



***Saccharomyces cerevisiae* KAYNAKLI
İNVERTAZ ENZİMİ ÜRETİMİNE
ULTRASONİKASYON PARAMETRELERİNİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sabriye Bükre ORAL

Yüksek Lisans

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU
2021**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Saccharomyces cerevisiae KAYNAKLI İNVERTAZ ENZİMİ ÜRETİMİNE
ULTRASONİKASYON PARAMETRELERİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Sabriye Bükre ORAL

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU

TEKİRDAĞ-2021

Her hakkı saklıdır.



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Sabriye Bükre ORAL



Bu tez TÜBİTAK tarafından 2190013 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Saccharomyces cerevisiae KAYNAKLI İNVERTAZ ENZİMİ ÜRETİMİNE ULTRASONİKASYON PARAMETRELERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sabriye Bükre ORAL

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU

İnvertaz enzimi bilimsel dilde β -fruktofuranozidaz ya da sükras olarak bilinmektedir. Hidrolaz sınıfına ait olan bu enzim kaynak olarak hayvan, bitki ya da mikroorganizmalardan yararlanılarak elde edilebilmektedir. İnvertaz enzimi intrasellüler yani hücre içerisinde faaliyet gösteren bir yapıya sahiptir. Protein yapısında olan invertaz enzimi herhangi bir dış faktör olmadıkça tüm faaliyetini hücre duvarından geçemediği için hücre içerisinde gerçekleştirir. Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisia* kaynaklı ekmek mayası fabrikası atığı olan eleküstü mayadan invertaz üretimi gerçekleştirilmiştir. *S. cerevisia* 'dan intraellüler yapıda olan invertaz enzimini üretebilmek için ultrasonikasyon cihazı kullanılarak ses dalgaları yardımı ile hücre yapısına zarar verilmiştir. Elde edilen enzimin protein miktarı ve enzim aktivitesinin maksimum düzeyde olabilmesi için ultrasonikasyon cihazı için süre, güç (amplitüt) ve maya miktarı parametreleri gerçekleştirilen deneylerde araştırılmıştır. Cevap yüzey yöntemi kullanılarak rastgele oluşturulan 20 farklı deneme modeli elde edilmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en yüksek protein miktarının 23,92 mg/ml'de, 45 dakika, %70 amplitüt ve % 36,82 gram değerlerinde olduğu, enzim aktivitesinin ise en yüksek olduğu değerlerin 1720 IU/ml, 45 dakika, % 70 amplitüt ve % 36,82 gram olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadaki amaç en yüksek protein miktarı ve invertaz enzimi aktivitesine ulaşmaktır. Bu sebeple kullanılan parametre aralıklarında belirlenen model denklemin tahmin başarısını ölçmede daha anlamlı sonuçlar vereceğinden kullanılan paket programda "response optimizer" seçeneği ile en yüksek değerleri sağlayan parametreler belirlenmiştir. Protein tayini optimizasyonu için % 49,5, enzim aktivitesi için %52 başarı sağlanabilmektedir.

Anahtar kelimeler: İnvertaz Enzimi, Ultrasonikasyon, Optimizasyon

2021, Sayfa 51

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATING the EFFECTS of ULTRASONICATION PARAMETERS on the PRODUCTION of INVERTASE ENZYME from *Saccharomyces cerevisiae*

Sabriye Bükre ORAL

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agriculture Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU

Invertase enzyme is scientifically known as β -fructofuranosidase or sucrase. This enzyme, which belongs to the hydrolase class, can be produced by animals, plants, or microorganisms. Invertase is an intracellular enzyme and it cannot pass through the cell wall. Invertase was produced by a waste product including sieve yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), obtained from a baker yeast factory. In order to extract the invertase enzyme, the cell was disrupted by an ultrasonication device using sound waves. Since the protein amount and enzyme activity of the obtained enzyme should be at maximum level, the parameters of time, power (amplitude) of ultrasonication, and yeast amount were investigated in the experiments. In the study, 20 different experiments were conducted which were randomly generated using the response surface methodology. As a result of the experiments, the highest protein amount was found as 23.92 mg protein/ml crude extract using following parameters: 45 min ultrasonication time, 70% amplitude, and 36.82% yeast concentration. Also, the highest enzyme activity was found to be 1720 IU/ml crude extract using following parameters: 45 min ultrasonication time, 70% amplitude, and 36.82% yeast concentration. The aim of the study was to reach the highest protein amount and invertase enzyme activity. The model equations were used to predict the amount of protein and invertase activity in crude extract at optimum conditions: ultrasonication time, amplitude and yeast concentration. Finally, it was recorded that the accuracy of the model for prediction of protein amount was 49.5% and that of invertase activity was 52%.

Key words: Invertase Enzyme, Ultrasonication, Optimization

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Enzimlerin Kısa Tarihi	4
2.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	5
2.3. İntertaz Enzimi	7
2.4. Ultrasonikasyon.....	9
2.5. Cevap Yüzey Yöntemi.....	16
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	20
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	20
3.2. Metod.....	21
3.2.1. Eleküstü Mayanın Tamponlanması	21
3.2.2. Cevap Yüzeyi Yöntemi Kullanılarak Ultrasonikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi.....	21
3.2.3. Protein tayini:	24
3.2.4. Enzim aktivite tayini:	24
3.2.5. Spesifik aktivite tayini	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	27
4.1. Çalışmaya ait kalibrasyon grafikleri.....	27
4.1.1. Protein tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eşitlik	27
4.1.2. Enzim aktivitesi tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eşitlik	27
4.2. Protein analizi sonuçları.....	28
4.3. Protein Analizi Optimizasyonu	32
4.4. Enzim aktivitesi analizi sonuçları.....	33
4.5. Enzim Aktivitesi Optimizasyonu	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38

KAYNAKÇA..... 39

ÖZGEÇMİŞ Error! Bookmark not defined.



ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması	7
Çizelge 3.1. Kullanılan bileşenlerin deney aralıkları.....	22
Çizelge 3.2. Merkezi kompozit deney tasarımı	23
Çizelge 4.1. Protein tayininde süre (S), güç (G) ve miktar (M) için denenen modellerin önem faktörleri ve R ² değerleri	29
Çizelge 4.2. Enzim aktivite tayininde süre (S), güç (G) ve miktar (M) için denenen modellerin önem faktörleri ve R ² değerleri.....	34



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. İvertaz enziminin genel tepkime mekanizması (Kat ve Keskin, 2013).....	8
Şekil 3.1. Çalışmanın işlem adımları	21
Şekil 4.1. Protein tayinine ait kalibrasyon grafiği	27
Şekil 4.2. Enzim aktivitesi tayinine ait kalibrasyon grafiği	28
Şekil 4.3. Protein miktarının (mg/ml) ultrasinikasyon gücü ve süresine göre değişimi.....	30
Şekil 4.4. Protein miktarının (mg/ml) ultrasonikasyon gücü ve maya miktarına göre değişimi	31
Şekil 4.5. Protein miktarının (mg/ml) ultrasonikasyon süresi ve maya miktarına göre değişimi	31
Şekil 4.6. Enzim aktivitesinin (IU) ultrasonikasyon gücü ve süresine göre değişimi	35
Şekil 4.7. Enzim aktivitesinin (IU) ultrasonikasyon gücü ve maya miktarına göre değişimi ..	35
Şekil 4.8. Enzim aktivitesinin (IU) ultrasonikasyon süresi ve maya miktarına göre değişimi	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	: Bovine Serum Albumin
$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$: Sodyum Potasyum Tartarat Tetrahidrat
CH_3COOH	: Asetik Asit
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$: Sodyum Asetat Trihidrat
d	: Dakika
DNS	: Dinitro salisilik asit
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
IU	: International Unit
IU/ml	: International unit/Mililitre
kDa	: Kilodalton
kHz	: Kilohertz
K _m	: Michaelis-Menten sabiti
M	: Molar
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/Litre
mg/ml	: Miligram/Mililitre
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normalite
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
pH	: Power of hydrogen
ppm	: Milyonda bir birim
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
U	: Unit
U/mg	: Spesifik aktivite
V _{max}	: Maximum hız

W	: Watt
W/ cm ²	: Watt/Santimetre kare
μL	: Mikrolitre
μmol/mL	: Mikromol/Mililitre



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aőamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU'na, tez çalıőmam boyunca özellikle laboratuvar analizleri esnasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaőlarım Neőe ÖZDİNÇ ve Seçil AYZ'a, uzakta olsa bile desteğini gördüğüm arkadaőım isil CEBECİ BJELAK'a ve son olarak hayatımın her döneminde maddi ve manevi olarak beni destekleyip, sevgi ve sabrını benden esirgemeyen kıymetli annem, babam ve kardeőime en içten teőekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2021

Sabriye Bükre ORAL



1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların uygun koşullar altında gerçekleşmesini sağlayan, bu reaksiyonları koordine eden protein yapısında özel biyolojik katalizörlerdir (Beilen ve Li, 2002; Panke ve Wubbolts, 2002). Enzimler intrasellüler enzim (endoenzim) ve ekstrasellüler (ekzoenzim) olmak üzere iki farklı formda sentezlenir. İtrasellüler enzimler; hücre içerisinde sentezlenmelerine rağmen, dışarı çıkamayıp hücre içerisinde rol oynarlar. Büyük bir enerji açığa çıkarırlar ve oksidasyon-redüksiyon olaylarının ayarlanmasında görev alırlar. Ekstrasellüler veya diğer adıyla ekzoenzimler ise hücre içerisinde sentezlenip dışarı salgılanırlar. Hidrolitik olarak aktivite gösterirler (Atasağungil, 1965; Topal, 1985).

Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizmaların canlı hücrelerinden sentezlenir. Canlıların doğal ürünü olması sebebiyle enzimler çevre ile uyumludur. Biyolojik olarak parçalanabilme yeteneğine sahip olmalarından dolayı imha problemi oluşturmazlar. Enzimler, geleneksel kimyasal katalizörlere kıyasla kullanımı avantajlı yapılardır. Genellikle kimyasal katalizörlerden çok daha üstün olan yüksek bir katalitik aktifliğe ve yüksek spesifik özgülüklere sahiptirler. Bu özgülükleri ile katalize edilmiş reaksiyonun yan reaksiyonlar tarafından bozulmamasını yani istenen son ürün elde edilerek istenmeyen yan ürünün ortadan kaldırılmasını sağlarlar. Enzimlerin kullanımı sayesinde yüksek reaksiyon verimi sağlanmasından dolayı endüstriyel kullanımlarda maliyet düşmektedir (Hasan, Shah ve Hameed, 2005; Kat, 2013; Krajewska, 2003).

İnvertaz enzimi, bilimsel dilde β - fruktofuranozidaz ya da sakkaroz olarak tanımlanıp E.C.3.2.1.26 numarasına sahiptir. Glikozit hidrolaz sınıfının bir üyesi olan invertaz enzimi, sakkarozun monosakkaritlerine parçalanmasını katalize eder (Yücekan ve Önal, 2012; Sirisatesuwon, Ninchan ve Sriroth, 2020).

Keşfedilen ilk enzimlerden birisi olan invertaz, ilk olarak mayadan izole edilmiştir (Bracho ve Whitaker, 1989). Kimliği belirlenen proteinler arasında önemli bir yere sahip olan invertazdan enzim kinetiğinin prensipleri oluşturulurken model enzim olarak faydalanılmıştır.

İnvertazlar yiyecek, içecek, kozmetik, ilaç ve kağıt sanayisinde birçok potansiyel uygulama alanına sahiptir. Doğada yaygın olarak bulunan invertazların varlığı bitkilerde, bazı hayvanların dokularında ve mikroorganizmalarda keşfedilmiştir (Margetić ve Vujčić, 2017).

Ülkemizde başarılı bir şekilde üretimi yapılan ve ekmek mayası olarak da isimlendirilen *Saccharomyces cerevisiae* en önemli invertaz kaynaklarından birisidir. Ekmekçilikte mayanın enzim üretebilme özelliğinden daha çok oluşturduğu şekerlerden yararlanarak karbondioksit oluşturma yeteneği ön plandadır. Bulk halinde üretilmesi esnasında *S. cerevisiae* hücre içerisinde invertaz enzimi salgılamaktadır. İlerleyen aşamalarda ürünün endüstriyel kullanım amaçlı dönüştürülmesinde de invertaz enzimi hücre içerisinde kalmaktadır (Leon-Gonzalez, Gonzalez-Valdez, Mayo-Deloisa ve Rito-Palomares, 2015; Özdiç, 2019).

İnvertazın ticari olarak üretilmesinde en önemli aşamalardan iki tanesi; enzim üreticisi mikroorganizma olan mayanın çoğaltılması ve maya hücrelerinin içerisinde invertazın en az aktivite kaybı ile dışarı alınmasıdır. Tez kapsamında kullanılacak enzim kaynağı maya, halihazırda üretimi tamamlanmış ve yapısında invertaz olduğu bilinen ancak ekmekçilik açısından yeterli özellikleri taşımadığı için artık olarak değerlendirilen elektüstü mayadır. Bu sebeple enzim üretiminin ilk basamağı olan maya çoğaltımı bu tez kapsamına dahil değildir. Maya hücresinden intraselüler bir enzimi, aktivite kaybına imkan vermeden, sulu dış ortama almak için çok sayıda yöntem kullanılabilir. Bunlar; ısı işlem, ultrasonikasyon, darbeli elektrik alan, deterjan uygulaması, alkali uygulaması, osmatik şok şeklinde sıralanabilir (Atasuğungil, 1965).

Yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde enzimlerin hücre içinden alınmasında ultrasonikasyonun kullanımının uygun bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Yüksek ses dalgaları yardımı ile hücre içerisi protein yapısına en az zararı vererek hücre dışı yapısı parçalanmakta ve enzimce zengin sıvı santrifüjlenerek ortamdan ayrılmaktadır. Birçok üretim prosesinde olduğu gibi, maya hücresine uygulanacak ultrasonikasyon işleminin de en uygun şartlarda gerçekleştirilmesi, yüksek verimli ve yüksek aktiviteli invertaz eldesi için çok önemlidir. Proses optimizasyonu olarak da adlandırılan uygun şartların belirlenmesinde klasik istatistik ve deneme planlama yaklaşımları yanında son yıllarda sıkça kullanılan, temel bileşen analizi, yapay sinir ağları ve cevap yüzeyi yöntemi gibi istatistiksel yöntemler de bulunmaktadır.

Cevap yüzeyi yöntemi (response surface, RSM) optimizasyonda kullanılan çok değişkenli teknikler arasında yer alan bir metodur. Bu metod, istatistiksel öngörüler yapmak amacıyla bir veri dizisinin davranışını tanımlaması gereken deneysel verilere bir polinom denkleminin sığdırılmasını temel alan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir bütünüdür. Bir cevap ya da ilgilenilen cevaplar dizisi birkaç değişkenden etkilendiğinde iyi bir şekilde

uygulanabilir. Amaç, en iyi sistem performansını elde etmek için bu değişkenlerin seviyelerini aynı anda optimize etmektir (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar ve Escaleira, 2008).

