

## KALSİYUM ALJİNATTA HÜCRE İMMOBİLİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİDEKİ UYGULAMALARI

### CELL IMMOBILIZATION IN CALCIUM ALGINATE AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Yekta GÖKSUNGUR, Ulgar GÜVENÇ

Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 35100 Bornova İzmir

**ÖZET:** İmmobilize hücrelerin serbest haldeki hücelere göre üründen kolayca ayrılabilmesi, tekrar tekrar kullanılabilmesi, yüksek hacimsel verimlilik değerleri elde edilebilmesi, proses kontrolün daha kolay olması ve kontaminasyona daha az duyarlı olmaları gibi bazı üstünlükleri vardır. Bu avantajlarından dolayı bazı biyolojik ürünlerin immobilize hücre sistemleri ile üretilmesi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Hücre immobilizasyon teknikleri arasında kalsiyum aljinat jeli, immobilizasyon yönteminin kolaylığı ve jelin toksik olmayan karakteri nedeniyle en fazla kullanılan tekniklerden birisidir. Bu derlemede aljinik asit ve kalsiyum aljinat jelinin yapısı, özellikleri, kalsiyum aljinat jeline immobilizasyon metodu ve konu ile ilgili yapılan çalışmalar anlatılmıştır.

**ABSTRACT:** As immobilized cells offers some advantages over free cells such as relative ease of product separation, reuse of biocatalysts, high volumetric productivity, improved process control and reduced susceptibility of cells to contamination research has been directed to the production of biological products by immobilized cell systems. Among the cell immobilization techniques calcium alginate gel has been one of the most used matrices for whole cell entrapment due to its simplicity and non-toxic character. This review examines the properties of alginic acid and calcium alginate gel, the method of calcium alginate immobilization and recent literature in the area of cell immobilization by Ca-alginate entrapment.

### GİRİŞ

Biyokatalizörler kimyasal tepkimelerin daha yumuşak, ılımlı ve kolay koşullarda gerçekleşmesini sağlayan enzimler, hücreler ve hücre parçalarıdır. Yüksek fiyata sahip olan biyokatalizörlerin değişik yöntemlerle immobilize edilmeleri ve defalarca kullanılabilmesi üzerine özellikle 1970'li yılların başından beri sayısız çalışmalar yapılmıştır. Yapılan geniş çaplı çalışmalar araştırmalar sonucunda glukoz izomeraz gibi bazı immobilize enzimler endüstriyel boyutlarda başarı ile kullanılmaktadır. Ancak daha kararlı ve ucuz olmalarının yanısıra enzim ayırma ve saflaştırma işlemlerine gerek kalmadığı için birçok durumda immobilize hücreler, immobilize enzimlere tercih edilmektedir.

İmmobilize hücrelerin ilk kullanımı birçok kaynağa göre 19. yüzyılın başlarında damlatmalı filtre sisteminde, odun yongası üzerine adsorbe edilmiş asetik asit bakterileri ile sirke üretimidir. Daha sonraları benzer sistemler ve yaklaşımlar atık su arıtılmasında da kullanılmıştır (SCOTT 1987). Son yıllarda hücre immobilizasyonu için çok değişik yöntemler kullanılmakla beraber bunlar arasında en çok kullanılan polimer matrikste tutuklama yöntemidir. Bu yöntemde jelatin, agar, aljinat, karagenan, kollagen, poliakrilamid, selüloz türevleri gibi polimerler kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda üzerinde birçok çalışma yapılan sodyum aljinat, birçok kaynağa göre mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunda en çok kullanılan polimer matrikstir (JAMUNA ve ark. 1992, KIERSTAN ve COUGHLAN 1985, ROSEVEAR ve ark. 1987). Bu derlemede aljinik asitin yapısı, özellikleri, kalsiyum aljinatta immobilizasyon yöntemi ve konu ile ilgili yapılan çalışmalar ele alınmıştır.

### HÜCRE İMMOBİLİZASYONU

İmmobilizasyon aktif olan enzim veya hücrelerin hareketli sıvı fazdan fiziksel olarak substrat ve ürün moleküllerinin fazlar arasında yer değiştirebileceği şekilde ayrılmasıdır (ROSEVEAR 1984). İmmobilize hücrelerin serbest hücelere göre başlıca avantajları şunlardır: immobilize hücreler istenilen biyodönüşüm

sonucunda ortamdan kolayca ayrılabilirler ve tekrar tekrar kullanılabilirler, immobilize hücreler ortamdan ayrıldıkları için fermentasyon ortamını kirletmezler ve alt akım işlemleri kolaylaşır, immobilize hücreler sürekli sistemde çalışmaya çok uygundur ve bunlarla daha yüksek hacimsel verimlilik değerleri elde edilebilir, substrat biyomas oluşumu için harcanmayacağından aynı mikroorganizma kullanılarak serbest hücrelere göre daha fazla ürün elde edilebilmektedir, immobilizasyon birçok durumda hücre aktivitesini stabilize eder ve immobilize hücreler kontaminasyona daha az duyarlıdır (KIERSTAN ve COUGHLAN 1985).

