

## Biyoreaktörde *Bacillus pumilus* ile Pektinaz Enzimlerinin Üretimi ve Karıştırma ve Hava Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi

Özlem Tepe\*, Arzu Y. Dursun

Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*otepe@firat.edu.tr<sup>ID</sup>, aydursun@firat.edu.tr<sup>ID</sup>

Makale gönderme tarihi: 25.10.2021, Makale kabul tarihi: 21.04.2022

### Öz

Pektinazlar, pektik polimerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen enzim ailesinin genel bir adıdır. Bu çalışmada *Bacillus pumilus* bakterisinin kesikli bir biyoreaktörde pektinaz grubu enzimlerden endo-pektinaz, ekzo-pektinaz ve pektin liyaz üretimi üzerine karıştırma ve hava akış hızlarının etkileri araştırılmıştır. Ayrıca oksijen tüketim hızı ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayısının değişimi ve karıştırma için güç sayısının hesabı da yapılmıştır. *Bacillus pumilus* bakterisinin pektinaz grubu enzimlerin üretimi için optimum karıştırma hızı değerinin 300 rpm olduğu tayin edilmiştir. Hava akış hızının enzim aktivite değerlerine etkisinin incelendiği deneylerde en yüksek enzim aktivite değerleri 0.1 vvm' de elde edilmiştir. 300 rpm karıştırma hızında ve 0.1 vvm hava akış hızında en yüksek pektin liyaz aktivitesi 66. saatte 19.5, ekzo-pektinaz aktivitesi 28. saatte 10.69, endo-pektinaz aktivitesi 66. saatte 102.13 U mL<sup>-1</sup> olarak kaydedilmiştir. Sıvı faz hacimsel oksijen transfer katsayısı değeri karıştırma hızının artmasıyla artmıştır. 300 rpm karıştırma hızında en yüksek k<sub>La</sub> değeri 26. saatte 0.1524 s<sup>-1</sup>, 400 rpm' de 60. saatte 0.2623 s<sup>-1</sup> olarak kaydedilmiştir. Üstel üreme bölgesinde oksijen tüketim hızı zamanla artmış, üstel üreme bölgesinden sonra ise azalmıştır. Karıştırma hızı artırıldığında ise oksijen tüketim hızında azalma meydana gelmiştir. Optimum 300 rpm' de, sisteme havalandırmanın yapıldığı durumda ki güç değeri P<sub>g</sub>= 1.95 W olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus pumilus*, biyoreaktör, hava akış hızı, karıştırma hızı, pektinaz üretimi

## Production of Pectinase Enzymes by *Bacillus pumilus* in Bioreactor and Investigation of the Effect of Mixing and Airflow Rate

### Abstract

Pectinases are a general name for a family of enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds in pectic polymers. In this study, the effects of stirring speed and airflow rate on the production of endo-pektinase, exo-pektinase and pectin lyase from pectinase group enzymes in a batch bioreactor were investigated. In addition, the oxygen consumption rate and the change of the liquid phase volumetric mass transfer coefficient and the power number for stirring were also calculated. It was determined that the optimum stirring speed for the production of pectinase group enzymes of *Bacillus pumilus* bacteria was 300 rpm. In experiments where the effect of airflow rate on enzyme activity was investigated, the highest enzyme activity values were obtained at 0.1 vvm. The highest pectin lyase, exo-pektinase and endo-pektinase activities were recorded as 19.5 at the 66th hour, 10.69 at the 28th hour and 102.13 U mL<sup>-1</sup> at the 66th hour, respectively at a stirring speed of 300 rpm and an airflow rate of 0.1 vvm. The liquid phase volumetric oxygen transfer coefficient value increased with increasing stirring speed. The highest k<sub>La</sub> value was recorded as 0.1524 h<sup>-1</sup> at the 26th hour at 300 rpm stirring speed and 0.2623 h<sup>-1</sup> at the 60th hour at 400 rpm. The oxygen consumption rate increased in the exponential growing zone and decreased after the exponential growing zone. When the stirring speed was increased, the oxygen consumption rate decreased. At optimum 300 rpm, the power value in the case of aeration to the system was found to be 1.95 W.

**Keywords:** Airflow rate, *Bacillus pumilus*, bioreactor, pectinase production, stirring speed

### GİRİŞ

Enzimler, katalitik olarak aktif proteinlerdir endüstrisinde, nişastanın dönüştürülmesinde, yakıt (Soetaert ve Vandamme, 2006). Deterjan alkol üretiminde, tekstil uygulamalarında, gıda ve

Research article/Araştırma makalesi  
 DOI:10.29132/ijpas.1028443

yiyecek endüstrilerinde, katı ve sıvı yağların işlenmesinde, organik sentezlerde, kağıt ve kağıt hamuru üretiminde ve bunun gibi birçok alanda kullanılmakta ve endüstriyel kullanımı hızla artmaktadır (Kirk ve ark., 2002; Ogawa ve Shimizu, 2002).

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi canlı organizmalar enzim kaynaklarıdır (Ozzybek ve Cekmecelioglu, 2022). Ancak, ticari uygulamalarda en önemli endüstriyel enzim kaynağı mikroorganizmalardır. Mikroorganizmalarla enzim üretimi, fiziksel ya da fiziko-kimyasal olarak kontrol edilebilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilmiş enzim miktarı, bitki ve hayvan kaynaklarından daha yüksektir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen özellikle hücre dışı enzimler kolaylıkla ekstrakte edilebilir (Ibrahim, 2008). Günümüzde mikroorganizmalardan enzim üretimi, derin kültür ve katı hal fermantasyon prosesleriyle başarılı olarak gerçekleştirilmektedir (Ibrahim, 2008; Fasim ve ark., 2021). Enzimler, önemli mikrobiyal metabolitler olarak düşünülmekte ve ticari ölçekte birçok gelişmiş ülkede özellikle Avrupa, ABD ve Japonya’da başarılı olarak üretilmektedir. Çalışılmış olan enzimler; lipaz, lipoprotein lipaz, proteaz, selulaz, lignin degrade eden enzimler (lignin peroksidaz manganez peroksidaz), lakkaz, mannanaz, kitinaz, fitaz,  $\beta$ -glukosidaz ve pektinazdır (Ibrahim, 2008).

Pektinazlar, pektik polimerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen enzim ailesinin genel bir adıdır (Reid ve Ricard, 2000). Bitki duvarlarında ve orta lamelde bulunan pektik maddeler yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Poligalakturonik asit bu maddeleri oluşturan birimdir ve birbirleriyle  $\alpha$ -1,4 bağı ile düz bir zincir yapmışlardır. Pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir grup madde pektik maddelerdir (Willants ve ark., 2001). Pektik enzimler; pektinesterazlar (ester bağına hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayrılır (Aksöz ve Aksöz, 1985; Ahmed ve ark., 2021). Pektinazlar, evlerde kullanılmış olan ilk enzimlerden biridir. Pektinazlar günümüzde tekstil, meyve suyu endüstrileri ve çeşitli biyoteknolojik uygulamanın merkezi konumundadır (Kashyap ve ark., 2001). 2017 Küresel Pektinaz Pazar Araştırması raporuna göre 2021 yılına kadar pektinazın pazar büyüklüğünün 35.5 milyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Amin ve ark., 2019; John ve ark., 2020). Meyve suları ve şarabın ekstraksiyonu ve

durultulmasında (berraklaştırılması) asidofilik pektinazlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Alkali pektinazlar ise, pektinli materyalleri işleyen gıda endüstrisi atıksularının ilk arıtımı, tekstil ve bitki fiberlerin işlenmesi, çay ve kahve fermantasyonu ve yağ ekstraksiyonu gibi çeşitli geleneksel endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. Pektini parçalayan mikroorganizmalar ve pektinaz grubu enzimler hakkındaki bilginin artması ile beraber alkali pektinazlar bitki virüslerinin saflaştırılması ve kağıt yapımı gibi diğer biyoteknolojik proseslerde de kullanılmaktadır (Hoondal ve ark., 2002). Pektinaz enzimi üretimi için 30’ dan fazla bakteri, mantar ve maya cinsi kullanılmaktadır. Enzim üretim çalışmalarında, *Erwinia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* sık çalışılan cinsler olmakla birlikte en fazla *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Erwinia* cinsleri kullanılmaktadır (Favela-Torres ve ark., 2006; Amin ve ark., 2019).

