

## Lactobacillus Brevis Mikroorganizmasının Çoğalma Kinetiğinin Cevap Yüzeyi Yöntemi ile İncelenmesi

Aybek Yiğit<sup>1\*</sup>, Nahit Aktaş<sup>1</sup>, Tekin Şahan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, VAN

E-posta: fizikokimyagerabo@gmail.com

**Özet:** Bu çalışmada amaç gelişen teknolojiyle beraber endüstride iyi tanınan bakteri kültürlerinden Lactobacillus Brevis' in çoğalma koşullarını Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanarak optimize etmek ve çoğalma kinetiklerini araştırıp gözlemlemektir. Çalışma kapsamı 2 bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde; uygun mikroorganizma ve bu mikroorganizmanın büyüme ortamları belirlenmiştir. Ayrıca çoğalma hızını etkileyen en önemli parametreler; pH, sıcaklık (°C) ve Cd iyonu derişimi (mg/L) olarak alınmış ve bu parametrelerin uygun aralıkları tespit edilmiştir. İkinci bölümde; CYY içindeki merkezi kompozit tasarım (MKT) ile özgül çoğalma hızı yanıt olarak alınarak yukarıda bahsedilen parametrelerin optimizasyonu çalışılmıştır. Lactobacillus Brevis için en iyi özgül çoğalma hızı koşulları pH 5.72, sıcaklık 33.01 °C ve Cd derişimi ise 34.01 mg/L olarak bulunmuştur. Bu optimum koşullar altında maksimum özgül çoğalma hızı 0.0797 1/saat olarak model eşitliğinden hesaplanmıştır. Ayrıca bu sonuç deneylerle doğrulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Cevap Yüzey Yöntemi (CYY), Lactobacillus Brevis, Merkezi Kompozit Tasarım (MKT), Optimizasyon

## Investigation of Growth Kinetics of Lactobacillus Brevis Microorganism by Response Surface Methodology (RSM)

**Abstract:** Aim of this study is; to optimize the growth conditions of Lactobacillus Brevis a well-known bacteria culture together with developing technology in the industry by using Response Surface Methodology (RSM) and observe of growth kinetics. The scope of the study consists of two sections. In the first part, a suitable microorganism and its growth medium were determined. Also, the most important parameters influencing the growth rate were taken as pH, temperature (°C) and Cd ion concentration (mg/L) and the appropriate ranges of them were determined. In the second part, the specific growth rate was taken as response using Central Composite Design (CCD) within RSM and optimization of the parameters mentioned above has been studied. The optimum growth rate conditions of lactobacillus brevis were determined as pH 5.72, temperature 33.01 °C and Cd(II) concentration 34.01 mg/L, respectively. Under these optimum conditions, the maximum specific growth rate was calculated to be 0.0797 hour<sup>-1</sup> from the model equation. Furthermore, these results were confirmed by experiments.

**Keywords:** Response Surface Methodology (RSM), Lactobacillus brevis, Central Composite Design (CCD), Optimization

### Giriş

Hızla değişen insan nüfusu beraberinde teknolojik alanda da hızlı bir araştırmayı olağan hale getirmiştir. Özellikle sanayiye öncülük eden biyoteknolojideki ilerlemeler, canlı mikroorganizmaları ve fonksiyonlarını daha iyi anlama ve

mikroorganizmaları teknolojinin hizmetine sunma yönünde bir adım kazandırmıştır. Son zamanlarda biyoteknolojik alanlarda yapılan çalışmalar mikroorganizmaların kullanımıyla günümüz ihtiyaçlarının karşılanması üzerine yoğunlaşmıştır. Mikroskop yardımıyla

görülebilen, bu tek hücreli, basit yapıdaki mikroorganizmalar, bazı yüksek organizmalar da görülmeyen bazı ortak özellikleri ile birbirine benzeyen ilkel yapıları canlılardır (Özçelik, 1996). Bu tek hücreli canlılar virüsler, mantarlar, protozoalar, bakteriler, planktonlar ve mavi yeşil alglerdir.