Hücre immobilizasyonu için özellikle son 20 yıldan beri yapılan çalışmalarda değişik teknikler geliştirilmekle beraber, bu teknikler temel olarak taşıyıcıya bağlama ve tutuklama olmak üzere 2 ana grupta incelenebilir (SCOTT 1987). Bu yöntemlerden polimer içerisinde tutuklama ile immobilizasyon, hücre immobilizasyonunda kullanılan en basit ve yumuşak koşullar kullanıldığı için en güvenli yöntemdir. Enzimlerin immobilizasyonunda ise dayanak maddesinin gözenek çapının genişliği nedeni ile daha az tercih edilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan polimerler aljinat, karagenen, agar ve poliakrilamittir (WOODWARD 1988).

### ALJİNATIN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Aljinat ilk olarak 1881 yılında İngiliz kimyager E.E.C. Stanford tarafından tanımlanmıştır. Doğada genel olarak kahverengi deniz alginde bulunmakla beraber, *Azotobacter vinelandii* gibi toprak bakterilerinde ve bazı *Pseudomonas* türlerinde de aljinata benzeyen hücre dışı polimerik maddeler belirlenmiştir. Aljinat, kahverengi deniz alginin kuru maddesinin %40'ını oluşturur ve hücre içi matrikste sodyum, kalsiyum, magnezyum, stronsiyum ve baryum iyonları içeren bir jel halinde bulunur. Alg dokularındaki temel işlevinin dokulara dayanıklılık ve elastikiyet vermek olduğu düşünülmektedir. Aljinik asitin sodyum tuzlarının biyoteknolojik uygulamalarda immobilizasyon materyali olarak kullanılmasının yanısıra su tutucu, jel oluşturucu, viskoziteyi artırıcı ve stabilize edici özelliklerinden dolayı sanayide de yaygın olarak kullanılmaktadır (SKJAK-BRAEK 1992).

Molekül olarak aljinat düz zincir yapıda (1→4) bağlı β-D mannuronik asit ve α-L-guluronik asit ünitelerinden oluşan bir kopolimerdir. Aljinik asitin yapısında 3 değişik polimerik yapı vardır. Bunlar temel olarak D-mannuronik asit üniteleri, guluronik asit üniteleri ve mannuronik asit ve guluronik asit ünitelerini karışık olarak içeren yapılardır. Bu monomerler glikozidik bağ ile bağlanarak polimerik yapıyı oluşturmaktadır (COTTRELL ve KOVACS 1977).

Aljinik asitin en önemli özelliği sodyum gibi +1 değerlikli katyonların varlığında düşük konsantrasyonlarda bile viskoz bir çözelti oluşturması; başta kalsiyum olmak üzere baryum, alüminyum ve stronsiyum gibi +2 değerlikli katyonların varlığında ise suda çözünmeyen bir jel oluşturmasıdır (ROSEVEAR 1984). Jel oluşumunun, polimer zincirindeki karboksil gruplarının kalsiyum iyonları ile iyonik köprü oluşması ile veya kalsiyum iyonlarının her polimer çiftindeki hidroksil ve karboksil grupları ile şelat oluşturması ile olduğu düşünülmektedir (COTTRELL ve KOVACS 1977).

Jel oluşumunu etkileyen temel faktör aljinat jelinin yapısındaki guluronik asit ünitelerinin oranı ve uzunluğudur. Guluronik asit miktarı arttıkça jel mekanik olarak daha dayanıklı olur ve jel oluşumunu bozan asitlere ve şelat yapıcı bileşiklere karşı stabilitesi daha fazla olur. Ayrıca yüksek guluronik asit içeren jellerin gözenekliliği daha yüksektir. Mannuronik asit içeriği arttıkça ise jel daha yumuşak ve elastik olur, jel oluşumu sırasında daha çok büzüşme meydana gelir ve jelin gözenekliliği azalır. EDTA ve fosfat iyonları gibi jel yapısını bozan bileşikler tarafında jelin çözünmesi daha kolay olur (SKJAK-BRAEK 1992).

Biyoteknolojik uygulamalarda immobilizasyon materyali olarak kullanımının dışında aljinatın gıda ve tekstil sektörlerinde de yaygın bir kullanım alanı vardır. Gıda sanayinde, dondurma üretiminde yıllardan beri kullanılan aljinat bazlı stabilizatörler kristal oluşumunu düzenlemekte ve pürüzsüz bir yapı sağlamaktadır. Çoğu aljinat bazlı dondurma stabilizatörü polifosfatlarla işleme tabi tutulmuş aljinat veya propilen glikol aljinattır. Dondurma dışında eritme peyniri, ekşi krema, çikolata süt gibi süt ürünlerinde de aljinat bazlı stabilizatörler

kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Pastacılıkta, pasta ve keklerin üzerine sürülen krema veya sosların stabilizasyonu için de aljinat kullanılmaktadır. Aljinatın film oluşturma ve su tutma özelliklerinden faydalanılarak krema ve sosların ambalaja yapışması, çatlaması ve depolama sırasında kurumması engellenebilmektedir. Ayrıca gazsız içeceklerde (propilen glikol aljinat), tatlılarda, salata soslarında ve konserve ürünlerinde de aljinat yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **KALSİYUM ALJİNATTA MİKROBİYAL HÜCRELERİN İMMOBİLİZASYONU**

Kalsiyum aljinat jelinin oluşumu yumuşak koşullarda gerçekleştiği için bu jel canlı hücrelerin immobilizasyonu için çok uygundur. Immobilizasyon yönteminde temel olarak sodyum aljinat çözeltisi ile karıştırılan hücreler  $\text{CaCl}_2$  çözeltisine damlatılır ve oluşan Ca-aljinat jel boncukları içerisinde hücrelerin hapsedilmeleri sağlanır. Jel oluşumu sırasında sodyum iyonları, kalsiyum iyonları ile yer değiştirir ve suda erimeyen ve hücreleri yakalayan Ca-aljinat damlaları oluşur.

