

## **Değişik Fermentasyon Parametrelerinin Pektinaz Enzim Üretimi ve Morfoloji Açısından İstatistiksel Yaklaşımla Optimizasyonu**

Nihan Göğüş, Canan Tari\*, Şelale Öncü, Sevcan Ünlütürk, Figen Tokatlı

İzmir Y.T. Ens. Müh.Fak., Gıda Müh. Böl., Gülbahçe Kampüsü Urla- İzmir.

\*canantari@iyte.edu.tr

### **Özet**

*Aspergillus sojae* ATCC 20235 suşu kullanılarak, karıştırma hızı (rpm), aşılama ortamı (spore/ml) ve maltrin (g/ml) ile mısır şurubu şırası (CSL) (g/ml) konsantrasyonları gibi önemli fermentasyon parametrelerinin enzim aktivitesi, morfolojik yapı ve biyokütle üzerine etkileri Yüzey Tepki Yöntemi (RSM) kullanılarak incelenmiştir. Buna göre pektinaz enzim aktivitesi (U/ml) üzerinde etkili faktörlerin maltrin ve mısır şırası konsantrasyonları olduğu ( $P < 0,001$ ), fakat inokülasyon oranının fazla önemli olmadığı görülmüştür ( $P > 0,05$ ). Morfolojik olarak ise çeşitli yoğunluk ve büyüklüklerde pelletlerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Pellet büyüklüklerinin ise 0,5232-7,2693mm arasında değiştiği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Pektinaz, optimizasyon, morfoloji, fermentasyon, *Aspergillus sojae*

### **Giriş**

Pektinaz enzimi, dünya enzim piyasasında büyük payı bulunan ve gıda, tekstil, kağıt ve atık suların arıtılması gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı istatistiksel verilere göre pektinaz enzimi, dünya gıda enzimleri satış gelirinin % 25 ine sahip olup, bu oran giderek artmaktadır (1). Bu anlamda pektinaz enzim üretiminin daha verimli yöntemler ile yapılması, artan talebin karşılanması açısından önemlidir. Bu enzim ticari olarak daha çok mikrobiyal yollardan özellikle de küflerden elde edilmektedir. Bu çalışmada pektinazlar arasında ticari önemi büyük olan poligalakturonaz (PG) enzimi aktivitesi belirlenmiştir. *Aspergillus sojae* suşu ise Japon koji gıdasının üretiminde katı hal fermentasyonu ile iyi bilinmesine rağmen, henüz sıvı tip fermentasyonda ve pektinaz enzimi üretiminde kullanılmaması açısından önemlidir. Sıvı ortam küf fermentasyonları günümüzde endüstriyel olarak başlıca enzim, antibiyotik, organik asit üretimi üzere gıda, eczalılık, tıp, kimya, tekstil gibi birçok alana hitap etmektedir. Bu anlamda bu tip fermentasyonlarda karşılaşılan başlıca sorunlar son ürünü önemli düzeyde etkilemektedir. Bunlardan en önemlileri üretimde kullanılan küfün fermentasyon sırasında gösterdiği morfolojik yapıdır. Bu morfolojik yapı son ürünün verimliliğin yanı sıra, alt akım

işlemlerini de büyük ölçüde etkilediğinden, sıvı tip küf fermantasyonların optimize edilmesi son derece önemlidir. Bu yüzden amaç maksimum enzim aktivitesini ve aynı zamanda en uygun morfolojiyi sağlayacak koşulları belirlemek ve böylece endüstriyel sıvı tip fermentasyonlara faydalı olmaktır.