Mikroorganizmalar grubu içinde kendine yer bulabilen bakteriler tek hücreli mikroorganizmalar olup çeşitli şekilleri bulunan, boyları 0,5µm ile 20 µm arasında değişen canlılardır. Bir kısmı spiral şekilli, bir kısmı küresel, bir kısmı çubuksu olabilir. Her ortamda bakterilere rastlamamız mümkündür. Toprakta, deniz suyunda, okyanusun tatlı su derinliklerinde, yer kabuğunda, insan derisinde, hayvanların bağırsaklarında, asitli sıcak su kaynaklarında, radyoaktif atıklarda çoğalabilen türleri vardır (Fredrickson ve ark., 2004).

Ayrıca; bakterilerin bazı laktobasil cinsleri, maya ve küflerle beraber, fermente edilmiş besinlerin (peynir, turşu, soya sosu, sirke, şarap ve yoğurt gibi) hazırlanmasında yıllardır kullanılmaktadır (Hagedorn ve Kaphammer, 1994; Johnson ve Lucey, 2006). Bakteriler çeşitli organik bileşikleri parçalayabilme, atıkların işlenmesi ve değerlendirilmesinde de (bioremediation) kullanılırlar. Bu anlamda bakterilerin üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar son zamanlarda artan bir öneme sahiptir.

Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus Brevis* bakterisi ana görevi laktik asit üretmek olan heksoz (şeker) fermente edebilen gram-pozitif olup spor oluşturan mikroorganizmalardır. *L. Brevis* laktik asit bakterilerinin bir cinsidir. Laktik asit bakterilerinin önemli özelliklerinden biride yiyecek ve içeceklerin korunması için kullanılmasıdır. Laktik asit bakterileri; bira, şarap ve bazı besinlerin üretimi için önemlidir (Kanta, 2002). Bu çalışmamızda ki amaç; *L. Brevis* bakterisinin optimum çoğalma koşullarını belirleyerek özgül çoğalma hızını optimize etmektir. Elde edilen verilerin bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Bu anlamda bu çalışma literatüre orijinal katkı sağlayacaktır.

### Malzeme ve Yöntem

Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus Brevis* (NRRL B-3065) bakterisi

kültürü Northem Region Research Laboratory (NRRL, USA)' dan liyofilize olarak temin edilmiştir. Kullanılan kimyasallar ise analitik saflıktadır.

### Liyofilize ortamdaki bakterilerin canlandırılması

Temin edilen liyofilize formdaki bakterilerin canlandırılması için Tablo 1'de tanımlanan bileşimde canlandırma ortamı hazırlanmıştır. Ortamlar hazırlanırken, bakteri kültürü ile beraber verilen reçete dikkate alınmış ve aynen uygulanmıştır. Bakteri canlandırmak için, 100 mL erlende 50 mL olacak şekilde hazırlanan canlandırma ortamı 121 °C de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Sterillenen canlandırma ortamına (ilk hacim 5-7 mL, çözündükten sonra 50 mL ye transfer) liyofilize formdaki bakteri kültürü aseptik koşullarda aktarılmıştır. Bu canlandırma ortamları 35 °C ve 120 rpm'de dairesel hareketle çalkalayan inkübatörde 24 saat bekletilerek, bakteri kültürünün canlandırılması sağlanmıştır. 24 saat sonra canlandırma ortamından alınan bakteri kültürü, petri kaplarında hazırlanmış patates dekstroz agar (PDA) katı besi yeri (39 g/L) ortamına aktarılmış ve 35 °C de 48 saat etüvde bekletilerek bakterinin katı besi yeri yüzeyinde çoğalması sağlanmıştır. 48 saat sonucunda etüvden alınan petri kapları, daha sonraki uygulamalar da kullanılmak üzere +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. İşlemler belli periyotlarda yenilenecek kültürler sürekli olarak aktif tutulmuştur. Canlandırma ortamında canlandırılan bakteriler daha sonra aşı ortamına aktarılmıştır.

