (*Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023. T=28 ˚C, Başlangıç substrat konsantrasyonu = 150 g/L; 1. karıştırmasız, 2. karıştırmalı, 3. ilk 8 saat karıştırmalı)

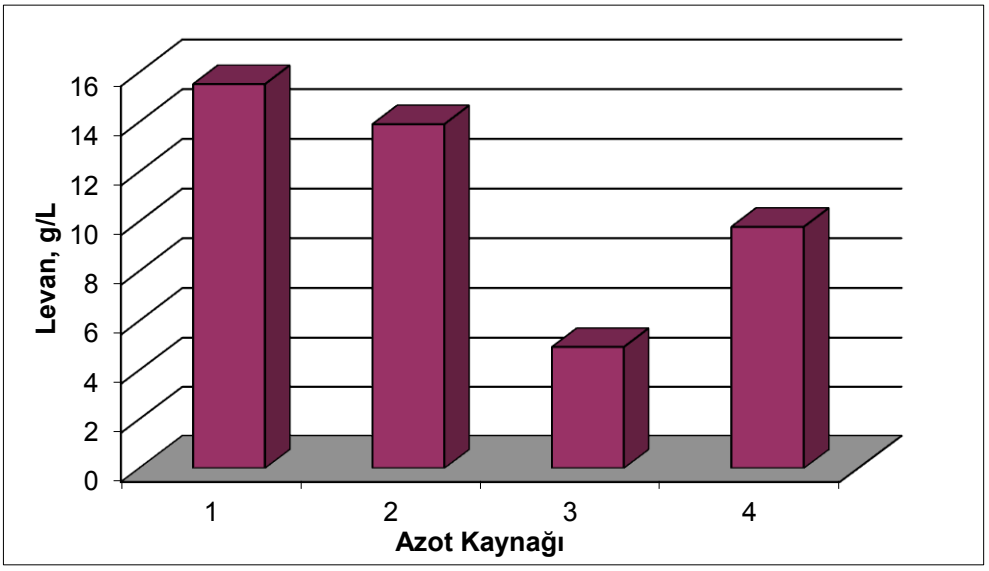
Sonuç olarak çalıştığımız bakterinin (*Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis*) fakültatif anaerob olmasına rağmen karıştırmalı ortamlarda (oksijenli) karıştırmasız (oksijensiz) ortamlara göre daha az levan üretme sebebinin, fazla oksijenin *Zymomonas mobilis* gelişimini olumsuz yönde etkilemesi olduğu belirtilmiştir (Doelle et al., 1993).

Melo et al., (2007) levan üretimi üzerine sıcaklık, karıştırma hızı, başlangıç sakkaroz konsantrasyonu ve maya ekstraktı konsantrasyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla faktöriyel deney tasarımı kullanmışlar ve araştırmalarının sonucunda, levan üretiminin başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve karıştırma hızına bağlı olduğu ancak maya ekstraktı konsantrasyonuna bağlı olmadığı gözlemişlerdir. Çalışmada 50, 75 ve 100 rpm orbital karıştırma hızları kullanılmış ve 20 °C sıcaklıkta karıştırma hızını 50 'den 100 rpm'e doğru arttırmanın levan üretiminde artışa neden olduğunu (5.6 g/L), 30 °C sıcaklıkta ise karıştırmanın levan üretiminde önemli bir artışa neden olmadığını tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda levan üretimi için optimum koşulların 100 rpm karıştırma hızı, 20ºC sıcaklık ve 250 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonu olduğunu belirlemişlerdir.

4.4 Farklı Azot Kaynaklarının Levan Üretimine Etkisi

Çalışmada levan üretimine farklı azot kaynaklarının etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton ve tripton azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu denemelerde maya ekstraktının yerine kullanılan azot kaynakları, 2.5 g/L maya ekstraktı ile eşit miktarda azot içerecek şekilde sakkaroz içeren üretim ortamına ilave edilerek fermantasyon gerçekleştirilmiştir.

En yüksek levan üretimi (15.52 g/L), üretim ortamında maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.6). Azot kaynağı olarak mısır ıslatma suyunun kullanıldığı üretimlerde de 13.91 g/L levan bulunmuştur. Diğer azot kaynakları olan pepton ve tripton kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde sırasıyla 4.94 ve 9.78 g/L levan elde edilmiştir. Levan üretimi için en uygun azot kaynağının maya ekstraktı olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6 Farklı azot kaynaklarının levan üretimine etkisi (1. maya ekstraktı, 2. mısır ıslatma suyu, 3. pepton, 4. tripton)

Bekers et al., (2002b) yaptıkları çalışmada farklı üretim ortamlarında *Z. mobilis* ile etil alkol ve levan üretimini incelemişlerdir. Araştırmacılar, iyi birer azot kaynağı olarak da kullanılan maya ekstraktı, pirinç destilatı ve şeker pancarı melasını, sakkaroz içeren üretim ortamına ilave ederek levan ve etil alkol üretimine olan etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada en yüksek etil alkol ve levan üretimi sırasıyla melasın ve maya ekstraktının kullanıldığı ortamlardan elde edilmiştir.

4.5 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Levan Üretimine Etkisi

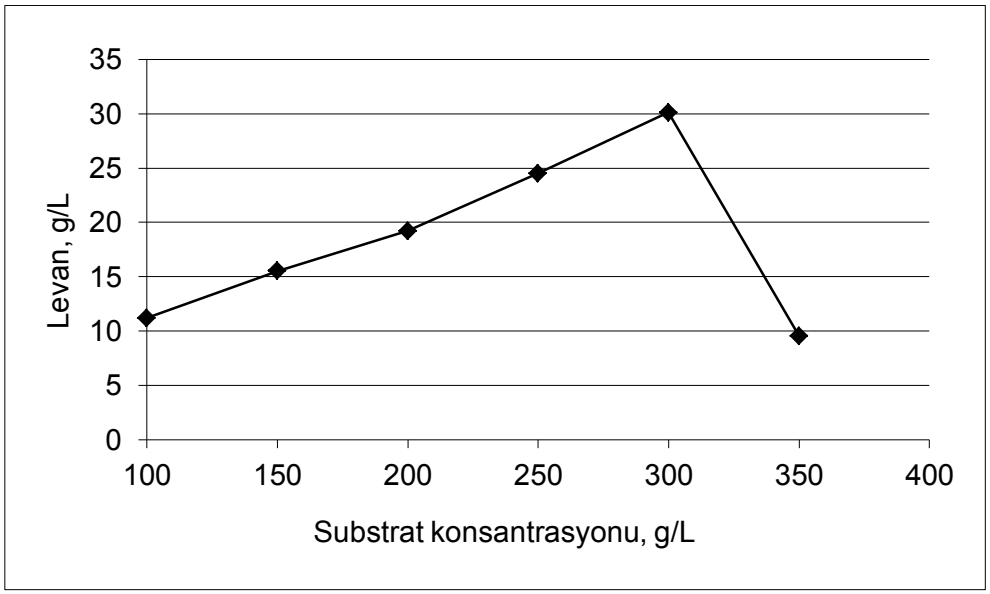
Başlangıç substrat konsantrasyonunun levan üretimine olan etkisini belirlemek için, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 g/L sakkaroz içeren sentetik ortam kullanılmıştır. Şeker konsantrasyonu 100'den 300 g/L'ye arttırıldığında, levan konsantrasyonları artmıştır (Şekil 4.7). 300 g/L şeker konsantrasyonunun üstünde, kesikli kültürün bir özelliği olan yüksek şeker konsantrasyonunun inhibisyon özelliğinden dolayı levan konsantrasyonunda önemli bir düşüş olmuştur.

En yüksek levan üretimi başlangıç substrat konsantrasyonu 300 g/L olduğunda ve fermantasyonun 48. saatinde, 30.12 g/L levan olarak bulunmuştur. Diğer başlangıç konsantrasyonları olan 100, 150, 200, 250 ve 350 g/L sakkaroz

içeren sentetik ortamlarda ise fermantasyonun 48. saatinde gözlemlenen levan konsantrasyonları sırasıyla 11.2, 15.52, 19.2, 24.52 ve 9.55 g/L'dir.

