

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BİRA MAYŞE ATIĞININ
LACTOBACILLUS PENTOSUS ile
BİYODÖNÜŞÜMÜNÜN LAKTİK ASİT VE FENOLİK
ASİTLERE ETKİSİ

Sakine AYHAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice KALKAN YILDIRIM

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bölüm Kodu: 614.02.00

Sunuş Tarihi: 13.07.2015

Bornova-İzmir

2015

Sakine AYHAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "Bira Mayşe Atığının *Lactobacillus Pentosus* ile Biyodönüşümünün Laktik Asit Ve Fenolik Asitlere Etkisi " başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.07.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Doç. Dr. Hatice Kalkan YILDIRIM

Raportör Üye

: Doç. Dr. Özgül ÖZDEN ÖCALAK

Üye

: Yrd. Doç. Dr. Samed DÖĞERLİ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bira Mayşe Atığının *Lactobacillus Pentosus* ile Biyodönüşümünün Laktik Asit Ve Fenolik Asitlere Etkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13 / 07 / 2015

İmzası

Adı- Soyadı

Sokhe AYHAN

ÖZET

**BİRA MAYŞE ATIĞININ *LACTOBACİLLUS PENTOSUS* İLE
BİYODÖNÜŞÜMÜNÜN LAKTİK ASİT VE FENOLİK ASİTLERE ETKİSİ**

Ayhan, Sakine

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice KALKAN YILDIRIM

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR

Temmuz, 2015, 123 sayfa

Bu tez kapsamında, *L. pentosus* suşlarının bira mayşe atığını fermentasyon ortamı olarak kullanarak laktik asit ve fenolik asitlere etkileri incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında bira mayşe atığının %1,25'lik seyreltik H₂SO₄ ile 1:8 g/g oranında hidrolizi sonucu hemiselülozidik şekerler içeren ortamına *L. pentosus* suşları (*Lactobacillus pentosus* O157, *Lactobacillus pentosus* O18, *Lactobacillus pentosus* O19) inokule edilerek laktik asit ve fenolik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Üç farklı suştan pH 6.0' da, 96 saat sürede 31 °C ve % 20 ksiloz konsantrasyonunda *Lactobacillus pentosus* O18 ile en yüksek üretimi (% 13.80 verim) gerçekleştiren suş olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise *Lactobacillus pentosus* O18 ile farklı azot kaynakları (maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, üre, tripton) kullanılarak üretim gerçekleştirilmiş ve her 12 saat ara ile örnekler alınıp HPLC' de analiz edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin kompleks organik madde ihtiyaçlarını karşılayabilmek amacıyla değişik azot kaynakları eşit azot bazında 10 g/L maya ekstraktına paralel olacak şekilde kullanılmıştır. Denemelere alınan azot kaynakları arasında en yüksek verim maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Ayrıca aynı koşullarda fenolik asitlere olan etkisinin de araştırıldığı çalışmada, gallik asit, kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, vanilik asit ve sinapik asit miktarlarının fermentasyon sonucunda arttığı belirlenmiştir. Fermentasyon öncesi ve sonrası analiz sonuçlarına bakarak bira atık mayşesinin *Lactobacillus pentosus* ile fermentasyonunda en fazla artış hidroksisinamik asitler grubundan olan ferulik ait (60-175 mg/L) ve p- kumarik asit (100-322,5 mg/L) olarak bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Bira atık mayşesi, biyodönüşüm, *L. pentosus*, laktik asit, fenolik asitler, HPLC

ABSTRACT

BIOCONVERSION EFFECTS OF BREWER'S SPENT GRAIN WITH
L. PENTOSUS ON LACTIC AND PHENOLIC ACIDS

Ayhan, Sakine

Master Thesis , Department of Food Engineering

Thesis Supervisor: Assoc. Dr. Hatice KALKAN YILDIRIM

Co Supervisor:: Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR

July , 2015 , 123 pages

In this thesis we were investigated the effects of brewer's spent grain biotransformation by *L.pentosus* strains on lactic and phenolic acids. At the beginning, brewing spent grain was diluted with 1,25% H₂SO₄ (1:8 g / g) solid/liquid ratio for hydrolysis of complex compounds. The bioconversion was performed by different strains of *L.pentosus* as *Lactobacillus pentosus* O157, *Lactobacillus pentosus* O18, *Lactobacillus pentosus* O19. Fermentation conditions were determined as: pH 6.0; follow up to 96 hours/ 31 ° C and %20 xylose concentrations. The highest amount of lactic acid (22.4 g/L) was determined to be produced by *Lactobacillus pentosus* O18 at the second day of fermentation with highest yield value of % 13.80.

In the second part of the study, during bioconversion of brewer's spent grain by *Lactobacillus pentosus* O18 were used different nitrogen sources (yeast extract, corn steep water, peptone, urea, tryptone). Used nitrogen sources quantities were determined on the basis of equivalent nitrogen 10 g/L of yeast extract. Values obtained at each 12th hour of fermentation were evaluated by HPLC technique. The best results for gallic acid, coumaric acid, ferulic acid, benzoic acid, vanillic acid and sinapic acid were obtained with yeast extract and peptone nitrogen sources. The maximum increases were detected for hydroxycinnamic acids ferulic (60-175 mg / L) and p-coumaric acid (100 to 322.5 mg / L).

Keywords: Brewer's spent grain, bioconversion, *L. pentosus*, lactic acid ,phenolic acids, HPLC

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince yardımını ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Hatice KALKAN YILDIRIM ve Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR'a sabrı ve özverisi için,

Çalışmalarım süresince bana destek olan ve yardımını esirgemeyen Ar. Gör. Dr. Sıma Yeğin'e, Ar. Gör. Selim Şılbır'a, Berna Şengül Erdoğan'a ve diğer Ege üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü teknik elemanlarına,

Gösterdikleri destek ve sabır için sevgili arkadaşlarıma ve yüksek lisans ve doktora öğrencisi çalışma arkadaşlarıma,

Ayrıca hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili ailem; annem Ümmehan AYHAN, babam Hasan Hüseyin AYHAN ve kardeşim Gülşah AYHAN'a çalışmalarım sırasında en sıkıntılı anlarımda sağladıkları motivasyon, gösterdikleri sabır ve anlayış için en içten TEŞEKKÜRLERİMİ SUNUYORUM.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ.....	6
2.1. Gıda sanayinde sıkça kullanılan atık maddeler.....	6
2.1.1. Peynir altı suyu.....	6
2.1.2. Melas.....	7
2.1.3. Lignoselülozik maddeler.....	8
2.2. Bira üretimi.....	9
2.2.1. Bira atık mayşesinin elde edilmesi	13
2.2.2. Atık bira mayşesinin kimyasal kompozisyonu.....	17
2.3. Laktik asit	22
2.3.1. Laktik asit bakterileri.....	24

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.3.2. Laktik asit üretimi.....	27
2.3.3 Laktik asitin kullanım alanları.....	36
2.4.Fenolik bileşikler.....	38
2.4.1. Fenolik asitler.....	39
2.5. Biyodönüşüm yoluyla üretim.....	49
2.6. HPLC yöntemi.....	50
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	54
3.1.Materyal.....	54
3.1.1.Substrat	54
3.1.2. Mikroorganizma	54
3.1.3. Deneylerde kullanılan besiyerleri.....	54
3.1.4. Deneylerde kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	56
3.1.5. Verim Hesapları.....	57
3.2.Yöntem.....	58
3.2.1. Deneyde Kullanılan Mikroorganizmaların Geliştirilmesi	58
3.2.2. Deneyde Kullanılan Mikroorganizmaların Muhafazası	58
3.2.3. Fermantasyon İçin Aşı Kültürü Hazırlanması.....	59

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.4. Substrat olarak kullanılan bira atığı mayşesinin hazırlanması.....	60
3.2.5. Fermantasyon.....	61
3.3. Analiz Yöntemleri.....	63
3.3.1. Bira mayşesindeki şeker içeriğinin HPLC ile tayini.....	63
3.3.2. Fenolik asitlerin HPLC ile tayini	65
3.3.3. Laktik asitin HPLC ile tayini.....	69
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	71
4.1. Laktik asit üretimine ait analiz sonuçları.....	71
4.2. Gallik asit üretimine ait analiz sonuçları	78
4.3. p-Kumarik asit üretimine ait analiz sonuçları.....	80
4.4. Ferulik asit üretimine ait analiz sonuçları	82
4.5. p-OH Benzoik asit üretimine ait analiz sonuçları.....	85
4.6. Siringik asit üretimine ait analiz sonuçları.....	87
4.7. Sinnapik asit üretimine ait analiz sonuçları.....	89
4.8. Vanilik asit üretimine ait analiz sonuçları.....	92

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.SONUÇ.....	96
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	98
ÖZGEÇMİŞ	111
EKLER.....	
EK 1 HPLC Analizleri.....	
EK 2 Fenolik asitler için ANOVA Analizleri.....	
EK 3 Laktik asit için ANOVA Analizleri.....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Bira üretim basamakları.....	13
2.2 Bira atığının değerlendirilmesi	15
2.3 Bira üretim prosesi içerisinde bira atık mayşesinin elde edilmesi.....	16
2.4 Literatürdeki atık bira mayşesinin kimyasal bileşimi	17
2.5 Selülozun yapısı ve formülü	20
2.6 Hemiselülozun yapısı	21
2.7 Lignini oluşturan yapılar	21
2.8 Laktik asitin D(-) ve L(+) şekilleri	23
2.9 Homolaktik laktik asit fermantasyonu yol izi.....	33
2.10 Heterolaktik laktik asit fermantasyonu yol izi.....	34
2.11 Fenolik asitlerin genel yapısı.....	40
2.12 HPLC cihazı akış şeması.....	51
3.1 Fermantasyon için aşı kültürü hazırlanması.....	59
3.2 Atık bira mayşesine uygulanan ön işlemler.....	61
3.3 Laktik asit ve fenolik asitlerin üretiminde kullanılan çalkalamalı inkübatör....	62
3.4 Laktik asit ve fenolik asitlerin analizlerinde kullanılan HPLC.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ(devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5 Glikozun standart eğrisi.....	63
3.6 Arabinozun standart eğrisi.....	64
3.7 Ksilozun standart eğrisi.....	64
3.8 Şirinjik asitin standart eğrisi.....	66
3.9 Sinnapik asitin standart eğrisi.....	66
3.10 Hidroksibenzoik asitin standart eğrisi.....	66
3.11 Gallik asitin standart eğrisi.....	67
3.12 Ferulik asitin standart eğrisi.....	67
3.13 Vanilik asitin standart eğrisi.....	67
3.14 Kumarik asitin standart eğrisi.....	68
3.15 Fenolik asitlerin alıkonma sürelerini gösteren örnek bir kromatogram.....	68
3.16 Laktik asit kalibrasyon doğrusu.....	70
4.1 Farklı suşlarla yapılan denemelerde elde edilen laktik asit miktarı grafiksel gösterimi.....	72
4.2 Maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen farklı suşlardaki laktik asit konsantrasyonları.....	73
4.3 Farklı azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit konsantrasyonları.....	75
4.4 Laktik asit fermentasyonuna ait kinetik profil.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ(devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 Farklı <i>Lactobacillus pentosus</i> suşlarının fenolik asit üretimine etkisi.....	76
4.6 Azot kaynaklarının fenolik asit üretimine etkisi.....	78
4.7 Fenolik asitlerin fermentasyonuna ait grafiksel gösterimi.....	79
4.8 Farklı azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit konsantrasyonları.....	79
4.9 p-Kumarik asit üretimine ait kinetik profil.....	80
4.10 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Gallik Asit Miktarı Grafiksel Gösterimi.....	81
4.11 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen p-Kumarik Asit Konsantrasyonları.....	82
4.12 Ferulik asit asit üretimine ait kinetik profil.....	83
4.13 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Gallik Asit Miktarı Grafiksel Gösterimi.....	83
4.14 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Ferulik Asit Konsantrasyonları.....	84
4.15 p-OH Benzoik asit üretimine ait kinetik profil.....	85
4.16 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen p-OH Benzoik Asit Miktarı Grafiksel Gösterimi.....	86
4.17 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen p-OH Benzoik Asit Konsantrasyonları.....	86

ŞEKİLLER DİZİNİ(devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18 Siringik asit üretimine ait kinetik profil.....	87
4.19 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen p-OH Benzoik Asit Miktarı Grafikselsel Gösterimi.....	88
4.20 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Siringik Asit Konsantrasyonları.....	88
4.21 Sınnapik asit üretimine ait kinetik profil.....	89
4.22 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Sınnapik Asit Miktarı Grafikselsel Gösterimi.....	90
4.23 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Sınnapik Asit Konsantrasyonları.....	91
4.24 Vanilik asit üretimine ait kinetik profil.....	92
4.25 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Vanilik Asit Miktarı Grafikselsel Gösterimi.....	93
4.26 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Vanilik Asit Konsantrasyonları.....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Peynir altı suyu (PAS)içeriği.....	6
2.2 Melasın kompozisyonu ve besin içeriği.....	7
2.3 Bazı lignoselülozik maddeler ve bileşenleri.....	8
2.4 Laktik asit üreten bakteriler	29
2.5 Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması	30
2.6. Fenolik maddelerin elde edilme yöntemleri.....	46
3.1 <i>Lactobacillus pentosus</i> Hücrelerinin Gelişmesinde Kullanılan Üretim Ortamının Kullanılan Azot Kaynakları ve Miktarları.....	55
3.2 <i>Lactobacillus pentosus</i> Hücrelerinin Gelişmesinde Kullanılan Üretim Ortamının Kullanılan Karbon Kaynakları ve Miktarları.....	56
3.3 Şeker Miktarı Analizi için HPLC Koşulları.....	65
3.4 Fenolik Asit Miktarı Analizi için HPLC Koşulları.....	69
3.5 Laktik Asit Miktar Analizi için HPLC Koşulları.....	70
4.1 Farklı <i>Lactobacillus pentosus</i> suşları ile bira mayşe atığından laktik asit üretiminde elde edilen verim değerleri.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
MIS	Mısır Islatma Suyu
ME	Maya Ekstaktı
BAM	Bira Atık Mayşesi
LAB	Laktik asit bakterileri
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
PEP	Fosfofenol Pirüvat
PGA	Fosfogliserik Asite
PES	Polietersülfon
PVP	Polivinilprolidon
DAD	Diyot Serili Dedektör
PLA	Polilaktik Asit

1.GİRİŞ

Biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte fermantasyon ile organik ve biyokimyasal maddelerin üretimi günümüzde en güncel konular arasındadır. Farklı sanayi alanlarında kullanılan organik çözücüler, antibiyotikler, enzimler gibi pek çok kimyasal madde ve besin, ilaç, kimya, tekstil, plastik, kozmetik ve kağıt endüstrilerinde kullanılan organik asitler de fermantasyon yolu ile üretilmektedir.

Endüstride ham maddeler belli bir amaca göre işlenirken bazı maddelerde atık madde olarak ortaya çıkmaktadır. Dünyada hemen her yıl milyonlarca ton atık madde çevreye atılmaktadır. Bu atık maddelerin yok edilmesi çeşitli endüstri kuruluşlarına büyük yükler getirmektedir. Örneğin tahıl ürünlerinin % 60'ı, yağlı tohum ürünlerinin % 85'i, şeker ürünlerinin % 90'nı atık madde olarak ortaya çıkmaktadır (Kahyaoğlu ve Konar, 2006). Endüstriyel üretimde fermantasyon için seçilecek besi yeri üretim maliyetini önemli düzey de etkileyeceği için melas, pirinç kabuğu, buğday kepeği, sebze ve meyve artıkları, bira mayşe atığı gibi ekonomik değeri son derece düşük ve temini kolay olan bu maddelerin mikroorganizmalar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılması avantajlı bir uygulamadır. Atık maddelerin mikroorganizma için gerekli enerji ve besini sağlamalarının yanı sıra, sanayi ve tarımsal üretim sonucunda ortaya çıkan atık maddelerin çevreye salınmayıp değerlendirilmesi ekolojik anlamda da avantajlı bir işlemdir.