Birçok mikrobiyal proses aerobiktir ve bu proseslerde mikroorganizmalar solunum, çoğalma, ürün sentezi gibi metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle, bir gaz akımından yeterli oksijen sağlanması önemlidir (Garcia-Ochao ve Gomez, 2009; Ferreira ve ark., 2016). Ürün verimi ve seçiciliği, oksijen aktarımının eksikliği ya da fazlalığı ile etkilenmektedir. Mikroorganizma türü, üretim ortamının fiziksel özellikleri ile biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonu biyolojik proseslerde oksijen gereksinimi ve aktarımını etkiler. Karıştırmalı biyoreaktörlerin en önemli işletim parametreleri; oksijen/hava giriş hızı, karıştırma hızı ve bunlardan etkilenen oksijen aktarımıdır (Demirci, 2006; Yılmaz, 2008). Bazı prosesler de yüksek oksijen transfer hızları gerektiren bazılarında oksijen alım hızlarını düzenlemek için kontrollü oksijen transfer hızları gereklidir. Biyoreaktör dizaynı, ölçek büyütme ve işletimi için, bir fermantasyon prosesinin kütle transfer karakteristiklerinin göstergeleri olan oksijen tüketim hızları ve oksijen transfer katsayıları gereklidir. Ancak, fermantasyon sıvısının kompleks bileşiminden dolayı bu parametreleri tahmin etmek güç olabilir (Korkmaz, 2007). Oksijen transferi, fiziksel bir olaydır. Bu nedenle, oksijen tüketimi biyokimyasal reaksiyonlar sırasında gerçekleşirken oksijen transfer hızı (OTH) tahmin edilebilir ve oksijen alım hızı (OAH) ölçülebilir (Haykır, 2007). Su içerisinde oksijen düşük çözünürlüğe sahip

Research article/Araştırma makalesi  
 DOI:10.29132/ijpas.1028443

olduğundan sıvı film direnci oksijen aktarımında önemlidir. Oksijen aktarım hızı; karıştırma veya hava akış hızının artırılmasıyla hava kabarcıkları çevresindeki film dirençleri kırılarak artırılabilir. Dolayısıyla biyoproses ortamı mekanik karıştırma ve/veya hava ile karıştırılmalıdır. Oksijenin sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı  $k_{La}$ , biyoreaktörlerde gaz-sıvı kütle aktarım hızını gösteren kritik bir parametredir.  $k_{La}$ , mikroorganizma türüne, fermantasyon ortamının fizikokimyasal özelliklerine, biyoreaktörün ve karıştırma sisteminin tasarımına, karıştırma ve havalandırma hızlarına bağlıdır (Demirci, 2006; Nur Asshifa ve ark., 2017).  $k_{La}$  tahmin edilmesi güç ancak ölçülebilir bir parametredir.  $k_{La}$ 'nın hesaplanması için çeşitli deneysel ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Yaygın olarak kullanılan dört yaklaşım; yatışkın olmayan durum, yatışkın durum, dinamik ve sülfite testi yöntemleridir (Shuler ve Kargı, 2002). Dinamik yöntem basittir ve metabolik aktiviteden kaynaklanan girişim azdır (Olughu ve ark., 2021). Tuzların ve yüzey aktif maddelerin varlığı kabarcık boyutunu ve gaz kabarcığı etrafındaki sıvı film direncini oldukça değiştirir. Bu faktörler oksijenin çözünürlüğünü de ( $C_o^*$ ) etkileyebilir.  $k_{La}$  ve  $C_o^*$  sıcaklık ve basınçtan da etkilenmektedir (Shuler ve Kargı, 2002).

Biyoreaktörler, çalkalamalı erlenler üzerinde çeşitli avantajlara sahiptirler. Biyoreaktörlerde pH, karıştırma ve hava akış hızı gibi proses parametreleri daha iyi kontrol edilir (Gummadi ve Kumar, 2008). Aerobik fermantasyonlarda, oksijen transferi anahtar bir değişkendir ve havalandırma ve karıştırmanın bir fonksiyonudur (Potumarthi ve ark., 2007). Bu nedenle maksimum ürün eldesi için optimum karıştırma ve hava akış hızı değerlerinin bulunması gereklidir (Potumarthi ve ark., 2007; Mishra ve ark., 2021).

Bu çalışmada, *Bacillus pumilus* ile pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo-pektinaz üretimi laboratuvar ölçekli bir biyoreaktör kullanılarak yapılmıştır. Enzim üretimine karıştırma ve hava akış hızının etkisi incelenmiş ayrıca oksijen tüketim hızı ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayısının değişimi ve karıştırma için güç sayısının hesabı da yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Mikroorganizma ve Enzim Üretim Ortamı

Çalışmalarda, National Center for Agricultural Utilization Research (Microbial Genomics & Bioprocessing Research Unit, Illinois, USA)' den temin edilen NRRL B-212 kodlu *Bacillus pumilus* bakterisi kullanılmıştır. Bu çalışmada, *B. pumilus* ile pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo-pektinaz üretimi biyoreaktör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besi ortamı bileşimi Tablo 1' de verilmiştir.

### Biyoreaktör Deneyleri

Pektinaz üretimine karıştırma ve hava akış hızının etkisini belirlemek amacıyla yapılacak deneylerde karıştırma hızı, sıcaklık, çözünmüş oksijen, pH ve hava akış hızı değerlerinin kontrol edilebildiği bir biyoreaktör (New Brunswick Bioflo III) kullanılmıştır. 6 L toplam hacimli, 5 L çalışma hacmine sahip biyoreaktörün hazne bölümü, ısıya dayanıklı silindirik şekilde pyreks camdan oluşmakta ve cam bölmenin üstünde yer alan kapak ile haznenin altına yerleştirilmiş olan çanak şeklindeki taban kısmı paslanmaz çelikten oluşmaktadır. Kapak kısmı üzerinde; steril hava girişi ve çıkışı, pH ve çözünmüş oksijen problemleri, termovel, aşılama, numune alma, asit-baz, besi ortamı ve köpük kırıcı ilavesi için uygun bağlantılar vardır. Cam kap, üst kapak kablo bağlantıları çıkarıldıktan sonra tümüyle otoklavda sterilize edilebilmektedir (Şekil 1). Biyoproses süresince belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde mikroorganizma konsantrasyonu, protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

### Analiz Yöntemleri

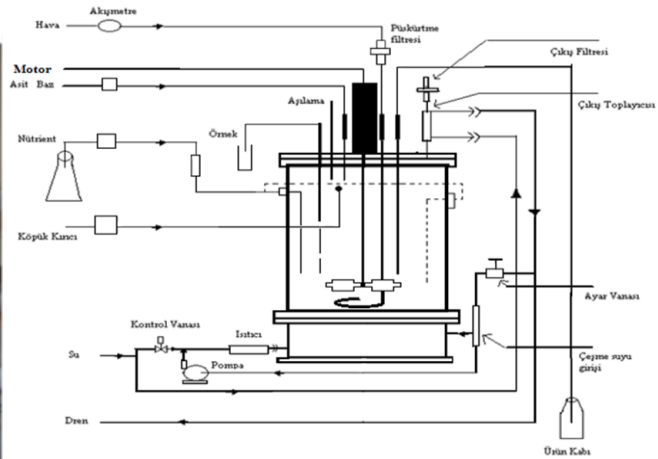
*B. pumilus* ile yapılan enzim üretimi çalışmalarında belli aralıklarla fermantasyon ortamından alınan numuneler, 5000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek (Nüve CN090) mikroorganizmadan ayrılmıştır. Elde edilen sıvı kısım enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### Mikroorganizma konsantrasyonu tayini

Alınan örnekteki yaş *B. pumilus* derişimi  $g L^{-1}$  cinsinden spektrofotometrik (Jenway 6105 UV/Vis Spectrophotometer) olarak, absorbansa karşı yaş mikroorganizma derişimi çalışma doğrusu yardımıyla tayin edilmiştir. Daha sonra yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusundan yararlanarak  $g L^{-1}$  cinsinden kuru mikroorganizma derişimine geçilmiştir.