İmmobilizasyon için hazırlanan sodyum aljinat çözeltisi higroskopik yapıda, toz halindedir ve çözelti hazırlanması sırasında topak oluşabilmektedir. Bu nedenle Na-aljinat çözeltisi hazırlanırken sürekli karıştırılan suya aljinat ağır ağır ilave edilmelidir. Elde edilen çözeltinin ısıtılması ile Na-aljinatın çözünürlüğü de artmaktadır. Çözelti hazırlandıktan sonra oluşan hava kabarcıklarının çözeltiyi terketmesi için yarım saat bekletilmelidir. Hava kabarcıklarının uzaklaştırılmaması, bu kabarcıkların boncuklarda tutuklanmasına ve daha sonraki kullanımlarda boncukların sıvı yüzeyinde yüzmesine sebep olabilmektedir.

Kalsiyum aljinat jelinin dayanıklılığını etkileyen temel faktörler aljinatın tipi (guluronik asit ve mannuronik asit içeriği), Na-aljinat konsantrasyonu ve  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinin konsantrasyonudur. OGBONNA ve ark. (1989) maya hücrelerini Ca-aljinat boncuklarında immobilize ettikleri çalışmalarında, immobilizasyondaki başlangıç hücre konsantrasyonunun,  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içerisinde boncukları bekletme süresinin ve sodyum aljinat konsantrasyonunun fermentasyon sırasında Ca aljinat boncuklarının stabilitesini etkileyen en önemli faktörler olduğunu belirlerken,  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonunun boncukların difüzyon özelliklerine etkisinin az olduğunu belirtmişlerdir.

Aljinat çözeltisindeki Na-aljinat konsantrasyonunun artırılmasıyla boncukların yapısı daha güçlendirilebilir ancak yüksek aljinat konsantrasyonlarında (özellikle %5'in üzerinde) çalışmak viskozite problemi nedeniyle güçleşmekte ve hücreleri homojen olarak karıştırmak mümkün olamamaktadır (OGBONNA ve ark. 1989).

Ca-aljinat jelinin immobilizasyon materyali olarak kullanılmasındaki az sayıdaki problemlerden birisi polifosfatlar, EDTA gibi şelat yapıcı bileşiklerin, laktik asit ve sitrik asit gibi organik asitlerin ve  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$  gibi bazı katyonların kalsiyum aljinatta bulunan kalsiyum iyonları ile yer değiştirmesi ve aljinata bağlanarak jelin parçalanıp dağılmasına neden olmasıdır (CHETTHAM ve ark. 1979). EIKMEIER ve REHM (1987) Ca-aljinatta tutuklanmış *A. niger* hücreleri ile sitrik asit üretiminde aljinat boncuklarının asit oluşumuna bağlı olarak büzüşmeye ve mekanik dayanıklılıklarını kaybetmeye başladıklarını belirlemişlerdir. BÜYÜKGÜNGÖR (1992) immobilize edilmiş *L. bulgaricus* ile laktik asit üretiminde, 48 saatlik fermentasyon sonunda Ca-aljinat boncuklarının sertliklerini kaybettiklerini ve deforme olduklarını belirlemiştir.

Ca-aljinat jelinin yukarıda belirtilen kimyasal maddelerin etkisiyle parçalanıp çözünmesi ortamda  $\text{Ca}^{+2}$  bulundurulması ile engellenebilir. GUOQIANG ve ark. (1991), Ca-aljinatta immobilize edilmiş *L. casei* hücreleri ile glükozdan laktik asit üretiminde oluşan laktik asitin kalsiyumu bağlayarak boncukları parçaladığını belirlemiş ancak fermentasyon sırasında ortamda  $\text{CaCO}_3$  bulundurarak bu sorunu çözümlenmişlerdir. GILSON ve THOMAS (1995), Ca-aljinatta immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile etil alkol üretiminde, fermentasyon sıvısına %56  $\text{CaCl}_2$  ilave ederek aljinat boncuklarının parçalanmasını engellemişlerdir. LI (1996) ise maya hücrelerini Ca-aljinat boncuklarında immobilize etmiş ve boncukları bir polielektrolit kompleksi ile kaplayarak etil alkol üretiminde boncukların dayanıklılığını artırmıştır.

Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle gerçekleştirilen üretimlerde bir kısım hücre fermentasyon ortamına sızmaktadır. Başlangıçta hücreler boncukların içinde ve yüzeyinde homojen olarak dağılırken, fermentasyonun ilerleyen aşamalarında, besin elementlerince zengin olan yüzeye yakın kısımlardaki hücrelerin çoğalmasından dolayı hücre sayısı artmaktadır. Boncukların üzerinde ve yüzeye yakın kısımlarda çoğalan hücreler, boncuklardan kolayca fermentasyon ortamına geçmekte ve bu yolla oluşan hücre sızıntısı; jel matrisinin mekanik dayanıklılığı, gözenek büyüklüğü gibi fiziksel özelliklerine, mikroorganizma türüne, başlangıç hücre konsantrasyonuna, ortam koşullarına bağlı olarak değişmektedir (TANAKA ve ark. 1989). GÖKSUNGUR ve GÜVENÇ (1999) Ca-aljinatta immobilize edilmiş *L. delbrueckii* ile melastan laktik asit üretiminde ortamdaki toplam hücre popülasyonunun %4-5 kadarının boncuklardan sızarak ortamda serbest halde bulunan hücreler olduğunu belirlemiş ve sistemdeki hücrelerin büyük bir kısmını (%94-95) aljinatta hapsedilen hücreler meydana getirdiği için laktik asit üretiminin sızan hücrelerden çok immobilize haldeki hücreler tarafından yapıldığı sonucuna varmışlardır. CHEETHAM ve ark. (1979)'da *Saccharomyces uvarum* mayasını Ca-aljinatta immobilize ettikleri çalışmalarında, tutuklanan hücrelerin %5 kadarının jelden dışarıya sızdığını belirlemişlerdir.

