

# 1. GİRİŞ

## 1.1 İmmobilizasyon Tekniği Hakkında Genel Bilgiler

İmmobilizasyon terimi, bir reaktör veya analitik sistem içinde biyolojik olarak aktif katalizörün tutuklanmasını ifade eden bir terimdir. Biyokatalizör ister tek bir enzim olsun isterse enzim karışımı veya bir canlı hücre olsun, taşıyıcı materyal üzerinde veya içinde tutuklanmıştır. İmmobilize kompleks katı desteğin fiziksel karakteristiklerini gösterirken serbest katalizörün temel biyokimyasal aktivitesine de sahiptir. İmmobilizasyon özel bir modül üzerinde çözünür olmayan bir kompleks oluşturarak akışkanın kolayca geçmesini sağlar. Bir başka deyişle, immobilizasyon, heterojen kataliz prensiplerinin biyolojik sistemlere uygulanmasıdır. Son otuz yıldan beri enzimlerin immobilizasyonu, daha yakın yıllardan beri de hücrelerin immobilizasyonu teorik ve pratik önem kazanmıştır. İmmobilizasyon teknolojisi kimya, biyokimya ve hücre biyolojisi disiplinleri ile biyokimyasal ve proses mühendisliklerini birleştirir (Aktaş, 2004).

İmmobilize enzim “enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi” olarak adlandırılır (Chibata, 1978). İmmobilizasyon terimi sadece enzimlere değil hücresel organeller, mikrobiyal hücreler, bitki ve hayvan hücreleri gibi tüm biyokatalizör tiplerine de uygundur (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Nelson ve Griffin (1916) bir rastlantı sonucu, aktif karbon üzerine adsorbe edilmiş maya invertazının sükrozun hidrolizini katalizleme yeteneğine sahip olduğunu buldular. Bu, immobilize enzim kavramının ilk gösterimiydi. Bu gelişmenin ardından, çeşitli desteklere kovalent olarak bağlanmış aktif proteinlerin immobilizasyonu hakkında birçok rapor yayınlanmıştır. Bu konudaki pratik uygulamaların artışından sonra, iyonik bağlama, fiziksel adsorpsiyon ve tutuklama gibi çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Tanaka and Kawamoto, 1999).

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması 1969 yılında Japonya’da Tanabe Seiyoku şirketi çalışanları ve Chibata tarafından yapıldı. Bu uygulamada

fungus amino açilaz, DEAE-Sephadex içine iyonik bağlanma ile immobilize edildi ve N-açil-D,L-amino asitlerin, L-amino asitlere ve N-açil-D-amino asitlere enantioselektif hidrolizinde kullanıldı (Chibata et al., 1972). İmmobilize mikrobiyal hücrelerin ilk endüstriyel uygulaması ise 1973 yılında yüksek derecede aspartaz aktivitesine sahip *Escherichia coli* hücrelerini poliakrilamid jel içine tutuklayarak amonyum fumarattan L-aspartat üretimi ile gerçekleştirildi (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Sadece enzimleri değil hücresel organelleri, mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal hücreleri de içeren biyokatalizörler kullanılarak dizayn edilen, enerji ve kaynak tasarrufu sağlayan ve düşük kirlilik üreten işlemler, çok az yan ürün çıkışı, düşük sıcaklık ve çevresel basınç koşulları ile avantaj sağlamaktadır. Buna karşılık, biyokatalizörler genel olarak katalitik reaksiyonlar için koşullar uygun olsa bile yüksek sıcaklık, düşük veya yüksek pH ve organik çözümlerin varlığında kolaylıkla inaktive olabilirler. Biyokatalizör serbest halde kullanılıyor ise atık reaksiyon karışımından biyokatalizörün geri kazanımı da bir başka problemdir. İmmobilizasyon bu problemlerin üstesinden gelebilecek tek yoldur. Genel olarak immobilize biyokatalizörler kararlıdır ve kesikli tip reaksiyonlarda tekrarlı olarak ya da akışkan sistemlerde sürekli olarak kullanılabilir (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Biyoişlemede (biyoproses) kullanılacak olan biyokatalizör göz önüne alındığında, enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu pratiktir. İmmobilize biyokatalizörlerin biyoişlemlerde kullanımları şu şekildedir:

- i) Stereospesifik ve/veya bölge spesifik (regio spesifik) reaksiyonlar ile yararlı bileşiklerin üretimi,
- ii) Biyolojik işlemler ile enerji üretimi,
- iii) Çevresel problemlerin çözümünde kirliliklerin seçimli arıtılması,
- iv) Çeşitli bileşiklerin yüksek duyarlılıkta ve spesifiklikte analizi,
- v) Yeni ilaçların veya yapay organların üretimi (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Tüm bu işlemler sadece tek bir enzimin değil daha kompleks reaksiyonların meydana geldiği multi enzim komplekslerinin de immobilizasyonunu gerektirir. Hücre ve hücresel organeller karmaşık reaksiyonların meydana geldiği metabolik

sistemlere sahiptir. Bu sebeple immobilize hücre veya organeller birleşmiş multi enzim kompleksleri olarak iş görür. Üstelik hücrelerin immobilizasyonu durumunda, hücrelerden enzim ekstraksiyonu basamağı elimine edilmiş olur. Bu durum, enzimin zamanla gelişebilecek inaktivasyonunu ve pahalı saflaştırma basamaklarını engeller ve enzimin daha kararlı koşullarda kullanımını olanaklı kılar (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Bunun yanında, immobilize hücrelerin pratik uygulamalarda göz önünde bulundurulması gereken bazı dezavantajları vardır:

*i)* Hücre, istenmeyen reaksiyonları katalizleyen enzimleri de içerebileceği için istenmeyen yan ürünler sentezlenebilir. Tür seçimi, mutasyon, hücre tipine göre özel muamele veya hücrelerin genetik olarak değiştirilmesi ile bu problemlerin üstesinden gelinebilir.

*ii)* Sağlam hücrelerin hücre duvarları ve membranları genellikle substrat, ürün ve diğer reaksiyon bileşenlerinin hücre içine veya dışına geçişini engeller. Bu gibi durumlarda bariyer, immobilizasyondan önce ve sonra uygun muameleler ile yıkılmalıdır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

İmmobilize hücreler uygun besin maddelerinin devamlı sağlanması ile büyüme evresinde tutulabilir. İmmobilize büyüyen hücre tekniği, hücreler kendiliğinden çoğaldıklarından ve kendiliğinden yenilendiklerinden dolayı avantajlıdır. Bununla birlikte, immobilize büyüyen hücreler aşağıdaki dezavantajlara sahiptir:

*i)* İmmobilize büyüyen hücreler, yaşam ve büyüme durumlarını devam ettirmek için besin maddesi ve enerji kaynağına ihtiyaç duyar. Besin maddesi veya enerji kaynağı arttığında artan substrat tüketiminden dolayı ürün verimi azalabilir.

*ii)* Ürün, taşıyıcıdan kopan hücreler ile kontamine olabilir.

İmmobilize biyokatalizörlerin uygulaması için, biyokatalizörün istenilen aktiviteye ve karakteristiğe sahip olduğunu bilmek çok önemlidir. Ek olarak, uygun taşıyıcının ve immobilizasyon tekniğinin seçimi de önemlidir. Taşıyıcı ve immobilizasyon tekniği immobilize edilecek biyokatalizöre uygun olmalıdır. Bu nedenle, tüm biyokatalizör tiplerine uygun genel ideal bir immobilizasyon metodu yoktur.

İdeal bir taşıyıcı biyokatalizör immobilizasyonu için yeterli fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Taşıyıcı ayrıca, mekanik güce, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olmalıdır. Ek olarak, çeşitli tipteki reaktörlere immobilize biyokatalizörlerin uygulanabilmesi için taşıyıcıya farklı şekiller verilebilmesi gerekebilir. Son olarak, ekonomik uygunluğu göz önünde tutulmalıdır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

İmmobilizasyon metotları 4 kategoriye ayrılabilir: Taşıyıcıya bağlama, çapraz bağlama, tutuklama ve bu üç metodun kombinasyonu. Her bir metodun avantajlı ve dezavantajlı yanlarının olmasından dolayı, aşağıda açıklandığı gibi seçim, biyokatalizör, reaksiyon, reaktör gibi faktörlere bağlıdır.

### 1.1.1 İmmobilizasyon teknikleri

#### a) Taşıyıcıya bağlama metodu

Taşıyıcıya bağlama, biyokatalizörün suda çözünmeyen taşıyıcıya kovalent bağlar, iyonik bağlar, fiziksel adsorpsiyon veya biyospesifik etkileşimler ile bağlanmasına dayanan bir metottur. Suda çözünmeyen polisakkaritler (örn. selüloz, dekstran ve agaroz türevleri), proteinler (örn. jelatin ve albumin), sentetik polimerler (örn. polistiren türevleri, iyon değişim reçineleri ve poliüretan) ve inorganik materyaller (örn. tuğla, kum, cam, seramik ve magnetit) gibi çeşitli çözünmeyen materyaller doğrudan veya özel modifikasyon veya aktivasyon sonrası kullanılabilir (Tanaka and Kawamoto, 1999).

#### i) Kovalent bağlama metodu

Kovalent bağlama metodu enzim immobilizasyonu için en sık kullanılan tekniklerdendir, fakat kovalent bağlayıcı ajanların toksisitesi ve doğru immobilizasyon koşullarının bulunmasının zorluğundan dolayı hücreler için kullanımı azdır. Navarro ve Durand (1977), *Saccharomyces carlsbergensis*'i aminopropiltrietoksisilan uygulanmış ve glutaraldehit ile aktive edilmiş gözenekli silika kürelere immobilize etmişlerdir. *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces amurcea* borosilikat camlara veya izosiyanat bağlama ajanı kullanılarak, zirkonyum dioksit ( $ZrO_2$ ) seramik üzerine kovalent olarak

bağlanmışır (Messing et al., 1979). Organik taşıyıcılar kovalent bağlama metodu ile hücre immobilizasyonunda ayrıca kullanılmaktadır.

Enzimlere bakıldığında ise, aktif bölge veya substrat bağlama bölgesinde bulunmayan amino asit birimleri taşıyıcıya kovalent bağlamada kullanılabilir. Lizinin  $\epsilon$ -amino grubu, aspartik asidin  $\beta$ -karboksil grubu, glutamik asidin  $\gamma$ -karboksil grubu, serin ve treoninin hidroksil grupları, sisteinin merkpto grubu, tirozinin fenolik hidroksil grubu ve histidinin imidazol grubu; diamonyum tuzu, asit azit, izosiyanat, aktifleştirilmiş alkil halojenür veya aldehit gibi reaktif fonksiyonel gruplara sahip taşıyıcılar ile reaksiyona girebilirler (Tanaka and Kawamoto, 1999).

İmmobilizasyonda kullanılacak olan taşıyıcı, reaktif gruplara sahip değilse, yardımcı bir reaktif ile aktive edilmesi gerekmektedir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı, suda çözünmemeli, fakat çok da hidrofobik karakterli olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağlanmasının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ile birlikte taşıyıcının enzimler tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesini engellemesi, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi; özelliklere sahip olmasına dikkat edilmelidir (Telefoncu, 1997).

Kovalent bağlama metodu aşağıdaki avantajlara sahiptir

- i) Biyokatalizör taşıyıcıdan sızmaz veya ayrılmaz,
- ii) Biyokatalizör taşıyıcı yüzeyinde tutunduğu için substrat ile kolaylıkla temasa geçebilir,
- iii) Biyokatalizör ve taşıyıcı arasındaki güçlü etkileşimden dolayı biyokatalizör kararlılığı genellikle artar.

Bu avantajlara ilaveten kimi dezavantajları da vardır

- i) Biyokatalizörün toksik ajanlara veya sert reaksiyon koşullarına maruz kalmasından dolayı ürün verimindeki düşüş,
- ii) İmmobilizasyon için optimum koşulların bulunmasındaki zorluk,
- iii) Taşıyıcının yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanılmasının imkansız olması.

Belirlenen bu özelliklerden dolayı, metot taşıyıcıya kovalent olarak bağlanarak kararlılığını anlamlı bir şekilde arttıran pahalı enzimler için çok uygundur.

### **ii) İyonik bağlama metodu**

Katalazın iyon değiştirici selüloza bağlanma yeteneğinin bulunmasından itibaren (Mitz, 1956), iyonik bağlama metodu birçok biyokatalizörün immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Prosedür çok basit olup, taşıyıcının yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanımı çok kolaydır ve immobilizasyon koşulları, yumuşaktır. İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması L-amino asit üretimi için DEAE-selüloz üzerine aminoaçilazın immobilizasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Chibata et al., 1972). İyonik bağlamada, biyokatalizörün taşıyıcıya bağlanması kullanılan tampon, pH, iyonik şiddet ve sıcaklıktan etkilenir. Taşıyıcının yenilenmesinin ve biyokatalizörün geri kazanımının kolay olmasının yanında biyokatalizör, taşıyıcıdan kolaylıkla ayrılabilir. Geniş çeşitlilikteki iyon değişim reçinelerine ilaveten iyon değişim grubuna sahip polisakkaritler de bu amaç için kullanılabilir.

### **iii) Fiziksel adsorpsiyon metodu**

Fiziksel adsorpsiyon metodu enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir (Nelson and Griffen, 1916). Proteinler ve özellikle enzimlerin katı yüzeylere adsorpsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp enzim saflaştırmaktır. Fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonda oldukça sık kullanıldığı görülmektedir (Nelson and Griffin, 1916; Flor and Hayashida, 1983).

Fiziksel adsorpsiyon metodu taşıyıcı ve biyokatalizör arasındaki hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri gibi ilişkilerin tek tek veya birlikte neden oldukları fiziksel etkileşimlere dayanır. Biyokatalizör hiçbir modifikasyon gerekmeksizin immobilize olmasına rağmen, fiziksel etkileşimler iyonik bağlardan daha zayıftır ve sıcaklık ve çözünen madde derişimi gibi çevresel faktörlere karşı daha duyarlıdır. Hüresel organeller ve değişik tipteki hücreler bu metot ile kolaylıkla immobilize edilebilir.

Taşıyıcılar çok değişik türde olmakla birlikte, iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için, genellikle taşıyıcının bir ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, kalsiyum karbonat, kül, kollodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır (Telefoncu, 1997).

Taşıyıcının yenilenmesi uygun koşullar altında başarılabilir. Fiziksel adsorpsiyonu takip eden glutraldehit ile çapraz bağlama bazen immobilize katalizörün kararlılığına yardım edebilir.

Adsorpsiyon yönteminin kimi avantajları vardır; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına izin vermesidir. İşlem çok kolay olup yumuşak koşullarda gerçekleştiği için enzim aktiviteleri üzerine olumsuz etkileri olmamaktadır. Yöntemin sakıncaları ise; optimum immobilizasyon koşulların saptanmasının çok güç olması, enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın güçlü olmadığı durumlarda enzimin reaksiyon ortamına kaçarak ürünü kirlenmesi olarak sıralanabilir (Telefoncu, 1997).

#### **iv) Biyospesifik bağlama metodu**

Biyospesifik bağlama metodu, çoğunlukla afinite ayırması işlemlerinde kullanılan koenzimler, inhibitörler, efektörler, lektinler ve antikorlar gibi bileşikler ile enzimler arasındaki biyospesifik etkileşime dayanır. Eğer etkileşim kuvvetli ise enzim bu bileşiklerden biri ile konjugat oluşturarak taşıyıcıya bağlanır. Bunun yanında, enzimler ile bağlandıklarında onları inaktive ettiklerinden dolayı antikorlar ve inhibitörler iyi bir seçim olmazlar. Lektin ile spesifik karbohidrat birimleri içeren enzimler arasındaki etkileşim, bu uygulamalar için faydalıdır (Sulkowski and Laskowski, 1974). Glikoprotein olan lektinler, spesifik karbohidrat birimi ile sıkı bir şekilde bağlanır. En çok kullanılan lektinlerden biri konkanavalin A'dır. Birçok enzim glikoprotein olduğundan dolayı, lektinlerin kullanım alanı vardır.

#### **b) Çapraz bağlama metodu**

Bu metot, küçük moleküllü bi- ve multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine,

pH ve immobilize edilecek enzime doğrudan bağımlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; gluteraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfoler, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir. Bu metot ile immobilize edilmiş biyokatalizörün aktivitesinde genellikle düşüş gözlenir (Telefoncu, 1997).

### c) Tutuklama metodu

Prencip olarak tutuklama, biyokatalizörü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Biyokatalizör bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik, biyokatalizörün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama metodu 5 ana grupta sınıflandırılabilir; kafes (polimer matrikte tutuklama), mikrokapsül, lipozom, membran ve ters misel.

Kafes tipinde, biyokatalizör çeşitli polimerlerden birinin matriksi içine tutuklanır (Tanaka and Kawamoto, 1999). Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda biyokatalizörün de bulunması halinde çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde (odacıklarda) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Yöntem, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin biyokatalizör çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu biyokatalizör çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmesi engellenmektedir. Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, biyokatalizör tutuklanabilmeli fakat substrat moleküllerinin biyokatalizöre ulaşmasına engel olmamalıdır. Bu yöntemle immobilize edilen biyokatalizörlerin asıl özelliklerinde bir değişme beklenmez. Ancak taşıyıcının tipi ve enzimatik reaksiyonlar bölgesel mikroçevre etkilerinin oluşmasına neden olmaktadır. Örneğin; taşıyıcının yüklü olması, immobilize biyokatalizörün özelliklerinde, doğal biyokatalizörlere göre çok önemli değişmelere neden olmaktadır. Bu yöntem; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktarda biyokatalizör ile gerçekleştirilmesi gibi avantajlara sahiptir. Kimyasal bir bağlanma olmadığı için nötral, suda çözünmeyen taşıyıcıların da



kullanımına olanak vermektedir. Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize biyokatalizörün sadece küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir (Telefoncu, 1997).

Mikrokapsül tipi immobilizasyon, biyokatalizörün bir yarı geçirgen sentetik polimerin mikrokapsülleri içine tutuklanmasını içerir (Tanaka and Kawamoto, 1999). Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1–100  $\mu$  arasında değişmektedir. Immobilizasyonda kullanılacak olan yarı geçirgen membranın, gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse, bu yöntem ile immobilize edilmiş biyokatalizörün verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır. Bu yöntem ile biyokatalizör immobilizasyonu sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Süreksiz mikrokapsüllerde (lipozomlar) çerçeve membranı bir sıvı tabaka iken sürekli mikrokapsüllerde membran katıdır (Telefoncu, 1997).

Lipozom tipinde, lipitlerden oluşmuş amfipatik sıvı-yüzey aktif madde membranı içine tutuklama yapılır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Membran tipinde biyokatalizör, reaksiyon çözeltisinden ultrafiltrasyon membranı, mikrofiltrasyon membranı veya hollow-fiber ile ayrılmıştır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Ters misel tipinde biyokatalizör, yüzey aktif madde ile bir organik çözgenin karışımı ile oluşturulan ters miseller içine tutuklanmıştır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Tutuklama metodunun en önemli avantajı, sadece tek bir enzimin değil çoklu enzimlerin, hücresel organellerin ve sağlam ve muamele görmüş hücrelerin de immobilize edilebilmesidir. Bunun yanında dezavantajları ise; yüksek molekül kütleli substratların tutuklanmış biyokatalizörlerin yanına yaklaşmaması ve taşıyıcının yenilenmesinin zor olmasıdır. Tutuklama metotları arasında kafes tipi en fazla kullanılandır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

## 1.2 Hücre İmmobilizasyonu Hakkında Genel Bilgiler

İmmobilize mikroorganizmaların endüstriyel alanlarda kullanımı son zamanlarda çok ilgi çekmektedir. Bu durum; hücre immobilizasyonunun fermantasyon üretkenliğini arttırması, sürekli işlemlerde uygulanabiliyor olması, hücre kararlılığı, geri kazanımın çok kolay olması ve tekrar kullanılabilirliği gibi çeşitli avantajlara sahip olmasından kaynaklanır. Hücre immobilizasyonu aynı zamanda kayma hareketlerine karşı hücreleri korur. Kayma hareketleri, farklı tabakalardaki sıvıların hızlarındaki farklılıktan ileri gelen deformasyondur. İmmobilize hücrelerin endüstride kullanımı halen sınırlıdır ve gelecekteki uygulamalar immobilizasyon prosedürünün geliştirilmesine bağlıdır (Kourkoutas et al., 2004).

### 1.2.1 Hücre immobilizasyon destekleri ve teknikleri

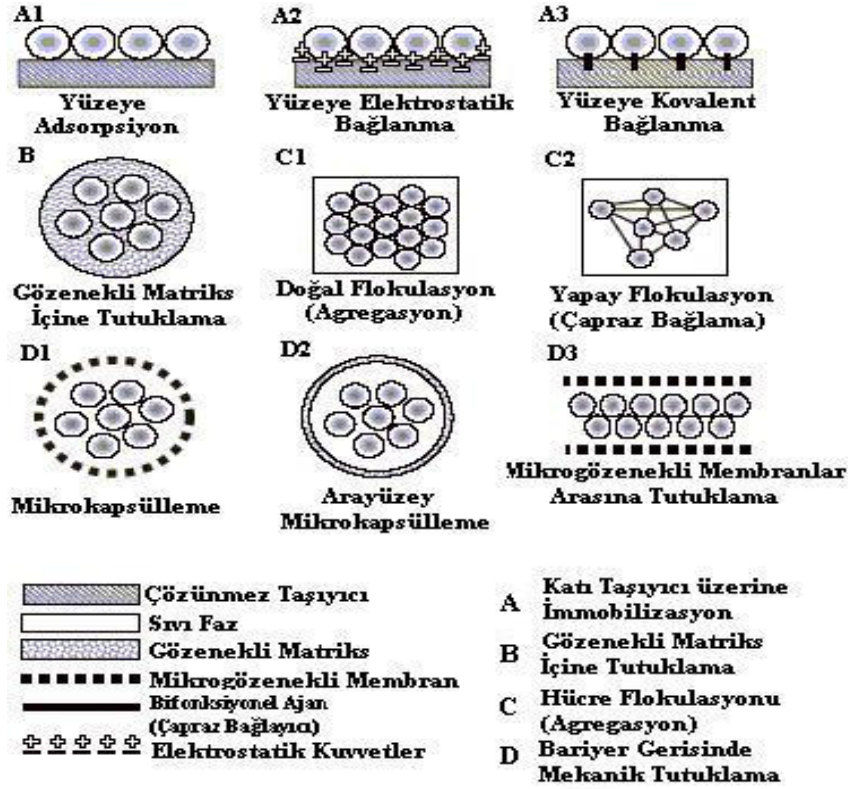
Hücre immobilizasyonu “bütün bir hücrenin, belirli bir bölgeye istenilen katalitik aktivitesini koruyarak, fiziksel olarak hapsedilmesi veya yerleştirilmesi” olarak tanımlanır (Karel et al., 1985). İmmobilizasyon; bazı hücreler için, hücreler bir yüzey üzerinde veya doğal bir yapı içinde büyüdüklerinde, doğal olarak oluşur. Birçok mikroorganizmanın doğal olarak kendini farklı tipteki yüzeylere bağlama özelliği vardır (Kourkoutas et al., 2004). Birçok biyoteknolojik işlem, immobilizasyon teknikleri ile üstünlük kazanmıştır ve bu yüzden çok sayıda immobilizasyon tekniği ve destek materyali önerilmiştir.

Destek materyali olarak alginatın, büyük ilgi görmesinin yanında, çeşitli polielektrolit jeller ve komplekslerin hücre tutuklamada kullanılması araştırılmaktadır. Çizelge 1.1’de hücre tutuklama uygulamalarında çoğunlukla kullanılan polielektrolitlerin fiziksel özellikleri verilmiştir (Bhatia et al., 2005).

Çizelge 1.1 Hücre tutuklamada kullanılan bazı polielektrolitlerin özellikleri.

Sistem	Özellik
Alginat	Güçlü polianyon
Karragenan	Güçlü polianyon
Poli(stiren sülfonat)	Güçlü polianyon
Karboksimetilselüloz	Polianyon
Selüloz sülfat	Polianyon
Heparin	Polianyon
Poli(metilen-co-guanidin)	Polianyon
Poli(diallildimetil amonyum klorür)	Güçlü polikasyon
Çitosan	Zayıf polikasyon primer aminin pKa'sı 6,3-6,8
Poli(L-lizin)	Zayıf polikasyon primer aminin pKa'sı ~10,5
Poli(allilamin) hidroklorür	Zayıf polikasyon amin grubun pKa'sı ~8,5
Poli(vinilamin) hidroklorür	Zayıf polikasyon

Hücre immobilizasyon teknikleri ise, fiziksel mekanizmaların uygulandığı 4 temel kategoriye ayrılabilir; a) katı taşıyıcı yüzeye adsorpsiyon veya bağlanma, b) gözenekli bir matris içine tutuklama, c) flokulasyon (doğal) veya çapraz bağlayıcı ajanlar (yapay) ile kendi kendine agregasyon ve d) bariyer arkasında hücre tutuklama (Pilkington et al., 1998). Şekil 1.1'de bu 4 temel kategori şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Hücre immobilizasyonunda kullanılan teknikler ve destek materyalleri (Kourkoutas et al., 2004).

### a) Katı taşıyıcı yüzeye immobilizasyon

Katı taşıyıcı üzerine hücre immobilizasyonu, elektrostatik kuvvetlerin neden olduğu fiziksel adsorpsiyon veya hücre membranı ve taşıyıcı arasındaki kovalent bağlama ile gerçekleştirilir. Hücre filminin kalınlığı, tek sıra hücreden 1 mm ve fazlasına kadar değişebilir. Bu tip immobilizasyonu gerçekleştirmenin kolaylığından dolayı, yüzey üzerine immobilize hücreleri kullanan sistemler oldukça popülerdir. Biyofilmin derinliği kadar hücrelerin taşıyıcıya bağlanma güçleri de genellikle değişir ve kolaylıkla saptanamaz. Hücre ve çözelti arasında bir bariyer olmadığı için, hücre ayrılması ve yer değiştirmesi olasıdır. Bu tip immobilizasyonda kullanılan katı taşıyıcılara örnek olarak, selülozik materyaller (DEAE-selüloz, odun, odun talaşı gibi) ve inorganik materyaller (poligorskite, montmorilonit, hydromica, gözenekli porselen ve gözenekli cam gibi) verilebilir (Kourkoutas et al., 2004).

### **b) Gözenekli matrikse tutuklama**

Bu tip immobilizasyonda, hücreler ya diğer hücrelerin varlığı tarafından hareketi sınırlanana kadar gözenekli matrikse doldurulur ya da gözenekli materyal hücre kültürü içinde oluşturulur. Her iki tutuklama yöntemi de hücrelerin dış ortama difüzyonunu engelleyen katı bir ağ içine hücrelerin tutuklanmasına dayanır. Fakat bu ağ besin maddeleri ve metabolitlerin geçişine izin vermelidir (Kourkoutas et al., 2004).

Bu tip immobilizasyonun en tipik örnekleri; alginat,  $\kappa$ -karragenan, agar, kitosan benzeri polisakkaritler ve poligalakturonik asit veya jelatin, kollajen ve polivinil alkol gibi diğer polimerik materyaller içine tutuklamadır.

Polisakkarit jel gibi, gözenekli matriks içine hücre tutuklamanın problemlerinden biri, kürelerin dış yüzüne yakın konumdaki hücrelerin küre dışına kaçmasıdır. Bu, kullanılan sistemin serbest ve immobilize hücreleri içermesine neden olur. Bu problemde kaçınmak için, hücreleri içeren iç çekirdek ve hücrelerin çekirdekten kaçmasını engelleyen, bir dış tabakadan oluşan hidrojel küreler geliştirilmiştir (Tanaka et al., 1989).

### **c) Hücre flokulasyonu (agregasyonu)**

Hücre flokulasyonu, hücrelerin büyük bir birim oluşturmak üzere agregasyonu veya süspansiyondaki hücrelerin kümelere yapışması ve hızla çökmesi özelliği olarak tanımlanır (Jin and Speers, 1998). Agregat oluşturma yeteneği, fungus ve bitki hücrelerinde gözlenir. Doğal yollarla flokule olmayan hücre kültürlerinin agregasyonunu gerçekleştirmede yapay flokulasyon ajanları veya çapraz bağlayıcılar kullanılabilir (Kourkoutas et al., 2004). Gluteraldehit ve toluendiizosiyanat (Chibata et al., 1974) gibi bi- veya multi-fonksiyonel ajanlar kullanarak hücreler kendi aralarında çapraz bağlanarak immobilize edilebilirler.

### **d) Bariyer arkasında mekanik tutuklama**

Bir bariyer arkasında hücre tutuklama, mikrogözenekli membran filtrelerin kullanımı ya da bir mikrokapsül içine hücrelerin tutuklanması veya karışmayan iki sıvının etkileşen yüzeyine hücre immobilizasyonu ile gerçekleştirilebilir. Bu tip immobilizasyon, hücreden ayrılmış ürünler ve bileşiklerin minimum transferi

gerektiğinde idealdir. Mikro gözenekli membranlar arasına hücre immobilizasyonunun temel dezavantajı, kütle transferinin sınırlı olması (Lebeau et al., 1998) ve hücre büyümesinden kaynaklanan membran biyobozunmasıdır (Gryta, 2002).

### **1.2.2 Hücre immobilizasyonu için ön gereksinimler**

Bir taşıyıcının hücre immobilizasyonuna uygun olabilmesi için aşağıdaki ön gereksinimleri karşılaması gerekmektedir (Korkoutas et al., 2004):

1. Taşıyıcı, hücrelerin bağlanabileceği fonksiyonel gruplar içeren geniş bir yüzeye sahip olmalıdır,
2. Taşıyıcı kolay elde edilebilmeli ve yeniden kullanılabilmelidir,
3. Hücre canlılığı ve immobilize biyokatalizörün operasyonel kararlılığı yüksek olmalı ve uzun süre boyunca aynı kalmalıdır,
4. İmmobilize hücrenin biyolojik aktivitesi, immobilizasyon işleminden etkilenmemelidir,
5. Desteğin gözenekliliği homojen olmalı ve kontrol edilebilmelidir. Destek aynı zamanda substrat, ürün, kofaktör ve gazların giriş-çıkışına izin vermelidir,
6. Taşıyıcı iyi bir mekanik, kimyasal, termal ve biyolojik kararlılığa sahip olmalı; enzimler, çözümler, basınç değişimi ya da kayma kuvvetleri ile kolaylıkla bozunmamalıdır,
7. Taşıyıcı ve immobilizasyon tekniği, kolay, ekonomik ve ölçek büyütme için uygun olmalıdır,
8. Taşıyıcı kalıntı bırakarak ürün kalitesini etkilememelidir.

### 1.2.3 Mikrobiyal hücre üzerine immobilizasyonun etkisi

Hücre immobilizasyonu, hücre büyümesinde, fizyolojik ve metabolik aktivitelerinde, değişikliklere neden olabilir. İmmobilizasyon ile gerçekleşen metabolik değişikliklerin tipini ve büyüklüğünü önceden sezmek zordur. Bazı parametreler bu değişikliklerden sorumlu olarak kabul edilmektedir. Örneğin; difüzyon nedeniyle kütle transfer sınırlaması, büyüme modelindeki karışıklık, yüzey gerilimi ve ozmotik basınç etkileri, azalan su aktivitesi, hücre-hücre iletişimi, hücre morfolojisinde ve membran geçirgenliğinde ve ortam bileşenlerinden yararlanmadaki değişimler (Kourkoutas et al., 2004).

#### a) İmmobilizasyonun büyümeye ve fizyolojiye etkisi

Melzoch ve arkadaşları (1994), destek içinde büyüme için yetersiz alan nedeniyle alginat üzerine immobilize *S. cerevisiae* hücreleri ve serbest *S. cerevisiae* hücreleri arasında morfoloji ve şekil bakımından farklılıklar bulmuşlardır.

Jamai ve arkadaşları (2001), farklı jel matriksleri ile yaptıkları çalışmaların sonucunda, küreler içindeki mikroçevrenin mikroorganizma fizyolojisini ve metabolik davranışını etkilediğini gözlemişlerdir.

İmmobilize hücre sistemlerinde, en fazla çalışılan parametre, mikrobiyal büyüme hızıdır (Junter et al., 2002). Genel olarak immobilize hücrelerin büyüme hızı serbest olanlara göre daha yavaştır ve bu durum, immobilize hücre sistemlerindeki kütle transfer sınırlamasından ileri gelmektedir (Parascandola and Alteriis, 1996).

İlave olarak, destek maddesinin koruyucu etkisinden kaynaklanan büyümeyi hızlandırıcı etkileri de vardır. Örneğin, bir filamentöz fungus olan *Tolypocladium inflatum*'un selit (celite) küreler içine tutuklanması, immobilize hücreleri yüksek kayma hareketlerine karşı korur ve immobilize hücre büyümesini teşvik eder (Chun and Agathos, 1991).

#### b) İmmobilizasyonun metabolik aktiviteye etkisi

Serbest ve immobilize *S. cerevisiae*'nın hücre içi pH ölçümleri sırasıyla, 6,9 ve 6,8 olarak bulunmuştur (Galazzo and Bailey, 1990). Hücre içi pH değerindeki

azalma, enzim aktivitesinde bir artma ve dolayısı ile de üretkenlikte bir artmaya sebep olmuştur.

Gözenekli cam kürelere immobilize edilmiş *S. carlsbergensis*'in, glukozdan etanol üretimi verimini arttırdığı ve karbon dioksit verimini azalttığı bulunmuştur (Navarro and Durand, 1977). Jelatine tutuklanmış *S. cerevisiae* hücrelerinin, serbest hücrelere göre daha yüksek derişimde polisakkarit, DNA ve RNA içerdiği bulunmuştur (Hilge-Rotmann and Rehm, 1990).