Fermantasyon kaynağı olarak ucuz karbonhidratların seçilmesi, fermantasyon proseslerinin kimyasal sentez prosesleriyle rekabetinde bir adım daha öne geçmesini sağlamaktadır (Zhang et al., 2007). Laktik asit üretimi için çok sayıda karbonhidrat ve azotlu maddeler substrat olarak seçilebilir. Araştırmalar, yüksek laktik asit verimi, optimum biyokütle üretimi, ihmal edilebilir yan ürün oluşumu, yüksek fermantasyon hızı, daha az ön muamele, düşük maliyet, kolay elde edilebilirlik gibi özellikler temel alınarak substrat seçiminin yapıldığı bildirmektedir. Buna göre, laktik asit fermantasyonunda substrat seçimi; substratın fiyatına, ön işlem gerektirip gerektirmediğine,

kolay fermente olup olamayacağına, kullanılacak mikroorganizmaya ve istenilen ürüne bağlı olarak yapılmaktadır. Günümüzde ticari laktik asit üretiminde en çok rafine sakkaroz içeren sentetik ortam, hidrolize nişastadan elde edilen maltoz ve dekstroz, laktoz içeren peynir altı suyu, sakkaroz içeren pancar ve kamışı melası kullanılmaktadır. Süt ürünleri ve yağlı tohumlar, alkollü ve alkolsüz içecekler, sebze ve meyveler, et ve balık ürünleri, hububat bazlı ürünler fermantasyon substratları olarak kullanılabilirler (Omay, 2011).

Laktik asit, türevleri ve poli-Laktik asit endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Laktik asit uzun yıllardan beri kimyasal yolla veya fermantasyonla üretilmektedir. Ancak, düşük maliyetli üretim yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Pahalı olmayan karbonhidrat kaynakları kullanmak, yüksek verimlilik elde etmek daha uygun laktik asit üretimi sağlayabilmektedir.

Laktik asit gıda sanayinde:

- ❖ Zeytin işleme ve turşuların paketlenmesinde ;
- ❖ Sığır etlerinin dekontaminasyonunda ;
- ❖ Mayonez gibi gıdalarda raf ömrünü uzatma ;
- ❖ Meşrubatlarda ve limonatada lezzet geliştirici ve asitleştirici ;
- ❖ Peynir, peynir ürünleri, reçellerde ve jölelerde asitleştirici ;
- ❖ Fırın ürünlerinde fermantasyonu hızlandırıcı ;
- ❖ Bira üretiminde kullanılan suyun pH ayarlamasında geniş kullanım alanı bulmaktadır.

Son yıllarda, araştırmacılar ve gıda üreticileri tarafından fenolik bileşiklere olan ilgi giderek artmaktadır. Bu ilginin nedeni, fenolik bileşiklerin antioksidan özellikte olmaları, besinlerin büyük miktarında bulunmaları ve kanser, kardiyovasküler, dejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres ilişkili çeşitli hastalıkların önlenmesinde rollerinin olmasıdır (Manach et al., 2004).

Yenilebilir bitkilerin büyük bir kısmında bulunan fenolik bileşikler, yapısında benzen halkası ve bu yapıya bağlı en az bir hidroksi grubu içeren moleküller olarak tanımlanmıştır. Bu bileşikler içerdikleri fenol halkası sayısı ve bu halkaya bağlı yapısal moleküllere göre farklı gruplar halinde sınıflandırılabilirler. Bu farklılıklar fenolik bileşikler fenolik asitler (benzoik veya hidroksisinamik asit türevleri), flavonoidler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere dört gruba ayırmaktadır (Manach et al., 2004).

Fenolik bileşikler;

- ❖ Tat ve koku oluşumundaki etkileri;
- ❖ Renk oluşumu ve değişimine katılmaları;
- ❖ Antimikrobiyal ve antioksidatif etkileri;
- ❖ Enzim parçalamasına neden olmaları;
- ❖ Değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadır.

Fenolik bileşiklere beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle biyoflavonoid adı da verilmektedir. Kılcal kan dolaşımı sisteminde geçirgenliği düzenleyici ve kan basıncı düşürücü etkisi olduğundan bazı kaynaklarda P Faktörü veya P Vitamini olarak da adlandırılmaktadır.

Fenolik bileşiklerden, gıdaların yapılarında yer alan fenolik asitler ve flavonoidler önem taşımaktadır. Fenolik asitler; hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki grupta incelenirler. Fenolik asitler genel olarak serbest halde bulunmazlar. Karboksil grupları karbohidratlar, glukozidler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterler, amino bileşikler ile de amidleri oluştururlar. Fenolik asitlerin, fenol halkasına bağlı hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glukozitleri oluştururlar (Köksal, 2008).

Bira atığı bileşimi açısından gıda sanayinde değerli bileşenlerin üretimi açısından zengin bir ortamdır. Bira, arpanın çimlendirilip kurutulması ile elde edilen maltın su ile belirli şartlar altında mayşelenmesi ve elde edilen şiranın

şerbetçiotu ile kaynatıldıktan sonra, alkol fermantasyonuna terk edilmesi sonucu meydana gelen, alkol ve CO₂ içeren bir içkidir (Türker ve Canbaş, 1995). Bira üretiminde oluşan atık ve yan ürünlerin % 85'i atık bira mayşesidir. Bunun yanı sıra şerbetçiotu atığı, fazla olan maya atığı da bira üretimindeki atık maddelerdendir (Mussatto, 2006).

Bira atığı genel olarak;

- ❖ Laktik asit üretimi
- ❖ Fenolik asitlerin üretimi
- ❖ Ksilitol üretimi
- ❖ Arabitol üretimi
- ❖ İnsan ve hayvan beslenmesinde
- ❖ Pullulan üretimi
- ❖ Biyoetanol üretimi
- ❖ Enzim üretimi
- ❖ Absorbent
- ❖ Mikroorganizma büyüme ortamı olarak geniş kullanım alanına sahiptir (Mussatto, 2006).

Selüloz 16.8 (% g/g), hemiselüloz 28.4 (% g/g), lignin 27.8 (% g/g), diğerleri 27.0 (% g/g) içeren bira atığı mayşesi fermantasyon ortamı olarak kullanılarak gıda sanayinde geniş kullanım alanı bulan laktik asit ve fenolik asit üretiminde kullanılabilir (Mussatto et al., 2008).

Laktik asit bakterileri gibi bazı mikroorganizmalar bira mayşesi gibi gıda atıklarındaki hemiselülozik şekerleri gıda katkı maddesi olan bazı bileşenlere dönüştürebilmektedir. Bu dönüşümden önce selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi karmaşık polimerik bileşenlerinin hidrolize edilerek yıkılması gerekmektedir (Bustos et al., 2005).

Bira atık mayşesi laktik asit üretimi için önemli bir atık maddedir. *Lactobacillus delbrueckii* kullanılarak 0.73 g/g glukoz kullanılarak 5.4 g/l L-laktik asit üretimi gerçekleştirilmektedir (Mussatto et al., 2007a).

Ferulik asit ve kumarik asit bira atığında en çok bulunan fenolik asitlerdendir. Bu bira atığının kullanımı çeşitlendirmektedir. *Aspergillus niger* kullanarak % 0.3 ferulik asit ekstrakte edilmiştir.Yapılan çalışmalar öncüğünde atık maddelerden elde edilen hidroksisinamik asitlerin değerlendirilmesine ilgi artmaktadır (Bertolome et al.,1997).

Bu çalışmada üretim sonucu ortaya çıkan atık bira mayşesinin kurutulması ve daha sonra ön işlemden geçirilerek yapısındaki hemiselülozik metaryellerin yıkımından sonra fenolik asitler ve laktik asit gibi değerli gıda bileşenlerine dönüştürülmesi amaçlanmıştır.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Gıda Sanayinde Sıkça Kullanılan Atık Maddeler

Tarımsal artıkların ucuzluğu, atmosferdeki karbondioksit gazını kullanarak oluşma nitelikleriyle enerji üretiminde kullanıldığında, atmosferdeki sera gazı artışına katkıda bulunmayışı ve gıda maddesi olarak insanlar tarafından tüketilmeyenler sınıfına girdiği için atık zirai biyokütlenin enerji alanında değerlendirilmesi cazip görünmektedir. Bu nedenle uygun süreçler geliştirilerek peynir üretiminin atık maddesi peynir altı suyu, şeker üretiminin atık maddesi melas ve bira üretiminin atık maddesi mayşe gibi biyokütlenin enerji kaynağı olarak değerlendirilmesi yapılacak olan çalışmaların önemini artırmaktadır.

2.1.1. Peynir Altı Suyu (PAS)

Peynir altı suyu fermentatif laktik asit üretiminde çok kullanılan bir substrattır. Bu hammadde süt ve süt ürünleri endüstrisinin temel yan ürünüdür ve laktoz, protein, yağ ve mineral tuzlar içerir. Peynir altı suyu laktozunun tam kullanımı için onu ek bir azot kaynağı ile tamamlamak gereklidir (Wee ve ark., 2006). Hidroliz edildiğinde glukoz ve galaktoz oluşur. Peynir altsuyundan laktik asit üretiminde en çok kullanılan tür *Lactobacillus delbrueckii* sp *bulgarius*'tur ama birçok çalışmada *Lactobacillus helveticus* veya *Lactobasillus casei* de kullanılmıştır (Hofvendahl and Hagerdal, 2000). Çizelge 2.1' de peynir altı suyunun içeriği verilmiştir.

Çizelge 2.1 Peynir altı suyu (PAS) içeriği (Wee et al., 2006).

İçerik	Değişim (g/L)
Toplam Katı	63-70
Laktoz	44-52
Protein	6-10
Kalsiyum	0.4-1.6
Fosfat	1-4.5
Laktat	2-6.4
Klorür	1.1

2.1.2. Melas

Melas seker üreten proseslerin bir atık ürünüdür ve genellikle fazla miktarda sakkaroz içerir (Wee at al., 2006). Hayvan yemi olarak, etanol ve maya üretiminde kullanılır. Önemli bir karbonhidrat kaynağı olması yanında azot, inorganik bileşikler ve vitaminler açısından da iyi ve ucuz bir besi yeridir (Ertugay ve Certel, 1995). Tüm melas tipleri yüksek oranlarda toplam seker ve ya karbonhidratlar içerirler ve bu bileşikler melasın besleme değerinin önemli bölümünü oluştururlar.

Şeker fabrikaları ekstrakte edilen sakkaroz miktarını kontrol edebilirler ve bu yüzden, farklı ülkelerde üretilen melasların seker içeriği kullanılan teknolojiye bağlı olarak değişmektedir. Şeker pancarı ve şeker kamışından elde edilen melas kompozisyonuna ait bir örnek Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Melasın kompozisyonu ve besin içeriği (Curtin, 1983)

	Şeker kamışı	Şeker pancarı
Kuru ağırlık (Brix)	79.5	79.5
Toplam katı (%)	75.0	77.0
Özgül ağırlığı	1.41	1.41
Toplam şeker (%)	46.0	48.0
Ham proteini (%)	3.0	6.0
Azotsuz ekstrakt(%)	63.0	62.0
Kül (%)	8.1	8.7
Kalsiyum (%)	0.8	0.2
Fosfor (%)	0.08	0.03
Potasyum (%)	2.4	4.7
Sodyum (%)	0.2	1.0
Sülfür (%)	0.5	0.5

2.1.3. Lignoselülozik maddeler

Lignoselülozik doğal kaynakların temel bileşenleri selüloz, hemiselülozlar, ligninler, özütlenebilir maddeler ve inorganiklerdir. Doğada selüloz; çeşitli nişasta, pektin ve hemiselüloz gibi polisakkaritlere bağlı olarak bulunur. Hemiselülozlar ise galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve diğer şekerlerle; üronik asitlerin polimerleri ve heteropolimerlerini içerirler. Bunlara ek olarak, doğadaki hemen hemen her selüloz, selüloz-lignin karışımı halinde bulunur.

Selülozik maddeler de laktik asit üretiminde nişastayla aynı yöntemlerle kullanılabilir. Heksoz, glukoz, galaktoz, mannoz ile pentoz, ksiloz ve arabinoz içerir ve kullanılmadan önce monomerlerine hidroliz edilmelidir. Selülozun hammaddeleri kağıt, bitki materyalleri ve odundur. Ayrıca literatürde kaba yonca lifi, buğday kepeği, mısır sapı ve buğday samanı, bira atık mayşesi gibi tarımsal atıklardan laktik asit üretiminde kullanıldığı görülmüştür (Hofvendahl and Hagerdal, 2000). Çizelge 2.3' de doğadaki bazı lignoselülozik maddeler ile bileşenleri görülmektedir.

Çizelge 2.3. Bazı lignoselülozik maddeler ve bileşenleri (Parisi, 1989)

Biyokütle	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Bira atık mayşesi	16	28	27
Kozalaklı ağaçlar	40-50	20-30	25-35
Şeker kamışı	40	30	20
Yaprakları dökülen ağaçlar	40-50	30-40	15-20
Mısır koçanı	45	35	15
Buğday sapı	30	50	15

2.2. Bira Üretimi

Bira üretimi M.Ö.700 yıllarına kadar uzanmaktadır (Türker ve Canbaş, 1995). İlk olarak Mezopotamya'da yapılmıştır. Günümüzde bazı otoriteler bira gibi içkilerin M.Ö. 6000'lerde Mısır'da üretildiğine inanmaktadır. Ayrıca M.Ö. 3500'lerde Asur ve Mısır'lılara ait belgelerde üzüm ve şaraptan bahsedilmektedir. Bira fermentasyonunu gerçekleştiren maya, insanlık tarihindeki en eski mikroorganizma olarak kabul edilmektedir. Ancak A. Von Leeuwenhoek tarafından iki yüzyıl önce mikroskop keşfedilene kadar fark edilememiştir (Cortaceno-Ramirez at al., 2003).

Bira, malttan yapılan ve içinde alkol bulunan bir içkidir (Angelino, 1991). Şerbetçiotu ile aromatize edilen çimlendirilmiş hububat yani malt sırasının alkol fermentasyonu sonucu elde edilir (Türker ve Canbaş, 1995).

Bira üretiminde kullanılan hammaddeler arpa, su, şerbetçiotu ve mayadır. Arpa, en eski zamanlardan beri bira hammaddesi olarak kullanılmaktadır ve kavuzlu olması, gerekli enzimleri yeterli miktarda içermesi ve ekstraktının daha uygun olması nedeniyle bira üretimi için diğer tahıllardan daha uygundur. Bira üretimi için arpa, α -amilaz, β -amilaz, proteaz ve β -glukanaz gibi enzimleri içerir ve ekstarktı biracılık bakımından diğer tahıllara göre daha uygundur (Türker ve Canbaş, 1995; Linko at al., 1998).

Çimlendirilip kurutulmuş arpaya malt denir. Malt ayrıca diğer tahıllardan da üretilmektedir. Çimlenme ve kurutma sırasında işleme parametreleri değiştirilerek çok farklı niteliklere sahip malt elde edilebilir (Fickert and Schieberle, 1998). Malt üretiminde başlangıçta arpa daneleri temizlenir ve sınıflandırılır, daha sonra üretim tipine göre (açık maltta % 42-44, koyu maltlarda % 44-47 oranlarında) ıslatılır. Daneler, istenilen miktarda su aldıktan sonra mayşelemede gerekli enzimlerin oluşması ve danedeki yedek besin maddelerinin hidrolize uygun hale gelmesi için uygun sıcaklık ve oksijen sağlanarak çimlendirilmeye bırakılır. Çimlendirmede erime istenilen düzeye gelince çimlendirmeyi durdurmak ve yapılacak bira tipine göre malta karakteristik tat ile kokuyu vermek amacıyla yeşil malt, kurutma ve kavurma

işlemlerine tabi tutulur. Elde edilen malt endospermi un haline gelecek ve kavuzları iri parçalar halinde kalacak şekilde öğütülür (Türker ve Canbaş, 1995).