**Tablo 1.** Bakterilerin canlandırılmasında kullanılan ortamın bileşimi

Bileşenler	Marka	Miktar(g/L)
Meat Extract	Oxoid	5
Yeast Extract	Oxoid	20
Glikoz	Oxoid	1
Tween 80	Merck	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	5
Na-Asetat	Merck	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck	0.2
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Merck	0.05
Casein Pepton	Oxoid	10

### Aşı Ortamının Hazırlanması

Aşı ortamı, 250 mL lik erlenlerde 100 mL olacak şekilde Tablo 2'de verilen

bileşimde hazırlanmıştır. Bu ortam 121 °C ve 15 dakika süre ile otoklavda sterillemiş ve oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra katı besiyerinde bulunan bakteri kültürleri aşılansarak 35 °C 120 rpm de dairesel hareketle çalışan inkübatörde 24 saat inkübe edilmiş ve istenen aşı ortamı elde edilmiştir.

**Tablo 2.** Aşı ortamının bileşimi

Bileşenler	Marka	Miktar(g/L)
Glikoz	Merck	1100
Maya Özütü	Oxoid	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	42
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	37.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	44.4
NaCl	Merck	1.5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck	2.25
FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Merck	0.37
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck	6.15
Tween 80	Merck	2.0

### Bakterilerin optimum çoğalma şartlarının belirlenmesi

Canlandırma ortamlarından katı besiyerine aktarılarak muhafaza edilen bakteri kültürlerinin çoğalması için planlanan ve temel karbon kaynağı glikoz olan besi yerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekimleri yapılan bakteri kültürlerinin çoğalmaları üzerine etki eden en önemli ortam faktörleri literatür araştırması ile belirlenmiştir (pH, sıcaklık ve Cd iyon konsantrasyonu). Bakteri optimizasyonu için kullanılan ortam bileşimi Tablo 3’de verilmiştir. Bakteri kültürü için yapılacak optimizasyon ve çoğalma kinetiği çalışmaları için hazırlanan ortamlara aşılama yapılırken, % 5 (v/v) aşılama oranı kullanılmıştır (Aktaş, 2003).

**Tablo 3.** Bakterilerin çoğalması için besi ortamı

Bileşenler	Marka	Miktar(g/L)
Glikoz	Merck	0.4
Maya Özütü	Oxoid	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	2.44
NaCl	Merck	0.15
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck	0.225
FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Merck	0.037
Tween 80	Merck	0.2

### Deneyisel Dizayn ve Optimizasyon

Bakteri kültürünün çoğalma ortamının optimizasyonu için istatistiksel paket program olan Design-Expert 8.0.7.1 deneme sürümü içindeki MKT kullanılarak deneysel parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. MKT, CYY içerisinde bulunan ve en çok kullanılan istatistiksel optimizasyon yöntemidir (Şahan, 2008). MKT üç kısma ayrılabilir. Bunlar iki düzey noktalar, aksiyal noktalar (iki düzey ötesi  $\alpha$ ) ve merkez noktalar. Yöntemin iki düzey (faktöriyel) noktaları, bir faktörün +1 veya -1 yani en yüksek veya en düşük düzeylerinden oluşur. Aksiyal noktalar, deneycinin belirlediği iki düzey noktalarının daha da ötesinde olan program tarafından aşağıdaki eşitlik ile belirlenen  $+\alpha$  ve  $-\alpha$  değerleridir. Program bu yolla deneycinin belirlediği düzeyleri genişleterek hatayı azaltmayı amaçlamaktadır.

$\alpha = 2^{k/4}$  ( $k =$  çalışılan bağımsız değişken sayısı)

Merkez noktalar ise; deneysel hatayı tahmin etmek için tekrar edilen ve parametrelerin iki düzey (faktöriyel) noktalarının orta noktalarıdır. Sonuç olarak MKT’ de her bir parametrenin beş düzeyi vardır. Bunlar +1 ve -1 ile ifade edilen faktöriyel noktalar,  $+\alpha$  ve  $-\alpha$  ile ifade edilen aksiyal noktalar, 0 olarak ifade edilen merkez noktaları (Myers ve Montgomery, 2002). Üç değişkenli deneylerin toplam sayısı 20 olarak ( $2k + 2^k + 6$  formülüne göre) program tarafından hesaplanmıştır. Burada  $k$ ; değişkenlerin sayısı olarak ifade edilir. Hatayı tespit etmek için değişkenlerin merkez noktasında toplam 6 deney yapılmıştır. Üç değişken ile optimizasyon deneylerinde değişkenlerin kodlu ve kodsuz değerleri Tablo 4’ de verilmektedir. Optimizasyon prosedüründe yanıt lineer veya quadratik olarak seçilen değişkenlerle ilgili olabilir. Bir quadratik model eşitliği aşağıdaki gibi verilebilir (Aktaş, 2005).