Ca-alginat jel kürelere immobilize edilmiş *Aspergillus niger*, serbest hücrelere göre antioksidan enzimlerinde artan bir sentez göstermiştir (Angelova et al., 2000).

İmmobilizasyon sonunda, ökaryotik (Doran and Bailey, 1986) ve prokaryotik (Lyngberg et al., 1999) mikroorganizmaların nükleik asit bileşimlerindeki değişim rapor edilmiştir.

### **c) İmmobilizasyonun stres toleransı üzerine etkisi**

Norton ve D'Amore (1994), immobilize maya hücrelerinin artan etanol toleransını incelemişler ve bu olguyu; jel materyalinin koruyucu tabakası ile hücre tutuklama veya sınırlı oksijen difüzyonundan dolayı, hücre membranlarında modifiye yağ asitlerinin birikmesi ile açıklamışlardır. Aynı araştırmacılar ayrıca, hücre immobilizasyonu sonucu substrat inhibisyonunda kısmi bir azalma rapor etmişlerdir. Benzer yüksek tolerans yeteneği immobilize *Kluyveromyces marxianus* için de elde edilmiştir (Dale et al., 1994). İmmobilizasyon tekniklerinin yol açtığı ozmotik stresin, polioller gibi basınç düzenleyen bileşiklerin hücre içi üretimini tetiklediği bulunmuştur. Bu bileşikler, su aktivitesini azaltmakta ve bunun sonucu olarak toksik bileşiklere karşı yüksek tolerans kazanılmaktadır (Norton ve D'Amore, 1994). Çeşitli polimer matrislere immobilize edilmiş maya ve bakteri hücreleri, dondurma ve dondurarak kurutma koşullarında, serbest hücrelere göre gelişmiş canlı kalma ve termal kararlılık yetenekleri, göstermektedirler (Lodato et al., 1999).

İmmobilize hücreler, ayrıca biyosid ve antibiyotikler gibi antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek dayanıklılık da sergilemektedirler (Junter et al., 2002).



### **1.2.4 İmmobilize hücrelerin serbest hücre sistemlerine göre avantajları**

İmmobilize hücre sistemleri, serbest hücre fermantasyonu üzerine bazı avantajlara sahiptir (Kourkoutas et al., 2004). Bunlar:

1. Biyokatalizörün aktivitesinin ve stabilitesinin artması. İmmobilizasyon için kullanılan desteğin pH, sıcaklık, çözügen veya ağır metallerin fizikokimyasal etkilerine karşı koruyucu etki göstermesi,
2. Birim biyoreaktör hacmi başına düşen yüksek hücre yoğunluğu sonucu yüksek hacimsel üretkenlik ve fermantasyon süresi,
3. Artan substrat alımı ve verim yükselmesi,
4. Sürekli işlemlere uygunluk,
5. Yüksek substrat derişimlerine karşı artan tolerans ve son ürün inhibisyonunda azalma,
6. Ürün kalitesini arttıran düşük sıcaklık fermantasyonuna uygunluk,
7. Ayırma ve filtrasyon gereksiniminin azalması sonucu enerji ve ekipman giderlerinin düşmesi,
8. Biyokatalizörün kesikli operasyonlarda biyoreaktörden çıkarılmadan uzun periyotlarda yeniden kullanımı,
9. Fermantasyon aktivitesi ve yüksek hücre yoğunluğundan kaynaklanan mikrobiyal kontaminasyon riskinin azalması,
10. Basitleştirilmiş işlem düzenlemeleri ile küçük biyoreaktörlerin kullanılabilmesi sonucu daha düşük maliyet,
11. Bazı ürünlerde olgunlaşma süresinin kısalması.

### 1.3 Hidrojellere Hücre İmmobilizasyonu

Hidrojeller; kimyasal bağlar, iyonik etkileşimler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler veya fiziksel bağlar ile çapraz bağlı polimerlerdir. Bu materyaller suyu absorplar ve çözünmeden kolayca şişerler. Hidrojeller tıp ve biyoteknolojide hücre immobilizasyonu için geliştirilmektedir. Sentetik ve doğal kaynaklı hidrojeller, çok çeşitli hücre tiplerinin immobilizasyonu için incelenmektedir (Jen et al., 1996).

Hidrojel temelli materyaller, sahip oldukları üstün özelliklerinden dolayı, ilaç veya biyoaktif moleküllerin dağıtım araçları olarak, biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Peppas, 1987). Son yıllarda, hidrojeller çeşitli biyolojik ürünleri (aşı, protein ve antikor gibi) üretmek için hücre immobilizasyon matrisi olarak (Jen et al., 1996) ve zarar gören dokunun yerine yeniden doku oluşturmak için, doku mühendisliğinde artan bir şekilde kullanılmaktadır (Lee and Mooney, 2001).

Hücre-tutuklayan hidrojeller, genel olarak jelleşme öncesi çözeltinin hücre ile karıştırılması ve takiben fiziksel veya kimyasal çapraz bağlayıcı kullanılarak jelleştirilmesi ile hazırlanır (Clark and Ross-Murphy, 1987). Başarılı bir immobilizasyon için hidrojel, hücre canlılığına ve fonksiyonuna yardım etmeli bir başka deyişle biyouyumlu olmalıdır. Hidrojel ayrıca, yeterli oksijen transportu ve difüzyonuna ve gerekli besin maddelerinin, metabolik atıkların ve salgılanan ürünlerin, hidrojel ağından geçişine izin vermelidir. Ayrıca kimyasal ve mekanik kararlılık da hidrojellerden biyomateryal olarak istenen özelliklerdendir (Jen et al., 1996). Biyouyumluluk, hücrelerin polimer üzerinde veya içinde gelişmesi için önemlidir. Hidrojel toksik olmamalı, inert olmalı ve hücre fonksiyonlarına engel olmamalıdır (Goosen, 1993).

Hidrojellere hücre immobilizasyonu için üç temel metot uygundur; adhezyon, matrikste tutuklama ve mikroenkapsülasyon (King and Goosen, 1993):

Adhezyon adında anlaşılacağı gibi, hücrelerin polimer taşıyıcı üzerine bağlanmasına dayanır. Bu metod hidrojel köpük veya jel film yüzeyine bağlama için etkilidir. Adhezyon ile immobilizasyon, kültür için hücreleri stabilize etmede veya analitik işlemler için kullanılır. Adhezyon metodu ile başarılı bir immobilizasyon, hücrenin fonksiyonları korunarak hidrojel üzerine bağlanmasına bağlıdır. Birkaç

faktör, hücre afinitesini ve hidrojel üzerine davranışları etkiler. Bunlar, monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların kimyasal yapısı, hidrofilik ve hidrofobik özellikler ile yüklü fonksiyonel grupların neden olduğu yüzey karakteristikleridir. Hidrojelin fiziksel karakteristikleri adhezyon afinitesini etkiler, bu yüzden gözenek çapının ve ağ yapısının değişmesi hücre adhezyonunu modifiye edebilir (Jen et al., 1996).

Adhezyonun tersine, matrikste tutuklama, hidrojel ağ içine hücrelerin fiziksel zorlanmasına bağlıdır. Matrikse tutuklama, bazen makroenkapsülasyon olarak da adlandırılır. Hidrojeller matrikste tutuklama için idealdir. Çünkü sentetik ve doğal kaynaklı hidrojellerin çapraz bağlanması, hücreleri tutabilecek gözenekli ağ yapısına sahip üç boyutlu yapının oluşmasını sağlar. Bu yapı, besin maddeleri, atıklar ve diğer gerekli moleküllerin geçişine izin verir. Matrikste tutuklama için kullanılan hidrojeller, kabul edilebilir difüzyon ve transport özelliklerine sahip olmalı ve ılımlı koşullarda polimerize olmalıdır (Jen et al., 1996).

Mikroenkapsülasyon, tek bir hücrenin veya küçük bir hücre topluluğunun ince mikro gözenekli yarı geçirgen bir membran ile sarılmasıdır. En yaygın kullanılan mikroenkapsülasyon tekniği, yüklü polielektrolitlerin hücre çekirdeği etrafında jelleşmesidir. Örneğin; alginat-polilizin mikrokapsülleri, sodyum alginat içinde süspanse edilmiş hücrelerin kalsiyum klorür gibi iki değerlikli katyon çözeltisi içine damlatılarak hücre içeren küresel damlacıkların oluşturulması ile elde edilir. Enkapsülennmiş hücreler daha sonra, dayanıklı mikrokapsüller oluşturmak üzere pozitif yüklü polilizin ile kaplanır (Jen et al., 1996).

### 1.3.1 Alginat

İlk olarak 1881 yılında İngiliz kimyager E.C.C. Stanford, kahverengi alglerde alginatın varlığını tanımlamıştır. Aynı zamanda alginatın kahverengi alglerde en fazla bulunan polisakkarit (kuru maddenin ~ % 40'ı) olduğunu da tespit etmiştir. 80 yıl kadar sonra, mikrobiyal alginat Linker ve Jones (1964) tarafından keşfedilmiştir. İki yıl sonra Gorin ve Spencer (1966) toprak bakterisi *Azobacter vinelandii*

tarafından üretilen asetillenmiş alginatı tanıtmıştır. Mikrobiyal alginata ilgi medikal kullanımı ile artmıştır. Bu polimerin farmasotik uygulamalarının hızla gelişmesi ve son yıllarda keşfedilen eşsiz immunolojik özellikleri bu yararlı bileşiğin optimize üretim yöntemlerinin endüstriyel biyokimyacılar tarafından geliştirilmesine neden olmuştur.

Alginat; kalınlaştırma, stabilizatör, süspanse edici, film oluşturucu, jel yapıcı ve emülsiyon stabilize edici gibi özellikleri içeren, eşsiz kolloidal özelliklerinden dolayı, potansiyel biyopolimer film ve kaplayıcı ajan olarak ilgi çekmektedir (Rhim, 2004). İlimli koşullarda jelleşen, toksik olmayan ve kolay elde edilebilen bir jeldir (Drury and Mooney, 2003). Alginat, yıllardır yiyecek ve meşrubat endüstrisinde kalınlaştırıcı ve jelleştirici ajan ve kolloidal stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Gıda, kozmetik, tıp, tekstil ve kağıt endüstrisinde yılda yaklaşık 30,000 ton sodyum alginat kullanılmaktadır (Moresi et al., 2004). Alginat ayrıca memeli ve mikrobiyal orijinli hücreleri ve enzimleri içeren çeşitli biyolojik materyallerin tutuklanmasında kullanılmaktadır (Simpson et al., 2006). Alginatın hücre ve protein tutuklamada veya salınımında bir matriks olarak kullanım alanı bulabilecek özellikleri vardır. Bu özelliklerden bazıları:

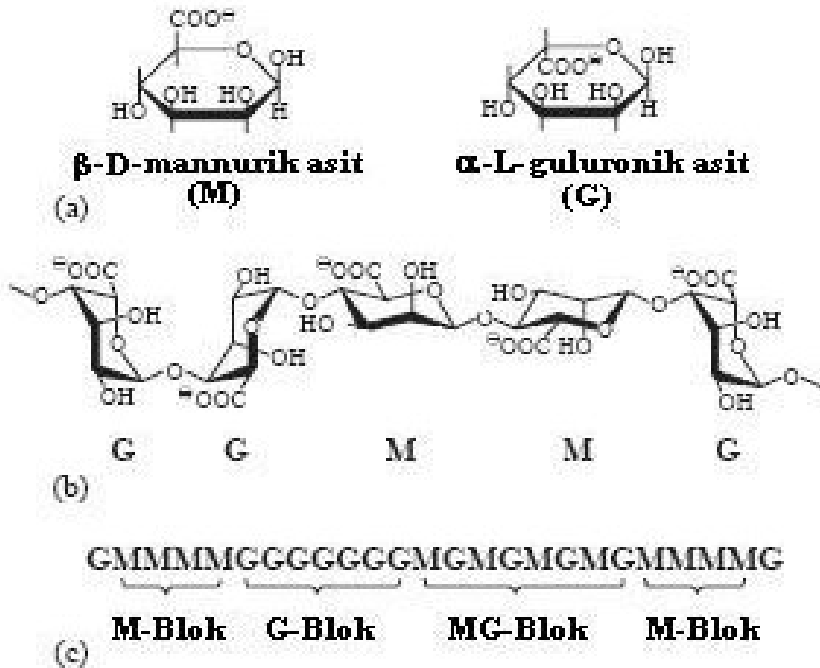
- a) Matriks içinde bağıl olarak inert sulu ortam,
- b) Organik çözügenlerin kullanılmadığı, ılımlı oda koşullarında gerçekleşen enkapsulasyon işlemi,
- c) Makromoleküllerin yüksek hızla difüzyonuna izin veren büyük jel gözenekliliği,
- d) Gözenekliliğin basit kaplama işlemleri ile kontrol edilebilirliği,
- e) Sistemin normal fizyolojik koşullarda kolaylıkla ayrışması ve biyobozunabilmesidir (Gombotz and Wee, 1998).

#### **a) Alginatın kaynağı ve kimyasal yapısı**

Alginat, çeşitli alg türlerinden seyreltik alkali ortamda özütlenen hidrofilik kolloidal bir karbohidrattır. Ticari alginat en fazla üç kahverengi alg (kelp) türünden özütlenir. Bunlar; *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera*'dır. Ayrıca *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negrescens* ve *Sargassum* türleri de diğer alginat üreten türlerdir. Tüm bu alg türlerinde alginat

birincil polisakkarittir ve kuru ağırlığın yaklaşık % 40'ını oluşturur. Kahverengi alglerdeki, alginat mekanik kuvveti ve esnekliği sağlayan yapısal bir bileşendir. Alginat, deniz suyunda bulunan  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  ve  $Na^+$  gibi çeşitli katyonların karışım tuzu olarak intraselüler matrisde bulunur. Doğal alginat çoğunlukla çözünmeyen  $Ca^{2+}$  çapraz bağlı jel olarak bulunur (Gombotz and Wee, 1998).

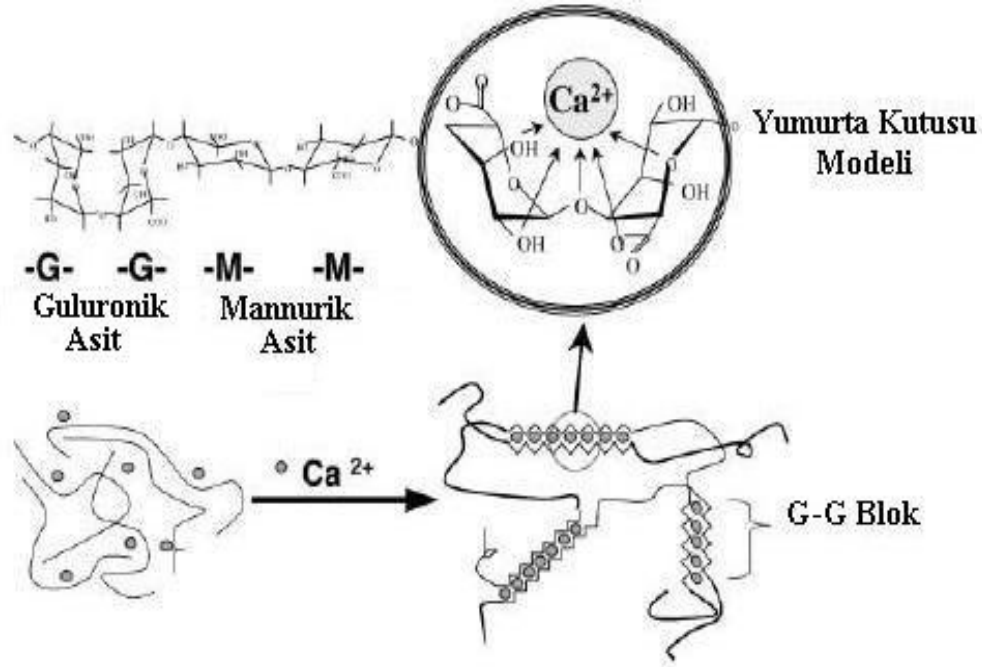
Alginat değişen miktarlarda 1,4-bağlı  $\beta$ -D-mannurik asit (M) ve  $\alpha$ -L-guluronik asit (G) birimlerini içeren dallanma göstermeyen lineer bir polisakkarittir (Şekil 1.2). Polimannurik asit şerit benzeri zincirdir ve moleküler tekrarı 10,35 Å'dır. Poliguluronik asit ise, çubuk benzeri bir zincirdir ve 8,7 Å'lık bir moleküler tekrara sahiptir (Atkins et al., 1973a; Atkins et al., 1973b). MG bloklarının sıklığı ve G ve M bloklarının frekansı ve uzunluğu alginatın izole edildiği doku veya organizmaya bağlıdır. Örneğin *L. hyperborea*'dan izole edilen alginat yüksek  $\alpha$ -L-guluronik asit içeriğine sahipken *A. nodosum* ve *L. japonica*'dan elde edilen alginat düşük miktarda  $\alpha$ -L-guluronik asit içerir. Alginat, polimer üzerinde düzenli tekrar eden birimlere sahip değildir (Gombotz and Wee, 1998).



Şekil 1.2 Alginat polimerinin yapısı. (a) Alginat monomerleri (M ve G); (b) Alginat polimeri; (c) Alginat polimerinin zincir dizisi. (Smidsrød and Draget, 1996).

### **b) Alginat jel oluşun mekanizması**

Alginat küreler, sodyum alginat zltisinin  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  veya  $\text{Ba}^{2+}$  gibi iki değerlikli çapraz bağlayıcı zlti içine damlatılması ile elde edilir.  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  gibi iki değerlikli katyonlar da alginat jelleri çapraz bağlayabilir fakat bu katyonların toksisitesi çoğu uygulamada kullanımı sınırlamaktadır. Jelleşme ve çapraz bağlama guluronik asit üzerindeki sodyum iyonu ile iki değerlikli katyonun yer değiştirmesi ve Şekil 1.3'de gösterildiği gibi; karakteristik yumurta kutusu yapısı oluşturmak üzere, bu guluronik asit gruplarının yığılması ile oluşur (Rees, 1981). Alginat, poliguluronik asit birimlerinin kalsiyum veya diğer iki değerlikli katyonların varlığında zincir içi dimerizasyon ile düzenli ağ yapısına geçerek jelleşir. Grant ve arkadaşları (1973), jelleşme işleminin kalsiyum iyonlarının aynı hizaya gelmiş iki alginat zincirinin G bloklarına bağlanması ile oluştuğunu göstermiştir. ubuk benzeri poliguluronik asit bölgeleri, düzenli bir çift zincirli yapı oluşturur, bu yapı düzenli bir koordinasyon bölgesi sağlar. Bu bölge, kalsiyum ve diğer iki değerlikli katyonlar için uygun boşluğa sahiptir. Dimerizasyon bölgesi polimannurik asit birimlerinin zincir sekansı ile sonlandırılır (Davis et al., 2003).



Şekil 1.3 Yumurta kutusu modeli olarak adlandırılan jelleşme işlemi. (Sabra et al., 2001).

İki değerlikli katyon  $\alpha$ -L-guluronik asit bloklarına yüksek kooperatiflikte bağlanır ve kooperatif birimin uzunluğu 20 monomerden daha fazladır (Gombotz and Wee, 1998). Ayrıca alginatın  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  gibi iki değerlikli katyonlara olan ilgisinin guluronik asit içeriği ile arttığı gözlenmiştir. İki değerlikli katyonlar için, poliguluronik asit birimlerinin bu yüksek spesifikliği  $Ca^{2+}$ 'ı (ve diğer iki değerlikli katyonları) barındıran poliguluronik asit birimlerinin zig zag yapısı ile açıklanabilir (Davis et al., 2003). Alginat jelin kuvveti, zincir arasında meydana gelen çapraz bağ sayısına, çapraz bağlayıcı iyonun türüne ve bağlanan blokların uzunluğuna bağlıdır (Sabra et al., 2001).

Genel olarak çapı 1 mm'den büyük küreler, şırınga iğnesi veya pipet ile oluşturulabilir (Gombotz and Wee, 1998). Sodyum alginat çözeltisi iki değerlikli çapraz bağlama çözeltisine damlatıldığında oluşan kürelerin çapı iğnenin boyutuna ve alginat çözeltisinin viskozitesine bağlıdır. Büyük çaplı iğne ve yüksek viskozitede çözelti büyük çaplı kürelerin oluşumuna neden olur. Sodyum alginatın viskozitesi oluşan kürelerin şeklini de etkiler. Sodyum alginat derişimi arttığında daha yuvarlak

küreler oluşur. Bununla beraber, genel olarak % 5'den daha derişik sodyum alginat çözeltilerinden küre hazırlanması oldukça zordur (Gombotz and Wee, 1998). İyonik olarak çapraz bağlı jelin çapraz bağ sıklığı, mekanik özellikleri ve gözenek çapı M ve G oranı ile veya polimer zincirin moleküler kütesinin değiştirilmesi ile ayarlanabilir (Drury and Mooney, 2003).

Alginat için iyonik çapraz bağlayıcı olarak kullanılan  $\text{CaCl}_2$  ile ilgili bir problem, jel oluşumunun çok hızlı olması ve bunun sonucunda ise hafif çapraz bağlanma ile homojen olmayan yapının oluşumudur (Kuo and Ma, 2001). Az çözüner kalsiyum tuzları veya inert elektrolitler, jelleşme hızını düşürür ve jellerin mekanik dayanıklılığı ile yapısal düzenliliğini artırır (Boisseson et al., 2004).

### c) Alginat kürelerin fiziksel özellikleri

Katyon çapraz bağlı alginat kürelerin fonksiyonel ve fiziksel özellikleri polimerin bileşimine, sekans yapısına ve moleküler boyutuna bağlıdır. Çözeltide alginat polimerinin esnekliği  $\text{MG} > \text{MM} > \text{GG}$  sırası ile artar. Yüksek  $\alpha$ -L-guluronik asit içeriğine sahip alginattan yapılan jeller rijit ve kırılğan olurken, düşük  $\alpha$ -L-guluronik asit içeriği jeli daha elastik yapar. Elektron mikroskobu kullanılarak yapılan kalsiyum alginat, jel küre analizleri gözenek genişliğinin, 5 nm ile 200 nm arasında değiştini göstermiştir. Büyük proteinlerin jelden difüzyonu onların moleköl ağırlıklarına bağlı iken glukoz ve etanol gibi küçük moleküllerin difüzyonu alginat matriksi tarafından etkilenmez.  $\text{Ca}^{2+}$  çapraz bağlı alginat jelin parçalanması  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir. Bu işlem glikol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)- $N,N,N',N'$ -tetraasetik asit (EGTA), laktat, sitrat ve fosfat gibi şelatlayıcı ajanların veya  $\text{Na}^+$  veya  $\text{Mg}^{2+}$  gibi iyonların yüksek derişimlerinin kullanımı ile başarılabilir (Gombotz and Wee, 1998).



## 1.4 İmmobilize Mikroorganizmalar ile Endüstriyel Üretim Örnekler

### 1.4.1 İmmobilize mikrobiyal hücreler ile antibiyotik üretimi

Antibiyotik üretimi, uygulamalı mikrobiyolojide anahtar alanlardan biridir. Geleneksel üretim karıştırmalı tank reaktörler içinde gerçekleşir. Büyüme eşlikli bir işlem olmadığı için serbest hücreler ile sürekli fermantasyonda antibiyotik üretimi çok zordur. Hücre immobilizasyonu büyüme ile metabolik üretimi, metabolit verimini etkilemeden ayırabildiği için uygun bir çözüm olarak görülebilir. Bu yüzden, antibiyotik üretimi için farklı destek matriksleri üzerine çeşitli mikrobiyal türlerin immobilizasyonu çalışmaları yapılmaktadır. En geniş çalışılan sistem, immobilize *Penicillium chrysogenum* hücrelerini kullanarak penisilin G üretimidir (Ramakrishna and Prakasham, 1999). Gaucher ve Deo bu fungusun konidialarını κ-karragenan içine immobilize etmişler ve penisilin kesikli ve sürekli üretiminde kullanmışlardır. Bulgularını selit üzerine immobilize ettikleri funguslar ile karşılaştırdıklarında selit üzerine adsorpsiyonun κ-karragenan içine tutuklamadan beş kat daha üretken olduğunu bulmuşlardır (Deo and Gaucher, 1984). Adsorbe edilmiş hücreler, serbest hücrelere göre maksimum spesifik reaksiyon hızı sergilemişlerdir. Bunun nedeni oksijenden daha iyi yararlanma olabilir. Başka bir çalışmada, Cruz ve arkadaşları (2004) immobilize *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272 hücrelerini alumina ve alginata immobilize ederek sefalosporin C üretmişlerdir. Srinivasulu ve arkadaşları (2003), alginat üzerine immobilize ettikleri *Streptomyces marinensis* hücrelerini kullanarak neomisin üretimini optimize etmişlerdir. Bu çalışmaları sonunda, % 2'lik alginat çözeltisi, 0,25 M CaCl<sub>2</sub> ve 1 saat küre olgunlaşma zamanı ile maksimum neomisin üretimi elde etmişlerdir. Çizelge 1.2'de immobilize mikrobiyal hücreler tarafından üretilen antibiyotiklerin listesi görülmektedir.

Çizelge 1.2 İmmobilize mikrobiyal hücreler tarafından üretilen antibiyotikler.

Antibiyotik	Mikroorganizma	Destek
Aktinomisin D	<i>Streptomyces parvullus</i>	Ca-alignate
Basitrasin	<i>Bacillus</i> sp.	Poliakrilamid
Kandisidin	<i>Streptomyces griseus</i>	κ-karragenan
Sefalosporin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Poliakrilamid hidrazit, pamuk kumaş
Klortetrasiklin	<i>Streptomyces aureofacino</i>	Ca-alignate
Siklosporin A	<i>Tolypocladium inflatum</i>	κ-karragenan, selit
Daunorubisin	<i>Streptomyces euceitus</i>	Ca-alignate
Eritromisin	<i>Streptomyces erythreus</i>	Ca-alignate
Hibrit antibiyotik	<i>Streptomyces lividans</i>	Kendiliğinden oluşan agregatlar
6APA	<i>Escherichia coli</i>	Ca-alignate
Mitramisin	<i>Streptomyces iverini</i>	Agar
Neomisin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Selüloz küreler
Nikkomisin	<i>Streptomyces tendae</i>	Ca-alignate
Patulin	<i>Penicillium urticae</i>	κ-karragenan
Penisilin G	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Poliakrilamid selit, κ-karragenan
Rifamisin B	<i>Streptomyces rimosus</i>	Cam yünü
Tinamisin	<i>Streptomyces cattleya</i>	Selit
Tilosin	<i>Streptomyces</i> sp.	Ca-alignate

(Ramakrishna and Prakasham, 1999)

### 1.4.2 İmmobilize mikrobiyal hücreler ile organik asit üretimi

Organik asitler, gıda ve medikal alanlar gibi çeşitli uygulamalarda kullanılan önemli bir mikrobiyal üründür. Tüm organik asitler içinde, sitrik asit ticari biyoteknolojide en baskın pozisyonda yer alır. *A. niger* sitrik asit üretimi için en yaygın kullanılan mikroorganizmadır. Geleneksel olarak *A. niger*'in kesikli fermantasyonu kullanılır. Fungal fermantasyon, büyüme ile artan viskozite ve hücrelere eksik oksijen sağlanması gibi ciddi dezavantajlara sahiptir. Bu durumda, kültürlerin bol miktardaki steril oksijen ile havalandırılması gerekmektedir. İmmobilize hücreler durumunda, büyüme sınırlandığı için viskozitede bir değişim olmadan fermantör çalışabilir ve bu sebeple minimum kayıp ile iyi bir oksijen transfer hızına ulaşmak kolaylaşır. *A. niger* immobilizasyonu için en fazla kullanılan

metotlar, alginat jellere, agarozaya ve poliakrilamide tutuklamadır (Ramakrishna and Prakasham, 1999).

Laktik asidin fermentasyon ile üretimini geliştirmek için immobilize hücre teknolojilerinin kullanımı denenmiştir (Tay and Yang, 2002). *Lactobacillus helveticus* ve *Rhizopus oryzae* immobilize hücre halinde laktik asit üretiminde kullanılan en önemli mikroorganizmalardır. İmmobilizasyon tekniği olarak alumina ve pamuk kumaşa immobilizasyon tercih edilmiştir.

Seramik desteğe (Kondo et al., 1988) ve karragenan (Osuga et al., 1984) üzerine immobilize edilmiş *Acetobactor* sp. hücreleri ile asetik asit üretimi de gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, selüloz kumaş üzerine immobilize edilmiş *A. niger* hücreleri ile glukonik asit üretimi gerçekleştirilmiştir (Sankpal et al. 2001). Çizelge 1.3'de immobilize mikroorganizmalar tarafından üretimi gerçekleştirilen organik asitler listelenmiştir.

Çizelge 1.3 İmmobilize mikroorganizmalar tarafından üretilen organik asitler.

Asit	Mikroorganizma	Destek
Sitrik asit	<i>A. niger</i>	Na-alginate
Sitrik asit	<i>A. niger</i>	Agaroz
Sitrik asit	<i>A. niger</i>	İki yönlü hollow fiber
Sitrik asit	<i>A. niger</i>	Poliakrilamid
Sitrik asit	<i>A. niger</i>	Poliüretan köpük
Sitrik asit	<i>Yarrowia lipolitica</i>	Çeşitli destekler
Sitrik asit	<i>Yarrowia lipolitica</i>	Na-selüloz sülfat
Laktik asit	<i>Lactobacillus delbreackii</i>	Reçine
Laktik asit	<i>Lactobacillus casei</i>	Reçine
Laktik asit	<i>Lactobacillus lactis ssp. lactis</i>	Ca-alginate
Laktik asit	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Çekirge fasulyesi sakız jeli
Laktik asit	<i>Streptococcus faecalis</i>	Polipropilen
Laktik asit	<i>Sporolactobacillus cellulosolvans</i>	Na-alginate
Laktik asit	<i>Pediococcus halophilus</i>	Gözenekli alümina küreler
Laktik asit	<i>Rhizopus orisae</i>	Poliyeten glikol dimetakrilat
Laktik asit	<i>Aspergillus awamori</i>	Ca-alginate
Asetik asit	<i>Acetobacter</i> sp. K-1024	κ-karragenan
Glukonik asit	<i>A. niger</i>	Ca-alginate
Kojik asit	<i>Aspergillus orizae</i>	Alginate
Fumarik asit	<i>Rhizopus archizus</i>	Kil, şişe mantarı
Süksinik asit	<i>Maya</i>	Na-alginate
Giberelik asit	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Ca-alginat
Vanilik asit	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Na-alginate
İtakonik asit	<i>Aspergillus terreus</i>	Poliüretan

(Ramakrishna and Prakasham, 1999)

### 1.4.3 İmmobilize mikrobiyal hücreler ile enzim üretimi

Mikroorganizmalar yararlı enzimlerin üretimi için en iyi kaynaçlardır. Hücre immobilizasyon teknolojisi, ekstraselüler enzimlerin üretimi için uygundur. Sürekli enzim üretiminde hücre immobilizasyon tekniklerinin kullanılmasına karşı artan bir

ilgi vardır. Mikrobiyal enzimler arasında nişasta parçalayan  $\alpha$ -amilaz ve glukoamilaz en çok çalışılan enzimlerdir. Ramakrishna ve arkadaşları (1993), kalsiyum alginat içine *Bacillus cereus*'un immobilizasyonunu ve termo dayanıklı  $\alpha$ -amilazın akışkan yatak ve dolgu yatak reaktörlerinde sürekli üretiminde kullanılmalarını rapor etmişlerdir.

Son yıllarda, selülozik materyallerin enzimatik hidrolizi; bu materyal, yakıt haline dönüşebildiğinden dolayı büyük ilgi çekmektedir. Selülazın sürekli üretimi için immobilize *Trichoderma reesei* kullanımı hakkında çeşitli çalışmalar vardır. Bu fungusun, poliester kumaşa, nonwoven materyallere, ve selülozik kumaşlara immobilizasyonu çalışmaları yapılmıştır. *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa* ve *Sporotrichum thermophile*; Apinis, gibi çeşitli mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonu ile lipaz üretimi hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Penisilin açılaz, 6-amino penisilik asit (6 APA) ve fenil asetik asidin ticari üretiminde kullanılan en önemli enzimdir. 6 APA, ampisilin ve amoksilin gibi yarı sentetik antibiyotiklerin üretilmesinde kullanılır. *E. coli* ve *Bacillus megaterium* bu enzimin potansiyel üreticisi olarak bilinirler (Ramakrishna and Prakasham, 1999). Çizelge 1.4'de immobilize mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlere örnekler verilmiştir.

Çizelge 1.4 İmmobilize mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler.