Öğütme işlemi sonrasında maltın bileşimindeki maddelerin enzimlerle parçalanarak suya geçirilmesi işlemi olan mayşeleme gerçekleştirilmektedir (Türker ve Canbaş, 1995). Mayşelemede, enzimlerin cinsi ve miktarı, uygulanan sıcaklık ve mayşeleme süresi şıranın bileşimine etki eder. Mayşelemede nişastanın maltoz ve dekstrinlere parçalanması ile proteinlerin parçalanması büyük önem taşır (Lewis and Young, 1995). Mayşelemede, dekoksasyon ve enfüzyon olmak üzere iki yöntem uygulanır. Genelde ülkemizde ve Orta Avrupa'da alt fermentasyon bira yapımında dekoksasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemin esası; mayşenin 1/3'ünün alınarak kaynatılmasına kadar ısıtılması ve esas mayşe üzerine geri verilmesidir. Elde edilmek istenen şıra tipine göre bu işlem tekli ya da daha fazla uygulanabilir. Kaynatma sayısı arttıkça biranın rengi koyu, tadı keskin ve sert olur. İngiliz üst fermentasyon biralarının üretiminde ise enfüzyon yöntemi uygulanır. Bu yöntemde şıra kaynatılmaksızın yavaş yavaş ısıtılır ve istenilen sıcaklıkta tutulur (Türker ve Canbaş, 1995). Maliyeti düşürmek amacıyla bu evrede mısır, pirinç, buğday, darı ve şekerli maddeler gibi katkı maddeleri kullanılabilir. Mayşeleme ile elde edilen ekstrakt kısa sürede süzme kazanlarında ya da mayşe filtrelerinde süzülür. Süzülen şıra Cannabinaceae familyasından olan şerbetçiotuyla (*Humulus lupulus*) kaynatma kazanına alınarak kaynatılır (Türker ve Canbaş, 1995).

Kaynatma işleminde hem biraya kendine özgü tat ve aromayı veren maddelerin şıraya geçmesi, hem de şıranın sterilizasyonu sağlanır. Kaynatma buharlaşma yoluyla suyu uçurularak şıra ekstraktını istenilen konsantrasyonlara getirmek, enzimleri parçalamak, şırayı strelize etmek, proteinleri çöktürmek ve biraya kendine özgü tat ve aroma veren maddeleri şıraya geçirmek amacıyla gerçekleştirilir. Kaynatma bitince şıranın şerbetçiotundan en kısa sürede ayrılması ve fermentasyon sıcaklığına getirilmesi gerekir. Aksi takdirde şerbetçiotu biraya hoş olmayan tat verir (Türker ve Canbaş, 1995).

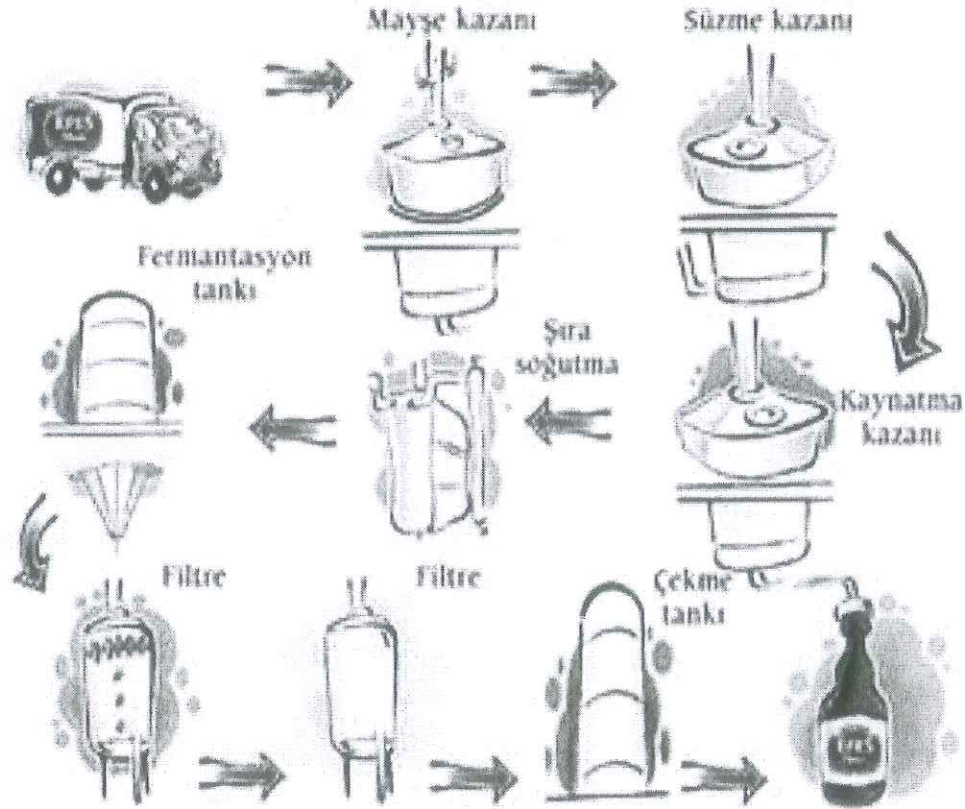
Bira kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri kullanılan mayadır. Bira endüstrisinde kullanılan iki maya türü vardır. Bunlar *Saccharomyces carlsbergensis* ve *Saccharomyces cerevisiae*’dır. Bu iki maya türü mikroskop altında ayırt edilemez. *S. carlsbergensis* bir alt fermantasyon mayasıdır, fermantasyon sonunda kümeleşerek dibe çöker ve fermantörün alt kısmında toplanır. *S. cerevisiae* ise bir üst fermantasyon mayasıdır ve fermantasyon sırasında oluşan CO² kabarcıkları ile yükselerek kahverengi bir tabaka şeklinde fermente olan şıranın üzerinde toplanır. Her iki tür de yeni sınıflandırmada *S. cerevisiae* olarak adlandırılmıştır (Tangüler ve ark., 2007).

Bira üretiminde alt ve üst fermantasyon olmak üzere, iki ayrı fermantasyon şekli vardır. Alt fermantasyon 8-15 °C’de 8-12 gün, üst fermantasyon ise 15-22°C’de 3-5 günde gerçekleşir. Fermantasyon süresi ve sıcaklık alt fermantasyon bira üretiminde oldukça farklıdır. Geleneksel alt fermantasyon bira üretiminde maya ilavesi 5-6 °C ‘de yapılır. Sıcaklık 8-9 °C’ye çıkarılabilir. Bu genellikle daha kaliteli bira üretimini sağlamaktadır (Kunze, 1996). Genel olarak maya 7-8 °C arasında aşılır ve sonraki iki günde bu sıcaklık 10-11 °C’ye yükseltilir. Bazı bira üreticileri bu sıcaklıkları başlangıç sıcaklığı olarak kullanmakta ve sonra 14-15 °C’ye yükseltmektedirler. Bazı üreticiler ise aşılama sıcaklığı olarak 12-14 °C arasında sıcaklıklar kullanmakta ve daha sonra sıcaklığı 18 °C’ye yükseltmektedirler (Knudsen, 1999). Alt fermantasyon mayaları iki tiptedir. Fermantasyon sırasında sıvı içinde ince zerrecikler halinde bulunan ve çok yavaş dibe çöken alt fermantasyon mayalarına “Toz maya”, buna karşılık fermantasyon sırasında bir araya gelerek topak oluşturan ve hızla dibe çöken mayalara da “Topak mayalar” denilmektedir (Anonim, 1997; Türker ve Canbaş, 1995).

Bira üretiminde fermantasyon, mayaların şekerleri esas ürün olarak alkol ve karbondioksit ve ikincil ürünler olarak esterler, yüksek alkoller, karbonilli bileşikler gibi ürünlere dönüştürdüğü bir işlemdir. Bu ürünler, biranın karakteristik özellikleri, koku ve tadı üzerinde önemli etkiye sahiptirler.

Dinlendirme, alt ve üst fermantasyon biralarında farklıdır. Üst fermantasyon biralarında genelde dinlendirme yapılmaz. Fermantasyon sonunda balık tutkalı kullanılarak durultma yapılır, genç bira CO₂ ile doyurulur ve tüketime sunulur. Alt fermantasyon biralarında ise dinlendirme süresi bira çeşidine göre değişir. 10-12 ballingli şıralardan yapılan biralar 1-3 ay dinlendirilirken, 16 ballingli şıradan yapılanlar 5-7 ay dinlendirilmektedir. Dinlendirmede, genç birada kalan % 1.0-1.2 indirgen şeker fermente olmaktadır ve % 0.3-0.4 atm basınç yapacak miktarda oluşan CO₂'in kalması sağlanmaktadır. Sonuç olarak biranın tadı olgunlaşmakta ve iyileşmektedir. Dinlendirmedeki ana bileşik fermantasyonda yan ürün olarak oluşan diasetildir. Oluşum mekanizması amino asit metabolizmasıyla doğrudan ilgilidir. Diasetil, tereyağımsı bir aroma verir ve algılanma eşiği oldukça düşüktür ve yaklaşık 0.15 mg/L'dir. Fermantasyon sonunda algılanma eşiğinin üstündeki değerlerde bulunmaktadır. Dinlendirme sırasında düşük sıcaklıklarda yavaş yavaş azalmakta ve algılanma eşiğinin altına düşmektedir (Türker ve Canbaş, 1995).

İkinci fermantasyon da denilen dinlendirme işleminden sonra biralar süzülür, dolum ve pastörizasyon işlemlerinden sonra tüketime sunulur. Dolum işlemi izobarometrik basınç altında gerçekleştirilmektedir. Pastörizasyon işlemi ise şişelerin 60-70°C'de 30 dk. tutulmasıyla yapılır (Türker ve Canbaş, 1995).Şekil 2.1'de bira üretiminin basamakları gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Bira üretim basamakları (Anonim,2013)

2.2.1 Bira Atık Mayşesinin Elde Edilmesi

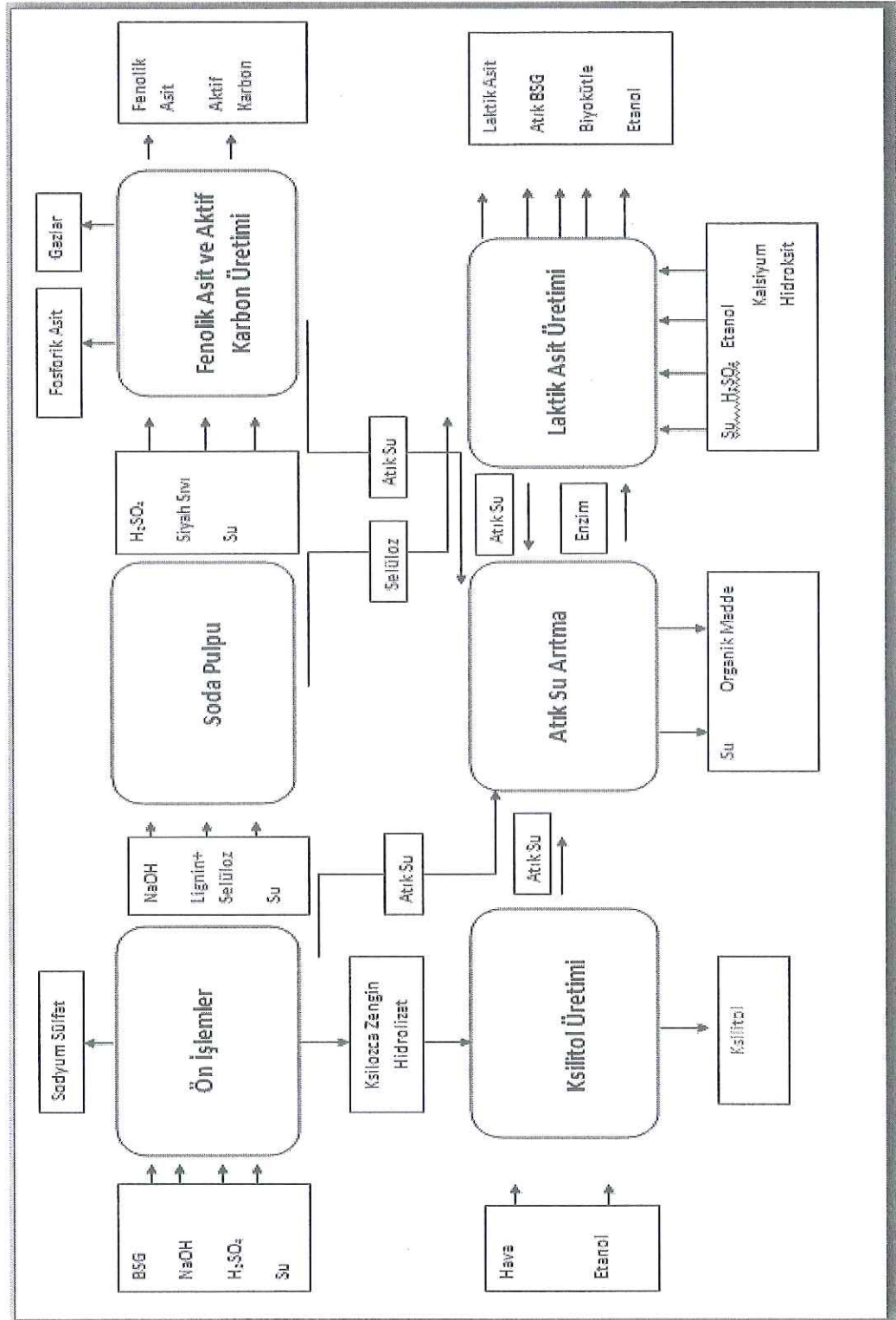
Bira üretiminde oluşan atık ve yan ürünlerin % 85'i atık bira mayşesidir (Reinold, 1997). Bunun yanı sıra şerbetçi otu atığı, fazla olan maya atığı da bira üretimindeki atık maddelerdendir (Mussatto, 2009).

Bira atığı bileşimi açısından gıda sanayinde değerli bileşenlerin üretimi açısından zengin bir ortamdır. Gıda sanayinde atık bira mayşesi ;

- ❖ Laktik asit üretimi
- ❖ Fenolik asitlerin üretimi
- ❖ Ksilitol üretimi
- ❖ Arabitol üretimi
- ❖ İnsan ve hayvan beslenmesinde
- ❖ Pullulan üretimi
- ❖ Biyoetanol üretimi
- ❖ Enzim üretimi
- ❖ Absorbent
- ❖ Mikroorganizma büyüme ortamı olarak kullanılmaktadır

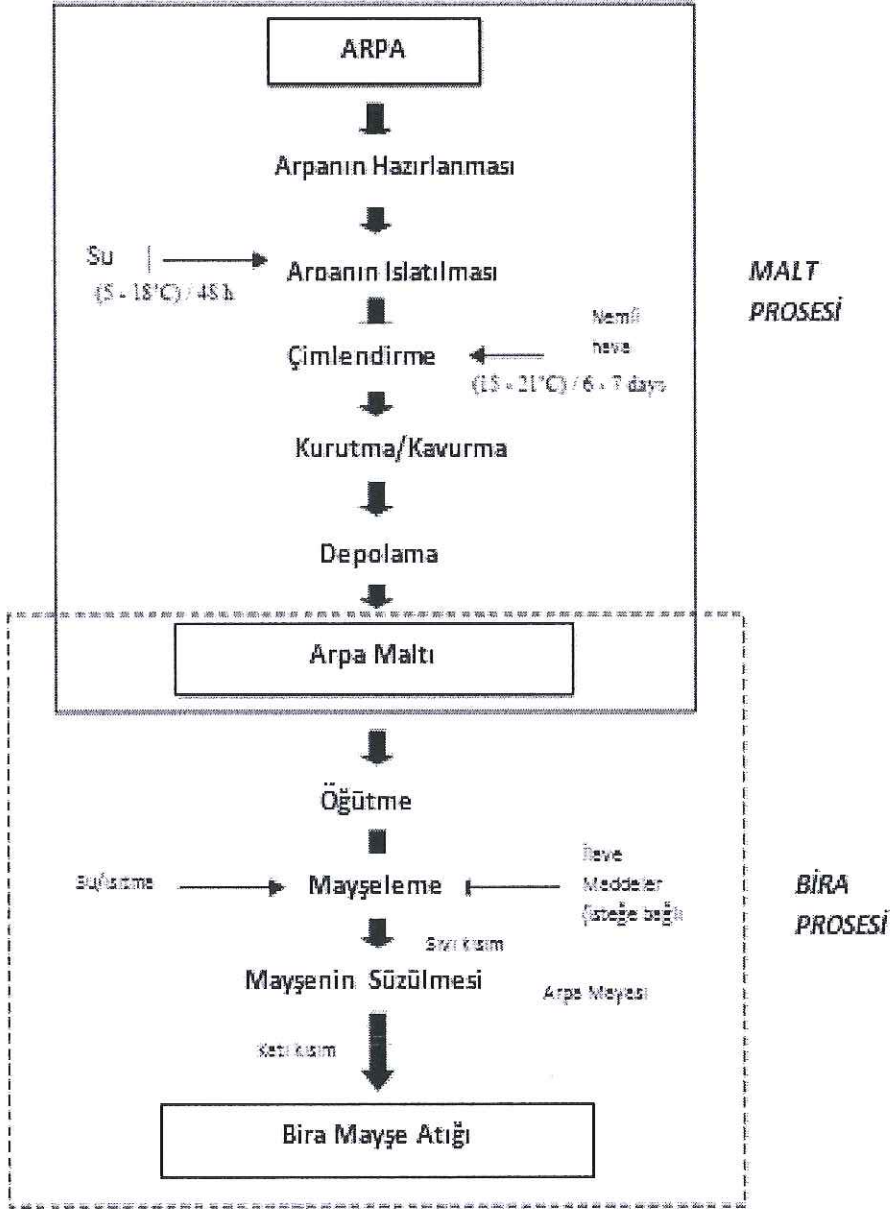
(Mussatto, 2006).