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Burada;

$\hat{y}$  : Yanıt (Özgül çoğalma hızı, 1/saat)

$\beta_0$  : Sabit katsayı

$X_i$  : Çalışılan değişkenler

$\beta_i$  : Lineer katsayı

$\beta_{ii}$  : Quadratik katsayı

$\beta_{ij}$  : İnteraksiyon katsayısı

$k$  : Parametre sayısı olarak tanımlanır.

Yanıt ve değişkenler arasındaki etkileşimi elde etmek için ANOVA testi içeren Design-Expert 8.0.7.1 programı kullanılarak yukarıdaki eşitlik elde edilmiştir. Modelin uygunluğu belirlenen  $R^2$  ile ifade edilmiş ve istatistiksel önemi, aynı programda bulunan  $F$  testi ile incelenmiştir.  $F$  testi iki ölçüm takımının kesinliğini karşılaştırmak için basit bir methodur. Numuneler, rastgele hata kaynaklarının aynı olduğunun kabul edilebileceği kadar birbirine benzediği sürece, veri takımlarının aynı numuneden elde edilmesine gerek yoktur.  $F$  testi null hipotezine dayanır ve bu yüzden kesinliklerin aynı olduğunu kabul eder (Şahan, 2008). İki ölçümün varyanslarının oranı olarak tanımlanan  $F$  büyüklüğü, iki ölçüm takımının kesinlikleri arasında bir fark yok ise, hesaplanır ve  $F'$  nin beklenen maksimum değeri (belirli bir olasılık seviyesinde) ile karşılaştırılır. Deneysel  $F$  değeri, olasılık tablolarından bulunan kritik değeri geçerse, iki standart sapmanın aynı olduğu null hipotezinin sorgulanması için istatistiksel bir dayanak vardır.  $F$  testi iki sorunun cevabının aranmasında kullanılır. Bunlardan birincisi; metot A' nin metot B' den daha kesin olup olmadığının araştırılmasında ve ikincisi ise, iki metodun kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığının anlaşılmasındadır.

**Tablo 4.** MKT için değişkenlerin kodlu ve kodsuz değerleri

Değişkenler	Kodlu ve gerçek değerler				
	-	-1	0	+1	+ $\alpha$
pH ( $X_1$ )	1	3.00	5.50	8.00	9.70
Sıcaklık ( $X_2$ ) (°C)	1	20.00	32.50	45.00	53.5
Cd Kons. ( $X_3$ )	9	20.00	35.00	50.00	60.2

### Sonuçların Optimizasyonu

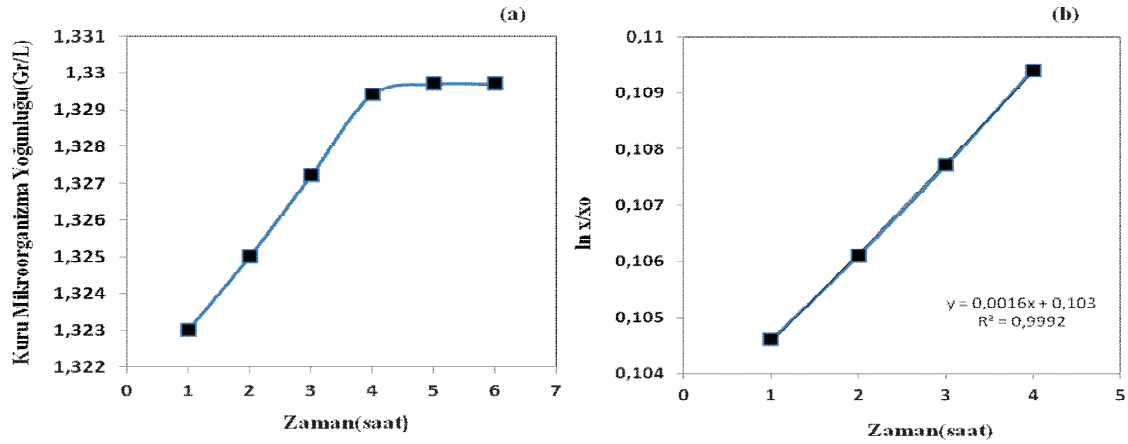
Bu bölümde cevap yüzeyin yapısını karakterize eden ve çalışılan parametrelerin  $X_1$ (pH),  $X_2$ (sıcaklık) ve  $X_3$ (Cd derişimi) deney koşullarının optimum noktalarının nasıl bulunacağına değinilecektir. Bunun için sadece MKT' de bulunan quadratik model eşitliği yeterlidir. CYY' de elde edilen grafikler optimizasyon için önemli bir rol oynar. Cevap yüzeyi analizi için bilgisayar yazılımı kullanan düzgün grafikleri üreterek bir deneyci genellikle yüzeyin şeklini karakterize edebilir ve mantıklı bir tahminle optimum noktayı tayin edebilir (Aktaş, 2005; Şahan ve ark., 2010).

