

# ***R. delemar* 'IN ASİT FOSFATAZ ÜRETİMİ ve Zn(II) BİYOBİRİKİMİNİN CEVAP YÜZEY YÖNTEMİ KULLANARAK OPTİMİZE EDİLMESİ**

**Mehtap Erşan, Ünsal Açık**

Cumhuriyet Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Sivas, Turkey  
[mersan@cumhuriyet.edu.tr](mailto:mersan@cumhuriyet.edu.tr), [uacikel@cumhuriyet.edu.tr](mailto:uacikel@cumhuriyet.edu.tr)

(Geliş/Received: 08.05.2013; Kabul/Accepted: 05.12.2013)

## **ÖZET**

*R. delemar*' in asit fosfataz aktivitesi, Zn(II) biyobirikimi ve üremesi, pH, sıcaklık ve başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun fonksiyonu olarak araştırıldı. Deney tasarımı Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ve Box-Behnken tasarımına göre yapıldı. Önerilen matematiksel modeller varyans analizi (ANNOVA) istatistiksel yöntemi ile değerlendirilmiştir. Asit fosfataz aktivitesi için doğrusal, mikroorganizma derişimi ve Zn(II) biyobirikimi için kuadratik eşitliğe tam bir uyum gözlenmiştir. *R. delemar*' in üremesi asit fosfataz üretimi ve Zn(II) biyobirikimi için optimum pH 5,03, sıcaklık 31,82 °C ve başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonu 30,15 mg/L olarak bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen maksimum asit fosfataz aktivitesi 794,098 µmol/L-dak, mikroorganizma konsantrasyonu 3,203 g/L ve biyobiriktirilen Zn(II) miktarı 17,62 mg/L olarak bulunmuştur. Deney doğrulama deneyi yapılarak sonuçların duyarlılığı ve geçerliliği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Asit fosfataz, *R. delemar*, biyobirikim, Zn(II), Cevap yüzey yöntemi (CYY)

## **OPTIMIZATION OF ACID PHOSPHATASE PRODUCTION AND ZN(II) BIOACCUMULATION by *R. delemar* USING RESPONSE SURFACE METHOD**

### **ABSTRACT**

Acid phosphatase activity, Zn (II) bioaccumulation and growth of *R. delemar* were investigated as a function of pH, temperature and initial Zn(II) ion concentration. Experimental design was performed by response surface method (RSM) and Box-Behnken design. The proposed mathematical models were evaluated by analysis of variance (ANNOVA) statistically method. The best fit for acid phosphatase activity was obtained by linear model, the Zn(II) bioaccumulation and microorganism growth were characterized by quadratic equations. The optimum conditions for acid phosphatase activity, Zn(II) bioaccumulation and growth of *R. delemar* were found to be pH 5,03, 31,82 °C and an initial Zn(II) ion concentration of 30,15 mg/L. At these conditions the maksimum acid phosphatase activity Zn(II) bioaccumulation and microorganism concentration were determined as 794,098 mmol / L-min, 17,62 mg / L and 3,2038 g / L respectively. To test sensivity and validity of the optimum conditions the validation experiments were performed.

**Keywords:** Acid phosphatase, *R. delemar*, bioaccumulation, Zn(II), Response surface methodology

### **1. GİRİŞ (INTRODUCTION)**

Fosfatazlar fosfomonoesterazlardır ve çeşitli fosfat esterlerinin, C-O-P bağlarının hidrolizini katalizlerler. Ayrıca tıpta çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. pH değerlerine göre asit yada alkali fosfataz olarak sınıflandırılırlar. Bu enzimler doğal ortamda oluşur, hayvan dokuları, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunur. Çeşitli mikroorganiz-

malar tarafından üretilen bu enzim son yıllarda yapılan bazı araştırmalara konu olmuştur. *Lactobacillus plantarum* DPC2739 isimli bakterinin ürettiği dış hücrel asit fosfataz incelenmiş, optimum üretim şartları 40 °C sıcaklık ve pH 3,5-5 aralığında bulunmuştur [1]. Asit fosfataz ürettiği bilinen diğer mikroorganizmalar; *Saccharomyces cerevisiae* [2], *Neurospora crassa* [3], *Euglena gracilis* [4] ve

*Rhizopus delema* 'dır (*R. delema*). Bu çalışmada asit fosfataz kaynağı olarak, etkili ağır metal biyosorbenti olarak bilinen *R. delema* kullanılmıştır [5]. Ağır metal iyonlarının mikroorganizmalar üzerine biyosorpsiyonu incelendiğinde, kullanılan mikroorganizmanın hücre yapısına bağlı olarak değişik mekanizmaların etkili olduğu görülmektedir [6]. Ağır metal giderim prosesleri iki basamaklıdır.

**i-) Metabolizmaya bağlı giderim (biyobirikim):** Metabolik hareketlerle birlikte hücre içinde metal iyonlarının biyobirikimidir. Enerji gerektiren bir prosesdir.

**ii-) Metabolizmadan bağımsız giderim (pasif metal giderimi, biyosorpsiyon):**

Ölü mikroorganizmalarla yapılan adsorpsiyon işlemi genellikle biyosorpsiyon olarak tanımlanmaktadır [7]. Biyosorpsiyonda kimyasal adsorpsiyon, iyon değişimi, elektrostatik çekim kuvvetleri, kompleksleşme gibi birçok mekanizmanın tek başına veya birlikte rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada canlı *R. delema* hücreleri ile metal biyobirikimi, hücreye bağlı metal fosfat olarak ağır metallerle çöken, inorganik fosfatı serbest bırakan hücreye bağlı fosfataz enzimi aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Asit fosfataz uygun organik veya inorganik fosfat kaynağından  $\text{HPO}_4^{2-}$  'yi serbest bırakır. Bu fonksiyonu üreme periyodunu tamamlamış ve/veya tutuklanmış mikroorganizma hücreleri de gösterebilir. Hidrojen fosfat,  $\text{M}^{+2}$  ile stokiyometrik olarak çökerek hücre yüzeyine  $\text{MHPO}_4$  oluşturmak üzere sıkıca bağlanır. Bu mekanizma ile metal içeren çözeltilerde Cd, U, Sr ve Pb iyonlarının *Citrobacter sp* grubu bakteriyel hücreler kullanılarak biyobirikiminin gerçekleştiği rapor edilmiştir [8].