Bira atığının değerlendirilmesi Şekil 2.2' de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Bira atığının değerlendirilmesi (Mussatto, 2006)

Şekil 2.3' de arpadan bira üretim süreci içerisinde bira atık mayşesinin elde edilmesi gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Arpadan bira üretim süreci içerisinde bira atık mayşesinin elde edilmesi (Mussatto, 2006)

2.2.2. Bira Atık Mayşesinin Kimyasal Kompozisyonu

Bira üretiminden yaklaşık olarak yıllık 0.5 milyondan fazla atık bira mayşesi oluşmaktadır (Mussatto et al., 2009). Bu da bira üretiminden arda kalan atık maddelerin yaklaşık % 85 civarına tekabül etmektedir. Biyokimyasal oksijen isteği oldukça yüksek olan bu atık maddenin çevreye atılamayacak düzeyde oluşundan değerlendirme yönünde çalışmalar araştırılmış ve bu çalışmalar atık madde içerisindeki maddelerin çeşit ve miktarları açısından bizlere veri sağlamaktadır. Şekil 2.4' de literatürdeki atık bira mayşesinin kimyasal bileşimi gösterilmektedir.

Bileşenler (% kuru ağırlık)	Kanauchi et al. (2001)	Russ et al. (2005)	Mussatto and Roberto (2006)	Mussatto et al. (2008a)	Adeniran et al. (2008)	Khidzir et al. (2010)
Selüloz	25.4	23-25	16.8	16.8±0.8	-	-
Hemiselüloz	-	30-35	28.4	28.4±2.0	-	-
Lignin	11.9	7.0-8	27.8	27.8±0.3	-	-
Protein	24	19-23	15.3	-	2.4±0.2	6.4±0.3
Kül	2.4	4-4.5	4.6	4.6±0.2	7.9±0.1	2.3±0.8
Eksraktifler	-	-	5.8	-	-	-
Diğer	21.8	-	-	22.4±1.2	-	-
Karbonhidratlar	-	-	-	-	79.9±0.6	-
Ham lif	-	-	-	-	3.3±0.1	-
Nem bileşenleri	-	-	-	-	6.4±0.2	-
Yağ	10.6	-	-	-	-	2.5±0.1
Toplam	-	-	-	-	-	35.6±0.3
karbon(%)	-	-	-	-	-	1.025±0.05
Toplam nitrojen(%)	-	-	-	-	-	-

Şekil 2.4 Literatürdeki atık bira mayşesinin kimyasal bileşimi

(Aliyu and Bala,2011)

Bira atık mayşesi selüloz, hemiselüloz, lignin ve yüksek protein içeriğinden dolayı besinsel değeri yüksek bir maddedir. Bira atık mayşesi en fazla bulunan monosakkaritler ise ksiloz, arabinoz ve glukozdur (Mussatto, 2009).

Ayrıca vitamin ve mineraller de bulunmaktadır. Bunlar biyotin, kolin, folik asit, niyasin, riboflavin, magnezyum, kalsiyum gibi vitaminler ve kobalt, potasyum, manganez, sodyum, sülfür gibi minerallerdir (Khidzir at al., 2010).

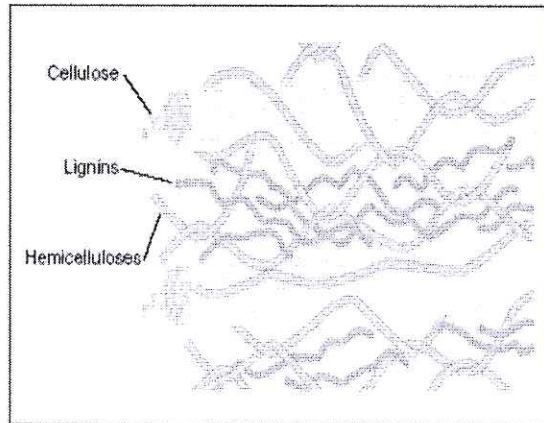
Bira atık mayşesinin bileşimindeki bileşiklerin kompozisyonları arpanın çeşidine, hasat zamanına, maltlama ve mayşeleme proseslerinin şartlarına göre değişmektedir (Robertson at al., 2010).

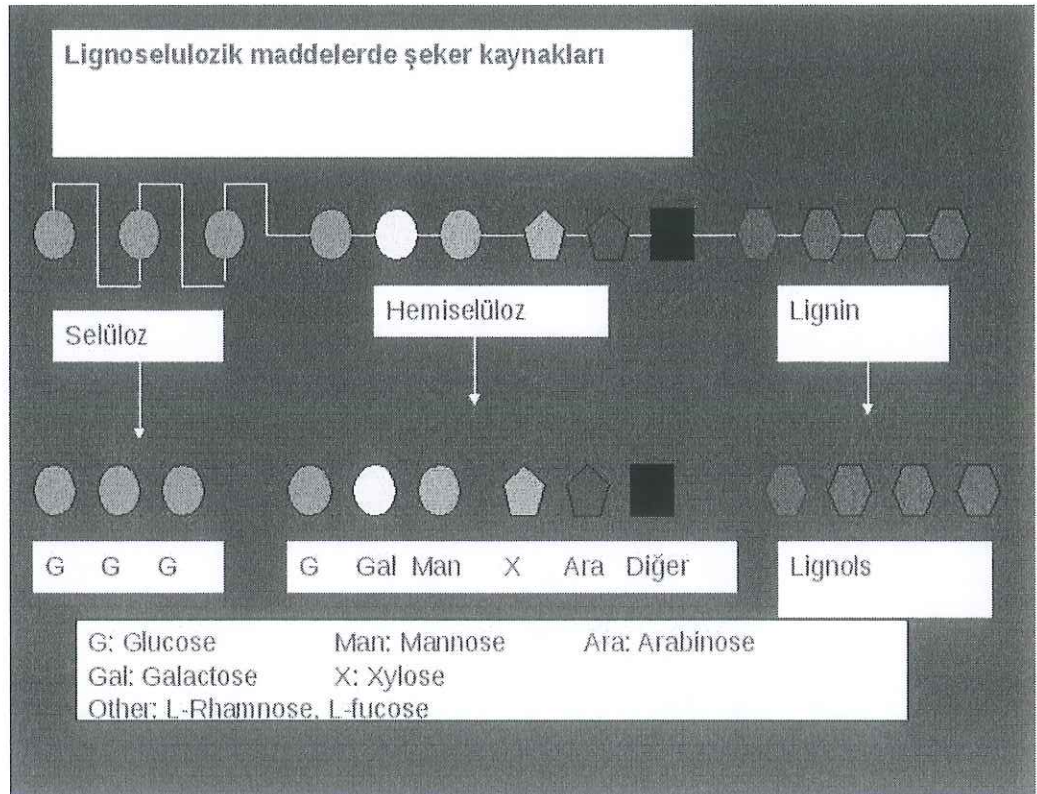
Bira atık mayşesinin oransal olarak büyük çoğunluğu oluşturan maddeleri aşağıda verilmiştir (Mussatto at al., 2008a)

Selüloz	16.8	(% g/g)	}	Lignoselülozik maddeler
Hemiselüloz	28.4	(% g/g)		
Lignin	27.8	(% g/g)		
Diğerleri	27.0	(% g/g)		

Yapılan çalışmalar sonucunda da görüldüğü gibi bira atığı mayşesinde hemiselüloz miktarı bileşimin en büyük parçasını oluşturmaktadır. Aşağıda açıklanacak olan yapıların şekilsel görünümü şekildeki gibidir.

Lignoselülozik
Maddelerin
Genel Yapısı





Lignoselülozik doğal kaynakların temel bileşenleri selüloz, hemiselülozlar, ligninler, özütlenebilir maddeler ve inorganiklerdir. Doğada selüloz; çeşitli nişasta, pektin ve hemiselüloz gibi polisakkaritlere bağlı olarak bulunur. Hemiselülozlar ise galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve diğer şekerlerle; üronik asitlerin polimerleri ve heteropolimerlerini içerirler. Yukarıdaki şekilde lignoselülozik maddelerin şeker kaynakları gösterilmiştir.

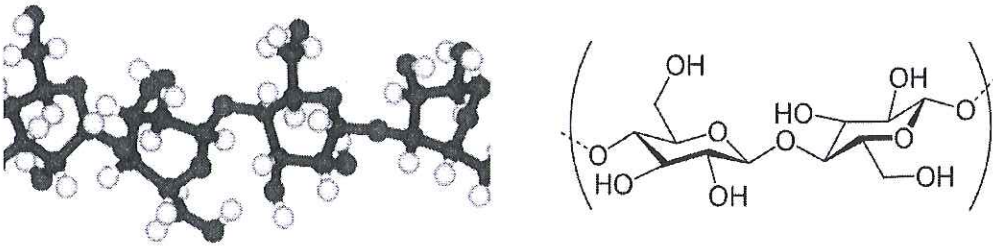
2.2.3.1. Selüloz

Selüloz glukoz moleküllerinin β -(1-4) bağlarıyla bağlanmasından oluşmuş bir homopolimerdir. Bir selüloz molekülündeki glukoz ünitelerinin sayısı 10.000'e kadar çıkabilmektedir. β bağları çok uzun düz zincir oluşması için uygundur.

Selüloz dünyada en bol bulunan organik bileşiktir. Bitkilerdeki karbonun tümünün % 50'si veya daha fazlası selüloz şeklinde bulunur.

Selüloz tam hidrolize edildiğinde glukozu parçalanır, kısmen hidrolize edildiğinde ise bir disakkarit olan sellobioz'a dönüşmektedir.

Selüloz suda çözünmez ve insan sindirim enzimleri tarafından sindirilemez. Birçok bitkide hücre duvarının başlıca bileşenidir. Selüloz yüksek su absorblama kapasitesi ve suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle gıdalarda hacim sağlamak için kullanılmaktadır. Şekil 2.5'de selülozun yapısı gösterilmektedir.

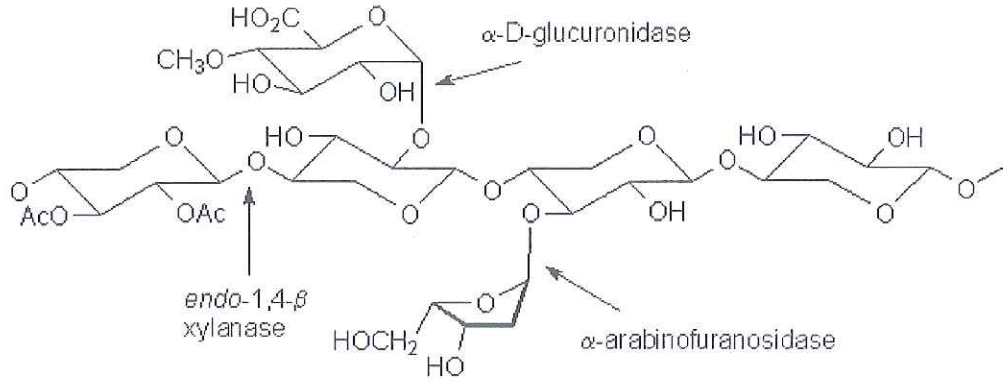


Şekil 2.5 Selülozun yapısı ve formülü (Valenzuela, 2006)

2.2.3.2. Hemiselüloz

Yapısında farklı çözünürlüklere sahip diğer şekerler de bulunan bir glukoz polimeridir. Hemiselülozlar kendilerini oluşturan şeker birimlerine göre; ksilanlar, mannanlar, arabinoksanlar, glikomannanlar ve glikoksilanlar şeklinde isimlendirilirler (Mutlu, 1990).

Hemiselüloz suda çözünen ve çözünmeyen formlara sahip bir moleküldür. Yapısında çok sayıda dallanmış ve düz zincir yapıda pentoz ve heksozlar yer almaktadır. Tahıllarda suda çözünen hemiselüloz pentozanlar olarak isimlendirilmektedir. Şekil 2.6'da hemiselülozun yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.6 Hemiselülozun yapısı (Kurtuluş, 2010)

2.2.3.3. Lignin

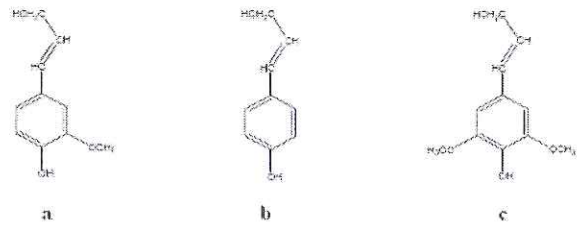
Lignin bitkilerde kök ve gövdenin odunsu yapısını oluşturan madde olarak bilinir. “Odunun özü” de denen su geçirmez bir yapıya sahiptir. Lignin bir glukozit olup kolayca glukoz ve aromatik bir alkole ayrıştırılabilmektedir. Bu glukozit “koniferin” olarak adlandırılır.

