

**Katı Kültür Fermentasyon Yöntemi ile *Aspergillus sojae*
ATCC 20235 Suşundan Üretilen Pektinaz Enziminin Optimizasyonu
ve Sıvı Kültür Yöntemiyle Karşılaştırılması**

Fatma Işık Üstok¹, Canan Tari^{2*}, Nihan Göğüş²

¹ İzmir Y.T. Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Bölümü

² İzmir Y.T. Enstitüsü, Gıda Müh. Bölümü, Gülbahçe Köyü 35430 Urla/İzmir

* canantari@iyte.edu.tr

Özet

Bu çalışmada Tepki Yüzey Yöntemi kullanılarak katı substrat, aşılama oranı ve inkübasyon süresi gibi faktörlerin enzim üretimi, spor miktarı ve biyokütle üzerine etkileri incelenmiştir. Optimizasyon çalışmaları, D-Optimal ve Merkezi Karma deney tasarımları kullanılarak 2 basamakta gerçekleştirilmiştir. D-Optimal deney tasarımı sonuçlarına göre mısır kırığı en yüksek enzim aktivitesini verdiği için Merkezi Karma Deney tasarımında mısır kırığı katı substrat olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, aşılama oranı ve inkübasyon süresinin enzim üretimi, spor miktarı ve biyokütle üzerine önemli düzeyde etkili olduğunu göstermektedir ($p < 0.001$). Hesaplanan optimum sonuçlara göre aşılama oranı 2×10^7 toplam spor, inkübasyon süresi 5-6 gün olduğunda enzim aktivitesi 30.55 U/g, spor miktarı 2.23×10^7 spor/ml ve biyokütle 13.74 mg/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca sıvı ortamda aynı kültürle yapılan optimizasyon çalışmalarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek enzim aktivitesi elde edildiği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Poligalakturonaz, *Aspergillus sojae*, katı kültür fermentasyonu

Giriş

Biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak endüstriyel enzim kullanımı da giderek artmaktadır. Enzim üretimlerinin büyük kısmı sıvı kültür fermentasyon yöntemiyle gerçekleştirilirken, günümüzde katı kültür fermentasyon yönteminin kullanımında da önemli bir artış söz konusudur. Bunun altında yatan en önemli nedenler arasında yüksek verim, düşük maliyet, basit alet-ekipman kullanımı, saflaştırmada kolaylık yer almaktadır. Ayrıca tarımsal materyallerin ve endüstriyel atıkların katı ortam olarak kullanılmasına olanak sağlanmasıyla organik asitler, proteinler ve enzimler gibi yüksek ticari değere sahip ürünlerin üretilmesi gerçekleşmektedir.

Dünya gıda enzimleri satışında %25'lik bir paya sahip ve gıda endüstrisinde büyük önem taşıyan enzim grubu olan pektinazlar daha çok katı kültür

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

yöntemiyle üretilmektedir. Pektinazlar arasında yer alan poligalakturonaz (PG) üretiminde ticari olarak *Aspergillus niger* suşu kullanılmaktadır. Buna karşılık *Aspergillus sojae* suşunun kullanımına ilişkin literatürde bir bilgi yer almamaktadır. Ancak yapılan ön çalışmalar bu suşun iyi pektinaz üretme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, katı kültür fermentasyonlar için önemli faktörler olduğu düşünülen katı substrat, aşılama oranı ve inkübasyon süresinin etkileri incelenmiştir. Yüksek enzim üretiminin yanı sıra biyokütle ve spor miktarının incelenmesi de amaçlanmıştır. Yüksek spor üretimi, spor inokulasyonu gerektiren sıvı kültür fermentasyonlar için büyük önem taşımaktadır. Ayrıca literatürde biyokütle ve enzimin ürün olarak atık artma tesislerinde kullanılması gibi uygulamaların yer alması biyokütle miktarının incelenmesini önemli kılmaktadır.