Bu çalışmada *R. delema* 'ın ürettiği asit fosfataz aracılığı ile Zn(II) biyobirikiminin gerçekleştiği optimum koşulların bulunması amaçlanmaktadır. Klasik yöntemlerle optimum deney koşullarının bulunması için çok sayıda deney yapmak gereklidir. Elde edilen sonuçlarla ise optimum deney koşulları üzerinde deney değişkenlerinin birbirleri üzerine olan etkilerini görmek mümkün değildir. Bu tür kısıtlamaları ortadan kaldırmak amacı ile Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ve Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak, pH, sıcaklık ve başlangıç metal iyonu konsantrasyonu bağlı olarak, asit fosfataz aktivitesi, *R. delema* üremesi ve Zn(II) biyobirikimi optimize edilmiştir. Elde edilen matematiksel modeller, ANNOVA (Analysis of variance) istatistiksel yöntemi ile değerlendirilmiş, modellerin doğruluğu ve geçerliliği tartışılmıştır [9].

## 2. MATERYAL ve METOD (MATERIAL and METHOD)

### 2.1. *R. delema* 'ın Asit Fosfataz Enzimi Aktivitesi ve Besin Ortamlarının Hazırlanması (Acid Phosphatase Activity of *R. delema* and Growth Medium Preparation)

Asit fosfataz üretiminde kullanılan aşu ortamı ve asit fosfataz üretiminde kullanılan fermantasyon ortamı hazırlanmış ve 100 ml çalışma hacmine sahip reaktörlerde fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Aşılama için besin ortamı içeren erlenler, 150 devir/dak hızında, 30 °C sıcaklıkta ve 24 saat orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Ortam pH' ı, mikroorganizmanın asit fosfataz enzimi üretmesi için en uygun pH değeri olan 4,8'e ayarlanmıştır [10].

### 2.2. Analitik Ölçüm Yöntemleri (Analytical Measurement Methods)

Belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamlarından steril olarak alınan örnekler filtrasyon ve/veya santrifüjleme işleminden geçirilmiş, sıvı kısım metal iyonları ve enzim aktivitesinin tayininde, dipte çökelen kısım veya filtrasyon kağıdının üzerinde kalan kısım ise mikroorganizma konsantrasyonunun bulunmasında kullanılmıştır. Alınan örnekteki yaş mikroorganizma konsantrasyonu g/L cinsinden spektrofotometrik olarak 360 nm'de absorbans okunarak tayin edilmiştir. Daha sonra yaş ağırlık-kuru ağırlık mikroorganizma çalışma doğrusundan yararlanarak kuru mikroorganizma konsantrasyonuna geçilmiştir.

### 2.3. Asit Fosfataz Aktivitesi Tayini (Acid Phosphatase Activity Determination)

Fosfataz aktivitesinin ölçümü için substrat olarak *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma 117K8210) kullanılarak önceden tanımlandığı gibi tayin edilmiştir [10] (Acıkkel ve Erşan, 2010). Fosfataz aktivitesi, 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bir birim fosfataz aktivitesi pH 4,8 ve 37 °C' de 1µmol *p*-nitrophenol / dak serbest bırakan enzim çözeltisinin miktarı olarak tanımlanır [5].

### 2.4. Metal İyonları İçeren Biyobirikim Ortamının Hazırlanması (Preparation of Bioaccumulation Medium Containing Metal Ions)

Zn(II) çözeltileri,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  kristallerinin damıtık suda çözülmesi ile elde edilen 1,0 g/L metal iyonu içeren stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır. Fermentasyon ortamlarının pH değeri 1 mol/L konsantrasyonunda hazırlanan  $\text{HNO}_3$  stok çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır.

## 2.5. Biyobirikim Deneyleri (Bioaccumulation Experiments)

Biyobirikim deneyleri orbital çalkalayıcıda 30 °C sıcaklıkta 150 devir/dak karıştırma hızında 48 saat süreyle yapılmıştır. Optimizasyon deneylerinde, *R. delemar*'ın maksimum asit fosfataz aktivitesi gösterdiği saptanan, üstel üreme evresinin sonundaki hücreler kullanılmıştır. Fermentasyon ortamından alınan 5ml hacmindeki örnek 6030 x g' de 5 dakika santrifüjlenmiş ve ortamdaki serbest Zn(II), 213,9 nm' de atomik absorpsiyon spektrofotometresinde ölçülmüştür.