Bu tez kapsamında, en yüksek enzim aktivitesine ulaşabilmek için ultrasonikasyon prosesi parametreleri olan süre, amplitüt ve çözeltide kullanılan maya miktarını optimize etmek amaçlanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi ile en yüksek enzim aktivitesine sahip ham enzimin elde edilmesi ileri saflaştırma çalışmalarında çok daha kaliteli bir hammadde ile çalışabilme olanağı sağlayacaktır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enzimlerin Kısa Tarihi

İlk çağlardan bu yana insanlar enzimlerden yararlanmışlardır. Örneğin; maya, ekmek, peynir, şarap, bira gibi gıda ürünlerinin üretiminin dışında deri, keten, çivit işlenmesinde de enzimlerden yararlanıldığı bilinmektedir (Kirk, 2002). İlyada destanında M.Ö. 600 civarında peynir üretiminde sütü kesmek için fisin (incir ağacı özü) kullanımından bahsedilmiştir. Şarap üretimi için mayaların kullanımı çok eski bir yöntemdir ve ilk olarak M.Ö. 2100 civarında Hamurabi Kanunlarında bahsedilmiştir (Buxbaum,2007).

Enzimlerle ilgili bilimsel çalışma ve bulgular 18. yüzyıldan sonra ortaya çıkmaya başlamıştır. Spallanzani 1783 yılında yapmış olduğu çalışmada atmaca mide suyunun eti yumuşattığını gözlemleyerek midede pepsin enziminin varlığını tespit eden ilk bilim insanı olmuştur (Buxbaum,2007).

Kirchoff'un 1811 yılında buğday nişastanın zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü tespit etmesi, 1830 senesinde Robiquet, Boutron ve Chalan'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini bulmaları, enzim alanındaki yapılmış ilk çalışmalar olarak kabul edilmiştir (Yarar, 2008).

Enzimoloji alanındaki en önemli gelişmelerden birisi Fransız kimyagerler Payen ve Persoz'un 1833 yılında, nişastayı şekere dönüştüren termostalabil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle saflaştırmaları olmuştur. Günümüzde amilaz olarak tanımlanan bu enzim ilk zamanlarda diastaz olarak adlandırılmış ve bugün enzimlere dair çoğu geleneksel ve tüm sistematik isimlendirmedeki -ase eki temelini bu çalışmadan almıştır (Çalışkan, 2011).

1834 yılında, Alman bilim insanı Schwann, pepsin enzimini oldukça yüksek saflıkta izole etmiştir (Buxbaum,2007). Berzelius 1835 yılında, günümüzde amilaz olarak isimlendirdiğimiz diastaz ile nişastayı hidrolize etmiş ve 1838 yılında enzimler için ilk kez katalizör (biyokatalizör) ifadesini kullanmıştır.

Enzimlerin keşfinin ilk zamanlarında çoğu araştırmacı, fermentasyon olaylarında mayalar ve mayaların etkilerini incelediği için, enzimleri tanımlamak amacıyla ferment sözcüğünü kullanmışlardır. Louis Pasteur, 1850'lerde şeker ve maya varlığında alkol fermentasyonunun gerçekleştiğini gözlemlemiş olup, fermentasyonun canlı hücrelerde

gerçekleştirdiği fikrini savunmuştur. Bu fikrin aksine Liebig, fermentasyonun sadece canlı hücrelerde gerçekleşmeyeceğini, cansız ortamlarda da olabileceğini iddia etmiştir. Frederick W. Kühne, 1878'de ilk kez bu fermentleri enzim terimi ile tanımlamıştır (Topal, 1985).

Büchner, 1897 yılında maya hücrelerinden izolasyon gerçekleştirerek, enzimlerin canlı maya hücreleri dışında da aynı fonksiyonlarını yerine getirdiğini ispat ederek, önceden yaşanan fikir ayrılıklarına son vermiştir (Hammamchi, 2014; Özdiç, 2019).

1894 yılında Emil Fischer, enzimlerin substratlarına olan özgünlüklerini ortaya koyarak anahtar-kilit modelini, 1959 yılında ise Koshland uyum oluşturma (el eldiven) modelini kullanarak enzimlerin spesifikliğini ortaya koymuşlardır. Her iki model doğrultusunda bugün hala geçerliliğini korumakta olan adımlar atılmıştır.

1926 yılında Sumner, fasulyeden ilk kez üreaz enziminin izolasyon ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. 1947'de üreaz kristallerinin tamamen proteinden meydana geldiğini ileri sürdüğü hipotezi ile Sumner Nobel ödülünü almayı hak kazanmıştır (Yarar, 2008). Bunun ardından 1930'larda John Northrop ve Moses Kunitz pepsin ve tripsin enzimlerini kristalize edip, bunların protein yapıda olduklarını bulmuşlardır.

Enzimler, metabolik tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden kimyasal bakımdan protein ana yapıda olan moleküllerdir. Yüksek sıcaklıkta denatüre olup etkinliklerini kaybederler. Bunun haricinde ortam pH'sı, çeşitli aktivatör ve inhibitörler, basınç gibi faktörlerin enzimlerin çalışma hızlarını ve mekanizmalarını etkilediği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Atasağungil, 1965).

Enzimlere dair çalışmalar yirminci yüzyılın sonlarına doğru artış göstermiştir. Bunun sonucu olarak pek çok enzim saflaştırılmıştır. Birçok enzimin kimyasal yapısı ve çalışma mekanizması açıklanmıştır. Farklı alanlarla enzim kullanımı her geçen gün artmakta ve yaygınlaşmaktadır.

2.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimler ile yapılan çalışmaların ilk yıllarında, keşfedilen enzimin sonuna -az eki getirilerek isimlendirme yapılmıştır. Örneğin; üreaz, lipaz, amilaz gibi. Fakat 1950'lerin sonuna gelindiğinde bulunan enzim sayısının artması ve araştırmacıların aynı enzime farklı isimler vermelerinden dolayı karışıklıklar yaşanmıştır. Bu karışıklıkların ortadan kaldırılması için

Uluslararası Biyokimya Derneği (International Union of Biochemistry) tarafından, 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) kurulmuştur. Bu komisyonun görevi; enzimlerin adlandırılması, sınıflandırılması, aktivite birimlerinin ve enzim kinetiği ile ilgili sembollerinin belirlenmesi olmuştur.

Enzimlerin adlandırılması ve numaralandırılması için temelde üç ana prensip belirlenmiştir. Birincisi; tek enzimler için, sonu -az eki ile biten isimler kullanılmalıdır. İkincisi; enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre isimlendirilmelidir. Üçüncüsü; birbirinden farklı tipte birden çok reaksiyon adını katalizleyen enzimler adlandırılırken katalizlediği ilk reaksiyon adını esas alınmalıdır. Biri sistematik diğeri ise geleneksel olmak üzere enzimler genellikle iki isime sahiptir (Aehle, 2004).

1961 yılında enzim komisyonunun hazırladığı rapora göre enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana gruba ayrılmıştır. Bu altı grubun dört ile on üç arasında değişen alt sınıfları mevcuttur. Bu sınıflarda yer alan her enzim dört rakam ile belirlenen bir enzim kod numarası (E.C. No) ile ifade edilmiştir.

1. Birinci rakam, enzimin altı ana bölümden hangisinde yer aldığını ifade eder.
2. İkinci rakam, etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu simgeler.
3. Üçüncü rakam, alıcı grubu gösterir.
4. Dördüncü rakam, serinin alt-alt sınıfının numarasını tanımlar.

Katalizledikleri reaksiyonun tipine göre adlandırılan enzimlerin altı ana grubu aşağıdaki gibidir:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Yükseltgenme reaksiyonu; moleküle oksijen eklenmesi veya hidrojen ayrılması, indirgenme reaksiyonu; molekülden oksijen ayrılması veya hidrojen eklenmesi olarak tanımlanabilir.

2. Transferazlar: Bir molekülden hidrojen dışında kalan grupların transferini katalizleyen enzim sınıfıdır.

3. Hidrolazlar: Bu grup, su katılması ile bağların parçalandığı hidroliz tepkimelerini katalizlemektedir. C-O, C-N, C-C gibi bağlar hidrolitik olarak yıkıma uğrar.

4. Liyazlar: Hidroliz ya da oksidasyon reaskiyonu dışında yollarla çeşitli kimyasal bağları kırabilen, genellikle bunu yeni bir çifte bağ oluşumu ve çifte bağa katılma şeklinde gerçekleştirirler.

5. İzomerazlar: Molekül içindeki geometrik ya da yapısal yeniden düzenlemeyi katalizlerler. Katalizledikleri izomerizasyon tiplerine göre; rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz gibi değişiklik gösteren isimler alabilirler.

6. Ligazlar: Fosfat enerjisinden yararlanarak yüksek enerjili bağların C, O, S ve N arasında yeni bağ oluşumunu katalize ettiği enzimlerdir (Atasağungil, 1965).

Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasına dair bazı örnekler “Çizelge 2.1”de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzim Sınıfı	Enzim	Enzim Kod (E.C.)
Oksidoredüktazlar	Alkoldehidrogenaz	1.1.1.1
Transferazlar	Hekzokinaz	2.7.1.2
Hidrolazlar	İnvertaz	3.2.1.26
Liyazlar	Pürivat dekarboksilaz	4.1.1.1
İzomerazlar	Alanin rasemaz	5.1.1.1
Ligazlar	Pürivat karboksilaz	6.4.1.1

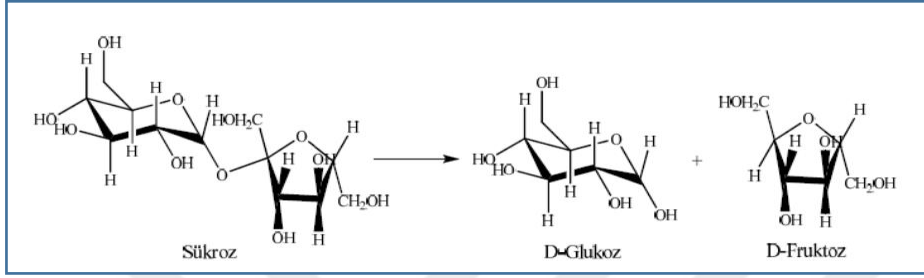
2.3. İnvertaz Enzimi

E.C.3.2.1.26 enzim koduna sahip olan invertazlar (β -fruktofuranozidaz), sakkarozun glikoz ve fruktoz hidrolizini katalize etmek amacıyla spesifik olarak tanımlanmış hidrolaz sınıfı enzimlerdir (Bhatti, Asgher, Abbas, Nawaz ve Sheikh, 2006; Osman, Kara, Uzun, Beşirli ve Denizli, 2005).

İnvertaz enzimi; invert şeker şurubu üretimi, şekerleme ve bisküvi üretimi, meyve suyu ve alkollü içecek üretimi, bebek maması üretimi, hayvan yemi üretimi ve farmasötik

uygulamalar gibi invert şekerin sakkarozu tercih edildiği çok farklı endüstri kollarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Guimaraes, Terenzi, Polizeli ve Jorge, 2007; Sirisatesuwon vd., 2019).

Genel tepkime mekanizması “Şekil 2.1 ”de gösterilmiş olan invertaz karboksilik grup bakımından zengin, krem renkli ve sıvı yardımcı ile çözünebilen bir enzimdir. Kimliği ilk belirlenen proteinler arasında yer alması da invertaz enziminin önemini arttırmaktadır.



Şekil 2.1. İvertaz enziminin genel tepkime mekanizması (Kat ve Keskin, 2013)

İvertaz enzimi ile yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde bitkiler, bazı hayvan dokuları ve özellikle mikroorganizmalar ile kontrollü koşullar altında çalışıldığında enzim elde edildiği gözlemlenmiştir.

Karkaş (2009) tarafından yapılan çalışmada enzim kaynağı olarak *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Enzim aktivitesine etki eden bazı faktörlerin etkisi incelenmiş pH, sıcaklık ve depolama gibi bazı kararlılık testleri uygulanmıştır. Enzim aktivitesi dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile, protein tayini ise Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen invertaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 186 mM ve 29,8 U olarak bulunmuştur. Ekstrakte edilerek saflaştırılan invertaz enziminin endüstride rahatlıkla kullanılabilir özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

Şahin (2015) yapmış olduğu çalışmada ak dut (*Morus alba*) meyvesinde bitkisel kaynaklı invertaz ekstraktı elde etmiştir. İvertaz enzimi basit ve geleneksel metodlar ile ak duttan izole edilmiştir. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırmasında homojenizasyon ve santrifüjleme adımları sırasıyla takip edilmiştir. Yapılan invertaz ve protein tayini sonucunda 4,01 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Uygulanmış olan ileri saflaştırma teknikleri ile bu aktivitenin 5 kat artırıldığı ifade edilmiştir.

Bir diğerk çalışmada, enzim kaynağı olarak kokulu kara üzüm (*Vitus alba*) kullanılmıştır. Araştırmacı temin ettiği üzümleri çalışmaya uygun bir enzim preparatı elde etmek için invertaz enzimini geleneksel metodlar ile izole ederek kısmi olarak saflaştırmıştır. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla; homojenizasyon ve santrifüjleme adımlarını takip etmiştir. Elde edilen preparat ileri saflaştırma yöntemlerinden olan üç fazlı saflaştırma sisteminde enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. İnvvertaz enzimi aktivitesi DNS, protein tayini ise Bradford yöntemleri ile belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda invertaz enziminin aktivite, protein ve spesifik aktivite değerleri sırasıyla 4,3 U, 0,95 mg ve 4,5 U/mg olarak bildirilmiştir. Kokulu kara üzümünden invertaz enzimi 10,3 gibi yüksek bir saflaştırma katsayısıyla saflaştırılmıştır. Elde edilen enzim ile yapılan ileri saflaştırma ve immobilizasyon çalışmaları sonucunda başlangıç aktivitesinin %10'a yakını koruyabildiği tespit edilmiştir. Araştırmacı daha yüksek aktivite gösteren immobilize enzim eldesine dair çalışmalara devam edileceğini bildirmiştir (Kat, 2013).

Yine bitki kaynaklı invertaz üretimi çalışmasında Yücekan (2008), enzim kaynağı olarak domatesi kullanmış olup spesifik aktivite değerinin saf enzim için 31 U/mg seviyesinde olduğunu bildirmiştir.

Duman ve Kaya (2014) tarafından patatesten invertaz eldesine yönelik bir çalışma gerçekteşirilmıştir. Saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri araştırılmış, patatesten invertaz enzimi geri kazanım oranının oldukça yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Akardere, Özer, Bıçak Çelem ve Önal (2010) mikroorganizma kökenli bir kaynak olan *S. cerevisiae* kullanarak invertaz enzimi üretimi gerçekteşirmişlerdir. Ticari olarak satılan ekmek mayasının kullanıldığı çalışmada enzim aktivite değerinin 136,5 IU/ml olarak bulunduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Uygun kaynak belirlendikten sonra, invertaz enzimi eldesi gerçekteştirilmekte ve amacına uygun olarak farklı sektörlerde kullanılmaktadır. Fakat invertaz enzimi yapısından kaynaklı olarak bulunduğu ortama direkt olarak salgılanamadığı için bazı müdahalelere gerek duyulmaktadır.