Bazı araştırmacılar yüksek şeker konsantrasyonlarının, ozmotik basınç (geçişme basıncı) ve düşük su aktivitesinden dolayı mikrobiyal polisakkarit üretiminde azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir (Lazaridou et al., 2002). *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-4286 suşu ile gerçekleştirilen bir çalışmada (Ananthalakshmy and Günasekaran, 1999), farklı başlangıç substart konsantrasyonları (50-250 g/L) denenmiş ve en yüksek levan üretiminin 250 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda (15.5 g/L) elde edildiği belirtilmiştir.

Shih et al., 2010 yaptıkları çalışmada kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi hücreleri ile sürekli sistemde levan üretimini incelemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada farklı başlangıç substrat(sakkaroz) konsantrasyonları denemişler (0, 50, 100, 150, 200 and 250g/L) ve en yüksek levan (86.3 g/L) üretimini, 200 g/L sakkaroz konsantrasyonunda, üretimin 36. saatinde elde etmişlerdir.



Şekil 4.7 Farklı substrat konsantrasyonlarının levan üretimi üzerine etkisi (*Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023, pH=5.0, T=28 ˚C, fermantasyon süresi = 48 h)

4.6 Levan Üretiminin Optimizasyonu

Levan üretiminde önemli proses parametreleri olan sıcaklık, pH ve başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek ve bu proses değişkenlerinin optimum seviyelerini belirlemek için cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır. Cevap yüzey yönteminde kullanılan deneysel tasarım noktaları ve analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Deneysel tasarım ve cevapları

Çalışma Sırası	Faktörler			Levan konsantrasyonu (g/L)
	Substrat konsantrasyonu (g/L)	Sıcaklık (°C)	pH	
1	250	24	4,5	18,63
2	350	48	5,5	33,00
3	350	36	5,0	30,02
4	300	36	5,5	40,17
5	250	36	5,0	29,85
6	300	36	5,0	36,20
7	300	24	5,0	27,33
8	300	36	5,0	36,26
9	300	36	5,0	36,60
10	250	48	5,5	28,18
11	300	48	5,0	30,12
12	300	36	5,0	36,20
13	350	24	4,5	14,46
14	300	36	4,5	29,07
15	250	48	4,5	6,89
16	300	36	5,0	36,50
17	300	36	5,0	36,10
18	350	48	4,5	16,40
19	350	24	5,5	17,11
20	250	24	5,5	25,38

Tasarım matrisi ve her bir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi (R^2 = 0.999)

Kaynak	SD	KD	Düz. KT	Düz. KO	F	P
Regresyon	9	1576.09	1576.09	175.121	1E+03	<0.001
Lineer	3	355.02	355.02	118.341	4E+03	<0.001
İkinci derece	3	1020.38	1020.38	340.128	838.12	<0.001
Etkileşim	3	200.69	200.69	66.895		<0.001
Artık hata	10	0.80	0.80	0.080	3.18	
Uyum eksikliği	5	0.61	0.61	0.121	1E+03	0.115
Saf hata	5	0.19	0.19	0.038		
Toplam	19	1576.89				

SD: serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: düzeltilmiş kareler ortalaması

Deneysel veriler ve tahmin edilen veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0.999 olarak elde edilmiştir. Bu değer; yüzey merkezli model ile deneysel verilerin % 99.9 doğrulukta açıklanabileceğini ifade etmektedir. Bu sonuç 20 deneysel nokta kullanılarak elde edilen model denklemin levan konsantrasyonu için incelenen bağımsız değişken aralığında yüksek doğrulukta kullanılabilirliğini göstermektedir.

Çizelge 4.2 incelendiğinde Regresyon için F testinin %5 önem derecesinde anlamlı olduğu ($P<0.05$), ayrıca model ile elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliğinin (0.115) %5 önem derecesinde önemsiz olduğu ($P>0.05$) görülmektedir. Bunun anlamı ise başlangıç substrat konsantrasyonu, inkübasyon

süresi ve pH'nın *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 hücreleri ile levan üretimine etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğidir.

Deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve bulunan regresyon katsayıları kullanılarak (Çizelge 4.3) yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model denklem üretilmiş ve aşağıda verilmiştir.

$$Y = -426.757 + 1{,}6103X_1 - 0{,}631952X_2 + 80.5715\,X_3 - 0.00264503\,X_1^2 - 0.0543235\,X_2^2 - 7.70634\,X_3^2 + 0.00557660\,X_1X_2 - 0.0439856\,X_1X_3 + 0.593507\,X_2X_3$$

Y= Levan konsantrasyonu

X_1, X_2, X_3 = İncelenen parametrelerin gerçek seviyeleri

Çizelge 4.3 Levan konsantrasyonları için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH kat.	T	P
Sabit	-426.757	0.09712	374.837	<0.001
SK	1.61030	0.08934	2.300	0.044
T	-0.631952	0.08934	13.065	<0.001
pH	80.5715	0.08934	65.361	<0.001
SK x SK	-0.00264503	0.17036	-38.815	<0.001
T x T	-0.0543235	0.17036	-45.917	<0.001
pH x pH	-7.70634	0.17036	-11.309	<0.001
SK x T	0.00557660	0.09988	33.498	<0.001
SK x pH	-0.0439856	0.09988	-11.009	<0.001
T x pH	0.593507	0.09988	35.652	<0.001

SH kat. : Standart Hata Katsayıları, SK: Substrat Konsantrasyonu, T: Sıcaklık

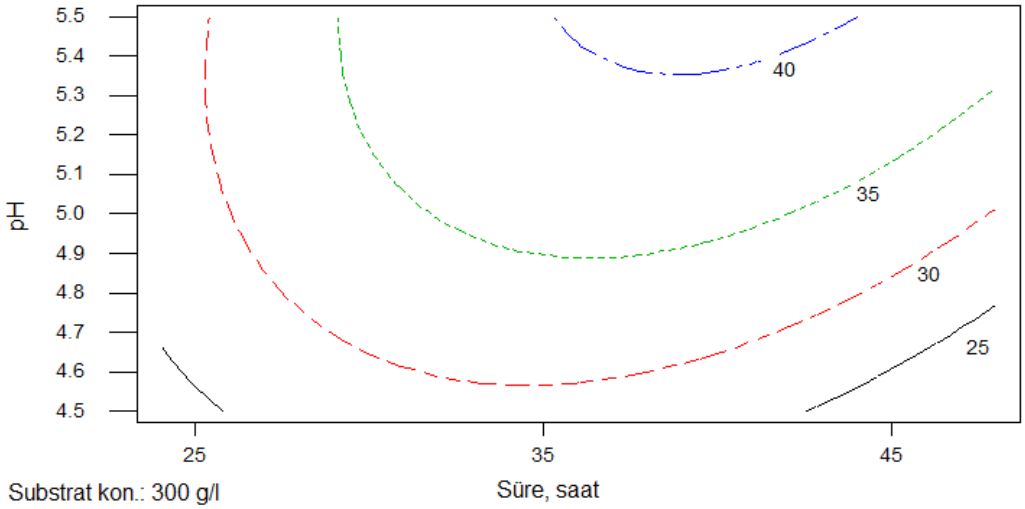
Çizelge 4.3'te başlangıç substrat konsantrasyonu ve pH ile cevap (levan konsantrasyonu) arasında pozitif doğrusal bir etki olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Bu sonuç artan substrat konsantrasyonu ve pH değerlerinde levan üretiminin