Burada  $x_i$  bağımsız bir değişkenin kodlanmış değeridir,  $X_i$  bağımsız bir değişkenin gerçek değeridir,  $X_0$  merkez noktada bağımsız bir değişkenin gerçek değeridir,  $\Delta X_i$  basamak değişim değeridir. Box-Benkhen tasarımı kullanılarak araştırılan pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) iyonu bağımsız değişkenlerinin aralığı ve düzeyleri Tablo 1.' de gösterilmektedir. Söz konusu bağımsız değişkenlerin aralıkları, bir deney setinde bir parametrenin değerinin değiştirildiği diğer parametrelerin değerlerinin sabit tutulduğu deney sistemlerinde belirlenmiştir. Asit fosfataz aktivitesi, biyobiriktilen Zn(II) iyonu konsantrasyonu ve mikroorganizma konsantrasyonu bağımlı değişken veya tasarım deneylerinin cevabı olarak alınmaktadır. Sistemin davranışı aşağıdaki kuadratik eşitlik tarafından ifade edilir:

## 2.6. Deney Sisteminin Matematiksel Modellenmesi (Metemathical Modelling of Experimental System)

### Yüzey Cevap Yöntemi (Response Surface Methodology)

*Asit fosfataz aktivitesi, Zn(II) biyobirikimi ve mikroorganizma derişiminin optimizasyonu için merkezi bileşke tasarımı* (Acid phosphatase activity, Zn (II) bioaccumulation and central composite design for optimization of microorganism concentration)

*R. delemar*'ın asit fosfataz enzimi üretimi ve Zn(II) biyobirikimi için, optimum fermentasyon koşullarının saptanması amacıyla, pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonunun etkilerini araştırmak üzere, Box-Benkhen deneysel tasarımı uygulanmıştır. İstatiksel hesaplamalar için,  $X_1$  ve  $X_2$  ile gösterilen iki bağımsız değişken, (1) numaralı eşitliğe göre kodlanmıştır:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (1)$$

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Burada Y önerilen cevap,  $\beta_0$  ofset terimi,  $\beta_i$  doğrusal etki,  $\beta_{ii}$  kare etkisi ve  $\beta_{ij}$  de parametreler arasındaki karşılıklı etkileşimi gösteren katsayıdır. Her deneysel nokta iki kez tekrar edildi. Tekrar edilen değerlerin aritmetik ortalaması, Box-Benkhen tasarımında kullanıldı. Design Expert 7,0 bilgisayar programı, deneysel verilerin regresyon analizi ile Eşitlik 2' nin katsayılarının hesaplanması için kullanılmıştır.

## 3. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA (RESULTS and DISCUSSION)

Klasik biyobirikim deneyleri sonucunda belirlenen en uygun pH ve sıcaklık aralıkları dikkate alınarak, deney sisteminin yüzey cevap yöntemiyle, deneysel çalışma aralıkları, en düşük pH değeri olarak 4,0 en yüksek pH değeri olarak 5,5, en düşük sıcaklık değeri olarak 25 °C, en yüksek sıcaklık değeri olarak 36 °C seçilmiştir. Tasarım çalışmaları için düşük derişimlerde aktivator etkisi göstermesi nedeniyle ağır metal olarak Zn(II) seçilmiştir. Sisteme eklenen Zn(II) konsantrasyonu 10-50 mg/L derişim aralığında değiştirilmiştir. pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, asit fosfataz aktivitesi, mikroorganizma derişimi ve metal biyobirikimi için elde edilen deneysel ve yöntem tarafından öngörülen değerler Tablo 2' de karşılaştırılmaktadır.

### 3.1. *R. delemar* ile Maksimum Asit Fosfataz Aktivitesi Elde Etmek İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi (Determination of Experimental Conditions for Maximum Acid Phosphatase Activity of *R. delemar*)

Eşitlik 3 tarafından ifade edilen model pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) derişiminin fonksiyonu olarak asit fosfataz aktivitesini göstermektedir. Elde edilen model doğrusal bir eşitliktir ve denklemini aşağıdaki gibidir.

$$\text{Enzim aktivitesi} = 757,73 + 81,08x_1 + 30,83x_2 - 159,14x_3 \quad (3)$$

**Tablo 1.** Bağımsız değişken aralıkları ve cevap değişkenleri (Level and code of independent variables)

Bağımsız değişken	Semboller		Kodlanmış düzeyler		
	Kodlanmamış	Kodlanmış	-1	0	1
pH	$X_1$	$x_1$	4,00	4,75	5,50
T (°C)	$X_2$	$x_2$	25,0	30,5	36,0
$C_{Zn,i}$ (mg/L)	$X_3$	$x_3$	10	30	50

Eşitlik 3' ün istatistiksel anlamı F testiyle kontrol edildi. Doğrusal modelin cevap yüzeyi için varyans analizi (ANNOVA) Tablo 3.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların anlamlı olabilmesi için modelde "Prob>F" diye ifade edilen olasılık değerinin 0,05' ten küçük olması gerekir. Olasılık değerinin 0,1000' den büyük olduğu durumlarda tasarım cevap değişkenleri için anlamsız olur. Model F-değerinden ve çok düşük

probabilite değerinden anlaşıldığı üzere, model anlamlıdır. Modelin uyum derecesi belirtme katsayısı  $R^2$  ve çoklu korelasyon katsayısı,  $R'$  nin değerine bakılarak değerlendirilir.  $R'$  nin değeri 1' e ne kadar yakınsa, deneysel ve model değerler arasındaki korelasyon o ölçüde iyidir. Asit fosfataz aktivitesi için öngörülen modelin 0,9275' lik  $R^2$  değeri deneysel verilerle model tarafından öngörülen değerlerin uyumuna işaret eder.