2.4. Ultrasonikasyon

Enzim üretiminde öncelikle uygun bir kaynak seçilir. Bu kaynak bitki, hayvan ya da mikroorganizma kökenli olabilir. Üretilcek enzimin intrasellüler ya da ekstrasellüler enzim olup

olmadığına dair araştırma yapılır. Ekstrasellüler enzimler hücrenin bulunduğu ortama direkt olarak salınmaktadır. Aynı durum intrasellüler enzimler için geçerli değildir. İntrasellüler enzimlerin hücre duvarı ve ilgili yapıları; ultrasonikasyon, dondurup çözündürme, soğuk şok, osmatik şok, katı kırma, sıvı kırma, deterjan uygulaması, alkali uygulanması, EDTA ve lizozim uygulanması gibi işlemler ile muamele edilip parçalanması ile hücre içeriğinin dışarıya alınması gerekmektedir (Atasungil, 1965; Weijers ve Van't Riet, 1992; Wiseman, 1993).

Hücre parçalanması için kullanılan teknikler arasında ultrasonikasyon (sonikasyon), laboratuvar ölçeğinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Wang ve Sakakibara, 1996). Ultrasonikasyon, insan işitme eşiğinin (> 16 kHz) üzerinde frekanslara sahip ses dalgaları olarak tanımlanır ve en temel tanımıyla, frekansı 20 kHz veya daha fazla olan basınç dalgalarını ifade eder (Demirdöven ve Baysal, 2008).

Genel olarak, ultrason ekipmanı 20 kHz ile 10 MHz arasındaki frekansları kullanır. 20 ile 100 kHz arasında olan daha düşük frekanslı fakat daha yüksek güçlü ultrason, oluşturduğu kavitasyon (gaz kabarcıklarının patlaması) ile mikroorganizmaları inaktive etmek için gıda işlemede kullanılmaktadır (Demirdöven ve Baysal, 2008). Düşük yoğunluklu ultrason; fizikokimyasal özellikler hakkında bilgi sağlarken, yüksek yoğunluklu ultrason; emülsifikasyon, homojenizasyon ve ekstraksiyon için kullanılmaktadır. Ultrasonikasyon, gıdaların kalitesini arttırmak için kullanılan hızlı, etkili ve güvenilir bir yöntemdir. Ayrıca farklı özelliklere sahip yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır (Soria ve Villamiel, 2010).

Kim ve Zayas (1989) tarafından yapılmış olan çalışmada, ultrasonikasyon yardımı ile kimozin ekstraksiyonunun işleme parametreleri incelenmiştir. Kimozin ekstraksiyonunun ultrasonikasyon ile muamelesi sonucu optimal parametreler; spesifik yoğunluk 20 kHz ve frekans 36 W/ cm², uygulanma süresi 80 d, sıcaklık 25 °C olarak bildirilmiştir.

Salvia officinalis (adaçayı)'den farmasötik olarak aktif bileşiklerin elde edilmesinde geleneksel ve ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Salisova, Toma ve Mason (1996)'a göre bu çalışmada kullanılan ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon sayesinde, geleneksel ekstraksiyona göre daha kısa sürede daha yüksek verimde ekstrakt elde edildiği belirlenmiştir. Tekrarlı ve kontrollü bir şekilde gerçekleştirilen deneylerin sonucuna göre *Salvia officinalis* 'ten ultrasonikasyon banyosu kullanılarak elde edilen ekstraktın optimum koşullarının 30 °C'de 12 saat olduğu bildirilmiştir.

Ultrasonikasyon banyosuna mekanik karıştırma eklenmesi ile 20 °C'de 2 saat süre ile gerçekleştirilen deneyde aktif bileşiklerin %60 düzeyinde bir ekstraksiyon gerçekleştiği sonucu elde edilmiştir. Bununla birlikte, bu tekniği kullanırken karşılaşılan tek zorluk, ekstraksiyon sıcaklığının doğru bir şekilde kontrol edilememesi olduğu sonucuna varılmıştır.

Vinatoru (2001) tarafından gerçekleştirilen derleme tarzı çalışmada ise şifalı bitkilerden biyoaktif bileşiklerin ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonun yardımı ile eldesi araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda ultrasonikasyonun çözücü ekstraksiyonuna yardımcı olduğu ve fitofarmasötik ekstraksiyon endüstrisi için etkili bir araç olduğu ispatlanmıştır. Ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonun, hem küçük hem de büyük ölçekte kullanılabilen çok yönlü bir teknik olduğu bildirilmiştir.

Gıda ve ilaç endüstrisi için gerçekleştirilen bir çalışmada ultrasonikasyon yardımı ile çözücü olarak bütanol, etil asetat ve etanol kullanılması ile *Rosmarinus Officinalis* (biberiye) bitkisinden karnizoik asitin ekstraksiyon verimini arttırmak hedeflenmiştir. Sıcaklık 47 ve 53 °C arasında sabit tutularak bitkinin hem kurutulmuş hem de taze yaprakları kullanılarak ultrasonikasyon gerçekleştirilmiştir. Ultrasonikasyonun her üç solvent için de karnizoik asit verimini arttırdığı ve ekstraksiyon süresini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca sonikasyon işleminin çözücü etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Ekstrakte edilmiş karnizoik asit seviyelerine bakıldığında ultrasonikasyon etkisinin gıda ve ilaç sanayisinde istenilen amaç için kullanımının büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Albu, Joyce, Paniwnyk, Lorimer ve Mason, 2004).

Vanilya bitkisinden vanilin ekstraksiyonu esnasında geleneksel soxhlet ve ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonun karşılaştırılması amacıyla Jadhav, Rekha, Gogate ve Rathod (2009) tarafından bir çalışma yapılmıştır. Her iki ekstraksiyon yöntemi için farklı işlem periyotlarının incelendiği çalışmada; 6 farklı çözücü (etanol, metanol, asetonitril, aseton, hekzan ve kloroform), numune miktarı 1-3 g, çalışma sıcaklığı 90-100 °C, çalışma için 30-90 d olacak şekilde çalışılmıştır. Geleneksel soxhlet yönteminde 95 °C'de 66,67 ml/g çözücü oranı kullanılarak 8 saatte 180 ppm vanilin ekstraktı elde edilmiştir. Aynı sıcaklık ve çözücü oranında ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonda ise 1 saat içinde 140 ppm vanilin ekstraktı tespit edilmiştir. İşlem süresi ve elde edilen ekstrakt miktarı açısından bakıldığında ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon ile daha verimli bir çalışma gerçekleştirileceği sonucuna varılmıştır.

Escherichia coli'nin ultrasonikasyon yöntemi ile inaktivasyonunun sağlandığı bir çalışma Furuta vd. (2004) tarafından gerçekleştirilmiştir. Sonikatörde 27,5 kHz'den yüksek yoğunlukta dalgalarla çalışılmıştır. *E. coli* hücrelerinin %99 düzeyinde inaktivasyonu için 180 amplitüt genlikte çalışılması gerektiği tespit edilmiştir.

Fahmi, Khodaiyan, Pourahmad ve Emam-Djomeh (2011) yaptıkları çalışmada ultrasonikasyon uygulamasının soya fasulyesinden ekstrakte edilen soya sütünün protein içeriği ve reolojik özellikleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada işlem sıcaklığı 20 ve 40 °C, işlem süreleri 20, 40, 60 d gibi farklı işlem parametreleri ve 35 kHz frekanslı dalga boyu kullanılmıştır. Ultrasonikasyon uygulamasının soya sütünün protein içeriğini yaklaşık %6,3 gibi önemli bir oranda arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Adulkar ve Rathod (2014) tarafından yüksek yağ içerikli süt ürünleri atık suyunun ultrasonikasyon destekli enzimatik ön arıtması üzerine bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Katalizör olarak lipaz z enzimi kullanılan çalışmada 2000 mg/l yağ içeriği olan süt ürününün enzimatik ön hidrolizi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Farklı işlem parametrelerinin denemiş olduğu çalışmada %78'lik maksimum hidroliz için; %0,2 enzim yüklemesi yapıp, 30 °C sıcaklıkta, 25 kHz'de 165 W ultrasonikasyon gücüyle çalışılmıştır. Ultrasonikasyon etkisi altındaki ön hidrolizin geleneksel yöntemlere kıyasla reaksiyonun süresini 24 saatten 40 dakikaya düşürdüğü tespit edilmiştir. İleride gerçekleştirilecek çalışmalarda ultrasonikasyonun kullanılması ile zamandan tasarruf sağlanacağı kanıtlanmıştır.

Domates peroksidazının inaktivasyonu üzerinde sıcaklık ve ultrasonikasyonun etkisi Şahin Ercan ve Soysal (2011) tarafından incelenmiştir. Termal inaktivasyon için 63, 64, 65, 66 ve 67 °C sıcaklıklar ile çalışılmıştır. Ultrasonikasyonun domates peroksidazı üzerine etkisini gözlemek için 20-150 saniye süreyle %15, %25, %40, %50 ve %70 güç aralıkları araştırılmıştır. Ultrasonik güç arttıkça inaktivasyon oranının arttığı gözlemlenmiştir. %100 oranında peroksidaz inaktivasyonun 150 saniye %50 güç ve 90 saniye %75 güçte olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık ve işlem süresinin domates özütünün peroksidaz içeriğinde önemli bir azalma gözlenirken, ultrasonik işlem sonucunda domates özütünün peroksidaz içeriği üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Tang, Huang ve Lim (2003) ultrasonikasyonun kitosan molekülleri ve nanopartiküller üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Moleküler ağırlığı 146 kDa olan kitosan HCl'nin ve %96 olan deasetilasyon derecesinin artan ultrasonikasyon genliği

ve süresi ile azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda yüksek yoğunluktaki ultrasonikasyonun kitosan ve nanopartiküllerinin işlevlerini etkileyecek önemli tahribat oluşturduğu, ultrasonikasyon ile daha düşük güç ve daha kısa sürelerde çalışılması gerektiği sonucu elde edilmiştir.

Sürekli ultrasonikasyon işleminin *Vaccinium corymbosum* (yaban mersini) mikrobiyolojik, kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerine etkisi ile ilgili bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Mohideen vd. (2015) ultrasonik işlemcinin sürekli akış hücrelerine 24 mL / d ya da 93,5 mL / d'da pompalayıp ve burada $13,88 \pm 2,45$, $43,45 \pm 4,12$ ve $73,60 \pm 5,35$ (J / mL) olmak üzere üç işlem seviyesinde sonike işlemi gerçekleştirmişlerdir. Ultrasonikasyon uygulanmış ve ultrasonikasyon uygulanmamış sular, koliformlar, toplam aeroblar, mayalar ve küfler için analiz edilmiştir. Ultrasonikasyonun mikrobiyal sayımları önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon işlemi, yaban mersini suyunun antosiyaninlerini ve rengini koruduğu gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda, ultrasonikasyonun ısı işleme kıyasla alternatif bir yöntem olabileceği gösterilmiştir.

Salehan, Sulaiman ve Ajit (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Labisia pumila* bitkisinin ekstraksiyonunda ultrasonikasyon ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Çalışmada süre 1-8 saat, sıcaklık 40, 50, 60 ve 80 °C, sonikasyon gücü %40 ve örnek oranı 1:10 olacak şekilde deneyler gerçekleştirilmiştir. Gallik asit ekstraktının 6 saatte 50 °C'ye kadar yükselen sıcaklıkta arttığı bulunmuştur. Ultrasonikasyon yardımıyla gerçekleştirilen ekstraksiyon ile en yüksek gelişme 50 °C'de 2,26 kat olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar tarafından ultrasonikasyonun herhangi bir kimyasal yardım olmadan biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunu geliştirdiği sonucuna varıldığı bildirilmiştir.

Paniwnyk, Beaufoy, Lorimer ve Mason (2001) yapmış oldukları çalışmada *Sophora japonica* bitkisinin tomurcuklarından elde edilen ekstraktın ultrasonikasyon ile eldesini incelemiştir. Çözücü olarak seyreltik sulu alkali ve metanol kullanan geleneksel ekstraksiyon yöntemleri, aynı çözücüler içinde ultrasonik ekstraksiyon ile karşılaştırılmıştır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle 2 saat süreyle 80 °C sıcaklıkta ekstrat elde edildiğini, ultrasonikasyon ile ekstraksiyon gerçekleştirildiğinde 1 saat gibi kısa bir sürede 40 °C'de ekstratta %50'lik bir verim artışı olduğunu belirlemiştir. Ekstraksiyonlarda ultrasonikasyon yönteminin kullanılması, ekstraksiyon süresinde önemli bir azalma ve verimde maksimum artış sağlamıştır.

Balasundaram ve Harrison (2005) ultrasonikasyon, yüksek basınçlı homojenizasyon ve hidrodinamik kavitasyon kullanarak *S. cerevisiae* hücrelerinin parçalanması ile invertaz enzimi eldesini incelemişlerdir. Ultrasonikasyon, yüksek basınçlı homojenizasyon ve hidrodinamik kavitasyonun invertaz salınımındaki enerji verimliliği hesaplanıp, üç ekipman kendi arasında karşılaştırılmıştır. Bozulma için kullanılan üç cihazdan hidrodinamik kavitasyonun, *S. cerevisiae*'den invertaz salınımının diğer ikisine kıyasla daha verimli olduğu sonucu elde edilmiştir.

Aureobasidium pullulans'ın, sakkarozdan fruktooligosakkarit (FOS) üretimi için fruktosiltransferazın (EC 2.4.1.9) ana kaynağını oluşturduğu bilinmektedir. *A. pullulans* organizmasının hem hücre içi hem de hücre dışı fruktosiltransferazı ürettiği yapılan araştırmalar sonucu tespit edilmiştir. Lateef, Oloke ve Prapulla (2007), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada ultrasonikasyonun *A. pullulans* CFR 77'den fruktosiltransferaz salınımı üzerindeki ve ardından fruktooligosakkaritlerin enzimatik üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Akustik güç (W) ve işlem süresi (d) enzim eldesi için seçilmiş parametrelerdir. 3, 6, 9, 12 ve 15 dakikalık işlem süresi için 20, 40 ve 50 W'lık üç akustik güç seviyesi çalışılmıştır. Akustik güç ve sonikasyon süresinin, FOS üretimi için *A. pullulans* CFR 77'den hücre içi fruktosiltransferazın verimli salınımı üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu çalışmada sonikasyonun 9 dakika içinde 20 W'lık akustik gücün en verimli model olduğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir.

Vargas, Piao, Domingos ve Carmona (2004), yapmış oldukları çalışmada sükröz ile pepton ve şeker melası ile pepton içeren iki farklı ortama yerleştirilen *Aspergillus niger*'den invertaz enzimi salınımı ve aktivitesi üzerine ultrasonun etkilerini araştırmışlardır. Sonikasyon 20 kHz'lik bir ultrason kullanılarak 20 ve 40 amplitütte, 2-10 dakikalık periyotlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sonikasyon varlığında ve yokluğunda kültür süpernatantlarının toplam ve spesifik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Her iki amplitüt için incelenmiş olan zaman periyotlarında toplam invertaz aktivitesinde önemli bir artış sağlanmış ve en yüksek değerlerin elde edildiği amplitüt değerinin 20 olduğu sonucuna varmışlardır. Ultrason ile hücre bozulması sağlanmış, böylece invertaz salınımı gerçekleştirilmiş ve 4 dakika sonra enzimin aktivasyonu da meydana gelmiştir. İvertaz üretiminde, ekstraksiyon ve aktivasyon için en iyi koşulların; şeker melası ile pepton ortamında 20 amplitütte 8 dakika periyodu olduğu sonucuna varmışlardır. Bu yöntemin aynı zamanda endüstriyel işlemlerde kullanımının büyük potansiyel taşıdığı sonucu elde edilmiştir.

