

Sürekli Sistem Fermentörde Mikrobiyal Rennin Üretimi ve Aktivitenin Modellenmesi

Haluk BEYENAL, Şule ŞEKER, Fatma AYHAN, Abdurrahman TANYOLAÇ

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü,
06532, Beytepe, Ankara-TÜRKİYE

Bekir SALİH

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü
06532 Beytepe, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi 05.05.1997

Özet

Bu çalışmada süt pıhtılaştırıcı bir enzim olan renninin *Mucor miehei*'nin ticari bir kültüründen (NRRL 3420) mikrobiyal üretimi sürekli sistem fermentörde incelenmiştir. Fermentörde kültürün topaklaşarak küresel formda büyümesi sağlanmış, ortam pH'ı, karıştırma hızı (KH), seyrelme hızı (D) ve besleme D-glikoz derişimi (S_{gf}) parametrelerinin süt pıhtılaştırma aktivitesi (S.P.A) üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Optimum üretim parametreleri 37°C'da, 1.24 IU/mL S.P.A. içeren fermentasyon çözeltisi için KH=400 rpm, D=0.125 gün⁻¹ ve $S_{gf} = 7.5$ g/L olarak bulunmuş ve pH kontrolü yapılmayan sürekli sistem fermentörde 575 saatte toplam 10230 IU S.P.A. enzim üretimi yapılmıştır. Fermentasyon çözeltisinde yapılan incelemelerde bulunan R faktörü (1.55×10^{-3} S.P.A./P.A) ve özgül S.P.A. (5.28 IU/mg protein) değerleri, enzimin saflaştırıldıktan sonra ticari maya aktivitesine ulaşabileceğini göstermektedir. Yapılan model çalışmalarında ulaşılan maksimum S.P.A. değerleri, üretimin gerçekleştiği ortam pH'ı, D-glikoz ve çözülmüş oksijen derişimleri ve seyrelme hızının fonksiyonu olarak ifade edilen çoklu doğrusal bir modelle mükemmel uyum sağlamış ve bu model enzim üretimini işletim parametrelerinden ziyade fermentasyon ortam parametrelerinin denetlediğini kanıtlamıştır.

Anahtar Sözcükler: Rennin, Süt Pıhtılaştırma, Peynir, *Mucor miehei*, Biyofilm

Production of Microbial Rennin in a Continuous System Fermenter and Modelling of the Activity

Abstract

In this work microbial production of rennin, a milk clotting enzyme, from a commercial strain of *Mucor miehei* (NRRL 3420, USDA) has been investigated in a continuous fermenter. The spherical biofilm type growth of the culture has been accomplished in the fermenter and the effects of operational parameters; medium pH, mixing rate (K.H.), dilution rate (D) and feed D-glucose concentration (S_{gf}) on milk clotting activity (S.P.A.) have been elaborated. For a fermenter sample containing 1.24 IU/mL S.P.A., optimum production parameters at 37°C have been determined as K.H.=400 rpm, D=0.125 day⁻¹ and $S_{gf}=7.5$ g/L without pH control. Under these conditions, the fermenter operated 575 hours continuously producing 10230 IU S.P.A. in total. In the fermenter sample, R factor and specific S.P.A. were determined as 1.55×10^{-3} S.P.A./P.A. and 5.28 IU/mg protein, respectively, denoting competitive activity of a commercial rennet after concentration. In model simulation studies of the results, maximum S.P.A. obtained has been successfully represented with a multiple-linear function expressed in terms of fermentation medium pH, D-glucose and dissolved oxygen concentrations and dilution rate. Model simulations also showed that enzyme production rate was solely controlled by fermentation medium characteristics rather than operational fermenter parameters.

Key Words: Rennin, Milk Clotting, Cheese, *Mucor miehei*, Biofilm.

Giriş

Mikrobiyal yolla enzim üretimi, günümüzde artan bir kapasiteyle endüstriyel alanda kendine büyük bir uygulama alanı yaratmakta ve hayvansal kökenli rennin enzimi açığının kapatılması ancak mikrobiyal yöntemle üretimden geçmektedir (Sardinas, 1968, 1972). Peynir mayası olarak da adlandırılan enzim preparatı rennet, sütün peynir yapısına dönüşmesini sağlayan, pıhtı oluşmasında temel görevi üstlenen proteolitik karakterli hücre dışı bir enzimdir. Peynir üretim aşamasında rennin enziminin esas itibarıyla, sütün kazeininin çöktürülmesinde rol oynadığı ve bu etkisinin Ca^{+1} varlığında arttığı da bilinmektedir (McMahon (1984a), Okigbo (1985), Topal (1985), Dönmez ve Özçelik (1986)).