**Tablo 1.** Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı

Bileşen	Miktar (% a/h)
Elma pektini	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01



**Şekil 1.** Biyoreaktörün resmi ve şematik gösterimi

### Pektin liyaz tayini

Pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz aktivitesi, Ramachandran (2005) tarafından önerilen metodun düzenlenmesiyle belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, pektinin parçalanması sonucu oluşan doymamış son ürünler ve tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyona dayanmaktadır (Nedjma ve ark., 2001). Bir birim aktivite, ölçüm şartları altında birim zamanda birim hacimde 0.01 absorbans değişimine neden olan enzim miktarıdır. 5.0 mL pektin çözeltisi (pH 10.0), 1.0 mL kalsiyum klorür çözeltisi ve enzim çözeltisi (1.0 mL) içeren reaksiyon karışımının son hacmi distile su ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır. 40 °C' de 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra 0.6 mL ZnSO<sub>4</sub> çözeltisi ve 0.6 mL NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. 3000 g' de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek protein ve kullanılmamış substrat çöktürülmüştür. Tiyobarbitürik asit (3.0 mL), hidroklorik asit (1.5 mL) ve distile sudan (0.5 mL) oluşan karışıma 5.0 mL süpernatant eklenmiştir. Karışım kaynayan bir su banyosunda 30 dakika boyunca ısıtılmıştır. Soğutulduktan sonra, ZnSO<sub>4</sub> ve NaOH ilavesinden önce inkübasyon yapılmayan aynı reaktifleri içeren kör çözeltiye (enzim yerine 1.0 mL

tampon kullanılmıştır) karşı 550 nm' de absorbansı okunmuştur.

### Ekzo-pektinaz tayini

Ekzo-pektinaz tayini, pektinin parçalanması sonucu oluşan indirgenmiş şekerlerin ölçümüyle yapılmıştır (Miller, 1959). Ekzo-pektinaz aktivitesi için; pH değeri 10.0 olan 0.1 M glisin-NaOH tamponunda hazırlanmış 0.25 mL % 1 pektin çözeltisi ile 0.25 mL enzim örneği 15 dakika boyunca 50 °C' de inkübe edilmiştir. İndirgenmiş şekerler, referans olarak galakturonik asit kullanılarak dinitro salisilik asit (DNS) metoduyla belirlenmiştir. Bir birim ekzo-pektinaz aktivitesi, birim zamanda (dak.) 1 µmol galakturonik asit salıveren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

### Endo-pektinaz tayini

Endo-pektinaz aktivitesi viskozimetrik olarak ölçülmüştür (Tuttobello ve Mill, 1961; Mill ve Tuttobello, 1961). Endo-pektinaz için, 1 mL enzim örneği pH değeri 10.0 olan 0.1 M glisin-NaOH tamponunda hazırlanmış 19 mL % 0.5 pektin çözeltisi



Research article/Araştırma makalesi  
 DOI:10.29132/ijpas.1028443

ile karıştırılmıştır. 30 °C’ de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, viskozitedeki azalma Vibroviskometre marka viskozimetre ile takip edilmiştir. Bir birim endo-pektinaz aktivitesi yukarıda açıklanmış şartlar altında dakikada çözeltinin viskozitesini % 50 azaltan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

### Protein tayini

Üretim ortamında toplam protein miktarını belirlemek için, Lowry ve ark. (1951) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Örnek tüplerine 0.5 mL örnek, kör çözelti tüpüne de 0.5 mL saf su koyulmuştur. Tüm tüplere 2.5 mL Reaktif B (1 mL Reaktif 1 (% 2 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) + 1 mL Reaktif 2 (% 2 Na-K-Tartarat) alınarak, 100 mL’ ye Reaktif A (0.1 N NaOH içinde % 2’ lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ile tamamlanmıştır) eklenmiştir. Karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Tüm tüplere 0.25 mL Reaktif C (Folin Ciocalteu fenol reaktifi distile su ile 1/1 oranında seyreltilmiş) eklenmiştir. Karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Absorbanslar 660 nm dalga boyunda kör çözeltiliye karşı okunmuştur. Protein miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplanmıştır. Örneklerdeki toplam protein derişimini belirlemek için bovine serum albuminin (BSA) derişimi bilinen örneklerinden yararlanılarak derişim-absorbans kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.

### Biyoreaktörde Sıvı Faz Hacimsel Kütle Transfer Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızının Hesaplanması

Biyoreaktörde enzim üretimi boyunca sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayısı ve oksijen tüketim hızını belirlemek için Dinamik Metot kullanılmıştır (Bandyopadhyay ve Humprey, 1967). Dinamik metot biyoreaktör içinde aktif olarak büyüyen organizmaların solunum aktivitesine dayanır. Dinamik Yöntemde önce biyoreaktörde fermantasyon sıvısına giren hava akışı birkaç dakika boyunca kesilir ve çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalma oksijen probuyla takip edilir. Daha sonra hava önceki işletme şartları altında tekrar verilir ve oksijen konsantrasyonundaki artış zamanla ölçülür. Bu sırada hava girişi tamamen kesilmiş ve yüzey havalandırmanın etkisini azaltmak için karıştırma hızı 20-50 rpm arasına düşürülmüştür. Oksijen alım hızı (OAH), hava akışı kesildikten sonra çözünmüş oksijen konsantrasyonunun azalmasından

belirlenir ve prosedür üretim prosesi boyunca birkaç dakika tekrarlanabilir. Bu şartlarda denklem şu şekildedir (Eş. 1):

$$\frac{dC}{dt} = -q_o \cdot X = OAH \quad (1)$$

Burada, OAH hava akışı kesildikten sonra zamana karşı çözünmüş oksijen konsantrasyonu eğrisinin eğiminden hesaplanır. Temel varsayım, test sırasında gaz ve sıvı arasında hiçbir oksijen değişiminin olmadığı ve gaz sirkülasyonu durdurulurken bağlantılı akış dinamiklerinde bir değişimin OAH’ nı etkilemediğidir. Hava tekrar verildiğinde çözünmüş oksijen konsantrasyonu denge halindeki konsantrasyona kadar artar. Bu şartlarda hem oksijen transfer hızları (OTH) hem de oksijen alım hızı ifadeleri uygulanır. Dinamik metotta kütle denklığı yazılırsa (Eş. 2);

$$\frac{dC}{dt} = OTH - OAH \quad (2)$$

ya da (Eş. 3)

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) + q_o X \quad (3)$$

Bu denklem çevrilerek aşağıda verilmiştir (Eş. 4);

$$C = -\frac{1}{k_L a} \left( \frac{dC}{dt} - q_o \right) + C^* \quad (4)$$

Burada k<sub>L</sub>, oksijen aktarım katsayısı (m s<sup>-1</sup>), a, gaz-sıvı ara yüzey alanıdır (m<sup>2</sup> m<sup>-3</sup>). k<sub>La</sub> hacimsel oksijen transfer katsayısı (s<sup>-1</sup>), C<sub>o</sub>\* doygunluk çözünmüş oksijen konsantrasyonu (g L<sup>-1</sup>), C<sub>o</sub> sıvı besiyerindeki gerçek çözünmüş oksijen konsantrasyonu (g L<sup>-1</sup>), X mikroorganizma konsantrasyonu (g L<sup>-1</sup>) ve q<sub>o</sub> (mg L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) spesifik oksijen tüketim hızıdır.

Havalandırmanın kesildiği bu zaman periyodunda oksijen tüketim hızı q<sub>o</sub>, hesaplanmıştır. Biyoreaktöre havanın tekrar verilmesiyle çözünmüş oksijen konsantrasyonunun artması sonucu Eşitlik 4. kullanılarak elde edilen eğrinin (C<sub>o</sub>, dC<sub>o</sub>/dt-q<sub>o</sub>) eğiminden k<sub>La</sub> değeri belirlenmiştir.