Ca-aljinat boncuklarından hücre sızmasını engellemek için değişik çalışmalar yapılmış ve değişik immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. CHEETHAM ve ark. (1979), Ca-aljinat boncuklarının %0.01 (w/v) kloramfenikol çözeltisi içerisinde çalkalanması sonucu %85 oranında; %0.01 glutaraldehit ile muamelesi sonucunda ise hücre sızıntısının %50-65 oranında azaltılabileceğini, ancak her iki durumda da hücre canlılığında önemli azalmalar olduğunu belirlemişlerdir. Benzer bir çalışmada BOYAVAL ve GOULET (1988), elde ettikleri Ca-aljinat boncuklarını polietilenimine ile muamele ettiklerinde, hücre kaybının azalmadığını ve boncuklarda büzüşme meydana geldiğini belirtmişlerdir. Boncukların glutaraldehit çözeltisinde tutularak hücre sızıntısının engellenmesinin ise hücrelerin hemen hemen tamamını öldürdüğünü belirlemişlerdir.

Yukarıda anlatılan ve bir takım kimyasal maddelerle hücre sızıntısının önlenmeye çalışıldığı yöntemlerde, hücrelerin canlılığının daha zarar görmesi nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Diğer bazı araştırmacılar ise Ca-aljinat boncuklarının dışını kaplayarak hücre sızıntısının engellenmesi üzerine çalışmalar yapmıştır. VARLOP ve ark. (1987), Ca-aljinat boncukları oluştuktan sonra, dış yüzeylerini hücre içermeyen bir aljinat tabakası ile kaplayarak boncuklardan hücre kaybını engellemeye çalışmışlardır. TANAKA ve ark. (1989), *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerini iki tabakalı aljinat lifi içerisinde tutuklayarak hücre sızıntısını engellemişlerdir. Bu sistemde içte bulunan tabaka hücreleri hapsederken, dış aljinat tabakası ise hücre sızmasını engellemiştir. Dış tabakanın glükoz ve etil alkol gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin geçişini engellemediğini belirlemişler ve sürekli fermentasyon yöntemi ile 300 saat süresince hücre sızıntısı olmadan etil alkol üretmişlerdir. CHAMPAGNE ve ark.'da (1992), Ca-aljinatta immobilize olmuş *Lactococcus lactis* hücrelerinin fermentasyon sırasında ortama sızmasını engellemek için değişik yöntemler uygulamışlardır.

Aljinat-hücre karışımı değişik boyutlardaki şırınga iğnelerden veya pipet uçlarından  $CaCl_2$  çözeltisine damlatarak farklı çaplarda boncuk elde etmek mümkündür GÖKSUNGUR ve GÜVENÇ (1999) *L. delbrueckii* bakterisinin Ca-aljinatta tutuklanmasında 3 değişik boyutta plastik mikropipet ucu kullanarak 1.3-1.7 mm, 2.0-2.4 mm ve 2.8-3.2 mm aralıklarında çapa sahip boncuklar üretmişlerdir. Daha küçük çapta jel boncuğu hazırlamak, aljinat damlalalarını atomize etmekle veya jel üzerine kontrollü hava akımı vermekle mümkün olmaktadır (ROSEVEAR 1984).

## **KALSİYUM ALJİNATTA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ HÜCRELERİN BİYOTEKNOLOJİK PROSELERDE UYGULAMA ALANLARI**

Ca-aljinatta tutuklama yöntemi basitliği, yumuşak koşullarda gerçekleşmesi ve hücrelere zarar vermemesi nedeniyle bakteri, maya, küf hücrelerinin, enzim komplekslerinin ve bitki hücrelerinin immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmakta ve etil alkolden antibiyotik üretimine kadar geniş bir yelpazede ürün üretimi gerçekleştirilmektedir.

### Organik Asit Üretimi

Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle laktik asit, sitrik asit, propiyonik asit ve asetik asit gibi organik asitlerin üretimi ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma vardır. Özellikle laktik asit bakterilerinin immobilizasyonunda Ca-aljinat en çok kullanılan polimerdir (BOYAVAL ve GOULET 1988). BOYAVAL ve GOULET (1988) peynir suyu ultrafiltratından laktik asit üretiminde *L. helveticus*'u, GÖKSUNGUR ve GÜVENÇ (1999) melastan laktik asit üretiminde *L. delbrueckii*'yi, ABDEL-NABY ve ark. (1992) enzimatik nişasta hidrolizatından laktik asit üretiminde *L. lactis*'i, GUOQIANG ve ark. (1991) glükoz içeren sentetik ortamdan laktik asit üretiminde *L. casei*'yi Ca-aljinat boncuklarında tutuklamışlardır. Laktik asit bakterileri ile yapılan çalışmalardan farklı olarak HANG ve ark. (1989) glükoz içeren sentetik ortamdan Ca-aljinatta tutukladıkları *Rhizopus oryzae* küfü ile laktik asit üretmişlerdir.