Reed (1969) tarafından *Mucor hemoris*, *Mucor pisullus*, *Mucor miehei* ve *Endothia parasitica* gibi küfler ve *Basillus subtilis* gibi bakterilerle yapılan mikrobiyal rennin üretimi çalışmaları başarıya ulaşmıştır. Whitaker (1972) tarafından da *Mucor pisullus* ve *Endothia parasitica* kültürleri kullanılarak peynir üretiminde kullanılabilen mikrobiyal rennet üretimi gerçekleştirilmiştir. Melachours (1968) araştırmalarında *Basillus cereus*'tan elde edilen mikrobiyal ve hayvansal renneti karşılaştırmış ve bu mikrobiyal rennin pH'a daha az duyarlı olduğu, maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesini 40-45 °C'de verdiğini saptamıştır. Yerli şirdenleri ve bunlardan yapılan peynir mayalarını inceleyen Uraz (1976) yurdumuzda sıvı şirden mayaların genellikle sahip olmaları gereken nitelikleri taşımadıklarını ve mikrobiyolojik kalitelerinin düşük olduklarını belirtmiştir. Prins (1970) uygun şartlar sağlanarak *Mucor miehei*'den geliştirilen enzime "rennilase" adını vermiş ve *Mucor pisullus*'tan üretilen mikrobiyal enzime kıyasla $CaCl_2$ varlığına daha az duyarlı olduğu saptanmıştır. Sternberg (1971) *Mucor miehei* kökenli rennin kristal halde üretimi ve bunun bazı özellikleri üzerinde çalışmıştır. Wieland (1972) *Mucor miehei*, *Mucor pisullus* ve *Mucor rhizopus* gibi küf türlerinden proteaz üretilebileceğini ve bunların proteolitik aktivitelerinin düşük olduğu halde süt pıhtılaştırma aktivitelerinin yüksek olduğunu, bunun da, bu suların sütteki κ -kazeine spesifik enzimi yüksek miktarda üretme özelliğinden ileri geldiğini belirtmiştir. Thakur ve arkadaşlarının (1990) katı hal fermentasyon koşullarında termofilik *Mucor miehei* suşu ile yaptıkları araştırmada erlen deneylerine yakın süt-pıhtılaştırma enzim aktivitelerine ulaşılmıştır. Başka bir çalışmada (Escobar ve Barnett (1993)) substrat tüketimi, sub-

strat tüketim hızı ve hücre ve enzim konsantrasyonu gibi kinetik parametreler farklı karıştırma hızlarında incelenmiştir. Üretim ve üreme arasındaki ilişki incelenerek ürün üretiminin üremenin hangi aşamasından itibaren başladığı da aynı çalışma kapsamında araştırılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise peynir oluşum mekanizması, yeni kültürler ve bu kültürlerin verimlerinin artırılmasına, ilişkin genetik çalışmaları içermektedir (McMahon (1984b), Bailey (1988), Carlson (1987), Bio Industrial Group (1989)).

Bu çalışmada bir asit proteaz olan rennin enziminin *Mucor miehei*'den mikrobiyal üretimi sürekli sistemde çalışan karıştırmalı fermentörde gerçekleştirilmiş ve küresel formda büyütülen bu kültürden rennin enziminin üretimi optimize edilmiştir. Bu amaca uygun olarak sistem parametrelerinin (ortamın glikoz ve oksijen derişimleri, pH, karıştırma hızı) enzim aktivitesine olan etkisi öngörülen seyrelme hız aralığında incelenmiş, maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesini ve üretim süresini veren çalışma koşulları belirlenmiştir. Sürekli sistem fermentör deney sonuçları bilgisayar ortamında irdelenerek enzim üretimine etki eden koşullar belirlenmiş ve sistem a matematiksel olarak modellenmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada *Mucor miehei*'nin yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi gösteren ticari bir suşu (NRRL 3420) USDA, Agricultural Research Service'den freeze-dried formda temin edilmiştir. Mikroorganizmanın Tablo 1'de bileşimi verilen steril besiyeri içeren erlenlere ekimi yapılmadan önce, temin edildiği kültür merkezinin (Northern Region Research Laboratories, U.S.Division of Agriculture) önerdiği patates dekstroz agarlı katı besi ortamında büyüterek sporlanması sağlanmıştır (agar/saf su oranı:39 g agar/1 L saf su).

Metot

Literatürde verilen standart yöntemler kullanılarak fermentasyon ortamında süt pıhtılaştırma aktivitesi (S.P.A.) (Payens, 1984, McMahon, 1984b), proteolitik aktivite (P.A.) (Mickelsen, 1969, Takamine, 1984) ve toplam protein (Lowry, 1951, Bensadoun, 1976) tayinleri gerçekleştirilmiştir. Reaktörden alınan örneklerdeki glikoz derişimi

Reflolux[®] marka glikometre ile, amonyum iyonu derişimi Crison[®] marka iyon analizörü ve Cole Parmer[®] marka amonyum elektrodu ile, çözünmüş oksijen derişimi ise reaktöre daldırılmış konumda bulunan Gallenkamp[®] marka çözünmüş oksijen elektrodu ile saptanmıştır.

Tablo 1. Erlen Deneylerinde Kullanılan Besi Ortamı.