Enzim	Mikroorganizma	Destek
Peptidaz	Maya	ENT-2000
$\beta$ -amilaz	<i>Bacillus megaterium</i>	Akrilamid
Glukoamilaz	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ca-alginat
Ribonükleaz	<i>Aspergillus clavatus</i>	PVA
Proteaz	<i>Humicola lutea</i>	Wort agar
Alkalin fosfataz	<i>Escherichia coli</i>	$\kappa$ -karragenan
Glukoz oksidaz	<i>A. niger</i>	Buğday, çadvar
Kitinaz	<i>Micromonospora chalybeata</i>	Ca-alginat
Hidantiaz	<i>Pseudomonas</i> sp.	Poliakrilamid
Pektinaz	<i>A. niger</i>	Buğday
İnvertaz	Maya	Polimer
$\alpha$ -amilaz	<i>Escherichia coli</i>	$\kappa$ -karragenan
Amiloglukozidaz	<i>A. niger</i>	Ca-alginat
Selülaz	<i>Trichoderma reesei</i>	Selülozik fiber
Penisilin açılaz	<i>Escherichia coli</i>	Poliakrilamid agar yağı
CGTaz	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. circulans</i>	Ca-alginat
Kloroperoksidaz	<i>Caldariomyces fumago</i>	$\kappa$ -karragenan
Lipaz	<i>Sporotrichum thermophile</i>	Alginat
Lignin peroksidaz	<i>Phanerachete chysogenum</i>	Polistren-divinil benzen
Pullulanaz	<i>Clostridium</i> sp.	Ca-alginat
Ksilanaz	<i>Aspergillus sydowii</i>	Ca-alginat

(Ramakrishna and Prakasham, 1999)

#### 1.4.4 İmmobilize mikrobiyal hücreler ile alkol üretimi

İmmobilize maya hücreleri kullanılarak etanol üretimi en çok çalışılan sistemlerden biridir. Jele tutuklama, çeşitli taşıyıcı yüzeylere adsorpsiyon ve çapraz bağlama gibi hemen hemen tüm immobilizasyon metotları alkol fermentasyonu için denenmiştir. İmmobilize *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol üretimi hakkında çalışmalar bulunmaktadır (Sree et al., 2000; Fujii et al., 2001). Ayrıca *Zymomonas mobilis*'in alkol üretiminde kullanımı ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Amutha

and Gunasekaran, 2001). Nojima (1983), immobilize canlı maya hücrelerini kullanarak büyük miktarlarda sürekli alkol fermantasyonunu rapor etmiştir. Burada maya, foto-çapraz bağlanabilen reçine ile karıştırılmış sonrasında ışık kaynağı ile polimerize edilmiştir.

Etanol yanında; sorbitol, gliserol, propan-di-ol, 2,3-bütan-di-ol, çözenler (aseton, bütanol, etanol), mannitol ve ksilitol gibi alkollerin de immobilize mikroorganizmalar ile üretim çalışmaları vardır. Çizelge 1.5’de immobilize mikroorganizmalar tarafından üretilen alkoller ve çözenler verilmiştir.

Çizelge 1.5 Immobilize mikroorganizmalar tarafından üretilen alkoller ve çözenler.

<b>Alkol</b>	<b>Mikroorganizma</b>	<b>Destek</b>
Etanol	<i>Zymomonas</i> sp.	Reçine jel
Etanol	Maya	Polimer
Etanol	Maya	Ca-alginate
Etanol	<i>Zymomonas mobilis</i>	Lifli matriks
Etanol	Maya	Ca-alginate
Etanol	Maya	Alginate
Etanol	<i>Kluyveromyce marxious</i>	Alginate
Etanol	Maya	PVA
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mikrotaşıyıcılar
Etanol	Maya	Ca-alginate
Aseton, bütanol, etanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Kömürleşmiş kemik
Bütanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	κ-karragenan
2,3-bütandiol	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ca-alginate
2,3-bütandiol	<i>Klebsiella oxytoca, Kluyveromyces lactis</i>	Kitosan + cam yünü
Bütanol	<i>Clostridium</i> sp.	Ca-alginate
Gliserol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Topaklanmış cam
Gliserol	<i>Citrobacter freundii</i>	Polimetan
Aseton, Bütanol	<i>Citrobacter acetobutylicum</i>	κ-karragenan, kitosan
Metanol	<i>Methylosinus trichosporium</i>	DEAE selüloz
Sorbitol	<i>Zymomonas mubilis</i>	κ-karragenan glutraldehit
Ksilitol	<i>Condida pelliculosa, Methanobacterium</i> sp.	Fotoçapraz bağlı reçine ENT 4000

(Ramakrishna and Prakasham, 1999)

### 1.4.5 İmmobilize mikrobiyal hücreler ile biyotransformasyon

İmmobilize hücreleri kullanan biyotransformasyon alanı son yıllarda büyük gelişme kaydetmiştir. Farmaskotik bileşiklerin üretimi için steroid biyotransformasyonuna olan ticari ilgi bu alana olan ilgiyi tetiklemiştir. Kortizolün d-1-dehidrojenasyonu için immobilize *Arthrobacter simplex*'in potansiyeli incelenmiştir (Ramakrishna and Prakasham, 1999). İmmobilize *Pseudomonas* sp. HZ519 hücreleri kullanılarak validamisin A'nın valienamine transformasyonu çalışılmıştır (Zheng et al., 2005). Karigar ve arkadaşları (2006), alginat immobilize ettikleri *Arthrobacter citreus*'u fenol degredasyonunda kullanmışlardır. Yapılan başka bir çalışmada, baryum alginata immobilize edilmiş *Candida guilliermondii* CCT 7207 hücreler ile nitrillerin biyodönüşümünü gerçekleştirmişlerdir (Dias et al., 2001).

### 1.5 *Aspergillus* Türleri Hakkında Genel Bilgiler

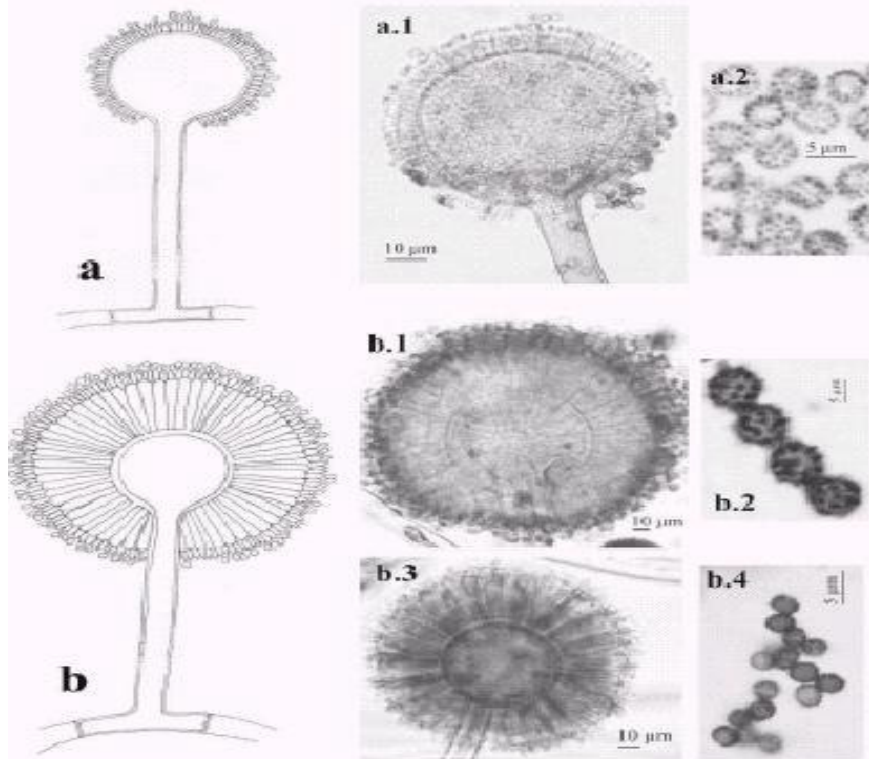
*Aspergillus*, Fungi aleminde, Ascomycota filumu, Eurotiomycetes sınıfı, Eurotales alt sınıfı (order), Trichocomaceae soyunda yer alan bir türdür (www.indexfungorum.org).

*Aspergillus Nigri* sınıfı [eski adı ile *Aspergillus niger* (*A. niger*) grubu] üyeleri geniş çeşitlilikteki ortamlarda büyüyebilir ve dünya çapında yayılmıştır. En yaygın çeşit olan *A. niger* bir patojen olarak kabul edilmesine rağmen, bu türün üyeleri genellikle zararsız olarak kabul edilir. Birçoğu gıda işlemlerinde kullanılan ekstraselüler enzimlerin ve organik asitlerin yaygın kaynağıdır. Siyah koloniler geliştiren tüm *Aspergillus* izolatlarının *A. niger* olarak tanımlanması çok yaygındır ve bazen aynı izolat kültür koleksiyonlarında farklı tür adları altında saklanır. Biyoteknolojik önemi nedeni ile bu türlerin tanımlanması belirgin olmalıdır (Abarca et al., 2004).

Raper ve Fennell (1965), *Aspergillus* türlerini; uniseriate (konidiayı oluşturan tek sıra palisade hücresi) veya biseriate (çift sıra palisade hücresi) olmalarına göre,



konidioforların yapısına, koloni ve konidial kafanın şekline, konidyanın şekline ve Czapek agarda üreme hızlarına göre, 12 alt türe ve 2 varyeteye ayırmıştır. Şekil 1.4'de uniseriate ve biseriata yapıları ile bazı konidial baş ve konidia resimleri görülmektedir. Renkleri kahverengiden siyaha değişen sporlara sahip *Aspergillus* türleri *A. niger* grubunu oluşturur. Bu grup üyelerinin çok değişken olmalarına rağmen sadece birkaç tür diğer çoğunluktan kolaylıkla ayrılabilir dolayısı ile onları türlere ayırmak çok kolaydır (örn. *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus* ve *A. aculeatus*). Diğer türleri içine alan tüm siyah *Aspergillus* türleri çok zor ayırt edilir: *A. ficuum*, *A. phoenicis*, *A. niger* ve *A. awamori* çok önemlidir. Pratik olarak türün bu grubu *A. niger* var. Tieghem olarak adlandırılır. Al-Musallam (1980), tüm morfolojik ve kültürel ve parametreleri içeren küme analizleri kullanarak bu fungus grubunun taksonomisini elden geçirmiştir. 2000 yılında Samson ve Pitt *Aspergillus niger*'in genetik taksonomisini yapmışlardır (Samson and Pitt, 2000).



Şekil 1.4. *Aspergillus* konidioforlarının yapıları. a) Uniseriate *Aspergillus* konidioforu; a.1) *A. japonicus* var. *aculeatus* konidial baş; a.2) *A. japonicus* var. *aculeatus* konidiası; b) Biserial *Aspergillus* konidioforu; b.1) *A. carbonarius* konidial baş; b.2) *A. carbonarius* konidiası; b.3) *A. niger* aggregate konidial baş; b.4) *A. niger* aggregate konidiası (Abarca et al., 2004)

Siyah *aspergilli* endüstriyel amaçlar için bol kullanılır ve araştırılır. Asya'da diğer funguslara nazaran fermente gıda ve meşrubat üretiminde geniş olarak kullanılır. *A. niger*'in birincil kullanımı fermantasyon ile organik asit ve enzim üretimidir ve insan sağlığına hiçbir yan etkisi olmadan uzun bir süredir kullanılmaktadır (Abarca et al., 2004).

*A. niger* ve *Aspergillus aculeatus* gibi diğer siyah *Aspergillus* türleri tarafından üretilen fungal enzimlerin geniş çeşitliliği gıda işlemede kullanılmakta olup bugün bu türlerin rekombinant soylarından elde edilen birçok enzim ürünü piyasada mevcuttur. *A. niger*, pulmonary aspergilosis salgınları ile ilişkili en yaygın üçüncü türdür ve aspergilomaya sebep olan etkenlerdendir. İnsan ve hayvanlarda ikinci zararı ise ürettikleri mikotoksinler nedeniyle ortaya çıkan toksisitedir. *A. niger* izolatları, malforminler ve naftopironlar gibi çeşitli toksik metabolitleri üretirler (Abarca et al., 2004).

### **1.5.1 *Aspergillus niger***

*A. niger*, organik maddeler üzerinde aerobik koşullar altında gelişen filamentli bir fungusdur. Doğada, toprak, çöp ve çürüyen bitki materyalleri üzerinde bulunur. *A. niger*, geniş bir sıcaklık aralığında büyüyebilir (6–47 °C) ve optimum sıcaklığı göreceli olarak 35–37 °C gibi yüksek bir değerdir. Büyümeyi sınırlayan su aktivitesi diğer *Aspergillus* türleri ile karşılaştırıldığında yüksek bir değer olan 0,88'dir. Ayrıca *A. niger* 1,4–9,8 gibi geniş bir pH aralığında gelişebilir. Bu özellikler ve hava ile dağılan konidiosporların verimli üretimi bu türün, sıcak ve nemli bölgelerde daha sık olmak üzere, geniş bir yayılım göstermesini sağlar (Schuster et al., 2002).

*A. niger*, biyoteknolojide kullanılan en önemli mikroorganizmalardan biridir. Onlarca yıldır ekstraselüler enzimler ve sitrik asit üretiminde kullanılmıştır. Bunlara ek olarak, *A. niger* biyotransformasyon ve atık arıtımında kullanılmaktadır. Son yirmi yıl içinde *A. niger* gıda işletmelerinde kullanılan enzimlerin üretiminde önemli bir transformasyon aracı olmuştur (Schuster et al., 2002). Pratikteki ilk önemi 1919

yılında, üretmiş olduğu yüksek orandaki sitrik asidin endüstriyel olarak kullanılması ile gerçekleşmiştir. Ekonomik önemi daha az olmasına rağmen glukonik ve fumarik asit de *A. niger* tarafından üretilmektedir. Bunun yanında, 1960'lerden beri *A. niger* meyve işleme, pişirme, nişasta ve gıda endüstrisinde kullanılan geniş çeşitlilikteki enzimlerin kaynağı olmuştur. Gen teknolojisi; *A. niger*'nin yabancı proteinlerin üretimi için kullanılmasında ve üretim işlemlerinin geliştirilmesinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Schuster et al., 2002).

Sitrik asit gıda ve meşrubat üretiminde birincil asitleyicidir. Sitrik asit ayrıca, yumuşak içkiler, meyve suları, tatlılar, reçeller, jelatinler, şekerleme ve şarap gibi gıdalarda da kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde, demir sitrat depolanmış kan için koruyucu olan demir ve sitrik asit kaynağı olarak, kozmetik endüstrisinde ise pH ayarlamada bir tampon ve bir antioksidan olarak kullanılmaktadır. Deterjan, deri ve elektrokaplama gibi endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır. Sitrik asit, verimi yüksek olduğu ve yan ürünlerin minimal olduğu, *A. niger* ve *A. wentii*'nin fermantasyonu ile üretilir. Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) *A. niger*'i sitrik asit kaynağı olarak listelemiştir (Schuster et al., 2002).

Sitrik aside ek olarak, *A. niger* zengin bir enzim kaynağıdır. Pektinaz, proteaz ve amiloglukozidaz ilk üretilenlerdendir ve orijinal olarak yüzey kültürü ile elde edilir. Selülaz ve hemiselülaz gibi enzimler *Aspergillus* türleri kullanılarak karıştırmalı tanklarda üretilmiştir (Schuster et al., 2002).

Glukoamilaz olarak da anılan amiloglukozidaz,  $\alpha$ -1,4-D-glukozidik bağları hidrolizleyerek nişastanın indirgen olmayan ucundan glukoz birimlerinin ayrılmasını katalizleyen bir ekzoamilazdır. Glukoz ve alkol kullanan endüstri kolları *A. niger* tarafından üretilen amiloglukosidazın birincil kullanıcılarıdır (Schuster et al., 2002).

Pektin, ticari olarak önemli meyve ve sebzelerin birincil bileşeni olan bir heteropolisakkarittir. *A. niger* tarafından üretilen pektin esteraz, endo- ve ekzo-poligalakturonidaz ve pektin liyazları içeren birçok enzim, pektini parçalar. Bu enzimler, presleme öncesi meyve suyu viskozitesini düşürmede ve berraklaştırmayı geliştirme aşamalarında şarap ve meyve suyu üretiminde kullanılırlar (Grassin and Fauguenbergue, 1999).

*A. niger*'den elde edilen glukoz oksidaz ve katalaz, temel olarak tanısal enzim kitleri ile glukoz belirlemede, glukoz veya oksijenin gıda ve meşrubatlardan uzaklaştırılmasında ve glukozdan glukonik asit üretiminde kullanılır (Berka et al., 1992).

Amerika birleşik devletlerinde FDA, pek çok enzimin gıdalarda kullanımına izin vermiştir: Buna göre FDA 1960'ların başında, patojenik ve toksijenik olmayan türler ile iyi üretim koşullarının sağlanması durumunda, *A. niger*'den elde edilen  $\alpha$ -amilaz, selüloz, amiloglukozidaz, katalaz, glukoz oksidaz, lipaz ve pektinazın 'güvenilir olarak kabul edilir' (GRAS) olduğunu onaylayan bir rapor yayınlamıştır (Schuster et al., 2002).

Günümüzde, rekombinant *A. niger* türlerinden elde edilen birçok enzim ürünü piyasalardadır. Enzim Teknik Kurumu tarafından son zamanlarda hazırlanan bir listeye göre;  $\alpha$ -amilaz, arabinofuranozidaz, katalaz, kimoziin, glukozamilaz, glukoz oksidaz, pektin esteraz, fosfolipaz A2 ve ksilanaz enzimleri, rekombinant *A. niger* türleri tarafından üretilmektedir (Pariza and Johnson, 2001).

*A. niger* genellikle güvenilir organizma olarak kabul edilir. İnsanlar, *A. niger* sporlarına hiçbir hastalık ortaya çıkmadan gün boyunca maruz kalabilirler. Sadece birkaç durumda, *A. niger* insan vücudunda kolonize olur. Fakat bu hastaların tümü şiddetli hastalıklarla dolu bir geçmişe sahiptir veya immunobaskılayıcı bir tedavi görmektedirler. Nadir durumlarda, kişi yoğun spor dumanına maruz kaldığında, aşırı duyarlı reaksiyonlar oluşur (Schuster et al., 2002).

### **1.5.2 *Aspergillus niger* ATCC 9642**

*A. niger* ATCC 9642, esasen *A. niger* van Tieghem türü olan, American Type Culture Collection (ATCC) tarafından izole edilen ve satışı yapılan ticari bir markadır (<http://www.lgcpromochem-atcc.com>).

*A. niger* ATCC 9642'nin literatürde, fungus dayanıklılık testlerinde, plastiklerin yıkımında, sitrik asit üretiminde ve kimi enzimlerin üretiminde kullanımları bulunmaktadır (<http://www.lgcpromochem-atcc.com>).

*A. niger*'in iki türünün (ATCC 6275 ve 9642) sitrik asit üretimi kabiliyetleri araştırılmış ve melasın karbohidrat kaynağı olarak kullanıldığı ortamlarda sitrik asit elde edilmiştir (Mehyar et al., 2005). Yapılan başka bir çalışmada ise, *A. niger* ATCC 9642'nin yüzey kültürü ile farklı sukroz, glukoz, fruktoz, riboflavin, trikalsiyum fosfat ve metanol derişimlerinde sitrik asit üretimi koşulları çalışılmıştır. Bu çalışma sonunda, % 15 (w/v)'lik sukroz ve % 1'lik metanol ortamında büyük miktarda sitrik asit üretildiği bulunmuştur (106,5 g/L) (El-Holi and Al-Delaimy, 2003).

Inoue ve arkadaşlarının (1988) yaptığı bir çalışmada *A. niger* ATCC 9642'den iki farklı tip metilglioksal reduktaz enzimi saflaştırılmış ve kinetik parametreleri belirlenmiştir.

Yine *A. niger* ATCC 9642 kullanılarak pullulan 4-glukanohidrolaz ve gliokzalaz I enzimlerinin üretimi gerçekleştirilmiş ve kinetik parametreleri saptanmıştır (Sakano et al., 1972).

Aoki ve arkadaşları (1997), *A. niger* ATCC 9642'den izopullulanaz genini izole ederek, *Penicillium* ve *Arthrobacter* dekstranazları arasındaki amino asit dizilimlerindeki benzerlikleri ortaya koymuşlardır. Çalışmalarının devamında aynı geni *Aspergillus oryzae*'ye eksprese ederek rekombinant enzimin kinetik parametrelerini tespit etmişlerdir.

*A. niger* ATCC 9642 antifungal testlerde kullanılmıştır. Bengal'in 9 farklı adasından izole edilen 64 *Streptomyces* spp. türlerinden 17'sinde antifungal aktivite gözlenmiş ve bu antifungal aktivite tayininde *A. niger* ATCC 9642 suşları kullanılmıştır (Peela et al., 2005). Başka bir çalışmada, *Nocardia* spp. türlerinin antifungal aktiviteleri yine *A. niger* ATCC 9642'nin kullanımı ile belirlenmiştir (Yamamura et al., 2003). Avrahami ve Shai (2004) *A. niger* ATCC 9642'i içeren fungus türlerini kullanarak palmitoillenmiş pozitif yüklü peptidlerden oluşan lipoproteinlerin antifungal aktivitelerini test etmişlerdir.

*A. niger* ATCC 9642 ayrıca pentan yıkımında (Ionata et al., 2005), immobilize *Arthrobacter* sp. ile karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Düşük yoğunluklu polietilenin *A. niger* ATCC 9642 ve *Penicillium pinophilum* ATCC 11797 ile biyoyıkımı incelenmiştir (Sepúlveda et al., 2002). Kim ve Rhee (2003)

makalelerinde, *A. niger* ATCC 9642'nin sky-green'i (süksinik asit, adipik asit, bütandiol ve etilen glikol içeren bir poliestere) yıkıma uğrattığına değinmişlerdir.

*A. niger* ATCC 9642 ayrıca plastik materyallerin dayanıklılık testlerinde standart olarak kullanılmaktadır (Gu and Gu, 2005). Ayrıca uranyum biyosorpsiyonunda kullanımı çalışmaları da yapılmıştır (Hu et al., 1996).

## 1.6 Fungusların Biyolojik Arıtmada Kullanımı

Funguslar, çok çeşitli ekstraselüler proteinler, organik asitler ve diğer metabolitlerin üretimi yanında farklı çevresel koşullara kendilerini üstün bir şekilde adapte edebilme kabiliyetine sahiptir (Lilly and Barnet, 1951; Cochrane, 1958). Üretilen çeşitli metabolitlerin yanında fungusların; metal, inorganik veya organik içeriğe sahip atık suların biyoarıtımında (uzaklaştırma veya yıkım) kullanımı giderek artan bir ilgi çekmektedir (Coulibaly et al., 2003).

### 1.6.1 Evsel atıkların arıtılması

Evsel atıklar, fungal biyokütle tarafından uzaklaştırılabilecek karbon ve besin kaynaklarına sahiptir (Coulibaly et al., 2003). Thanh ve Simard (1973) fungal biyokütlelerin evsel atıklarda fosfat (% 84,1), amonyak (% 73,3), toplam azot (% 68,1) ve kimyasal oksijen isteğini (COD) (% 39,3) azaltma kapasitelerini göstermişlerdir. *A. niger* ile yapılan bir çalışmada fungal biyokütlenin COD'yi % 72 azalttığı, toplam proteinin ise % 65'ini uzaklaştırdığı bulunmuştur (Coulibaly, 2002). Azot ve karbon kaynaklarının kültür ortamına eklenmesi ve biyomas kalitesinin artırılması gibi optimizasyon çalışmaları ile arıtım kapasitesinde artışların olduğu gözlenmiştir. Fungal uygulamalar atık arıtımında iyi bir kapasite göstermelerine rağmen, pratikte kullanım için halen geliştirilme aşamasındadır. Bu durum, fungal türlerin bakteriler kadar iyi performans göstermemeleri ile açıklanabilir (Coulibaly et al., 2003).

### 1.6.2 Endüstriyel atıkların arıtılması

Zeytinyağı, nişasta, içki imalatı (melas), pamuk ağartma, kağıt hamuru ve kağıt işleme endüstrisi, her yıl birkaç milyar litre renkli, genellikle toksik ve zararlı atık sular üretmektedir. Bu atıklar, yüksek derişimlerde COD ( $10-120 \text{ g.L}^{-1}$ ), fenol ve türevlerini ( $0,5-8 \text{ g.L}^{-1}$ ) ve genellikle proteinler, siyanürler, klorlanmış lignin bileşikleri ve boya içerir. Büyük miktarlardaki lignin türevlerinin varlığı bu atıklardaki koyu kahverengi rengin olası sebebidir (Calvo et al., 1995). Bu tip atık sularda bulunan fenolik bileşikler bakterisidal etkiye sahiptir (Fang and Chan, 1997). Bu tip atıkların aerobik şartlar altında fungal arıtımı ile fenolik bileşiklerde azalma (% 51–100), iyi bir renksizleştirme (% 31–100) elde edilmiş ve biyokimyasal oksijen isteğinde (BOD) % 85,4'lere varan bir azalma ile proteaz, lakkaz, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve amilaz gibi enzimlerin üretimi gerçekleşmiştir (Coulibaly et al., 2003). Miranda ve arkadaşları (1996), *A. niger* ile melas atık sularında % 69'lara kadar bir renk giderimi elde etmişlerdir. Endüstriyel atıkların funguslar tarafından renksizleştirilmesinin mekanizması, biyosorpsiyon ve/veya biyobozunumu içerecek şekilde rapor edilmiştir (Soares and Duran, 1998).

Toksik olmayan diğer endüstriyel atık sulara ilişkin olarak (nişasta, pirinç ve midye işleme, sos üretimi gibi) üzerlerinde büyüyen fungusların, tek hücre proteinini, enzimleri, kitosanı ve amilolitik preparatları ürettiği ve iyi bir COD düşüşü sağladığı rapor edilmiştir (Coulibaly et al., 2003).

### 1.6.3 Boya atıklarının arıtılması

İlaç, boyama, baskı, fotoğraf, tekstil ve kozmetik endüstrisi atıkları boya içerir. Dünya çapında yıllık  $7 \times 10^7$  tondan fazla boya üretilmektedir ve bunun % 10'u endüstriyel atık olarak kayıp olmaktadır (Vaidya and Datye, 1982). Tekstil endüstrisi atıkları, organo-klorür bazlı pestisitler, ağır metaller, pigmentler ve boya gibi birçok kirletici bileşiklerin bir karışımını içerir (O'Neil et al., 1999). Boya gideriminde en fazla çalışılan beyaz çürükçül fungus *P. chrysosporium* ve *T.*

*versicolor*'dur. Günümüzde, diğer fungus türleri de endüstriyel atıklardan boya gideriminde bazı kapasitelerde kullanılmaktadır. Boyalar, funguslar tarafından biyosorpsiyon, biyoyıkım veya enzimatik yollar ile uzaklaştırılabilir (Coulibaly et al., 2003).

#### **1.6.4 Metal içeren atıkların arıtılması**

Metalurji endüstrisi, madencilik, yüzey temizleme, atık fırınları büyük miktarlarda metallerce kirletilmiş atık su üretirler. İnsanların en yukarıda olduğu yiyecek zinciri boyunca çözünmüş metallerin yaşayan dokulardaki birikiminden dolayı metaller birçok sağlık sorununa sebep olurlar. Ağır metallerin ekosisteme girmeden uzaklaştırılması gerekmektedir. Çok seyreltik metal içeren sular için geliştirilen fizikokimyasal arıtım (çöktürme, elektrokimyasal, pıhtılaştırma, koagülasyon, iyon değişim) oldukça pahalıdır (Coulibaly et al., 2003). Biyokütle kullanımı özellikle de fungusların kullanımı atık su arıtımında en iyi alternatif olarak düşünülmektedir (Gupta et al., 2000). Fungal biyokütle duvarı, karboksi, amino, fosfat grupları, lipit, melanin, sülfat ve hidroksit içeren makromoleküllerden (çitin, çitosan, glukon, lipit, fosfolipit) oluşmuştur. Bu fonksiyonel gruplar metal bağlama bölgeleridir. Funguslar, metalleri başlıca adsorpsiyon, kimyasal adsorplama (iyon değişim), kompleksleşme, koordinasyon, şelatlama, fiziksel adsorplama ve mikro çöktürme yolları ile uzaklaştırırlar (Coulibaly et al., 2003).



## 2. İMMOBİLİZE MİKROORGANİZMALARIN KULLANIMLARI İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kapoor ve Viraraghavan (1997), *A. niger* biyokütlesini polisülfon matrikse immobilize edilmiştir. Küresel şekil verilmiş olan bu immobilize matriksi bir kolona doldurarak, atık sulardan kadmiyum, bakır, kurşun ve nikel uzaklaştırma yetenekleri araştırılmış ve kürelerin her bir birim ağırlıkları başına kadmiyum, bakır, kurşun ve nikel adsorpsiyonları sırasıyla 3,60; 2,89; 10,05 ve 1,08 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorplanan metal iyonları 0,05 N nitrik asit kullanımı ile kolondan kolaylıkla elue edilebilmiştir.

Bir başka çalışmada, alginata immobilize edilmiş alg (*Chorella vulgaris*) hücrelerinin sulu çözeltilerdeki nikel iyonlarını uzaklaştırma kabiliyeti araştırılmıştır (Al-Rub et al., 2004). Çalışmalar sonunda immobilizasyonun nikel adsorpsiyonunu arttırdığı ve sorbentin tekrar kullanımının başarılı olduğu bulunmuştur. Bunun yanında pH'ın veya başlangıç nikel derişimindeki bir artışın nikel adsorbsiyonunu arttırdığı da gözlenmiştir.

Zeytin karasuyunu detoksifiye etmede ve kirletici organik yükünü azaltmada ekstremofil bir tür olan *Candida tropicalis* YMEC14 alginat kürelere immobilize edilerek kullanılmıştır (Ettayebi et al., 2003). Sonuçta zeytin karasuyu içinde 40 °C'de büyüyen *C. tropicalis*, 24 saatlik fermantasyon periyodu sonunda kimyasal oksijen isteği, monofenol ve polifenollerde sırası ile % 69,7; % 69,2 ve % 55,3'lük azalmaya neden olmuştur.

*Burkholderia sp.*'nin alginat jel kürelere immobilize edildiği bir çalışmada ise reaktör kullanılarak sulu çözeltilerdeki quinoline yıkımı gerçekleştirilmiştir (Jianlong et al., 2001). Çalışmada, quinoline yıkımı için immobilize hücrelerin tekrarlı kullanımı da araştırılmış ve 100 saatten daha fazla stabil olduğu bulunmuştur.

*Arthrobacter sp.* türlerinin, 2,4,6-trinitrotoluen (TNT)'yi aerobik koşular altında 4-amino-2,6-dinitrotoluen, 2-amino-4,6-dinitrotoluen ve 2,2-diamino-6-nitrotoluene dönüştürdüğü bulunmuştur. TNT 36 saat içinde, monoaminodinitrotoluenler ve diaminonitrotoluenlerin bir karışımına dönüşmüştür.

Aynı deneysel koşullar altında, baryum alginat içine immobilize edilmiş *Arthrobacter sp.* hücrelerinin TNT transformasyonunda daha etkili olduğu ve 24 saat içinde tamamlandığı bulunmuştur. Bunun yanında immobilize hücrelerin 8 döngü boyunca kullanılabilirdiği de gözlenmiştir (Tope et al., 1999).

Sepiolit üzerine immobilize edilmiş *A. niger* tarafından ön deriştirme yapılmış jeolojik örneklerden bakır, çinko, demir, nikel ve kadmiyumun alev atomik adsorpsiyon spektrometrisi (FAAS) ile saptanmasını geliştirmişlerdir. Ön deriştirme çalışmaları için kolon adsorpsiyon metodu kullanılmıştır. Sepiolit üzerine immobilize edilmiş *A. niger*'den Cu, Zn, Fe, Ni ve Cd'nin geri kazanımı sırası ile % 98,01 ± 0,06; %98,8 ± 0,5; % 98,0 ± 0,4; % 96,4 ± 0,8 ve % 94,8 ± 0,6 olarak bulunmuştur (Bağ et al, 1999).

Tek ve ikili metal çözeltilerinden Ni ve Cu uzaklaştırmada alginata tutuklanmış *Chlorella vulgaris*'in potansiyeli araştırılmış ve immobilize *C. vulgaris*'in Ni ve Cu gideriminde daha etkili olduğu bulunmuştur (Mehta and Gaur, 2001).

Poliüretan köpükler üzerine immobilize edilmiş *Aspergillus terreus* türleri kullanılarak, çelik dökümhanelerinden kaynaklanan metalurjik atıklardan krom, nikel ve demirin biyosorpsiyonu incelenmiştir. Endüstriyel seviyede demir, krom ve nikel uzaklaştırma uygulamalarında *A. terreus*'un iyi bir kaynak olduğu sonucuna varılmıştır (Dias et al., 2002).

Yeşil mikroalg olan *Chlorella sorokiniana* luffa sünger disklere immobilize edilmiş ve bunlar sulu çözeltilerden metal iyonlarını gidermede kullanılmıştır. Mikroalg-luffa sünger diskler 5 dakika içerisinde % 97'lik denge seviyesine ulaşarak çok hızlı bir şekilde Ni(II)'yi gidermiştir. Bu disklerin aynı zamanda dolgu yatak kolonları ile sulu çözeltilerden Ni(II) giderimi potansiyelleri test edilmiştir (Akhtar et al., 2003).

Polivinil alkol (PVA) içine immobilize edilmiş *Auricularia polytricha* miselleri kullanılarak bakır biyosorpsiyonu koşulları test edilmiştir. Optimum koşullarda PVA üzerine immobilize edilmiş biyokütle ile hazırlanmış kolonlarda, % 90'lık bir biyosorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir (Gali et al., 2003).

Couto ve arkadaşları (2004), lakkaz üretimi için beyaz çürükçül fungus *Trametes hirsuta*'nın alginat kürelere, poliüretan köpüklere, naylon sünger ve paslanmaz çelik köpüklere immobilizasyonunu araştırmış ve paslanmaz çelik köpüklerin 8 günlük kütlivasyon sonunda en yüksek lakkaz aktivitesi göstererek en iyi immobilizasyon materyali olduğu bulmuşlardır.

Süspanse ve poliüretan köpüklere immobilize edilmiş *Phanerochaete chrysosporium* kullanılarak 4-klorofenol yıkımı incelenmiş ve immobilize olanların 4-klorofenol yıkımında daha etkili olduğu bulunmuştur (Zouari et al., 2002). *Phanerochaete chrysosporium*'un aynı immobilizasyon materyalinde Red 533 boyası ve polimerik bir boya olan poli(R-478)'in biyoyıkımı çalışmaları yapılmış ve optimum koşullar altında her iki boya için % 80'lere varan bir renk giderimi elde edilmiştir (Mielgo et al., 2002, Yang and Yu, 1996).