Materyal ve Yöntem

Aspergillus sojae ATCC 20235 suşu YME (Malt ekstrakt, maya ekstraktı) plakalarda canlandırıldıktan sonra melas slant besiyerine aktarılarak 30 °C'de 1 hafta inkübe edilmiştir. Daha sonra, steril Tween 80-su süspansiyonu katı besiyeri üzerine ilave edilerek spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Aşılama, içerisinde 50 ml steril sıvı melas besiyeri bulunan erlenlere bu spor süspansiyonun farklı oranlarda aktarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu besiyeri inokulum besiyeri olarak adlandırılmıştır.

Katı Kültür Fermentasyonu, içerisinde 50 g steril katı substratlardan birini içeren (mısır kırığı, mısırözü küspesi, mısır koçanı) 500 ml'lik erlenlere yukarıda belirtilen inokulum besiyerinin ilave edililip, 30 °C'de 3-10 gün inkübasyona bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Katı substratların inkübasyon öncesi başlangıç nemi %48.99 (mısır kırığı), %51.04 (mısırözü küspesi), %50.69 (mısır koçanı) şeklindedir. İnkübasyon süreleri sonunda erlenlere 150 ml steril Tween 80-su süspansiyonu (%0.02) ilave edilip süzülerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Deney Tasarımı, Design Expert 6.0.11 ve 7 Trial (Statease Inc.) istatistiksel programı ile yapılmıştır. D-Optimal deney tasarımında katı substrat (mısır kırığı, mısırözü küspesi, mısır koçanı), aşılama oranı (2.5×10^5 - 7.5×10^5 toplam spor) ve inkübasyon süresinin (6-10 gün) enzim aktivitesi ve spor miktarı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Merkezi Karma Deney Tasarımında kullanılan aralıklar D-Optimal Deney Tasarımından elde edilen veriler ışığında seçilmiştir. Aşılama oranı (1.25×10^4 - 2×10^7 toplam spor) ve inkübasyon süresinin (3-9 gün) enzim aktivitesi, spor miktarı ve biyokütle üzerine etkileri incelenmiştir. Değişkenlerin etkileri ikinci dereceden polinomiyal denklem ile ifade edilmektedir.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_{12} + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + \varepsilon$$

Bulgular ve Tartışma

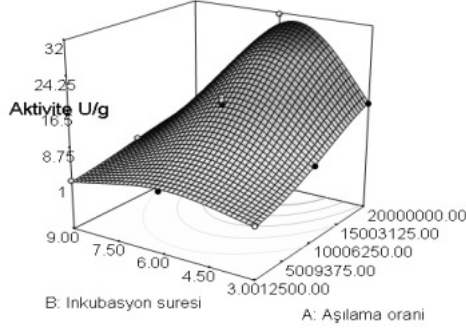
D-Optimal tasarımından elde edilen sonuçlara göre sadece katı substratın enzim aktivitesi üzerinde etkili olduğu ($p < 0.05$) ve mısır kırığının en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Öncelikli amaç yüksek enzim aktivitesine sahip enzim üretimi olduğundan mısır kırığı, Merkezi Karma tasarımda kullanılmıştır. Sonuçların normal dağılıma uygun olması için gerekli transformasyonlar uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre aşılama oranı ve inkübasyon süresinin enzim aktivitesi, biyokütle ve spor miktarı üzerine önemli düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$). R^2 değerleri enzim, spor miktarı ve biyokütle için sırasıyla 0.9963, 0.9775, 0.9760 şeklindedir. Regresyon katsayıları kodlanmış olarak önemlilik seviyeleri ile Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1. Regresyon Katsayıları

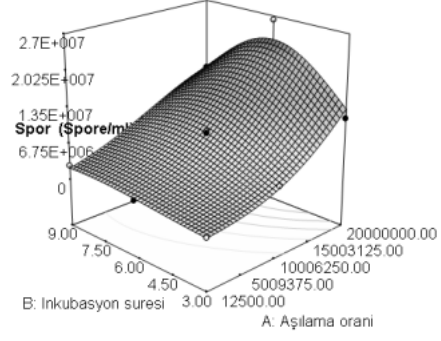
Regresyon katsayısı	Ln (PG aktivitesi)	Ln (spor)	1/Sqrt (Biyokütle)	Önemlilik Seviyesi
b_0	2,84	15.99	0.35	* 0.05
b_1	0.92***	1.27***	-0.10***	** 0.01
b_2	-0.25***	0.37***	0.047**	*** 0.001
b_{12}	-0.13*	-0.36**	-0.039*	1: Aşılama oranı
b_{11}	-0.38***	-0.33*	0.025	2: İnkübasyon Süresi
b_{22}	-1.05***	-0.52**	0.29***	