**Tablo 2.** Asit fosfataz aktivitesi, mikroorganizma konsantrasyonu ve Zn(II) biyobirikiminin deneysel ve model değerleri içeren Box–Behnken tasarım matrisi (Box–Behnken design matrix along with the experimental and predicted values of acid phosphatase activity, biomass concentration and Zn(II) bioaccumulation)

SET	Gerçek Değerler			Asit Fosfataz Aktivitesi (µmol/L-dak)			Mikroorg. Derişimi (g/L)			Metal Biyobirikimi (mg/L)		
	pH	T	C <sub>Zn,i</sub>	Model değerler	Deneysel değerler	% Hata	Model değerler	Deneysel değerler	% Hata	Model değerler	Deneysel değerler	% Hata
1	0	1	1	633,07	666,11	-5,21	2,59	2,58	0,63	34,39	34,00	1,17
2	0	0	0	757,87	746,32	1,52	3,09	3,10	-0,20	16,50	16,66	-0,91
3	0	0	0	757,87	746,32	1,52	3,09	3,10	-0,20	16,50	16,66	-0,91
4	0	-1	1	572,68	596,13	-4,09	2,42	2,42	0,33	21,56	21,40	0,79
5	-1	1	0	711,66	721,42	-1,37	3,57	3,57	0,04	20,79	20,2	2,95
6	0	0	0	757,87	785,32	-3,62	3,09	3,10	-0,20	16,50	16,9	-2,32
7	1	-1	0	804,09	792,31	1,46	3,02	3,00	0,81	12,05	12,3	-1,99
8	-1	0	1	526,46	512,21	2,70	2,63	2,61	0,82	28,35	28,11	0,85
9	0	-1	-1	882,68	845,00	4,19	2,73	2,73	0,21	3,76	3,96	-4,80
10	0	0	0	757,87	752,21	0,74	3,09	3,0	3,02	16,50	16,75	-1,45
11	0	1	-1	943,07	912,21	3,27	3,85	3,84	0,38	6,69	6,86	-2,36
12	1	1	0	864,48	841,32	2,67	3,80	3,81	-0,06	20,37	20,42	-0,21
13	-1	0	-1	836,46	836,32	0,017	2,99	3,00	-0,17	5,60	5,93	-5,53
14	1	0	0	757,87	721,21	4,83	3,09	3,10	-0,29	16,50	16,5	0,04
15	-1	-1	0	651,27	661,00	-1,5	3,06	3,04	0,89	13,36	13,21	1,14
16	1	0	1	679,28	645,96	4,90	2,30	2,28	1,22	27,48	27,96	-1,68
17	1	0	-1	989,28	1100	-11,19	3,51	3,51	0,04	4,73	7,50	-1,08

**Tablo 3.** Cevap yüzeyi doğrusal eşitlik için, ortam bileşenlerinin fonksiyonu olarak asit fosfataz aktivitesinin varyans analizi (ANNOVA) (Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model of acid phosphatase activity as a function of concentration levels of medium components)

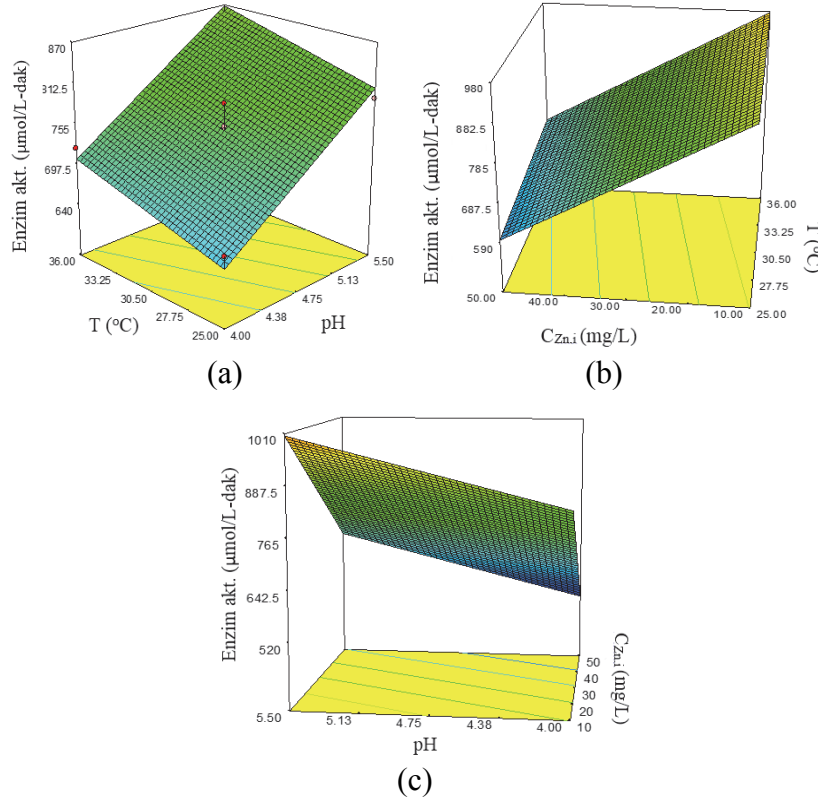
Kaynak	Kareler toplamı (Sum of squares)	DF	Ortalamanın Karesi (Mean square)	F- Değeri	Probabilite (P)>F	
Model	2,628 .10 <sup>5</sup>	3	87599,58	55,46	0,0001	uyumlu
Arta kalan (Residual)	20531,86	13	1579,37			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	18423,91	9	2047,10	3,88	0,1021	
Hata (Pure error)	2107,95	4	526,99			
Düzeltilmiş toplam	2,833.10 <sup>5</sup>	16				
$R^2 = 0,9275$	$R^2_{Adj} = 0,9108$	$R^2_{Pred} = 0,8564$	$R = 0,9632$			

Yüzde olarak ifade edildiğinde,  $R^2$  enzim aktivitesi için % 92,75 toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız % 7,25'inin modelle ifade edilemediğini göstermektedir.  $R^2_{Pred}$  (0,8564),  $R^2_{Adj}$  (0,9108) ile iyi bir uyum içerisindedir. Eğer modelde pek çok değişken varsa ve örnek miktarı çok değilse  $R^2_{Adj}$ ,  $R^2$  den belirgin şekilde küçük olabilir. Sonuç olarak bu değerlerin birbirine ve 1'e yaklaşması modelin başarısını göstermektedir.

Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranını gösterir. Sinyal gürültü oranının ise 4'ün üstünde olması beklenir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranı 24,922 yeterli sinyale işaret etmektedir. Uyum eksikliği (lack of fit), regresyonda içerilmeyen noktalarda deneysel kümedeki verileri göstermek için modelin başarısını ölçer. Eşitlik 3'ün regresyonundan elde edilen uyum eksikliği anlamlı değildir ( $P=0,1021$ ). Anlamlı olmayan uyum eksikliği iyidir ve öngörülen eşitliğin değişkenlerin değerlerinin herhangi bir kombinasyonunda asit fosfataz aktivitesini önermek için yeterli olduğunu göstermektedir. Asit fosfataz aktivitesi için doğrusal bir eşitlik elde edilmiş olması incelenen

parametrelerin birbirini etkilemediğini göstermektedir. *R. delemar*'ın asit fosfataz aktivitesi gösterdiği pH optimumu sıcaklıktan bağımsızdır. Bunun terside doğrudur. Asit fosfatazın aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı ortam pH'ına bağlı olarak değişmez. Eşitlik 3.'ün regresyonunun grafiksel gösterimlerine cevap yüzeyleri denir. Üç boyutlu cevap yüzeyleri design expert kullanılarak elde edilmiş ve Şekiller 1-a, b ve c ile gösterilmiştir.

Grafiklerden de görüldüğü gibi ortam pH'ı 5,03'e, sıcaklık 31,82 °C'ye ve başlangıç metal iyonu derişimi 30,15 mg/L'ye kadar artırılmasıyla, asit fosfataz aktivitesinin 794,098  $\mu\text{mol/L-dak}$ 'ya kadar arttığı gözlenmiştir. Daha önceki bir deney setinde bir parametrenin değerinin değiştirilip, diğerlerinin sabit tutulduğu konvansiyonel modellerle yapılan deneylerde, *R. delemar*'ın ortamda Cu(II) ve Ni(II) iyonlarının varlığında pH 4,8-5,0, sıcaklık 30-35 °C arasında asit fosfataz enzimini ürettiği gösterilmiştir. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen fosfataz için aktiviteyi artırıcı ve azaltıcı farklı ortamlar ifade edilmektedir [11]. Bu çalışmada uygulanan yüzey-cevap modeli ile bulunan pH ve sıcaklık optimumları literatürle uyumludur [6].



**Şekil 1.** (a) CYY ile, enzim aktivitesinin pH ve sıcaklıkla değişimini gösteren üç boyutlu grafiği (b) CYY ile, enzim aktivitesinin,  $C_{Zn,i}$  ve sıcaklıkla değişimini gösteren üç boyutlu grafiği (c) CYY ile, enzim aktivitesinin  $C_{Zn,i}$  ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği (Figure 1. (a) Response surface plot described by the model which represents the effect of pH and temperature and their mutual effects on acid phosphatase activity (b) Response surface plot described by the model which represents the effect of  $C_{Zn,i}$  and temperature and their mutual effects on acid phosphatase activity (c) Response surface plot described by the model which represents the effect of  $C_{Zn,i}$  and pH and their mutual effects on acid phosphatase activity)

**Tablo 4.** Cevap yüzeyi kuadratik eşitlik için, ortam bileşenlerinin fonksiyonu olarak *R. delemar*' in Zn (II) biyobirikimi için varyans analizi (ANNOVA) ( Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model of Zn(II) bioaccumulating as a function of concentration levels of medium components)

Kaynak	Kareler toplamı (Sum of squares)	DF	Ortalamanın Karesi (Mean square)	F- Değeri	Probabilite (P)>F	
Model	1152,72	9	128,08	4008,86	<0,0001	uyumlu
Arta kalan (Residual)	0,22	7	0,032			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	0,14	3	0,046	2,15	0,2362	
Hata (Pure error)	0,086	4	0,021			
Düzeltilmiş toplam	115295	16				
$R^2 = 0,9998$	$R^2_{Adj} = 0,9996$	$R^2_{Pred} = 0,9980$	$R = 0,9989$			

### 3.2. *R. delemar*' in Zn(II) Biyobirikimi İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi (Determination of Experimental Conditions for Zn (II) Bioaccumulation of *R. delemar*)

Eşitlik 4 tarafından ifade edilen model pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) konsantrasyonunun fonksiyonu olarak *R. delemar* tarafından biyobiriktilen Zn(II) konsantrasyonunu göstermektedir. Elde edilen eşitlik kuadratik bir eşitliktir ve denklemini aşağıdaki gibidir:

$$\text{Zn(II) biyobirikimi} = 16,69 - 0,25 x_1 + 3,83 x_2 + 11,24 x_3 - 0,28 x_1x_2 + 0,25 x_1x_3 + 2,42 x_2x_3 - 9,5 \cdot 10^{-3} x_1 - 0,15 x_2^2 + 0,013 x_3^2 \quad (4)$$

Eşitlik 4'ün istatistiksel anlamı F testiyle kontrol edildi. Cevap yüzeyi kuadratik eşitlik için varyans analizi (ANOVA) Tablo 4. 'de verilmiştir.