Fungal biyokütle tarafından, altın soğurumunda immobilizasyon matriksi olarak, PVA ve alginat kullanımı karşılaştırılmıştır. PVA-immobilize edilmiş biyokütlenin, üstün mekanik kuvvet ve kimyasal kararlılığa sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak da, geniş pH (1-13) aralığında kararlı olduğu gözlenmiştir. Immobilize PVA kürelerin 33,5 saatte % 80'lik altın giderimi gösterirken, aynı derecede altın adsorpsiyonun alginat küreler ile başarabilmesi için 265 saat gerektiği bulunmuştur (Khoo ve Ting, 2001).

Tanımlanamamış basidiomiset sınıfı bir beyaz çürükçül fungus alginat kürelere immobilize edilmiş ve 1 gün içinde % 97'lik bir Orange II boya giderimi sergilemiştir (Zhang et al., 1999).

Serbest ve poliüretan köpüklere immobilize edilmiş *A. niger* B-77 miselleri kullanılarak, çözeltilerden bakır uzaklaştırma yetenekleri incelenmiştir. Sonuçta, immobilize hücrelerin serbestlere göre 3 kat daha fazla metal tutukladığı bulunmuştur (Tsekova and Ilieva, 2000).

*Pseudomonas putida* ATCC 17484'ün iki farklı sistemde fenol biyoyıkımında kullanımları incelenmiştir. Birinci sistemde süspanse hücreler karıştırılmalı tanklarda kullanılırken, ikinci sistemde alginat üzerine immobilize edilmiş hücreler akışkan yatak tanklarda kullanılmıştır. Her iki sistemde de % 90'dan fazla fenol yıkımı gözlenmiştir (González et al., 2001).

İmmobilize *Pseudomonas luteola* kullanılarak, azo boya içeren atık sularından boya giderimi çalışılmıştır. *P. luteola* hücreleri, kalsiyum alginat,  $\kappa$ -karragenan ve poliakrilamid içine immobilize edilmiş; sıcaklık, pH ve boya derişimi gibi operasyonel koşulları, mikrobiyal boya giderimi açısından incelenmiştir. Alginat,  $\kappa$ -karragenan ve poliakrilamide immobilize hücreler ile sırasıyla % 75, % 85 ve % 80 boya giderimi bulunmuştur (Chang et al., 2001).

Alginata immobilize edilmiş *Phanerochaete chrysosporium* hücrelerinin melas yıkama sularındaki rengi serbest hücrelere nazaran daha hızlı ve etkili bir şekilde giderebildiği gözlenmiştir (Fahy et al., 1997).

*Flavodon flavus*'un poliüretan köpüklere immobilizasyonu ile melas yıkama suyundan kahverengi rengin giderimi çalışmaları yapılmıştır. İmmobilize fungus melas yıkama suyundaki rengi 7. günde % 73 oranında azaltmıştır. İmmobilize fungusun en az üç döngüde etkili bir şekilde kullanılabilirdiği de gösterilmiştir (Raghukumar et al., 2004).

Yapılan bir çalışmada, *Mucor rouxii* polisülfon matrikse immobilize edilerek bir kolona doldurulmuş. Bu biyosorpsiyon kolonunda Pb, Cd, Ni ve Zn gibi metal iyonlarının uzaklaştırılmasına çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda, Pb, Cd, Ni ve Zn için kürelerin gram başına metal uzaklaştırma kapasiteleri sırasıyla 4,06; 3,76; 0,36 ve 1,36 mg/g olarak bulunmuştur (Yan and Viraraghavan, 2001).

Mayalar üzerinde yapılan bir çalışmada; *Saccharomyces cerevisiae* biyokütlesinin ağır metal biyosorpsiyonunu arttırmak için biyokütleler, 0,75 M NaOH içinde 70 °C'de 15 dakika ısıtılarak ve alginat içine immobilize edilmiş. Alginat jel, doğal maya, alginat jele immobilize edilmiş maya ve alginat jele immobilize edilmiş baz muamele edilmiş mayaların; Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> biyosorpsiyon özellikleri karşılaştırılmış. Sonuç olarak immobilize bazla muamele edilmiş mayaların yüksek ağır metal biyosorpsiyon kapasitesine sahip olduğu ve geniş pH aralığında yüksek metal uzaklaştırma etkisine sahip olduğu bulunmuştur (Lu and Wilkins, 1996).

Alginat,  $\kappa$ -karragenan ve poliakrilamid jel gibi farklı materyaller üzerine *A. niger* (ANT 90) hücrelerinin immobilizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, söz konusu immobilize hücreler arasında  $\kappa$ -karragenan ve poliakrilamid jel içine

immobilize edilen hücrelerin enzim aktiviteleri alginata immobilize edilenlere göre daha az bulunmuştur. Lipaz üretimi üzerine etkilerini test etmek için farklı derişimlerde alginat jelleri denenmiştir. En yüksek lipaz üretimi % 3'lük alginat ve 60 dakikalık olgunlaşma zamanı (curing time) ile elde edilmiştir. Zeytinyağı serbest ve immobilize hücrelerin lipaz üretimini arttırmıştır (Ellaiah et al. 2004).

Yaygın olarak kullanılan beyaz-çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium*; farklı sentetik boyaaların biyoyıkımında kullanılmış, metil violet, kongo kırmızısı, asit turuncu, asit kırmızı 114, vat magenta, metilen mavisi ve asit yeşiline olan boya giderme potansiyeli araştırılmıştır. Sonuçta, *P. chrysosporium*'un farklı sınıftaki boyaaların giderimi için uygun olduğu belirlenmiştir (Radha et al. 2005).

*Bjerkandera* BOS55, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes versicolor*'un amaranth, remazol siyah B, remazol turuncu, remazol brilliant, reaktif mavi ve tropaeolin O üzerine boya giderme yetenekleri araştırılmış ve büyük oranda boya giderdikleri saptanmıştır (Swamy and Ramsay, 1999).

*Pleurotus ostreatus* üzerine yapılan bir çalışmada, *P. ostreatus*'un farklı tipteki (trifenil metan, heterosiklik, azo ve polimerik) boyaaları peroksidaz aktivitesi ile dekolorize edebildiği gösterilmiştir. En iyi boya giderimi bromfenol mavisi (% 98) ile elde edilirken heterosiklik boyaaları, metilen mavisi ve toluidin mavisi O'yu ancak % 10 oranında giderebilmiştir (Shin and Kim, 1998).

Mikroorganizmaların boya gideriminde kullanımı ile ilgili bir başka denemede, Sirianuntapiboon ve arkadaşları, 205 maya izolatının arasından *Citeromyces sp.* WR-43-6'nın en yüksek boya giderme verimine sahip olduğunu bulmuşlar. Bu mikroorganizma türü, alkol fabrika atıklarında renk yoğunluğu, kimyasal oksijen isteği (COD) ve biyokimyasal oksijen isteğinde (BOD) sırasıyla % 75, % 100 ve % 76'lık bir azalma göstermiştir (Sirianuntapiboon et al. 2004).

Bu çalışmada, *A. niger* ATCC 9642'nin alginat üzerine immobilizasyonu koşullarının optimizasyonu ve immobilize fungusun çevre örneklerindeki kirliliklerin giderilmesinde kullanımının araştırılması amaçlanmıştır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Malzemeler**

Deneylerde, Heraeus (Funktion Line) etüv, Shimadzu (AX 200) 0,0001 duyarlılıkta terazi, Hanna (HI 190M) magnetik karıştırıcı, Hanna (pH 211) pH metre, Memmert (WB14) çalkalamalı su banyosu, Shimadzu UV-1601 spektrofotometre, Ika (MS2) vorteks, Hettich (Universal 32R) santrifüj, Hirayama (HA 240 MIV) otoklav, Brand (Transferpette) otomatik pipetler ve Thoma lamı kullanıldı.

Glukoz,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , KCl,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , NaCl,  $I_2$ ,  $NaNO_3$  ve Fenol Carlo Erba (Rodano İtalya)'dan; Malt Ekstrakt Agar, Skim Milk ve Bakteriyolojik Pepton Lab M (Lancashire İngiltere)'den; Tween 80,  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ , Sülfürik asit, Agar, Çözünür nişasta, Myo-inositol,  $CoCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , Biotin, Tris-HCl ve Bradford reaktifi Merck (Darmstadt Almanya)'den;  $CaCl_2$ , Safra tuzu, Alginik asit sodyum tuzu medium viscosity ve BSA (Sığır serum albumin) Sigma (Steinheim Almanya)'dan,  $H_2O_2$ , HCl, KI ve NaOH Riedel-de Haën (Seelze Almanya)'den; Fosfat Tamponu salin (PBS) Oxoid (Hampshire İngiltere)'den temin edildi.

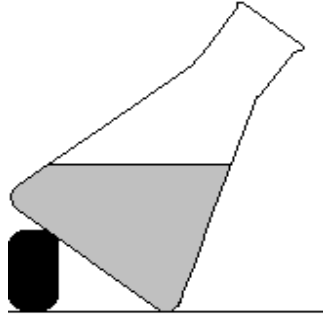
#### **3.2 İmmobilizasyon İşleminde Kullanılacak Sporların Hazırlanması**

##### **3.2.1 Mikroorganizmanın seçimi**

Endüstriyel uygulamalarının çok olması, çevre kirliliklerine kullanımının fazla olması, üremesinin hızlı ve çalışılmasının kolay olması, numaralı bir suş olarak standart bir mikroorganizma olmasından dolayı, deneylerde *A. niger* ATCC 9642 suşu kullanıldı. Bu suş Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden temin edilmiştir.

### 3.2.2 Sporulasyon ortamının hazırlanması

250 mL'lik bir erlene 100 mL % 5'lik Malt Ekstrakt Agar alınarak, 10 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. Mikrodalga fırında homojen bir görünüm alana kadar ısıtıldıktan sonra, 115 °C'de 10 dakika otoklavlandı. Otoklavlanan erlen yatık bir şekilde sabitlenerek agarın katılaşması beklendi (Şekil 3.1).



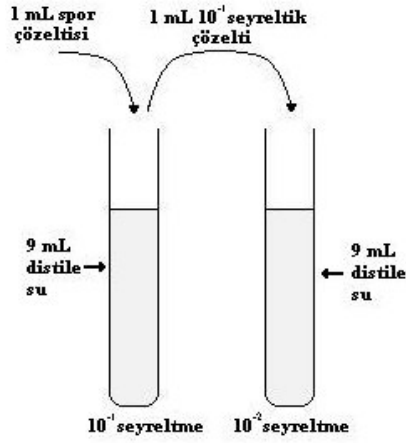
Şekil 3.1 Besi ortamı bulunduran erlenin yatık olarak sabitlenmesi.

Hazırlanan sporulasyon ortamına stok *A. niger* ATCC 9642 suşu üç nokta halinde ekildi ve 27 °C'lik etüvde 7 gün sporlanmaya bırakıldı.

### 3.2.3 Sporların eldesi ve spor sayımı

Oluşan sporlar, sporulasyon ortamından steril 10 mL % 0,1'lik Tween 80 çözeltisi ile alındı. Tween 80 çözeltisi 10 dakika sürekli karıştırılarak sporların çözeltiye geçişi sağlandı.

Elde edilen sporlar sayım için 10 ve 100 kez seyreltildi. Seyreltme işlemi kapaklı tüplere alınan 9 mL steril distile su üzerine 1 mL spor çözeltisi eklenerek yapıldı. Elde edilen % 10'luk çözeltiden 1 mL alınıp 9 mL steril distile su ile karıştırılarak % 1'lik seyreltme elde edildi (Şekil 3.2). Her bir seyreltmede Thoma lamı ile spor sayımı yapıldı.



Şekil 3.2 Spor çözeltilerinin seyreltilmesi.

Thoma lamı her bir 16 büyük kare içinde 25 küçük kare içeren lam sistemidir. Bu lam üzerinde bulunan 16 büyük karedeki spor sayıları sayılıp, aşağıda verilen denklemde yerine konarak toplam spor sayısı bulundu. Thoma lamında 2 adet 16'lık büyük kare olduğu için sayılan sporların ortalaması alındı.

$$\text{Toplam spor sayısı} = A \times SF \times 10^4$$

Burada:

A = 16 karedeki spor sayısı

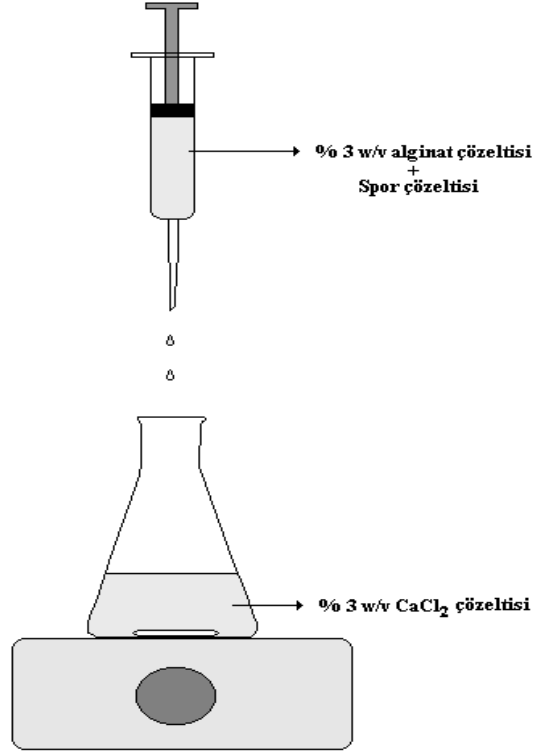
SF = Seyreltme faktörü

$10^4 = 0,1 \text{ mm}^3$ 'deki sayımı 1 mL'ye çeviren katsayı

### 3.3 İmmobilizasyon İşlemi

Spor çözeltilerinden 1 mL alınarak sterilize edilmiş 6 mL uygun derişimdeki alginat çözeltisi ile karıştırılıp, vortekslendi. Elde edilen alginat-spor çözeltisi steril alginat derişimine eşit derişimdeki CaCl<sub>2</sub> çözeltisine 10 cm mesafeden bir enjektör (8 mm çaplı) yardımı ile damlatılarak kürelerin oluşumu sağlandı (Şekil 3.3). Her immobilizasyon işleminde 200 adet küre oluşturuldu. Daha sonra steril distile su ile yıkanan immobilize sporlar büyüme ortamına alındı.





Şekil 3.3 Alginat kürenin oluşturulmasının şematik olarak gösterimi.

### 3.4 Mikrobiyal Büyümenin İzlenmesi

Büyüme ortamı için aşağıda derişimleri verilmiş olan kimyasallar kullanıldı (Hayashida and Teramoto, 1986).

NaNO <sub>3</sub>	3 g/L
KCl	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,01 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g/L
Pepton	10 g/L
Glukoz	20 g/L

250 mL'lik erlenlere alınan 50 mL besi ortamları, 115 °C'de 10 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. İmmobilize sporlar bu ortama aktarıldı.

Alginat kürelere immobilize edilmiş olan *A. niger* ATCC 9642 sporları büyüme ortamlarına inokule edildi ve besi ortamları 28 °C'de 150 rpm hızda çalkalama hareketi yapan su banyosuna koyuldu. Sıfırncı günden itibaren her gün erlenlerdeki küreler süzülerek alındı ve distile su ile yıkandı. Yıkanan küreler darası alınmış filtre kağıtlarına alınarak 50 °C'de bir gün boyunca kurutuldu. İmmobilize *A. niger* ATCC 9642'nin net kuru ağırlığı hesaplanarak 6 gün boyunca mikrobiyal büyüme izlendi.

### **3.5 Mikrobiyal Büyümenin Optimizasyonu**

#### **3.5.1 Kürelerin olgunlaşma sürelerinin optimizasyonu**

Oluşturulan immobilize küreler CaCl<sub>2</sub> çözeltisi içinde 4 °C'de 30, 60 ve 120 dakika bırakılarak olgunlaşması sağlandı. Belirtilen süreler sonunda küreler büyüme ortamlarına alınarak mikrobiyal büyüme izlendi. Aynı deneme, olgunlaşmaya bırakılmayan (0 olgunlaşma süresi) kürelerin direkt büyüme ortamına alınması ile tekrarlandı. Maksimum büyümenin gözlemlendiği olgunlaşma süresi optimum olgunlaşma süresi olarak kabul edildi.

#### **3.5.2 Alginat derişiminin optimizasyonu**

Farklı derişimlerde hazırlanmış alginat çözeltileri (% 2, % 3, % 4) ile yapılan immobilizasyonlar sonunda elde edilen kürelerin besi ortamı içinde büyümeleri takip edilerek optimum alginat derişimi belirlendi. Bunun için % 2, % 3 ve % 4'lük (w/v) alginat çözeltileri hazırlanarak *A. niger* ATCC 9642 sporları ile immobilize edilerek sırası ile % 2, % 3 ve % 4'lük (w/v) CaCl<sub>2</sub> çözeltisine damlatıldı. Elde edilen immobilize funguslar, büyüme ortamına alınarak her bir derişim için mikrobiyal büyümeler izlendi ve maksimum büyümenin gözlemlendiği alginat derişimi tespit edildi.

### **3.5.3 Besi ortamındaki glukoz derişiminin optimizasyonu**

Besi ortamındaki glukozun miktarı % 1, % 2, % 3 ve % 4 olarak şekilde değiştirildi ve immobilize fungusların bu ortamlardaki büyümeleri ölçüldü. Elde edilen verilerden maksimum büyümenin olduğu glukoz derişimi bundan sonraki denemelerde kullanıldı.

### **3.5.4 Spor çözeltisi/alginate çözeltisi oranının optimizasyonu**

Optimum spor çözeltisi/alginate çözeltisi oranının tespiti için 1 mL spor çözeltisi ile 8, 6 ve 4 mL alginate çözeltileri karıştırılarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirildi (Çoğu literatürde 1/6 oranı kullanılırken, diğer oranlarda denendi). Immobilize *A. niger* ATCC 9642'ler büyüme ortamlarına alınarak maksimum büyümenin gözleendiği en uygun spor/alginate çözeltisi oranı tespit edildi.

### **3.5.5 Besi ortamı pH'ının optimizasyonu**

Bölüm 3.4'de bileşimi verilen besi ortamının oda sıcaklığındaki pH'ı 6,75 olarak ölçülmüştür. Bu ortama 0,1 N HCl veya 0,1 N NaOH ilave edilerek sırası ile pH'ı 6,00 ve 7, 50 olan besi ortamları hazırlanmıştır.

pH'ı 6,00; 6,75 ve 7,50 olarak ayarlanan besi ortamlarına alınan immobilize fungusların mikrobiyal büyümeleri izlenerek maksimum büyümenin olduğu pH, optimum pH olarak kabul edildi.

### **3.6 *A. niger* ATCC 9642'nin Salgıladığı Enzimlerin Tespiti**

İmmobilize mikroorganizmaların en önemli kullanım alanlarından birisi enzim üretimi, diğeri de üretilen enzimler aracılığı ile atık arıtımıdır. Bu nedenle immobilize hücrelerin hangi enzimleri ürettiğinin tespit edilmesi önemlidir. Pek çok

enzim tespit edilebilir ancak bu çalışmanın yapıldığı laboratuvar koşullarında test edilebilecek ve atık suların organik bileşenlerinin yıkılmasında yararlanılabilecek dört enzimatik aktivite test edilmiştir.

### 3.6.1 Kalitatif lipaz aktivitesi tayini

*A. niger* ATCC 9642'de lipolitik aktivite Tween 80 agar yöntemi ile belirlendi (Haba et al. 2000). Bu işlem için % 0,01'lik CaCl<sub>2</sub> içeren 250 mL % 5'lik malt ekstrakt agar hazırlandı ve 115 °C'de 10 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. 45 °C'ye kadar soğutulan agara son derişimi % 1 olacak şekilde steril Tween 80 eklendi. Agar petri kaplarına döküldü ve sertleştikten sonra *A. niger* üç nokta ve tek nokta şeklinde ekildi. 5 gün sonunda fungus kolonileri etrafındaki opak zon cetvel ile ölçüldü. Lipolitik aktivite, opak zon çapları fungus koloni çapına oranlanarak belirlendi. Oran 2'den büyük ise iyi, 2 ile 1 arası ise orta, 1'den küçük ise zayıf olarak sınıflandırıldı (Ionita et al. 1997).

### 3.6.2 Kalitatif amilolitik aktivite tayini

*A. niger* ATCC 9642'nin amilolitik aktivitesi amilaz besi yerinde belirlendi. Bunun için % 2 agar, % 0,5 safra tuzu, % 1 çözümlü nişasta içeren ortam 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. 40–50 °C'ye kadar soğuyan ortama son derişimi % 0,67 olacak şekilde steril yeast nitrojen baz (1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl<sub>2</sub>, 2 mg Myo-inositol, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2 mg CoCl<sub>2</sub>, 2 mg ZnCl<sub>2</sub>, 2 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2 mg Biotin 1000 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı) ilave edildi. Ortam petrilere dökülerek kuruması sağlandı. *A. niger* kültürleri bu petrilere inokule edilerek 27 °C'de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında petrilere iyodür çözeltisi (% 0,3 I<sub>2</sub> + % 0,6 KI) püskürtülerek fungus kolonileri etrafında oluşan açık zon çapı ölçüldü. Amilolitik aktivite, açık zon çapı koloni çapına oranlanarak belirlendi (Hyun et al. 1985).

### 3.6.3 Kalitatif proteolitik aktivite tayini

Proteolitik aktivite % 10 skim milk içeren malt ekstrakt agar yöntemi ile belirlendi (Pereira et al. 2001). Bu işlem için, malt ekstrakt ve yağsız süt tozu (skim milk) ayrı olarak 115 °C'de 10 dakika otoklavlandı. Ortamlar 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, skim milk çözeltisi son derişimi % 10 olacak şekilde malt ekstrakt agar ortamına eklendi ve petrilere dökülerek kuruması sağlandı. *A. niger* kültürleri petrilere ekilerek 27 °C'de 3 gün inkübe edildi. Koloniler etrafında oluşan şeffaf zon proteolitik aktivite olarak belirlenirken, bu aktivitenin derecesi şeffaf zon çapı koloni çapına oranlanarak belirlendi.

### 3.6.4 Katalaz aktivitesi tayini

Katalaz aktivitesinin tayininde spektrofotometrik bir yöntem kullanıldı (Aebi, 1974). Bu yöntemde, katalaz enziminin substratı olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 240 nm'deki absorpsiyonundaki düşüşten yararlanılarak aktivite tayini yapıldı. Bunun için, kör olarak Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) kullanılırken, standart çözelti için 10,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi, enzimli örnek için ise 1 mL enzim çözeltisi (besi ortamının sıvı kısmından alınan 1 mL örnek) içeren 10,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler 35 °C'de 10 dakika bekletildi ve 240 nm'de absorpsansları köre karşı ölçüldü. Enzim çözeltisindeki absorpsans değişimi standardın absorpsansından enzim çözeltisinin absorpsansının çıkarılması ile bulundu. Veriler,  $\Delta A = \epsilon \cdot c \cdot d$  formülünde yerine konularak aktivite hesaplandı ( $\epsilon = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **3.7 İmmobilize *A. niger* ATCC 9642'nin Boya Giderimi ve Zeytin Karasuyunun Renginin Gideriminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

#### **3.7.1 İmmobilize *A. niger* ATCC 9642'nin boya giderme kapasitesinin incelenmesi**

*A. niger* ATCC 9642'nin boya giderme kapasitesi alınan tekstil boyaları ve tekstil fabrikası atıkları kullanılarak analizlendi. Tekstil boyaları olan Everdirect Supra (ES) Blue 4BL ve ES Red BWS Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümü'nden temin edilirken; tekstil fabrikası atıkları, Aydın Umurlu sanayii sitesinde bulunan Mutçalı tekstil fabrikasından 06.05.2006 tarihinde alındı. Deneysel aşamaya geçmeden önce, tekstil boyalarının çözeltileri hazırlandı ve bu boyaların UV-Görünür bölge spektrumları alınarak maksimum absorbans verdikleri dalga boyları belirlendi. *A. niger* ATCC 9642'nin tekstil boyalarını giderme kapasitesinin incelenmesinde, farklı derişimlerde tekstil boyaları (25 mg/L, 50 mg/L ve 75 mg/L) içeren besi ortamları hazırlanarak bu besi ortamlarına immobilize *A. niger* ATCC 9642 sporları ekildi. Tekstil atıklarının boya gideriminin ölçümünde ise, besi ortamı distile su yerine gerçek tekstil fabrikası atığı ile hazırlandı ve immobilize *A. niger* ATCC 9642 bu ortama inokule edildi. Boya giderimi, tekstil boyaları için, belirlenen dalga boyunda (ES Blue 4BL için 518 nm, ES Red 506 nm) ölçülen absorbans düşüşü ile tespit edilirken; tekstil atıkları belirli bir dalga boyunda maksimum adsorbsiyon göstermedikleri için spektrumları alındı. Günlere göre alınan spektrumlardaki absorbans düşüşü izlenerek boya giderimi incelendi. Bunun için 24 saatte bir steril koşullar altında besi ortamlarından 1,5 mL sıvı örnek alındı ve çözeltide asılı katı partiküllerin çökmesi için 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın absorbansının 7 gün boyunca ölçülmesi ile *A. niger* ATCC 9642'nin boya giderme kapasitesi incelendi.

### **3.7.2. İmmobilize *A. niger* ATCC 9642'nin zeytin karasuyununun rengini giderme kapasitesinin incelenmesi**

#### **a) Zeytin karasuyunun spektroskopik özelliklerinin incelenmesi**

Zeytin karasuyu Aydın merkeze bağlı bir köy olan Kızılcaköy'de bulunan Mehmet İnce Kontine sistem zeytinyağı fabrikasından 15.04.2006 tarihinde temin edildi. Alınan zeytin karasuyu örneklerinde ilk olarak seyreltmeler yapılarak maksimum absorbans verilen dalga boyu belirlendi. Bunun için bir tülbentten süzülen zeytin karasuyu örnekleri 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım alınarak, saf su ile 20 kat 50 kat ve 100 kat seyreltildi ve spektrumları alınarak maksimum absorbansın gözlemlendiği dalga boyu tespit edildi.

#### **b) Zeytin karasuyunda toplam protein tayini**

Zeytin karasuyunda toplam protein tayini Bradford (1976) yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde, 50 µL örnek çözeltisi üzerine 2,5 mL Bradford reaktifi eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Oluşan mavi renkli çözeltinin 595 nm'deki absorbansı ölçülerek protein tayini yapıldı. Kör olarak 50 µL saf su kullanıldı. Protein tayininde standart protein olarak BSA (sığır serum albumin) kullanıldı. Bunun için 10 mg/mL derişiminde hazırlanan BSA stok çözeltisinden yola çıkarak seyreltmeler yapılarak 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 ve 1,4 mg/mL'lik standart protein çözeltileri hazırlandı.

Zeytin karasuyunda protein tayini için ise örnekler, 2 kat, 5 kat, 10 kat ve 20 kat seyreltilerek protein tayini prosedürü uygulandı.

#### **c) Zeytin karasuyunda toplam karbohidrat tayini**

Zeytin karasuyunda toplam karbohidrat tayini fenol-sülfürik asit metodu ile belirlendi (Dubois et al. 1956). Bu prosedüre göre, 1 mL % 5'lik fenol çözeltisi ile 1 mL karbohidrat çözeltisi karıştırıldı ve üzerine 5 mL derişik sülfürik asit çözeltisi eklendi. Karıştırılan örnekler 20 dakika bekletildi ve 470 nm'de köre karşı absorbans okundu. Kör olarak karbohidrat çözeltisi yerine saf su kullanıldı. Standart çözelti olarak 10'ar birimlik aralıklarla 10–100 µg/mL'lik glukoz çözeltileri hazırlandı. Aynı işlemler bu çözeltiler için de tekrarlanarak glukoz standartları oluşturuldu. Zeytin

karasuyunda ise, 20 kat, 50 kat ve 100 kat seyreltmeler yapılarak fenol-sülfürik asit metodu ile karbohidrat tayini yapıldı.

#### **d) Zeytin karasuyu üzerinde immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin kullanımı**

Zeytin karasularının 5 kat, 10 kat ve 25 kat seyreltilerek kullanıldığı denemede, her seyrelme oranı için besi ortamı içeren ve içermeyen ortamlara *A. niger* ATCC 9642 ekimi gerçekleştirilerek, zeytin karasuyunu renksizleştirme özellikleri incelendi. Bunun için, belirlenen dalga boyunda, 24 saat aralıklar ile 7 gün boyunca, her bir denemeden örnekler alınarak zeytin karasuyunun maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu olan 278 nm'de verdikleri absorpsiyon ölçüldü. Sonuçlar 4.3.2'de tartışıldı.

### **3.8 SEM Fotoğraflarının Çekimi**

Küreler üzerinde *A. niger* ATCC 9642 büyümesinin gözlenebilmesi için alınan 3 farklı örneğin SEM (taramalı elektron mikroskop) fotoğrafları çekildi. İlk örnek 0. günde alınan alginat küreler, ikinci örnek besi ortamında üzerinde *A. niger* ATCC 9642 büyümesi olan 5. gün sonunda alınan küreler, üçüncü örnek ise serbest *A. niger* ATCC 9642'dir. 0. gün örneği olan boş küre steril  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içinde, 5. gün örneği ve serbest *A. niger* ATCC 9642 ise steril distile su içinde ependorf tüplere alınarak ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan örnekler SEM fotoğraflarının çekilmesi için İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne gönderildi.

SEM fotoğraflarının çekiminde Leo evo 40 marka SEM cihazı kullanıldı. Hızlandırma potansiyeli 20 kV olarak ayarlandı. 500-5000 arası büyütme gerçekleştirildi. Tungsten filament kullanıldı. Çalışma aralığı 19-15 mm olarak seçildi.



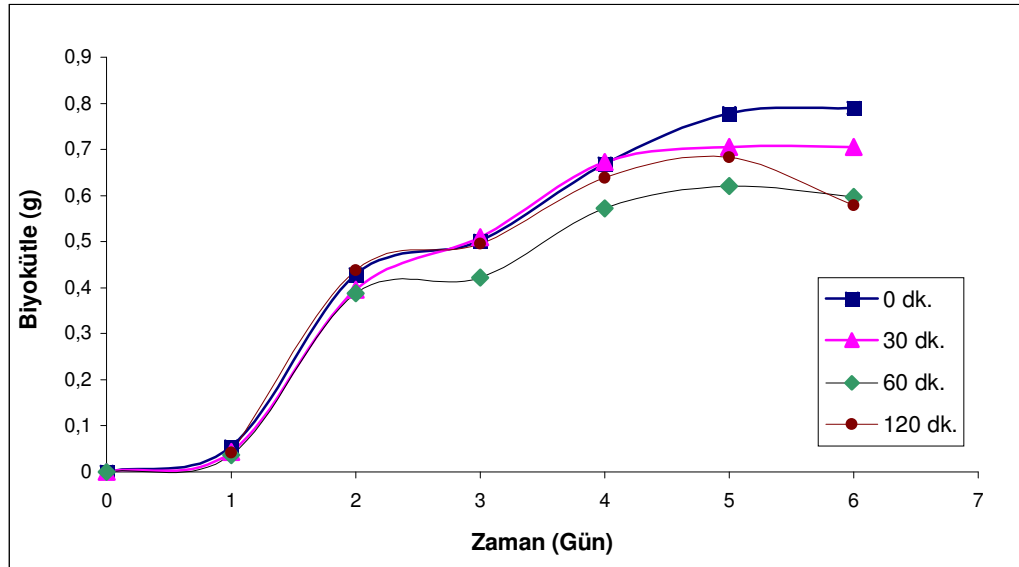
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1 Mikrobiyal Büyümenin Optimizasyonu Sonuçları:

Alginat üzerine *A. niger* ATCC 9642'nin immobilizasyon koşullarının optimizasyonu için olgunlaşma süresi, uygun alginat derişimi, uygun glukoz derişimi, uygun spor çözeltisi/alginat çözeltisi oranı ve uygun pH tespitleri yapıldı.