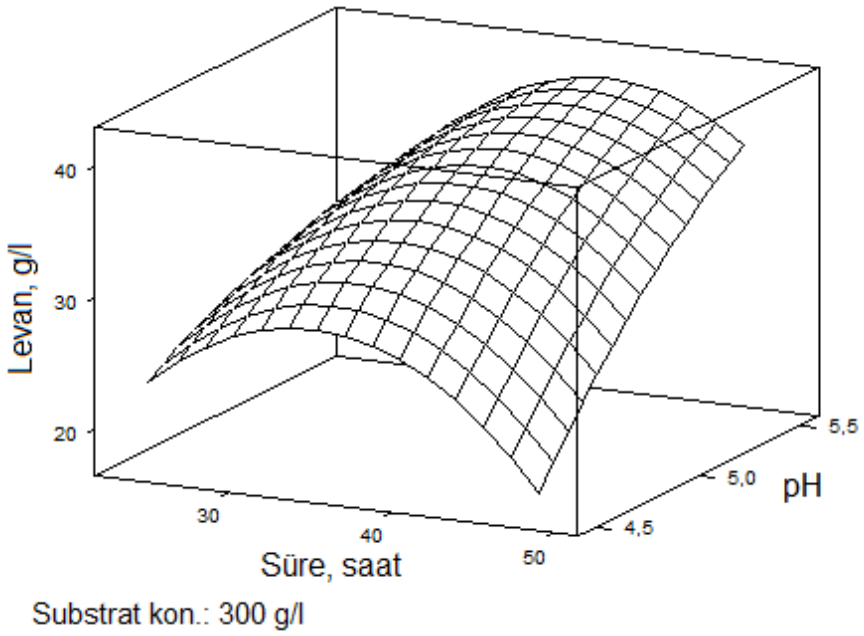
artacağını göstermektedir. P değerleri her bir katsayının önemini kontrol etmek için bir araç olarak kullanılmaktadır. P değerinin daha küçük olması, katsayıya ilişkin korelasyonun önem derecesinin daha fazla olduğunu göstermektedir. pH, en yüksek doğrusal katsayı ile (80.5715) levan konsantrasyonu üzerine en büyük etkiye sahiptir. pH'ı sırayla substrat konsantrasyonu (1.61030) ve inkübasyon süresi (0.631952) takip etmektedir.

Aynı çizelge incelendiğinde substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve pH'nın cevap üzerinde negatif kuadratik etkisinin olduğu da görülmektedir ($P<0.05$). Bunun anlamı artan substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve pH değerlerinde levan üretiminin artması ve daha yüksek değerlere çıkılmaya devam edildiğinde levan üretiminin azalmasıdır.

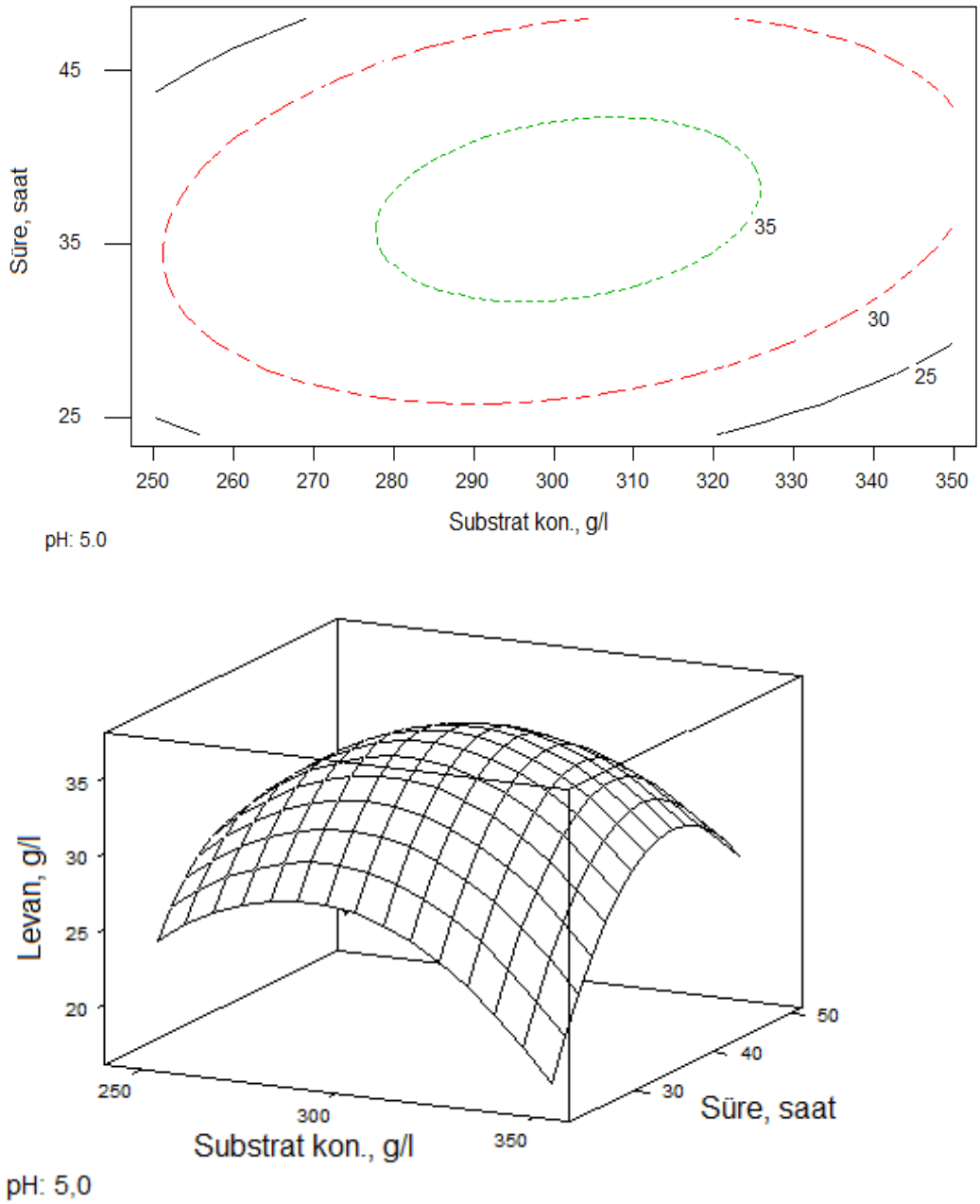
Substrat konsantrasyonu ve pH arasındaki negatif interaksiyon etkileşim, her iki parametrede meydana gelen artışlarda levan üretiminin artacağı, belli bir değerde üretimin maksimum değerine ulaşacağı ve parametrelerde daha yüksek değerlere çıkıldığında üretimin azalacağı anlamı taşımaktadır. Substrat konsantrasyonu-inkübasyon süresi, substrat konsantrasyonu-pH ve pH-inkübasyon süresi arasındaki etkileşimler anlamlıdır ($P<0.05$).

Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'da faktörlerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin levan konsantrasyonu üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Şekil 4.8'de substrat konsantrasyonunun aynı düzeyleri için, merkezden yüksek seviyedeki sürelere gelindikçe levan konsantrasyonu azalmış, merkezden yüksek seviyedeki pH'larda ise levan konsantrasyonu artmıştır. Şekil 4.9'da sabit pH değerlerinde, merkezden yüksek seviyedeki substrat konsantrasyonu ve inkübasyon sürelerinde levan konsantrasyonu azalmıştır. Şekil 4.10'da sabit inkübasyon süresinde, substrat konsantrasyonu değerleri merkez seviyesinin üzerine çıktığında levan konsantrasyonu azalmış, pH değerleri merkez seviyesinin üzerine çıktığında ise levan konsantrasyonu artmıştır.