Model için F değeri 4008,65 olarak bulunmuştur. Model F değerinden ve probabilitate değerininin 0,0001'den küçük olmasından modelin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Zn(II) biyobirikimi için bulunan ikinci dereceden modelin  $R^2$ ,  $R^2_{Adj}$ ,  $R^2_{Pred}$  ve R (0,9989-0,9998) değerlerinin 1' e çok yakın olması deneysel değerlerle model tarafından öngörülen değerlerin mükemmel bir uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. Model değişkenlerinin önündeki katsayıların anlamlı olup olmadığını kontrol etmek için p değerleri kullanılmaktadır. Olasılık p değerlerinin 0,05' den küçük olması pH' ın, sıcaklığın ve başlangıç Zn(II) konsantrasyonunun birinci dereceden etkisinin öngörülen biyobirikim modelinde anlamlı olduğunu göstermektedir. Çalışılan başlangıç Zn(II) derişimi aralığında, pH ve sıcaklığın, pH ve konsantrasyonun, sıcaklık ve derişimin karşılıklı etkileşimlerinin biyobirikim üzerinde önemli olduğu görülmektedir. Öte yandan 0,1' den büyük olasılık p değerleri, pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonunun ikinci dereceden etkilerinin anlamsız olduğunu göstermektedir. Bu durum pH,

sıcaklık ve başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonu küçük değişimlerin Zn(II) biyobirikimini etkilemediğini göstermektedir. Eşitlik 4' ün regresyonunun grafiksel gösterimlerine cevap yüzeyleri denir. Üç boyutlu cevap yüzeyleri design expert kullanılarak elde edilmiş ve Şekil 2-a, b ve c ile gösterilmiştir. Sıcaklık ve pH'ın sırasıyla 31,82 °C ve 5,03'e artırılmasıyla Zn(II) biyobirikiminin arttığı gözlenmiştir (Şekil 2-a). Çalışılan sıcaklık aralığında başlangıç Zn(II) iyon derişiminin 30,15 mg/L' ye kadar artırılmasıyla Zn(II) biyobirikiminin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 2-b). Çalışılan pH aralığında başlangıç Zn(II) derişiminin artmasıyla biyobiriktilen Zn(II) iyonu derişimi neredeyse doğrusal olarak artmış ve maksimum değeri 17,622 mg/L' ye ulaşmıştır (Şekil 2-c).

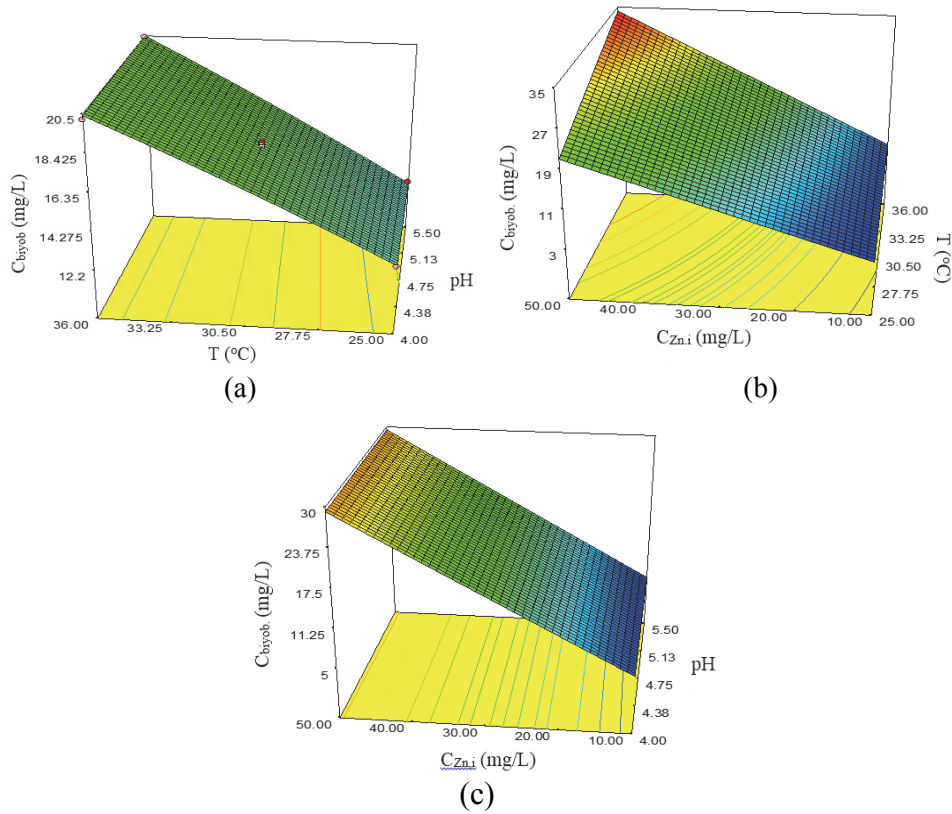
### 3.3. *R. delemar* Üremesi İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi (Determination of Experimental Conditions for Growth of *R. delemar*)

Eşitlik 5 tarafından verilen model pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) konsantrasyonunun fonksiyonu olarak *R. delemar* derişimini göstermektedir. Elde edilen model 2. dereceden bir eşitliktir ve denklemini aşağıdaki gibidir:

$$\text{Mikroorganizma derişimi} = 3,08 + 0,048 x_1 + 0,33 x_2 - 0,40 x_3 + 0,07 x_1x_2 + 0,21x_1x_3 - 0,24 x_2 x_3 + 0,12 x_1^2 - 0,16 x_2^2 - 0,35 x_3^2 \quad (5)$$

Eşitlik 5' in istatistiksel anlamı F testiyle kontrol edildi. Cevap yüzeyi 2. Dereceden eşitlik için varyans analizi (ANOVA) Tablo 5' de verilmiştir.