Lignin bir karbonhidrat olmamakla beraber fonksiyonları bakımından karbonhidratlara yakın bir maddedir. Hücre çeperini oluşturan selüloz misellerin arasını amorf lignin doldurur ve böylece dokuda odunlaşma meydana gelir. Lignin kimyasal olarak polisakkaritlere bağlı olarak bulunur. Şekil 2.7 ‘de lignini oluşturan yapılar gösterilmektedir.

a) koniferil alkol;

b) p-kumaril alkol;

c) şiringil alkol



Şekil 2.7 Lignini oluşturan yapılar (Valanzuela, 2006)

2.3. Laktik Asit

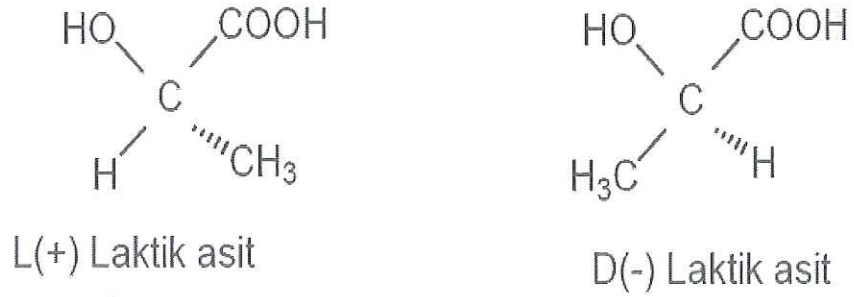
Laktik asit adı ekşi sütün gelmektedir. Bunun nedeni de 1790 yılında Scheele tarafından ilk kez ekşi sütte bulunmuş olmasıdır. Scheele sütü üç hafta boyunca fermentasyona tabi tutmuş, ardından protein kısmını ayırmış ve kalsiyum hidroksit ilave ederek fosfatı çöktürmüştür. Kalsiyum laktat çözünmüş olarak kalmış ve oksalik asitle bozundurulmuştur. Filtre edilen kısmın konsantrasyonu artırılarak alkol içine alınmıştır. Alkol deriştirildikten sonra, laktik asit ne distilasyona ne de kristalizasyona tabi tutulamayan koyu bir şurup halinde elde edilmiştir. Bu ve bundan sonraki çalışmalarında, Scheele, asidin asetat içermediğini ve yeni bir asit elde edildiğini kanıtlamıştır. Bu olaydan 77 yıl sonra Pasteur, 1867 yılında, sütün ekşimesine bir mayanın neden olduğunu bulmuş ve sterilize edilmiş sütün ekşimesine neden olan mikroorganizmayı tanımlamıştır. 1878 yılında Lister, laktik asit fermentasyonunun alkol fermentasyonuna benzer olduğunu ve laktik asidin ekşi sütün seyrelterek izole ettiği mikroorganizmalar tarafından üretildiğini göstermiştir (Oban, 2008).

Laktik asit, Amerika Birleşik Devletleri'nde uzun yıllar ticari amaçlarla üretilmiştir. İlk olarak Charles E. Avery, Littleton ve Massachussetts'te 1881 yılında kabartma tozundaki krem tartarın yerine kalsiyum laktat kullanılabilmesi için kalsiyum laktat elde edebilmek amacıyla üretilmiştir. Ancak bu ilk deneme başarısızlıkla sonuçlanmış ve deri, tekstil, gıda ve çözücü maddelerin üretimi gibi endüstriyel uygulamaların başlaması oldukça sonralara kalmıştır. Laktik asit üretimi Avrupa'da gelişmiş ve ABD laktik asidi uzun süre Almanya'dan ithal etmiştir. Ancak ham asidin saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar II.Dünya Savası'ndan önce bu ithalatı durdurmuştur. Laktik asit veya α -hidroksi propiyonik asit, doğada sıklıkla rastlanan zayıf bir asittir ve suda çözüldüğünde laktat ve H^+ iyonları verir. Bu bir tersinir reaksiyondur ve bu denge aşağıda gösterilmiştir.



Laktik asit renksiz, çok az sarıya çalan şurupsu bir sıvıdır. Özgül ağırlığı 25 °C'de 1,294'tür. Su, alkol ve eterde tamamen çözünürken, kloroformda çözünmez. Yüksek konsantrasyona sahip çözeltilerde higroskopiktir. demirklorürle ∞ -hidroksi asite özgü karakteristik yeşil-sarı rengi verir.

Laktik asit asimetrik bir karbon atomu içerir ve iki formda bulunur (Şekil 2.8). Bunlar: D(-) ve L(+) formlarıdır.



Şekil 2.8 Laktik asitin D(-) ve L(+) şekilleri (Oban, 2008)

L(+) laktik asit insan vücudunda sentezlenen izomerdir. Güçlü aktivitelerin ardından kandaki ve kaslardaki laktik asit konsantrasyonu yükselir.

İki optik izomeri, karıştırılmış etil eter ve izopropil eter çözeltilerinden saf laktik asitin fraksiyonlu kristalizasyonu sonucu elde edilir. Optik izomerlerden sağa doğru dönüş gösteren L-(+) laktik asit olarak adlandırılır. Saf haldeyken, 52,8 °C de erir. Laktik asidin bu formu tamamıyla insan vücudu tarafından metabolize edilir. Dekstrorotari (sağa dönüşlü) asidin tuzları levorotaridir. Levorotari laktik asit D(-) laktik asit olarak belirtilir ve kaynama noktası 52,8 °C dir. Hayvan vücudu tarafından metabolizlenemez, tuzları dekstrorotaridir. Optik olarak aktif laktik asitlerin, kuvvetli ısıtılması sonucu optik olarak inaktif resamik forma dönüşürler. Bu formlar eşit oranlarda dekstro ve levo modifikasyonları içerirler.

Su çözeltilerindeki laktik asit deriştirildiğinde dehidrasyona uğrayarak anhidrit oluşturur. $\text{CH}_3\text{-CHOH-CO-O-CO-CHOH-CH}_3$ anhidriti viskoz, şurupsu bir sıvıdır ve seyreltik çözeltisi asit veya alkali ile kaynatıldığında yavaş yavaş hidrolize uğrayarak serbest asit oluşturur. Daha ileri konsantrasyonu 130-140 °C'lerde L-laktik asit üretimiyle sonuçlanır. L-laktik asit amorf, viskoz bir kütledir. Suda hiç çözünmezken, alkol ve eterde çözünür. Laktik asitin 140 °C' de ve 10 mm basınçta uzun süre ısıtılması laktide dönüşmesine neden olur. Laktid distilasyonla elde edilebilir. Bunların erime noktası 128 °C ve kaynama noktası 255 °C'dir, su ve alkolde çözünmesi oldukça zor olmasına rağmen, asetonda kolaylıkla çözünürler. Laktid suyla uzun süre kaynatıldığında veya bir alkaliyle hızlı bir şekilde kaynatıldığında laktik aside hidrolizlenir (Oban, 2008).

2.3.1. Laktik asit bakterileri

İnsanlar gıdaların saklanması gerektiğini fark ettikleri zamandan beri fermentasyon işleminden yararlanmışlardır. Geleneksel olarak fermente ürünlerin üretiminde doğal olarak hammaddeden gelen *Lactobacillus* cinsi bakteriler laktik asit fermentasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu nedenle hammadde üzerindeki mikroorganizmaların tipi ve sayısı, başarılı bir fermentasyon ve son ürün kalitesi için çok önemlidir (Canbaş ve Fenercioğlu, 1984; Seven ve Ayhan, 1999; Cosansu ve Ayhan, 2002; Curiel ve ark., 2010).

Laktik asit bakterileri morfolojik, metabolik ve fizyolojik karakteristiklerine göre Gram pozitif bakterilerinin bir grubunu oluşturmaktadır. Bu grupta yer alan bakterilerin genel tanımı; Gram pozitif, *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmayan, katalaz negatif, sitokroma sahip olmayan, aerobik olmayan ama aerotolerant, *Pediococcus* cinsi hariç yalnız tek düzlemde bölünen, asidi tolere edebilen, kuvvetli fermentatif olup şeker fermentasyonu sırasında başlıca son ürün olarak laktik asit üreten, bazı istisnalar hariç hareketsiz, kok veya çubuk şeklinde bakterilerdir. Laktik asit bakterileri genellikle besin içeriği bakımından zengin

olan ortamlarda, örneğin süt, et ve sebzelerde bulunmaktadır (Tunail ve Köşker, 1989; Çon ve Gökalp, 2000).

Daha önceleri laktik asit bakterileri olarak *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri incelenmekte iken son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucu *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Vagococcus* cinsleri de bu grupta incelenmeye başlanmıştır. Yine son yıllara ait Literatürde bu grupta *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranum*, *Tetragenococcus*, *Alloiococcus* ve *Gemella* gibi yeni cins isimlerine rastlanmakta ise de bu cinslerle ilgili taksonomik çalışmaların henüz tamamlanmadığı bildirilmektedir (Temiz ve Yılmaz, 2003).

Gıdalarda sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek ve/veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın duyuşal özelliklerinde değişime sebep olmayan antogonistik kültürler koruyucu kültürler denir. Laktik asit bakterilerin uzun yıllardır gıda üretimlerinde starter ya da koruyucu kültür olarak kullanılan güvenilir bakteriler olup bakteriyosinleri de içeren çeşitli antimikrobiyel bileşikler üretirler (Kuleaşan, 2002; Tunail, 2009; Altuntaş ve ark., 2010a). Laktik asit bakterilerinin antagonizması diğer mikroorganizmalarla besin öğeleri için yarışarak ya da organik asitler (asetik, propiyonik ve laktik asit gibi), hidrojen peroksit, antimikrobiyel enzimler, diasetil ve bakteriyosinler gibi bir veya daha fazla antimikrobiyel aktiviteye sahip bileşikler üretmelerinden kaynaklanmaktadır (Klaenhammer, 1988; İşleroğlu ve ark., 2008).

Laktik asit bakterilerinin insan sağlığı üzerine pek çok yararları olduğu uzun zamandır bilinmekte olup, son 20 yıldır laktik asit bakterilerinin ve fermente süt ürünlerinin antikanserojen etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Akçelik ve Ayhan, 1992; Altuntaş ve ark., 2010b). Bunlara ek olarak laktik asit bakterileri, fermente et, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar. Çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski

gıda muhafaza metotlarından biri olarak kabul edilmektedir. Günümüzde modern işleme ve koruma yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen, özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talep nedeniyle, laktik asit bakterileri potansiyel gıda koruyucusu olarak önemini halen sürdürmektedir (Çon ve Gökalp, 2000; Tunail, 2009; Coşansu ve ark., 2010; Sofos ve Geornaras, 2010).

Son yıllarda laktik asit bakterilerinin bu önemli özelliklerinin dışında fenolik bileşikler ile ilişkisi üzerinde durulmaktadır. Laktik asit bakterileri ile fenolik bileşikler arasındaki ilişki; laktik asit bakterilerinin fenolik bileşikleri sentezlemesi ya da metabolize etmesi ile fenolik bileşiklerin bulunduğu ortamlarda inhibe/aktive olması şekillerinde olabilmektedir. Örneğin *L. plantarum*, anaerobik koşullarda kinat ve şikimatı indirgeyebildiği (Whiting ve Coggins, 1969), buna karşın hidrokisinamik asit bulunan ortamlarda *L. plantarum* ile diğer laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus collinoides* ve *Lactobacillus brevis*'in gelişiminin olumsuz etkilendiği (Stead, 1993) bilinmektedir. Yine yeşil zeytin ekstraktı olan oleuropeinin de *L. plantarum* üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Ruiz-Barba ve ark., 1991). Bu inhibisyon mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, oleuropeinin hücrelerin ATP içeriğini azaltarak etki ettiği düşünülmektedir (Juven ve ark., 1972).

Bunların yanı sıra laktik asit bakterilerinin meyvelerin muhafazasında kullanılan kükürt dioksit gibi kimyasal maddelerin kullanımını azaltma/ortadan kaldırma potansiyeli de sözkonusudur. Laktik asit bakterilerinin bu amaçlı kullanımı ile meyvelerin fenolik bileşik ve antioksidan düzeyleri de korunabilmektedir (Martinez-Castellanos ve ark., 2011).

2.3.2. Laktik Asit Üretimi

Laktik asit kimyasal olarak üretilebildiği gibi hem L(+) hem de D(-) formu *Lactobacilli* geninin farklı tür ve modifikasyonlarını içeren homolaktik organizmalar ile karbonhidratlardan fermantasyon ile üretilebilir. Üretimin yaklaşık % 90'ı mikrobiyal yolla yapılmaktadır. Kimyasal olarak sadece rasemik laktik asit üretilebilirken mikrobiyal olarak istenen optik formda laktik asit üretimi yapılabilmektedir.

2.3.2.1. Kimyasal yolla laktik asit üretimi

Laktik asitin kimyasal sentezi laktonitrilin güçlü asitlerle hidrolizi temeline dayanır. Laktonitril, hidrojeniyanidin baz varlığında asetaldehite katılmasıyla üretilir. Bu reaksiyon sıvı fazda yüksek atmosfer basıncında gerçekleşir. Ham laktonitril distilasyonla geri kazanılır ve saflaştırılır. Daha sonra ise derişik HCl ya da H_2SO_4 ile hidroliz edilerek laktik asit ve amonyum tuzu üretilir. Oluşan laktik asit metanol ile esterleştirilerek metil laktat oluşturulur. Oluşan metil laktat distilasyonla uzaklaştırılarak saflaştırılır ardında asit katalizliğinde su ile hidroliz edilir ve laktik asit ile metanol elde edilir. Metanol sisteme geri döner. Bu proseste aşağıdaki reaksiyonlar gerçekleşir.

(a) Laktonitril oluşumu



(b) H_2SO_4 ile hidroliz



(c) Esterleşme



(d) H_2O ile hidroliz



2.3.2.2. Mikrobiyal yolla laktik asit üretimi

Fermantasyon; bir maddenin dönüştürülmesi ve yeni maddelerin oluşturulmasında, mikroorganizmaların biyokimyasal reaksiyonlarından faydalanma tekniğidir. Fermantasyon prosesinin akım seması aşağıda Şekil 2.9' de gösterilmiştir. Yaygın anlamda fermantasyon; oksijensiz ortamda yüksek moleküllü organik bileşiklerin (özellikle karbonhidratların) mikroorganizmalar tarafından daha küçük molekül yapısına sahip bileşiklere parçalanması işlemi olarak da bilinmektedir (Ertugay ve Certel, 1995).

Genel olarak, aşağıdaki kriterlerin oluşması için fermantasyon ortamına besleyici kaynaklar sağlanmalıdır.

- 1- Kullanılan her gram substrat başına maksimum konsantrasyonun sağlanması,
- 2- Ürün veya biyokütle olarak maksimum konsantrasyonun sağlanması,
- 3- Maksimum ürün fermantasyonunun gerçekleştirilmesi,
- 4- İstenmeyen ürünlerden minimum düzeyde oluşması,
- 5- Belli bir kalitesinin olması ve yıl içinde istenildiği gibi elde edilebilmesi,

- 6- Ortam hazırlanırken ve sterilizasyon sırasında minimum düzeyde problem yaratması,
- 7- Üretim potansiyeliyle ilgili havalandırma, ekstraksiyon, saflaştırma ve atıkların uzaklaştırılması gibi konularda da minimum düzeyde sorun meydana gelmesi (Stanbury ve ark., 1995).

Laktik asit bakterileri (LAB) çoğunlukla sporsuz çoğalan, katalaz negatif, gram-pozitif, anaerob bakteriler olarak tanımlanmışlardır. Anaerob olmalarının yanında havaya karşı toleransı olan bakterilerdir. Güvenli bakteriler olarak bilinirler ve bu özellikleri, geleneksel yiyeceklerde ve pazar payı her gün genişleyen özel besleyici gıdalar ya da sağlık ürünlerinde (probiyotikler, prebiyotikler vb.) kullanımlarını arttırmaktadır. Çizelge 2.4 'de laktik asit üreten mikroorganizmalar verilmiştir.

Çizelge 2.4. Laktik asit üreten bakteriler

Mikroorganizma	D(-) Laktik Asit	L(+) Laktik Asit	D/L – Laktik Asit
<i>L. acidophilus</i>			+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	+		
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	+		
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	+		
<i>L. helveticus</i>			+
<i>L. casei</i>		+	
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>		+	
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		+	
<i>L. rhamnosus</i>		+	
<i>Lc. lactis</i>		+	

LAB en çok bilinleri *Lactobacillus* (L.), *Lactococcus* (Lc.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.), ve *Streptococcus* (S.) gibi familyalaradan oluşmaktadır. *Lactobacillus* içlerinde en geniş familyadır ve 125 tür içermektedir. Laktik asit fermantasyonu 2 farklı yol izi izleyerek gerçekleşebilir. Bu mikroorganizma türüne bağlı olarak heterolaktik laktik asit fermantasyonu ve homolaktik laktik asit fermantasyonu şeklindedir. Çizelge 2.5 'de laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2.5. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması

Homolaktik Fermentatif Laktik Asit Bakterileri	Heterolaktik Fermentatif Laktik Asit Bakterileri	
	Fakültatif aerob	Zorunlu anaerob
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbr. subsp. delbrueckii</i>	<i>L. rhammosus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. delbr. lactis</i>	<i>L. coryneformis</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbr. subsp. bulgaricus</i>	<i>L. curvatos</i>	<i>L. kefir</i>
<i>Lc. lactis</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>

Homolaktik *Lactobacilli* türleri şekerli Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) glikoliz yol izine göre kullanırlar ve standart fermantasyon koşulları altında tek ürün olarak laktik asit ortaya çıkar. Bu bakteriler pentoz ve glukonatı fermente etmezler.