Bileşen	Derişim (g/L)
D-glikoz	20.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.500
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.100
K ₂ HPO ₄	3.000
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	5.600
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.001
KCl	0.050
Maya özütü	2.000
Mikrobesi çözeltisi	2.0 ml
Mikro besi bileşimi	Derişim (g/L)
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	1.000
ZnSO ₄	1.000
MnSO ₄	0.500
CuSO ₄	0.080
CO ₂	0.100

İlk aşamada kültürün çalkalamalı erlenlerde değişen başlangıç D-glikoz ve amonyum sülfat derişimleri, ortam pH ve sıcaklık değerlerinde büyümesi sağlanarak S.P.A. ve P.A. tayinleri yapılmıştır. Bu deneylerden amaç sürekli fermentörde uygulanacak optimal pH ve sıcaklık değerlerini saptamak ve sürekli fermentör için karbon ve azot kaynaklarının derişim aralıklarını bulmaktır. Bu deneyler sünger tıpalı 250 ml'lik erlenlerde 75 vuru/dakika hızla çalışan çalkalayıcı su banyosunda yürütülmüştür. Ortam olarak Tablo 1'de bileşimi verilmiş sıvı besiyeri kullanılmış ve başlangıç D-glikoz, amonyum sülfat derişimleri sırayla 5-40 g/L ve 2-14 g/L, başlangıç pH'ı 4-8 ve ortam sıcaklığı 20-45°C aralığında değiştirilmiştir.

İkinci aşamada, belirlenen parametre aralıklarında çalışmak üzere sürekli sistem deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde; 5 L çalışma hacimli New Brunswick marka pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen kontrollü fermentör kullanılmıştır. Her bir deneyin başlaması için petriyer içerisinde bulunan kültür sporlarından erlenlere 10 ml (~4x10⁶ spor/ml) aşılma yapılarak, 75 vuru/dakika çalkalama hızında çalışan çalkalayıcı su banyosunda 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Ardından bu kültür, steril olarak hazırlanmış fermentöre % 10 (v/v) oranında aşılarak sürekli beslemeli fermentör deneyi başlatılmıştır. Öngörülen seyrelme ve karıştırma hızlarında pH, çözünmüş oksijen, biyokütle, glikoz, amonyum sülfat derişimleri sürekli olarak ölçülmüştür. pH kontrolü gerektiren deneylerde steril 0.1 N sodyum hidroksit ve 0.1 N sülfürik asit çözeltileri kullanılmıştır. Tüm deneyler steril koşullarda gerçekleştirilmiş, hazırlanan sıvı besiyeri ve ekipmanlar 121°C'de net 15 dakika süre otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır. Sürekli beslemeli fermentörde rennin enziminin üretimi reaktördeki glikoz, amonyum iyonu ve çözünmüş oksijen derişimleri, karıştırma hızı ve ortam pH'nın fonksiyonu olduğundan, bu parametrelerin derişimi ile elde edilen farklı S.P.A. değerlerinin doğrusal bir matematiksel modelle temsil edilmesi düşünülmüştür. Bu amaçla yapılacak deneylerde çalışma aralığı Tablo 2'de verildiği gibi düzenlenmiştir. En yüksek değerlerde ve uzun süre devamlı üretilen süt pıhtılaştırma aktivitesinin (S.P.A.) elde edildiği koşulların daha iyi saptanması amacıyla optimum karıştırma ve seyrelme hızlarında yalnız besleme D-glikoz derişiminin değiştirildiği bir seri deney gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde fermentöre yollanan taze besi ortam bileşiminde amonyum derişimi 1.25 g/L olarak sabit tutulmuş, D-glikoz ise 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 g/L olarak değiştirilmiş ve diğer ortam bileşenleri Tablo 1'deki derişim değerlerinde sabitlenmiştir.

Sürekli beslemeli fermentör deneylerinde elde edilen maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesinin (M.A., IU/mL) ve deney süresince üretilen toplam süt pıhtılaştırma aktivitesinin (T.A., IU) sürekli sistem fermentör çalışma parametrelerine olan bağımlılıkları standart çoklu doğrusal ifadelerle (Ertek, 1982) modellenerek araştırılmıştır. Sürekli fermentörde üretilen toplam aktivite zamana karşı değişen S.P. A.'ların integrasyonu ile elde edilmiş ve T.A. (IU)=D.V. \int (S.P.A.)dt şeklinde tanımlanmıştır.

Model iki farklı objektif fonksiyonla (M.A. ve T.A.), iki farklı durumda irdelenmiştir;

1. durumda gerçekleşen maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesi (M.A.) veya toplam süt pıhtılaştırma aktivitesi (T.A.), mikroorganizmanın etkilemediği sistem parametreleri cinsinden ifade edilmiştir. Bu parametreler; karıştırma hızı (K.H.), reaktör başlangıç glikoz derişimi (S_{g_i}), taze besleme D-glikoz derişimi (S_{g_f}) ve seyrelme hızı (D)'dir.

pH'nin kontrol edildiği deneylerde mikroorganizma topakları parçalanıp aktivite gözlenmediğinden dolayı, pH model içinde parametre olarak yer almamıştır.