### Güç Gereksinimi Hesabı

Biyolojik bir proseste elde edilecek iyi sonuç, iyi bir karışırmaya bağlıdır. Karıştırma iki veya daha fazla fazın gelişi güzel biri birinde dağıtılmasıdır.

Research article/Araştırma makalesi  
 DOI:10.29132/ijpas.1028443

Mikroorganizmaların bir sıvı içinde karıştırılması, mikroorganizmaların sıvı ile sürekli temasını ve sıvı içinde askıda tutulmasını sağlar. Mikroorganizmaların sıvı içindeki süspansiyonu ve süspansiyonun hareket halinde muhafazası genel olarak parçacıkların çökme hızına bağlıdır. Bu da taneciklerin büyüklüğüne, şekline, yoğunluğuna, sıvının viskozitesi ve yoğunluğuna, çökmenin serbest veya engelli olup olmadığına bağlıdır. Genel olarak küçük ve 0.3 m dak<sup>-1</sup> lık bir çökme hızına sahip hafif tanecikler kolaylıkla süspansiyon edilebilirler. Bir karıştırılmalı kabın tasarımında karıştırıcıyı çevirmek için gerekli olan güç hesabı önemlidir. Bu, en basit sistemde dahi teorik olarak bulunamaz. Fakat boyutsal analiz yardımıyla hesaplanabilir. Sürüklenme kuvvetinin atalet kuvvetine oranı güç sayısı olarak adlandırılır (Eş. 5) (Dursun, 1998).

$$N_{Po} = \frac{P_g g_c}{n^3 D_a^5 \rho} \quad (5)$$

Karıştırma esnasında sisteme verilen güç (Eş. 6);

$$P = \frac{K_T n^3 D_a^5 \rho}{g_c} \quad (6)$$

Burada;

$N_{Po}$ : güç sayısı

$P_g$ : sisteme havalandırma yapıldığında güç gereksinimi (w)

$g_c$ : newton kanunu faktörü (kg m kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)

$n$ : karıştırıcı devir sayısı (rpm)

$D_a$ : karıştırıcı çapı (cm)

$\rho$ : yoğunluk (g mL<sup>-3</sup>)

$K_T$ : sabit (6.3)

Bu ifade de hesaplanan güç, sistemde havalandırma olmadığı durumda sisteme verilen güçtür. Sisteme hava verildiğinde, havalandırma da bir miktar karıştırma sağladığından sistemin güç gereksiniminde karıştırma yapılmayan duruma kıyasla azalma olur. Her iki durumdaki güç tüketimi oranı havalandırma sayısının bir fonksiyonudur (Eş. 7-8).

$$\frac{P_g}{P} = f(N_a) \quad (7)$$

$$N_a = \frac{F}{n D_a^3} \quad (8)$$

F: hava akış hızı (vvm)

$N_a$ : havalandırma sayısı' dır.

Literatürde karıştırıcı türüne göre  $P_g/P$ ' ye karşı havalandırma sayısı grafikleri mevcuttur. Havalandırma sayısı bulunarak  $P_g/P$  karşı  $N_a$  grafiklerinden  $P_g/P$  oranının değeri belirlenerek  $P_g$  hesaplanabilir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Karıştırma Hızının Etkisi

Karıştırma, besiyerinin uygun şekilde karışmasını sağlar ve sistem verimliliğinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu etkiler, hücre duvarının bozulması, hücre morfolojisinde değişimler, substrat kullanımında, üreme hızında ve ürün oluşumu veriminde değişiklikler gibi faydalı ya da zararlı olabilir. Hücre bozulması; genelde tepkime kabındaki kayma geriliminin hücre duvarını kırmak için gerekli kuvvetten daha yüksek olduğu durumda oluşur. Ayrıca yüksek karıştırma hızlarında aşırı köpüklenme meydana gelir (Naik ve ark., 2008). Karıştırılmalı biyoreaktörde karıştırma hızı oksijen aktarımını etkileyen temel parametrelerden biridir.

0.1 vvm hava akış hızında, farklı karıştırma hızlarının (200, 300 ve 400 rpm) mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 2' de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi 200, 300 ve 400 rpm' de elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları sırasıyla 0.0584, 0.0790 ve 0.0825 (sa<sup>-1</sup>) olarak belirlenmiştir. Karıştırma hızının artmasıyla, mikroorganizma substrat temasının artması sonucu mikroorganizma özgül üreme hızı artmıştır.

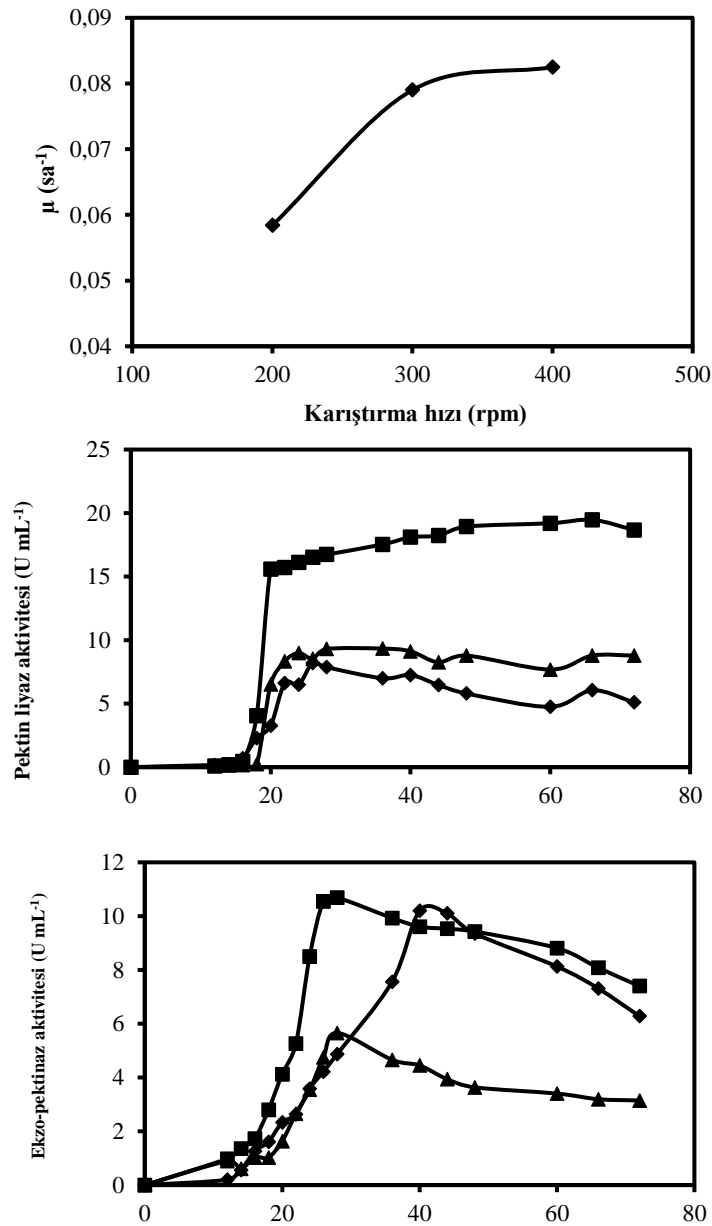
Pektin liyaz, endo ve ekzo-pektinaz aktivitelerinin zamanla ve karıştırma hızı ile değişimi Şekil 2' de verilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi, en yüksek pektin liyaz aktivitesi 300 rpm' de 66. saatte 19.5, ekzo-pektinaz aktivitesi 28. saatte 10.69, endo-pektinaz aktivitesi 66. saate 102.13 U mL<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. Bu durum, düşük karıştırma hızında yetersiz karıştırma ya da oksijen kısıtlaması ile açıklanabilir (Kao ve ark., 2007). Çok yüksek karıştırma hızlarında ise, ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ve makromoleküllerin dağılımı artmakta enzim aktiviteleri negatif olarak etkilenebilmektedir (Feng ve ark., 2003). Yüksek karıştırma hızlarında metabolit üretimindeki azalma,