Mikroorganizmalar belirli bir substratı direk olarak kullanamadığında, diğer bir mikroorganizma ile beraber immobilize edilmekte ve buna koimmobilizasyon ismi verilmektedir. Koimmobilizasyonda mikroorganizmalardan birisi substratı parçalarken, diğer parçalanmış substratta istenilen biyodönüşümü sağlamaktadır. KUROSAWA ve ark. (1988) *Aspergillus awamori* ve *L. lactis*'i Ca-aljinat jelinde beraber immobilize ederek nişastadan laktik asit üretmişlerdir. Bu çalışmada nişastayı parçalayan *A. awamori* küfü Ca-aljinat boncuklarının oksijen zengin olan yüzey kısımlarında gelişme gösterirken, anaerobik *L. lactis* bakterisi ise jel boncuklarının yüzey bölgelerinin yanısıra, oksijen fakir olan merkez bölgelerinde de aktivite göstermiştir. Diğer bir çalışmada ise ROUKAS ve KOTZEKIDOU (1991) Ca-aljinatta koimmobilize ettikleri *L. caesi* ve *L. lactis* hücreleri ile peynir suyundan laktik asit üretmişlerdir.

Gıda, içecek ve eczacılık endüstrilerinde geniş kullanım alanı olan sitrik asidin de Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerden üretimi ile ilgili değişik çalışmalar yapılmıştır. EIKMEIER ve REHM (1984) Ca-aljinatta tutukladıkları *Aspergillus niger* hücreleri ile hava kaldırmalı biyoreaktörde, ROUKAS (1991) ise aynı mikroorganizma ile pancar melasından kesikli sistemde sitrik asit üretmişlerdir. RYMOWICZ ve ark. (1993) *Yarrowia lipolytica* mayasını Ca-aljinatta immobilize ederek glükoz içeren ortamdan çalkalamalı karıştırıcıda tekrarlanan kesikli tipte ferentasyon yöntemi ile ve hava kaldırmalı biyoreaktörde sürekli yöntem ile sitrik asit üretmişlerdir.

Ca-aljinatta tutuklanmış hücrelerle propiyonik asit ve asetik asit üretimi ile ilgili değişik çalışmalar da yapılmıştır (RICKERT ve ark. 1998, SAEKI 1990). SAEKI (1990), sakkarifikasyona tabi tutulmuş pirinç içeren ortamdan Ca-aljinatta tutuklanmış *S. ludwigii* hücreleri ile önce etil alkol üretmişler, daha sonra bu ortamdan yine Ca-aljinatta tutuklanmış *Acetobacter aceti* hücrelerini kullanarak sürekli sistemde %4.7-5.3 oranında asetik asit içeren sirke üretmişlerdir.

### Etil Alkol Üretimi

Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle etil alkol üretimi ile ilgili yapılan çalışmalarda en çok kullanılan organizma *Saccharomyces cerevisiae* (BRAVO ve GONZALES, 1991, ROUKAS 1994) olmakla beraber, *Kluyveromyces marxianus* (GOUGH ve McHALE 1998), *Saccharomyces diastaticus* (DEBNATH ve ark. 1990), *Zymomonas mobilis* (KIM ve RHEE, 1993) gibi mikroorganizmalar da kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda daha çok dolgu yatak ve akışkan yatak tipi biyoreaktörler üzerinde durulmuş ve 15-150 g/h'a kadar hacimsel verimlilik değerleri elde edilmiştir. Dolgu yatak biyoreaktör düşük üretim ve işletme maliyetleri, basit yapıları ve kolonda yüksek biyokatalizör yoğunluğu elde edilebildiği için son yıllarda yapılan çalışmalarda çok sık kullanılmıştır. Ancak bu biyoreaktörlerin dezavantajı olan yüksek basınç düşüşleri olması ve özellikle etil alkol üretiminde ortaya çıkan CO<sub>2</sub> gazının biyoreaktörün çalışmasını olumsuz etkilemesi nedeniyle çalışmalarda yatay kolonlar ve konik kolonlar gibi birtakım özel tasarımlar üzerinde durulmuştur (ÇOLAK ve HAMAMCI 1991, SCOTT 1987).

Koimmobilize sistemlerle etil alkol üretimi ile yapılan çalışmalarda KIM ve RHEE (1993) *Zymomonas mobilis* bakterisini ve amiloglukosidaz enzimini kitin ve Ca-aljinattan oluşan bir sistemde beraber immobilize

ederek nişastadan laboratuvar ve pilot ölçeklerinde etil alkol üretmişlerdir. Nişasta ile yapılan diğer bir çalışmada *Aspergillus awamori* ve *Z.mobilis* beraber immobilize edilerek etil alkol üretilmiştir (TANAKA ve ark. 1986). KIERSTAN ve ark. (1982) ise *Z.mobilis* sellobiyozu parçalayamadığı için,  $\beta$ -glükosidaz enzimi ve *Z.mobilis*'i Ca-aljinatta koimmobilize ederek sellobiyozdan etil alkol üretmişlerdir.