#### 4.1.1 Olgunlaşma süresi

*A. niger* ATCC 9642 içeren kürelerin olgunlaşma süresinin optimizasyonu için  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içinde  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 0, 30, 60 ve 120 dakika olgunlaşmaya bırakılan kürelerin besi ortamına alındıktan sonra elde edilen büyüme eğrileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



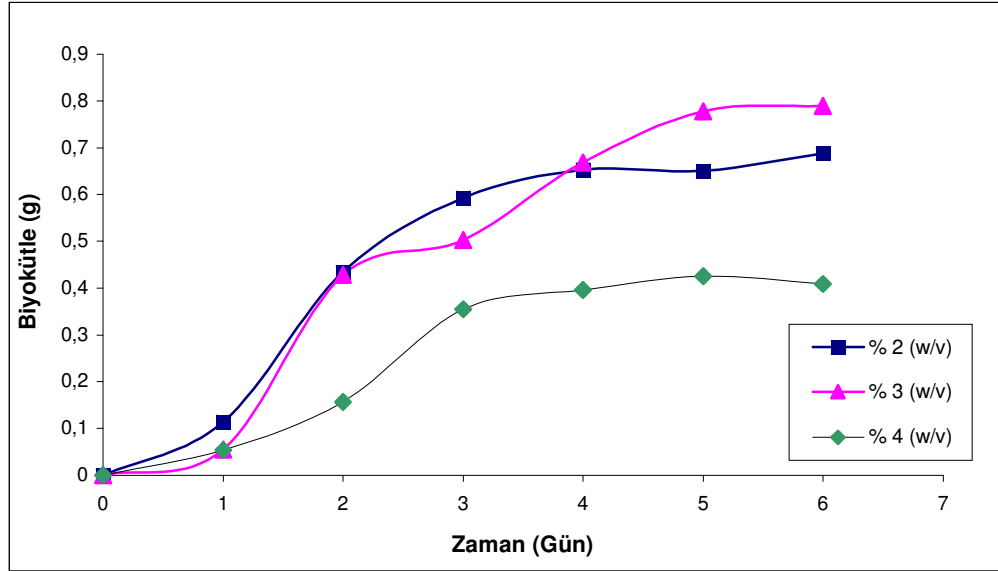
Şekil 4.1 Alginat üzerine immobilize olmuş *A. niger* ATCC 9642'nin biyokütlesinin olgunlaşma süresine bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.1'den görüldüğü gibi biyokütlerdeki maksimum artış 0 dakika olgunlaşma süresinin uygulanması halinde elde edilmiştir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda 0 dakika olgunlaşma süresi kullanılmıştır. Olgunlaşma süresinin optimizasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada 0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 saat  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içinde bekletilen alginat üzerine immobilize *Burkholderia* sp. hücrelerinin biyoaktivitesi üzerinde olgunlaşma süresinin önemli bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür (Jianlog et al., 2001). Alginat üzerine immobilize *A. niger* kullanıldığı iki farklı çalışmada, immobilize küreler olgunlaşmaya bırakılmadan doğrudan besi ortamına alınmıştır (Pashova et al., 1999). Ayrıca, immobilize kürelerin  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içinde 0,5 ve 1,0 saat olgunlaşmaya bırakıldığı çalışmalar vardır (Quan et al., 2003). % 2'lik alginata immobilize edilmiş olan *Pseudomonas luteola*'nın boya gideriminde kullanıldığı bir çalışmada oluşturulan immobilize küreler 12 saat  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içinde olgunlaşmaya bırakılmıştır (Chang et al., 2001). Bu sonuçlar göstermektedir ki olgunlaşma süresi 0-12 saat arasında değişmekte ve her immobilizasyon işlemi için farklı olabilmektedir.

Mikroorganizmaların üreme grafiklerinde lag faz, logaritmik faz ve daha sonra ürün inhibisyonu nedeniyle durağan faz oluşur. *A. niger* ATCC 9642'nin 6. günden sonra durağan faza girdiği görülmektedir. 120 dakika olgunlaşma süresinin uygulandığı deneylerde ise üretimde düşme gözlenmektedir. Olgunlaşma süresinin uzunluğu kürelerin rijiditesini arttırmaktadır. Daha rijit küreler içindeki hücrelerin ürettiği toksik maddelerin difüzyonu daha yavaş olacağı için biyokütlerde azalma olabilir.

#### 4.1.2 Alginat derişimi

% 2, % 3 ve % 4 (w/v)'lük alginat çözeltileri kullanılarak yapılan immobilizasyon sonunda elde edilen küreler üzerindeki *A. niger* ATCC 9642'nin büyüme eğrileri Şekil 4.2'de verilmiştir.



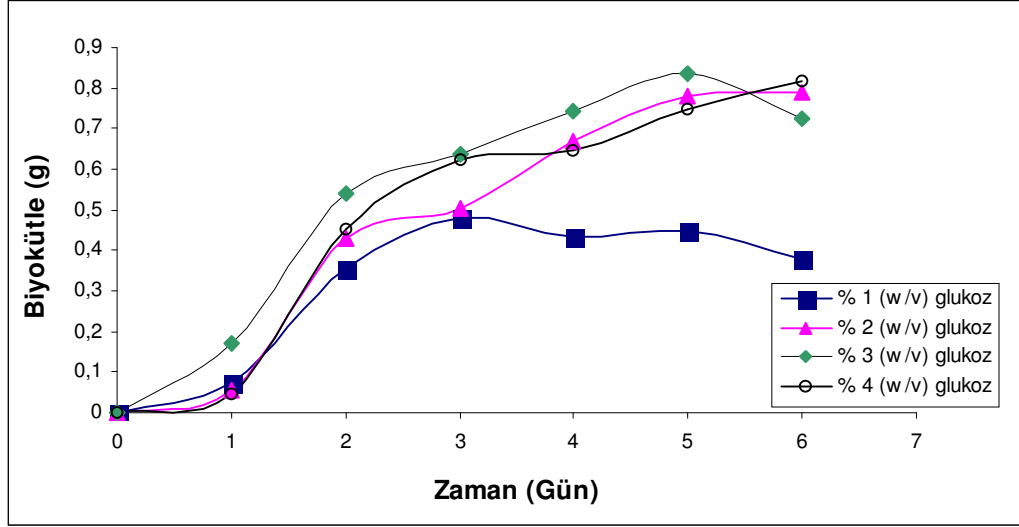
Şekil 4.2 Alginat derişiminin immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin büyümesine etkisi.

% 2'lik alginat derişimi içeren kürelerle yapılan üretimde 3. günde daha fazla verim alınmasına rağmen 6. gün sonunda % 3'lük alginat kürelerdeki verimin daha fazla olması nedeniyle daha sonraki çalışmalarda % 3'lük alginat çözeltisi kullanılmıştır. % 2'lik alginat derişiminin kullanıldığı kürelerde muhtemelen daha gevşek yapıdan dolayı başlangıçtaki substrat akışı daha hızlı olmakta ve üretim artmakta ancak sıkışma nedeniyle daha sonra üreme azalmaktadır.

Lipaz üretimi yapılan ve *A. niger*'in alginat üzerine immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, alginat derişiminin optimizasyonu için % 2, % 3 ve % 4 (w/v)'lük alginat çözeltileri kullanılmış ve en iyi üretim veriminin % 3'lük alginat çözeltisi ile alındığı rapor edilmiştir (Ellaiah et al. 2004). İmmobilizasyon materyali olarak % 2, % 2,5, % 3 ve % 4 (w/v)'lük alginat çözeltilerinin kullanıldığı çalışmalar vardır (Al-Rub et al., 2004; Fahy et al., 1997; Mehta and Gaur, 2001; Quan et al., 2003). Alginat derişiminin artırılması daha dayanıklı kürelerin oluşmasına neden olmakla birlikte kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak alginat derişiminin etkisi farklı olmaktadır. Bu durum difüzyonel direniş ile açıklanabilir.

### 4.1.3 Besi ortamındaki glukoz derişimi

Besi ortamındaki glukoz derişiminin mikrobiyal büyümeye olan etkisi Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Besi ortamındaki glukoz derişiminin immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin büyümesine etkisi.

Bu deneyin amacı optimum substrat derişimini tespit etmektir. Glukoz, besiy ortamına funguslar için birincil karbon kaynağı olması nedeniyle eklenmiştir. Şekil 4.3'den görüldüğü gibi genel olarak en yüksek biyokütleyle % 3 glukoz derişimi ile ulaşıldığından daha sonraki deneylerde besiy ortamının glukoz derişimi % 3 olacak şekilde ayarlanmıştır.

% 3'lük glukoz derişimi ile gerçekleştirilen deneyde, 6. günden sonra biyokütledeki meydana gelen azalma, 1. günden itibaren mikroorganizmaların çok hızlı büyümesi nedeniyle, mikroorganizmaların ölüm fazına daha erken girmesinden kaynaklanabilir.

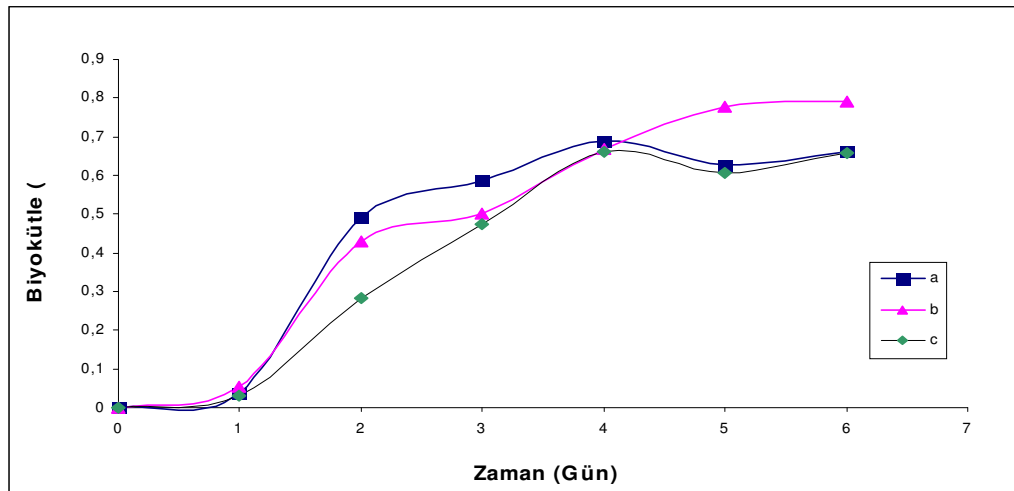
İmmobilize *A. niger* kullanılarak sitrik asit üretiminin yapıldığı bir çalışmada, glukoz derişiminin optimizasyonunda % 5, % 10 ve %15 (w/v) glukoz derişimleri kullanılmıştır. Yapılan optimizasyon deneyleri sonunda % 5'den % 10'a çıkan glukoz derişimi ile biyokütlede bir artış olurken, % 15'lik glukoz derişiminde %

5'likten daha az bir büyüme gözlenmiştir (Papagianni and Matthey, 2004). Polimetilgalakturonaz ve lipazın biyosentezinde immobilize *A. niger* kullanıldığı iki farklı çalışmada, besi ortamı glukoz derişimi % 1,0 (w/v) olarak seçilmiştir (Pashova et al., 1999). Glukoz, sukroz ve laktoz içeren üç farklı besi ortamında okzalik asit üretimi için immobilize *A. niger*'in kullanıldığı bir araştırmada, glukoz besi ortamında büyüme daha fazla, okzalik asit üretimi ise en düşük olarak bulunmuştur (Mandal and Banerjee, 2005).

#### 4.1.4 Spor çözeltili/alginat çözeltili oranı

Bu çalışmada kullanılan yöntemde spor çözeltili ile alginat çözeltili karıştırıldıktan sonra hidrojel oluşturma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum çözeltili içine damlatılan ve karıştırılan bu karışımın viskozitesi önemlidir. Yüksek viskozitenin hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Kong et al., 2003). Bu nedenle spor çözeltili/alginat çözeltili oranının optimize edilmesi gereklidir.

Spor çözeltili ( $6 \times 10^7$  spor.mL<sup>-1</sup>) / alginat çözeltili (% 3 w/v) oranı; 1/8, 1/6 ve 1/4 (mL/mL) olacak şekilde değiştirilerek hazırlanan kürelerde gözlenen büyüme eğrileri Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4 Spor çözeltili/alginat çözeltili oranlarının immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin büyümesine etkisi. a: Spor çözeltili/alginat çözeltili = 1/8; b: Spor çözeltili/alginat çözeltili = 1/6; c: Spor çözeltili/alginat çözeltili = 1/4

Grafikte gözlenen bu durum, alginat derişiminin optimizasyonundaki gibi açıklanabilir. 1/4, 1/6 ve 1/8 oranlarında seyreltilen çözeltilerden 1/8'lik olan en derişiktir ve immobilize fungusun besi ortamından yeterli nütrient alamadığı için biyokütledeki artış sınırlanmaktadır. 1/4'lük oran ise en seyreltiktir ve fungusun jel matriksinden besi ortamına olası kaçışından dolayı alginat jeli üzerinde büyüme daha az olabilir.

Şekil 4.4'den yararlanarak en uygun spor çözeltisi/alginat çözeltisi oranının 1/6 olduğu karar verildi ve daha sonraki çalışmalarda bu oran kullanıldı.

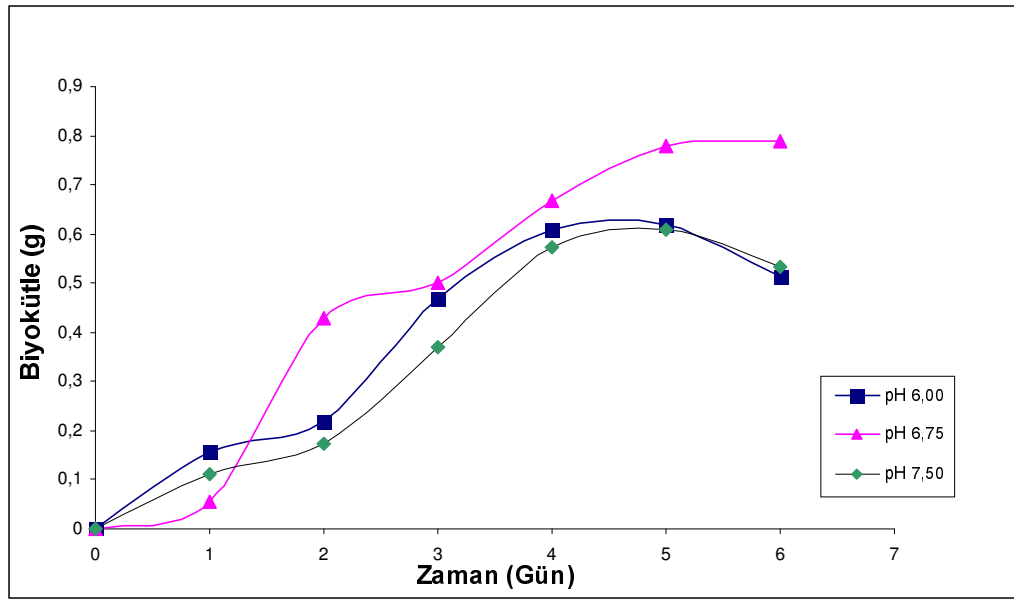
Lipaz enzimi üretiminde *A. niger* kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, spor çözeltisi ( $5 \times 10^6$  spor.mL<sup>-1</sup>)/alginat çözeltisi (%3 w/v) oranı 1/5 olarak kullanılmıştır (Ellaiah et al., 2004). Aynı oran Angelova ve arkadaşlarının antioksidan enzim sentezledikleri immobilize *A. niger* için de kullanılmıştır (Angelova et al., 2000). Nighojkar ve arkadaşları alginata immobilize *Rhodococcus equi* No.23 hücrelerini kullanarak kolesterol üretimi gerçekleştirmiş ve bu çalışmalarında spor/alginat çözeltisi oranını 1/6 olarak kullanılmışlardır (Chan and Chou, 2002).

#### 4.1.5 Besi ortamı pH'ı

Fermantasyon ortamının içeriği ve amacına göre besi ortamı pH'ı farklılıklar göstermektedir. Örneğin sitrik asit üretiminde kullanılan fermantasyon ortamının pH'ının 5,0 ve 6,0 olarak ayarlanarak kullanıldığı çalışmalar vardır (Papagianni and Matthey, 2004; Sankpal et al., 2001). Kesilmiş süt suyundan sitrik asit üretimini için yapılan bir çalışmada ise besi ortamı pH'ı 3,0'a ayarlanmıştır (El-Holi and Al-Delaimy, 2003). Beyaz çürükçül fungus kullanılarak Orange II boyası gidermede, *Citeromyces* sp. WR-43-6 kullanılarak molas atık suyu gidermede ve *Pseudomonas* sp. kullanılarak azo boya 4BS gidermede kullanılan besi ortamı pH'ları sırasıyla 5,0; 6,0 ve 7,0 olarak ayarlanmıştır (Zhang et al., 1999; Sirianuntapiboon et al., 2004; Fang et al., 2004). Poliüretan köpüklere immobilize *A. niger* kullanılarak okzalik asit üretiminde ise besi ortamı pH'ı 6,0'dır (Mandal et al., 2005). Örneklerden görüldüğü

üzere uygun besi ortamı pH'ı elde edilmek istenen ürünlere ve mikroorganizma türüne göre değişkenlik göstermektedir ve optimum pH'ın bulunabilmesi için optimizasyon işlemlerinin yapılması gerekmektedir.

Bölüm 3.5.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanan farklı (6,00; 6,75; 7,50) pH'daki besi ortamları kullanılarak elde edilen immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin büyüme eğrileri Şekil 4.5'de verilmiştir. Görüldüğü gibi pH'ı 6,75 olan besi ortamında en yüksek büyüme elde edilmiştir. Bu nedenle pH 6,00'dan aşağı ve pH 7,50'den yukarı olan pH'ların denenmesi gereksiz görülmüştür.



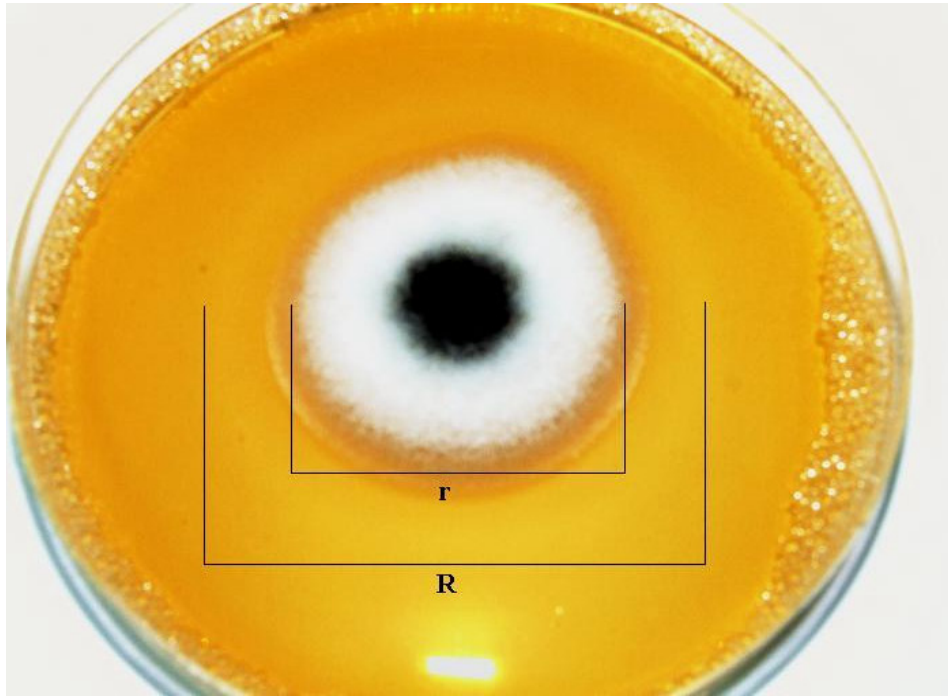
Şekil 4.5 pH'ı farklı besi ortamlarında immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin büyüme eğrileri.

Fungusların, nötral pH'larda maksimum büyüme gösterdikleri bilinmektedir. Ayrıca, alginat kürelerin en dayanıklı formunun nötral pH'da olduğu tespit edilmiştir (Gombotz and Wee, 1998). Nötral pH'dan asidik bölgeye kaydıkça alginatın moleküler ağırlığında bir azalma ve hızlı bir bozunma gözlenmiştir. Bu nedenle pH6,75'de en uygun üzereme gözleendiğinden dolayı çalışmalarda bu pH kullanılmıştır.

## 4.2 *A. niger* ATCC 9642'nin Salgıladığı Enzimler

### 4.2.1 Kalitatif lipaz aktivitesi

Lipolitik aktivite için hazırlanan 4 petriye yapılan ekimler sonunda, oluşan opak zon çapları (R) ve koloni çapları (r) cetvel ile ölçüldü. [R/r oranı 2'den büyük ise iyi, 2 ile 1 arası ise orta, 1'den küçük ise zayıf olarak sınıflandırılır (Ionita et al. 1997)]. Şekil 4.6'da oluşan koloni ve opak zon görölmektedir.



Şekil 4.6 Kalitatif lipaz aktivitesi testi uygulanan *A. niger* ATCC 9642 kolonisi ve etrafında 5 gün sonunda oluşan opak zonun fotoğrafı.

Her bir petride lülen R ve r değerleri ile hesaplanan R/r ve ortalama değerler izelge 4.1'de gösterilmiştir.



Çizelge 4.1 Lipaz aktivitesi testinde elde edilen opak zon (R), koloni çapları (r) ve R/r değerleri.

Petri No	R (mm)	r (mm)	R/r	Sonuç
1	48	40	1,20	Orta
2	47	38	1,24	Orta
3	52	39	1,33	Orta
4	49	37	1,32	Orta
<b>Ortalama <math>\pm</math> SD</b>	49,0 $\pm$ 2,2	38,5 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 0,06	Orta

Sonuçlardan görüldüğü gibi, *A. niger* ATCC 9642'nin orta düzeyde lipolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.2.2 Kalitatif amilolitik aktivite

Şekil 4.7'de amilaz ile hazırlanmış besi yerine ekilmiş olan *A. niger* ATCC 9642'nin 3 gün sonunda oluşan kolonisi görülmektedir. Koloni etrafına açık zon görülmediğinden *A. niger* ATCC 9642'nin amilolitik aktivitesi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Kalitatif amilolitik aktivite tayininde ayrıca, substrat olarak nişastanın kullanıldığı, nişasta agar (starch agar) yöntemi de kullanılmaktadır (Vedder, 1915).



Şekil 4.7 Kalitatif amilaz aktivitesi testi uygulanan *A. niger* ATCC 9642'nin 3 gün sonundaki kolonisinin fotoğrafı.

### 4.2.3 Kalitatif proteolitik aktivite

Skim milk içeren malt ekstrakt agara ekilmiş olan *A. niger* ATCC 9642 kolonileri Şekil 4.8'de görülmektedir. Koloni etrafında şeffaf zon gözlenmediği için proteolitik aktivitenin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Proteolitik aktivitenin kalitatif tayininde bu yöntemin yanında, hızlı bir mikroanaliz tekniği de kullanılmaktadır. 5 dakika içinde sonuç alınan bu teknikte; substrat olarak jelatin kullanılmakta ve sonuçlar Coomassie Brilliant Blue boyası ile gözlenmektedir (Mohan et al., 2005).



Şekil 4.8 Kalitatif proteaz aktivitesi testi uygulanan *A. niger* ATCC 9642 kolonisinin fotoğrafı

#### 4.2.4 Katalaz aktivitesi

Katalaz aktivitesi Bölüm 3.6.4'de anlatıldığı şekilde (Aebi, 1974) spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart 10,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ile 10 dakika sonunda elde edilen 240 nm'deki absorbans 0.436 olarak bulunurken, enzim örneği (*A. niger* ATCC 9642 büyüme ortamından alınan 1 mL örnek) içeren aynı derişimdeki çözeltisi 240 nm'de 0,437 absorbans vermiştir. Bu sonuçtan çalışmalarda kullanılan *A. niger* ATCC 9642'nin katalaz aktivitesinin olmadığı anlaşılmıştır.

*A. niger* ATCC 9642 plastikleri yıkma özelliğine sahip olduğu için uçak ekipmanları, otomotiv bileşenleri, tıplar, elektrik izolasyon maddeleri, deri, polimer, vernik, yapıştırıcı ve vaksların fungus dayanıklılık testlerinde ve ağaç koruyucu testlerinde kullanılmaktadır (<http://www.lgcpromochem-atcc.com>). *A. niger* ATCC 9642 sitrik asit sentezi için de kullanılmaktadır (El-Holi and Al-Delaimy, 2003). *A.*

*niger* ATCC 9642 ayrıca, izopullulanaz (pullulan 4-glukanohidrolaz) ve laktoilglutasyon (glioksalaz I) enzimlerini üretme kabiliyetine de sahiptir (www.lgcpromochem-atcc.com; Kim and Rhee, 2003; Sakano et al.,1972; Inoue et al., 1987).

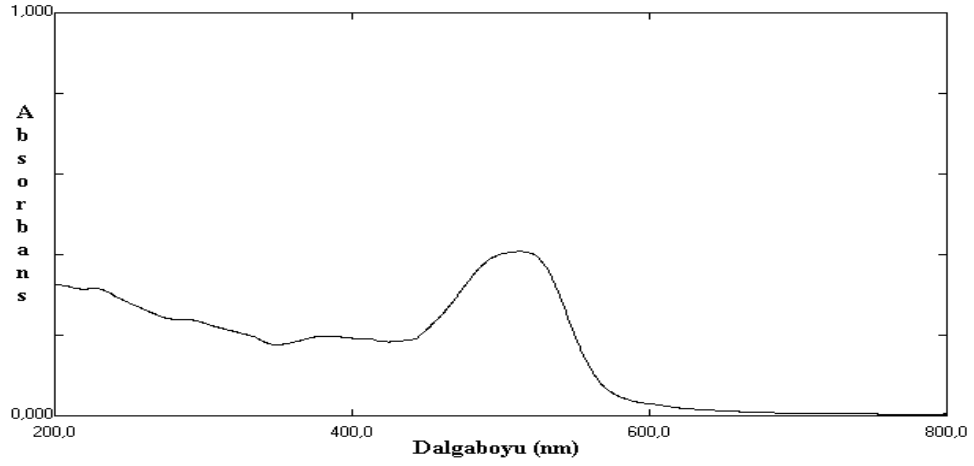
Lipaz, amilaz, proteaz ve katalaz, endüstride ve biyoteknolojide geniş kullanım alanı bulunan enzimlerdir. Bu enzimlerin *A. niger* ATCC 9642'de bulunmasının, bu fungusun biyoteknolojide ve çevre örneklerinde kullanılabilirliğini artırabileceği düşünülmüştür. Ancak enzim aktivite testleri sonunda *A. niger* ATCC 9642'nin yapılan testler arasında sadece orta düzeyde lipaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

### **4.3 Boya Giderme ve Zeytin Karasuyunun Renk Giderilmesinde İmmobilize *A. niger* ATCC 9642'nin Kullanılabilirliği**

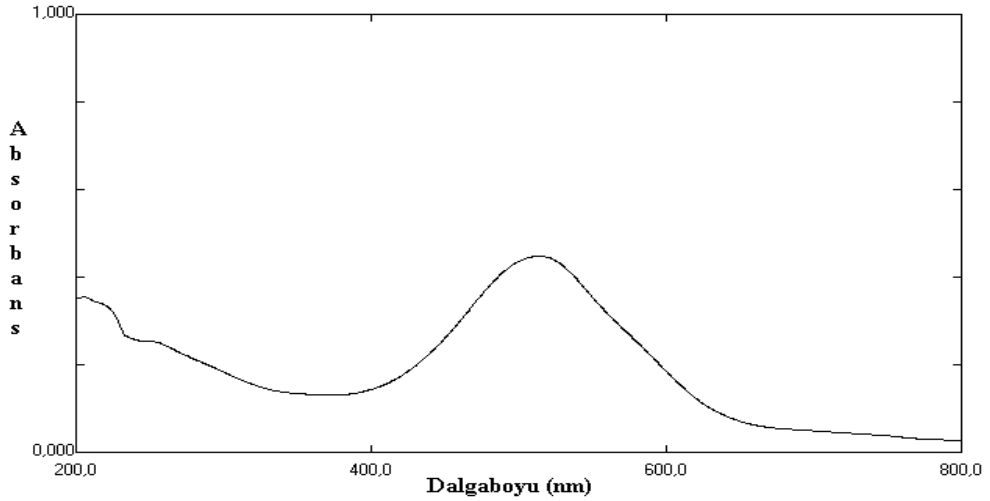
Tekstil boyalarının giderilmesinde birçok mikroorganizma ve boya giderme tekniği kullanılmaktadır. Boya gideriminde mikroorganizmalar serbest olarak kullanılabilirdiği gibi işlemin verimliliğini arttıran immobilize formda mikroorganizmaların kullanımı da yaygındır (Sirianuntapiboon et al., 2004; Mielgo et al., 2002). Bunların yanında baz muamelesi gibi kimyasal modifikasyonların yapıldığı ve ölü mikroorganizmaların kullanıldığı boya giderme çalışmaları da vardır (Lu and Wilkins, 1996). Boya gideriminde en yaygın kullanılan mikroorganizmalar, beyaz çürükçül funguslar olan *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trametes versicolor*'dur (Swamy and Ramsay, 1999). *A. niger*'in boya gideriminde kullanımı bu iki çürükçül fungus kadar yaygın değildir. Boya giderme denemelerinde kullanılan, ES Red BWS ve ES Blue 4BL boyalarının patentli boyalar olması ve ticari bir sır olarak saklandığından dolayı, bu boyaların kimyasal yapılarına ve kimyasal formüllerine ulaşamamıştır.

### 4.3.1 Boya giderme kapasitesi

ES Blue 4BL ve ES Red BWS boyaalarının UV-görünür bölge spektrumları Şekil 4.9 ve 4.10'da görülmektedir. ES Blue 4BL ve ES Red BWS'nin maksimum adsorpsiyon verdikleri dalga boyu sırasıyla 518 ve 506 nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.9 ES Blue 4BL boyasının UV-görünür bölge spektrumu.



Şekil 4.10 ES Red BWS boyasının UV-görünür bölge spektrumu.

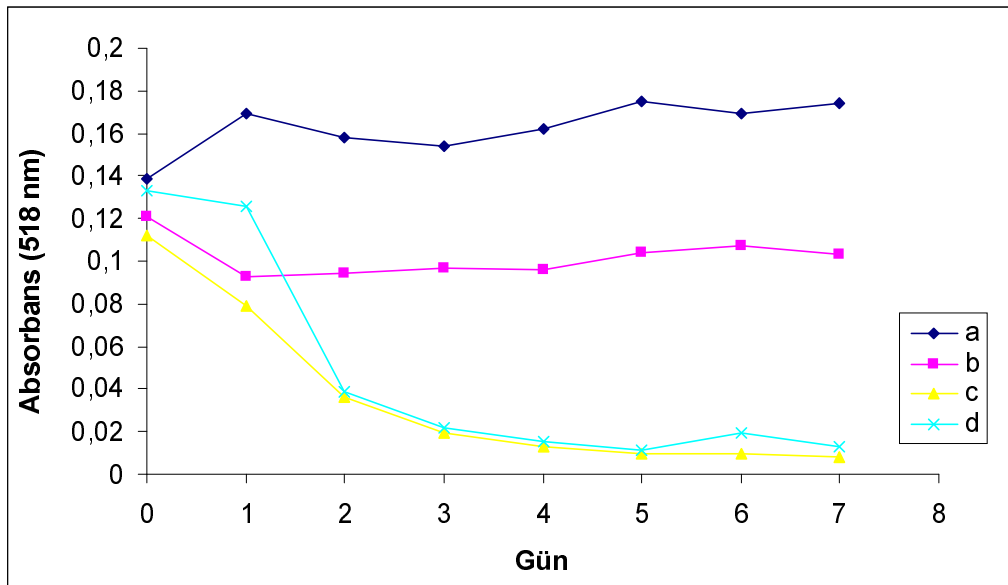
### a) ES Blue 4BL boyası sonuçları

Üç farklı derişimde (25 mg/L, 50 mg/L ve 75 mg/L) ES Blue 4BL içeren besi ortamı, 3 farklı derişimde ES Blue 4BL ve alginat küreleri içeren besi ortamı, 3 farklı derişimde ES Blue 4BL ve immobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren besi ortamı ve serbest mikroorganizma içeren besi ortamı 7 gün boyunca takip edilerek 0. günden başlamak üzere 24'er saat ara ile alınan örnekler 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra 518 nm'deki absorbanları ölçülerek boya derişimindeki azalma izlenmiştir. Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'de sırası ile 25 mg/L, 50 mg/L ve 75 mg/L ES Blue 4BL içeren fermantasyon ortamlarının absorban değışimleri gösterilmiştir.

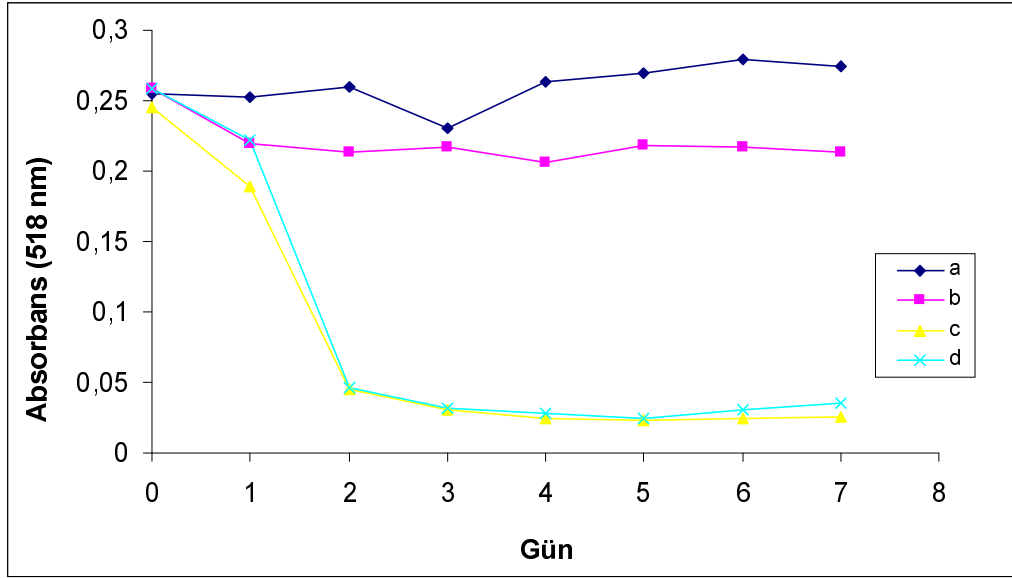
Şekiller 4.11 – 4.13'de görüleceği üzere serbest ve immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin ES Blue 4BL boyasını giderme kapasiteleri birbirine çok yakındır. İncelenen tüm örneklerin boya yüzdesi

$$\text{Boya giderme } \% \text{'si} = \frac{A_{\text{Baş}} - A_{\text{Son}}}{A_{\text{Baş}}} \times 100$$

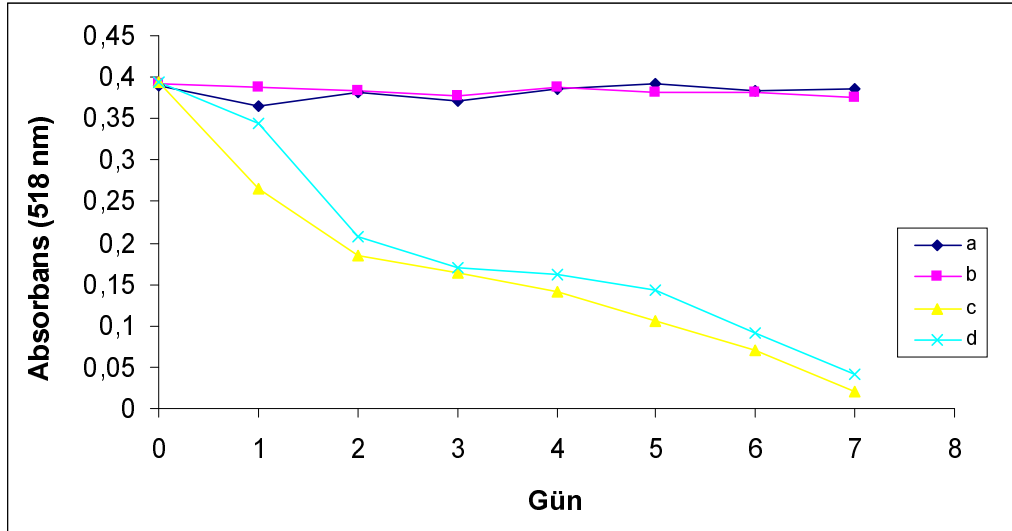
Formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu hesaplar ve sonunda elde edilen değerler Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.11 İmmobilize ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin ES Blue 4BL boyasını giderme kapasitesi. a: Sadece besi ortamı; b: Boş alginat küre; c: İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren alginat küre; d: Serbest *A. niger* ATCC 9642. Boya derişimi 25 mg/L.