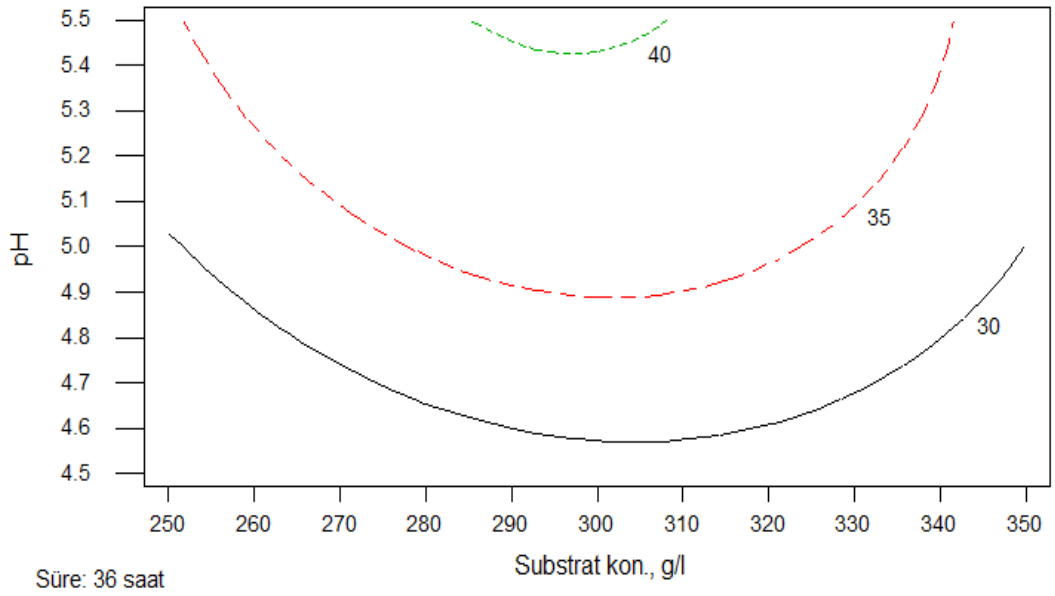


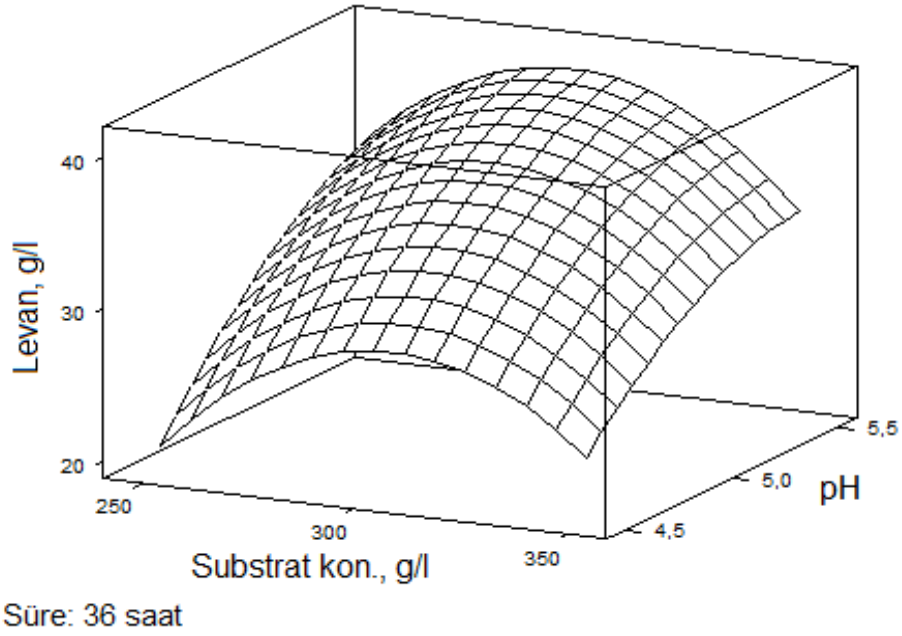


Şekil 4.8 Sabit substrat konsantrasyonunda (300 g/L), süre ve pH'nın izohips eğrisi ve yüzey grafiği



Şekil 4.9 Sabit pH'da (5.0), substrat konsantrasyonu ve sürenin izohips eğrisi ve yüzey grafiği





Şekil 4.10 Sabit sürede (36 saat), substrat konsantrasyonu ve pH'nın izohips eğrisi ve yüzey grafiği

Levan biyosentezini tahminlemek için oluşturulan ikinci derece polinomiyal eşitlik çözülmüş ve proses için belirlenen optimum koşullar belirlenmiştir. Bu optimum koşullar, başlangıç şeker konsantrasyonu 299.11 g/L (X_1), inkübasyon süresi 42.34 saat (X_2) ve pH 6 (X_3)'dır ve bu koşullarda model, fermantasyon sonunda maksimum 42.6 g/L levan üretilebileceğini tahminlemiştir. Bu veriler *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 suşu ile sakkaroz içeren sentetik besi yeri ortamında maksimum levan üretimi için en uygun seviyeler olarak belirlenmiştir.

Borsari et al., (2006) levan üretiminin optimizasyonu üzerine çalışmışlardır. Çalışmada, şeker kamışı suyunu, sakkarozu ve farklı fermantasyon proseslerini (kesikli ve yarı sürekli) bağımsız değişkenler olarak belirlemiş ve bu parametrelerle levan üretimini optimize etmişlerdir. Fermantasyon ortamına şeker kamışı suyu ilave ettiklerinde oluşan levan miktarının artmadığını fakat biyokütle, sorbitol ve etil alkol miktarlarının arttığını gözlemişlerdir. *Z. mobilis* CP4 ile en yüksek levan üretimi (40.14 g/L), 150 g/L sakkaroz ortamında kesikli fermantasyon sistemi ile elde edilmiştir.

Son fermantasyonda, modelin verdiği optimum koşullarda *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 suşu kullanılarak sakkaroz içeren sentetik besi yeri ortamında kesikli sistemde üretim gerçekleştirilmiş ve fermantasyonun 42. saatinde maksimum levan konsantrasyonu (40.2 g/L) elde edilmiştir. Bu değer modelin verdiği değer olan 42.6 g/L değerine oldukça yakın bir değerdir.

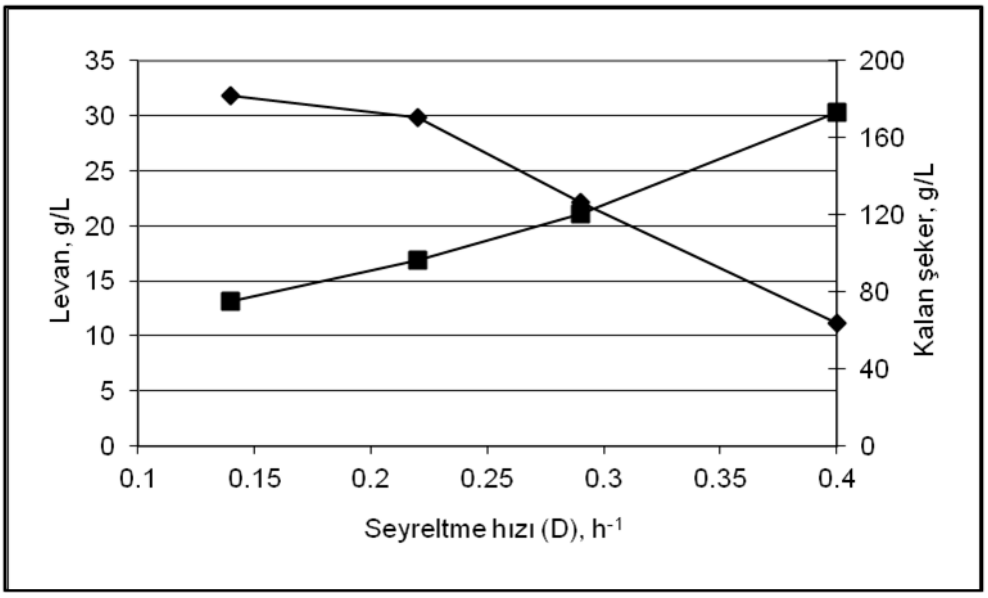
4.7 Dolgulu Yatak Biyoreaktörde Levan Üretimi

Cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimum koşullar belirlenmiş bu değerler gözönünde bulundurularak dolgulu yatak biyoreaktörde *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 suşu ile levan üretimi denemeleri yapılmıştır.

Çalışmada, *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* NRRL B-14023 hücreleri Ca-aljinat boncuklarında immobilize edilmiştir. İmmobilize edilmiş hücreler, dolgulu yatak biyoreaktöre (packed bed bioreactor) doldurularak sürekli

sistemde levan üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı seyreltme hızlarında levan üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir.