2. durumda gerçekleşen maksimum süt pıhtılaştırma aktivites (M.A.) veya toplam süt pıhtılaştırma aktivitesinin (T.A.), maksimum M. A. anında ortamda ölçülen ve mikroorganizmanın etkilediği sistem parametreleri cinsinden ifadesi modelde yer almıştır. Bu parametreler; ortam pH'ı, glikoz derişimi (S_{gm}), çözülmüş oksijen derişimi (S_{om}) ve seyrelme hızı (D)'dir. Burada seyrelme hızı, operatör tarafından kontrol edilmesine karşın doğrudan pH, S_{gm} ve S_{om} üzerine etkili olmasından ötürü modele dahil edilmiştir. Sürekli beslemeli fermentörde yürütülen deneylerden model çalışması için 1. durumda 15 set veri ve 2. durumda ise 13 set veri elde edilmiştir. Model oluşumunda kullanılan matematiksel ifadeler; çoklu-doğrusal modelde sabit kat sayılı değişkenlerin yalın, ikili ve üçlü kombinasyonları şeklinde standart yöntemlerle oluşturulmuş (Ertek, 1982), ve anlatılan iki farklı durum için bilgisayar ortamında irdelenmiştir. Bunun için çoklu doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon yapabilen Systat® paket programı (Version 3, Systat Inc., USA) kullanılarak her kombinasyon ayrı ayrı denenmiş; deneysel verilere en iyi uyumu sağlayan ve istatistiksel analizlerle kanıtlanan modeller seçilmiştir. Doğru bir model kurulması amacıyla modeller oluşturulurken; parametre sayısı, veri sayısı ve modelin içerdiği terim sayısı gözönüne alınmıştır.

Sonuçlar ve Tartışma

Erlenlerde yürütülen ön deneylerde küresel formda topaklaşarak büyüyen kültürün 37°C'de, 3,0 g/L D-glikoz ve 1.25 g/L amonyum başlangıç derişimleri ve 6.8 başlangıç pH 'ında en yüksek (~ 6 IU/mL, 2400 Soxhlet Unit/ml) süt pıhtılaştırma aktivitesini (S.P.A.) ve 2000 PU/mL proteolitik aktivitesini (P.A.) gösterdiği saptanmıştır. Optimum sıcaklık olarak bulunan 37°C bütün sürekli sistem deneylerinde uygulanmıştır.

Proteolitik ve süt pıhtılaştırma aktivitesinin gözlenebildiği, literatürden saptanan pH 5-8 aralığında fermentörün 37°C'de pH kontrollu olarak çalıştırılması gerek S.P.A.'yı ve gerekse kültürün küresel formda büyümesini olumsuz yönde etkilediğinden çoğu deneyde ortam pH'ı kontrol edilmemiştir.

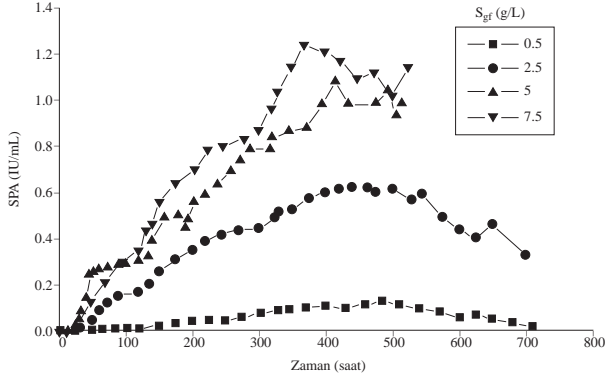
Sürekli beslemeli fermentörde karıştırma hızının topak oluşumunu ve çapını, çözülmüş oksi-

jen derişimini ve kütle aktarım hızlarını kontrol edeceği düşünülerek literatür deneyimi ile belirlenen 200-800 rpm aralığında değiştirilen karıştırma hızında 37°C'de pH kontrolü yapılmaksızın deneyler gerçekleştirilmiştir. 600 rpm ve daha yüksek karıştırma hızlarında oluşan topraklar dağılmış ve kültür sürekli ortamda büyütülmemiştir. 200 rpm'de düşük kalan karıştırma hızı, fermentörde yeterli kütle transfer hızını gerçekleştirilememiş ve çözülmüş oksijen derişimi ortamda çok azalarak S.P.A.'yı olumsuz etkilemiştir (maksimum S.P.A.=0.0133 IU/mL). 1 IU/mL gibi yüksek bir S.P.A. veren 400 rpm diğer deneyler için değişmez karıştırma hızı olarak seçilmiştir.