Immobilize hücrelerle etil alkol üretimi sanayide uygulama alanı bulan konulardan birisidir. Ca-aljinatta immobilize hücrelerle endüstriyel etil alkol üretiminde bilinen tesislerden bir tanesi Japonya'daki Kyowa HAKKO Kogyo Şirketi tarafından kurulan pilot tesistir. Ca-aljinatta tutuklanmış *S.cerevisiae*'nin kullanıldığı tesis 4 ton toplam reaktör hacmine sahip 5 akışkan yatak biyoreaktörden oluşmaktadır. Tesiste 20 g/l/h hacimsel verimlilikle, günde 2.4 ton etil alkol üretilebilmekte ve yaklaşık 6 ay süre ile tesis sürekli sistemde çalışabilmektedir (NAGASHIMA ve ark. 1984).

### Gıda ve İçecek Sanayindeki Uygulamalar

Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerin gıda ve içecek sanayinde de çeşitli uygulama alanları vardır. Süt sanayinde, peynir üretiminde sütün önfermentasyonunda ve sürekli yoğurt üretiminde Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle çalışmalar yapılmaktadır PREVOST ve ark. (1985) *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'u Ca-aljinat boncuklarında beraber ve ayrı ayrı tutuklayarak sürekli karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde sürekli sistem yoğurt üretmişlerdir. PREVOST ve DIVIES (1987) peynir üretiminde kullanılan mezofilik *Lactococcus* cinsi bakterileri Ca-aljinatta tutuklamış ve sütü önfermentasyona tabi tutarak peynir üretmişlerdir. Aynı araştırmacılar bu yöntemin, taze fermente peynir üretim prosesindeki inkübasyon süresini %50 oranında azalttığını belirtmişlerdir.

Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerin bira, şarap, şampanya ve sirke üretiminde kullanımı üzerine de çalışmalar yapılmıştır (SAEKI 1990, SCOTT 1987, SHIEH ve TSAY, 1990). SHIEH ve TSAY (1990) malik asiti metabolize edebilen *Leuconostoc* sp. M-1 hücrelerini Ca-aljinat jelinde tutuklamışlar ve şaraptaki malolaktik fermentasyonu immobilize hücrelerle gerçekleştirmişlerdir.

### Enzim Üretimi

Özellikle son yıllarda Ca-aljinatta immobilize edilmiş bakteri ve küf hücrelerinden çeşitli enzimlerin üretimi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda aktivitede önemli kayıplar olmadan tekrar tekrar enzim üretebilme, enzim veriminin yüksekliği ve sürekli sistemlere uygunluğu gibi kimi avantajları immobilize hücrelerin serbest hücrelere üstünlüğü olarak gözükmektedir (DOBREVA ve ark. 1996, GHOSH ve NANDA 1991). RAMAKRISHNA ve ark. (1992) Ca-aljinatta tutuklanmış *Bacillus cereus* hücreleri ile akışkan yatak biyoreaktörde sürekli istemde  $\alpha$ -amilaz enzimi üretmişler ve hacimsel verimliliğin serbest hücrelerle kesikli yöntemde yapılan enzim üretimlerine göre 20 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Ca-aljinatta tutuklanmış hücrelerle enzim üretimi ile ilgili yapılan bazı çalışmalar Tablo 1'de verilmiştir.

Yukarıda anlatılan uygulamalar dışında Ca-aljinatta tutuklanmış hücrelerle bakteriyosinler, penisilin G, glükonik asit, izopropanol, n-bütanol, L-alanin, ksilitol, kojik asit gibi değişik biyolojik ürünlerin üretimine ait araştırmalar da

Çizelge 1. Kalsiyum Aljinatta Tutuklanmış Hücrelerden Elde edilen Bazı Enzimler

| Mikroorganizma                    | Enzim                  | Referans                         |
|-----------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| <i>Bacillus licheniformis</i>     | a-amilaz               | DOBREVA ve ark. 1996             |
| <i>Aspergillus sydowii</i>        | ksilinaz               | GHOSH ve NANDA 1991              |
| <i>Bacillus cereus</i>            | a-amilaz               | RAMAKRISHNA ve ark. 1992         |
| <i>Halobacterium salinarium</i>   | a-amilaz               | RAJVIT ve DATTA 1997             |
| <i>Streptomyces kanamyceticus</i> | glükoz izomeraz        | MUKHOPADHYAY ve ark. 1995        |
| <i>Aspergillus flavipes</i>       | ksilinaz               | MUKHOPADHYAYA ve CHATTERJEE 1997 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | a-maliiaz              | ARGIRAKOS ve ark. 1992           |
| <i>Aureobasidium pullulans</i>    | amiloglükosidaz        | FEDERICI ve ark. 1990            |
| <i>Humicola lutea</i>             | asit proteaz           | SLOKOSKA ve ark. 1999            |
| <i>Aspergillus niger</i>          | polimetil galakturanaz | ANGELOVA ve ark. 1998            |

yapılmıştır (SCOTT 1987; CHIBATA ve ark. 1986). Caljinatta immobilize edilmiş hücrelerin diğer bir uygulama alanı olan atıkların arıtılmasında ise özellikle fenolik maddelerin ve mineral maddelerin Ca-aljinatta tutuklanmış hücrelerle giderilmesi ile ilgili çalışmalar vardır (AKSU VE BÜLBÜL 1999, NURBAŞ ve ark. 1997).