En yüksek levan üretimi, seyreltme hızının 0.14 h^{-1} olduğu denemede 31.8 g/L olarak bulunmuştur. Diğer seyreltme hızları olan 0.22, 0.29 ve 0.4 h^{-1} değerleri ile gerçekleştirilen levan üretimlerinde ise sırasıyla 29.8, 22.1 ve 11.2 g/L levan elde edilmiştir (Şekil 4.11).

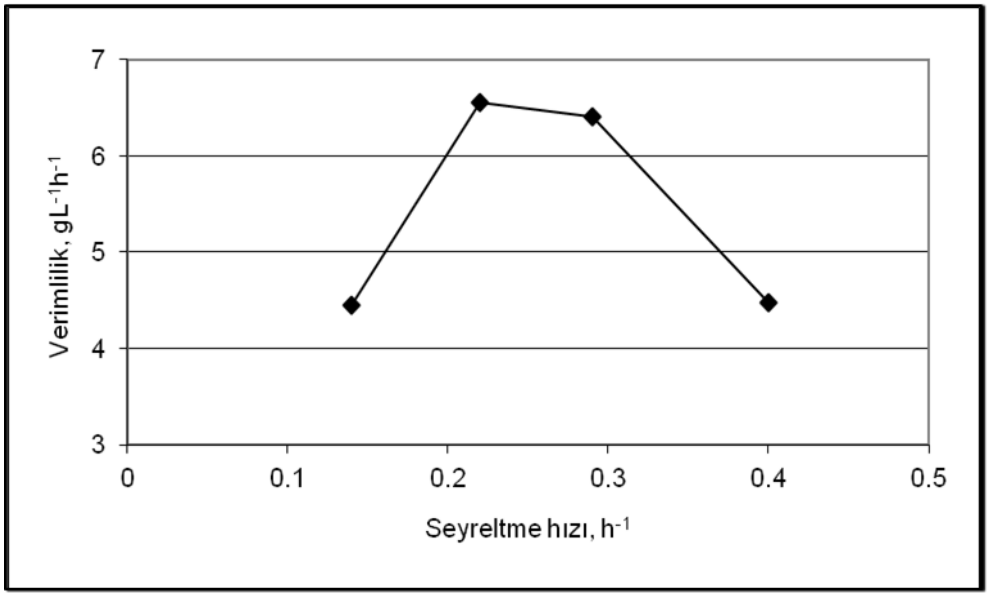


Şekil 4.11 Dolgulu yatak biyoreaktörde farklı seyreltme hızlarında levan üretimi(♦: levan, ■: kalan şeker).

Farklı seyreltme hızlarında gerçekleştirilen üretimlerin verimlilikleri Şekil 4.12'de gösterilmiştir. En yüksek verimlilik 0.22 h^{-1} seyreltme hızında 6.56 g L^{-1} h^{-1} olarak ve en düşük verimlilik ise 0.4 h^{-1} seyreltme hızında 4.5 g L^{-1} h^{-1} olarak hesaplanmıştır. En yüksek hacimsel verimlilik değerinin elde edildiği 0.22 h^{-1} seyreltme hızında kullanılmadan kalan sakkaroz konsantrasyonu da 96.2 g/L gibi oldukça yüksek bir değerdir. Bunun sebebinin, sürekli sistemin karakteristiği olan yüksek akış ve yüksek seyreltme hızlarında mikroorganizmaların substratı kullanacak yeterince vakit bulamamaları ve kullanılmadan kalan substrat konsantrasyonunun artması olduğu düşünülmüştür. Diğer seyreltme hızları olan 0.14 h^{-1} ve 0.29 h^{-1} seyreltme hızlarında hesaplanan verimlilik değerleri ise sırasıyla 4.45 g L^{-1} h^{-1} ve 6.41 g L^{-1} h^{-1}'tir.

Sürekli sistemde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, maksimum hacimsel verimliliğin elde edildiği (D=0.22 h^{-1}) ve maksimum substrat tüketimi ile beraber levan oluşumunun elde edildiği (D=0.14 h^{-1}) iki önemli seyreltme hızının olduğu görülmektedir.

Literatürde *Zymomonas mobilis* ile dolgulu yatak biyoreaktör kullanılarak levan üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışma bulunamamıştır. Fakat Margaritis et al., (1981) kütle transferini en az düzeyde tutmak ve immobilize hücre aktivitesini en yüksek seviyelere çıkarmak için *Zymomonas mobilis* hücrelerini 1mm çapındaki küçük Ca-aljinat boncuklarına immobilize ederek küçük boncuk boyutu ve yüksek (58g kuru hücre/L) hücre konsantrasyonunda, dolgulu yatak biyoreaktör sisteminde etil alkol üretimi gerçekleştirmişler ve yüksek etil alkol verimlilik değerleri sağlamışlardır. Sistem kararlı halde iken seyreltme hızları 0.4 h^{-1} ile 3.9 h^{-1} arasında değiştirilerek 100 g glikoz/L substrat konsantrasyonu ve %87 şeker dönüşümü ile en yüksek 102 g etil alkol L^{-1} h^{-1} verimliliği elde etmişlerdir. Biyoreaktörü 384 saat boyunca sürekli çalıştırmışlar ve kısa aralıklarla $CaCl_2$ uygulaması ile etil alkol verimliliğini en yüksek düzeyine (116 g etil alkol L^{-1} h^{-1}) ulaştırmışlardır.



Şekil 4.12 Farklı seyreltme hızlarında levan üretim verimliliği

5. SONUÇ

Bu çalışmada, sakkaroz içeren besi yerinde *Zymomonas mobilis* subspecies *mobilis* B-14023 suşu kullanılarak, iki aşamada, kesikli ve sürekli sistemlerde levan üretimi gerçekleştirilmiştir. Kesikli sistemde levan üretimine etki eden faktörler Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılarak optimize edilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, kesikli fermentasyon yöntemi ile levan üretimi gerçekleştirilmiştir. Maksimum levan üretimi elde etmek için farklı başlangıç substrat konsantrasyonları, farklı azot kaynakları, farklı pH seviyeleri ve inkübasyon süreleri denenmiş ve en yüksek levan üretiminin elde edildiği seviyeler belirlenmiştir.

Başlangıç substrat konsantrasyonunun levan üretimine etkisi incelendiğinde en yüksek levan konsantrasyonu olan 30.12 g/L değeri, 300 g/L başlangıç substrat konsantrasyonu içeren ortam kullanılarak elde edilmiştir. Daha yüksek başlangıç substrat konsantrasyonları kullanıldığında elde edilen levan miktarları azalmıştır. Böylece yüksek başlangıç substrat konsantrasyonlarının levan üretimini inhibe edici etkisi olduğu belirlenmiştir.

Farklı azot kaynaklarının levan üretimine etkisinin incelendiği aşamada, dört farklı azot kaynağı denenmiş ve en yüksek levan üretiminin (15.52 g/L) maya ekstaktı kullanılarak yapılan fermantasyonda elde edildiği belirlenmiştir.

Fermantasyon süresi, pH ve substrat konsantrasyonu levan üretimine etkilerinin incelenmesi için seçilmiş ve bunun için cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır. Bu üç değişkenin levan üretimine lineer, kuadratik ve interaksiyon etkileri cevap yüzey yöntemi ile belirlenmiştir. Bulunan model, proses değişkenlerinin etkilerini yeterli düzeyde açıklayabilmiştir. Cevap yüzey yönteminin uygulanması sırasında seçilen fermantasyon süresi, pH ve substrat konsantrasyonu aralıkları için yüzey merkezli tasarım kullanılmıştır. Seçilen tasarım için deney modeli oluşturulmuş ve modelin belirlediği 20 noktada deney yapılmıştır. Deneysel veriler kullanılarak ikinci dereceden model denklem elde edilmiş ve bu eşitlik kullanılarak 20 deney noktası için levan konsantrasyonları