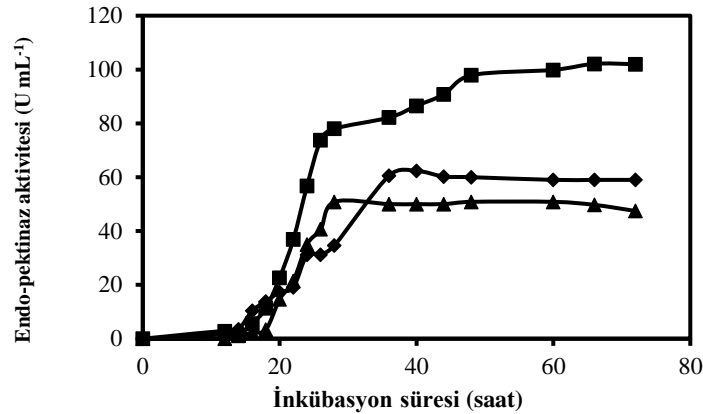
Research article/Araştırma makalesi  
DOI:10.29132/ijpas.1028443

yüksek kayma gerilmelerine maruz kalan hücrelerin hasarı ve bozulmalarından kaynaklanmaktadır (Bandaiphet ve Prasertsan, 2006).

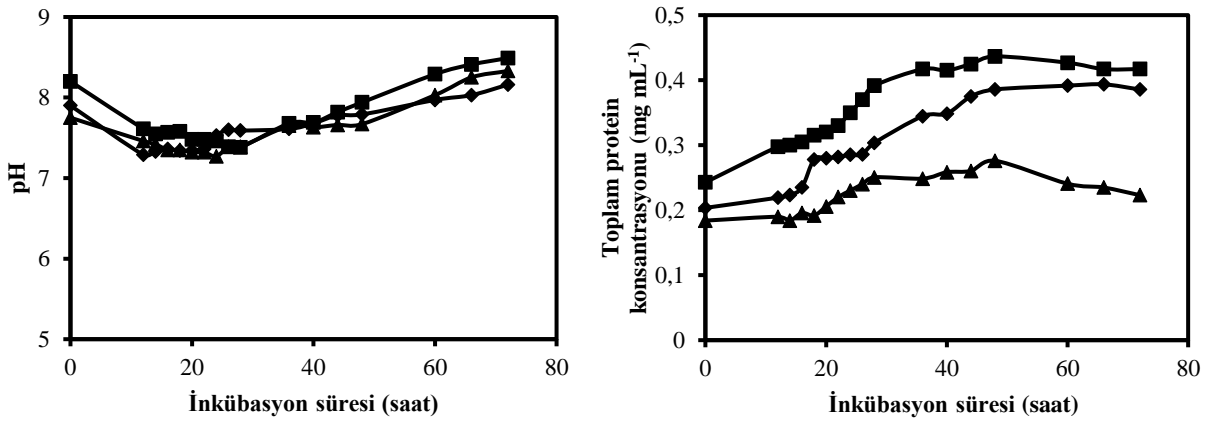
Öncü (2007) tarafından yapılan çalışmada, 500 rpm' de elde edilen maksimum biyokütlenin 200 ve 350 rpm' de elde edilenlerden sırasıyla 3.27 ve 3.67 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Maksimum enzim üretimini ise 200 rpm' de elde etmişlerdir. Oksijenin proses için sınırlayıcı bir adım olmadığını ve enzim sentez metabolizması ile bunun kısmen bağlantılı olduğunu açıklamışlardır. Benzer sonuçlar Songpim ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada da

kaydedilmiştir. Songpim ve ark. (2010) *P. polymyxa* ile pektat liyaz aktivitesini etkileyen parametreleri optimize etmek için tepki yüzey metodunu kullanmışlar ve 200 rpm ve üzerindeki karıştırma hızlarında enzim üretiminin azaldığını tespit etmişlerdir. Lee ve ark. (2010) ise, pirinç kabuğundan karboksimetilselülaz üretimini optimize ettikleri çalışmalarında, yüksek karıştırma hızlarının karboksimetilselülaz üretimini inhibe ederken *B. subtilis* subsp. *subtilis*' in hücre üremesini teşvik ettiğini belirtmişlerdir.





Şekil 2. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları ve enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, Hava akış hızı: 0.1 vvm, ◆:200 rpm, ■:300 rpm, ▲:400 rpm)



Şekil 3. Farklı karıştırma hızlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, Hava akış hızı: 0.1 vvm, ◆: 200 rpm, ■: 300 rpm, ▲: 400 rpm)

pH ve toplam protein miktarının inkübasyon süresi ile değişimi Şekil 3' de verilmiştir. Ortamın pH değeri inkübasyon süresi ile önce azalmış, belli değere geldikten sonra artmaya başlamıştır. Biyoreaktörde havalandırılmalı şartlarda hızlı bir pH düşüşü ve ardından alkalinizasyon görülmüştür. Benzer durum Venugopal ve ark. (2007) tarafından termofilik mantar *Mycotypha* sp. AKM 1801 ile kahve posasından endo-pektinaz üretiminde havalandırmanın etkisinin araştırıldığı çalışmada da gözlenmiştir. Toplam protein konsantrasyonu enzim aktiviteleri ile paralel olarak en fazla 300 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. Maksimum protein miktarı 48. saatte 0.44 mg mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Daha sonraki biyoreaktör deneylerinde karıştırma hızı olarak, en yüksek enzim aktivitelerinin elde edildiği 300 rpm seçilmiştir.

Biyoreaktör deneylerinde daha yoğun bir karıştırma uygulandığından fermantasyon süresi

kısalır. Fermantasyon zamanının kısalması ve ürün oluşumunun artması üretim maliyetlerini azalttığından biyoreaktörlerde enzim üretimi çok avantajlıdır (Gummadi ve Kumar, 2006). Benzer sonuç, Gummadi ve Kumar (2008) tarafından biyoreaktörde yapılan *Debaryomyces nepalensis* ile pektin liyaz üretimi çalışmasında da gözlenmiş, fermantasyon süresi 95 saatten 65 saate azalmıştır.

#### Hava Akış Hızının Etkisi

Sulu çözeltilerde oksijen, çözünürlüğünün az olmasından dolayı hız sınırlayıcı faktördür ve aerobik fermantasyonlarda hücre büyümesini, ürün verimini etkiler (Potumarthi ve ark., 2007). Fermantasyon ortamında çözünmüş oksijen konsantrasyonu, gaz fazdan sıvı faza oksijen transfer hızına, mikroorganizmanın oksijen alım hızına ve oksijen tüketim hızına bağlıdır. Fermantasyon sırasında oksijen transferi; hava kabarcıklarından ortama,