Model için F değeri 273,75 olarak bulunmuştur. Model F değerinden ve probabilitate değerininin küçük olmasından modelin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Mikroorganizma derişiminin model tarafından öngörülmesi için  $R^2$ ,  $R^2_{Adj}$ ,  $R^2_{Pred}$  ve R değerlerinin 1'e çok yakın olması deneysel değerlerle model



**Şekil 2-**(a) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği, (b) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve  $C_{Zn,i}$  ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği, (c) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin pH ve  $C_{Zn,i}$  ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği (Figure 2-(a) Response surface plot described by the model which represents the effect of pH and temperature and their mutual effects on Zn(II) bioaccumulating (b) Response surface plot described by the model which represents the effect of  $C_{Zn,i}$  and temperature and their mutual effects on Zn(II) bioaccumulating (c) Response surface plot described by the model which represents the effect of  $C_{Zn,i}$  and pH and their mutual effects on Zn(II) bioaccumulating)

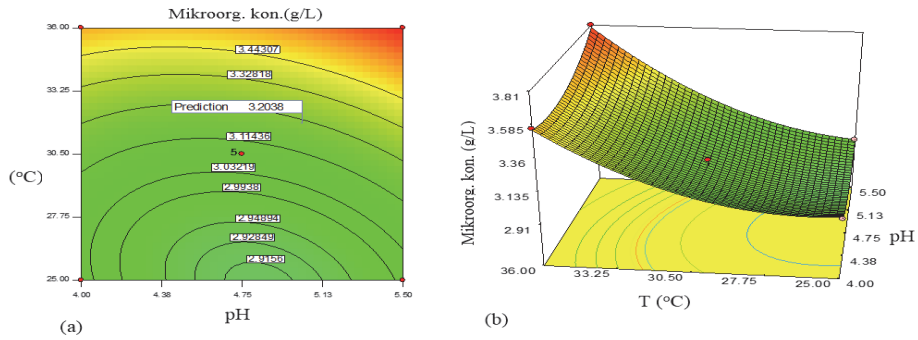
**Tablo 5.** Cevap yüzeyi kuadratik eşitlik için, sıcaklık, pH ve  $C_{Zn,i}$  fonksiyonu olarak *R. delemar* üremesinin varyans analizi (ANNOVA) (Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model of acid phosphatase activity as a function of concentration levels of medium components)

Kaynak	Kareler toplamı (Sum of squares)	DF	Ortalamanın Karesi (Mean square)	F- Değeri	Probabilite (P)>F	
Model	3,20	9	0,36	273,75	<0,0001	uyumlu
Arta kalan (Residual)	$9,089 \cdot 10^{-3}$	7	$1,29 \cdot 10^{-3}$			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	$9,75 \cdot 10^{-4}$	3	$3,25 \cdot 10^{-4}$	0,16	0,9178	
Hata (Pure error)	$8,11 \cdot 10^{-3}$	4	$2,082 \cdot 10^{-3}$			
Düzeltilmiş toplam	3,21	16				
$R^2 = 0,9972$	$R^2_{Adj} = 0,9935$	$R^2_{Pred} = 0,9912$	$R = 0,9986$			

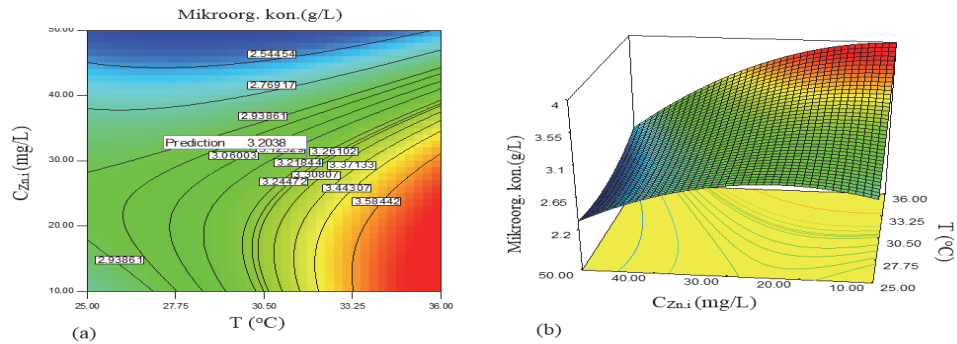
değerler arasındaki uyumun çok iyi olduğuna işaret eder.

Sıcaklık, pH ve Zn(II) konsantrasyonunun hem birinci dereceden etkisinin hem de ikinci dereceden etkisinin, hem de parametrelerin çoklu etkileşimlerinin, mikroorganizma konsantrasyonu üzerinde önemli olduğu, 0,05' den daha küçük olasılık değerlerinden

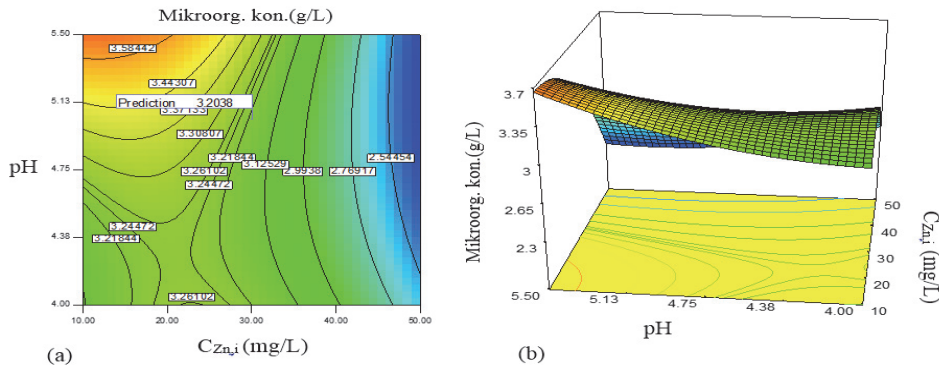
anlaşılmaktadır. Şekil 3' de üç boyutlu pH ve sıcaklığa karşı mikroorganizma cevap yüzeyine ait izdüşüm grafiği görülmektedir. İzdüşüm grafiklerinin şekillerinin dairesel veya eliptik olması, değişkenler arasındaki etkileşimlerin anlamlı olup olmadığına işaret eder. Eğer bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimler anlamlı ise şekil 4' de görüldüğü eliptik izdüşüm grafikleri elde edilir. Şekil 4.a ve b' de