Şekil 4.12 İmmobilize ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin ES Blue 4BL boyasını giderme kapasitesi. a: Sadece besi ortamı; b: Boş alginat küre; c: İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren alginat küre; d: Serbest *A. niger* ATCC 9642. Boya derişimi 50 mg/L.



Şekil 4.13 İmmobilize ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin ES Blue 4BL boyasını giderme kapasitesi. a: Sadece besi ortamı; b: Boş alginat küre; c: İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren alginat küre; d: Serbest *A. niger* ATCC 9642. Boya derişimi 75 mg/L.

*Çizelge 4.2 Besi ortamı, boş ve A. niger ATCC 9642 immobilize alginat küreler ve serbest A. niger ATCC 9642'nin ES Blue 4BL boyasını giderme kapasiteleri.*

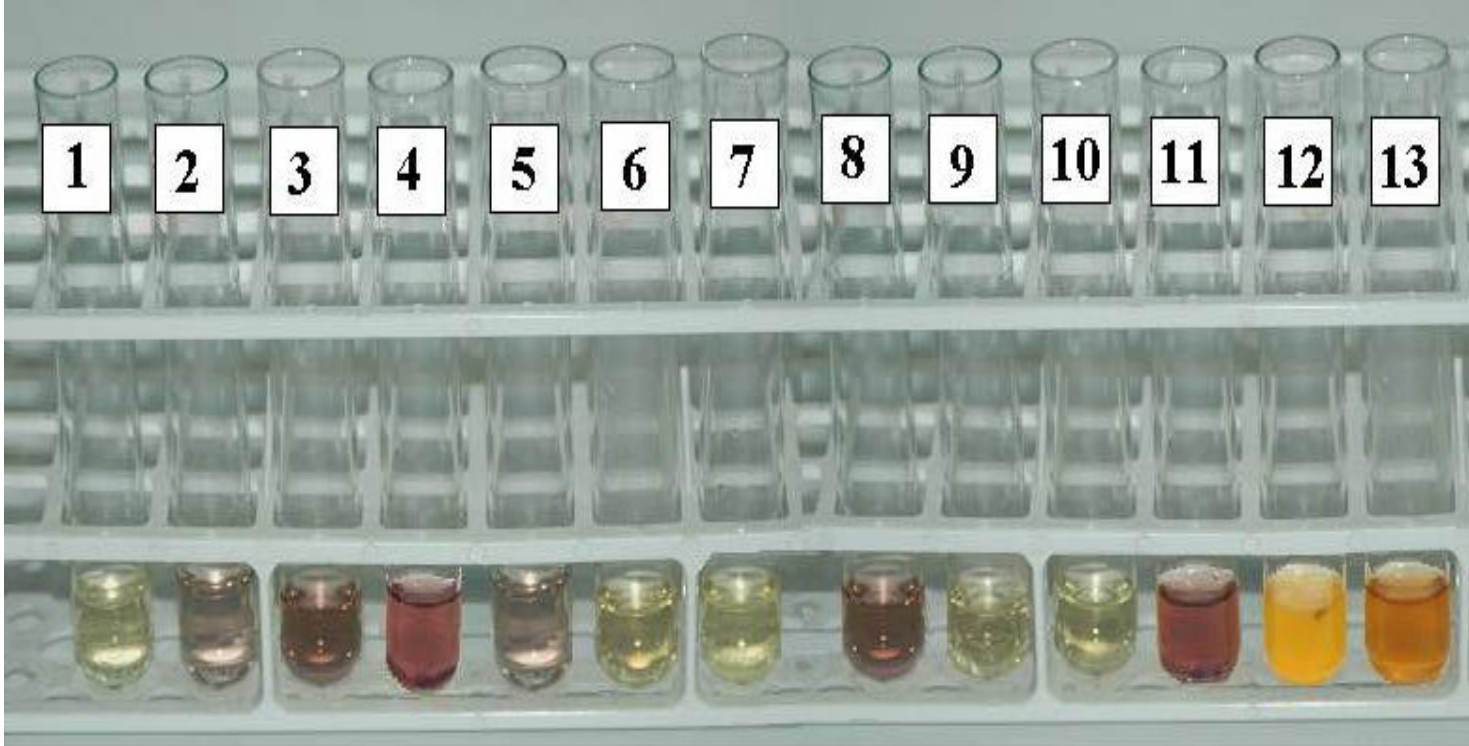
Örnek	ES Blue 4 BL boya derişimi						Boya giderme %		
	25 mg/L		50 mg/L		75 mg/L		25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L
	A <sub>baş</sub>	A <sub>son</sub>	A <sub>baş</sub>	A <sub>son</sub>	A <sub>baş</sub>	A <sub>son</sub>			
Boyalı besi ortamı	0,139	0,174	0,250	0,274	0,398	0,386	-25,2	-9,6	0,8
Boş küre	0,121	0,103	0,258	0,214	0,392	0,375	14,9	17,4	4,3
İmmobilize Küre	0,112	0,008	0,245	0,026	0,395	0,021	92,9	89,4	94,7
Serbest A. niger ATCC 9642	0,133	0,013	0,258	0,035	0,395	0,041	90,2	86,4	89,6

A<sub>baş</sub>: Başlangıç 518 nm Absorbansı

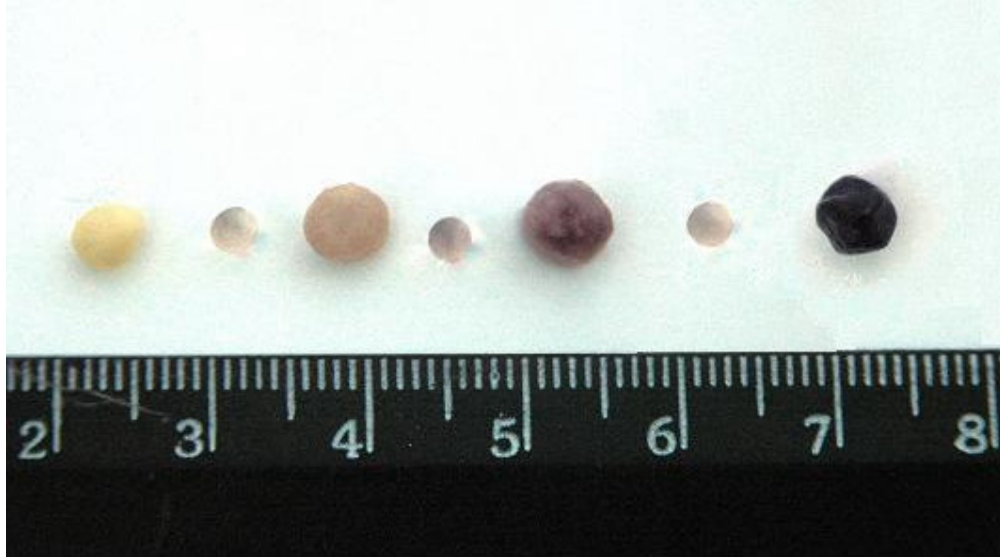
A<sub>son</sub>: 7 gün sonunda 518 nm Absorbansı

Adı geçen tüm örneklerin 7. gün sonunda santrifüj sonrası fotoğrafları Şekil 4.14'de verilmiştir. Ayrıca 7 günlük fermentasyon işlemi sonunda boyasız ve 3 farklı derişimde boya içeren ortamlardaki boş ve A. niger ATCC 9642 immobilize alginat kürelerin fotoğrafları da Şekil 4.15'de görülmektedir.





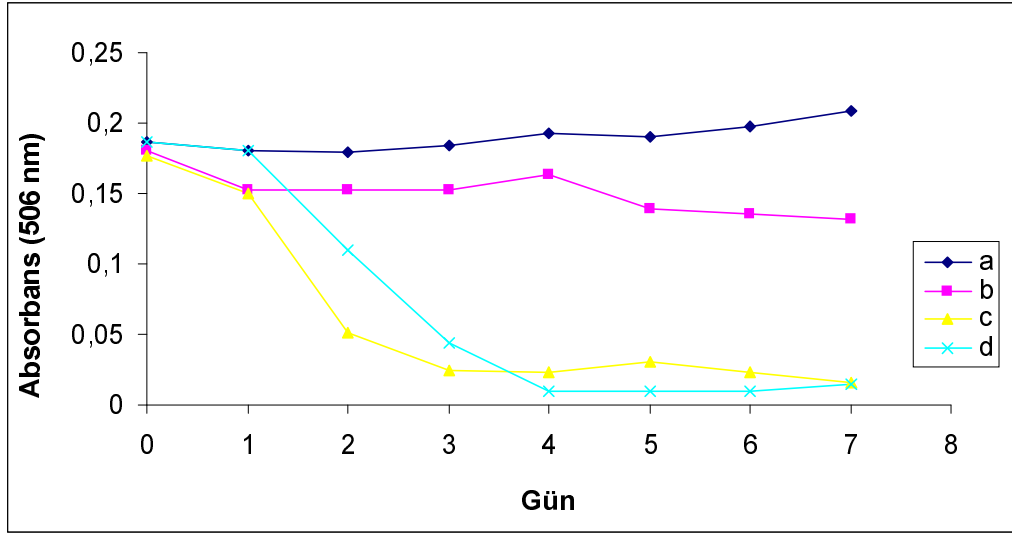
Şekil 4.14 Boya giderimi denemesi yapılan örneklerin 7 gün sonundaki besi ortamları. 1) Boyasız besi ortamı; 2) 25 mg/L ES Blue 4BL içeren besi ortamı; 3) 50 mg/L ES Blue 4BL içeren besi ortamı; 4) 75 mg/L ES Blue 4BL içeren besi ortamı; 5) boş alginat küreler içeren 25 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamı; 6) İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L ES blue 4BL'li besi ortamı; 7) Serbest *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L ES blue 4BL'li besi ortamı; 8) boş alginat küreler içeren 50 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamı; 9) İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren 50 mg/L ES blue 4BL'li besi ortamı; 10) Serbest *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L ES blue 4BL'li besi ortamı; 11) boş alginat küreler içeren 75 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamı; 12) İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren 75 mg/L ES blue 4BL'li besi ortamı; 13) Serbest *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L ES blue 4BL'li besi ortamı.



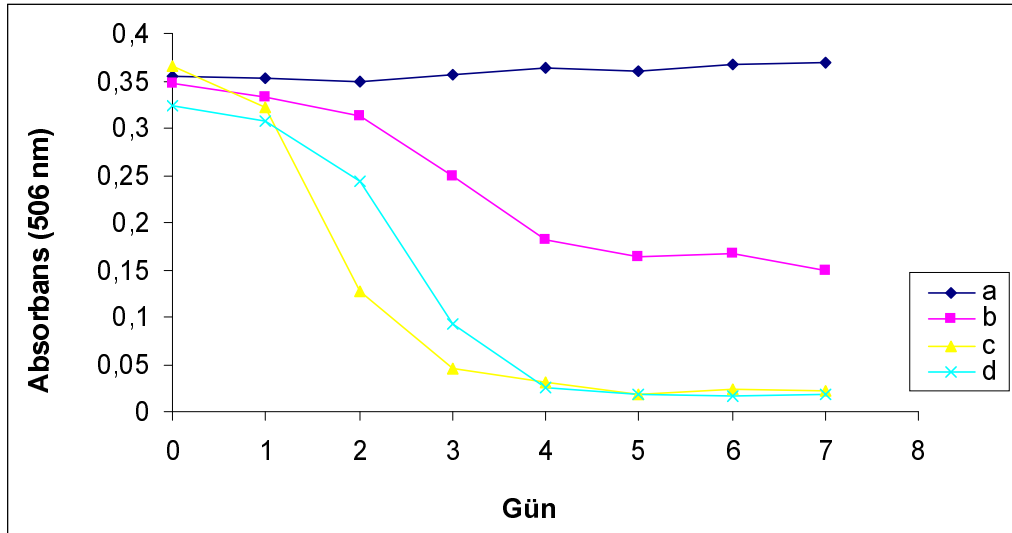
Şekil 4.15 Boyalı fermantasyon ortamından alınan kürelerin fotoğrafları. Sırasıyla 1) boyasız besi ortamındaki; 2) 25 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamındaki boş küre; 3) 25 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamındaki *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş küre; 4) 50 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamındaki boş küre; 5) 50 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamındaki *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş küre; 6) 75 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamındaki boş küre; 7) 75 mg/L ES Blue 4BL'li besi ortamındaki *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş küre.

### b) ES Red BWS boyası sonuçları

Bölüm 4.3. 1-a'da anlatıldığı yöntemle ES Red BWS giderme kapasitesi ölçülmüş ve Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de sırası ile 25 mg/L, 50 mg/L ve 75 mg/L ES Red BWS içeren fermantasyon ortamlarının absorbans değişimleri gösterilmiştir. Tüm örneklerin 7. sonunda santrifüj (10000 rpm, 5 dakika) sonrası görüntüleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Ayrıca 7 günlük fermantasyon işlemi sonunda boyasız ve 3 farklı derişimde boya içeren ortamlardaki boş ve *A. niger* ATCC 9642 immobilize alginat kürelerin fotoğrafları Şekil 4.20'de görülmektedir.

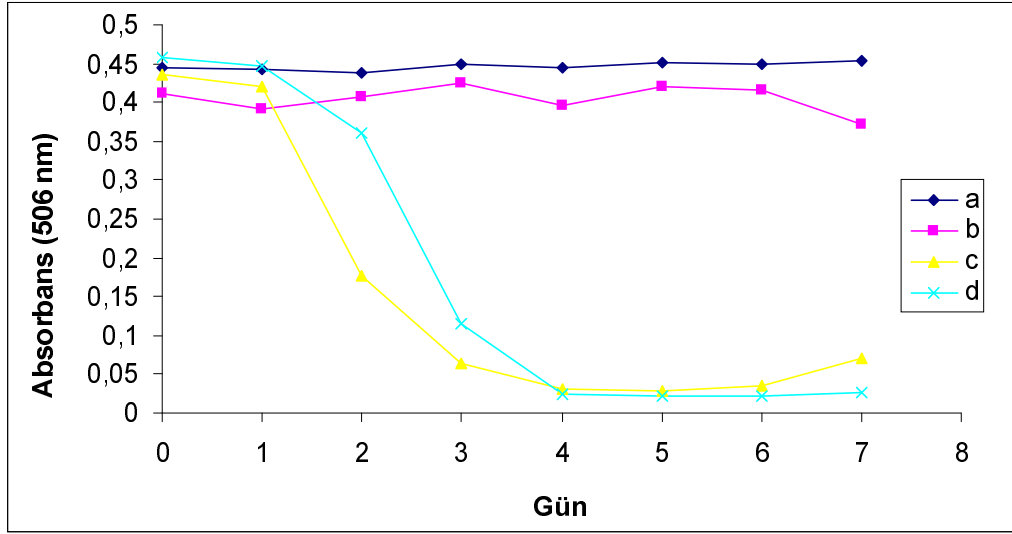


Şekil 4.16 İmmobilize ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin ES Red BWS boyasını giderme kapasitesi. a: Sadece besi ortamı; b: Boş alginat küre; c: İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren alginat küre; d: Serbest *A. niger* ATCC 9642. Boya derişimi 25 mg/L.



Şekil 4.17 İmmobilize ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin ES Red BWS boyasını giderme kapasitesi. a: Sadece besi ortamı; b: Boş alginat küre; c: İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren alginat küre; d: Serbest *A. niger* ATCC 9642. Boya derişimi 50 mg/L.

Şekil 4.16 – 4.18'de görüleceği üzere serbest ve immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin ES Red BWS boyasını giderme kapasiteleri de birbirine çok yakındır. Çizelge 4.3'de çalışılan örneklerin % boya giderme kapasiteleri verilmiştir.



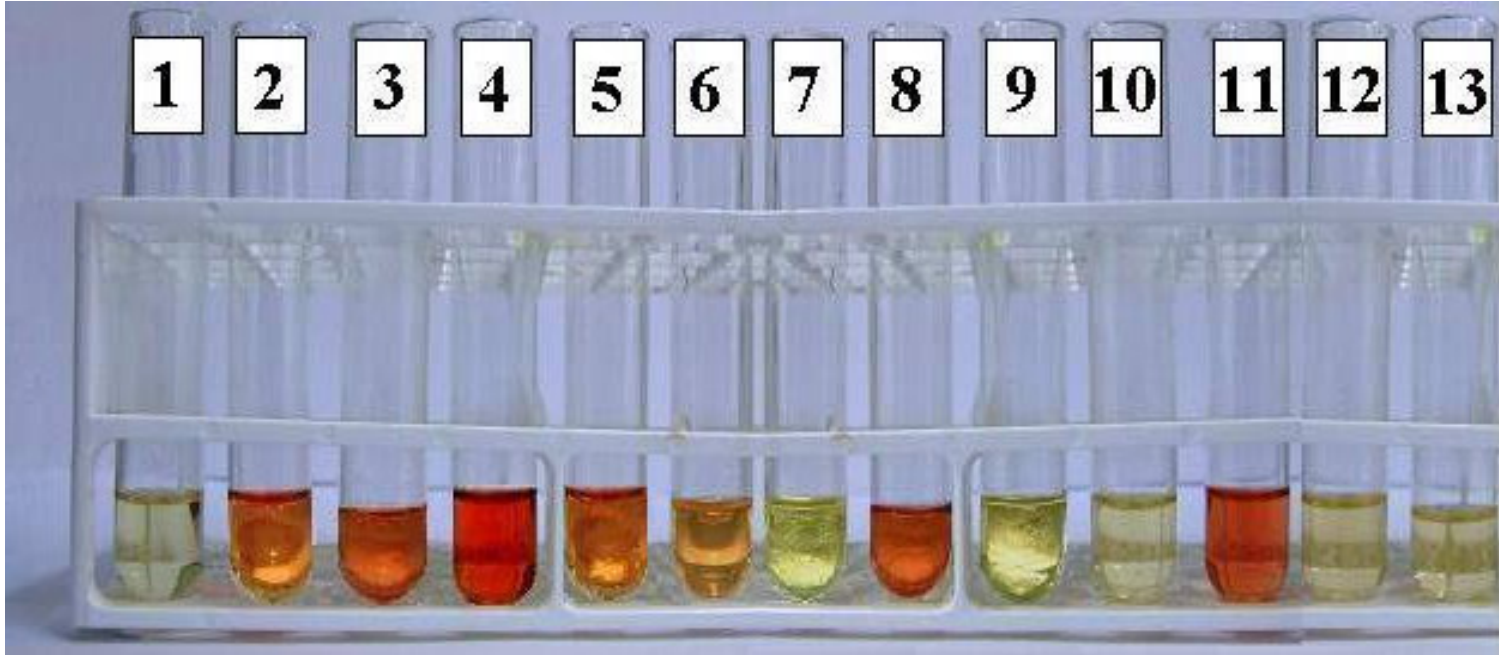
Şekil 4.18 İmmobilize ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin ES Red BWS boyasını giderme kapasitesi. a: Sadece besi ortamı; b: Boş alginat küre; c: İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren alginat küre; d: Serbest *A. niger* ATCC 9642. Boya derişimi 75 mg/L.

Çizelge 4.3 Besi ortamı, boş ve *A. niger* ATCC 9642 immobilize alginat küreler ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin ES Red BWS boyasını giderme kapasiteleri.

Örnek	ES Red BWS boya derişimi						Boya giderme %		
	25 mg/L		50 mg/L		75 mg/L		25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L
	A <sub>baş</sub>	A <sub>son</sub>	A <sub>baş</sub>	A <sub>son</sub>	A <sub>baş</sub>	A <sub>son</sub>			
Boyalı besi ortamı	0,186	0,208	0,354	0,369	0,445	0,453	-11,8	-4,2	-1,8
Boş küre	0,180	0,132	0,347	0,149	0,412	0,372	26,7	57,1	9,7
İmmobilize Küre	0,177	0,016	0,366	0,022	0,435	0,07	91,0	94,0	83,9
Serbest <i>A. niger</i> ATCC 9642	0,186	0,015	0,323	0,018	0,458	0,027	91,9	94,4	94,1

A<sub>baş</sub>: Başlangıç 506 nm Absorbansı

A<sub>son</sub>: 7 gün sonunda 506 nm Absorbansı



Şekil 4.19 Boya giderimi denemesi yapılan örneklerin 7 gün sonundaki besi ortamları. 1) Boyasız besi ortamı; 2) 25 mg/L ES Red BWS içeren besi ortamı; 3) 50 mg/L Red BWS içeren besi ortamı; 4) 75 mg/L Red BWS içeren besi ortamı; 5) boş alginat küreler içeren 25 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 6) İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 7) Serbest *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 8) boş alginat küreler içeren 50 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 9) İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren 50 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 10) Serbest *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 11) boş alginat küreler içeren 75 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 12) İmmobilize *A. niger* ATCC 9642 içeren 75 mg/L Red BWS'li besi ortamı; 13) Serbest *A. niger* ATCC 9642 içeren 25 mg/L Red BWS'li besi ortamı.

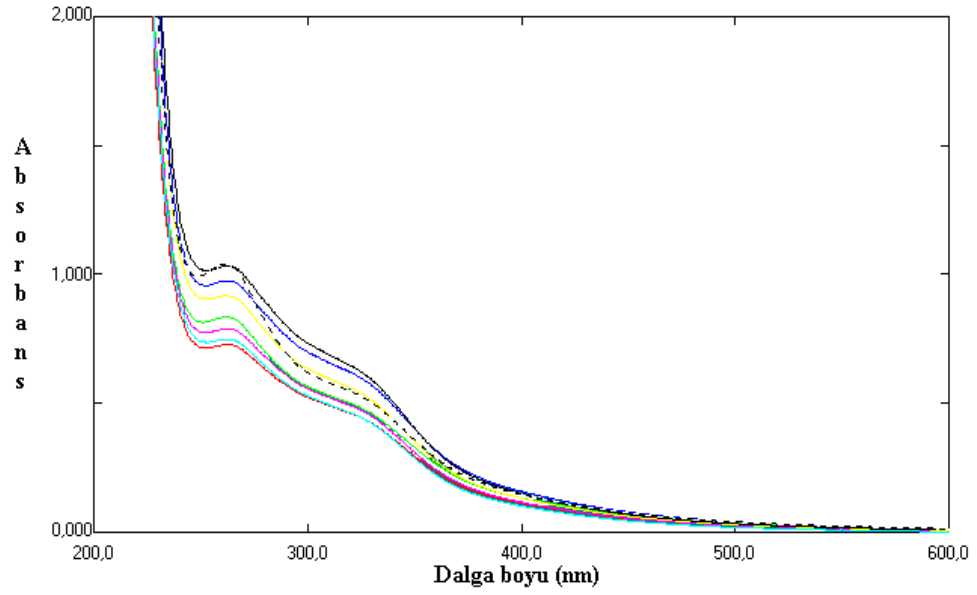


Şekil 4.20 Boyalı fermantasyon ortamından alınan kürelerin fotoğrafları. Sırasıyla 1) boyasız besi ortamındaki; 2) 25 mg/L ES Red BWS'li besi ortamındaki boş küre; 3) 25 mg/L ES Red BWS'li besi ortamındaki *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş küre; 4) 50 mg/L ES Red BWS'li besi ortamındaki boş küre; 5) 50 mg/L ES Red BWS'li besi ortamındaki *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş küre; 6) 75 mg/L ES Red BWS'li besi ortamındaki boş küre; 7) 75 mg/L ES Red BWS'li besi ortamındaki *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş küre.

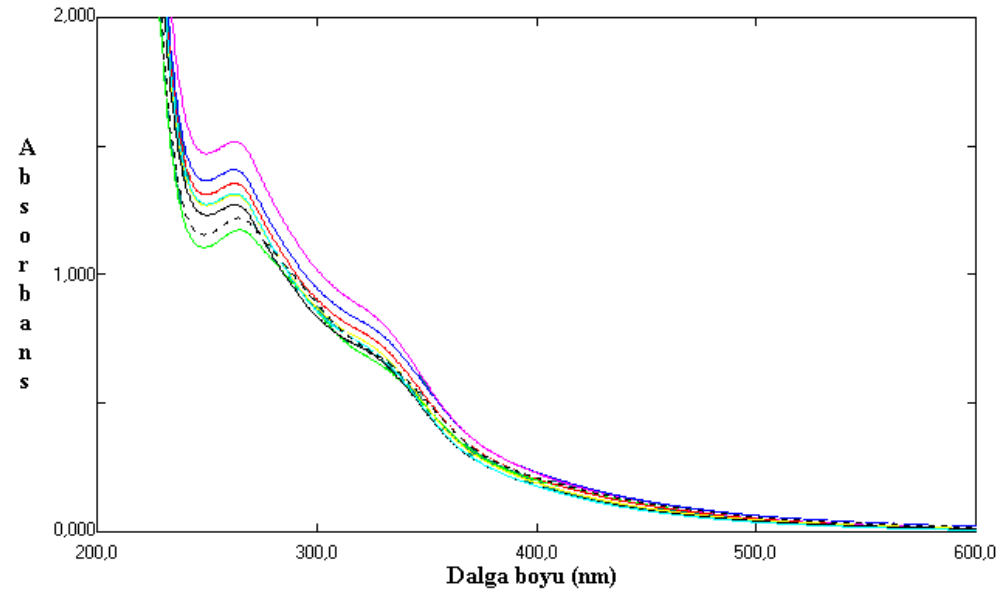
*A. niger* ATCC 9642'nin boya giderme kapasitesinin saptanması için seçilen iki test boyası ile ilgili sonuçlardan görülmektedir ki, ES Blue 4BL boyası 7. gün sonunda immobilize mikroorganizma ve serbest mikroorganizma tarafından sırasıyla % 94,7 ve % 89,6 degrede edilmektedir. Bu değerler ES Red BWS için % 83,9 ve % 94,1'dir. Bu sonuçlar immobilizasyon işleminin fungusların boya giderme kapasitesinde pratik olarak bir değişiklik yapmadığını göstermektedir.

### c) Tekstil atık suyunu arıtma kapasitesi

Gerçek çevre örnekleri olarak tekstil fabrikası atık suyundan alınan atık suların spektrumlarından muhtemel kompleks organikler nedeniyle ~450 nm'den daha küçük tüm dalga boylarında artan absorbands gözlenmiştir. Örneklerin karmaşıklığı nedeniyle tek bir dalga boyunda ölçüm yapılmamış bunun yerine Bölüm 4.3.1'de anlatıldığı şekilde muamele edilen atık suların 200–600 nm aralığında spektrumları takip edilmiştir.



Şekil 4.21. Mavi renkli tekstil atığının 7 gün boyunca spektrumlarındaki değişim. Siyah çizgi 0. gün, mavi çizgi 1. gün, siyah-beyaz çizgi 2. gün, sarı çizgi 3. gün, yeşil çizgi 4. gün, pembe çizgi 5. gün, turkuaz çizgi 6. gün ve kırmızı çizgi 7. gün alınan spektrumdur.



Şekil 4.22 Yeşil renkli tekstil atığının 7 gün boyunca spektrumlarındaki değişim. Mor çizgi 0. gün, mavi çizgi 1. gün, kırmızı çizgi 2. gün, yeşil çizgi 3. gün, sarı çizgi 4. gün, siyah çizgi 5. gün, siyah-beyaz çizgi 6. gün ve yeşil çizgi 7. gün alınan spektrumdur.

Şekil 4. 20 ve 4. 21'de görüldüğü gibi tekstil atıklarının 7 gün boyunca absorpsiyonlarında düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş ES Blue 4BL ve ES Red BWS'de elde edilen kadar önemli düzeylerde olmamasına rağmen yeşil renkli tekstil boyası atığı için yaklaşık % 17'lik bir boya giderimi, mavi renkli tekstil boyası için ise yaklaşık % 30'luk bir boya giderimi hesaplanmıştır.

Sumathi ve Manju (2001), *Aspergillus foetidus*un prosion boyaları olarak adlandırılan azo reaktif boyalarına karşı % 90'lık bir boya giderimine sahip olduğunu bulmuşlardır. Ohmomo ve arkadaşları (1987), *Aspergillus fumigatus*'un molas atıklarında bulunan melanoidini % 75 oranında renksizleştirdiğini rapor etmişlerdir. Dong ve arkadaşları (2000) ise, *Aspergillus* WS-2 türünün Reactive Red KD-8B ve Direct Light Turquoise GL boyalarını sırasıyla % 98 ve % 96 oranlarında giderdiğini bulmuşlardır. İmmobilize ve serbest *Aspergillus ficuum* hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada Reactive Brilliant Blue KN-R boyasını % 96 oranında giderdiği bulunmuştur (Xinjiao and Wenhai, 2003). Başka bir çalışmada, *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochrocouus*, *A. terres* ve *A. parasiticus* hücrelerinin Direct Brown ve Polar Red boyalarını arıtmaları incelenmiş ve *A. niger*in Direct Brown boyasını diğer *Aspergillus* türlerinden daha fazla ve % 95 oranında giderdiği, Polar Red boyasını ise *A. ochrocouus*'un en fazla (% 96), *A. niger*'in ise % 94 oranında giderdiği bildirilmiştir (Wafaa and Hassan, 2003). Molas atık suyunda boya giderimi için *A. niger* kullanılmış ve fungusun % 69 oranında renk giderme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Miranda et al., 1996). *A. parasiticus*'un kullanıldığı bir başka boya giderme çalışmasında ise, bu türün Reactive Blue 4 ve Acid yellow 25 boyalarını sırasıyla % 92,4 ve % 92,9 oranlarında giderdiği tespit edilmiştir (Deng et al., 2005). Assadi ve Jahangiri (2001), tekstil atıklarının boya gideriminde *A. niger*'i kullanmış ve % 97'lere varan bir renk giderimi bulmuşlardır.

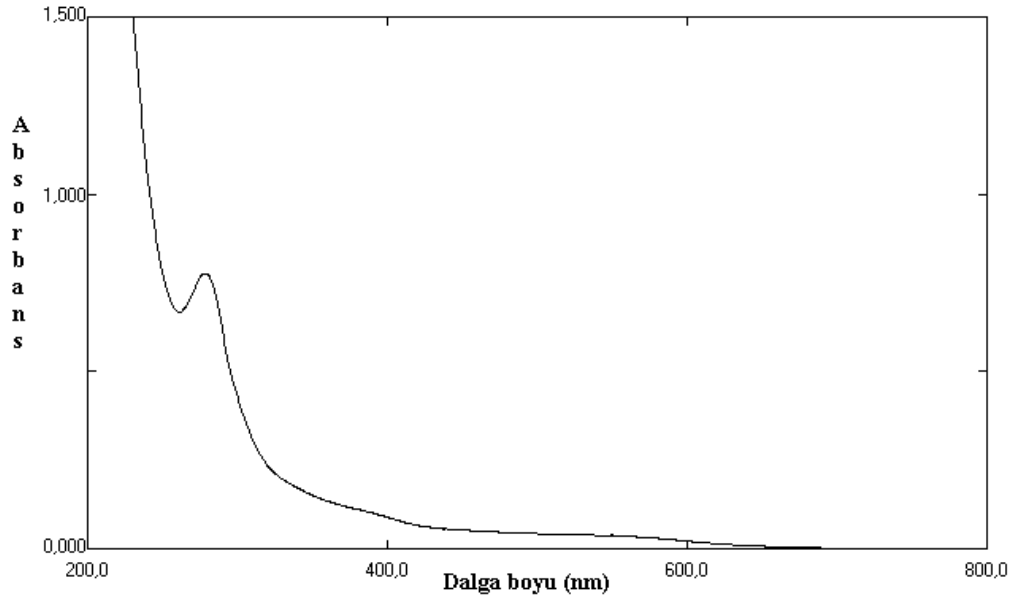


### 4.3.2 Zeytin karasuyunu arıtmada immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin kullanılabilirliği

Zeytinyağı üretim tesislerinden alınan gerçek atık su örneğinin *A. niger* ATCC 9642 için besi ortamı olarak kullanılabilirliğini tespit etmek üzere kimyasal özellikleri belirlendi.