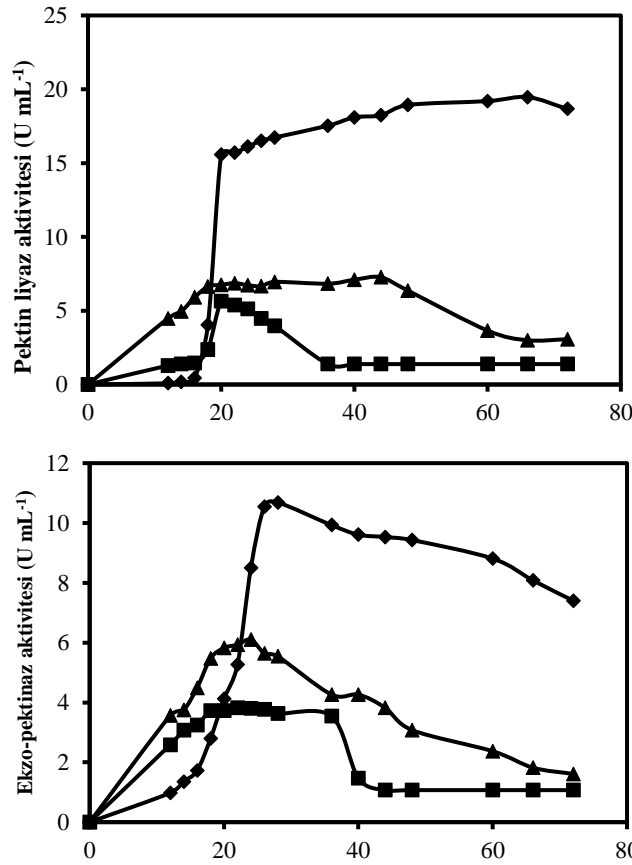


Research article/Araştırma makalesi  
DOI:10.29132/ijpas.1028443

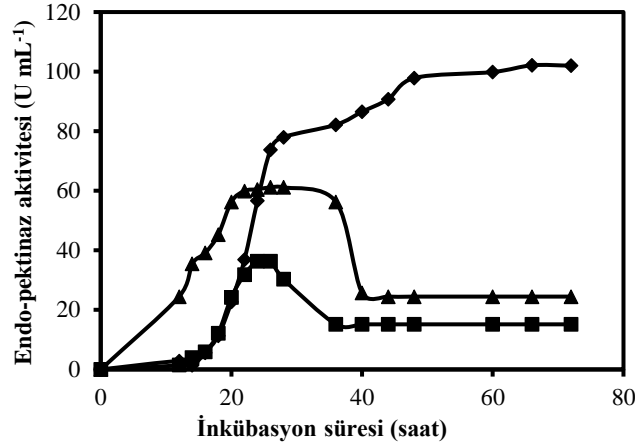
hücrelere ve hücre içinde reaksiyon bölgesine transfer ile gerçekleşir. Oksijen transferi, hava akış hızının artması ile artar (Naik ve ark., 2008). Ancak, yüksek hava akış hızlarında hücre hasarı sonucu inhibisyon oluşabilir (Fadzilah ve Mashitah, 2010).

Optimize edilmiş derin kültür fermantasyon ortamı kullanılarak 300 rpm karıştırma hızında, farklı hava akış hızlarının (0.1, 0.15 ve 0.2 vvm) enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir. Pektin liyaz, endo ve ekzo-pektinaz aktivitelerinin zamanla ve hava akış hızı ile değişimi Şekil 4' de sunulmuştur. Şekillerden de görüldüğü gibi en yüksek pektin liyaz aktivitesi 0.1 vvm' de 66. saatte 19.5, ekzo-pektinaz aktivitesi 28. saatte 10.69, endo-pektinaz aktivitesi 66. saatte 102.13 U mL<sup>-1</sup> olarak kaydedilmiştir. Hava akış hızının artması ile enzim aktivite değerlerindeki düşme enzim proteini moleküllerinin oksidasyonu ile açıklanabilir (Naik ve ark., 2008). Benzer sonuç, Songpim ve ark. (2010) tarafından, *P. polymyxa* ile pektat liyaz üretimi üzerine yapılan bir çalışmada

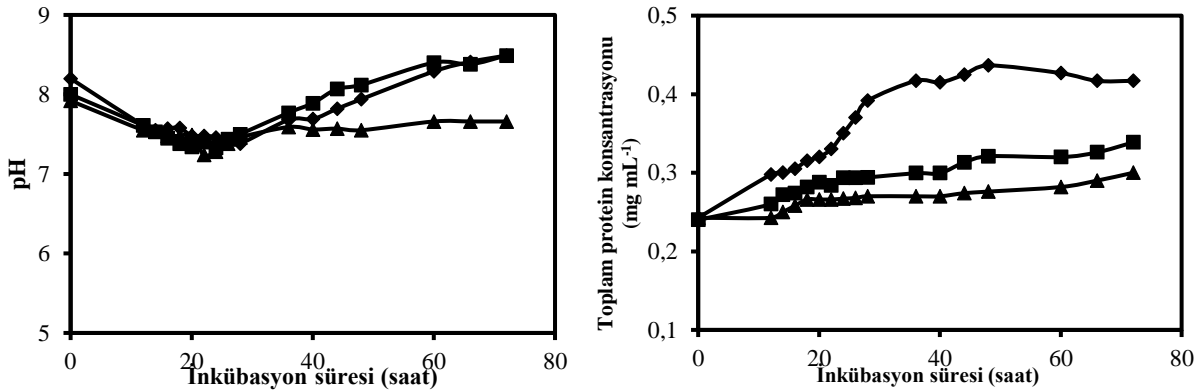
gözlenmiş, 1.0 vvm' nin üzerindeki havalandırma hızlarında enzim üretiminin inhibe olduğu belirtilmiştir. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu yaklaşık olarak 4 mg L<sup>-1</sup>' nin üzerine çıktığında *Bacillus pumilus* ile pektinaz sentezinin baskılandığı gözlenmiştir. Cruz-Guerrero ve ark. (1999) 3.3 mg L<sup>-1</sup> çözünmüş oksijen konsantrasyonunda *K. marxianus* ile endo poligalakturonaz üretiminin tamamen baskılandığını gözlemişlerdir. Farklı hava akış hızlarında pH değerinin ve toplam protein miktarının inkübasyon süresi ile değişimi Şekil 5' de verilmiştir. Ortamın pH değeri inkübasyon süresi ile önce az miktarda azalmış daha sonra artarak başlangıç pH değerine yakın değerlere ulaşmıştır. En yüksek toplam protein konsantrasyonu ise yine 0.1 vvm hava akış hızında elde edilmiş ve 48. saatte 0.44 mg mL<sup>-1</sup> olarak kaydedilmiştir.



Research article/Araştırma makalesi  
DOI:10.29132/ijpas.1028443



Şekil 4. Farklı hava akış hızlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 300 rpm, ◆: 0.1 vvm, ■: 0.15 vvm, ▲: 0.2 vvm)



Şekil 5. Farklı hava akış hızlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH= 8, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 300 rpm, ◆: 0.1 vvm, ■: 0.15 vvm, ▲: 0.2 vvm)

### Oksijen Transfer Parametreleri

Sulu çözeltilerde oksijen, çözünürlüğünün az olmasından dolayı hız sınırlayıcı faktördür ve aerobik fermantasyonlarda hücre büyümesi ve ürün verimini etkiler. Reaktörlerin işletme ve geometrik özellikleri, ortam bileşimi, viskozite, yüzey gerilimi, konsantrasyon, mikroorganizma morfolojisi ve hava kabarcıklarının yüzeyel alanı gibi birçok faktöre bağlı olan  $k_{La}$ , biyoreaktörlerin karıştırma-dağıtma ekipmanlarının dizayn ve işletiminde önemli bir parametredir (Marques ve ark., 2009).

Oksijen aktarım parametreleri olan oksijen tüketim hızı ( $q_o$ ) ve hacimsel oksijen transfer katsayısını ( $k_{La}$ ) bulmak için dinamik metot kullanılmıştır. 300 ve 400 rpm' de elde edilen sonuçlar Tablo 2' de verilmiştir. 200 rpm' de oksijen konsantrasyonu çok düşük olduğu için oksijen tüketim hızı ve hacimsel sıvı faz oksijen transfer katsayısı hesaplanamamıştır. Tablo 2' de görüldüğü

gibi, hacimsel oksijen transfer katsayısı değeri karıştırma hızının artmasıyla artmıştır. Bu etki, karıştırma hızındaki artış ile daha küçük boyutlu hava kabarcıklarının hızlıca parçalanması ve kütle transferi için mevcut gaz-sıvı ara yüzeyindeki artışa bağlanabilir (Gomez ve ark., 2006; Orman, 2007). 300 rpm karıştırma hızında en yüksek  $k_{La}$  değeri 26. saatte  $0.1524 s^{-1}$ , 400 rpm' de 60. saatte  $0.2623 s^{-1}$  olarak kaydedilmiştir. Ayrıca,  $k_{La}$  değeri inkübasyon süresince önce artmış sonra ise azalmıştır.  $k_{La}$  değeri sıvının viskozitesinin artmasıyla azalır (Garcia-Ochoa ve Gomez, 2009).  $k_{La}$  değerindeki değişimler inkübasyon süresi boyunca fermantasyon sıvısının viskozitesindeki değişimlere bağlanabilir. Nur Asshifa ve ark. (2017) karıştırılmalı bir tank biyoreaktörde *Pseudomonas aeruginosa* ile rhamnolipid üretiminde karıştırma hızının oksijen transferi üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında, karıştırma hızının 400 rpm' den 500