EMP glikoliz yol izi 11 basamaklı reaksiyonlar dizisinin sonunda laktik asit oluşmasıdır (Tüzün 2002).

1. İlk reaksiyon glukoz molekülünün 6. C'ndan fosfatlanmasıyla başlar ve glukoz-6- fosfat meydana gelir. Buradaki enzimler; hekzokinaz ve/veya glikokinaz, koenzim ATP ve kofaktör Mg^{++} 'dir.

2. Glukoz-6-fosfatın fruktoz-6-fosfata dönüşmesi bir izomerleşme reaksiyonudur. Enzim, fosfoheksozimeraz veya fosfoglikoizomerazdır. Glukoz-6-fosfatın halkalı yarı asetal bağı açılıp zincir şeklinde dönüşür, zincir

şekli aldoz-ketoz dönüşümüne göre fruktoz-6-fosfata izomerleşir, sonra yarı ketal bağı kapanarak fruktoz-6-fosfat meydana gelir.

3. Fruktoz-6-fosfatın fruktoz 1,6 difosfata dönüşmesi reaksiyonu fruktoz-6-fosfatın bir kez daha fosfatlanmasıdır. Enzim, fosfofrutokinaz, koenzim ATP ve kofaktör Mg^{++} 'dir.

4. Fruktoz 1,6 difosfatın gliseraldehit-3-fosfat ve dihidroksiasetonfosfata bölünmesi reaksiyonunun olası mekanizması: fruktoz 1,6 difosfatın bir dengeye kadar zincir şekline dönüşmesi ve bu zincirin bölünerek gliseraldehit-3-fosfat ve dihidroksiasetonfosfat meydana gelmesi şeklinde açıklanabilir. Enzim aldolazdır.

5. Triozfosfatların birbirine dönüşmesi reaksiyonunda enzim triozfosfat izomerazdır. Reaksiyonun mekanizması diğer şekerlerdeki aldoz ketoz dengesinde olduğu gibi endiol üzerinden geçer.

6. Gliseraldehit-3-fosfatın 1,3 difosfogliserik asite dönüşmesi. Buraya kadarki reaksiyonlarda fosfatlanma, izomerleşme ve bölünme gibi reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Bunlarda belirgin bir elektron aktarılması yoktur. İlk kez bu reaksiyonda elektron aktarılması olur ve gliseraldehit-3-fosfatın aldehit grubu iki elektronunu NAD^+ ye aktararak kendisi karboksilik asit basamağına yükseltgenir ve reaksiyon sırasında inorganik fosfat bağlayarak 1,3 difosfogliserik asit meydana gelir.

Bu reaksiyon biyokimyanın en ilginç reaksiyonlarından biridir. Çünkü burada gliseraldehit-3-fosfat molekülünün aldehit grubundan hidrür iyonu ayrılarak yüksek enerjili iki bileşik yani 1,3 difosfogliserik asit ve NADH meydana gelmektedir. Kimyasal termodinamik bakımından böyle bir reaksiyonun gerçekleşmesi olası değildir. Biyokimyasal olarak böyle bir reaksiyonun gerçekleşmesi ancak enzimin özel yapısı ile mümkün olmaktadır. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enziminin aktif merkezinde sistein

kalıntısının –SH grubu vardır ve başka bir aktif merkezine NAD^+ kovalent bağlarla bağlanmıştır.

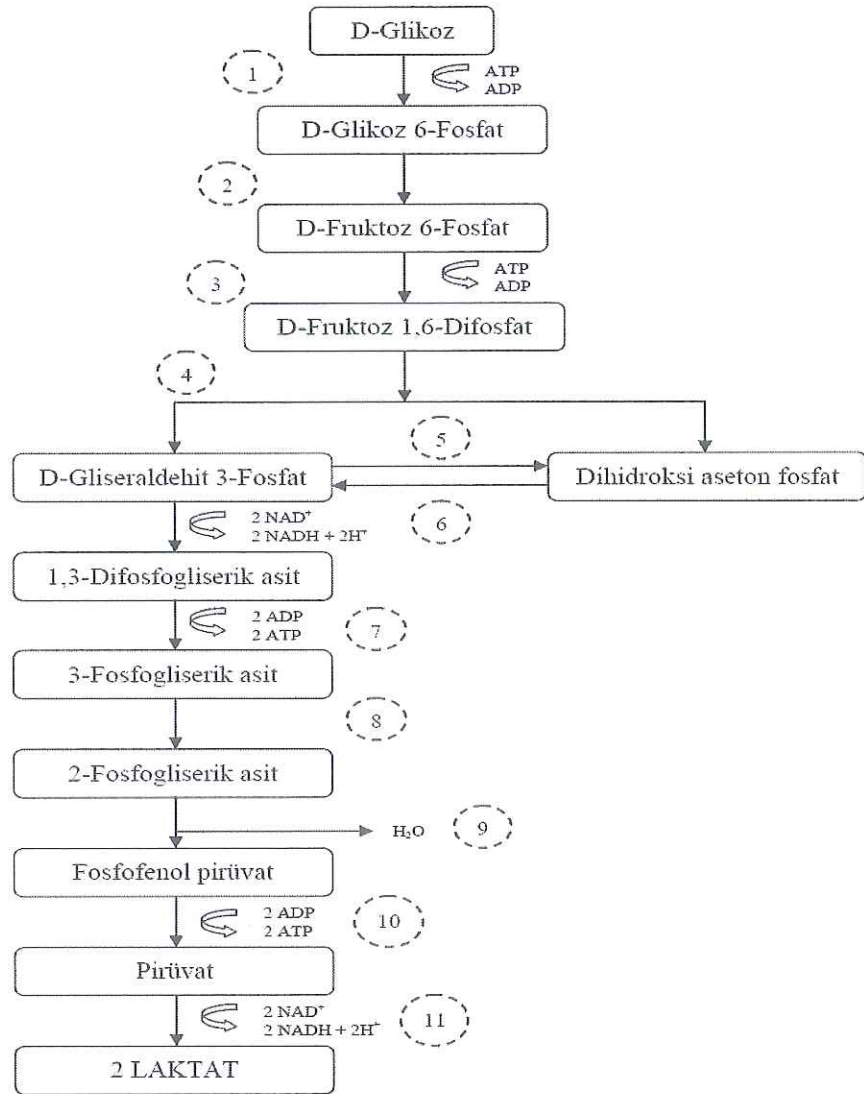
7. 1,3 fosfoglisirik asitin 3-fosfoglisirik asite (3-PGA) dönüşmesi. 1,3 difosfoglisirik asit karboksilik asit ile fosforik asit anhidrididir. Bu reaksiyonda anhidrit bağından fosfat grubu ayrılıp ADP ye bağlanır ve 3 fosfoglisirik asit + ATP meydana gelir. Enzim : fosfoglisirik kinaz, koenzim ; ADP ve kofaktör Mg^{++} dir.

8. 3-Fosfoglisirik asidin (3-PGA) 2-Fosfoglisirik asite (2-PGA) dönüşmesi reaksiyonunun enzimi fosfoglisirik mutazdır. Bu enzimin aktif merkezinde serin kalıntısına bağlı fosfat grupları bulunur. Bu 3-PGA nın 2- yerini fosfatlayarak 2,3 difosfoglisirik asit-enzim kompleksi oluşturur. Bunun 3- yerinden fosfat grubu ayrılarak 2-PGA meydana gelir.

9. 2-Fosfoglisirik asitten (2-PGA) fosfofenol pirüvat (PEP) oluşması reaksiyonunun enzimi enolaz (veya fosfopirüvat hidrolaz), kofaktörler Mg^{++} veya Mn^{++} dir.

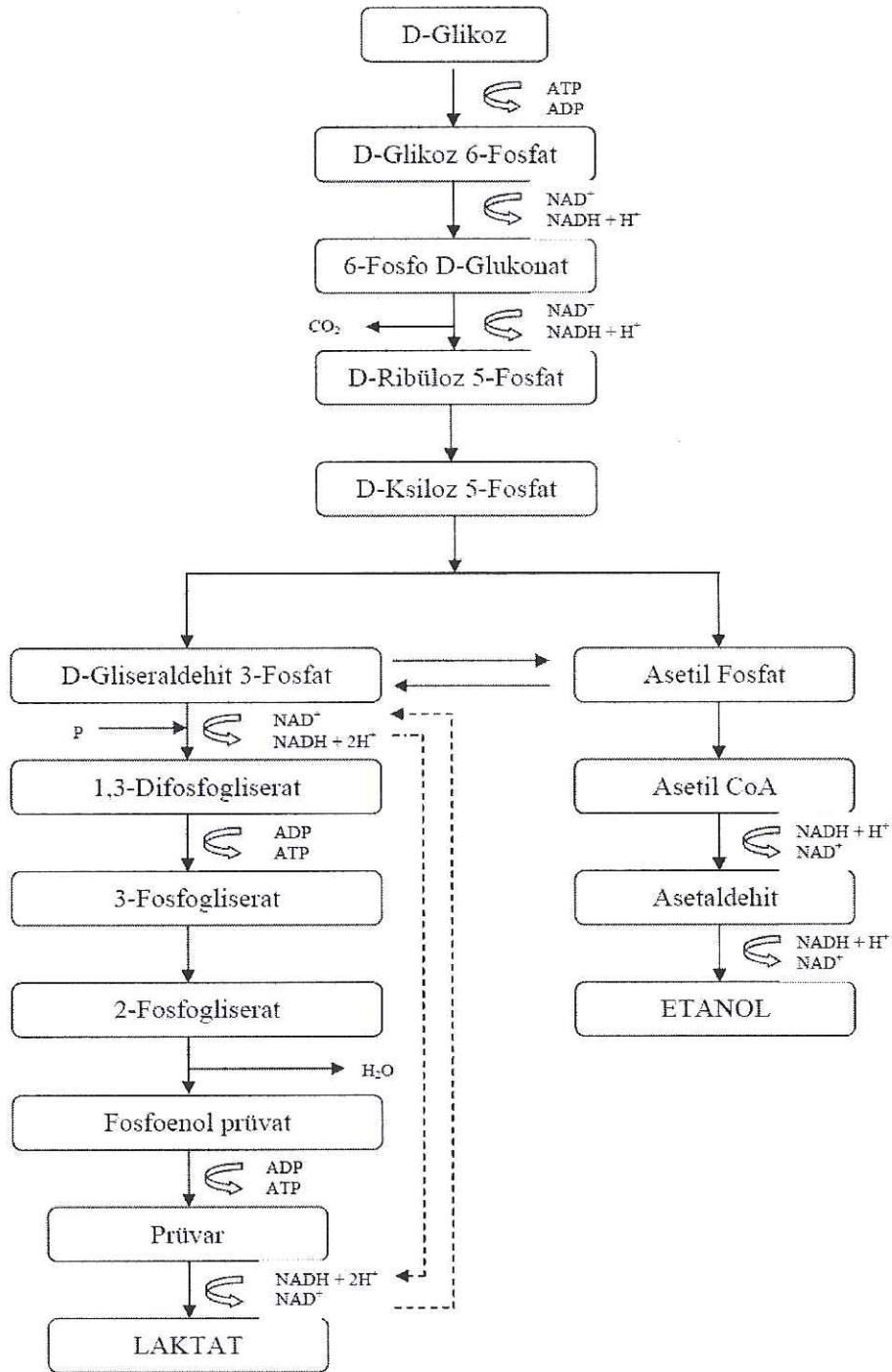
10. Fosfofenolpirüvatın (PEP) pirüvik asite dönüşmesi. Enzim; pirüvik kinaz, koenzimler Mg^{++} ve K^+ . Bu reaksiyonda PEP ten ayrılan fosfat anyonu ADP'ye bağlanarak yüksek enerjili bir koenzim olan ATP meydana gelir.

11. Pirüvik asitin L(+) laktik asite dönüşmesi. Glikoliz reaksiyonunun son basamağı olan bu dönüşümün enzimi laktik dehidrojenaz (laktat dehidrojenaz), koenzim NADH dir. Pirüvik asitin keto- grubuna 2 elektron + 2 proton aktarılarak laktik asit meydana gelir. Reaksiyon çok ekzotermiktir ve laktik asit lehinedir. Şekil 2.9'de homolaktik fermentasyon yol izi gösterilmiştir (Panesar *et al.* 2007).



Şekil 2.9. Homolaktik laktik asit fermantasyonu yol izi

Fakültatif olarak heterolaktik mikroorganizmalar da heksozu aynı yol izine göre kullanırlar ancak bu mikroorganizmalar pentoz ve bazı farklı maddeleri fosfoketolazdan bağımsız bir yol izini kullanarak parçalarlar ve ortaya laktik asit ile genellikle asetik asit ya da etanol gibi yan ürünler ortaya çıkar. Zorunlu heterolaktik laktik asit bakterileri ise sadece fosfoketolazdan bağımsız bir yol izini kullanırlar ve bu nedenle ortaya laktik asit yanında büyük miktarlarda da yan ürün (asetik asit, etanol vb.) ortaya çıkar. Şekil 2.10 'de heterolaktik fermantasyon yol izi gösterilmiştir (Panesar *et al.* 2007).



Şekil 2.10. Heterolaktik laktik asit fermantasyonu yol izi

Musatto ve ark. (2007a) yaptıkları bir çalışmada %50 glukoz içeren ve ilave besin maddesi içermeyen bira atığı ortamında *L.debruecki* ile 5.4 g/L laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu üretimde glukoz tüketimi % 73 verimliliktedir. Farklı miktarlarda inokulumun kıyaslandığı bu çalışmada en iyi sonuç litrede 1 g kuru hücre içerenden elde edilmiş olup pH azalmasının glukoz tüketimi ve laktik asite dönüştürme kapasitesini etkilediği bulunmuştur.

Arvid ve ark. (2002) lignoselülozidik materyal olan buğday kabuğundan elde edilen hemiselülozidik hidrolizattan *L.brevis* ve *L.pentosus* ile laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu hidrolizattan asit ve ya enzimatik hidrolizden 11-12 g/L fermente edilebilir şeker bulunmuştur. *L.brevis* tek başına %51 *L.pentosus* % 61 verimlilikle laktik asit üretim gerçekleştirmiştir. Ancak her iki mikroorganizma da birlikte kullanıldığı ortamda verim % 95' e kadar yükselmiştir.

Bustos ve ark. (2005) *L.pentosus* ile şarap üretiminden arda kalan yongadan elde edilen hemiselülozidik hidrolizattan laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu hidrolizat 12 g/L glukoz, 17.5 g/L ksiloz ve 4.3 g/L arabinoz içerdiği belirlenmiştir. Bu üretimde en önemli yan ürün olarak asetik asit de bulunmuştur. Asetik asit üretimin glukoz tüketiminden daha sonra meydana gelmesinden yola çıkarak asetik asitin ksiloz ve arabinoz tüketimine bağlı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. *L.pentosus* glukoz yokluğunda homofermentatif yoldan heterofermentatif yola kaydığında yola çıkarak fakültatif heterofermentatif bir mikroorganizma olduğu belirtilmiştir. *L.pentosus* hekzos varlığında Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yol izini, pentozların varlığında fosfoketolaz yol izini kullanmaktadır. Şeker içeriği daha önce belirlenen hidrolizatlar vakumlu evaporatörde 35.4 g/L glukoz, 52.3 ksiloz ve 13 g/L arabinoz' a yükseltilmiştir. Bu koşullar altında 46.6 g/L laktik asit üretimi gerçekleşmiştir.