Aktif çamurdaki mikroorganizmalar tarafından salınan hidrolitik enzimler, buradaki organik madde bozunmasından sorumludur. Fakat, bu kaynağın optimal çıkarma prosedürü henüz iyi bir şekilde oluşturulmamıştır. Karn, Kumar ve Pan (2013) proteaz ve lipazın ekstraksiyonu için iyonik olmayan bir deterjan (TritonX-100) ve katyon değişim reçinesi ile birlikte ultrasonikasyon yardımı ile parçalama kullanarak aktif çamurdan ekstrakt eldesi üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Lipaz ve proteaz ekstraksiyonunda sırasıyla %0,1 ve %1 Triton X-100 konsantrasyonunun güçlü bir etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Aktif çamur prosesinden farklı enzimler için enzim ekstraksiyon prosesinin daha yakından incelenmesi gerektiği ve bu çalışmanın enzimlerin diğer endüstrilerden de ekstraksiyonu için bir temel oluşturabileceği çalışmacılar tarafından bildirilmiştir.

Ultrasonikasyon su ve atık su arıtımı için ileri oksidasyon proseslerinde kullanılan yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Genel olarak ultrasonikasyon, fiziksel ve kimyasal kirleticilerin yanı sıra patojenik mikroorganizmaları da sonikasyon yöntemiyle yok edebilen ve parçalayabilen bir dezenfeksiyon işlemidir. Budari, Ali, Hamid ve Musa (2015), incelemiş oldukları çalışmada dezenfeksiyon sürecinde bakteriyel bozulma için ultrasonikasyon yöntemini gözden geçirmişlerdir. Su ve atık su arıtma çalışmalarında fiziksel arıtma yöntemi olarak; ısıtma işlemi, darbeli elektrik alan ve membran ayırmadan yararlanılmaktadır. Dezenfektanların kullanıldığı kimyasal arıtma yöntemleri arasında; ozon, klor dioksit, brom, brom klorür, bakır/gümüş, potasyum permanganat ve hidrojen peroksit kullanıldığına yapılan araştırmalar sonucunda ulaşılmıştır. Gerçekleştirilmiş olan çalışmada ultrasonikasyon *Escherichia coli* bakterisinin üzerine beş dakika uygulanmasının ardından diğer fiziksel ve kimyasal arıtma yöntemlerinden daha etkili bir sonuç elde edildiği araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir. Dezenfeksiyon işleminde mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesi veya bozulması, su temini gerçekleştirilen tesislerde önemli bir konudur. Geleneksel mikroorganizma arıtma yöntemleri bazı sınırlamalara ve uygulama zorluklarına sahiptir. Bu sebeplerden dolayı yenilikçi ve çevre dostu bir uygulama olan ultrasonikasyon teknolojisinin su ve atık su arıtma işlemlerinde mikroorganizmalardan kurtulmak için kullanılmasında yeni bir alternatif oluşturacağı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Ultrasonikasyon işleminde bu çalışma için önemli olan parametreler amplitüt, süre ve çözültide kullanılan maya miktarı olarak belirlenmiştir. En doğru parametrelerin seçimi yani bu prosesin optimize edilmesi verimlilik açısından çok önemlidir. Proses parametrelerinin seçiminde geleneksel istatistikî yaklaşımlar kullanılabilmesine karşın, belirli parametre

aralıklarında daha detaylı proses modelleme olanağı veren modern tekniklerin kullanımı son yıllarda yaygınlaşmaktadır. Temel bileşen analizi, yapay sinir ağları ve cevap yüzeyi yöntemi gibi proses modelleme ve optimizasyonunda kullanılan yöntemler literatürde sıklıkla kullanılmaktadır.

2.5. Cevap Yüzey Yöntemi

Cevap yüzeyi yöntemi (Response Surface, RSM), çok çeşitli alanda deneysel model oluşturma ve optimizasyon için kullanımı tercih edilen istatistiksel tekniklerin bir kombinasyonudur (Alvarez, Ilzarbe, Viles ve Tanco, 2016). RSM ilk olarak 1950'lerde Box ve Wilson tarafından geliştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, gıda muhafazası, fermantasyon, tarım ve diğer mühendislik alanlarını içeren çeşitli deneysel tasarımlarda cevap yüzeyi yöntemi uygulanmıştır (Alvarez, Ilzarbe, Viles ve Tanco, 2016; Myers, Montgomery, Vining, Borror ve Kowalski, 2004).

Cevap yüzeyi yöntemi; deneylerin tasarımı, regresyon yoluyla yanıt yüzeyi modellemesi ve optimizasyon olmak üzere üç aşamadan meydana gelmektedir (Said ve Amin, 2015).

Yiğit, Aktaş ve Şahan (2013), yapmış oldukları çalışmada endüstride iyi bilinen bakteri kültürlerinden *L. brevis*'in çoğalma koşullarını cevap yüzey yöntemi kullanarak optimize etmek ve çoğalma kinetiklerini araştırıp gözlemlemeyi hedeflemişlerdir. Çalışma iki kısımdan meydana gelmektedir. Birinci kısımda; uygun mikroorganizma ve bu mikroorganizmanın büyüme ortamlarını belirlenmiştir. Bunun yanı sıra çoğalma hızını etkileyen parametreler; pH, sıcaklık (°C) ve Cd iyonu derişimi (mg/L) olarak belirlenmiş ve bu parametrelerin uygun aralıkları tespit edilmiştir. İkinci kısımda; cevap yüzeyi yöntemi içinde yer alan merkezi kompozit tasarım ile özgül çoğalma hızı yanıt olarak alınarak üç parametrenin optimizasyonunu çalışmışlardır. *L. brevis* için en iyi özgün çoğalma hızı koşulları pH 5,72, sıcaklık 33,01° C ve Cd derişimi ise 34,01 mg/L olarak bildirilmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında en yüksek özgül çoğalma hızı 0,0797 1/saat olarak model eşitliğinden hesaplanmıştır.

Das, Roy, Bhattacharjee, Chakraborty ve Bhattacharjee (2015), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada serbest ve hareketsiz modda laktöz hidrolizi için yanıt yüzey metodundan (RSM) yararlanarak proses değişkenleri arasındaki etkileşimleri optimize etmeyi hedeflemişlerdir. Opimize edilecek parametreler olarak; sıcaklık (15-45 °C), çözelti pH (5-9)

ve β -galaktosidaz enzim konsantrasyonu (2,8 mg/mL) belirlenmiştir. Serbest modda maksimum laktoz hidrolizi elde etmek için sıcaklığın 35,5 °C, pH'nın 6,7 ve enzim konsantrasyonunun 6,7 mg/mL şeklinde optimize edilmiştir. İmmobilize modda ise sıcaklık 30 °C'de, pH 5'te, enzim konsantrasyonunun değeri 5,2 mg/mL şeklinde optimize edilmiştir. Serbest moddaki enzim ile sadece kesikli çalışılabileceği, ancak immobilize enzim modu ile hem kesikli hem de sürekli işlem için kullanılabileceği tespit edilmiştir. İmmobilize enzimin, daha iyi enzim termostabilitesine, pH toleransına, birkaç döngü için yeniden kullanılabilir ve enzim aktivitesinin kaybını önlemeye yardımcı olduğu tespit edilmiştir. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilir olma özelliğinin işlem maliyetini düşüreceği bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada ise Velioğlu ve Çelikyurt (2016), bakteriyel ve fungal alfa amilaz üretimini cevap yüzeyi yöntemi ile modellemişlerdir. Üretimde besin bileşeni olarak süne zararı görmüş buğday ve kırık pirinç kullanılmıştır. Elde edilen model denklemlerine ait R^2 değerleri bakteriyel enzimin süneli buğday ve kırık pirinçten üretildiği çalışmalar için sırasıyla 0,719 ve 0,621, fungal enzimin süneli buğday ve kırık pirinçten üretildiği çalışmalar için sırasıyla 0,965 ve 0,922 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen değerler ve optimizasyon sonuçları doğrultusunda *Bacillus amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens* ile süneli buğdaydan α -amilaz üretimi çalışmasında en yüksek enzim aktivitesinin 33,27°C, 77 saat ve 0,39 g/100 ml süneli buğday varlığında ulaşılabileceği model tarafından tahmin edilmiştir. Aynı bakteri kullanılarak ve substrat olarak kırık pirinç varlığında en yüksek enzim aktivitesinin ise bileşen miktarı ve sıcaklık değerleri süneli buğday kullanılan deneme parametreleri ile aynı olmak şartıyla 86. saatte en yüksek değerine ulaşacağı model tarafından tahmin edilmiştir. *Aspergillus foetidus* kullanılarak süneli buğdaydan ve kırık pirinçten α -amilaz üretimi çalışmasında en yüksek enzim aktivitesine sıcaklığın 33,27°C, ortama eklenen süneli buğday ya da kırık pirinç oranının 6,11 g/100ml olduğu ve fermentasyonunu 105. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında hem bakteriyel hem de fungal α -amilaz üretiminde kullanılan mikroorganizmaların optimum enzim üretme sıcaklığının 28-32°C aralığının üstünde olduğu bulunmuştur. Yapılmış olan araştırma bu aralıktaki optimizasyon için yeterli olmasına rağmen, kullanılacak suşların özelliklerinin de dikkate alınarak, 30-40°C aralığının optimizasyon çalışmalarında denenmesi faydalı olacağı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Kobalt (Co) atık sularda bulunan en önemli ağır metallere biridir. Kimyasal bazlı endüstrilerdeki atık sularda bulunan Co gibi bazı metaller toksik veya zararlı etkiye sahip

olabilir. Bu nedenle çevresel tehlikeye neden olan atık sularda toksik metallerin giderilmesi önem arz etmektedir. Şahan ve Yılmaz (2017), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada doğal pomza minerali ile sulu çözeltilerden Co(II) iyonunun adsorpsiyonla giderimi kesikli sistemde incelemiştir. Merkezi kompozit tasarım (MKT) içeren cevap yüzey yöntemi (RSM) pH, başlangıç Co(II) konsantrasyonu (Co) ve sıcaklık (T, °C) gibi adsorpsiyonu etkileyen önemli ortam koşullarının optimize ve modellenmesi amacıyla bir cevap yüzeyi geliştirmek başarılı bir şekilde uygulanmıştır. MKT’de deneysel sonuçların uyduğu kvadratik modelden elde edilen model eşitliği ile optimum koşullar belirlenmiştir. Bu koşullar sırasıyla; pH 7,79, Co 69,84 mg/L ve sıcaklık 20 °C olarak bulunmuştur. Bu optimum koşullarda adsorpsiyon kapasitesi 2,816 mg/g ve adsorpsiyon yüzdesi ise %40,32 olarak hesaplanmıştır. Daha sonra program tarafından elde edilen bu bilgilerin deneylerle doğrulandığı aktarılmıştır.

Türken ve Pala (2016), yapmış oldukları çalışmada antioksidan içeriği yüksek bir meyve olan vişneden elde edilen vişne suyuna uygun sıcaklık koşullarında (20°C, 30°C, 40°C), farklı genlik değerlerinde (% 50, % 75, % 100) ve farklı sürelerde (2, 6, 10 dakika) ultrasonikasyon işlemi uygulamışlardır. Vişne suyunun antioksidan aktivite değeri deneysel olarak belirlenmiş ve cevap yüzey metodu kullanılarak modellenmiştir. Oluşturulan model için optimizasyon genetik algoritma (GA) tekniği kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda, antioksidan aktivite optimum değerlerini belirlemek amacıyla cevap yüzey metodu ile GA birlikte kullanımının mümkün olabileceği gözlemlenmiştir. Modelleme için yanıt yüzey metodu ve optimizasyon için GA’ nın kullanılması, etkin ve sistematik bir yaklaşım sağladığı bildirilmiştir.

Afshar ve Banisadi (2017), gıda paketlenme uygulamaları için uygun potansiyele sahip nişasta/jelatin/grafen oksit biyobozunur nanokompozit filmlerin tasarımını ve üretimi hakkında bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Deneyler, hazırlanan filmlerin özelliklerini etkileyen proses parametreleri olarak jelatin/nişasta ağırlık oranı (G/S ağırlık oranı) ve % grafen oksit (GO) ağırlık oranı tanımlanarak cevap yüzeyi yöntemi üzerinden Design Expert yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Optimizasyon yapılmış ve optimum filmin çeşitli özellikleri atıştırılmıştır. XRD ve SEM görüntüleri sonucunda, grafen oksit katmanlarının nişasta/jelatin matrisinde araya girebileceğini ve çözelti döküm yöntemiyle elde edilen matriste nanodolgu maddelerinin uygun şekilde dağıldığı doğrulanmıştır. Mekanik mukavemet, termal kararlılık, yüzey hidrofiliği ve grafen oksitin güçlendirme etkisi uygun bariyer özelliği ile ilişkili olabilecek GO'nun mevcut durumunda su buharı geçirgenliği iyileştirilmiştir. Hazırlanan filmlerin toprak altında

bozunması 6 hafta boyunca araştırılmış ve sonuçlar test süresi boyunca en az %30 ağırlık kaybı olduğunu göstermiştir. Genel olarak, elde edilen sonuçlar nişasta/jelatin/GO bileşiminin gıda paketleme uygulamaları için biyolojik olarak parçalanabilen nanokompozit filmlerin üretimi amacıyla iyi bir aday olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada Atacan ve Koçak Yanık (2017), fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi yüksek olan yaban mersininden elde meyve suyu konsantresinden püskürtmeli kurutucu yardımıyla meyve tozu üretim koşullarının cevap yüzeyi yöntemi ile optimize edilmesini hedeflemişlerdir. Çalışmada kurutma ajanı olarak maltodekstrin (DE8) kullanılmıştır. Hava giriş sıcaklığı (110-150°C) ve maltodekstrin oranı (%20-80) bağımsız değişkenler; fenolik madde geri kazanımı ve kurutma verimi ise bağımlı değişkenler olarak belirlenmiştir. Verimin ve fenolik madde geri kazanımının maksimum olduğu optimum kurutma şartları hava giriş sıcaklığı için 130°C, maltodekstrin oranı için ise %71 olarak tespit edilmiştir. Bu optimum koşulda hava çıkış sıcaklığı 76°C olarak kaydedilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen toz yaban mersini (%3,51 nem) için verim ve fenolik madde geri kazanımı sırasıyla %75,8 ve %86,1 olarak belirlenmiştir. Elde edilen toz üründe çözünürlük, yoğunluk, higroskopisite, gözeneklilik, yapışkanlık, akabilirlik, camsı geçiş sıcaklığı, toplam fenolik madde miktarı, toplam antosiyanin miktarı, antioksidan kapasite ve renk, kalite parametreleri olarak incelenmiştir. Çalışma sonunda yaban mersini suyu konsantresinden püskürtmeli kurutucu kullanılarak maltodekstrin varlığında yüksek verim ve fenolik geri kazanımı ile mikroenkapsüle toz ürün üretilebilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Püskürtmeli kurutma sonrası elde edilen yaban mersini meyve tozlarının fenolik içerik, antosiyanin miktarı, antioksidan aktivitesi, çözünürlük, higroskopisite, yoğunluk, gözeneklilik ve renk açısından oldukça iyi kalitede olduğu araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasında da RSM yöntemi kullanılmış olup, maya hücrelerine uygulanacak ultrasonikasyon işlemine ait proses parametreleri olan süre, amplitüt ve çözeltideki maya miktarı değerleri bağımsız değişkenler, ham enzim ekstraktındaki enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik enzim aktivitesi bağımlı değişkenler yani cevaplar olarak seçilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Tez çalışmasında hammadde olarak kullanılan eleküstü maya Kırklareli Lüleburgaz'da faaliyet gösteren Lesaffre Turquie A.Ş. ekmek mayası fabrikasından tedarik edilmiştir. Yaklaşık 10 kilografa yakın maya nem ve hava almayacak şekilde laboratuvara getirilmiştir. Analizler gerçekleştirilinceye kadar vakumlu poşetlere aktarılarak +4°C olan buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