hesaplanmıştır. Tasarımın R^2 değeri 0.999 olarak belirlenmiş olup deneysel verilerin elde edilen model denklemde % 99.9 doğrulukla açıklanabileceğini ifade etmektedir. Levan üretiminde optimum parametrelerin hesaplanması amacıyla yüzey merkezli tasarıma ait regresyon katsayıları kullanılarak 3 değişken (fermantasyon süresi, pH ve substrat konsantrasyonu) için matris çözümlemesi yapılmıştır. Yapılan çözümleme sonucunda optimum fermantasyon süresi 42.34 saat, pH 6 ve substrat konsantrasyonu 299.11 g/L olarak bulunmuştur. Modelin bu değerler ile kesikli sistemde üretim için tahminlediği maksimum levan miktarı 42.6 g/L iken üretim sonucunda, % 13.4 efektif verim ile 40.2 g/L levan elde edilmiştir. Optimizasyon öncesi elde edilen levan konsantrasyonu 30.12 g/L iken, optimizasyon sonrası levan konsantrasyonunun 40.2 g/L seviyesine ulaşması, cevap yüzey yönteminin levan üretiminin optimizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise; dolgulu yatak biyoreaktör ile sürekli sistemde levan üretimi gerçekleştirilmiştir. Dolgulu yatak biyoreaktörde, Ca-aljinatta immobilize edilmiş *Z.mobilis* hücreleri ile gerçekleştirilen levan üretiminde en yüksek levan konsantrasyonu olan 31.8 g/L, 0.14 h^{-1} seyreltme hızında ve 4.45 g L^{-1} h^{-1} verimlilik değerinde elde edilirken; en yüksek verimlilik değeri (6.56 g $L^{-1}h^{-1}$) ise 29.8 g/L levan üretiminde ve 0.22 h^{-1} seyreltme hızında elde edilmiştir. İmmobilize hücrelerle sürekli sistemde levan üretiminde, denenen seyreltme hızları içerisinde ürün konsantrasyonunun maksimum olduğu ve hacimsel verimliliğin maksimum olduğu iki ayrı kritik seyreltme hızı olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu tez projesinde elde edilen sonuçlar, levan üretiminde cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonun üretimin maliyetini düşürmek açısından ne kadar kullanışlı ve önemli bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca *Zymomonas mobilis* ile dolgulu yatak biyoreaktörde sürekli sistemde levan üretiminin bu alanda bir ilk olması ve yapılacak çalışmalara ışık tutacak nitelikte olması da tez projesinin diğer bir önemini yansıtmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Ananthalakshmy, V. K. and Gunasekaran P., 1999, Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis, Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(3): 291-297.

Anonymous, 2012a, http://bio-x.ru/articles/poluchenie-etil alkola-kak-topliva (Erişim tarihi: 17 Aralık 2012).

Anonymous,2012b, http://www.indiatalkies.com/2010/12/bioengineers-develop-bacterial-strain-hike-ethanol-biofuel-production.html (Erişim tarihi: 17 Aralık 2012).

Arvidson, S.A., Rinehart, B.T. and Gadala-Maria, F., 2006, Concentration regimes of levan polysaccharide from *Bacillus* sp., *Carbohydrate Polymers*, 65:144-149.

Audet, P., Paquin, C. and Lacroix, C., 1988, Immobilized growing lactic acid bacteria with κ-Carragenan- locust beangum gel, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(1): 11-18.

Audet, P., Paquin, C. and Lacroix, C., 1989, Sugar utilization and acid production by free and entrapped cells of *Streptococcus salivarus* subsp. *thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a whey permeate medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1): 185-189.

Bayramoğlu, G., Yilmaz, M. and Arica, M.Y., 2004, Immobilization of a thermostable α-amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continious starch hydrolysis, *Food Chemistry*, 84:591-599.

Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, A., Pankova, L. and Danilevich, A., 2002a, Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase, *Process Biochemistry*, 38:701-706.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bekers, M., Grube, M., Vulfa, L., Upite, D., Kaminska, E., Scherbaka, R., Vigants, A. and Danilevich, A., 2002b, Stillage as a source of growth promoting biosurfactans and a stimulator of levan and extracellular lecansucrase synthesis for *Zymomonas mobilis*, *Food Technol. Biotechnol.*, 40:305-310.

Bekers, M., Upite, D. and Kaminska, E., 2005, Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*, *Process Biochemistry*, 40:1535-1539.

Bergey, D.H., Holt, J.G. and Krieg, N.R., 1989, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1:576-580.

Borsari, R.R.J., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B. and Silva, R.S.S.F., 2006, Influence of carbon source and fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. *Cienc. Tecnol.Aliment., Campinas,* 26:604-609.

Box, G.E.P. and Draper, N.R., 1987, Empirical model building and response surfaces, *John Wiley and Sons,* New York, NY.

Box, G.E.P. and **Wilson K.B.,** 1951, On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B Metho.* 13:1-45.

Bradley, D.E., 1958, A double-evaporation carbon replica technique fort he electron microscope, *Mikroskopie*, 13(5-6):180-186.

Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B., Scarmino, I.S. and Silva, R.S.F., 2005, Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar canemolasses. *Process Biochemistry*, 40:747–751.

Chakrabarti, A.C. and Storey, K.B., 1990, Co-immobilization of amyglucosidase and pullulanase for enhanced starch hydrolysis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:48-50.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chiang, C.J., Wang, J.Y., Chen, P.T. and Chao, Y.P., 2009, Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3):445-451.

Crittenden, R.G. and Doelle, H.W., 1994, Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41:302-308.

Dağbağlı, S. and Göksungur, Y., 2008, Optimization of β-galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology, *Electronic Journal of Biotechnology* [online]., 11(4) Available from Internet: http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol11/issue4/full/12/index.html , ISSN 0717-3458.

Dağbağlı, S. and Göksungur, Y., 2009, Optimization of β-galactosidase production in strirred tank bioreactor using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279, *Food Science and Biotechnology*, 18:1342-1350.

Dağbağlı, S. ve Göksungur, Y., 2012, Baysal, T. ve İçier, F.(Editörler), Gıda Mühendisliğinde Isıl Olmayan Teknolojiler, Nobel Yayınları, 137, Ankara, 424s.

Dias, F. and Bhat, J.V., 1962, A new levan producing bacterium, *Corynebacterium laevaniformans* nov. Spec., *Antonie van Leeuwenhoek*, 28(1):63-72.

Doelle, W. H., Kirk, L., Crittenden, R. and Sientoh, H., 1993, *Zymomonas mobilis*-Science and industrial application, *Critical Reviews in Biotechnology*, 13(1): 57-58.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28:350-356.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dudak, F.C., Boyacı, İ.H., Şeker, U.Ö.Ş., Baş, D., ve Tamerler, C., 2005, Laktoz hidrolizinde β-galaktosidaz inhibisyonunun cevap yüzey yöntemi ile incelenmesi, *Gıda Kongresi 2005,* 19-21 Nisan, İzmir.

Emnova, E., Tate, I. R. L., Gimenez, D., Daraban, O. and Budac, A., 2009, Impact of soybean seed inoculation with the levan-producing bacteria *Pseudomonas aureofaciens* on soil invertase and levansucrase acivities under soil water stress and elevated copper level, *Lucrari Stintifice,* 51:127-134.r

Entner, N. and Doudoroff, M., 1952, Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*, *Journal of Biological Chemistry*, 196(2):583-862.

Eren, İ., 2004, Patateslerin osmotik dehidrasyonunun Response Surface metodu kullanılarak optimizasyonu, *Yüksek lisans tezi*, E.Ü. Bornova, İzmir.

Faveri, D.D., Torre, P., Perego, P. and Converti, A., 2004, Statistical investigation on the effects of starting xylose concentration and oxygen mass flowrate on xylitol production from rice straw hydrolyzate by response surface methodology, *J Food Eng*, 65:383–389.

Ghaly, A. E., Arab, F., Mahmoud, N. S. And Higgins, J., 2007, Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures, *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3(2):47-54.

Ghose, T., 1984, Measurement of Cellulase Activities, *Commission on Biotechnology*, 2-3.

Göksungur, Y., 2004, Optimization of the production of chitosan from beet molasses by response surface methodology, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79:974-981.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Göksungur, Y., Dağbağlı, S., Uçan, A. and Güvenç, U., 2005, Optimization Of Pullulan Production From Synthetic Medium By *Aureobasidium pullulans* In A Stirred Tank Reactor By Response Surface Methodology, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80:819-827.