### **Materyal ve Yöntem**

*Aspergillus sojae* ATCC 20235 öncelikle YME plakalar üzerinde canlandırıldıktan sonra melas aşılama slant besi yeri üzerine inokule edilmiş ve bir hafta süreyle 30°C inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tween 80 – su karışımı, katı besi yerleri üzerine ilave edilmiş ve buradan hücreler süspansiyon halinde bir falkon tüp içerisine alınmıştır. Tüp içinde toplanan hücreler için, spor ve canlı hücre sayımı yapılmıştır. Buradan, değişik oranlarda Merkezi Karma Deney Tasarımı (CCD) ile planlanan toplam 31 tane erlenmeyere inokulasyon yapılmış ve 30 °C 'de 150 - 300 rpm aralıklarında 96 saat süreyle değişik maltrin ve mısır şurubu şırası konsantrasyonlarındaki kompleks besiyerinde fermantasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda poligalakturonaz (PG) aktivitesi (2), biyokütle, morfolojik yapı incelenmiştir. Morfolojik olarak pellet büyüklükleri IMAGE PRO görüntü analiz programı ile ölçülmüştür. Deney tasarımı MINITAB V 13 istatistik paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Çalkalama hızı (150 - 300 rpm), inokulasyon oranı ( $2,5 \cdot 10^5$  -  $7,5 \cdot 10^5$  toplam spor), maltrin (25 – 75 g/l) ve mısır şurubu şırası (2,5 – 15 g/l) konsantrasyonlarının PG aktivitesi ve biyokütle üzerine etkileri incelenmiştir. Değişkenlerin etkileri için tahmin edilen ikinci derece polinom modeli aşağıda belirtilmiştir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=1}^4 \sum_{j=1}^4 \beta_{ij} x_i x_j$$

### **Bulgular ve Tartışma**

Merkezi karma deney tasarımı sonuçlarına göre enzim aktivitesi üzerine maltrin ve CSL konsantrasyonlarının önemli düzeyde ( $P < 0,001$ ) etkili olduğu belirlenmiştir. Maksimum PG aktivitesinin (7,63 U/ml) yüksek maltrin (75 g/ml) ve düşük CSL (2,5 g/ml) konsantrasyon koşullarında sağlandığı görülmüştür (şekil 1a). İnokulasyon oranının ise PG aktivitesi üzerine etkili olmadığı ( $P > 0,05$ ), fakat şekil 1b den de görüleceği üzere düşük inokulasyon oranında ( $2,5 \cdot 10^5$  toplam spor) ve yüksek çalkalama hızında (300 rpm) maksimum enzim aktivitesine (7,63 U/ml) ulaşıldığı belirlenmiştir.

Biyokütle üzerine ise en etkili faktörlerin maltrin ve CSL konsantrasyonları olduğu ( $P < 0,01$ ), maksimum CSL (15g/ml), maltrin (75g/ml)

konsantrasyonlarında ve 225 rpm çalkalama hızında en yüksek biyokütle (0,0155 g/ml) değerine ulaşıldığı tespit edilmiştir (şekil 2b ve 2a). Ayrıca PG aktivitesi ve biyokütleyi tahmin eden polinom modeli, kodlanmamış değişkenler açısından tablo 1 ve 2 de verilmiş olup, R<sup>2</sup> değerleri, enzim aktivitesi ve biyokütle için sırasıyla 86,9 ve 77,3 'dür.

Tablo1

Tablo 2

Regresyon katsayısı	(PG aktivitesi)	Regresyon katsayısı	(Biyokütle)
$\beta_0$	-3.30372	$\beta_0$	-0.0142143
$\beta_1$	0.0110140*	$\beta_1$	0.000257406*
$\beta_2$	-4.35807E-07	$\beta_2$	2.498681E-09
$\beta_3$	0.0807656***	$\beta_3$	-0.000207721**
$\beta_4$	0.247956***	$\beta_4$	0.000458347***
$\beta_{13}$	0.000105126	$\beta_{11}$	-6.01050E-07**
$\beta_{14}$	-0.00107682*	$\beta_{33}$	2.667347E-06
$\beta_{34}$	-0.00264339		

Önemlilik Seviyesi: \* 0.05 level, \*\* 0.01, \*\*\* 0.001

1: Çalkalama hızı, 2: İnokulasyon oranı, 3: Maltrin, 4: CSL (mısır şurubu şurası)