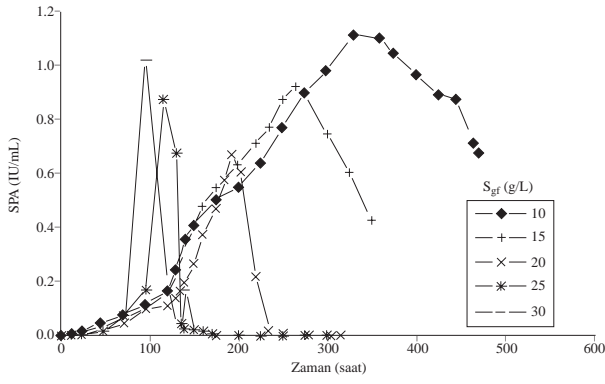
Sürekli sistem fermentörde ortam substrat derişimlerini ve kontrol edilmediği durumda pH'ı etkileyen seyrelme hızının (D) maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesine (MA) ve toplam aktivite (T.A.) üretimine etkisinin belirlenmesi için D, 0.06-0.25 gün⁻¹ aralığında değiştirilmiştir. Çok uzun alkonma süresinin (düşük seyrelme hızının) ortam substrat derişimlerini enzim üretemeyecek kadar düşürdüğü, kısa alkonma süresinin de ortam enzim derişimini seyrelttiği sonucuna varılmış ve en ideal seyrelme hızı 0.125 gün⁻¹ olarak saptanmıştır. Ayrıntılı olarak incelenen son parametre bu seyrelme hızında gerçekleştirilmiştir.

pH kontrolü yapılmaksızın, 400 rpm karıştırma ve 0.125⁻¹ seyrelme hızlarında reaktöre gönderilen sıvı besiyerindeki D-glikoz derişiminin etkisi 37°C'de bir seri deneyle incelenmiş ve gözlenen enzim aktivitesi zamana karşı Şekil 1a ve Şekil 1b'de grafiğe geçirilmiştir.

Grafiklerdeki genel eğilim beslemedeki D-glikoz derişimi düştükçe enzim aktivitesinin azalması, fakat üretimin devam ettiği zaman aralığının genişlemesidir. Ancak ilk eğilim 15 g/L'den sonra değişmiş düşen D-glikoz derişimi ile 7.5 g/L'ye kadar enzim aktivitesi artmış ve üretim zaman aralığı da genişlemiştir. Bu derişimden sonra azalan besleme D-glikoz derişim miktarları enzim aktivitesini düşürürken, üretim bandı genişlemeye devam etmiştir. Azalan besleme D-glikoz derişimiyle hiç değişmeyen eğilim ise maksimum aktivitenin gerçekleştiği sürenin (t_{max}) uzamasıdır. Gerek ulaşılan enzim aktivitesi ve gerekse ortalama üretim hızı açısından en iyi besleme D-glikoz derişimi 7.5 g/L'dir.



Şekil 1a. Besleme Akımındaki Farklı D-glikoz Derişimlerinde Gözlenen Süt Pıhtılaştırma Aktivitesinin Zamanla Değişimi ($S_{gf} = 0.5 - 7.5$ g/L, $D=0.125$ gün⁻¹, $KH=400$ rpm).

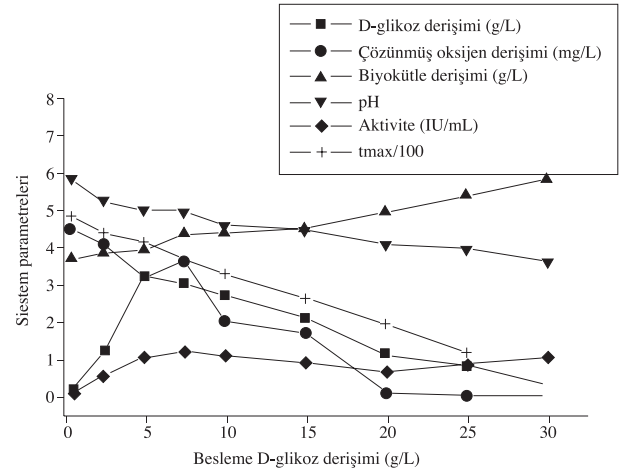


Şekil 1b. Besleme Akımındaki Farklı D-glikoz Derişimlerinde Gözlenen Süt Pıhtılaştırma Aktivitesinin Zamanla Değişimi ($S_{gf} = 10 - 30$ g/L, $D=0.125$ gün⁻¹, $KH=400$ rpm).

Şekil 2 ise maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesinin (S.P.A.) elde edildiği durumdaki sistem parametre değerlerini (pH, S_{gm} , S_{om} , X_m , S.P.A. ve t_{max}) göstermektedir. 7.5 g/L D-glikoz besleme derişiminde 1.235 IU/mL değeriyle, S.P.A. maksimum olarak gerçekleşmiştir. Bu maksimum aktiviteyi veren noktada $S_{gm}=3.04$ g/L, $S_{om}=3.64$

mg/L, pH=4.48 ve $X_{gm}=4.37$ g/L'dir ve deneyde enzim üretimi 48-515. saatler arasında devam etmiştir.

7.5 g/L D-glikoz besleme derişiminde üretilen deriştirilmemiş renninin, deriştirilmiş bir piyasa ürünü olan ve hayvansal kökenli rennet içeren Pınar[®] ticari mayasıyla karşılaştırılması Tablo 3'de verilmektedir. Tablodaki sonuçlara göre üretilen enzimin mayalama kuvveti ticari enzime göre 23 kat azdır, ancak uygun R katsayısı enzimin iyi bir maya olabileceğini göstermektedir. Özgül S.P.A. değerinin (5.28 IU/mg protein) ticari eşdeğerinden küçük olması, fermentasyon ortamında başka proteinlerin de olduğunu, ancak deriştirme işleminde sonra ticari enzimle aynı spesifik aktiviteyi sağlayabileceği izlenimini vermektedir.