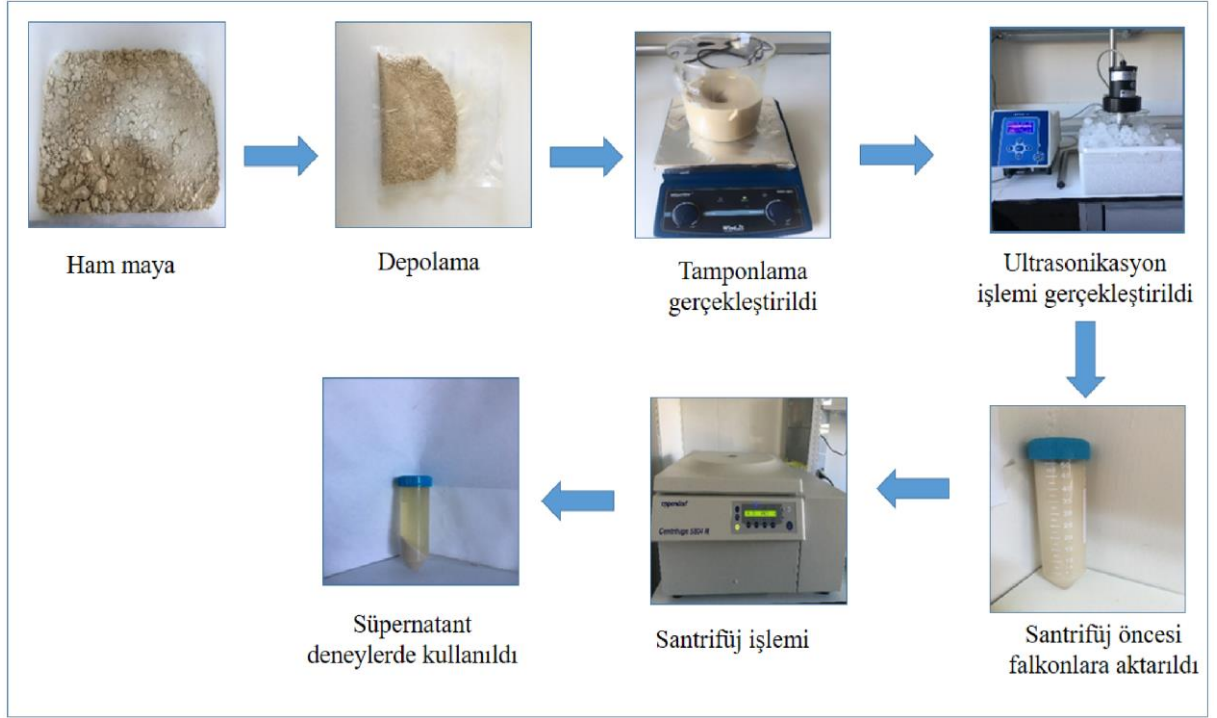
Çalışmada kullanılan sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$), asetik asit (CH_3COOH), 3,5- dinitro salisilik asit (DNS), sodyum hidroksit (NaOH), Na/K tartarat tetrahidrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), sükroz, Coomasie-Brilliant Blue, etanol, o-fosforik asit, bovine serum albumin (BSA) analitik saflıkta olup Merck (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir.

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

pH metre (Mettler Toledo, ABD), ultrasonikatör (Bandelin HD4200, Almanya), hassas terazi (RADWAG, Polonya), santirfüj (Eppendorf AG, Almanya), spektrofotometre (Mecasys Optizen POP, UV-Vis, Kore), manyetik karıştırıcı (Wisestir, Kore), su banyosu (JK-WBN-150A, Çin), vortex mixer (ISOLAB, Türkiye).

3.2. Metod

Çalışmada gerçekleştirilen işlem adımları “Şekil 3.1”de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın işlem adımları

3.2.1. Eleküstü Mayanın Tamponlanması

Ultrasonikasyon işlemi öncesinde kullanılacak örneğin çözdürülmesi için pH 5,0'lık 1M sodyum asetat tamponu, 6,8 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'a 1000 ml saf su içerisinde pH istenilen değerde sabitlenene kadar asetik asit (CH_3COOH) eklenmesi ile hazırlanmıştır.

3.2.2. Cevap Yüzeyi Yöntemi Kullanılarak Ultrasonikasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Ultrasonikasyon cihazı ve bazı kullanım alanları ile ilgili literatür örnekleri önceki bölümlerde verilmiştir.

Bu çalışmada deneysel tasarım, tezin önceki bölümlerinde hakkında bilgi verilmiş olan, cevap yüzey yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Eleküstü maya hücrelerinin parçalanmasını etkileyen ve daha fazla miktarda invertaz enzimi elde edilmesini etkilediği düşünülen süre, ultrasonikasyonun gücü (amplitüt) ve maya miktarı birleşik etkilerinin ortaya konmasında cevap yüzeyi yönteminin uygulanabilirliği test edilmiştir.

Parçalanması yapılacak maya hücrelerinin bileşimini etkileyecek olan süre, amplitüt ve maya miktarı cevap yüzeyi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan bileşenlerin deney aralıkları modellenmiş ve modellenmemiş değerler üzerinden “Çizelge 3.1”de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan bileşenlerin deney aralıkları

Değişkenler	Semboller	Modellenmiş değişken seviyeleri				
		$-\alpha(-1,682)$	-1	0	1	$+\alpha(1,682)$
Süre (d)	X_1	19,77	30	45	60	70,23
Güç (Amplitüt)	X_2	53,18	60	70	80	86,82
Miktar (g)	X_3	3,18	10	20	30	36,82

Üç faktörlü merkezi bileşik tasarım modeli ile 20 farklı deneme tamamen rastgele sıralama ile yapılmıştır. Deney tasarımı “Çizelge 3.2 ”de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Merkezi kompozit deney tasarımı

Deney sırası	Süre (d)	Güç (%)	Miktar (g)
1	30	60	10,00
2	60	60	10,00
3	30	80	10,00
4	60	80	10,00
5	30	60	30,00
6	60	60	30,00
7	30	80	30,00
8	60	80	30,00
9	19,77	70	20,00
10	70,22	70	20,00
11	45	53,18	20,00
12	45	86,81	20,00
13	45	70	3,18
14	45	70	36,81
15	45	70	20,00
16	45	70	20,00
17	45	70	20,00
18	45	70	20,00
19	45	70	20,00
20	45	70	20,00

İşlem görecek maya çözeltisi için; istenilen miktarda (g) maya üzerine hazırlanan 1000 ml (pH 5,0) tampon çözeltisi eklenerek, 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Maya çözeltisinin sonikasyonu esnasında ısınmadan kaynaklı enzim denatürasyonu probleminin aşılabilmesi için örnek bir gece boyunca buzdolabı koşullarında bekletilmiş, deney sırasında ise buz banyosu içerisinde çalışılmış ve çözeltinin sıcaklığı 25°C'yi aşmamıştır. Cevap yüzey yönteminin vermiş olduğu 20 farklı deneme noktasına istenilen süre, amplitüt ve miktarda sonikasyon işlemi dikkatli bir şekilde uygulanmıştır. Sonikasyonlar sonrasında elde edilen ekstraktlar 50 ml falkon tüplerine aktarılıp, +4°C, 10000 rpm'de 30 d santrifüjlenerek proteince zengin süpernatant kısımları toplanmıştır.

Ultrasonikasyon cihazının maya hücrelerinde istenilen parçalamayı sağlayıp sağlamadığı ve belirlenmiş parametrelerin hücre parçalaması üzerindeki etkisini kontrol etmek amacıyla protein tayini yapılmış ve invertaz enziminin aktivitesine bakılmıştır.

3.2.3. Protein tayini:

Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976). Örnek içerisindeki protein konsantrasyonunu ölçmek amacıyla kullanılan Bradford metodunun prensibi ortamdaki protein moleküllerinin asidik ortamda Coomassie blue G-250 boyasına bağlanarak spektrofotometrik olarak ölçülebilen kahvrengeiden maviye doğru değişen bir renk oluşturmasıdır. Metodun temeli bazik aminoasitler olan lisin, histidin ve arjinin kalıntılarının protein-boya kompleksi oluşturması üzerine kurulmuştur.

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 %95'lik 50 mL etil alkol ile manyetik karıştıcıda karıştırılarak çözdürülmüştür. Üzerine 100 mL %85'lik fosforik asit eklenip son hacim saf su ilave edilerek 1 L'ye tamamlanmıştır. Protein tayininde; 1/8, 1/20 ve 1/40 seyreltme oranları kullanılmıştır. Seyreltme işlemi, 1/8 oranı için; 2 mL'lik ependorf tüplerinde, 200 µL ham ekstrakt üzerine, 1400 µL tampon çözelti eklenerek, 1/20 oranı için 100 µL ekstrakt 1900 µL tampon çözelti eklenerek ve 1/40 oranı seyreltilmiş olan 1/20 oranındaki tüplerden 500 µL ekstrakt üzerine 500 µL tampon çözelti eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Seyreltme işleminin ardından, cam deney tüplerine 100 µL seyreltilmiş örnek mikropipet ile eklenmiştir. Kör numune için ise yine cam deney tüplerine 100 µL tampon çözelti (0,2 M, pH 5,0) eklenmiştir. Daha sonra, kör ve örnek tüplerinin tamamına 3'er µL Coomassie blue G-250 boyası eklenmiştir. Tüp içerikleri karıştırıldıktan sonra, spektrofotometre kuvvetlerine aktarılmıştır.

Elde edilen örneklerin 595 nm dalga boyundaki absorbansları, spektrofotometre ile tespit edilmiştir. Protein miktarının hesaplanmasında kullanılmak üzere kalibrasyon grafiğinin çizilebilmesinde, 0,1-0,7 mg/mL konsantrasyon aralığında bovine serum albumin (BSA) standart çözeltileri kullanılmıştır. Bunun için öncelikle, 0,100 g BSA tartılıp tampon çözelti ile 50 mL'ye tamamlanarak, 2 mg/mL'lik BSA stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.4. Enzim aktivite tayini:

Enzim aktivitesi sıklıkla IU (International Unit) veya U (Unit) birimi ile ifade edilmektedir. Bir IU enzim aktivitesi, optimum koşullarda, 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne

dönüştüren enzim etkinliğini ifade etmektedir. Bu tez çalışmasında tespit edilen değerler IU birimi üzerinden verilmiştir.

Ham enzim ekstraktında aktivite tayini, dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi olarak bilinmekte olan sakkarolitik yöntemle yapılmıştır. İvertaz enziminde aktivite tayininde amaç, sükroz kullanılarak enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan indirgen şeker varlığının dinitro salisik asit (DNS) yöntemi ile belirlenmesidir (Kat, 2013). Aktivite tayininde inkübasyon, su banyosunda yapılmış ve spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

1 g DNS, 20 mL 2 N NaOH çözeltisi içerisine eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözdürülmüştür. 30 g sodyum potasyum tartarat tetrahidrat, 50 mL saf su ile bir cam behere eklenerek, manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. İki çözelti birleştirilip homojen bir karışım olana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen DNS çözeltisi, amber renkli şişede buzdolabında muhafaza edilmiştir.

İvertazın aktivite ölçümünde; enzim ekstraktı, tüplere eklenmeden önce hazırlanmış olan asetat tamponu ile 1/2000 ve 1/4000 oranında seyreltilmiştir.

Sakkaroz çözeltisi hazırlığı için; 1,7125 g sakkaroz tartılmış, 10 mL'lik balon jøjeye aktarılmış, az miktar tampon çözelti yardımı ile vortex kullanılarak çözdürülmüş ve son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. Böylece 0,5 M sakkaroz çözeltisi hazırlanmıştır.

Seyreltme işleminin ardından, her bir tüpte aşağıda belirtilen miktarlarda çözelti olacak şekilde uygun ekleme yapıldıktan sonra 30 saniye vortexlenmiştir.

Kör tüpüne; 800 µL 0,2 M tampon çözelti (pH 5,0),

200 µL sakkaroz (tampon çözelti ile çözdürülmüş) çözeltisi eklenir.

Örnek tüpüne; 600 µL 0,2 M tampon çözelti (pH 5,0),

200 µL sakkroz (tampon çözelti ile çözdürülmüş) çözeltisi,

200 µL seyreltilmiş enzim örneği eklenir.

Reaksiyon karışımı 37 °C'de 30 dakika boyunca lineer olarak manuel karıştırılarak, su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon ortamına 1000 µL DNS

çözeltisi eklenerek kaynar su dolu kaptaki 10 dakika inkübe edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında soğutulmuştur. Tüplerden 200 µL alınıp 2 mL ependorf tüplere aktarılıp, üzerlerine 1000 µL saf su eklenip vortex ile yaklaşık 30 saniye karıştırılmıştır. İndirgen şeker varlığı spektrofotometrede 546 nm dalga boyunda absorban ölçümü ile belirlenmiştir.

Enzim aktivite hesaplanmasında 2-12 µmol aralığında hazırlanan glukoz kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. 0,2378 g glukoz monohidrat tartılıp, tampon çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak 12 µmol/mL konsantrasyona sahip stok çözelti hazırlanmıştır.

3.2.5. Spesifik aktivite tayini

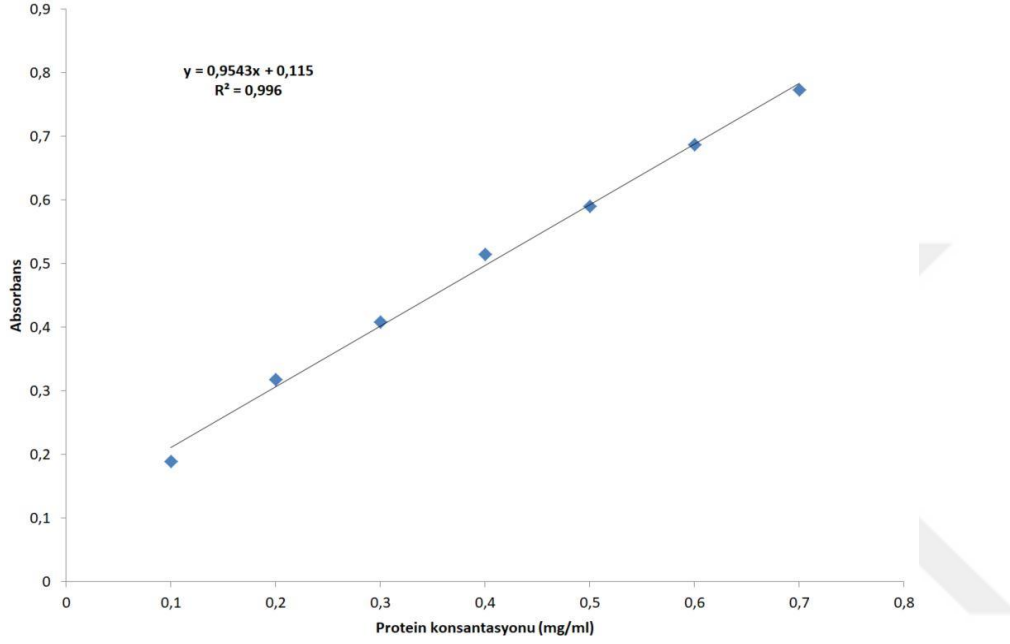
Enzimler için spesifik aktivite ortamda bulunan mg protein başına tespit edilen enzim aktivitesi (IU/mg protein) şeklinde tanımlanmaktadır. Bu çalışmada elde edilen enzim aktivitesi ve protein miktarı verileri kullanılarak RSM analizinde cevap olarak kullanılan spesifik aktivite değerleri hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmaya ait kalibrasyon grafikleri

4.1.1. Protein tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eşitlik

Çalışma sonucunda elde edilen kalibrasyon grafiği “Şekil 4.1”de verilmiştir.