Moldes ve ark. (2006) seyreltik sülfürik asit ile farklı lignoselülozidik madde bakımından zengin olan zirai atıklardan hemiselülozidik şekerlerin elde edilmesi ve *Lb. pentosus* ile laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir.

Üzüm cibresi, mısır koçanı ve arpa kabuğunun asit ile hidrolizinde ligninden gelen toksik maddelerin de araştırıldığı çalışmada en iyi koşullarda laktik asit üretimi arpa kabuğundan elde edilmiştir.(33 g/L). Pentozların en yüksek verimle üzüm cibresinden asit hidrolizi ile elde edildiği belirtilmiştir. (0.76 g/g).

2.3.3. Laktik Asitin Kullanım Alanları

Birçok uygulama alanına sahip bir kimyasal olan laktik asidin endüstride önemli bir yeri vardır. Laktik asidin en yaygın kullanımı ve uygulama alanları

- Gıda sektörü ;
- Kozmetik ;
- İlaç ;
- Kimyasal uygulamalar olmak üzere dört temel sınıfa ayrılmaktadır.

Gıda katkı maddesi olarak laktik asit, tatlandırıcı, pH ayarlayıcı, mikrobiyal niteliği geliştirici ve mineral takviyesi olarak gıda endüstrisinin birçok alanında geniş olarak kullanılmaktadır. Ayrıca laktik asit; gıda sanayinde ürünlerin raf ömrünü uzatmak, tadını iyileştirmek ve gıdada kaynaklı hastalıklara neden olan patojenleri daha iyi kontrol edebilmek için ticari olarak et endüstride kullanılmaktadır. Laktik asit hafif tadından dolayı salatalarda ve soslarında, pişmiş gıdalarda, salamura bitkilerde ve meşrubatlarda kullanılır. Gıda endüstrisinde laktik asidin bir diğer kullanım alanı da gıda ürünlerinde mineral takviyesi olarak kullanılmasıdır. Laktik asit ticari olarak, özellikle kümes hayvanları olmak üzere et endüstrisinde raf ömrü arttırılmış, lezzeti arttırılmış ve besinde oluşan patojenleri daha iyi kontrollü ürünler sağlamak için kullanılmaktadır. Şekerlemecilikte laktik asit

sadece tatlandırıcı olarak değil, ayrıca pişirilmiş karışımın pH'sını, düzenlemek ve doğru noktaya getirmek için de kullanılır. Şekerlemecilikte laktik asit kullanımının avantajları; düşük tersine çevirme hızı, kullanım kolaylığı, şeffaf sekerler üretebilme yeteneğini içerir (Wee at al., 2006).

Laktik asit kozmetik uygulamalarında doğal katkı maddesi özelliği gösterir. Öncelikli olarak nemlendirici ve pH düzenleyici olmasına rağmen, antimikrobik aktivitelerde, derinin temizlenmesinde ve derinin sulandırılmasında da kullanılır. Nemlendirici etki doğrudan laktik asidin su tutma kapasitesine bağlıdır ve laktik asidin cilt parlaticı etkisi tirozinaz oluşumunu önlemesiyle oluşturulur. İnsan bedeninin doğal bileşenleri olduğundan, laktik asit ve onun tuzu, doğal ve daha güvenli formüllerden yana olan modern eğilimlere kusursuzca uyar ve onları kozmetikte çok faydalı aktif maddeler yapan cilt parlaticı ve yeniden gençleştirme gibi etkileri üretir (Wee at al., 2006). Laktik asit, elektrolitleri veya vücut sıvılarını tamamlamada yardımcı olan birçok parenteral (damar yolu) çözeltilerinde bir elektrolit olarak kullanılır. Ek olarak laktik asit; tablet, protez, cerrahi dikiş ve uyuşturucu kontrol eden sistemler gibi birçok alanda mineral formülasyonu hazırlanmasında kullanılır.

Laktik asit ve tuzu, birçok çeşitli kimyasal ürünlerde ve proseslerinde kullanılır. Bu uygulama alanlarında laktik asit; kireç giderme maddesi, pH düzenleyici, nötrleştirici, temizleme maddesi, metal karıştırıcı madde, antimikrobik madde olarak çeşitli fonksiyonlar gösterir. Doğal laktik asit mekanik olarak birçok temizleme alanlarında kullanılır. Çözülebilir özelliği ve çözücü gücü nedeniyle laktik asit, polimeri ve reçineleri uzaklaştırıcı olarak da kullanılır. Ayrıca yaygın organik kireç temizleyicilerinden daha iyi olduğundan banyo, tuvalet ve kahve makineleri temizlenmesinde kullanılır. Etillaktat, polimerik boyalara ve yağlara karşı güçlü bir çözücü olduğundan ayrıca çevreye zarar vermeyip, zehirli de olmadığından birçok akne gideren uygulamalarda da kullanılmaktadır.

Laktik asit yüksek çözücülük ve çözünürlüğünden dolayı mükemmel bir polimer ve reçine taşıyıcıdır. % 98'den daha büyük bir izomerik saflıkla elde edilebilir ve herbisit ya da ilaç üretiminde uygun bir başlangıç maddesi olmak için uygundur.

Karboksilik grubu ve hidroksil grubu olarak iki reaktif fonksiyonel grubu içeren laktik asit kimyasal dönüşümlerin önemli bir hammaddesidir. Laktik asit propilen oksit, asetaldehit, akrilik asit, propanoik asit, 2,3-pentadiene, dilaktit gibi potansiyel olarak yararlı kimyasalların içinde kimyasal dönüşümlerin hammaddesi olarak kullanılabilir.

Özellikle son yıllarda, laktik asit monomeri, biyolojik olarak parçalanabilen bir plastik olarak kullanılan polilaktik asitin (PLA) üretimi için önemli bir hammadde durumundadır. Saf olarak üretilen laktik asit; polikondenzasyon, depolimerizasyon ve ring-opening polimerizasyon gibi bir seri reaksiyon boyunca yüksek molekül ağırlıklı PLA'yı polimerize edilebilir. Sonuç olarak meydana gelen polimer, PLA, koruyucu giysilerde, gıda ambalajlarında, 'mulch' filminde, çöp kaplarında, sert konteynerlerde, 'shrink' giysilerde ve kısa raf ömürlü 'tray'lerdeki gibi geniş bir kullanım alanı bulunur. Hızla artan PLA marketleri laktik asite olan ihtiyacı artırmaktadır (Wee et al., 2006).

2.4 Fenolik Bileşikler

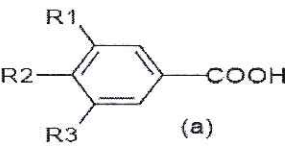
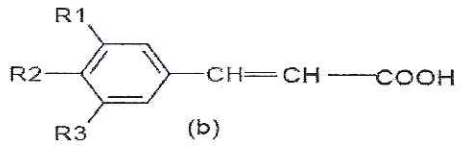
Fenolik bileşikler, bütün bitki metabolizmalarında sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu sanılan çok sayıda farklı nitelik ve miktarlardaki çeşitli bileşiklerdir (Saldamlı, 2007). Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (Kafkas ve ark., 2006). Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Cemeroğlu, 2004; Coşkun, 2006).

Fenolik bileşikler besinsel ve antioksidan özelliklere sahip olmalarının yanısıra lezzet, burukluk, renk gibi birden fazla duyuşal gıda özelliklerini etkilemekte olup, bitki kökenli birçok gıda ürününün tadına ve aromasına katkıda bulunurlar. Fenolik bileşiklerin aromaya olan katkısı başlıca uçucu fenollerin varlığına bağılıdır ve bunlar ya yüksek alkollerin hidrolizinden üretilebilirler yada maya ve laktik asit bakterileri gibi mikroorganizmaların metabolizmaları sonucunda oluşabilirler. Yine fenolik bileşikler arasında yer alan flavanoidler ise doğal gıda pigmentleridir ve sebze ürünlerinin rengini büyük ölçüde etkilerler (Rodriguez ve ark., 2009).

Fenolik bileşikler, flavanların polimerleri olup, başlıca flavan 3-4-diollerden oluştukları bilinmektedir (Bayrak, 2006). Bu bileşikler fenol halka sayılarının fonksiyonuna bakılarak farklı gruplarda sınıflandırılabilirler ve bir halkayı diğere bağlayarak yapısal element görevi üstlenebilirler. Fenolik bileşikler; fenolik asitler, flavanoidler, stilbenler ve lignanlar olarak gruplandırılmakta olup, flavanoidler de kendi aralarında flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar ve antosiyanidinler olarak ayrılabilirler. Bu çeşitliliğe ek olarak, polifenoller çeşitli karbonhidratlar ve organik asitlerle ilişkili olabilirler (Manach ve ark., 2004).

2.4.1. Fenolik Asitler

Hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunan, fenolik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 2.11' de görülmektedir (Saldamlı, 2007).

							
(a)				(b)			
Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şük	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 2.11. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri

Fenolik asitlerin antioksidan etkileri yapılarıyla ilgilidir (Tapiero ve ark., 2002). Bu etki aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısına, bağlanma yerine ve pozisyonlarına bağlıdır (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Sroka ve Cisowski, 2003; PeyratMaillard ve ark., 2000). Hidroksi grubunun sayısının artmasıyla antioksidan etkinin arttığı gözlenmiştir (Peyrat-Maillard ve ark., 2000; Fukumoto ve Mazza, 2000). Metoksi grubu taşıyan fenolik asit türevinin taşımayana göre daha etkin olduğu saptanmıştır (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Fukumoto ve Mazza, 2000).

Meyveler, sebzeler ve çay gibi içecekler insanların günlük diyetinde yer alan fenolik bileşiklerin ana kaynağıdır. Akdeniz diyeti, fenolik bileşiklerin duyuşal ve besinsel özelliğinden sorumlu olduğu, şarap ve sofralık zeytin gibi fermente gıdalar içerir. Örneğin şarap karmaşık fenolik bileşik kompozisyonuna sahiptir ve hem şarap prosesine hem de üzüm çeşitliliğine bağlı olarak 100 mg/L'den 200 mg/L'ye değişen konsantrasyonlarda çeşitli fenolik bileşikler (hidroksisinamik ve hidroksibenzoik) içermektedir (Reguant ve ark., 2000; Campos ve ark., 2003).

Bunlara ek olarak batı dünyasında çok az bilinen siyah veya mor havucun Türkiye, Afganistan, Mısır, Pakistan, Hindistan ve uzak doğuda geleneksel tüketimi yaygındır. Ülkemizde Adana ve yöresinde tüketimi yaygın olan şalgam suyunun hammaddelerinden biri olan mor havucun

kökünde 40'dan fazla fenolik bileşik tespit edilmiş olup bunların çoğu p-kumarik, kafeik ve ferulik asit olarak belirlenmiştir (Kammerer ve ark., 2004).

Geleneksel olarak, fenolik bileşikler beslenme açısından istenmeyen bileşikler olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni, proteinlerin çökmesine, sindirim enzimlerinin inhibe olmasına ve vitaminler ile minerallerin kullanımının etkilenmesine, gıdaların besinsel değerlerinin azalmasına neden olmalarıdır. Ancak antioksidan aktivitelerinin fark edilmesi ile sağlığı olumsuz etkileyen özelliklerinin araştırılması azalmıştır. Hatta günümüzde, günlük diyetle yer alan fenolik bileşiklerin, bazı kimyasalların zararlı etkilerini önleyici (kemopreventif) özelliği nedeniyle sağlık için yararlı olduğu ve bu özelliğin daha çok antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Rodriguez ve ark., 2009). Fenolik bileşikler sağlık açısından sahip olduğu bu özelliklerinin yanında, laktik asit fermentasyonlarında görev alan LAB üzerinde de bazı etkilere sahiptir. Yapılan bir araştırmada gallik asit ve kateşinin *Lactobacillus hilgardii*'nin gelişimini teşvik ettiği bu konuda yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Alberto ve ark., 2001).

Diğer yandan, fenolik bileşiklerin yine LAB gelişimi üzerinde olumsuz etkileri de söz konusudur. Bu bakterisidal etkinin hücre duvarı ve sitoplazmik membran ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Ruiz-Barba ve ark., 1990).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, fenolik bileşiklerin daha çok laktik asit bakterilerinin gelişimini olumsuz etkilediğini, hatta laktik asit bakterilerinin metabolize ettiği fenolik bileşiklerin de sınırlı sayıda olduğunu göstermiştir (Rodriguez ve ark., 2009).

2.4.1.1. Fenolik asitlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

2.4.1.1.1. Sinamik Asit:

Kimyasal formülü $C_9H_8O_2$ ((E)-3-fenil-2-propenoik asit) 'dir. Moleküler ağırlığı 148.17 g/mol 'dür. Monoklinik kristaller halinde bulunur. Yoğunluğu 1.25 g/cm^3 , kaynama noktası 300°C , erime noktası 133°C ' dir. Kokusuz beyaz kristal halinde bulunur. Suda çözünürlüğü oldukça azdır. Ancak etanol, aseton ve THF' deki çözünürlükleri iyidir (Anonim, 2014).

Sinamik asit sığla yağı, tarçın yağı ve yeşil çay gibi maddelerde bulunmaktadır. Tatlandırıcı olarak, sentetik çivit olarak ve ilaç endüstrisinde oldukça fazla kullanılır. Başlıca kullanım alanı; parfüm endüstrisinde metil, etil ve benzil esterlerin eldesidir.

2.4.1.1.2. Klorojenik Asit:

Kimyasal formülü $C_{11}H_{18}O_9$, molekül ağırlığı 354.31 g/mol 'dir. Açık kimyasal formülü (3-[[3-(3,4-Dihidroksifenil)-1-okzo-2-propenil]oksi]-1,4,5-trihidroksisikloheksan karboksilik asit). Yoğunluğu 1.28 g/cm^3 , erime noktası $207\text{--}209^\circ\text{C}$ arasında olan klorojenik asit, kafeik asit ve kuinik asitin esteridir. Bitki metabolizmasında en önemli faktörlerdendir. Antioksidan özelliği ile bilinir. Kahvedeki en önemli fenolik bileşiktir. Çoğunlukla ilaç endüstrisinde, gıda endüstrisinde ve kozmetik endüstrisinde kullanılır (Anonim, 2014).

2.4.1.1.3. Gentisik Asit:

Molekül formülü (2,5-dihidroksibenzoik asit) $C_7H_6O_4$, molekül ağırlığı 154.12 g/mol olan gentisik asit; beyaza yakın sarı renkte pudra kıvamında bulunur. Erime noktası $200\text{--}205^\circ\text{C}$ 'dir. Suda, etanolde, polar organik çözücü ve tuzlarda çözünürlüğü iyidir (Anonim,2014).

2.4.1.1.4. Şirinjik Asit:

Molekül formülü (4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit) $C_9H_{10}O_5$, molekül ağırlığı 198.17 g/mol'dür. Kaynama noktası 205–209 °C'dir (Anonim, 2014).

2.4.1.1.5. Vanilik Asit:

Molekül formülü (3-metoksi 4-hidroksi benzoik asit) $C_8H_8O_4$, molekül ağırlığı 168.14 g/mol'dür. Alkoldeki çözünürlüğü çok iyidir. Erime noktası 210–230 °C'dir (Anonim, 2014).

Beyaz renkli pudra şeklindedir. Şarap (Minussi ve ark., 2003), buğday kepeği (Yu ve Zhou, 2005) ve okalıptusta (*Eucalyptus globulus*) (Gonzalez ve ark., 2004) bulunmaktadır.