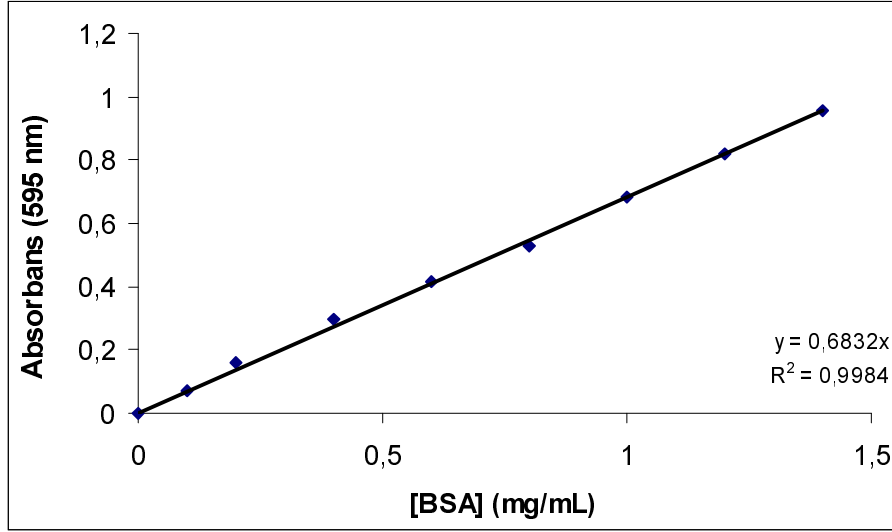
#### a) Zeytin karasuyunun spektroskopik ve kimyasal özellikleri

Zeytin karasuyunu 50 ve 100 kez seyreltilerek alınan spektrumlarda 278 nm'de maksimum absorbans verdiği bulunmuştur (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 Zeytin karasuyunun UV-görünür bölge spektrumu.

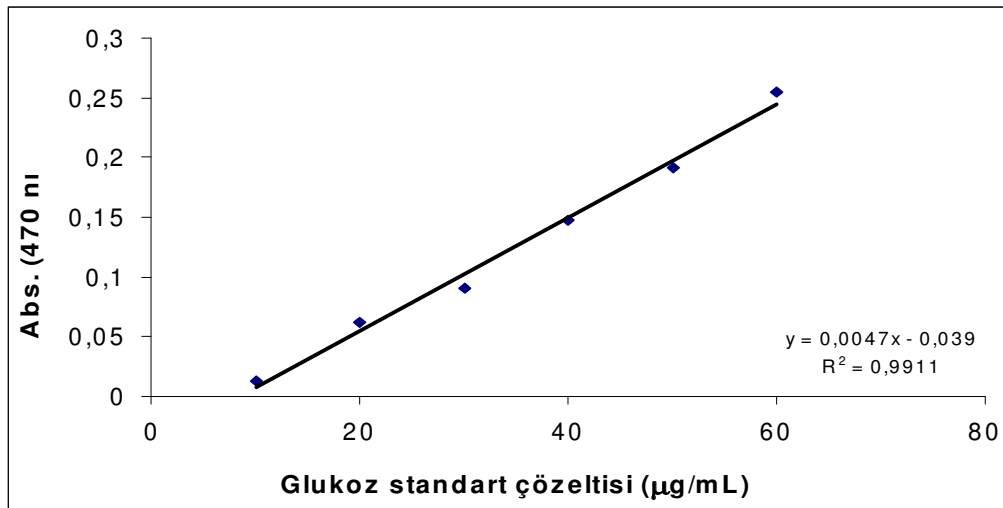
Zeytin karasuyunda Bradford yöntemine göre protein tayini yapılmıştır. Bunun için BSA standartları ile hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 4.24'de verilmiştir.



Şekil 4.24 Bradford yöntemi ile protein tayini için standart çalışma grafiği.

Bradford metodu ile 2 kat seyreltilmiş olan zeytin karasuyu örneklerinden elde edilen absorbans standart çalışma grafiği aralığındadır ve 0,076 absorbans değeri elde edilmiştir. Diğer seyreltmeler çalışma aralığı dışındadır. Standart grafiğinden yola çıkarak zeytin karasuyunda protein miktarı 0,222 mg/mL olarak bulunmuştur.

Zeytin karasuyunda toplam karbohidrat tayini için kullanılan glukoz standart çalışma grafiği Şekil 4.25'de verilmiştir.



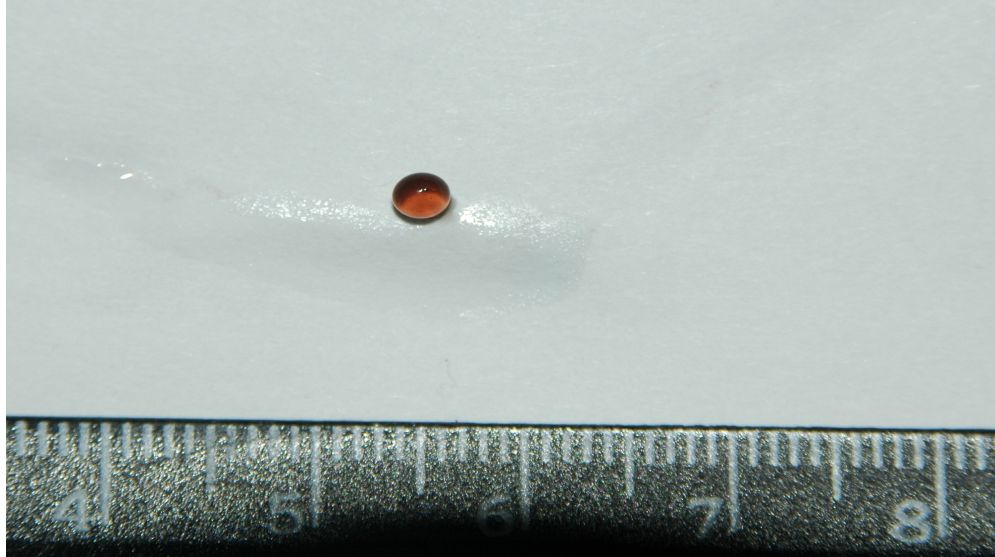
Şekil 4.25 Glukoz derişimi tayini için standart çalışma grafiği

Zeytin karasuyunda toplam karbohidrat tayininde 100 kat seyreltilmiş olan örnekler çalışma aralığına girdi ve hesaplar bu örnek üzerinden yapıldı. Buna göre, zeytin karasuyunda karbohidrat miktarı 4,40 mg/mL olarak bulunmuştur.

Çalışmada kullanılan Zeytin karasuyunun pH'ı ölçülmüş ve 4,89 olarak bulunmuştur.

### **b) Zeytin karasuyunu arıtmada immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin kullanımı**

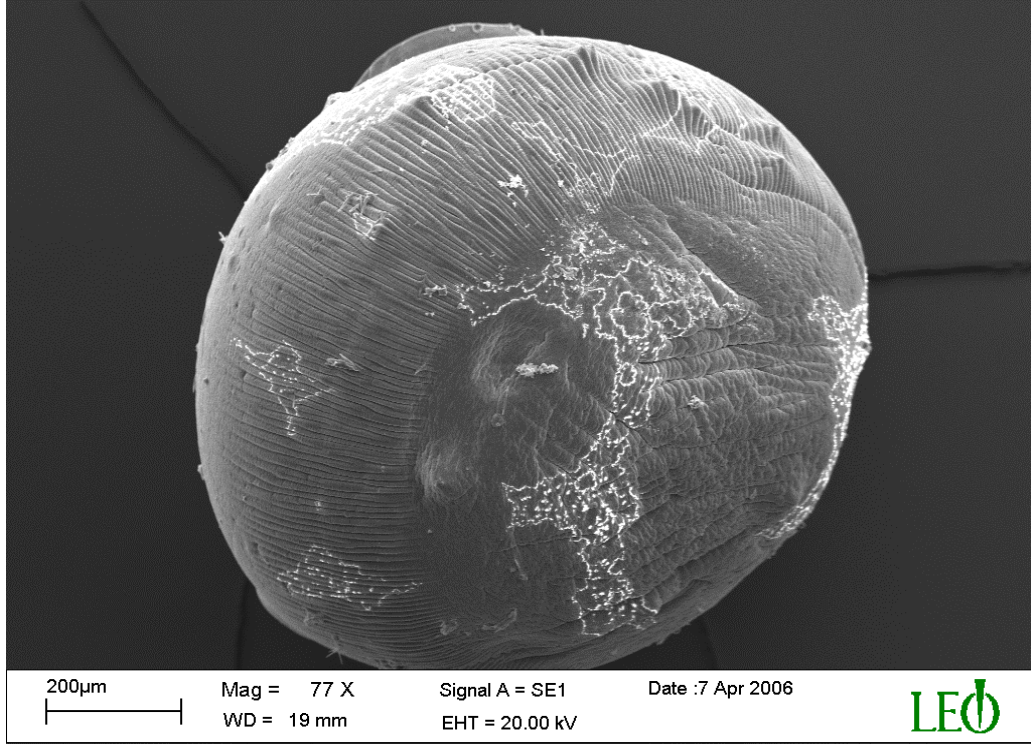
5, 10 ve 25 kat seyreltilen zeytin karasuyu örneklerinin kullanıldığı denemelerde, besi ortamı takviyesi yapılan ve yapılmayan tüm örneklerde 7 gün boyunca 278 nm'deki aborbansda bir değişim gözlenmediği gibi mikroorganizmanın büyütülmesi de mümkün olmadı. Şekil 4.26'da üzerinde büyüme olmayan, immobilize *A. niger* ATCC 9642 küreleri görülmektedir.



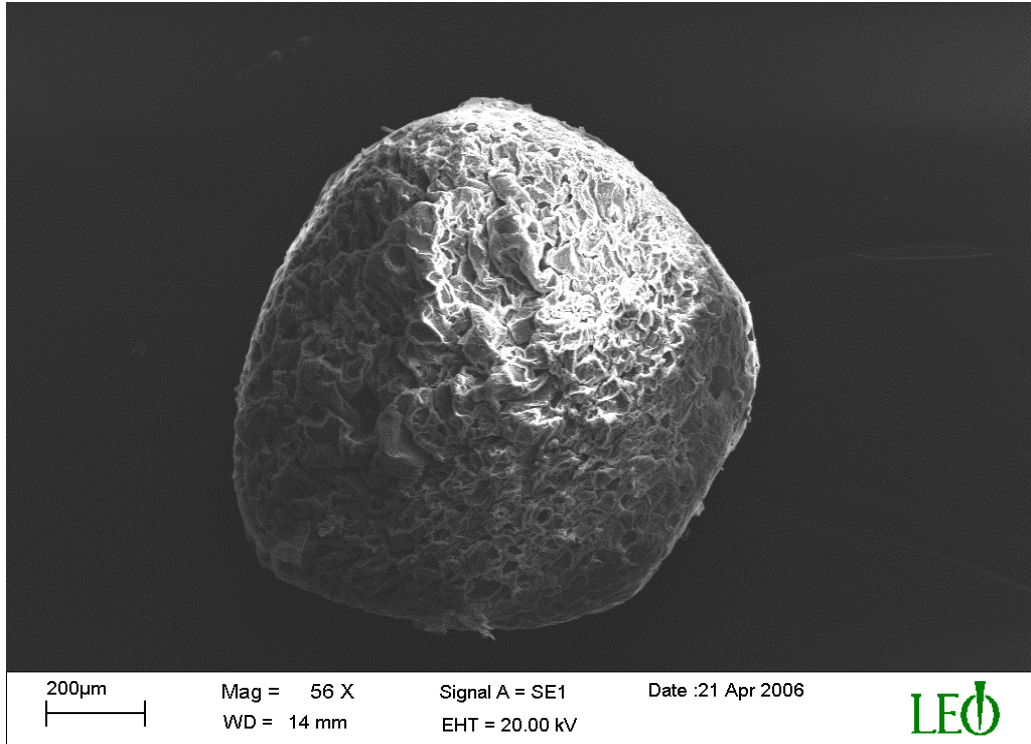
Şekil 4.26 Zeytin karasuyu içeren besi ortamında 7 gün boyunca büyümeye bırakılan immobilize *A. niger* ATCC 9642 hücreleri içeren küre.

## **4.4 SEM Sonuçları**

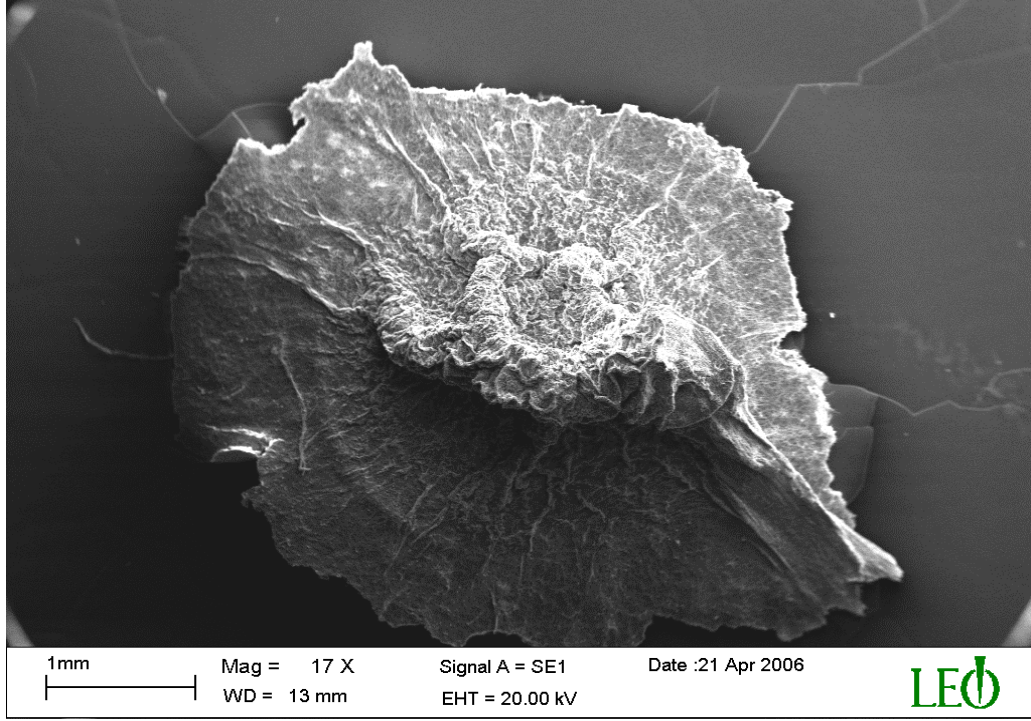
Boş alginat küre, *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş küre ve serbest *A. niger* ATCC 9642'nin SEM fotoğrafları Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da görülmektedir. Kürelerin daha yakın ve ayrıntılı fotoğrafları Şekil 4.30, Şekil 4.31 ve Şekil 4.32'de verilmiştir.



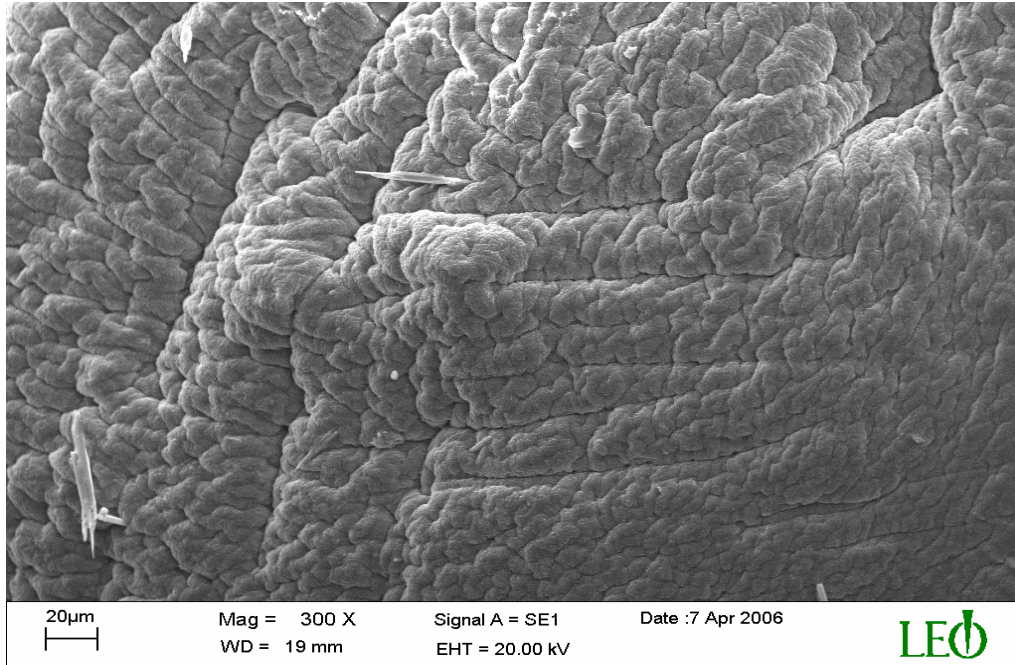
Şekil 4.27 Boş alginat kürenin SEM görüntüsü.



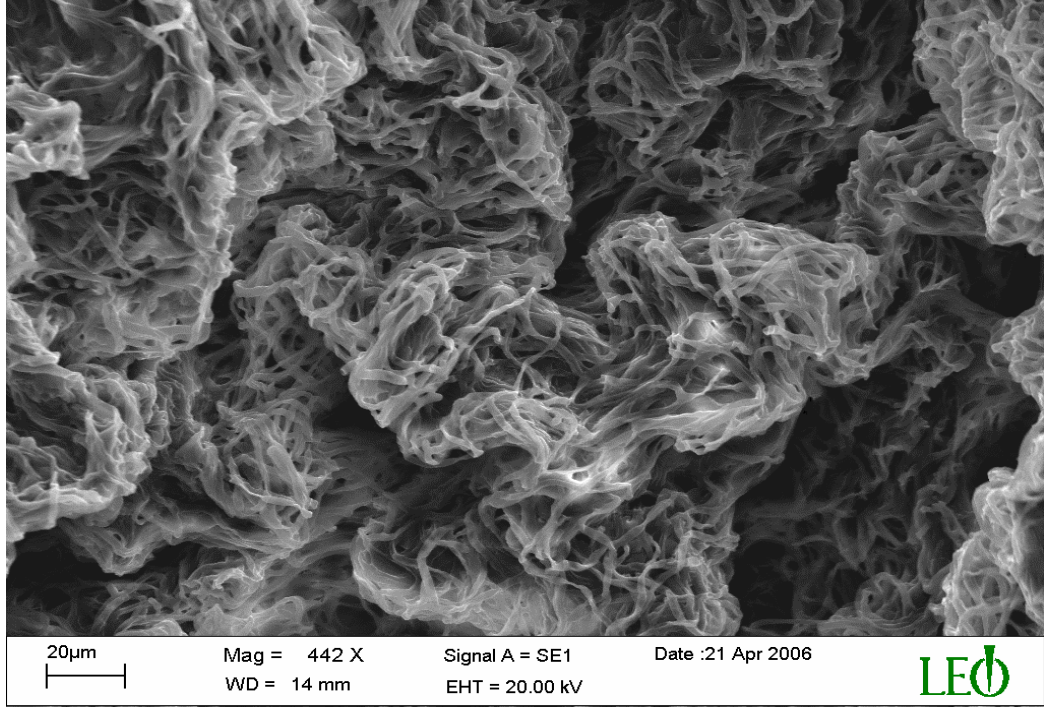
Şekil 4.28 A. niger ATCC 9642 immobilize edilmiş alginat kürenin SEM görüntüsü.



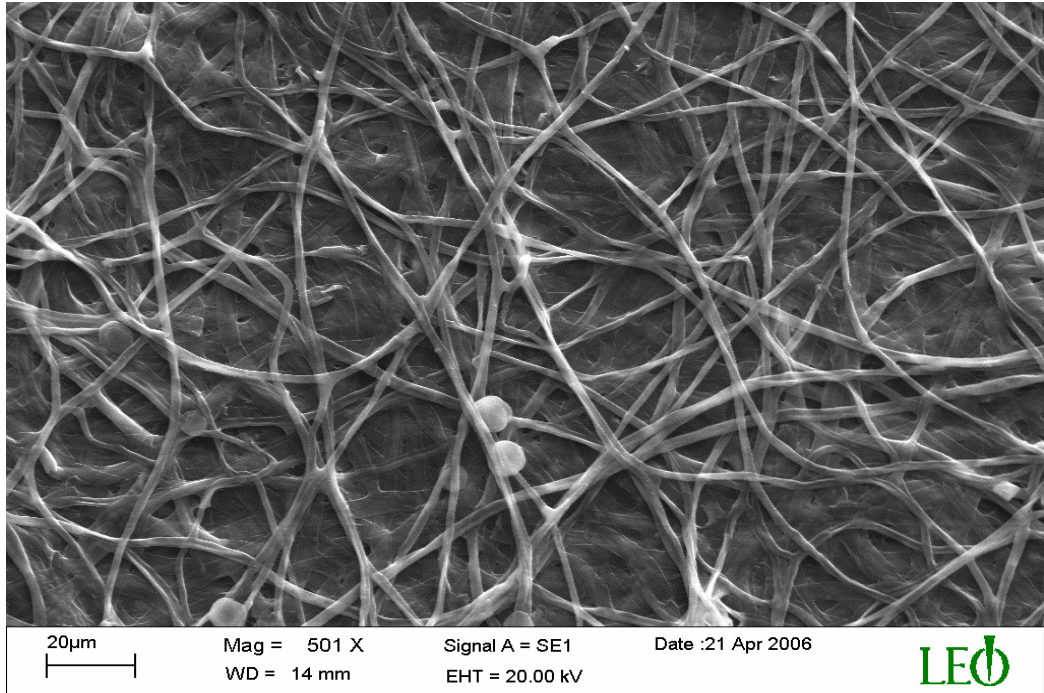
Şekil 4.29 Serbest *A. niger* ATCC 9642'nin SEM görüntüsü.



Şekil 4.30 Boş alginat kürenin yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafı.



Şekil 4.31 *A. niger* ATCC 9642 immobilize edilmiş alginat kürenin yüzey morfolojisini gösteren SEM fotoğrafı.



Şekil 4.32 Serbest *A. niger* ATCC 9642'nin morfolojisini gösteren SEM fotoğrafı.

SEM fotoğrafları incelendiğinde, boş alginat kürenin yüzeyinin oldukça homojen ve düzgün olduğu buna karşın *A. niger* ATCC immobilize edilmiş kürenin ise fungus büyümesinden kaynaklanan girintili çıkıntılı bir yapıya sahip olduğu ve yüzey morfolojisinin boş alginat küreye göre oldukça değiştiği saptanmıştır. İmmobilize ve serbest *A. niger* ATCC 9642 karşılaştırıldığında ise bu iki örneğin yüzey yapıları arasında farklılıklar tespit edilmiştir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikrobiyolojik üretim yöntemlerinin daha etkin uygulanabilmesi için immobilize hücrelerin bir araç olarak kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır. Giriş bölümünde örnekleri verilen pek çok üretim, immobilize hücreler kullanılarak başarı ile gerçekleştirilmektedir. İmmobilize hücrelerin fizyolojisinin serbest hücrelerinkinden farklı olması nedeniyle elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğinin kısıtlı ve yöntemin ampirik olması eleştirilere neden olsa da; büyük çaptaki üretimlerdeki ekonomik üstünlüğü immobilize hücre tekniklerini üzerinde çalışmaya değer kılmaktadır.

Bu çalışmada *A. niger* ATCC 9642'nin alginat üzerine immobilizasyon koşulları optimize edilmiş ve en iyi üretimin gerçekleştiği besi ortamı, glukoz derişimi, pH, alginat %'si, spor çözeltisi/alginat çözeltisi oranı tespit edilmiştir. Bu parametrelerin çalışılan her mikroorganizma ve her immobilizasyon matriksi için ayrıca tespit edilmesi önemlidir; zira bu değerler kullanılan aynı tür mikroorganizmanın farklı suşları için bile değişebileceği gibi, kullanılan matriks için de özel olabilmektedir.

*A. niger* ATCC 9642'nin pek çok immobilizasyon işleminde farklı üretimler için kullanıldığı bilinmektedir. Alginat da bir immobilizasyon matriksi olarak enzim ve hücre immobilizasyonunda çok kullanılmıştır. Ancak, alginat üzerine *A. niger* ATCC 9642'nin immobilizasyonu ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan bu çalışma orijinal sonuçlar içermektedir.

*A. niger*'in sanayide kullanılan boya ları degrede etme özelliği daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Boya üretimindeki rekabet nedeniyle formülleri gizli veya patent altında tutulan; bu nedenle de kodlarla isimlendirilen çok değişik boya vardır. Bu boya ların atık sulara katılması gözle görülür çevre kirliliğine neden olduğu gibi, suyun seyahat ettiği çevrede uzun vadede kimyasal ve biyolojik zararlar vermesi olasıdır. Bu durumu engellemek için yasal düzenlemelerle arıtma sistemlerinin kurulması zorunlu kılınsa da özellikle suda çözünen boya ların filtrasyon, durutma, süzme, adsorpsiyon gibi fiziksel ayırma yöntemleri ile veya kimyasal çöktürme ile arıtılması genellikle mümkün olamamakta veya çok fazla



maliyet gerektirmektedir. Bu boyaların temizlenmesi için en etkin yöntem biyolojik arıtma olarak görülmektedir. Biyolojik arıtma için serbest mikroorganizmaların kullanılması ise daha sonra mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılması için ek zorluk ve maliyet gerektirmektedir. İmmobilize mikroorganizmaların bu amaçla kullanılması günümüzde yukarıda anlatılan dezavantajların giderilmesi için en uygun yol gibi görülmektedir. Ayrıca, mikrobiyal boya giderme süreçlerinin boyayı muhtemel teknik bileşenlere kadar değil, karbondioksit, amonyak ve suya kadar indirgeme özelliği nedeniyle topyekün temizleme sağladığından tercih edilmelidir.

Bu çalışmada test boyası olarak seçilen ES Blue 4BL ve ES Red BWS boyalarının immobilize *A. niger* ATCC 9642 tarafından serbest mikroorganizmanın çok yakın bir etkinlikte uzaklaştırılması bu yöntemin atık su arıtmada kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak, tekstil atıklarının boya bileşenlerinin sayısı birden fazla olabileceğinden tek tek boyaların giderilmiş olması mikroorganizmanın tekstil atıklarında aynı başarıyı göstereceği anlamına gelmez. Nitekim bir tekstil fabrikasından alınan atık su örneklerindeki arıtmanın düşük düzeylerde kalması gerçek örneklerin karmaşık matrikslerinin mikroorganizmanın büyümesini ve biyodegradasyon kapasitesini düşürdüğünü göstermektedir. Bu nedenle endüstriyel üretimin niteliğine bağlı olarak değişen atık su profilinin parametrelerinin çok iyi analizlenmesi ve bu parametrelerin yönettiği ortamda en yüksek kapasiteyle aktivite gösterecek mikroorganizma üreme koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Üretimde ve tüketimde kullanılan boyaların % 10-15'inin çevreye atıldığı ve bu boyaların çoğunun toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin olduğu göz önüne alındığında bu alanda yapılacak araştırmaların önemi daha iyi anlaşılabilir.

İmmobilize mikroorganizmaların bir başka kullanım alanı da ürettikleri enzimlerden yararlanmaktır. Endüstriyel önemi olan enzimlerden laboratuvarımızın olanakları içerisinde test edilebilenler arasında sadece orta derecede lipaz aktivitesi tespit edilmiş, çalışılan diğer enzimler olan amilaz, proteaz ve katalaz aktiviteleri negatif bulunmuştur. Bu sonuçlar nedeniyle alginat üzerine immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin hücre dışına salgıladığı enzimlerin kullanılabilirliği daha fazla araştırılmamıştır.

Zeytin karasuyu zeytinyağı üretiminin koyu renkli atığıdır. Bu su zeytin suyu, makine soğutma suyu, meyve yıkama suyu ve meyve atıklarını içerir. Zeytin karasuyunun bileşimi hasat türüne, meyve çeşidine ve yağ üretimi için kullanılan teknolojiye bağlı olarak değişiklik gösterir. Büyük çapta zeytinyağı üretiminin yapıldığı Akdeniz bölgesinde bu suyun bertaraf edilmesi önemli bir problemdir. Zeytin karasuyunun toksik etkileri yüksek organik içeriği (~ % 15), inatçı ve yüksek antimikrobiyal özellik gösteren polifenol içeriği sonucu edindiği yüksek COD ve BOD değerlerinden kaynaklanır. Bu özellikleri zeytin karasuyunu muamele görmeden atılması halinde büyük bir çevre problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Akdeniz ülkelerinin yıllık zeytin karasuyu atığının  $3 \times 10^7$  m<sup>3</sup> olduğu göz önüne alınırsa bu çevre probleminin büyüklüğü daha iyi anlaşılabilir.

Aydın yöresinde de zeytinyağı üreten birimlerin sayısının çokluğu sonucu zeytin karasuyu önemli bir çevre problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak bu çalışmaya konu olan immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin zeytin karasuyunu arıtma kapasitesi incelenmiş ancak mikroorganizmanın büyütülmesi mümkün olamamıştır. Zeytin karasuyunun yüksek fenolik madde içeriği nedeniyle antimikrobiyal aktivitesi olduğu bilinmektedir. Mikroorganizma büyümemesinin nedeni muhtemel antimikrobiyal aktivite olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle bu çalışmaya konu olan immobilize *A. niger* ATCC 9642'nin zeytin karasuyunun giderilmesinde kullanılması ümit vermemektedir. Ancak, farklı mikroorganizma kullanılarak zeytin karasuyunun arıtılması ve/veya zeytin karasuyundan ekonomik ve endüstriyel önemi olan bileşiklerin elde edilmesi çalışmaları rapor edilmiştir ve üzerinde çalışılmaya değer araştırma konularıdır.

Mikroorganizmalar uygun besi ortamında serbest halde çoğaldıklarında belli bir morfoloji gösterirler. Doğal veya yapay bir desteğe immobilize olan mikroorganizma ise bu desteğe attığı kanca hareketi ile daha farklı bir büyüme morfolojisi gösterebilir. *A. niger* ATCC 9642 için böyle bir farkın olup olmadığını izleyebilmek için SEM fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 4.31'den görüldüğü üzere immobilize fungusun büyüme morfolojisi yapıştığı alginat polimeri üzerinde kümelenme şeklindedir. Serbest fungus ise daha çok iplikçik (fibriler) bir morfolojiyi göstermektedir. Ancak bu morfoloji değişikliği fungusun büyümesini ve boya

giderme kapasitesini pratik olarak etkilemektedir. SEM fotoğrafları alginat küre üzerinde mikroorganizmanın düşmeden büyüdüğünü de kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmanın sonuçları *A. niger* ATCC 9642'nin alginat üzerine immobilizasyonunun uygun koşullarda mümkün olduğunu ve immobilize mikroorganizmanın test edilen boyalar için serbest mikroorganizma kadar yüksek giderme özelliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Tekstil veya diğer endüstri kollarının boyalı atık sularının arıtılması için de ümit verdiği görülmektedir. Gerçek atık su örnekleri üzerindeki daha ileri araştırma çevre örneklerinin arıtılması için önerilir.

## ÖZET

Bu çalışmada alginat küreleri üzerine *A. niger* ATCC 9642 fungusunun immobilizasyon koşulları optimize edildi. Fungusun alginat matrikste en iyi büyümeyi gösterdiği glukoz derişiminin % 3 (w/v), alginat derişiminin % 3 (w/v), olgunlaşma süresinin 0 dakika, pH 6,75, spor çözeltisi/alginat çözeltisi oranının ise 1/6 (v/v) olduğu tespit edildi. İmmobilize *A. niger* ATCC 9642'nin salgıladığı hücre dışı enzimler araştırıldı. İncelenen dört enzimden (lipaz, amilaz, proteaz ve katalaz) sadece orta derecede lipaz aktivitesi tespit edildi.

İmmobilize *A. niger* ATCC 9642'nin ES Blue 4BL ve ES Red BWS boyalarını giderme kapasiteleri araştırıldı. ES Blue 4BL için serbest ve immobilize fungusun boya giderme kapasiteleri sırasıyla % 89,6 ve % 94,7 (75 mg/L boya için) olarak tespit edildi. ES Red BWS boyası için ise serbest fungus % 94,1 boya giderme kapasitesi gösterirken, immobilize fungus % 83,9 aktivite gösterdi (75 mg/L boya için). İmmobilize fungusun yeşil ve mavi renkli tekstil fabrikası atık suları için boya giderme kapasiteleri ise sırası ile % 17 ve % 30 olarak bulundu. Zeytin kara suyunu arıtma kapasitesinin ise olmadığı tespit edildi.

SEM fotoğrafları serbest ve immobilize fungusun üreme morfolojilerinin farklı olduğunu gösterdi. Ancak bu farkın boya giderme kapasitesini etkilemediği sonucuna varıldı.

## SUMMARY

In this work the optimal conditions for the immobilization of *A. niger* ATCC 9642 on alginate beads were determined. Optimum alginate concentration was found to be % 3 (w/v). Optimum glucose concentration of growth medium was found % 3 (w/v). 0 minute and 6,75 were optimum curing time and pH, respectively. Optimum spor/alginate concentration ratio was 1/6 (v/v).

Extracellular enzymes produced by immobilized *A. niger* ATCC 9642 were investigated. Out of the four enzymes (lipase, amilase, protease and catalase) tested, lipase was the only enzyme present with low activity.

Decolorization capacity of free and immobilized *A. niger* ATCC 9642 against ES Blue 4BL and ES Red BWS dyes was investigated. Decolorization capacity of free and immobilized *A. niger* ATCC 9642 against ES Blue 4BL were % 89,6 and % 94,7, respectively. Furthermore, decolorization capacity of free and immobilized *A. niger* ATCC 9642 against ES Red BWS were % 94,1 and % 83,9 (for 75 mg/L dye solution).