Şekil 4.1. Protein tayinine ait kalibrasyon grafiği

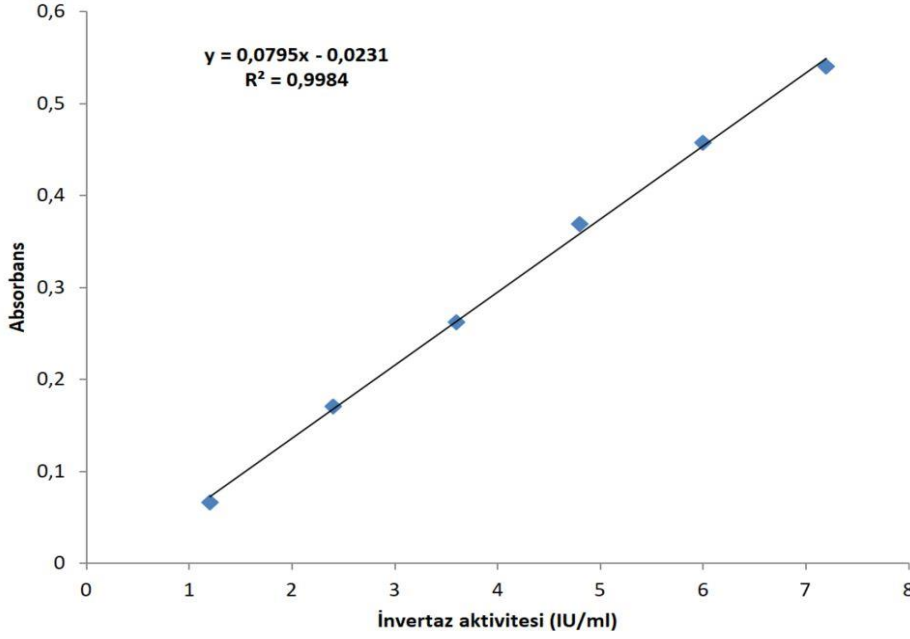
Grafik üzerinde de belirtildiği üzere kalibrasyon eğrisi için elde edilen R² değeri 0,996 olmuştur. İleriki bölümlerde yapılan protein değeri hesaplamalarında Eşitlik 4.1 kullanılmıştır.

$$C_p = \frac{A_{595} - 0,115}{0,9543} \quad (4.1)$$

C_p ham enzim ekstraktındaki protein konsantrasyonunu (mg/mL), A₅₉₅ ölçümlerin yapıldığı 595 nm dalga boyundaki absorbans değerini ifade etmektedir.

4.1.2. Enzim aktivitesi tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eşitlik

Çalışma sonucunda elde edilen kalibrasyon grafiği “Şekil 4.2”de verilmiştir.



Şekil 4.2. Enzim aktivitesi tayinine ait kalibrasyon grafiği

Grafik üzerinde de belirtildiği üzere kalibrasyon eğrisi için elde edilen R^2 değeri 0,998 olmuştur. İleriki bölümlerde yapılan protein değeri hesaplamalarında Eşitlik 4.2 kullanılmıştır.

$$EA = \frac{A_{546} + 0,0231}{0,0795} \quad (4.2)$$

EA ham enzim ekstraktındaki enzim aktivitesini (IU/mL), A_{546} ölçümlerin yapıldığı 546 nm dalga boyundaki absorbans değerini ifade etmektedir.

4.2. Protein analizi sonuçları

Araştırma kapsamında seçilen bağımsız değişkenler olan ultrasonikasyon süresi, ultrasonikasyona ait amplitüd değeri ve kullanılan maya miktarının ham enzim ekstraktı içerisinde bulunan protein miktarına etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar ml ekstrakt içerisinde mg protein olarak ölçülmüştür. Seçilen 20 farklı deney noktasında protein değerleri 0,44-23,92 mg/ml aralığında bulunmuştur. Deneme deseninde en yüksek protein miktarı olan 23,92 mg/ml değerine 45 dakika ve %70 amplitüd değerinde %36,82 maya içeren çözelti ile ulaşılmıştır. Maya hücresine ait hücre duvarının sağlamlığını sağlayan en önemli yapılar glukanlar, mannoproteinler ve kitinlerdir. Ultrasonikasyon işleminin özellikle glukanlar üzerindeki yıkıcı etkisi sitoplazmada bulunan proteinlerin hücre dışına salınmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar bu etkinin sonikasyon gücü ve süresi ile doğru orantılı olarak arttığı ancak ortam sıcaklığının artması, köpük oluşumu gibi fiziksel kısıtlar gibi

sorunlar sebebiyle bu parametrelerin limitsiz olarak arttırılamayacağını göstermiştir. Örnek bir çalışmada *S.cerevisiae* ile hazırlanan %1'lik çözeltinin 120, 360 ve 600 W gücünde ultrasonikasyona tabi tutulması neticesinde süre arttıkça açığa çıkan protein miktarının arttığı 5 dakika ile 25 dakika arasında yapılan ultrasonikasyonda %100'e yakın bir protein artışı gözlemlendiği belirtilmiştir (Liu, Zeng, Sun ve Han, 2013). Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneyler neticesinde elde edilen veriler kullanılarak ortama salınan protein miktarını süre, güç ve maya miktarı parametrelerine bağlı olarak tahmin edebilecek bir denklem ortaya konmuştur. Bu denklemin oluşturulmasında bağımsız değişkenlerin cevap üzerindeki doğrusal, doğrusal+kareler, doğrusal+ilişkiler ve tam ikinci derece etkileri araştırılmış ve "Çizelge 4.1 " de bu etkiler özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Protein tayininde süre (S), güç (G) ve miktar (M) için denenen modellerin önem faktörleri ve R² değerleri

Kurulan model				
	Doğrusal	Doğrusal+Kareler	Doğrusal+İlişkiler	Tam ikinci derece
Sabit	*	*	*	*
Süre (S)	-	*	-	*
Güç (G)	-	*	-	*
Miktar (M)	*	*	*	*
S*S		-	-	-
G*G		-	-	-
M*M		*	-	*
S*G				-
S*M				-
G*M				-
R ²	0,84	0,96	0,82	0,96

*: önemli ($P < 0,05$), -: önemli değil ($P > 0,05$)

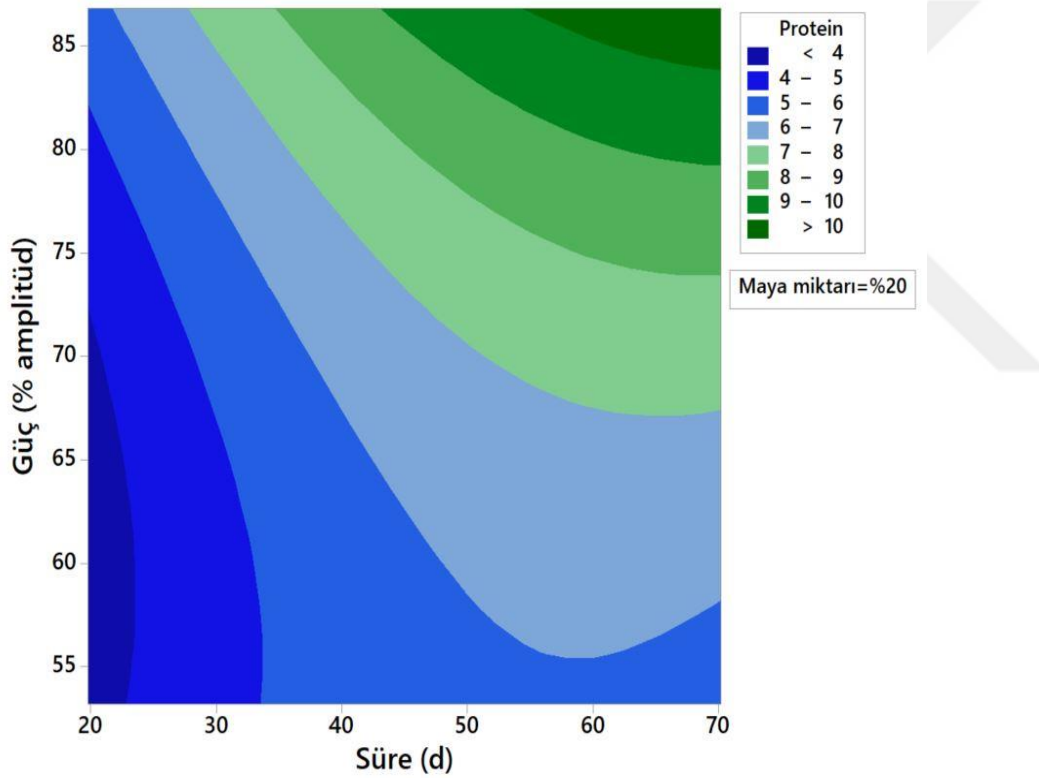
Sonuçlar incelendiğinde ultrasonikasyon sonrası maya hücresinden ortama salınan protein miktarını tahmin etmek için kullanılacak Eşitlik 4.3 aşağıda verilmiştir.

$$P = 0,5 + 0,213S - 0,297G - 0,076M - 0,0016S^2 + 0,0029G^2 + 0,02M^2$$

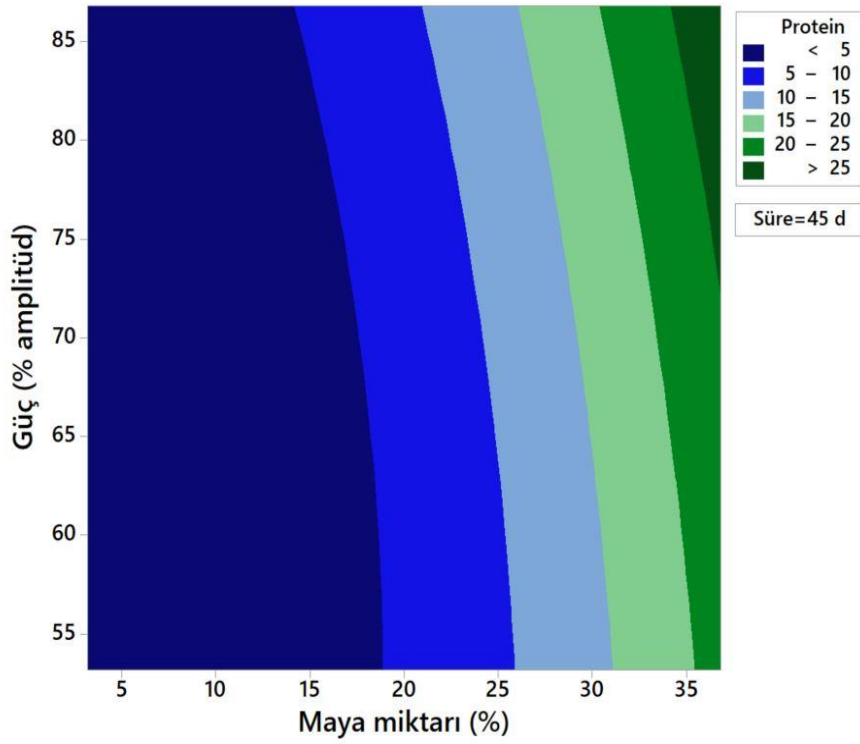
(4.3)

Modelin uyum eksikliği (lack of fit) değeri istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Bu bulgu modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir. Modelin sahip olduğu R^2 değeri 0,96'dır ve eşitlik kullanılarak protein miktarının tahmininin başarılı bir şekilde yapılabileceği anlaşılmaktadır.

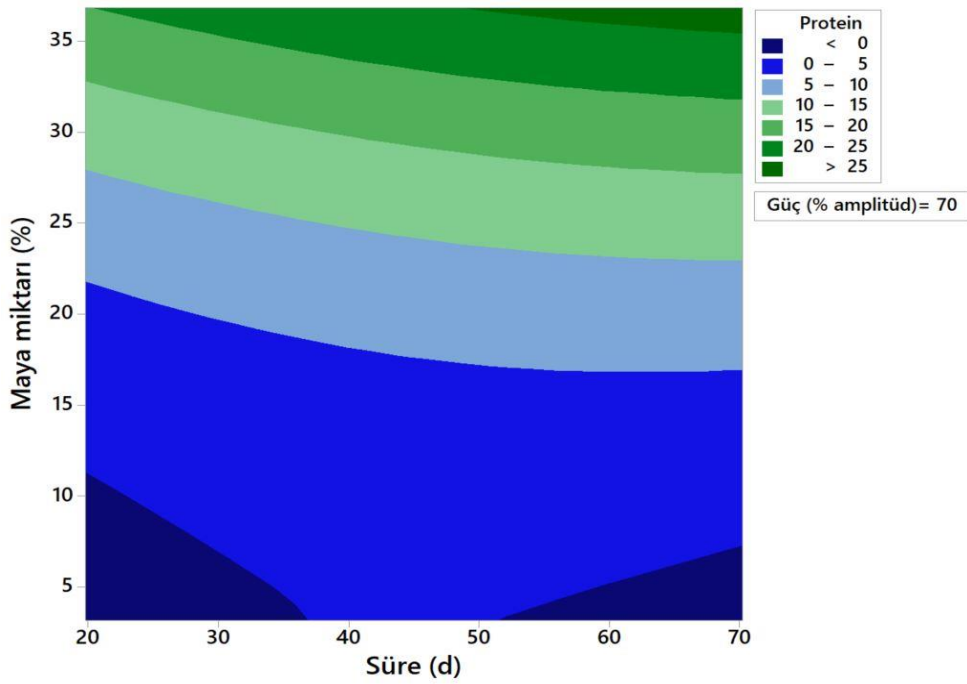
Eşitlik incelendiğinde, bu tez çalışmasındaki parametre aralıkları için, ultrasonikasyon süresinin doğrusal etkisinin pozitif iken, güç ve maya miktarı parametrelerinin doğrusal açıdan negatif bir etkiye sahip olduğu ancak miktar parametresinin kareler seviyesinde pozitif yönde protein miktarını etkilediği anlaşılmaktadır. Bu etkileri görsel olarak sunabilmek için “Şekil 4.3”, “Şekil 4.4 ” ve “Şekil 4.5 ” deki kontur plot grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.3. Protein miktarının (mg/ml) ultrasonikasyon gücü ve süresine göre değişimi



Şekil 4.4. Protein miktarının (mg/ml) ultrasonikasyon gücü ve maya miktarına göre değişimi



Şekil 4.5. Protein miktarının (mg/ml) ultrasonikasyon süresi ve maya miktarına göre değişimi

Elde edilen grafikler model denklemi ile uyumlu gözükmemektedir. Ultrasonikasyon süresinin özellikle sabit güç değerinde çalışıldığı durumda “Şekil 4.3 ” hızlı bir şekilde ortamdaki protein miktarını arttırdığı, bu etkinin yüksek güç değerlerinde daha kısa sürede görüldüğü anlaşılmaktadır. Benzer şekilde maya miktarı da sabit güç değerlerinde “Şekil 4.4.” maya hücresinden ortama salınan protein miktarını, beklenildiği gibi, arttırmaktadır. Apar ve Özbek (2008) tarafından yapılan bir çalışmada ultrasonikasyon süresinin artışına bağlı olarak mikroorganizma hücresinden ortama salınan protein miktarının arttığı bulunmuştur. Yüksek ultrasonikasyon gücünün bu proseslerde uygulanabilir olmadığını, enerjideki artışın protein salınımındaki artışlar oransal olarak tatmin edici sonuçlar vermediğini bildiren aynı araştırmacılar ortamdaki mikroorganizma hücresi konsantrasyonunun salınan protein miktarı ile neredeyse bağlantısız olduğunu vurgulamışlardır. Ancak bu çalışmada kullanılan konsantrasyon aralığının %3-15 aralığında oluşunun mevcut tez çalışması verileri ile ortaya çıkan farklılığın sebebi olabileceği düşünülmektedir. Özellikle Şekil “Şekil 4.4 ” görüldüğü gibi sabit güç değerinde %20 maya konsantrasyonundan sonra gerçekleşen artış doğrudan salınan protein miktarını etkilemeye başlamaktadır. Benzer durum “Şekil 4.5 ” de de görülmekte olup, sürenin sabit olması durumunda da özellikle yaklaşık %20 maya konsantrasyonu sonrası salınan protein miktarındaki değişim dikkat çekicidir.