Research article/Araştırma makalesi  
 DOI:10.29132/ijpas.1028443

rpm' ye yükseldiğinde,  $k_{La}$  değerinin de 48.21' den 70.38  $sa^{-1}$ ' e yükseldiğini ifade etmişlerdir. Tablo 2' de inkübasyon süresince kuru mikroorganizma derişimi ile oksijen tüketim hızının değişimi de görülmektedir. Üstel üreme bölgesinde oksijen tüketim hızı zamanla artmış, üstel üreme bölgesinden sonra ise azalmıştır. İnkübasyon süresince oksijen tüketim hızının değişimi mikrobiyal büyümeye paralellik göstermektedir. Üstel üreme bölgesinde oksijen tüketim hızı mikroorganizmanın üstel büyüme fazında en yüksek değere ulaşmış, daha sonra da düşüş göstermiştir. Biyoproseslerde, mikroorganizma konsantrasyonundaki artışla oksijen tüketim hızının artması beklenen bir sonuçtur. Literatürde yapılan birçok çalışmada da, mikroorganizmanın üstel büyüme fazında oksijen tüketim hızı artmış, durağan fazda ve karbon kaynağının tükendiği durumlarda ise bu değer azalma göstermiştir (Ulgen ve Mavituna, 1998; Nur Asshifa ve ark., 2017). Li ve ark. (2018) *Escherichia coli* BL21 ile  $\alpha$ -siklodekstrin glikoziltransferaz üretimini inceledikleri çalışmalarında, logaritmik fazda oksijen tüketim hızının çok hızlı arttığını ifade etmişlerdir. Karıştırma hızı arttırıldığında ise oksijen tüketim hızında azalma meydana gelmiştir. 300 rpm

karıştırma hızında maksimum oksijen tüketim hızı 26. saatte 0.0185  $mg L^{-1} s^{-1}$ , 400 rpm değerinde en yüksek oksijen tüketim hızı ise 36. saatte 0.0151  $mg L^{-1} s^{-1}$  olarak kaydedilmiştir.

### Karıştırma İçin Gerekli Güç Hesabı

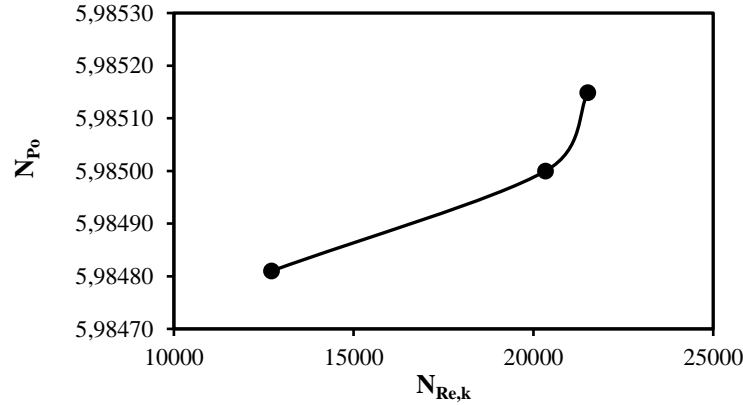
*Bacillus pumilus* ile biyoreaktörde pektinaz grubu enzimlerden ekzo-pektinaz, endo-pektinaz ve pektin liyaz üretiminde, değişik karıştırma kap Reynolds sayılarında ( $N_{Re,k}$ ) hesaplanan güç ( $P_g$ ) değerleri, güç sayılarının ( $N_{Po}$ ) bulunmasında kullanılmış, Eşitlik 5.' den hesaplanan güç sayıları, karıştırıcıya bağlı Reynolds sayısına karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 6' da verilmiştir. Optimum 300 rpm' de, sisteme hava gönderilmediği durumdaki güç  $P = 2.05 W$  olarak hesaplanmış, daha sonra havalandırmanın yapıldığı durumda ki güç değeri  $P_g = 1.95 W$  olarak bulunmuştur. Havalandırma da bir miktar karıştırma sağladığından sisteme hava gönderildiği durumdaki güç değerinin düşmesi beklenen bir sonuçtur. Birim hacim için verilmesi gerekli güç miktarı ise  $390 w m^{-3}$  olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 2.** Farklı karıştırma hızlarında  $k_{La}$  ve  $q_o$  değerlerinin zamanla değişimi

Karıştırma Hızı (rpm)	Zaman (saat)	X ( $g L^{-1}$ )	$q_o$ ( $mg L^{-1} s^{-1}$ )	$k_{La}$ ( $s^{-1}$ )
300 rpm 0.1 vvm	12	2.72	0.0098	0.0704
	16	3.60	0.0078	0.1006
	20	4.72	0.0138	0.0815
	22	5.20	0.0140	0.0769
	24	5.82	0.0151	0.1004
	26	7.26	0.0185	0.1524
	28	7.19	0.0161	0.1101
	36	8.76	0.0135	0.0944
	40	9.37	0.0125	0.0790
	44	10.01	0.0117	0.0727
	48	10.30	0.0098	0.0878
	60	10.80	0.0047	0.0932
	64	11.08	0.0046	0.1242
	68	9.57	0.0050	0.1095
72	9.56	0.0049	0.1089	
400 rpm 0.1 vvm	12	2.49	0.0109	0.2038
	14	3.06	0.0105	0.2134
	16	4.18	0.0104	0.2202
	18	4.15	0.0082	0.2236
	20	4.82	0.0100	0.2142
	22	5.84	0.0111	0.1784
	24	6.43	0.0145	0.1613
	26	6.82	0.0140	0.1776
	28	8.22	0.0122	0.2147
	36	10.39	0.0151	0.2249
40	12.60	0.0121	0.2265	

Research article/Araştırma makalesi  
DOI:10.29132/ijpas.1028443

44	12.93	0.0070	0.2462
48	13.24	0.0056	0.2203
60	14.72	0.0041	0.2623
66	13.67	0.0027	0.2602
72	13.71	0.0026	0.2540



Şekil 6. Reynolds sayısı ile güç sayısının değişimi

## SONUÇ

Bu çalışmada, kullanılan kesikli karıştırıcı biyoreaktörün *Bacillus pumilus* ile pektin liyaz, endo-pektinaz ve ekzo-pektinaz üretimi için faydalı olduğu ve pektinaz üretiminin karıştırma ve hava akış hızı ile etkilendiği ortaya çıkarılmıştır. En yüksek pektin

liyaz, ekzo-pektinaz ve endo-pektinaz aktivitesi değerleri 300 rpm' de ve 0.1 vvm' de elde edilmiştir. Hacimsel oksijen transfer katsayısı  $k_{La}$  inkübasyon süresi ve karıştırma hızına bağlı olarak ayrıca Reynolds sayısına bağlı olarak da güç sayısı değişmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın büyük bölümü Özlem Tepe' nin Doktora Tezinden türetilmiştir. Yazarlar 1674 nolu proje ile bu çalışmaya verdiği destekten dolayı FÜBAP' a teşekkür ederler

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu çalışmada herhangi bir şekilde çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİĞİ BEYANI

Yazarlar bu çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulduğunu beyan eder.

## KAYNAKLAR

Ahmed, J., Thakur, A., Goyal A. (2021). Emerging trends on the role of recombinant pectinolytic enzymes in industries-an overview. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 38, 102200.  
Aksöz, E. ve Aksöz, N. (1985). Pektik enzimler. *Biyokimya Dergisi*, 10 (1), 38-51.  
Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M. (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases-

A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1017–1026.