**Şekil 3-**(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği (Figure 3-(a) Response surface contour plot of microorganism concentration showing interactive effect of temperature and pH (b) Response surface plot described by the model which represents the effect of temperature and pH and their mutual effects on Zn(II) bioaccumulating)



**Şekil 4-**(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve sıcaklık ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve sıcaklık ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği (Figure 4-(a) Response surface contour plot of mikroorganizma konsantrasyonu showing interactive effect of  $C_{Zn,i}$  and temperature (b) Response surface plot described by the model which represents the effect of  $C_{Zn,i}$  and temperature and their mutual effects on Zn(II) bioaccumulating)



**Şekil 5-**(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği (Figure 5-(a) Response surface contour plot of mikroorganizma konsantrasyonu showing interactive effect of  $C_{Zn,i}$  ve pH (b) Response surface plot described by the model which represents the effect of  $C_{Zn,i}$  and pH and their mutual effects on Zn(II) bioaccumulating)

mikroorganizma derişiminin sıcaklık arttıkça arttığı ancak başlangıç Zn(II) iyon konsantrasyonu arttıkça şiddetle azaldığı görülmektedir. Şekil 5' de çalışılan pH aralığı boyunca, yüksek başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonlarında mikroorganizma konsantrasyonunun düştüğü, düşük başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonlarında pH 5,03' de mikroorganizma konsantrasyonu için maksimum değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Ancak amaç

asit fosfat aktivitesini ve Zn(II) biyobirikimini maksimize eden uygun aralıktaki mikroorganizma konsantrasyonunu belirlemektir. Grafiklerden de görüldüğü gibi ortam pH' ının 5,03, sıcaklığının 31,82 °C ve başlangıç metal iyonu konsantrasyonunun 30,15 mg/L olduğu yerde, 3,2038 g/L mikroorganizma konsantrasyonu elde edilmiştir.



### 3.4. Deney doğrulama (Experimental verification)

CYY ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için yapılan deney doğrulama sonuçlarından, asit fosfataz aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ ), mikroorganizma konsantrasyonu ( $\text{g/L}$ ) ve Zn(II) biyobirikimi ( $\text{mg/L}$ ) için % hata değerleri sırasıyla 0,84, 5,79, ve 3,77 olarak bulunmuştur.

### 4. SONUÇLAR (RESULTS)

Design Expert 7,0 kullanılarak Zn(II) için en iyileme deneyleri yapılmış ve asit fosfataz aktivitesi için doğrusal, mikroorganizma konsantrasyonu ve Zn(II) biyobirikimi için kuadratik eşitliğe tam bir uyum gözlenmiştir. CYY ile yapılan çalışmalar sonucunda pH 5,03, 31,82 °C ve 30,15 mg/L başlangıç değerleri için deneyler tasarlanmış, asit fosfataz aktivitesi 794,098  $\mu\text{mol/L-dak}$ , mikroorganizma konsantrasyonu 3,203 g/L ve biyosorplanan Zn(II) miktarı 17,62 mg/L olarak öngörülmüştür. Deney doğrulama deneyi yapılarak sonuçların duyarlılığı ve geçerliliği gösterilmiştir. Bu çalışmayla CYY kullanılarak, özellikle tıp ve eczacılık alanında önemli bir yere sahip olan asit fosfataz enziminin en etkin besin ortamı içeriğine ulaşarak, kısa sürede üretimine katkıda bulunulduğu düşünülmektedir.

### 5. KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Abdallah A.A, Magboul P., L.H. McSweeney. 'Department of food science and technology', **Food chemistry**, 6515-6522, 1999.
2. Schmidt G.G. Bartsch. M. C. Lamont. T. Herman. and M. Liss, ' Acid phosphatase of

baker's yeast: an enzyme of the external cell surface', **Biochemistry**, 2, 126-121, 1963.

3. Nyc. J.F. 'A repressible acid phosphatase in *Neurospora crassa*', **Biochem. Biophysic**, 27, 183-188, 1967.
4. Blum J. J. 'Observation of the acid phosphatases of *Euglena gracilis*', **J. Cell Biology.**, 24, 223-234, 1956.
5. Tsekova K. and Galabova D. 'Phosphatase production and activity in copper(II) accumulating *Rhizopus delemar*'. **Enzyme Microb. Technology**, 33, 926-931, 2003.
6. Leborans G.F. and Novillo. A., "Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium *Olithodiscus luteus* (Raphidophyceae) **Water Resource**, 30, 57-62, 1996.
7. Tsezos M. and Volesky B., "Biosorption of Uranium and Thorium". **Biotechnology and Bioengineering**, 23, 583-604, 1981.
8. Macaskie L.E., Wates J.M., Dean A.C.R.' Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.* immobilized on gel and solid supports: applicability to the treatment of liquid wastes containing heavy metal cations', **Biotechnology and Bioengineering**, 30, 66-73, 1987.
9. Stat ease, Inc 2021 East Hannepin Ave., Suite 480 Minneapolis, MN 55413 Design Expert version 7.0 , Buil date 2005.
10. Acikel Ü., Ersan, M., ' Acid phosphatase production by *Rhizopus delemar*: A role played in the Ni(II) bioaccumulation process', **Journal of Hazardous Materials**, 184, 632-639, 2010.
11. Durak Z. E, Gürü M., 'Isolation, Inhibition and Kinetic Modelling of alkaline phosphatase (Alp) Enzyme'**Journal of Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University.**, 28, 1, 2013.