Sonuç olarak serbest hücrelere göre birçok avantajı, kolay ve hücre aktivitesine en az zarar veren immobilizasyon yöntemlerinden olması nedeni ile Ca-aljinatta immobilizasyon yöntemi ile önümüzdeki yıllarda da birçok araştırma yapılacağı açıktır. Her ne kadar immobilizasyon maliyetinin fazla olması ve difüzyon kısıtlamaları gibi klasik problemler tüm immobilizasyon yöntemlerinde olduğu gibi Ca-aljinatta immobilizasyon yönteminde endüstriyel boyutlarda kullanımını sınırlasa da, özellikle etil alkol üretimi ile başlayan pilot ve endüstriyel çaptaki uygulamaların önümüzdeki yıllarda artacağı öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- ABDEL-NABY, M., MOK, C. AND LEE, C. 1992. Production of organic acids from enzymatic hydrolyzate of starch by immobilized lactic acid bacteria, UNIDO Proceedings, Korea, 227-243.
- AKSU, Z. AND BÜLBÜL, G. 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate immobilized *P.putida* beads, *Enzyme Microb. Technol.*, 25: 344-348.
- ANGELOVA, M., SHEREMETSKA, P. AND LEKOV, M. 1998. Enhanced polymethylgalacturonase production from *Aspergillus niger* 26 by calcium alginate immobilisation. *Process Biochem.*, 33 (3): 299-305.
- ARGIRAKOS, G., THAYANITHY, K AND WASE, D.A.J. 1992. Effect of immobilisation on the production of alpha-amylase by an industrial strain of *Bacillus amyloliquefaciens*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 53(1): 33-38.
- BOYAVAL, P. AND GOULET, J. 1988. Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 10 (12): 725-728.
- BRAVO, P. AND GONZALES, G. 1991. Continuous ethanol fermentation by immobilized yeast cells in a fluidized-bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52: 127-134.
- BÜYÜKGÜNGÖR, H. 1992. Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in  $\kappa$ -carrageenan gels, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 53: 173-175.
- CHAMPAGNE, C.P., GAUDY, C., PONCELET, D. AND NEUFELD, R.J. 1992. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(5): 1429-1434.
- CHEETHAM, P.S.J., BLUNT, K.W. AND BUCKE C. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate Gels, *Biotechnol. Bioeng.*, 21:2155-2168.
- CHIBATA, I., TOSA, T. AND SATO, T. 1986. Methods of cell immobilization. pp. 217-229. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, eds. A.L. Demain, N.A. Solomon, American Society for Microbiology, Washington D.C., 466 p.
- ÇOLAK, T. AND HAMAMCI, H. 1991. The optimum taper angle for ethanol fermentation in a packed-bed column reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 52: 445-455.
- COTTRELL, I.W. AND KOVACS, P. 1977. *Algin.* pp. 438-463. *Food Colloids*, eds. H.D. Graham, The Avi Publishing Company, Westport, Connecticut 588p.
- DEBNATHS, S., BANNERJEE, M. AND MAJUMDARS, S.K. 1990. Production of Alcohol from starch by immobilised cells of *Saccharomyces diastaticus* in batch an continuous process, *Process biochem.*, 25(2): 43-46.
- DOBREVA, E., IVANOVA, V., TONKOVA, A., RADULOVA, E. 1996. Influence of the immobilization conditions on the efficiency of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* *Process Biochem.*, 31(3): 229-234.
- EIKMEIER, H. AND REHM, H.J. 1984. Production of citric acid with immobilized *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 365-370.
- EIKMEIER, H. AND REHM, H.J. 1987. Stability of calcium-alginate during citric acid production of immobilized *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 105-111.
- FEDERICI, R.G., FEDERICI, F. AND PETRUCCIOLI, M. 1990. Continuous production of glucoamylase by immobilized growing cells of *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnol. Lett.*, 12 (9): 661-666.
- GHOSH, M. AND NANDA, G. 1991. Immobilized *Aspergillus sydowii* produces xylanase, *Biotechnol. Lett.*, 13 (11): 807-808.
- GILSON, C.D. AND THOMAS, A. 1995. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 62: 38-45.
- GÖKSUNGUR, Y. AND GÜVENÇ, U. 1999. Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74:131-136.
- GOUGH, S. AND MCHALE, A.P. 1998. Continuous ethanol production from molass at 45°C using alginate immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in a continuous-flow bioreactor, *Bioprocess Eng.*, 19: 33-36.
- GUOQIANG, D., KAUL, R. AND MATTIASSON, B. 1991. Evaluation of alginate-immobilized *Lactobacillus caesi* for lactate production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (3): 309-314.