4.3. Protein Analizi Optimizasyonu

Çalışmadaki amaç en yüksek protein miktarına ulaşmak olup kullanılan parametre aralıklarında belirlenen model denklemin tahmin başarısını ölçmek sonuçların daha anlamlı hale gelmesine yardımcı olacaktır. Bu amaçla kullanılan istatistik paket programının “response surface optimizer” seçeneği ile model denkleminin tahmin yapabileceği en yüksek protein miktarının elde edileceği parametreler belirlenmiştir. Bu parametreler sırasıyla;

Süre: 29,4 dakika

Ultrasonikasyon gücü: % 86,81

Maya miktarı: 36,81

olarak deney tasarlandığında model denklemin verdiği cevap olarak 25,87 mg/ml protein miktarı olmaktadır. Bu durumun test edilerek model denklemin optimum noktadaki başarısını ortaya koymak amacıyla tez çalışmasının son kısmında söz konusu deney noktasında protein miktarı tayini yapılmıştır. Deneysel sonuç olarak tespit edilen protein miktarı değeri 12,805

olmuş ve optimum nokta için model denklemin başarısı % 49,5 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak model denklemin parametre aralıkları için ortaya koyduğu yüksek başarının ($R^2 = 0,96$) en yüksek protein miktarını verecek parametre noktalarını belirlemede düşük kaldığı gözlenmiştir.

4.4. Enzim aktivitesi analizi sonuçları

Araştırma kapsamında seçilen bağımsız değişkenler olan ultrasonikasyon süresi, ultrasonikasyona ait amplitüd değeri ve kullanılan maya miktarının ham enzim ekstraktının invertaz enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar ml ekstrakt içerisinde IU enzim aktivitesi olarak ölçülmüştür. Seçilen 20 farklı deney noktasında invertaz aktivite değerleri 228-1720 IU/ml aralığında bulunmuştur. Deneme deseninde en yüksek enzim aktivitesi değeri olan 1720 IU/ml değerine 45 dakika ve %70 amplitüd değerinde %36,82 maya içeren çözelti ile ulaşılmıştır. Ultrasonikasyon teknolojisi kullanılarak hayvansal veya bitkisel dokular ile mikroorganizma hücrelerinden enzim ekstraksiyonu çok uzun zamandır literatürde çalışılan bir konudur. Bir hücre veya dokuyu içerisindeki hedef maddeye zarar vermeden parçalamaya yardım eden ultrasonik kavitasyon, sıvı ortamda oluşan baloncukların bir araya gelirken meydana getirdiği ani şok dalgalarının hedeflenen maddeyi saran materyale (örneğin hücre duvarı) zarar vermesi şeklinde etki göstermektedir. Bu konuda yapılan en eski çalışmalardan birisi hayvansal dokulardan kimozen enziminin ekstraksiyonunda ultrasonikasyonun başarısını göstermiştir (Kim ve Zayas, 1989).

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneyler neticesinde elde edilen veriler kullanılarak sıvı ortamdaki invertaz aktivitesini süre, güç ve maya miktarı parametrelerine bağlı olarak tahmin edebilecek bir denklem ortaya konmuştur. Bu denklemin oluşturulmasında bağımsız değişkenlerin cevap üzerindeki doğrusal, doğrusal+kareler, doğrusal+ilişkiler ve tam ikinci derece etkileri araştırılmış ve “Çizelge 4.2” de bu etkiler özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. Enzim aktivite tayininde süre (S), güç (G) ve miktar (M) için denenen modellerin önem faktörleri ve R² değerleri

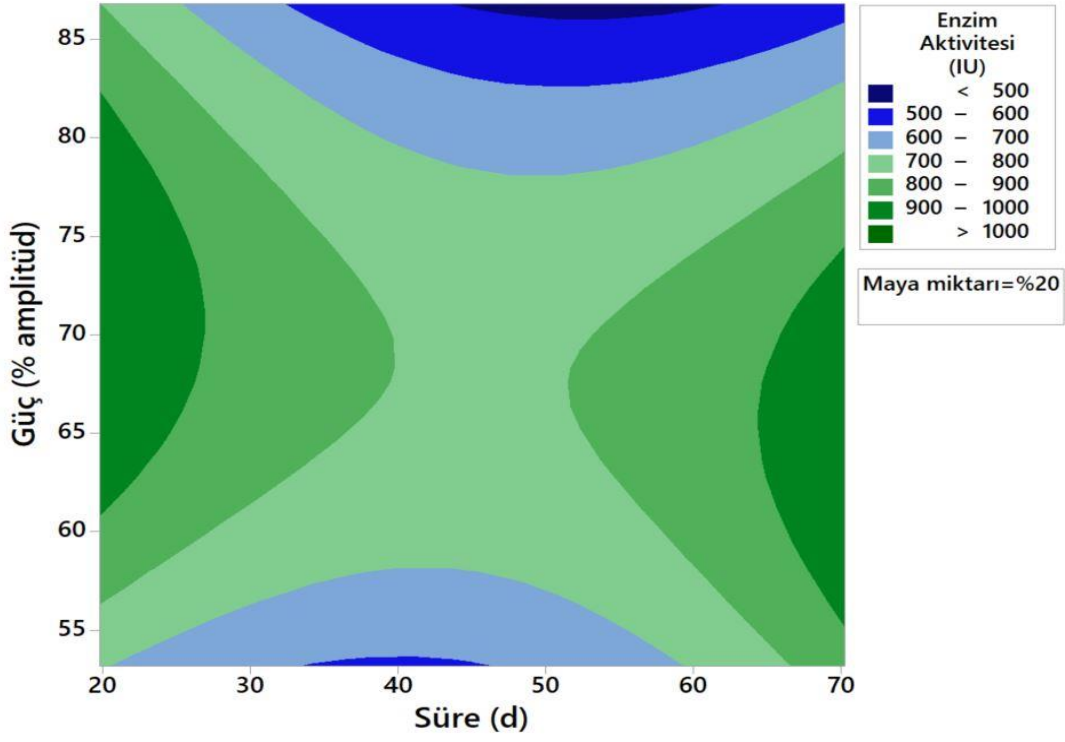
Kurulan model				
	Doğrusal	Doğrusal+Kareler	Doğrusal+İlişkiler	Tam ikinci derece
Sabit	*	*	*	*
Süre (S)	-	-	-	-
Güç (G)	-	-	-	*
Miktar (M)	*	*	*	*
S*S		*	-	*
G*G		*	-	*
M*M		*	-	*
S*G				-
S*M				-
G*M				*
R ²	0,81	0,93	0,84	0,96

*: önemli (P<0,05), -: önemli değil (P>0,05)

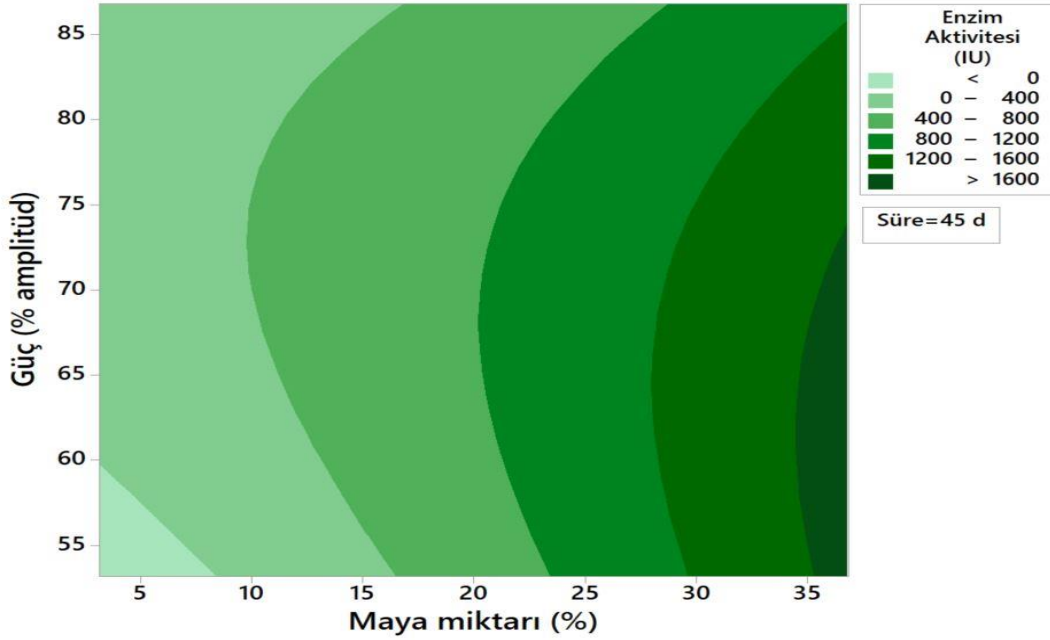
Sonuçlar incelendiğinde ultrasonikasyon sonrası elde edilen invertaz aktivitesi değerini tahmin etmek için kullanılacak Eşitlik 4.4. aşağıda verilmiştir.

$$EA = -5248 - 8,14S + 143,9G + 86,7M + 0,3S^2 - 0,86G^2 + 0,53M^2 - 0,23SG - 0,178SM - 0,8GM \quad (4.4)$$

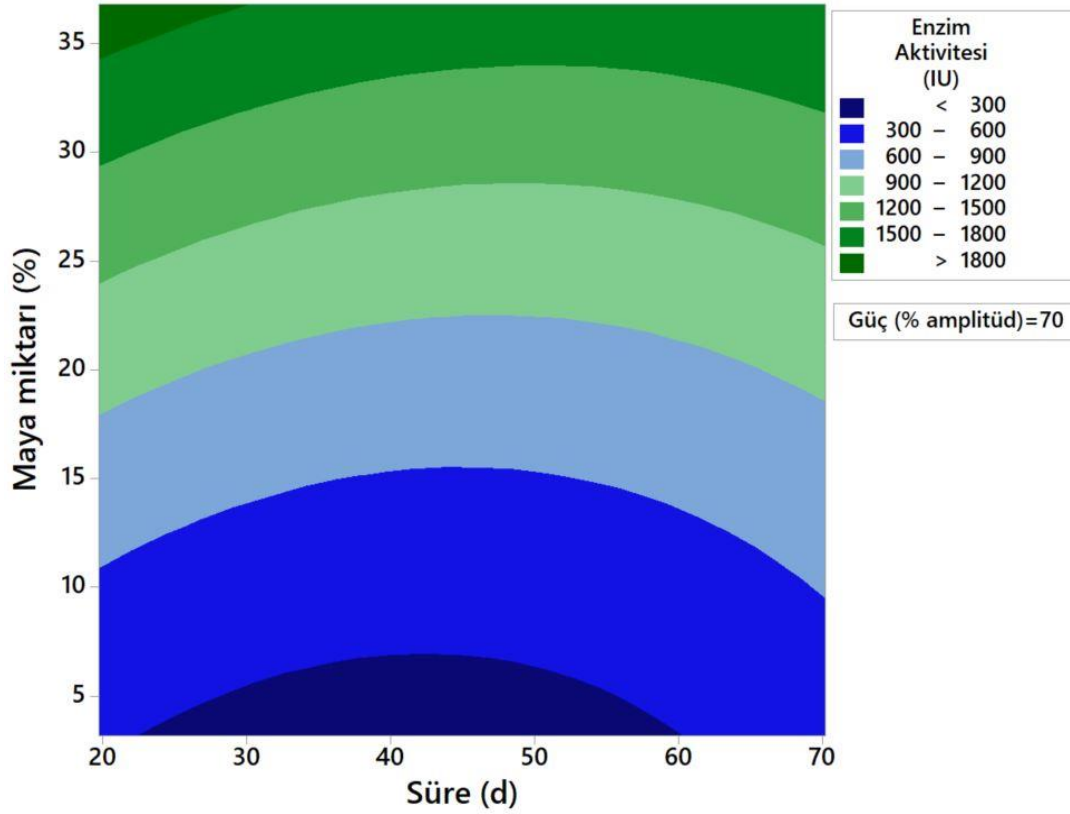
Modelin uyum eksikliği (lack of fit) değeri istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (P>0,05). Bu bulgu modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir. Modelin sahip olduğu R² değeri 0,96'dır ve eşitlik kullanılarak invertaz aktivitesi tahmininin başarılı bir şekilde yapılabileceği anlaşılmaktadır. Model eşitlik tam ikinci derece bir denklemdir ve eşitlik incelendiğinde, bu tez çalışmasındaki parametre aralıkları için, ultrasonikasyonda kullanılan gücün ve ortamdaki maya miktarının enzim aktivitesi üzerinde doğrusal etkilerinin pozitif olduğu anlaşılmaktadır. Diğer taraftan ultrasonikasyon süresinin ikinci dereceden etkisinin de pozitif olduğu ancak güç ve maya miktarı parametrelerinin interaktif etkilerinin negatif yönde olduğu anlaşılmaktadır. Bu etkileri görsel olarak sunabilmek için “Şekil 4.6”, “Şekil 4.7”, “Şekil 4.8” deki kontur plot grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.6. Enzim aktivitesinin (IU) ultrasonikasyon gücü ve süresine göre değişimi