Göksungur, Y., Uzunoğulları, P. and Dağbağlı, S., 2011, Optimization of pullulan production from hyrolysed potato starch waste by response surface methodology, *Carbohyrate Polymers*, 83:1330-1337.

Grote, W., Lee, K.J. and Rogers, P.L., 1980, Continious ethanol production by immobilized cells of *Zymomonas mobilis*, *Biotechnology Letters*, 2(11):481-486.

Han, Y.W., 1989, Levan production by *Bacillus polymyxa*, *Journal of Industrial Microbiology*, 4:447-452.

Han, Y., 1990, Microbial levan, *Adv. Appl. Microbiol.*, 35:171-194.

Han, Y.W. and Clarke, M.A., 1990, Production and characterization of microbial levan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:393-396.

Hunter, J.R., 1959, Photographic recording of agar diffusion plates, *Nature*, 2;183(4670):1283-4.

Jang, K.H., Kang, A.S., Cho, Y., Kim, Y.Y., Lee, Y.J., Hong, K., Jang, E.K., Kim, C.H. and Choue, R. 2002, The effects of levan and inulin on the growth of lactic acid-producing bacteria and intestinal conditions in rats, *The Korean Nut. Soc.* 35,912–918.

Kierstan, M.P.J. and Coughlan, M.P., 1985, Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment, 39-48, *Immobilized Cells and Enzymes*, Woodward, J. (Ed.), IRL Press, Oxford, p177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Klein. J. and Kresdorf. B., 1983, Improvement of productivity and efficiency in ethanol production with ca-alginate immobilized *Zymomonas mobilis*, *Biotechnology Letters*, 5(8):497-502.

Koshcheyenko, K.A. and Sukhodolskaya, G.V., 1985, İmmobilized cells: transformation of steroids in immobilized cells and enzymes, 91-225, *Immobilized Cells and Enzymes*, Woodward J.(Ed.), IRL Press, Oxford, p177.

Kotzamanidis, C., Roukas, T. and Skaracis, G., 2002, Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130, *World J. Microbiol. Biotechnol.,* 18:441–448.

Küçükaşık, F., Kazak, H., Güney, D., Finore, I., Poli, A., Yenigün, O., Nicolaus, B. and Öner, E.T., 2011, Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6):1729-1740.

Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Roukas, T. and Izydorczyk, M., 2002, Production and characterization of pullulan from beet molasseds using a nonpigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97(1):1-22.

Liu, J., Luo, J.G., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z.X. and Zeng, X.X., 2010, Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3, *Carbohydrate Polymers*, 79:206-213.

Margaritis. A., Bajpai. P. K. and Wallace. J. B., 1981, High ethanol productivities using small Ca-alginate beads of immobilized cells of *Zymomonas mobilis*, *Biotechnology Letters*, 3(11):613-318.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mchugh, D.J., 2003, A guide to the seaweed industry, *FAO Fisheries Technical Paper*, 441.

Melo, I.R., Pimentel, M.F., Lopes, C.E. and Clazans, G.M.T., 2007, Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*, *Brazillian Journal of Microbiology*, 38(1):45-51.

Muro, A.C., Roriguez, E., Abate, C.M. and Sineriz, F., 2000, Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions, *Biotechnology Letters*, 22(20):1639-1642.

Myers, R.H. and Montgomery, D.D., 1995, Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, p700.

Nawani, N.N. and Kapadnis, B.P., 2002, Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. *Process Biochem,* 40:651–660.

Oliveira, M.R., Silva, R.S.S.F., Buzato, J.B. and Celligoi, M.A.P.C., 2007, Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate source, *Biochemical Engineering Journal*, 37:177-183.

Panesar, P.S., Marwaha, S.S. and Kennedy J.F., 2006, *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:623-635.

Pollock, C.J. and Cairns, A.J., 1991, Fructan metabolism in grasses and cereals, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42*,77–101.

Rajagopalan, G. And Krishnan, C., 2008, Immobilization of malto-oligosaccharide forming α-amylase from *Bacillus subtilis* KCC103: properties and application in starch hydrolysis, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83:1511-1517.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rosevar, A., 1984, Immobilised biocatalysts-a critical review, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34(3):127-150.

Roy, I. and Gupta, M.N., 2004, Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 34:26-32.

Sanjay, G. and Sugunan, S., 2005, Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor, *Catalysis Communications*, 6:525-530.

Shih, I. L., Chen, L. D. and Wu, J. Y., 2010, Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate, *Carbohydrate Polymers*, 82(2010): 111-117.

Sturzoiu, C., Manea, V., Dinischiotu, A., Drainas, C. and Stoian, G., 2012, A sucrose-hypertolerant mutant *Zymomonas mobilis* is a high levan producer, *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3):7317-7323.

Takeshita, M., 1973, Translucent colony form of Gram-negative, levan-producing, *Aerobacter levanicum*, *Journal of Bacteriology*, 116(1):503-506.

Tuli, A., Sethi, R.P., Khanna, P.K. and Marwaha, S.S., 1985, Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*, *Enzyme and Microbial Technology*, 7(4):164-168.

Ürküt, Z., 2007, Kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Aerobasidium pullulans* P56 hücreleri ile oullulan üretiminin optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*¸E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, s125.

Viikari, L., 1984, Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(4):252-255.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N., and Tonomura, K., 1992, Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 56, 1335-1337.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler:

Adı Soyadı: Mehmet Selim ŞILBIR

Doğum yeri: Yeşilova/Trabzon

Doğum tarihi: 30-08-1986

Ünvan: Araştırma Görevlisi

Adres: Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Eğitim bilgileri:

Yüksek lisans(2010-halen): Ege Üniversitesi Gıda Müh. A.B.D (İzmir)

Lisans(2004-2008): Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (Samsun)

Lise(2000-2004):Ordu Anadolu Lisesi (Ordu)

Yabancı diller:

İngilizce (Çok iyi)

Sertifikalar:

İngilizce sertifikası (B2 seviyesi), Ankara Üniversitesi- TÖMER- 2010 (Samsun)

İngilizce sertifikası (C1 seviyesi) 2011 (Malta)

Araştırma faaliyetleri:

- *Şılbır, S., Göksungur, Y, ve Dağbağlı, S, " Optimization of Levan Production by Response Surface Methodology", 1st North and East European Congress on Food, (*: Sözlü Sunum), Saint Petersburg, Russia, p51, 2012.

- Dağbağlı, S., Giray, N., Şılbır, S., Göksungur, Y., ve Baysal, T., " Levan Biyopolimeri Ve Uygulama Alanları", Türkiye 11. Gıda Kongresi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, Türkiye p380, 2012

- Baysal, T., Dagbagli, S. ve Giray, N. K., Şılbır, S., "Optimization of Levan Production from *Zymomonas mobilis*, Effects of Plasticizers on Mechanical Properties of the Edible Levan Films ", IFT 2012, Las Vegas, NV, USA, p262,2012

E-mail:

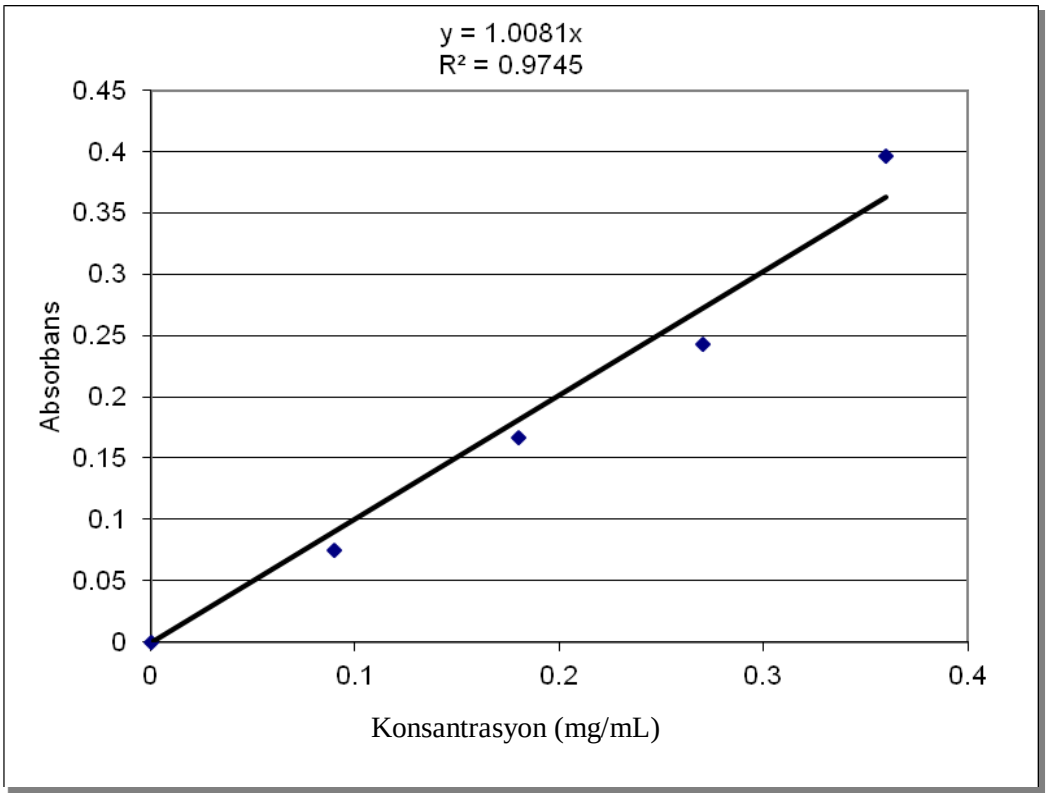
selim.silbir@gmail.com

EKLER

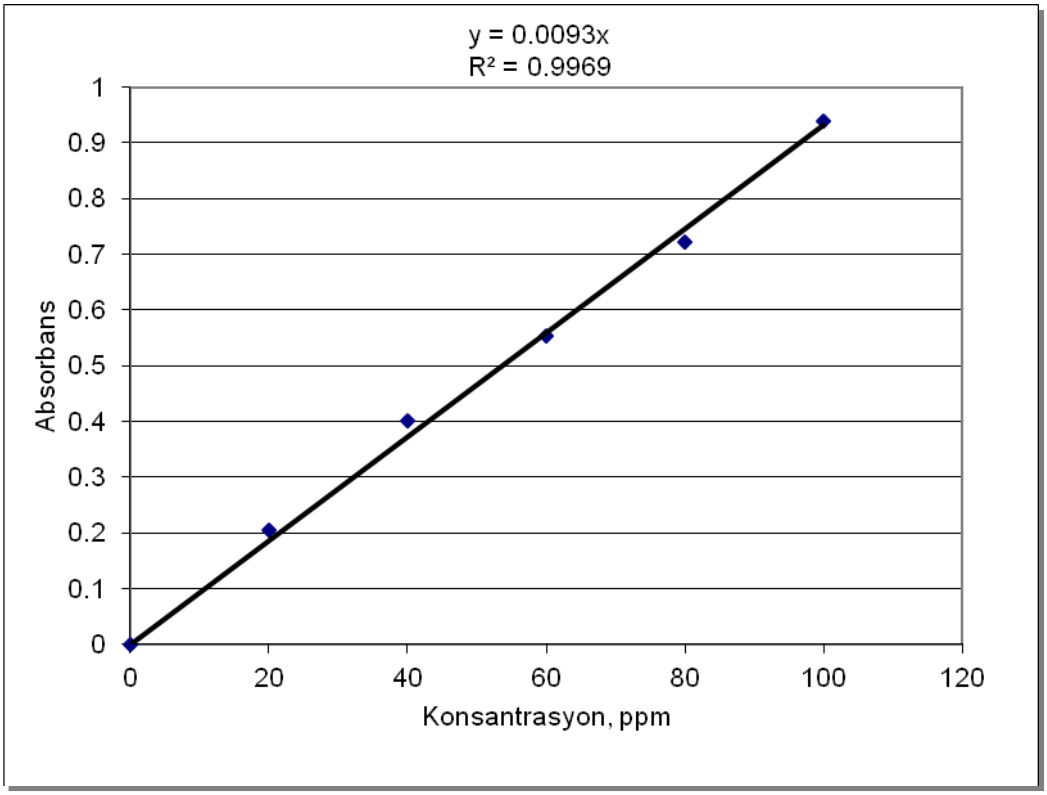
Ek 1 İndirgen Şeker Analizi Absorbans- Konsantrasyon Grafiği (Dns Metodu; Dalga Boyu: 540nm)

Ek 2 Kalan Şeker Analizi Absorbans- Konsantrasyon Grafiği (Fenol Sülfürik Asit Metodu- Dalga Boyu: 490 Nm)

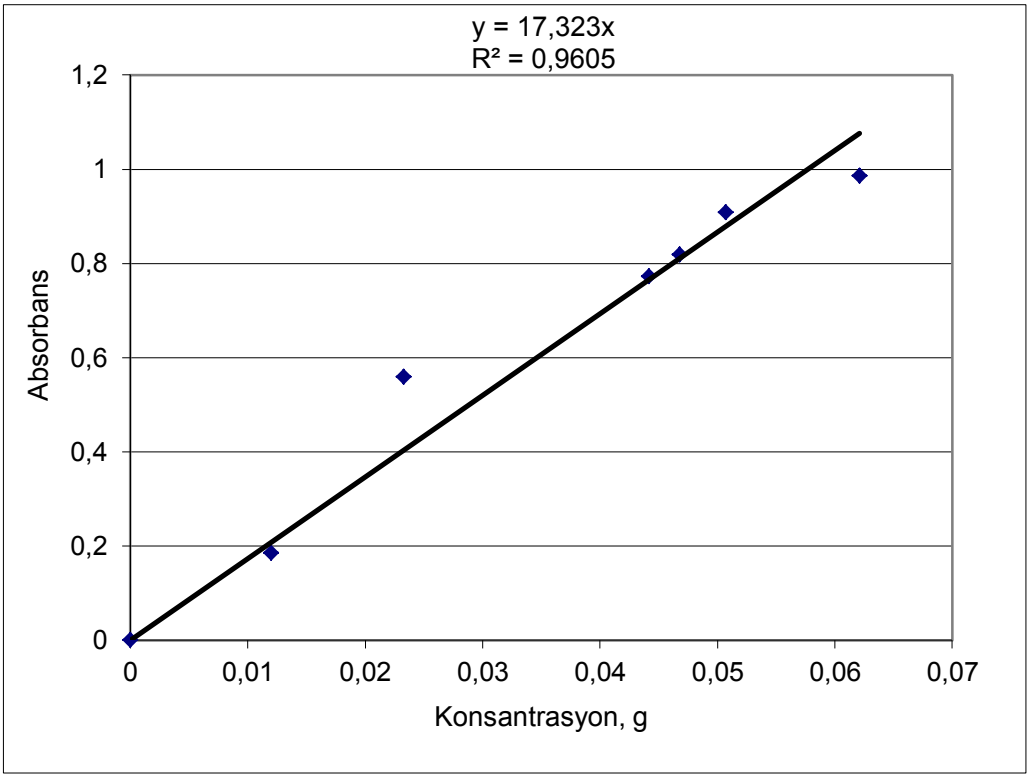
Ek 3 Biyokütle Tayini Absorbans- Konsantrasyon Grafiği (Optik Dansite Yöntemi- Dalga Boyu: 590 Nm)



EK 1 İNDİRGEN ŞEKER ANALİZİ ABSORBANS- KONSANTRASYON GRAFİĞİ (DNS METODU; DALGA BOYU: 540nm)



EK 2 KALAN ŞEKER ANALİZİ ABSORBANS- KONSANTRASYON GRAFİĞİ (FENOL SÜLFÜRİK ASİT METODU- DALGA BOYU: 490 nm)



EK 3 BİYOKÜTLE TAYİNİ ABSORBANS- KONSANTRASYON GRAFİĞİ (OPTİK DANSİTE YÖNTEMİ- DALGA BOYU: 590 nm)