- HANG, Y.D., HAMAMCI, H. AND WOODAMS, E.E. 1989. Production of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels, *Biotechnol. Lett.*, 11:119-120.
- JAMUNA, R., SAI, P.S.T., VORA, S. AND RAMAKRISHNA, S.V. 1992. Optimization of critical parameters for immobilization of yeast cells to alginate gel matrix, *J. Ferment. Bioeng.*, 73 (4): 319-322.
- KIERSTAN, M.P.J. AND COUGHLAN, M.P. 1985. Immobilisation of cells and enzymes by gel entrapment. pp. 39-48. *Immobilised Cells and Enzymes*, ed. Woodward, J. IRL Press, Oxford, 177 p. KIERSTAN, M.P.J., MCHALE, A. AND COUGHLAN, M.P. 1982. The production of ethanol from cellobiose using immobilised  $\beta$ -glucosidase coentrapped with yeast in alginate gels, *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 1461-1463.
- KIM, C.H. AND RHEE, K. 1993. Process development for simultaneous starch saccharification and ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*, *Process Biochem.*, 28 (5): 331-339.
- KUROSAWA, H., ISHIKAWA, H. AND TANAKA, H. 1988. L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*, *Biotechnol. Bioeng.*, 31: 183-187.
- LI, X. 1996. The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with entrapped yeast cells, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 23(3): 269-272.
- MUKHOPADHYAY, S., MAJUMDAR, S.K. AND SIKHA, M. 1995. Preparation and properties of glucose isomerase of *Streptomyces kanamyceticus* cell entrapped in calcium alginate, *Biotechnol. Lett.*, 17 (8): 867-870
- MUKHOPADHYAYA, S.K. AND CHATTERJEE, S.P. 1997. Production of xylanases by immobilized *Aspergillus flavipes*, *Journal of Mycopathological Research.*, 35(2): 119-123.
- NAGASHIMA, M., AZUMA, M., NAGUCHI, S., INUZUKA, K. AND SAMEJIMA, H. 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 992-997.
- NURBAŞ, M., KILIÇARSLAN, S., İLHAN, S. VE KUTSAL, T. 1997. İmmobilize hücrelerle ağır metal iyonlarının adsorpsiyonu ve desorpsiyonla geri kazanımı, Sayfa 136-140. *Hücre İmmobilizasyon Teknikleri: Tarım Sanayideki Uygulamaları*, British Council, E.Ü. Biyoteknoloji Uyg. Araş. Mrk., E.Ü. Bilim-Tekn. Uyg. Araş. Mrk, 140 s.
- OGBONNA, J.C., AMANO, Y. AND NAKAMURA, K. 1989. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate, *J. Ferment. Bioeng.*, 67:92-96.
- PREVOST, H. AND DIVIES, C. 1987. Fresh fermented cheese production with continuous pre-fermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic Streptococci entrapped in Ca-alginate, *Biotechnol. Lett.*, 9 (11): 789-794.
- PREVOST, H., DIVIES, C. AND ROUSSEAU, E. 1985. Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in Ca-alginate, *Biotechnol. Lett.*, 7(4): 247-252.
- RAJVIT, B. AND DATTA, M. 1997. Continuous production of halophilic alpha-amylase through whole cell immobilization of *Halobacterium salinarum*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 62(2/3): 213-218.
- RAMAKRISHNA, S.V., JAMUNA, R. AND EMERY, A.N. 1992. Continuous production of thermostable  $\alpha$ -amylase by immobilized *propionibacteria*, *Enzyme Microb. Technol.*, 22(5): 409-414.
- ROSEVEAR, A., KENNEDY, J.F. AND CABRAL, J.M.S. 1987. *Immobilised Enzymes and Cells*, Adam Hilger, Bristol and Philadelphia, 247 p.
- ROSEVEAR, A. 1984. Immobilised biocatalysts-a critical review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34B: 127-150.
- ROUKAS, T. AND KOTZEKIDOU, P. 1991. Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus caesi* and *Lactococcus lactis* cells, *Enzyme Microb. Tech.*, 13 (1): 33-38.
- ROUKAS, T. 1991. Production of citric acid from beet molasses by immobilized cells of *Aspergillus niger*, *J. Food Sci.*, 56(3): 878-880.
- RYMOWICZ, W., KAUTOLA, H., WOJTATOWICZ, M., LINKO, Y.Y. ANND LINKO, P. 1993. Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous airlift bioreactors, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 39:1-4.
- SAEKI, A., 1990. Studies on acetic acid fermentation. III. Continuous production of vinegar with immobilized *Saccharomyces ludwigii* cells and immobilized *Saccharomyces ludwigii* cells and immobilized *Acetobacter aceti* cells entrapped in calcium alginate gel beads, *J. Japanese Society of Food Science and Technology*, 37 (9): 722-725.
- SCOOT, C.D. 1987. Immobilized cells: a review of recent literature, *Enzyme Micr. Technol.*, 9: 66-73.
- SHEIH, Y.M. AND TSAY, S.S. 1990. Malolactic fermentation by immobilized *Leuconostoc* sp. M-1, *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 28(3): 246-257.
- SKJAK-BRAEK, G. 1992. Alginates: biosynthesis and some structure-function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications, *Biochemical Society Transactions*, 20(1): 27-33.
- SLOKOSKA, L., ANGELOVA, M., PASHOVA, S., PETRICHEVA, E. AND KONSTANTINOV, C. 1999. Production of acid proteinase by *Humicola lutea* 120-5 immobilized in mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate beads, *Process Biochem.*, 34(1): 73-76.
- TANAKA, H., IRIE, S. AND OCHI, H. 1989. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix, *J. Ferment. Bioeng.*, 68:216-219.
- TANAKA, H., KUROSAWA, H. AND MURAKAMI, H. 1986. Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*, *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 1761-1768.
- VORLOP, K.D., STEINERT, H.J. AND KLEIN, J. 1987. Cell immobilisation within coated alginate beads or hollow fibers formed by ionotropic gelation-preventing cell grow out, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 501:339-342.
- WOODWARD, J. 1988. Methods of immobilization of microbial cells, *J. Microb. Methods*, 8:91-102.