Şekil 4.7. Enzim aktivitesinin (IU) ultrasonikasyon gücü ve maya miktarına göre değişimi



Şekil 4.8. Enzim aktivitesinin (IU) ultrasonikasyon süresi ve maya miktarına göre değişimi

İnvertaz enziminin başlıca üreticisi olan *S.cerevisiae* bu enzimi intraselüler ve ekstraselüler olarak üretebilme yeteneğindedir. Diğer bir deyişle çalışma konusu invertaz enzimi mayalar tarafından hücre dışına da salgılanabilmektedir (Vargas, Piao, Domingos ve Carmona, 2004). Ancak özellikle *S.cerevisiae* söz konusu olduğunda hücre içinde bulunan enzim miktarının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Ultrasonikasyon işlemi başlatıldığı anda ortamda (hücre dışında) bir miktar enzim bulunması, ultrasonikasyon işleminin gücü ve zamana bağlı olarak ekstraselüler invertazın kısmen aktivitesini yitirirken, hücre içerisinden dışarı alınmaya başlayan invertazın ortamdaki enzim aktivitesini arttırması “Şekil 4.6” gözlenmektedir. “Şekil 4.7 ” görüldüğü gibi maya miktarı sabitken gücün arttırılması kısmen enzim aktivitesini arttırmaktadır. Benzer şekilde maya miktarı ve ultrasonikasyon süresinin ortak etkisinin gösterildiği “Şekil 4.8 ” model eşitlikle tutarlı olarak maya miktarının arttırılmasının sabit süreler dikkate alındığında ortamdaki enzim aktivitesini arttırdığı gözlenmektedir. Bu noktada vurgulanması gereken husus, her ne kadar modelleme yapılan

parametre aralıklarında sürekli bir enzim aktivitesi artışına sebep oluyor gibi görünse de, ortamdaki maya miktarının sonsuza kadar arttırılamayacağıdır. Çalışma süresince maya miktarını arttırmada gözlenen en önemli limitleyici faktör köpük oluşumu sorunudur. Çözeltideki maya konsantrasyonunun %40'ı geçmesiyle ultrasonikasyon işlemi kontrollü şekilde yapılamamakta ve köpük oluşumunun önüne (herhangi bir kimyasal köpük kırıcı kullanılmadan) geçilememektedir. Sonuçların ve parametre aralıklarının bu açıdan da değerlendirilmesi yerinde olacaktır.

4.5. Enzim Aktivitesi Optimizasyonu

Çalışmadaki amaç en yüksek invertaz aktivitesine ulaşmak olup kullanılan parametre aralıklarında belirlenen model denklemin tahmin başarısını ölçmek sonuçların daha anlamlı hale gelmesini sağlayabilecektir. Bu amaçla kullanılan istatistik paket programının “response optimizer” seçeneği ile model denklemin tahmin yapabileceği en yüksek invertaz enzim aktivitesini sağlayan parametreler belirlenmiştir. Bu parametreler sırasıyla;

Süre: 19,8 dakika

Ultrasonikasyon gücü: % 64

Maya miktarı: % 36,8

olarak deney tasarlandığında model denklemin verdiği cevap olarak 2594 IU invertaz enzim aktivitesi olmaktadır. Bu durumun test edilerek model denklemin optimum noktadaki başarısını ortaya koymak amacıyla tez çalışmasının son kısmında söz konusu deney noktasında enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Deneysel sonuç olarak tespit edilen enzim aktivitesi değeri 1348 IU olmuş ve optimum nokta için model denklemin başarısı %52 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak model denklemin parametre aralıkları için ortaya koyduğu yüksek başarının ($R^2=0,96$) en yüksek enzim aktivitesini verecek parametre noktalarını belirlemede düşük kaldığı gözlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hidrolaz sınıfında yer alan invertaz enzimi; şeker şurubu, hayvan yemi, bebek maması gibi pek çok farklı sektörde invert şekerin sakkarozaya tercih edilmesi sonucu kullanılmaktadır. İvertaz enzimi eldesinde kaynak olarak hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır. Bu çalışmada invertaz enzimi eldesinde ekmek mayası fabrikası atığı olan eleküstü maya (*Saccharomyces cerevisia*) kullanılmıştır. İvertaz enzimi üretiminde ultrasonikasyon parametrelerinin etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada deneysel tasarım, cevap yüzey yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Eleküstü maya hücrelerinin parçalanmasını etkileyen ve daha fazla miktarda invertaz enzimi elde edilmesini etkilediği düşünülen süre, ultrasonikasyonun gücü (amplitüt) ve maya miktarı birleşik etkilerinin ortaya konmasında cevap yüzeyi yönteminin uygulanabilirliği test edilmiştir. Üç faktörlü merkezi bileşik tasarım modeli ile 20 farklı deneme deseni rastgele sıralama ile yapılmıştır. Protein tayininde deneme deseninde en yüksek değerler 23,92 mg/ml, 45 dakika, %70 amplitüt ve %36,82 gram mayada elde edilmiştir. Enzim aktivite tayini için deneme deseninde en yüksek değerler 1720 IU/ml, 45 dakika, %70 amplitüt ve %36,82 gram maya içeren çözelti ile elde edilmiştir. Çalışmadaki amaç en yüksek protein miktarı ve invertaz aktivitesini elde etmek olup kullanılan parametre aralıklarında belirlenen model denklemin tahmin başarısını ölçmek sonuçların daha anlamlı hale gelmesini sağlayabilecektir. Bu amaçla kullanılan istatistik paket programının “response optimizer” seçeneği ile model denklemin tahmin yapabileceği en yüksek invertaz enzim aktivitesini sağlayan parametreler belirlenmiştir. Elde edilen değerler tahmini başarının yarısına karşılık gelmektedir.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında invertaz eldesinde parametrelerin sınırsız bir şekilde arttırılamayacağı, değişkenlerden en az birisinin optimum noktada sabit tutulması gerektiği sonucuna varılabilir. Bunun haricinde deneylerde en büyük sınırlayıcı olan ısınma ve köpük sorununun daha teknik bir yöntem ile çözüme kavuşturulması için daha farklı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

- Adulkar, T. V. ve Rathod, V. K. (2014). Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21 (3), 1083-1089.
- Aehle, W. (2004). *Enzymes in industry: production and applications* (2. Baskı). Germany: Weinheim.
- Afshar, S. ve Banisadi, H. (2017). Investigation the effect of graphene oxide and gelatin/starch weight ratio on the properties of starch/ gelatin/ GO nanocomposite films: the rsm study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109 (*), 1019-1028.
- Akardere, E., Özer, B., Bıçak Çelem, E. ve Önal, S. (2010). Three-phase partitioning of invertase from bakers yeast. *Separation and Purification Technology*, 72 (3), 335-339.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnky, L., Lorimer, J. P. ve Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonic Sonochemistry*, 11 (3-4), 261-265.
- Alvarez, M. J., Ilzarbe, L., Viles, E. ve Tanco, M. (2016). The use of genetic algorithms in response surface methodology. *Quality Technology and Quantitative Management*, 6 (3), 295-307.
- Apar, D. K. ve Özbek, B. (2008). Protein releasing kinetics of bakers yeast cells by ultrasound. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22 (1), 113-118.
- Atacan, K. ve Koçak Yanık, D. (2017). Yaban mersini (*Vaccinium corymbosum* L.) suyu konsantrinin püskürtmeli kurutucuda kurutulması: tepki yüzey yöntemiyle optimiasyon. *Akademik Gıda*, 15 (2), 139-148.
- Atasağungil, M. (1965). *Enzimler* (8.Baskı). Ankara
- Balasundaram, B. ve Harrison, S. T. L. (2005). Disruption of brewers yeast by hydrodynamic cavitation: process variables and their influence on selective release. *Wiley InterScience*, 94 (2), 303-311.
- Beilen, J. ve Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4), 338-344.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. ve Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (rsm) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5), 965-977.

- Bhatti, H. N., Asgher, M., Abbas, A., Nawaz, R. ve Sheikh, M. A. (2006). Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13), 4617-4623.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Budari, N. M., Ali, M. F., Hamid, K. H. K. ve Musa, M. (2015). Ultrasonic irradiation on microorganism disruption in water disinfection process- a mini overview. *Applied Mechanics and Materials*, 754-755 (), 676-681.
- Buxbaum, E. (2007). Fundamentals of protein structure and function. *Enzyme are biocatalayst* (2. Baskı) içinde (97-101). Kevelaer: Springer Press.
- Çalışkan, S. (2011). *Geobacillus sp. tarafından termostabil α -amilaz üretimi* (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Das, B., Roy, A. P., Bhattacharjee, S., Chakraborty, S. ve Bhattacharjee, C. (2015). Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: optimization using response surface methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 121 (?), 244-252.
- De Leon-Gonzalez, G., Gonzalez-Valdez, J., Mayolo-Deloya, K. ve Rito-Palomares, M. (2015). Intensified fractionation of brewery yeast waste for the recovery of invertase using aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63 (6), 886-894.
- Demirdöven, A. ve Baysal, T. (2008). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25 (1), 1-11.
- Duman, Y. ve Kaya, E. (2014). Purification and recovery of invertase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (4), 443-448.
- Fahmi, R., Khodaiyan, F., Pourahmad, R. ve Emam Djomeh, Z. (2011). Effect of ultrasound assisted extraction upon the protein content and rheological properties of the resultant soymilk. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3 (4), 245-249.
- Furuta, M., Yamaguchi, M., Tsukamoto, T., Yim, B., Stavarache, C. E., Hasiba, K. ve Maeda, Y. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* bu ultrasonic irradiation. *Ultrasonic Sonochemistry*, 11 (2), 57-60.

- Guimaraes, L. H. S., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M. ve Jorge, J. A. (2007). Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 42 (1), 52-57.
- Hammamchi, H. (2014). *Rhodotorula mucilaginosa*'dan lipaz enzimi üretimi ve aktivitesine etki eden parametrelerin belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2005). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (2), 235-251.
- Jadhav, D., Rekha, B. N., Gogate, P. R. ve Rathod, V. K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93 (4), 421-426.
- Karkaş, T. (2009). *İnvertaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için sulu ikili-faz afinite sistemlerinin geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Karn, S. Kr., Karn, P. ve Pan, X. (2013). Extraction of lipase and protease and characterization of activated sludge from pulp and paper industry. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43 (2), 152-162.
- Kat, B. (2013). *İnvertaz enziminin üç faz sistemi ile saflaştırılması ve demir-tanin kompoziti üzerine immobilizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi), Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Kat, B. ve Keskin, S. Y. (2013). Üç faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 17 (2), 291-294.
- Kim, S. M. ve Zayas, J. F. (1989). Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound. *Journal of Food Science*, 54 (3), 700-703.
- Kirk, O., Borchert, T. V. ve Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4), 345-351.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (2-3), 126-139.

- Lateef, A., Oloke, J. K. ve Prapulla, S. G. (2007). The effect of the ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (5), 1067-1070.
- Liu, D., Zeng, X., Sun, D. ve Han, Z. (2013). Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18 (), 132-137.
- Margetic, A., Vujcic, Z. (2017). Comparative study of stability of soluble and cell wall invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47 (3), 305-311.
- Mohideen, F. W., Solval, K. M., Li, J., Zhang, L., Chouljenko, A., Chotiko, A., Prudente, A. D., Bankston, J. D. ve Sathivel, S. (2015). Effect of continuous ultra-sonication on microbial counts and physico-chemical properties of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. *LWT-Food Science and Technology*, 60 (1), 563-570.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Vining, G. G., Borror, C. M. ve Kowalski, S. M. (2004). Response surface methodology: a retrospective and literature survey. *Journal of Quality Technology*, 36 (1), 53-77.
- Osman, B., Kara, A., Uzun, L., Beşirli, N. ve Denizli, A. (2005). Vinily imidazole carrying metal-chaletad beads for reversible use in yeast invertase adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37 (1-6), 88-94.
- Özdingç, N. (2019). *Ekmek mayası (Saccharomyces cerevisiae) fabrikası artığı eleküstü mayadan invertaz enzimi üretimi* (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J. P. ve Mason, T. J. (2001). The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (3), 299-301.
- Panke, S. ve Wubbolts, M. G. (2002). Enzyme technology and bioprocess engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2), 111-116.
- Said, K. A. M. ve Amin, M. A. M. (2015). Overview on the response surface methodology (rsm) in extraction processes. *Journal of Applied Science and Process Engineering*, 2 (1), 8-17.
- Salehan, N. A. M., Sulaiman, A. Z. ve Ajit, A. (2016). Effect of temperature and sonication on the extraction of gallic acid from *labisia pumila* (Kacip fatima). *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, 11 (4), 2193-2198.

- Salisova, M., Toma, S. ve Mason, T. J. (1996). Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonic Sonochemistry*, 4 (2), 131-134.
- Sirisatesuwon, C., Ninchan, B., Sriroth, K. (2020). Effects of inhibitors on kinetic properties of invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Sugar Tech*, 22 (2), 274-283.
- Soria, C. A. ve Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (7), 0-331.
- Şahan, T. ve Yılmaz, Ş. (2017). Doğal pomza minerali ile Co (II) adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu için cevap yüzey yönteminin uygulanması. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 23 (7), 887-892.
- Şahin Ercan, S. ve Soysal, Ç. (2011). Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. *Ultrasonic Sonocahemistry*, 18 (2), 689-695.
- Şahin, İ. (2015). *İnvertaz enziminin ak duttan (Morus alba) üçlü faz sistemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi), Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Tang, E. S. K., Huang, M. Lim, L. Y. (2003). Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 265 (1-2), 103-114.
- Topal, Ş. (1985). Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojiye renninin yeri. *The Journal of Food*, 10 (1), 25-37
- Türken, T. ve Pala, T. (2016). Vişne suyunun antioksidan aktivite değerinin yanıt yüzey metodu ile modellenmesi ve genetik algoritma kullanılarak optimizasyonu. *El-Cezri Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3 (2), 238-247.
- Vargas, L. H. M., Piao, A. C. S., Domingos, R. N. ve Carmono, E. C. (2004). Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (2), 137-142.
- Velioğlu, H. M. ve Çelikyurt, G. (2016). Farklı tarım atığı ürünlerden fungal ve bakteriyel α -amilaz enzimi üretiminin optimizasyonu. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13 (1), 12-24.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry*, 8 (3), 303-313.

- Wang, D. ve Sakakibara, M. (1996). Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with Lactobacillus strains. *Ultrasonic Sonochemistry*, 4 (3), 255-261.
- Weijers, S. R. ve Van't Riet, K. (1992). Enzyme stability in downstream processing part 1: enzyme inactivation, stability and stabilization. *Biotechnology Advances*, 10 (2), 237-249.
- Wiseman, A. (1993). Designer enzyme and cell applications in industry and in environmental monitoring. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56 (1), 3-13.
- Yarar, Ü. (2008). *α -amilaz enziminin fotoimmobilizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi), Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yiğit, A., Aktaş, N. ve Şahan, T. (2013). Lactobacillus brevis mikroorganizmasının çoğalma kineğinin cevap yüzeyi yöntemi ile incelenmesi. *Yuzuncu Yıl University Journal of the Institute of Natural and Applied Sciences*, 18 (1-2), 25-32.
- Yücekan, İ., Önal, S., (2011). Partitioning of invertase from tomato in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 46 (1), 226-232.