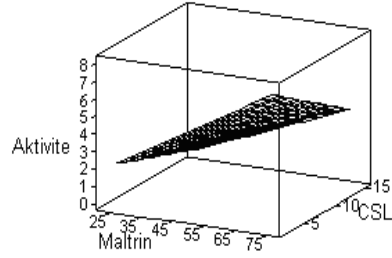
Maksimum enzim aktivitesini (7,63 U/ml) sağlayan koşulların, maltrin (75 g/ml), CSL (2.5 g/ml), inokulasyon oranı ( $2,5 \cdot 10^5$  toplam spor) ve çalkalama hızı (300 rpm) olduğu belirlenmiştir. Bu değerlerin, modelin doğrulanması için yapılan deneylerden elde edilen sonuçlara yakın olduğu görülmektedir (9,48 U/ml). Bu çalışmada öncelikli amacımız maksimum enzim aktivitesini sağlamak olduğu için doğrulama deneyleri enzim aktivitesine yönelik yapılmıştır. Morfolojik olarak ise maksimum enzim aktivitesini sağlayan koşullarda pellet büyüklüklerinin 2-4 mm arasında değiştiği belirlenmiştir. Yapılan doğrulama deneylerinde elde edilen pellet büyüklükleri de bu aralıktadır.

### Sonuç

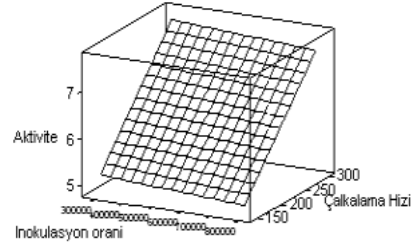
Sonuç olarak maksimum PG aktivitesine yüksek maltrin, düşük CSL ve yüksek karıştırma hızında ulaşılmıştır. Maksimum enzim aktivitesini sağlayan bu koşullar, orta büyüklükte pelletlerin oluştuğu ve biyokütlenin minimum olduğu koşullardır (şekil 2a ve 2b). Bu da alt akım işlemlerinde kolaylık sağlaması bakımından önemlidir. Henüz bu sonuçlar tam anlamıyla bir optimumu

## Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu

vermediğinden daha sonra yapılacak optimizasyonun ön çalışmasını oluşturmaktadır.



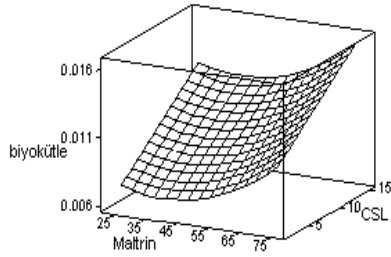
Çalkalama Hızı: 300.0 Inokulasyon oranı: 7.5e5



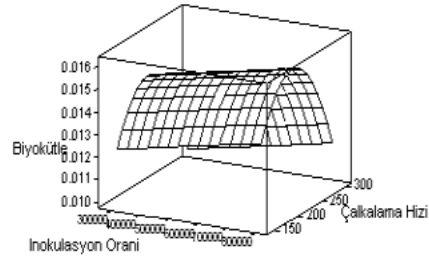
Maltin: 75.0 CSL: 2.5

Şekil 1a. Maltin ve CSL konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi

Şekil 1b. İnokulasyon oranı ve çalkalama hızının aktivite üzerine etkisi



Çalkalama Hızı: 300 Inokulasyon oranı: 2.5e5



Maltin: 75.0 CSL: 2.5

Şekil 2a. Çalkalama hızı ve inokulasyon oranının biyokütle üzerine etkisi

Şekil 2b. Maltin ve CSL konsantrasyonlarının biyokütle üzerine etkisi

### **Kaynaklar:**

1. Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry.
2. Panda T, Naidu GS, Sinha J. (1999). Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*. A statistical view. Process Biochemistry. 35: 187-195.