Bandaipheth, C. ve Prasertsan, P. (2006). Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient  $k_{La}$  in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, 66, 216–228.

Bandyopadhyay, B. ve Humphrey, A.E. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, IX, 533-544.

Cruz-Guerrero, A., Barzana, E., Garcia-Garibay, M. ve Gomez-Ruiz, L. (1999). Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 34, 621–624.

Demirci, Y. (2006). Reaksiyon mühendisliği prensipleriyle rekombinant L-Fenilalanin üretimi için biyoproses geliştirilmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).

Dursun, A.Y. (1998). Atıksulardaki ağır metal-siyanür kompleks iyonlarının serbest ve tutuklanmış *Pseudomonas fluorescens* ile biyolojik arıtımının kesikli ve sürekli sistemlerde karşılaştırmalı olarak incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi. Doktora Tezi.

Research article/Araştırma makalesi  
 DOI:10.29132/ijpas.1028443

- Fadzilah, K. ve Mashitah, M.D. (2010). Cellulases production in palm oil mill effluent: effect of aeration and agitation. *Journal of Applied Sciences*, 10 (24), 3307-3312.
- Fasim, A., More, V.S., More, S.S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68–76.
- Favela-Torres, E., Volke-Sepulveda, T. ve Viniegra-Gonzales, G. (2006). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technology Biotechnology*, 44 (2), 221–227.
- Feng, Y., He, Z., Ong, S.L., Hu, J., Zhang, Z. ve Ng W.J. (2003). Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum  $\beta$ -mannanase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 282–289.
- Ferreira, P., Lopes, M., Mota, M., Belo, I. (2016). Oxygen mass transfer impact on citric acid production by *Yarrowia lipolytica* from crude glycerol. *Biochemical Engineering Journal*, 110, 35–42.
- Garcia-Ochoa, F. ve Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology Advances*, 27, 153–176.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E. ve Merchuk, J.C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 289–307.
- Gomez, E., Santos, V.E., Alcon, A. ve Garcia-Ochoa, F. (2006). Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chemical Engineering Science*, 61, 4595–4604.
- Gummadi, S.N. ve Kumar, D.S. (2006). The effect of microbiological parameters on production of pectin lyase and pectate lyase by *Debaryomyces nepalensis*: A statistical approach. *Research Journal of Microbiology*, 1(3), 220-227.
- Gummadi, S.N. ve Kumar, D.S. (2008). Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *Bioresource Technology*, 99, 874–881.
- Haykır, I. (2007). Investigation of bioprocess parameters for glucose isomerase production by *Bacillus thermoantarcticus*, Middle East Technical University, Yüksek Lisans Tezi.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. ve Beg, Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 409–418.
- Ibrahim, C.O. (2008). Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. *Bioresource Technology*, 99, 4572–4582.
- John, J., Surendranathan Kaimal, K.K., Smith, M.L., Rahman, P.K.S.M., Chellam, P.V. (2020). Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 162 1086–1099.
- Kao, P.-M., Chen, C.-I., Huang, S.-C., Chang, Y.-C., Tsai, P.-J. ve Liu, Y.-C. (2007). Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 172–178.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S. ve Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77:215-227.
- Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345–351.
- Korkmaz, N. (2007). Recombinant therapeutic protease production by *Bacillus* sp., Middle East Technical University, Yüksek Lisans Tezi.
- Lee, B.-H., Kim, B.-K., Lee, Y.-J., Chung, C.H. ve Lee, J.-W. (2010). Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 38–42.
- Li, X., Xu, C.-Q., Luo, Y.-D., Zhang, S., Huang, C., Zou, K., Tan, Y.-L., Wu, Y.-X., Deng, Z.-S. (2018). Influence of the flow field on  $\alpha$ -cyclodextrin glycosyltransferase production by *Escherichia coli* BL21. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, 819–829.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-75.
- Marques, D.A.V., Torres, B.R., Porto, A.L.F., Pessoa-Júnior, A. ve Converti, A. (2009). Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 47, 122–126.
- Mill, P.J. ve Tuttobello, R. (1961). The pectic enzymes of *Aspergillus niger* 2. Endo polygalacturonase. *Biochemical Journal*, 79, 57-64.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mishra, S., Kumar, V., Sarkar, J., Rathore, A.S. (2021). CFD based mass transfer modeling of a single use bioreactor for production of monoclonal antibody biotherapeutics. *Chemical Engineering Journal*, 412, 128592.
- Naik, S.C., Kaul, P., Barse, B., Banerjee, A. ve Banerjee, U.C. (2008). Studies on the production of enantioselective nitrilase in a stirred tank bioreactor



Research article/Araştırma makalesi  
 DOI:10.29132/ijpas.1028443

- by *Pseudomonas putida* MTCC 5110. *Bioresource Technology*, 99, 26–31.
- Nedjma, M., Hoffmann, N. ve Belarbi, A. (2001). Selective and sensitive detection of pectin lyase activity using a colorimetric test: application to the screening of microorganisms possessing pectin lyase activity. *Analytical Biochemistry*, 291, 290–296.
- Nur Asshifa, M.N., Zambry, N.S., Salwa, M.S., Yahya, A.R.M. (2017). The influence of agitation on oil substrate dispersion and oxygen transfer in *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 fermentation producing rhamnolipid in a stirred tank bioreactor. *3 Biotech*, 7, 189.
- Ogawa, J. ve Shimizu, S. (2002). Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in japan. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 367–375.
- Olughu, W., Galbraith, D., Paget, C., Ruscoe, S., Smith, J., Mason, A. (2021). Does the BioBLU 0.3f single-use scale to the BioFlo® 320 reusable bioreactor on a matched volumetric oxygen mass transfer coefficient? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 11.
- Orman, M.A. (2007). Extracellular recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. Middle East Technical University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Yüksek Lisans Tezi.
- Ozzybek, M., Cekmecelioglu, D. (2022). Formulation of apple pomace, orange peel, and hazelnut shell mix for co-production of bacterial pectinase and cellulase enzymes by mixture design method, *Biomass Conversion and Biorefinery*, doi.org/10.1007/s13399-022-02409-0.
- Öncü, Ş. (2007). Investigation of the effects of dissolved oxygen concentration, aeration and agitation on the morphology and rheology in submerged fungal fermentation, İzmir Institute of Technology, Master Thesis.
- Potumarthi, R., Subhakar, C. ve Jetty, A. (2007). Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 185–192.
- Ramachandran, S. (2005). Isolation, purification and characterization of pectinase from *Penicillium citrinum*, School of Biosciences Mahatma Gandhi University Kottayam, Kerala India, Doctoral Thesis.
- Reid, I. ve Ricard, M. (2000). Pectinase in paper making: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 115–123.
- Shuler, M.L. ve Kargı, F. (2002). *Bioprocess engineering: basic concepts* (2nd Ed.). Prentice Hall Inc., USA.
- Soetaert, W. ve Vandamme, E. (2006). The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology Journal*, 1, 756–769.
- Songpim, M., Vaithanomsat, P. ve Chuntranuluck, S. (2010). Optimization of pectate lyase production from *Paenibacillus polymyxa* N10 using response surface methodology. *The Open Biology Journal*, 3, 1-7.
- Tuttobello, R. ve Mill, P.J. (1961). The pectic enzymes of *Aspergillus niger* 1. the production of active mixtures of pectic enzymes. *Biochemical Journal*, 79, 51-57.
- Ulgen, K. ve Mavituna, F. (1998). Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) culture in a batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 73, 243-250.
- Venugopal, C., Jayachandra, T. ve Anu Appaiah, K.A. (2007). Effect of aeration on the production of endo-pectinase from coffee pulp by a novel thermophilic fungi *Mycotypha* sp. strain No. AKM 1801. *Biotechnology*, 6(2), 245-250.
- Willants, W.G., Mc Cartney, L., Mackie, W. ve Knox, J.P. (2001). Pectin: cell biology and structural prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47(1-2), 9-27.
- Yılmaz, Ö.D. (2008). Metabolik mühendislik ve reaksiyon mühendisliği prensipleriyle hücre dışı rekombinant insan büyüme hormonu üretimi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.