Hesaplanan optimum sonuçlar, aşılama oranı 2×10^7 toplam spor, inkübasyon süresi 5-6 gün olduğunda enzim aktivitesi 30.55 U/g, spor miktarı 2.23×10^7 spor/ml ve biyokütle 13.74 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin, modelin doğrulanması için yapılan deneylerden elde edilen sonuçlara çok yakın olduğu görülmektedir (29.093 U/g, 2.31×10^7 spor/ml, 11.8 mg/ml). Şekil 1., 2., 3 aşılama oranı ve inkübasyon süresinin etkilerini göstermektedir. Enzim aktivitesi, biyokütle ve spor miktarını maksimize etmek için gerekli koşulları gösteren uyumluluk grafiği Şekil 4'te verilmektedir. Sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında %90 buğday kepeği, %10 şeker kamışı katı substrat olarak kullanıldığında gıda endüstrisinde ticari öneme sahip *Aspergillus niger* suşunun gösterdiği poligalakturonaz aktivitesi 9.0-15.0 U/g arasında değiştiği gözlemlenmiştir (1). Sıvı ortam optimizasyon çalışmalarında ise *Aspergillus sojae* suşunun 7.63 U/ml aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu

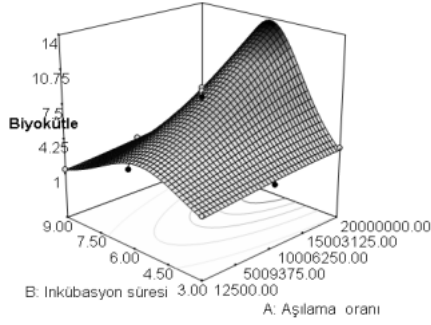
da katı kültür fermentasyonunun veriminin yüksek olduğunu ve elde ettiğimiz sonuçların literatürdekilere oranla daha iyi olduğunu göstermektedir.



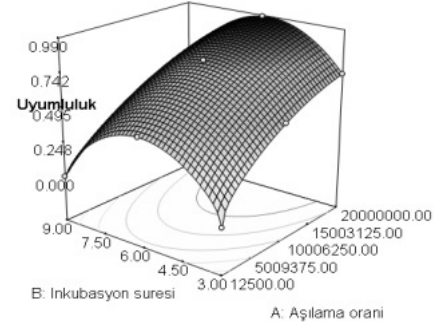
Şekil.1. Aşılama oranı ve inkübasyon süresinin PG enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 2. Aşılama oranı ve inkübasyon süresinin spor miktarı üzerine etkisi



Şekil.3. Aşılama oranı ve inkübasyon süresinin biyokütle üzerine etkisi



Şekil.4. Enzim, biyokütle ve spor miktarını maksimize etmede aşılama oranı ve inkübasyon süresinin etkisi

Sonuç

Sonuç olarak bu çalışma literatürde fazla rastlanılmayan *Aspergillus sojae* suşunun katı kültür fermentasyon yöntemiyle iyi bir poligalakturonaz üreticisi olduğunu göstermektedir. Bunun yanında yüksek oranlarda spor ve biyokütle üretmesi, enzim endüstrisi, gıda endüstrisi, atık arıtma tesisleri ve mikrobiyoloji alanına yeni bir kültürün tanıtılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Kaynaklar

1. Martin N., Souza S.R., da Silva R., Gomes, E. 2004. Pectinase production by fungal strains in solid –state fermentation using agro-industrial bio products. Brazilian Arch. Biol. Technol. 47, 813-819