Şekil 2. Maksimum Süt Pıhtılaştırma Aktivitesinin elde Edildiği Durumdaki Sistem Parametre Değerlerinin Besleme D-glikoz Derişimi ile Değişimi

Matematiksel modelleme bölümünde daha önce ayrıntısı verilen her iki durum için en uyumlu maksimum (M.A.) ve toplam (T.A.) enzim aktivitesini veren modellerin aşağıdaki ifadeler şeklinde olduğu saptanmıştır.

Tablo 2. Sürekli Sistem Fermentördeki Çalışma Aralıkları

Deęişken	Çalışma aralığı
Başlangıç ve besleme glikoz derişimi	0.5-30 g/L
pH	5-8
Reaktör karıştırma hızı	200-800 rpm
Seyrelme hızı	0.06-0.25 gün ⁻¹

Tablo 3. $S_{gf}=7.5$ g/L Olarak Yürütülen Sürekli Sistem Deneyinde Üretilen Deriştirilmemiş Enzimle Ticari Enzimin Karşılaştırılması

Nitelik	NRRL 3420 ¹	Ticari enzim ²
S.P.A (IU/mL)	1.24	28.90
Toplam protein (mg/mL)	0.235	4.11
S.P.A/Toplam protein (IU/mg)	5.28	7.05
P.A/Toplam protein (PU/mg)	3400	2985
R=S.P.A/P.A.(IU/PU)	1.55×10^{-3}	2.36×10^{-3}

(1) Deriştirilmeden, fermentasyon ortamından alındığı gibi, (2) Deriştirilmiş
1.Durum: M.A. ve T.A. objektif fonksiyon ve bağımsız değişkenler; K.H., S_{gi} , S_{gf} ve D.

$$MA = W_1xS_{gf} + W_2xS_{gi} + W_3xD + W_4xKH + W_5x(S_{gf})^2 + W_6x(S_{gi})^2 + W_7x(D)^2 + W_8x(KH)^2 \quad (1)$$

$$W_1 = -17.016, W_2 = 17.078, W_3 = 3.194, W_4 = 0.002, W_5 = 0.492, W_6 = -0.494, \\ W_7 = -15.238, W_8 = -0.000 \\ R = 0.920$$

$$TA = X_1xS_{gf} + X_2xS_{gi} + X_3xD + X_4xKH + X_5x(S_{gf})^2 + X_6x(S_{gi})^2 + X_7x(D)^2 + X_8x(KH)^2 \quad (2)$$

$$X_1 = 86.443, X_2 = 216.810, X_3 = 28500.705, X_4 = 15.866, X_5 = -4850, X_6 = -12.927, \\ X_7 = -95095.709, X_8 = -0.020. \\ R = 0.899$$

2. Durum: M.A. ve T.A. objektif fonksiyon ve bağımsız değişkenler; S_{gm} , S_{go} , pH ve D.

$$MA = Y_1xS_{gm} + Y_2xS_{go} + Y_3xpH + Y_4xD + Y_5xS_{gm}xD + Y_6xS_{go}xD + Y_7xpHxD \quad (3)$$

$$Y_1 = -1.874, Y_2 = -5.603, Y_3 = 3.508, Y_4 = 33.362, Y_5 = 16.502, Y_6 = 46.785, Y_7 = -35.228. \\ R = 0.998, \text{ Standard Hata} = 0.075$$

$$TA = Z_1xS_{gm} + Z_2xS_{go} + Z_3xpH + Z_4xD + Z_5xS_{gm}xS_{go} + Z_6xS_{gm}xpH + Z_7xS_{gm}xD + Z_8xS_{go}xpH + Z_9xS_{go}xD + Z_{10}xpHxD \quad (4)$$

$$Z_1 = -8231.348, Z_2 = 878.448, Z_3 = 7052.969, Z_4 = -8391.377, Z_5 = 520.947, Z_6 = 447.563, \\ Z_7 = 43350.710, Z_8 = -1715.747, Z_9 = 62023.919, Z_{10} = -51348.727. \\ R = 0.994, \text{ Standard Hata} = 1134.770$$

1-4. eşitliklerde yer alan matematiksel ifadeler modele katılan tüm parametrelerin yalnız, ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşturulan set içinde en iyi uyumu veren matematiksel ifadelerdir. 1. durumda en fazla 15, 2. durumda ise en fazla 13 parametrenin modele dahil edildiği işlemlerde, uyum için

en yüksek regrasyon katsayısına ($R \approx 1$), en uygun T testine ($T > 3$), istatistiki tablolardaki F oranına ve P değerine ($P < 0.05$) sahip olan ifade en uygun model olarak seçilmiştir. Elde edilen model sonuçları ile deneysel veriler Tablo 4’de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Tablo 4. Deneysel ve modelden hesaplanan maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesi (M.A.) ve toplam aktivite (T.A.) değerlerinin karşılaştırılması