Immobilized fungus decolorized blue and green effluents obtained from a textile factory by % 17 and % 30, respectively. No decolorization capacity against olive oil mill waste was measured.

SEM images of free and immobilized fungus were compared and differences between morphologies were detected. Nevertheless, it is concluded that differentiation of morphologies do not effect the decolorization capacity.

## TEŞEKKÜR

Bu tezin konu seçiminden yazımına kadar her aşamada yoğun emeğini ve desteğini gördüğüm sevgili danışman hocam Doç. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e,

Laboratuar çalışmalarında ve tez yazımındaki yoğun yardımlarından dolayı, sevgili eşim Arş. Grv. Deniz AKTAŞ UYGUN'a,

Mikrobiyoloji hakkındaki engin bilgilerinden yararlanma fırsatı bulduğum ve kullanılan mikroorganizma türünün seçimindeki yardımlarından dolayı Biyoloji Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Halil BIYIK'a,

Tekstil boyalarının teminindeki yardımlarından dolayı Kimya Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Erdener KARADAĞ'A,

SEM fotoğraflarının çekilmesinde yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen İnönü Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay SEÇKİN ve Arş. Grv. Süleyman KÖYTEPE'ye,

Laboratuar çalışmaları sırasında tecrübelerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e,

Mikroorganizmalar ile çalışmada yardımlarını ve desteğini kesmeyen arkadaşım Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Arş. Grv. Öznur ARAT'a,

Bu çalışmaya FEF 05002 no'lu araştırma projesi olarak maddi destek veren Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne,

Ve emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim eşime ve aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

## KAYNAKLAR

ABARCA M. L., ACCENSÍ F., CANO J. and CABAÑES F. J., 2004. Taxonomy and Significance of Black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 86: 33–49.

AEBI H., 1974. Catalase *In Vitro*. **Methods Enzymol**. 105: 121–126.

AKHTAR N., IQBAL J. and IQBAL M., 2003. Microalgal-luffa Sponge Immobilized Disc: A New Efficient Biosorbent for the Removal of Ni (II) from Aqueous Solution. **Lett. Appl. Microbiol**. 37: 149–153.

AKTAŞ D., 2004. Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Aydın.

AL-MUSALLAM A., 1980. Revision of The Black *Aspergillus* Species. Ph.D. Thesis. University of Utrecht. Netherland.

AL-RUB F. A. A., EL-NAAS M. H., BENYAHIA F. and ASHOUR I., 2004. Biosorption of Nickel on Blank Alginates Beads, Free and Immobilized Algal Cells. **Process Biochem**. 39: 1767–1773.

AMUTHA R. and GUNASEKARAN P., 2001. Production of Ethanol from Liquefied Cassava Starch Using Co-Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. **J. Biosci. Bioeng**. 92: 560–564.

ANGELOVA M. B., PASHOVA S. B. and SLOKOSKA K. S., 2000. Comparison of Antioxidant Enzyme Biosynthesis By Free and Immobilized *Aspergillus niger* Cells. **Enzyme Microb. Technol**. 26: 544–549.

AOKI H., SAKANO Y. and SAKANO Y., 1997. Molecular Cloning of Heterologous Expression of The Isopullulanase Gene from *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Biochem J.** 323: 757-764.

ASSADI M.M. and JAHANGIRI M.R., 2001. Textile Wastewater Treatment by *Aspergillus niger*. **Desalination.** 141: 1-6.

ATKINS E. D. T., MACKIE W., NIEDUSZYNSKI I. A., PARKER K. D. and SMOLKO E. E., 1973a. Structural Components of Alginic Acid. Part I. The Crystalline Structure of Poly  $\beta$ -D-Mannuric Acid. Results of X-ray Diffraction and Polarized Infrared Studies. **Biopolymers.** 12: 1865–1878.

ATKINS E. D. T., MACKIE W., NIEDUSZYNSKI I. A., PARKER K. D. and SMOLKO E. E., 1973b. Structural Components of Alginic Acid. Part II. The Crystalline Structure of Poly  $\alpha$ -L-Guluronic Acid. Results of X-ray Diffraction and Polarized Infrared Studies. **Biopolymers.** 12: 1879–1887.

AVRAHAMI D. and SHAI Y., 2004. A New Group of Antifungal and Antibacterial Lipopeptides Derived from Non-membrane Active Peptides Conjugated to Palmitic Acid. **J. Biol. Chem.** 279: 12277–12285.

BAĞ H., TÜRKER A. R. and LALE M., 1999. Determination of Trace Metals in Geological Samples by Atomic Absorption Spectrophotometry After Preconcentration by *Aspergillus niger* Immobilized on Sepiolite. **Anal. Sci.** 15: 1251- 1256.

BERKA R. M., DUNN-COLEMAN N. S. and WARD M. A., 1992. Industrial Enzymes of Aspergilli. In: *Aspergillus, Biology and Industrial Applications*. Eds. Bennett J. W., Ward M. A., Butterworth-Heinemann. London.



BHATIA S. R., KHATTAK S. F. and ROBETS S. C., 2005. Polyelectrolytes for Cell Encapsulation. *J. Colloid. Interface Sci.* 10: 45–51.

BOISSESON M. R., LEONARD M., HUBERT P., MARCHAL P., STEQUERT A., CASTEL C., FAVRE E. and DELLACHERIE E., 2004. Physical Alginate Hydrogels Based on Hydrophobic or Dual Hydrophobic/Ionic Interactions: Bead Formation, Structure and Stability. *J. Colloid Inter. Sci.* 273: 131-139.

BRADFORD M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-251.

CALVO A. M., TERRON M. C., FIDALGO M. L., PALEYO J. M., GALLETTI G. C. and GONZALES A. E., 1995. Pyrolysis - Gas Chromatography - Mass Spectrometry Characterization of Wheat Straw Alkaline-cooking Effluents After Biological Treatment with the Fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Ganoderma australe*. *Analytica Acta.* 309: 145–152.

CHAN Y. C. and CHOU C. C., 2002. Growth and Production of Cholesterol Oxidase by Alginate-Immobilized Cells of *Rhodococcus equi* No.23. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35: 69-74.

CHANG J. S., CHOU C. and CHEN S. Y., 2001. Decolorization of Azo Dyes with Immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochem.* 36: 757–763.

CHIBATA I., TOSA T. and SATO T., 1974. Immobilized Aspartase-Containing Microbial Cells: Preparation and Enzymatic Properties. *Applied Microbiology.* May: 878-885

CHIBATA I., TOSA T., SATO T., MORI T. and MAUTO Y., 1972. Preparation and Industrial Application of Immobilized Aminoacylases. In: Proc. IVth Int. Ferment. Symp. Fermentation Technology Today. Society for Fermentation Technology. Japan. 383-389.

CHIBATA I., 1978. Immobilized Enzymes, Research and Development. Kodansha, Tokyo.

CHUN G. T. and AGATHOS S. N., 1991. Comparative Studies of Physiological and Environmental Effects on The Production of Cyclosporin A in Suspended and Immobilized Cells of *Tolypocladium inflatum*. **Biotechnol. Bioeng.** 37: 256–265.

CLARK A. H. and ROSS-MORPHY S. B., 1987. Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels. **Adv. Polym. Sci.** 83: 57–192.

COCHRANE V. W., 1958. Physiology of Fungi. John Wiley and Sons Inc. New York.

COULIBALY L., GOUREENE G. and SPIROS A., 2003. Utilization of Fungi for Biotreatment of Raw Wastewaters. **African J. Biotechnol.** 2(12): 620–630.

COULIBALY L., 2002. Bioconversion de Macromolécules Dans un Réacteur Simulant un Écoulement Piston en Régime Transitoire. Cas de la Bioremédiation D'eaux Usées Synthétique par *Aspergillus niger*. Thèse de Doctorat, Université Catholique de Louvain, Unité de Génie Biologique. [www.gebi.ucl.ac.be](http://www.gebi.ucl.ac.be)

COUTO S. R., SANROMAN M. A., HOFER D. and GÜBITZ G. M., 2004. Stainless Steel Sponge: A Novel Carrier for the Immobilization of the White-rot Fungus *Trametes hirsuta* for Decolourization of Textile Dyes. **Biores. Technol.** 95: 67–72.

CRUZ A. J. G., PAN T., GIORDANO R. C., ARAUJO M. L. G. C. and HOKKA C. O., 2004. Cephalosporin C Production by Immobilized *Cephalosporium acremonium* Cells in a Repeated Batch Tower Bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** 85: 96–102.

DALE M. C., EAGGER A. and OKOS M. R., 1994. Osmotic Inhibition of Free and Immobilized *K. marxianus* Anaerobic Growth and Ethanol Productivity in Whey Permeate Concentrate. **Process Biochem.** 29: 535–544.

DAVIS T. A., VOLESKY B. and MUCCI A., 2003. A Review of the Biochemistry of Heavy Metal Biosorption by Brown Algae. **Water Res.** 37: 4311–4330.

DENG S., YU G. and TING Y. P., 2005. Production of a Bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its Application in Dye Removal. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** 44: 179–186.

DEO Y. M. and GAUCHER G. M., 1984. Semicontinuous and Continuous Production of Penicillin-G by *Penicillium chrysogenum* Cells Immobilized in  $\kappa$ -Carrageenan Beads. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 285-295.

DIAS J. C. T., REZENDE R. P. and LINARDI V. R., 2001. Bioconversion of Nitriles by *Candida guilliermondii* 7207 Cells Immobilized in Barium Alginate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 757–761.

DIAS M. A., LACERDA I. C. A., PIMENTEL P. F., CASTRO H. F. and ROSA C. A., 2002. Removal of Heavy Metals by an *Aspergillus terreus* Strain Immobilized in a Polyurethane Matrix. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 46–50.

DONG X., ZHENG J. and ZHANG F., 2000. Study on Dyes Decolorization by *Aspergillus* WZ-2. **Chin. J. Appl. Environ. Biol.** 6: 281-283.

DORAN P. M. and BAILEY J. E., 1986. Effects of Immobilization on Growth, Fermentation Properties, and Macromolecular Composition of *Saccharomyces cerevisiae* Attached to Gelatin. **Biotechnol. Bioeng.** 28: 73–87.

DRURY J. L. and MOONEY D. L., 2003. Hydrogels for engineering: Scaffold Design Variables and Applications. **Biomaterials.** 24: 4337-4351.

DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P.A. and SMITH F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.** 28: 350.

EL-HOLI M. A. and AL-DELAIFY K. S., 2003. Citric Acid Production from Whey Sugars and Additives by *Aspergillus niger*. **African J. Biotechnol.** 2(10): 356–359.

ELLAIAH P., PRABHAKAR T., RAMAKRISHNA B., TALEB A. T. and ADINARAYANA K., 2004. Production of Lipase by Immobilized Cells Of *Aspergillus niger*. **Process Biochem.** 39: 525–528.

ETTAYEBI K., ERRACHIDI F., JAMAI L., TAHRI-JOUTI M. A., SENDIDE K. and ETTAYEBI M., 2003. Biodegradation of Polyphenols with Immobilized *Candida tropicalis* Under Metabolic Induction. **FEMS Microb. Lett.** 223: 215–219.

FAHY V., FITZGIBBON F. J., McMULLAN G., SINGH D. and MARCHANT R., 1997. Decolourization of Molasses Spent Wash by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnol. Lett.** 19: 97–99.

FANG H. H. P. and CHAN O. C., 1997. Toxicity of Phenol Towards Anaerobic Biogranules. **Wat. Res.** 31: 2229–2242.

- FANG H., WENRONG H. and YUEZHONG L., 2004. Biodegradation Mechanisms and Kinetic of Azo Dye 4BS by a Microbial Consortium. **Chemosphere**. 57: 293-301.
- FLOR P. Q. and HAYASHIDA S., 1983. Continuous Production of High-Glucose Syrup by Chitin-Immobilized Amylase. **Biotechnol. Bioeng.** 25 (8): 1973-1980.
- FUJII N., OKI T., SAKURAI A., SUYE S. and SAKAKIBARA M., 2001. Ethanol Production from Starch by Immobilized *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces pastorianus* Using Cellulose Carriers. **J. Inst. Microbiol. Biotechnol.** 27: 52-57.
- GALAZZO J. and BAILEY J. E., 1990. Growing *Saccharomyces cerevisiae* in Calcium-Alginate Beads Induces Cell Alteration, Which Accelerate Glucose Conversion to Ethanol. **Biotechnol. Bioeng.** 36: 417-426.
- GALLI E., MARIO F. D., RAPANA P., LORENZONI P. and ANGELINI R., 2003. Copper Biosorption by *Auricularia polytricha*. **Lett. Appl. Microbiol.** 37: 133-137.
- GOMBOTZ W. R. and WEE S. F., 1998. Protein Release from Alginate Matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 31: 267-285.
- GONZALEZ M. G., HERRERA M. G., GARCIA M. T. and PENA M. M., 2001. Biodegradation of Phenol in a Continuous Process: Comparative Study of Stirred Tank and Fluidized-bed Bioreactor. **Biores. Technol.** 76: 245-251.
- GOOSEN M. F. A., 1993. Toxicity, Biocompatibility, and Mass Transfer Effects in Immobilized Cell System. In: Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization. Ed. Goosen M. F. A., CRC Press. Boca Raton.
- GORIN J. P. A. and SPENCER T. J. F., 1966. Exocellular Alginic Acid from *Azotobacter vinelandii*. **Can. J. Chem.** 44: 993-998.

GRAND G. T., MORRIS E. R., REES D. A. SMITH P. J. C. and THOM D., 1973. Biological Interactions Between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model. **FEBS Lett.** 32: 195–200.

GRASSIN C. and FAUGUENBERGUE P., 1999. Enzymes, Fruit Juice Processing. In: Encyclopedia of Bioprocess Technology, Vol 17. Eds. Bielecki S., Tramper J., Polak J., Elsevier. Amsterdam.

GRYTA M., 2002. The Assessment of Microorganism Growth in The Membrane Distillation System. **Desalination.** 142: 79–88.

GU J. G. and GU J. D., 2005. Methods Currently Used in Testing Microbiological Degradation and Deterioration of a Wide Range of Polymeric Materials with Various Degree of Degradability: A Review. **J. Polym. Environ.** 13: 65–74.

GUPTA R., AHUJA P., KHAN S., SAXENA R. K. and MOHAPATRA H., 2000. Microbial Biosorbents: Meeting Challenges of Heavy Metal Pollution in Aqueous Solutions. **Curr. Sci.** 78: 967–973.

HABA E., BRESCO O., FERER C., MARQUES A., BUSQUEST M. and MANRESA A., 2000. Isolation of Lipase-Secreting Bacteria by Deploying Used Frying Oil as Selective Substrate. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 40–44.

HAYASHIDA S. and TERAMOTO Y., 1986. Production and Characteristics of Raw-Starch-Digesting  $\alpha$ -Amylase from a Protease-Negative *Aspergillus ficum* Mutant. **Appl. Environ. Microb.** 52: 1068–1073.

HILGE-ROTMANN B. and REHM H. J., 1990. Comparison of Fermentation Properties and Specific Enzyme Activities of Free and Calcium–Alginate Entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33: 54–58.

<http://www.lgcpromochem-atcc.com>

HU M. Z. C., NORMAN J. M., FASION B. D. and REEVES M. E., 1996. Biosorption of Uranium by *Pseudomonas aeruginosa* Strain CSU: Characterization and Comparison Studies. **Biotechnol. Bioeng.** 51: 237–247.

HYUN H. H. and ZEIKUS J.G., 1985. General Biochemical Characterization of Thermostable Extracellular  $\beta$ -Amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 1162–1167.

INOUE Y., RHEE H., WATANABE K., MURATA K. and KIMURA A., 1988. Metabolism of 2-oxoaldehyde in Mold. Purification and Characterization of Two Methylglyoxal Reductase from *Aspergillus niger*. **Eur. J. Biochem.** 171: 213–218.

IONATA E., DE BLASIO P. and LA CARA F., 2005. Microbiological Degradation of Pentane by Immobilized Cell of *Arthrobacter* sp. **Biodegradation.** 16: 1–9.

IONITA A., MOSCOVICI M., POPA C., VAMANU A., POPA O. and DINU L., 1997. Screening of Yeast and Fungal Strains for Lipolytic Potential and Determination of Some Biochemical Properties of Microbial Lipases. **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic.** 3: 147–151.

JAMAI L., SENDIDE K., ETTAYEBI K., ERRACHIDI F., HAMDOUNI-ALAMI O., TAHRI-JOUTI M. A., McDERMOT T. and ETTAYEBI M., 2001. Physiological Difference During Ethanol Fermentation Between Calcium Alginate-Immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 204: 375–379.

JEN A. C., WAKE M. C. and MIKOS A. G., 1996. Review: Hydrogels for Cell Immobilization. **Biotechnol. Bioeng.** 50: 357–364.

JIANLONG W., LIPING H., HANCHANG S. and QIAN Y., 2001. Biodegradation of Quinoline by Gel Immobilized *Burkholderia* sp. **Chemosphere**. 44: 1041–1046.

JIN Y. L. and SPEERS R. A., 1998. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Res. Int.** 31: 421-440.

JUNTER G. A., COQUET L., VILAIN S. and JOUENNE T., 2002. Immobilized-Cell Physiology: Current Data and The Potentialities of Proteomics. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 201–212.

KAPOOR A. and VIRARAGHAVAN T., 1997. Removal of Heavy Metals from Aqueous Solutions Using Immobilized Fungal Biomass in Continuous Mode. **Wat. Res.** 32: 1968–1977.

KAREL S. F., LIBICKI S. B. and ROBERTSON C. R., 1985. The Immobilization of Whole Cells-Engineering Principles. **Chem. Eng. Sci.** 40: 1321-1354.

KARIGAR C., MAHESH A., NAGENAHALLI M. and Tun D. J., 2006. Phenol Degradation by Immobilized Cells of *Arthrobacter citreus*. **Biodegradation**. 17: 47–55.

KHOO K. M. and TING Y. P., 2001. Biosorption of Gold by Immobilized Fungal Biomass. **Biochem. Eng. J.** 8: 51–59.

KIM D. Y. and RHEE Y. H., 2003. Biodegradation of Microbial and Synthetic Polyesters by Fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61: 300–308.

KING G. and GOOSEN M. F. A., 1993. Immobilization Technology: An Overview. In: Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization. Ed. Goosen M. F. A., CRC Press. Boca Raton.



KONDO M., SUZUKI Y. and KATO H., 1988. Vinegar Production by *Acetobacter* cells Immobilized on Ceramic Honeycomb-Monolith. **Hakkōkōgaku Kaishi**. 66: 393-399.

KONG H. J., SMITH M. K. and MOONEY D. J., 2003. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. **Biomaterials**. 24: 4023-4029.

KOURKOUTAS Y., BEKATOROU A., BANAT I. M., MARCHANT R., KOUTINAS A. A., 2004. Immobilization Technologies and Support Materials Suitable in Alcohol Beverages Production: A Review. **Food Microbiology**. 21: 377-397.

KUO C. K. and MA P. X., 2001. Ionically Crosslinked Alginate Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering: Part I. Structure, Gelation Rate and Mechanical Properties. **Biomaterials**. 22: 511-521.

LEBEAU T., JOUENNE T. and JUNTER G. A., 1998. Diffusion of Sugars and Alcohols Through Composite Membrane Structures Immobilising Viable Yeast Cells. **Enzyme Microb. Technol.** 22: 434-438.

LEE K. Y. and MOONEY D. J., 2001. Hydrogels in Tissue Engineering. **Chem. Rev.** 101: 1869-1879.

LILLY D. N. and BARNET H. L., 1951. Physiology of The Fungi. McGraw-Hill Book Co. 1st ed. New York.

LINKER A. and JONES R. S., 1964. A Polysaccharide Resembling Alginic Acid from a *Pseudomonas* Microorganism. **Nature**. 204: 187-188.

LODATO P., SEGOVIA De HUERGO M. and BUERA M. P., 1999. Viability and Thermal Stability of a Strain of *Saccharomyces cerevisiae* Freeze-Dried in Different Sugar and Polymer Matrices. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52: 215–220.

LU Y. and WILKINS E., 1996. Heavy Metal Removal by Caustic-treated Yeast Immobilized in Alginate. **J. Hazard. Materials.** 49: 165–179.

LYNGBERG O. K., THIAGARAJAN V., STEMKE D. J., SCHOTTEL J. L., SCRIVEN L. E. and FLICKINGER M. C., 1999. A Patch Coating Method for Preparing Biocatalytic Films of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.** 62: 44–55.

MANDAL S. K. and BENERJEE P. C., 2005. Submerged Production of Oxalic Acid from Glucose by Immobilized *Aspergillus niger*. **Process Biochem.** 40: 1605-1610.

MEHTA S. K. and GAUR J. P., 2001. Removal of Ni and Cu from Single and Binary Metal Solutions by Free and Immobilized *Chlorella vulgaris*. **Europ. J. Protistol.** 37: 261–271.

MEHYAR G. F., DELAÏMY K. S. and IBRAHIM S. A., 2005. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Date-Based Medium Fortified with Whey and Additives. **Food Biotechnol.** 19: 137–144.

MELZOCH K., RYCHTERA M. and HABOVA V., 1994. Effect of Immobilization Upon the Properties and Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **J. Biotechnol.** 32: 59–65.

MESSING R., OPPERMAN R. A. and KOLOT F. B., 1979. Pore Dimensions for Accumulating Biomass, in Immobilized Microbial Cells. **Am. Chem. Soc. Symp. Ser.** 106: 13-28.

MIELGO I., MOREIRA M. T., FEIJOO J. M. and LEMA J. M., 2002. Biodegradation of a Polymeric Dye in a Pulsed Bed Bioreactor by Immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Res.** 36: 1896–1901.

MIRANDA M. P., BENITO G. G., CRISTOBAL N. S. and NIETO C. H., 1996. Color Elimination from Molasses Wastewater by *Aspergillus niger*. **Biores. Technol.** 57: 229-235.

MITZ M. A, 1956. New Insoluble Active Derivative of an Enzyme as a Model for Study of Cellular Metabolism. **Science.** 123: 1076-1077.

MOHAN S., MA P. W. F. and LUTHE D. S., 2005. Rapid qualitative protease microassay (RPM). **J. Biochemical and Biophysical Methods.** 64: 182-188.

MORESI M., BRUNO M. and PARENTE E., 2004. Viscoelastic Properties of Microbial Alginate Gels by Oscillatory Dynamic Tests. **J. Food Eng.** 64: 179–186.

NAVARRO J. M. and DURAND G., 1977. Modification of Yeast Metabolism by Immobilization Ontoporous Glass. **Eur. J. Appl. Microbiol.** 4: 243-254.

NELSON J. M. and GRIFFIN E. G., 1916. Adsorption of Invertase. **J. Chem. Soc.** 38: 1109-1115.

**NOJIMA S., 1983. The Development of Alcohol Fermentation by Immobilized Living Cells.** Chem. Econ. Eng. Rev. **15(4): 17–22.**

NORTON S. and D'AMORE T., 1994. Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 365-375.

O'NEIL C., HAWKES F. R., HAWKES D. L., LOURENCO N. D., PINHERIO H. M. and DELEE W., 1999. Colour in Textile Effluents-Sources, Measurement, Discharge Consents and Simulation: A Review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 1009–1018.

OHMOMO S., KANEKO Y., SIRIANUNTAPIBOON S., SOMCHAI P. and ATTHASAMPUNNA P., 1987. Decolorization of Molasses Waste Water by a Thermophilic Strain, *Aspergillus fumigatus* G-2-6. **Agric. and Biol. Chem.** 51: 3339-3346.

OSUGA J., MORI A. and KATO J., 1984. Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* Cells Entrapped in a  $\kappa$ -Carrageenan Gel. **J. Ferment. Technol.** 62: 139-149.

PAPAGIANNI M. and MATTEY M., 2004. Physiological Aspects of Free and Immobilized *Aspergillus niger* Cultures Producing Citric Acid Under Various Glucose Concentrations. **Process Biochem.** 39: 1963-1970.

PARASANCODOLA P. and De ALTERIIS E., 1996. Patterns of Growth and Respiratory Activity of *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) Cells Growing Entrapped in an Insolubilized Gelatin Gel. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 23: 7–12.

PARIZA M. W. and JOHNSON E. A., 2001. Evaluating The Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** 33: 173–186.

PASHOVA S., SLOKOSKA L. S., KRUMOVA E. and ANGELOVA M., 1999. Induction of Polymethylgalacturonase Biosynthesis by Immobilized Cells of *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 535-540.

PEELA S., KURADA V. B. and TERLI R., 2005. Studies on Antagonistic Marine Actinomycetes from the Bay of Bengal. **W. J. Microbiol. Biotechnol.** 21: 583–585.

PEPPAS N. A., 1987. Hydrogells in Medicine and Pharmacy, Vols 1-3. CRC Press. Boca Raton.

PEREIRA C. I., CRESPO M. T. B. and ROMAO M. V. S., 2001. Evidence for Proteolytic Activity and Biogenic Amines Production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochi*. **Int. J. Food Microbiol.** 68: 211–216.

PILKINGTON P. H., MARGARITIS A., MENSOUR N. A. and RUSSELL N. A., 1998. Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. **J. Inst. Brew.** 104: 19-31.

QUAN C. S., FAN S. D. and OHTA Y., 2003. Immobilization of *Candida krusei* Cells Producing Phytase in Alginate Gel Beads: An Application of The Preparation of Myo-inositol Phosphates. **Appl. Microb. Biotechnol.** 62: 41-47.

RADHA K. V., REGUPATHI I., ARUNAGIRI A. and MURUGESAN T., 2005. Decolorization Studies of Synthetic Dyes Using *Phanerochaete chrysosporium* and Their Kinetics. **Process Biochem.** 40: 3337–3345.

RAGHUKUMAR C., MOHANDASS C., KAMAT S. and SHAILAJA M. S., 2004. Simultaneous Detoxification and Decolorization of Molasses Spent Wash by The Immobilized White-rot Fungus *Flavodan flavus* Isolated from a Marine Habitat. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 197–202.

RAMAKKRISNA S. V. and PRAKASHAM R. S., 1999. Microbial Fermentation with Immobilized Cells. **Curr. Sci.** 77: 87–100.

RAMAKRISHNA S. V., JAMUNA R. and EMERY A. N., 1993. Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells. **Appl Biochem Biotechnol.** 37: 275–282.

RAPER K. B. and FENNELL D. I., 1965. The Genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins. New York.

REES D. A., 1981. Polysaccharide Shapes and Their Interactions-Some Recent Advances. **Pure Appl. Chem.** 53: 1–14.

RHIM J. W., 2004. Physical and Mechanical Properties of Water Resistant Sodium Alginate Films. **Lebensm. Wiss. Technol.** 37: 323-330.

SABRA W., ZENG A. P. and DECKWER W. D., 2001. Bacterial Alginate: Physiology, Product Quality and Process Aspects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 315–325.

SAKANO Y., HIGUCHI M. and KABAYASHI T., 1972. Pullulan 4-glucanohydrolase from *Aspergillus niger*. **Arch. Biochem. Biophys.** 153: 180–187.

SAMSON R. A. and PITT J. I., 2000. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers. ISBN: 90-5823-159-3. Amsterdam.

SANKPAL N. V., JOSHI A. P. and KULKARNI B. D., 2001. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Immobilized on Cellulose Microfibrils: Influence of Morphology and Fermenter Conditions on Productivity. **Process Biochem.** 36: 1129-1139.

SEPÚLVEDA T., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., GUTIÉRREZ-ROJAS M., MANZUR A. and FAVELA –TORRES E., 2002. Thermally Treated Low Density Polyethylene Biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. **J. Appl. Polym. Sci.** 83: 305–314.

SHIN K. S. and KIM C. J., 1998. Decolorisation of Artificial Dyes by Peroxidase from The White-rot Fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnol. Lett.** 20: 569–572.

SCHUSTER E., COLEMAN N. D., FRISVAD J. C. and DIJCK P. W. M., 2002. On The Safety of *Aspergillus niger*-A Review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 426–435.

SIMPSON N. E., GRANT S. C., GUSTAVSSON L., PELTONEN V. M., BLACKBAND S. J. and CONSTANTINIDIS I., 2006. Biochemical Consequences of Alginate Encapsulation: A NMR Study of Insulin-Secreting Cells. **Biomaterials.** 27: 2577–2586.

SIRIANUNTAPIBOON S., ZOHSALAM P. and OHMOMO S., 2004. Decolorization of Molasses Wastewater by *Citromyces* sp. WR-43-6. **Process Biochem.** 39: 917–924.

SMIDSRØD O. and DRAGET K. I., 1996. Chemistry and Physical Properties of Alginates. **Carbohydr. Eur.** 14: 6–13.

SOARES C. H. L. and DURAN N., 1998. Degradation of Low and High Molecular Mass Fraction of Kraft E1 Effluent by *Trametes villosa*. **Environ. Technol.** 19: 883–891.

SREE N. K., SRIDHAR M., SURESH K., BANAT I. M. and RAO V., 2000. High Alcohol Production by Repeated Batch Fermentation Using an Immobilized Osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Microbiol. Biotechnol.** 24: 222–226.

SRINIVASULU B., ADINARAYANA K. and ELLAIAH P., 2003. Investigations on Neomycin Production With Immobilized Cells of *Streptomyces marinensis* Nuv-5 in Calcium Alginate Matrix. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** 4: 1–6.

SULKOWSKI E. and LASKOWSKI M., 1974. Venom Exonuclease (Phosphodiesterase) Immobilized on Concanavalin-A-Sepharose. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 57: 463-468.

SUMATHI S. and MANJU B.S., 2001. Fungal Mediated Decolorization of Media Containing Procion Dyes. **Water Sci. Technol.** 43: 285–290.

SWAMY J. and RAMSAY J. A., 1999. The Evaluation of White Rot Fungi in The Decolorization of Textile Dyes. **Enzyme Microb. Biotechnol.** 24: 130–137.

TANAKA A. and KAWAMOTO T., 1999. Cell and Enzyme Immobilization. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Ed. DEMAIN A. L. and DAVIES J. E., American Society for Microbiology. ISBN 1-55581-128-0. Washington.

TANAKA H., IRIE S. and OCHI H., 1989. A Novel Immobilization Method for Prevention of Cell Leakage from Gel Matrix. **J. Ferment. Bioeng.** 68: 216-219.

TAY A. and YANG S. T., 2002. Production of L(+)-Lactic acid From Glucose and Starch by Immobilized Cells of *Rhizopus oryzae* in a Rotating Fibrous Bed Bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** 80: 1–12.



TELEFONCU A., 1997. Enzimoloji Lisans Üstü Yaz Okulu Notları. Ege Üniversitesi, İzmir.

THANH N. C. and SIMARD R. E., 1973. Biological Treatment of Domestic Sewage by Fungi. **Mycopathol. Mycol. Applicata**. 51: 223–232.

TOPE A. M., JAMIL K. and BAGGI T. R., 1999. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by Immobilized and Resting Cells of *Artrobacter* sp. **J. Hazard. Subs. Res.** 2: 1–9.

TSEKOVA K. and ILIEVA S., 2001. Copper Removal from Aqueous Solution Using *Aspergillus niger* Mycelia in Free and Polyurethane-bound form. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55: 636–637.

VAIDYA A. A. and DATYE K. V., 1982. Environmental Pollution During Chemical Processing of Synthetic Fibbers. **Colourate**. 14: 3–10.

VEDDER E.B., 1915. Starch agar, a useful culture medium. **J. Infectious Diseases**. 18: 385-388.

WAFAA M. E. R. and HASSAN M., 2003. Enhancing Bioremoval of Textile Dyes by Eight Fungal Strains from Media Supplemented with Gelatine Wastes and Sucrose. **J. Basic Microbiol.** 43: 367– 375.

[www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)

XINJIAO D. and WENHAI C., 2003. Decolorization of Anthraquinone Dye by *Aspergillus ficuum* in Various Physiological States. **J Environ. Biol.** 24(2):181-186.

YAMAMURA H., HAYAKAWA M. and IIMURA Y., 2003. Application of Sucrose-Gradient Centrifugation for Selective Isolation of *Nocardia* spp. from Soil. **J. Appl. Microbiol.** 95: 677–685.

YAN G. and VIRARAGHAVAN T., 2001. Heavy Metal Removal in a Biosorption Column by Immobilized *M. rouxii* Biomass. **Biores. Technol.** 78: 243–249.

YANG F. C. and YU J. T., 1996. Development of a Bioreactor System Using an Immobilized White Rot Fungus for Decolorization. **Bioprocess Eng.** 15: 307–310.

ZOUARI H., LABAT M. and SAYADI S., 2002. Degradation of 4-chlorophenol by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* in Free and Immobilized Cultures. **Biores. Technol.** 84: 145–150.

ZHANG F. M., KNAPP J. S. and TAPLEY K. N., 1999. Development of Bioreactor Systems for Decolorization of Orange II Using White Rot Fungus. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 48–53.

ZHENG Y. G., ZHANG X. F. and SHEN Y. C., 2005. Microbial Transformation of Validamycin A to Valienamine by Immobilized Cells. **Biocatalysis and Biotransformation.** 23(2): 71–77.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Araştırma Görevlisi Murat UYGUN 07.12.1978 yılında Aydın'da doğdu. İlk öğrenimini Aydın Güzelhisar İlköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Aydın Efeler Lisesi'nde tamamladı. 1997 yılında Ege Üniversitesi Biyokimya bölümünde lisans öğrenimine başladı. Bu bölümden bir yıl İngilizce hazırlık sınıfı okuyarak 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda lisans üstü öğrenimine başladı. 2005 yılından itibaren Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak lisansüstü öğrenimine devam etmektedir.