### Tartışma ve Bulgular

Özgül Optimizasyonu	Çoğalma	Koşullarının
Özgül optimizasyonu	çoğalma tek	koşullarının adımda

gerçekleştirilmiştir.

Bu adımda; MKT deneyleri gerçekleştirilerek özgül çoğalmayı etkileyen en iyi yanıtın alındığı noktalar belirlenmiştir. Belirlenen bu parametrelerin (pH, sıcaklık, Cd konsantrasyonu) optimizasyonu için MKT ile özgül çoğalma hızı yanıt olarak alınmıştır. MKT deneyleri ve sonuçları Tablo 5' de verilmiştir. Özgül çoğalma hızı hesaplanırken öncelikle kuru mikroorganizma yoğunluğuna karşılık zaman grafiği çizilmiştir (Şekil 1.a). Bu grafiğin lineer artış gösteren noktaları alınarak bu noktalardan  $\ln x/x_0$ 'a karşılık zaman grafiği elde edilmiştir (Şekil 1.b). Çizilen bu grafiğin eğimi hesaplanarak özgül çoğalma hızı bulunmuştur. Aşağıda örnek olması açısından MKT deney programındaki 9. deneyin özgül çoğalma hızı hesaplanmasında kullanılan grafikler verilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Kuru mikroorganizma yoğunluğuna karşılık zaman grafiği (a) ve  $\ln x/x_0$ 'a karşılık zaman grafiği (b).

Tablo 5. MKT için önerilen deney programı

Deney No	pH (X <sub>1</sub> )	Sıcaklık (°C, X <sub>2</sub> )	Cd Kons. (mg/L, X <sub>3</sub> )	Özgül Çoğalma Hızı (1/saat)
1	5.50(0)	11.48(-α)	35.00(0)	0.0016
2	5.50(0)	32.50(0)	9.77(-α)	0.0004
3	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0850
4	8.00(+1)	45.00(+1)	20.00(-1)	0.0326
5	5.50(0)	32.50(0)	60.23(+α)	0.0016
6	9.70(+α)	32.50(0)	35.00(0)	0.0005
7	3.00(-1)	20.00(-1)	50.00(+1)	0.0008
8	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0790
9	3.00(-1)	20.00(-1)	20.00(-1)	0.0016
10	8.00(+1)	20.00(-1)	20.00(-1)	0.0185
11	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0850
12	8.00(+1)	20.00(-1)	50.00(+1)	0.0017
13	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0816
14	3.00(-1)	45.00(+1)	20.00(-1)	0.0017
15	5.50(0)	53.52(+α)	35.00(0)	0.0028
16	1.30(-α)	32.50(0)	35.00(0)	0.0017
17	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0760
18	8.00(+1)	45.00(+1)	50.00(+1)	0.0090
19	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0715
20	3.00(-1)	45.00(+1)	50.00(+1)	0.0015

Sonuçların uyumluluğu Tablo 6'da gösterilen regresyon analizi ile değerlendirildi. Sonuçlara göre önerilen modelde  $p(0.0001) < 0.05$  olduğu

görülmektedir. Bu da önerilen model eşitliğinin istatistiksel olarak yaklaşık %99.50 güven aralığında önemli olduğunu göstermektedir.