1.DURUM				2.DURUM			
M.A.(IU/mL)		T.A.(IU)		M.A.(IU/mL)		T.A.(IU)	
Deneysel	Hesaplanan (Eşitlik 1)	Deneysel	Hesaplanan (Eşitlik 2)	Deneysel	Hesaplanan (Eşitlik 3)	Deneysel	Hesaplanan (Eşitlik 4)
0.013	0.467	74.624	-147.662	0.010	0.038	7.255	34.786
1.000	0.867	483.581	625.538	1.000	1.022	783.581	874.454
0.000	1.267	0	-201.262	0.025	0.013	24.313	-20.756
0.010	0.846	7.255	-41.353	0.008	0.003	6.866	6.874
0.025	0.769	24.313	549.494	0.124	0.118	1065.618	1255.224
0.008	0.552	6.866	-269.485	0.621	0.605	7329.443	6871.946
0.124	0.992	1065.618	5373.438	1.078	1.078	8516.295	9046.002
0.621	1.105	7329.443	5874.424	1.235	1.239	10229.55	10057.33
1.235	1.317	10229.55	6501.370	1.112	1.061	7411.108	6275.386
1.112	1.386	7411.108	6466.183	0.920	0.954	3952.659	5309.155
0.920	1.441	3952.659	5744.225	0.670	0.740	1194.040	788.126
0.670	1.399	1194.04	4132.302	0.870	0.783	743.710	697.967
0.870	1.259	743.7097	1652.739	1.030	1.022	823.995	874.454
1.03	1.044	823.995	-1376.090				
1.08	1.223	8516.295	6299.949				

1. durumda M.A. ve T.A. için elde edilen en uygun eşitlikler sonuçları temsil etmekten uzaktır. Regrasyon katsayıları ~ 0.9 civarında olan bu iki modelin mikroorganizmanın etkilemediği sürekli sistem işletim parametrelerinin (karıştırma hızı, fermentör başlangıç glikoz derişimi, taze besleme glikoz derişimi ve seyrelme hızı) ulaşılan maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesini (M.A.) veya toplam süt pıhtılaştırma aktivitesini (T.A.) belirleyemeyeceği anlaşılmıştır.

2. durumda M.A. ve T.A. için elde edilen modellerdeki bağımsız değişkenler, küresel formda büyüyen kültür topraklarının çevresindeki koşullardan (ortam pH’ı, glikoz ve çözünmüş oksijen derişimleri ve seyrelme hızı) oluşmaktadır. Maksimum aktiviteyi veren model (Eşitlik 3) deneysel sonuçlara mükemmel yakın bir şekilde uyumaktadır (P ; her terim için < 0.05 | T |; her terim için > 6 ve $F=211.306$). Bu modeldeki terimler ayrı ayrı incelendiğinde özellikle glikoz derişiminin

modelde çok etkin olduğu görülmektedir. Diğer değişkenlerden çözünmüş oksijen derişimi, pH ve bu parametreleri değiştirebilen seyrelme hızı eş ağırlıklı bir etkiye sahiptir. ikili kombinasyon terimleri sadece seyrelme hızı ile anlamlı sonuç vermiş, en kuvvetli etkiye sahip terim yine ($S_{gm}xD$) terimi olmuştur. Bu model kullanılarak daha yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesini veren ortam değişkenleri daha duyar olarak bulunabilir veya ulaşılan çalışma koşullarının sağlayabileceği enzim aktivitesi deney öncesi öngörülebilir. Ancak bu çıkarımların istatistiki olarak seçilecek noktalarda deneysel olarak sınanması ve daha sonra genelleştirilmesi gerekir.

2. durumda toplam üretilen aktivite (T.A.) için, bulunan en iyi M.A. modelinde gözlenen uyuma ulaşılmamıştır. Bunun nedeni; maksimum enzim aktivitesini duyar olarak saptayabilen sistem parametrelerinin, tüm fermentasyon süresi boyunca maksimum aktivitenin gerçekleştiği değerlerden çok farklı olabilmesidir. Ancak maksimum aktivitenin

gerçekleştiği koşullar net olarak belirlendiğinde bu koşullar T.A. için hazırlanan modelde (4) yerine konularak, üretilecek toplam aktivite pratik olarak öngörülebilir. Zaten deneysel sonuçlar da maksimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği koşullarda maksimum toplam aktivite elde edildiğini göstermektedir (Şekil 1a, b ve 2).

Bu çalışma TOG-TAG 1279 nolu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Yazarlardan Haluk Beyenal ve Şule Şeker TÜBİTAK'ın doktora burs programı tarafından desteklenmektedir.

Semboller

D	Seyrelem hızı, gün ⁻¹
K.H.	Karıştırma hızı, rpm
M.A.	Maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesi (IU/mL)
P.A.	Protoeolitik aktivite (PU/mL)
R	S.P.A./P.A. (IU/PU)
S	Substrat derişimi, g/L

S_{gf}	Reaktör besleme akımındaki D-glikoz derişimi, g/L
S_{gi}	Reaktör başlangıç D-glikoz derişimi, g/L
S_{gm}	Maksimum enzim aktivitesine ulaşıldığı andaki D-glikoz derişimi, g/L
S_{om}	Maksimum enzim aktivitesine ulaşıldığı andaki çözünmüş oksijen derişimi, mg/L
S.P.A.	Süt pıhtılaştırma aktivitesi (IU/mL)
T.A.	Fermentasyon süresince elde edilen toplam süt pıhtılaştırma aktivitesi (IU)
t_{max}	Maksimum enzim aktivitesine ulaşılma zamanı, saat
X_m	Maksimum enzim aktivitesine ulaşıldığı andaki biyokütle derişimi, g/L

Kaynaklar

- Bailey M. J., Siika-aho, M., "Production of Microbial Rennin", *Biotechnology Letters*, 10 (3), 161-166, 1988.
- Bensadoun, A., Weinstein, D., "Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials", *Analytical Biochemistry*, 70, 241-250, 1976.
- Bio Industrial Group, Enzyme Process Division, NOVO Nordisk A/S, "Microbial Rennets For Cheese Making", *Dairy Industries International*, 54 (5), 1989.
- Carlson, A., Hill, G. C., Olson, N. F., "Kinetics of Milk Coagulation: I. The Kinetics of Kappa Casein Hydrolysis in the Presence of Enzyme Deactivation", *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 582-589, 1987a.
- Carlson, A. Hill, G. C., Olson, N. F., "Kinetics of Milk Coagulation: II Kinetics of the Secondary Phase: Micelle Flocculation", *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 590-600, 1978b.
- Carlson, A., Hill, G. C., Olson, N. F., "Kinetics of Milk Coagulation: Mathematical Modeling of the Kinetics of Curd Formation Following Enzymatic Hydrolysis of k-Casein-Parameter Estimation", *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 601-611, 1987c.
- Dönmez, S., Özçelik, F., "*Mucor miehei*'den Rennet Üretiminde Bazı Azotlu Katkı Maddelerinin Enzim Üretimine Etkisi Üzerinde Bir Araştırma", *Gıda*, Yıl: 11, Sayı: 2, Mart-Nisan, 67-73, 1986.
- Ertek, T., "Ekonometriye Giriş", *Araştırma, Eğitim, Ekin Yayınları*, pp. 216-233, 1982.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. of Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- McMahon, D. J., Brown, R. J., Richardson, G. H., Ernstorm, C. A., "Effects of Calcium Phosphate, and Bulk Culture Media on Milk Coagulation Properties" *J. of Dairy Science*, 67, 930-938, 1984a.
- McMahon, D. J., Brown, R. J., Ernstorm, C. A., "Enzymic Coagulation of Milk Casein Micelles", *J. of Dairy Science*, 67, 745-748, 1984b.
- Melachours, N., Tuckey, S. L., "Properties of a Milk Clotting Microbial Enzyme", *J. Dairy Science*, 51 (5), 650-655, 1968.
- Mickelsen, R., Fish, N. L., "Comparing Proteolytic Action of Milk Clotting Enzymes on Caseins and Cheese", *J. of Dairy Science*, 53 (6), 704-710, 1969.
- Okigbo, L. M., Richardson, G. H., Brown, R. J., Ernstorm, C. A., "Effects of pH, Calcium Chloride, and Chymosin Concentration on Coagulation Properties of Abnormal and Normal Milk", *J. Dairy Science*, 68, 2527-2533, 1985.
- Payens, T. A., "The Relationship Between Milk Concentration and Rennet Coagulation Time", *J. of Applied Biochemistry*, 6, 232-239, 1984.
- Prins, J., Nielsen, K. K., "Microbial Rennet- *Mucor miehei*", *Process Biochemistry*, 5 (5), 34-35, 1970.
- Reed, G., "Enzyme in Food Processing", 2nd. Ed., Academic Press, New York, p:636, 1969.

Sardinas, J. L., "Microbial Rennets", Advances in Appl. Microbiol., 15, 39-81, 1972.

Sardinas, J. L., "Rennin Enzyme of *Endothia parasitica*", Advances in Appl. Microbiol., 16, 248-255, 1968.

Sternberg, M. Z., "Crystalline Milk Clotting Protease from *Mucor miehei* and of its Properties", J. of Dairy Science, 54 (2), 159-167, 1971.

Takamine, J., "U. S. Patent", No:582.820 and 525.823, 1984.

Topal, Ő., "Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri", Gıda, Yıl:10, Sayı:1, Ocak-Şubat, 25-37, 1985.

Uraz, T., "Türkiye Peynirciliğinde Kullanılan Mayalar ve Bunların Elde Edildikleri Şirtenler Üzerinde Araştırmalar", Doçentlik Tezi, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ankara, 1976.

Whitaker, J. R., "Principles of Enzymology fo the Food Sciences", Marcel Dekker Inc., New York, p:636, 1972.

Wieland, H., "Cheese Making Applications, Enzymes in Food Processing and Products", Noyes Data Corporation, New Jersey, USA, p:269, 1972.