**Tablo 6.** MKT için regresyon analiz sonuçları

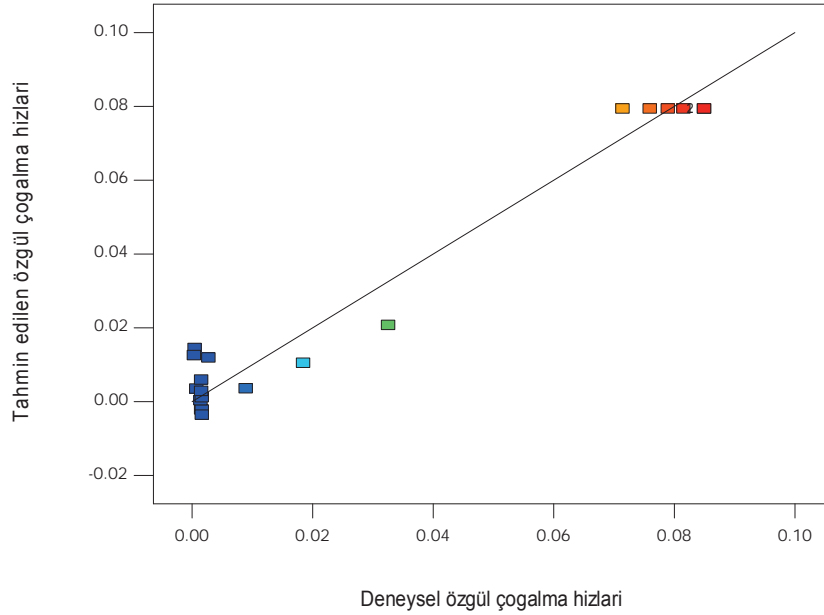
Kaynak	Kareler toplamı	DF	F-Değeri	p-Değeri	Önemli
Model (Kuadratik)	0.2612	9	29.37	0.0001	Önemli
X <sub>1</sub>	0.215	1	2.42	0.1511	
X <sub>2</sub>	0.4295	1	0.48	0.5030	
X <sub>3</sub>	0.1136	1	1.28	0.2849	
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.5305	1	0.6	0.4578	
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.1940	1	2.18	0.1705	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.4805	1	0.054	0.8209	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.9229	1	103.76	0.0001	
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.8948	1	100.60	0.0001	
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.9255	1	104.05	0.0001	

$R^2=0.84$

Regresyon analizinden sonra özgül çoğalma hızını, pH, sıcaklık ve Cd konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak veren kuadratik model eşitliği (model tarafından önerilen) gerçek değerleri için aşağıda verilmiştir.

$$\text{Özgül çoğalma hızı}(1/\text{saat})(\text{Gerçek değerler}) = -0.37146 + 0.048045[\text{pH}] + 0.010199[\text{Sıcaklık}] + 8.54850\text{E-}003[\text{Cd konsantrasyonu}] + 8.24000\text{E-}005[\text{pH}][\text{Sıcaklık}] - 1.31333\text{E-}004[\text{pH}][\text{Cd}(k\text{onsantrasyonu})] - 4.13333\text{E-}006[\text{Sıcaklık}][\text{Cd konsantrasyonu}] - 4.04901\text{E-}003[\text{pH}]^2 - 1.59472\text{E-}004[\text{Sıcaklık}]^2 - 1.12630\text{E-}004[\text{Cd}(k\text{onsantrasyonu})]^2$$

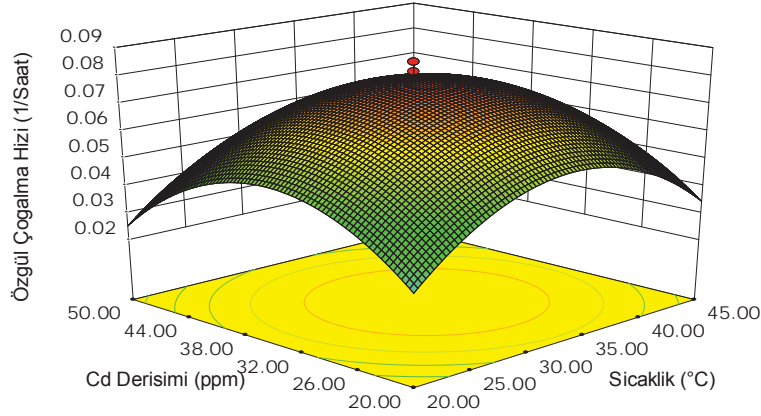
(1)



**Şekil 2.** Teorik olarak hesaplanan değerlere karşı gözlenen (deneysel) değerlerin dağılımı

Şekil 2, model tarafından teorik olarak hesaplanan değerlere karşı gözlenen (deneysel) değerlerin ilişkisini göstermektedir. Deneysel verilerle modelden hesaplanan değerlerin bazı noktalarda uyumlu olduğu görülmektedir.

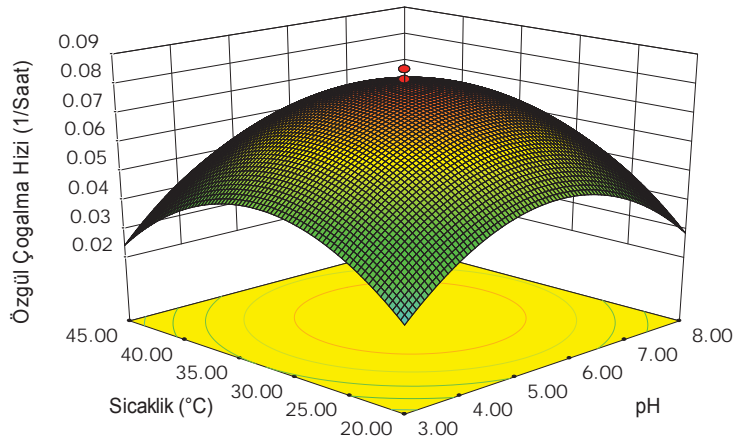
Yapılan çalışmada, mikroorganizma çoğalma hızına etki eden parametre sayısının fazla ve konunun hassas olmasından ötürü, bazı sapmaların olması normal karşılanmaktadır (Aktaş,2003).



**Şekil 3.** Sabit pH değerinde (5.50) Cd iyonunun ve sıcaklığın özgül çoğalma hızına etkisi

Şekil 3’de görüldüğü gibi özgül çoğalma hızı sıcaklık 20 °C den 35 °C ye yükselirken artmaktadır; özgül çoğalma hızının maksimum değerinin ise yaklaşık olarak 35 °C de olduğu görülmektedir. Bu sıcaklığın üzerinde ise özgül çoğalma hızının düştüğü tespit edilmiştir. Özgül çoğalma hızındaki artış ve azalışın nedeni, sıcaklığın L. Bacillus Brevis bakterisinin enzim sistemi üzerindeki etkisiyle açıklanabilir. Düşük sıcaklık ( $T < 20^{\circ}\text{C}$ ), L. Bacillus Brevis üremesi üzerine inhibisyon etkisi yaparken, yüksek sıcaklık ( $T > 35^{\circ}\text{C}$ ) ise bakterinin enzim sistemini bozmaktadır. Böylece optimum sıcaklığın üzerinde mikroorganizmada ki büyüme, sıcaklığın artışıyla birlikte düşer ve ölümler başlar. Benzer bir çalışmada da (Marcobal ve ark., 2006) sıcaklığın L. Bacillus Brevisin enzim sistemini belli bir sıcaklıkta pozitif yönde etkilediği daha sonra ise negatif yönde etki ettiği görülmektedir. Peng ve ark.,

(2013) yaptıkları çalışmada L. Brevis için optimum sıcaklığı 35 °C ve optimum pH’ı ise 5.5 olarak gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da şekilde gözlendiği gibi Cd(II) konsantrasyonunun 20 mg/L den 35 mg/L ye yükselmesiyle özgül çoğalma hızının arttığı ve özgül çoğalma hızının en yüksek olduğu noktanın ise yaklaşık 35 mg/L olduğu görülmektedir. Cd(II) derişiminin 35 mg/L nin üstündeki değerlerinde L. Brevisin özgül çoğalma hızının azaldığı görülmektedir. Artan konsantrasyonla özgül çoğalma hızındaki bu azalma hücre yüzeyindeki metallerin belli bir konsantrasyona kadar hücre tarafından kullanılması ve daha sonra ise doygunluğa ulaşmasıyla birlikte toksik etki yaparak mikroorganizmayı inhibe etmesiyle açıklanabilir (Uslu,1999).



**Şekil 4.** Sabit Cd(II) konsantrasyonunda (35 mg/L) sıcaklığın ve pH’ nın özgül çoğalma hızına etkisi

Özgül çoğalma hızının pH 3.0'den 6.0'ya yükselirken arttığı ve pH 6.0'dan 8.0'e yükselirken negatif yönde azalmaya başladığı Şekil 4'den görülmektedir. Optimum pH ise yaklaşık olarak 5.5 dir. pH ve sıcaklığın özgül çoğalma hızı üzerindeki bu etkisi benzer çalışmalarda da gözlenmiştir (Marcobal ve ark., 2006). Ayrıca farklı mikroorganizmalar için özgül çoğalma hızı üzerine pH ve Cd(II) iyonunun etkisi, Uslu (1999) tarafından da çalışılmış ve benzer yorumlar yapılmıştır.

#### Optimizasyon ve Sonuçlar

Çalışılan deneysel parametrelerin optimum değerlerinin belirlenmesi matematiksel olarak daha önce literatürde belirtilen matris yöntemiyle yapılmıştır (Myers ve Montgomery, 2002; Şahan ve ark., 2010). Bunun için; L. Brevis özgül çoğalma hızı için MKT tarafından önerilen model eşitliği kullanılmıştır (Eşitlik 1).

Sonuç olarak; optimum noktalar pH 5.72, sıcaklık 33.01 °C ve Cd konsantrasyonu 34.01 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu optimum noktalarda teorik olarak hesaplanan özgül çoğalma hızı 0.0797 1/saat olarak hesaplanmıştır. Ayrıca optimum şartlarda yapılan deneylerle de bu sonuç doğrulanmıştır.

#### Kaynaklar

Aktaş, N., 2003. Akiskan yatak biyofilm reaktörde (AYBR) peyniraltı atık suyunun arıtılması ve sistem performansının modellenmesi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Aktaş, N., 2005. Optimization of biopolymerization rate by response surface methodology (RSM) , *Enzyme and microbial technology* 37: 441-447.

Fredrickson, J., Zachara, J., Balkwill, D., 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste contaminated vadose sediments at the Hanford site. Washington state.

Johnson, M., Lucey, J., 2006. Major technological advances and trends in cheese. *Journal of Dairy Science*, 89 (4): 1174–8.

Kanta., 2002. Bira bozulma bakterisi ve hop direnç Lactobacillus brevis. Groningen Üniversitesi, Bölüm 1, S 5-6.

Marcobal, A., Martinez Alvarez, P.J., Po, M.C, Munoz, R., & Moreno Arribas, M.V., 2006. Formation of biogenic amines through the industrial manufacture of red wine. *J.Food Prot.*, 69, 391-396.

Myers, R.H., Montgomery, D.C, 2002. Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments. Second Edition.

Özçelik, A., 1996. “Genel Mikrobiyoloji”. Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Isparta.

Şahan, T., 2008. Atık sularda bulunan bazı ağır metallerin biyosorpsiyon ile uzaklaştırılması ve biyosorpsiyon koşullarının optimizasyonu. (Doktora tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

Şahan, T., Ceylan, H., Şahiner, N., Aktaş, N., 2010. Optimization of removal conditions of copper ions from aqueous solutions by *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 101(12):4520-4526.

Peng, C., Huang, J., Hu, S., Zhao, W., Yao, S., Mei, L., 2013. A Two-stage pH and Temperature Control with Substrate Feeding Strategy for Production of Gamma-amino butyric acid by *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(10):1190-1194.

Uslu, G., 1999. Kurşun (II), Kadmiyum (II), Bakır (II) iyonlarının *R. arrhizus*'ün üreme kinetiğine etkisi ve adsorpsiyonu. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.