2.4.1.1.6. p-Kumarik Asit: (3-hidroksi sinamik asit) ve o-Kumarik Asit: (2 hidroksi sinamik asit)

Kumarik asit sinamik asitten türemiş organik bileşiktir. Yapıdaki hidroksi grubunun yerine bağlı olarak orto, para ve meta olmak üzere üç tane izomeri vardır. Molekül formülü $C_9H_8O_3$, molekül ağırlığı 164.15 g/mol'dür. Erime noktası 210 ile 213 °C arasındadır (Anonim, 2014). Portakal (Sousa ve ark., 2004), kiraz (Cadenas ve Packer, 2002) kahve, çikolata ve şarapta (Abdel-Wahab ve ark., 2003) bulunmaktadır. Strese karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Tümör hücrelerini öldürme yeteneğinin yanında DNA'da oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir. Yüksek miktarlarda alındığı zaman toksik etki göstermektedir (Labieniec ve ark., 2003). pKumA özellikle mide kanserine karşı oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir (Ferguson ve ark., 1999).

2.4.1.1.7. p-Hidroksibenzoik Asit:

Molekül formülü (4-hidroksi benzoik asit) $C_7H_6O_3$, molekül ağırlığı 138.12 g/mol'dür. Erime noktası 214–217 °C' dir. p-hidroksibenzoik asit benzoik asidin fenolik türevidir. Beyaz kristaller şeklinde bulunur. Suda çözünürlüğü azdır, ancak alkoller, eter ve asetonda oldukça iyi çözünür (Anonim, 2014).

2.4.1.1.8. Protokateşik Asit:

Molekül formülü (3,4-dihidroksi benzoik asit) $C_7H_6O_4$, molekül ağırlığı 154.12 g/mol'dür. Beyaz kristal pudra şeklinde bulunur. Erime noktası 200–202 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü çok azdır. Alkol ve eterdeki çözünürlüğü çok güçlüdür (Anonim, 2014). Soya fasulyesi ve kekikte oldukça çok bulunmaktadır (Bektaş, 2005).

2.4.1.1.9. Kafeik Asit :

Molekül formülü (3,4-dihidroksi sinamik asit) $C_9H_8O_4$, molekül ağırlığı 180.16 g/mol'dür. Sarı kristalize şeklinde bulunur. Erime noktası 223–225 °C'dir. Sıcak suda ve alkolde çözünürlüğü oldukça iyidir (Anonim, 2014). Doğal bir fenolik asittir, bu nedenle pek çok bitkide bulunmaktadır. Hidrosinamik asitlerin doğada en çok rastlanılan türevidir. Elma, üzüm, erik, yulaf gibi çeşitli meyvelerde mevcuttur. Nitrite hızlı bir şekilde etki ederek nitrik oksite indirgemektedir (Huang ve Ferraro, 1991).

2.4.1.2. Fenolik Bileşiklerin Elde Edilmesi

Fenolik maddelerin besin maddeleri ve atıklarından izole edilmesinde, özellikle çözgen ekstraksiyonu, tanımlanmasında ise daha çok kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Bunların yanında son yıllarda membran teknolojisi ile fenolik maddelerin elde edilmesi üzerine çalışmalar yapılmaya başlamıştır. Borneman ve ark. (Borneman ve ark., 1997), polietersülfon (PES) ve

polivinilprolidon (PVP) kombinasyonuyla yapılmış membranların elma suları ve model çözeltilerden polifenollerin ayrılmasında yalnızca PES kullanılan membranlara göre daha etkili olduğunu ve akış oranının da daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Mangas ve ark. (1997), inorganik membranlar kullanarak ters akım filtrasyon tekniğiyle elma sularının durultulması üzerine yaptıkları çalışmada, sıcaklık, işlem süresi ve membran tipinin polifenollerin ayrılmasında etkili olduğunu, ultrafiltrasyon ile düşük sıcaklıkta elma suyunun yeterli stabiliteye ulaşmasını sağlayacak ölçüde polifenol ayrılabilirdiğini belirlemişlerdir. Fenolik maddelerin elde edilmesi amacıyla uygulanan yöntemler Çizelge 2.6' de özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Fenolik maddelerin elde edilme yöntemleri (Mangas et al., 1997; Lu and Foo, 1997; De Sotillo et al., 1994; Madsen and Betelsen, 1995; Chkikvishvili and Gogiyo, 1995)

Yöntem	Uygulama	Çözgen	Kullanım Alanı
Ekstraksiyon	Çözgen Ekstraksiyonu	Metanol	Kekik, lavanta, mercanköşk, nane, fesleğen, pirinç kabuğu, zeytin ve yaprağı, kuşyemi, nişasta atık suları, biberiye, patates kabuğu
			Elma posası, susam çekirdeği, biberiye, sarımsak
			Adaçayı, biberiye
		Aseton	Kuşyemi
			Zeytin ve yaprakları
		Hekzan	Sarımsak, biberiye,
		Eter	adaçayı
		Etil asetat	Mandarin atıkları
		Diklor metan	Sarımsak
		Benzen	Biberiye
		Tuz çözeltisi	Mandarin atıkları
		Etil alkol	Patates kabuğu, çay
		Kloroform	Biberiye
		Su	Biberiye
Kromatografi	Kolon kromatografisi		Elma posası
	Sıvı kromatografisi		Ayçiçeği küspesi
Membran			Elma suyu

Laktik asit bakterileri ve fenolikler arasındaki ilişki iki şekilde düşünülebilir: Laktik asit bakterileri, fenollerini daha az kompleks fenolik

metabolitlere indirgeyebilir veya bakteri gelişimi fenoliklerden olumlu yada olumsuz şekilde etkilenebilir. Bu iki etkileşim içinde fenolik bileşiklerin konsantrasyonu çok önemlidir. Örneğin, bakteri belli bir konsantrasyondaki fenolik bileşiği tolere edebilir hatta metabolize edebilir. Aynı zamanda düşük fenolik konsantrasyonlar bakterinin gelişimini teşvik edebilir ya da yüksek konsantrasyondaki fenolik bileşiklerin varlığı bakterileri inhibe edebilir (Stead,1993).

Herna'ndez ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada laktik asit bakterilerinin trans-kaftarik ve trans-kutarik asidi substrat olarak kullanabildikleri ve malolaktik fermantasyon (MLF) esnasında sinnamol esteraz enzim aktivitesiyle hidroksisinamik asit konsantrasyonunu arttırdıkları saptanmıştır.

Couto ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada laktik asit bakterilerinin p-kumarik ve ferulik asitten uçucu fenol oluşturma kapasitesini gaz kromatografisiyle incelemişler ve 13 adet suşun p-kumarik asitten uçucu fenol üretebildiğini, bunlardan sadece üçünün ise 4-etilfenol ürettiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmada, 10 adet suş sadece 4-vinilfenol oluşturabilmiş, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum*'un tek bir suşu p-kumarik ve ferulik asit türevlerini meydana getirmiştir. *Lactobacillus collinoides*'in bir suşunun kuvvetli bir 4-etilfenol üreticisi olduğu anlaşılmıştır. Diğer *Lactobacillus* türleri (*L. mali*, *L. sake* ve *L. viridescens*) yüksek konsantrasyonlar da 4-vinilfenol ürettiği saptanmıştır. *Lactobacillus hilgardii* suşları dekarboksilasyon aktivitesi göstermemiştir. Araştırmada 8 adet *Pediococci* suşundan yedisi p-kumarik asitten 4-vinilfenol, *P. acidilactici* ve *P. Damnosus*'un da 4 -vinilfenol ürettiği belirlenmiştir. Çalışılan iki *O. oeni* suşu p-kumarik asit türevlerini oluşturamadığı ve test edilen *L. mesenteroides* de uçucu fenol üreticisi olmadığı anlaşılmıştır.

Mussatto ve ark. (2007a) bira atık mayşesinden alkali hidrolizi ile gıda, sağlık, kozmetik ve fermokolojik uygulamada kullanımı ilgi çeken bileşikler olan ferulik asit ve kumarik asit ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. NaOH % 1, 1.5 ve 2 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda, sıcaklık 20, 100 ve 120 °C, reaksiyon süresi 30, 60 ve 90 dk da denemeler yapılarak en iyi

hidroliz koşullarını araştırmışlardır. İstatiksel analiz kullanılan çalışmada en iyi alkali hidrolizi koşulları %2 NaOH konsantrasyonu, 120 °C sıcaklıkta ve 90 dk reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında 145,3 mg/L ferulik asit, 138,8 mg/L kumarik asit elde edilmiştir. Bu da çözünen ligninin her gramında 9,65 mg/L ferulik asit 9,22 mg/L kumarik asit olduğu bulunmuştur.

Yine benzer bir çalışmada Mussatto ve ark. (2007b) bira atık mayşesi içerisindeki 12,44 g/L çözünebilen ligninin asit ile hidrolizi bazı fenolik asitlerin (vanilik asit, şiranjik asit, p-hidroksibenzoik asit ve kumarik asit) elde edildiğini belirtmişlerdir. pH 2,15-12,56 arasında on farklı değerde çalışılmıştır ve pH değişimine bağlı olarak fenolik asitlerin %32-74 arasında elde edildiği belirtilmiştir. pH'nın 7,7 den düşük olduğu çalışmalarda önemli oranda lignin dönüşümü gerçekleştiği belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada Mussatto ve ark. (2013) yılında yaptıkları bir çalışmada bira atık mayşesinin etanol, metanol, aseton ve su gibi farklı solventlerle antioksidant fenolik bileşiklerin elde edilmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada kullanılan her bir çözücünün fenolik bileşikler elde etme açısından farklı etkilerinin olduğu ve elde edilen fenoliklerin hepsinin antioksidant özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. % 60 v/v aseton çözeltisinin toplam fenoller ve antioksidant bileşikler elde etmede en iyi sonucu verdiğini bulmuşlardır. Aseton (% 60 v/v) çözeltisinin hem daha verimli hem de daha ucuz oluşu kullanım açısından avantaj oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Cavin ve ark. (1993) *L. brevis*, *L. plantarum* ve *P. Pentosaceus*'un, *p*-kumarik ve ferulik asidi dekarboksile edebildiğini ortaya koymuşlardır. Chatonnet ve ark. (1995) ise *L. brevis* ve *P. Pentosaceus*'un bazı suşlarının *p*-kumarik asidi 4-vinilfenole dekarboksile edebildiğini belirtmişlerdir. *L. plantarum* iki çeşit fenolik asit dekarboksilaz üretebilmektedir; PAD ya da PDC olarak isimlendirilen birinci fenolik dekarboksilaz, *p*-kumarik, ferulik ve kafeik asitleri vinil türevlerine dekarboksilize eder. Diğer enzimi ise padA (PDC) geni tarafından üretilen fenol asit dekarboksilaz enzimidir ve *p*-kumarik aside göre ferulik asit ile çok daha iyi aktive olmaktadır. Bu ikinci enzim hala karakterize edilememiştir (Rodriguez ve ark., 2009).

2.6. Biyodönüşüm Yoluyla Üretim

Mikroorganizmaların bir bileşiği yapısal yönden kendisine benzer başka bir bileşiğe dönüştürmesi olayına mikrobiyel biyodönüşüm denir (Crueger ve Crueger, 1990). Bir başka deyişle, mikroorganizmalar tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümlerdir. (Telefoncu, 1995). Biyodönüşüm olayına en klasik örnek olarak asetik asit bakterileri tarafından etil alkolden asetik asit üretimi gösterilebilir. Günümüzde mikrobiyel biyodönüşümle üretilen birçok aroma maddesi olmasına karşın bunların halen büyük çoğunluğu araştırma düzeyindedir. Mikrobiyel biyodönüşüm sırasında gerçekleşen bazı reaksiyon türleri arasında oksidasyon, hidroliz, esterleşme, dehidrasyon, fosforilasyon, C-C bağlarının koparılması, indirgenme reaksiyonları gelmektedir. Biyodönüşümde genellikle verim çok yüksektir. Verimi etkileyen faktörler arasında mikroorganizma türü, pH, sıcaklık, hücre zarı geçirgenliği, ürün inhibisyonu, substratların ortamda çözünürlük derecesi gibi özellikler sayılabilir. Birçok mikrobiyal biyodönüşüm olayında iki substrat gereklidir. Bunlardan biri mikroorganizmaların gelişmesi için gereklidir. Diğerisi ise, dönüşüme uğrayacak substrattır. Mikroorganizma gelişimi için gerekli substrat doğal kaynaklardan ucuz olarak karşılanabileceğinden maliyet düşürülmüş olur (Crueger ve Crueger, 1990).

Biyoteknolojide kullanılan farklı mikrobiyal biyodönüşüm teknikleri vardır. Bunlar;

Çoğalan hücreler ile biyodönüşüm: Hücreler ideal besi ortamında üretilir ve yapılan testlerle belirlenen şekilde biyodönüşüme uğratılacak substrat ortama katılır,

Durgun evredeki hücreler ile biyodönüşüm: Mikroorganizma ideal besiyerinde üretilir, filtrasyon veya santrifüj ile ayrıldıktan sonra biyodönüşüm ortamına ilave edilir, Sporlar ile biyodönüşüm: Küfler spor oluşumu için ideal koşullarda üretilir ve sporlar misellerden ayrılıp soğukta saklanır. Biyodönüşüm yapılacağı zaman bu sporlardan yararlanılır,

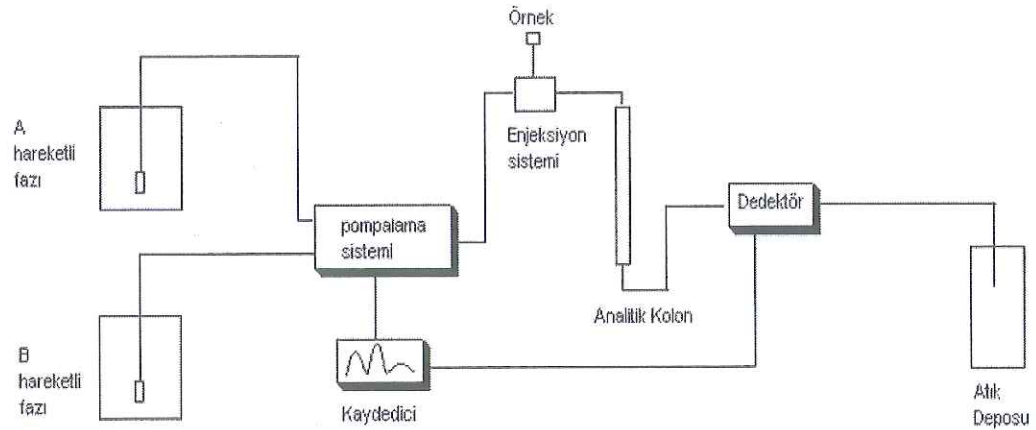
İmmobilize hücreler ile biyodönüşüm: Mikroorganizmalar ürün ve substratın geçişine izin veren bir polimer matrikste (poliakrilamid, kapakarragenan, alginat, selüloz, nişasta vb.) tutuklanır veya bir polimere bağlanır. İmmobilize hücreleri istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilir, yeniden kullanılabilir, kesikli ve kesiksiz fermantasyonlara uygundur (Telefoncu, 1995).

Mikrobiyel biyodönüşüm yüksek substrat seçiciliği, az miktarda yan ürün oluşumu ve asıl ürünün kolay izole edilmesi ve saflaştırılması gibi önemli avantajlara sahip olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntem aroma maddelerinin yanında bazı katkı maddelerinin endüstriyel ölçekli üretimlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2007).

2.7. HPLC Yöntemi

Bir ayırma tekniği olan yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC), bir çözücüde çözünmüş olan bileşikler, sabit bir faz içeren kolon içinden, yüksek basınçlı pompa ile gönderilen hareketli faz yardımı geçmeye zorlanırlar. Hareketli faz içindeki bileşenler, durgun ve sıkı faza karşı farklı ilgilerinden dolayı değişik hızlarda ilerleyerek kolondan farklı zamanlarda çıkmaktadır. Kolonun çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör yardımıyla farklı zamanlarda kolondan ayrılan maddeler sırasıyla belirlenerek kaydedilir. Yüksek hızlı ayrımların yapıldığı bu işleme, yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisi denmektedir (Erdik ve ark.,2000). Yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminin birimleri ve özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- a)Hareketli/ Taşıyıcı Faz Depoları
- b)Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa sistemi
- c)Enjeksiyon (Örnek Yükleme) Sistemi
- d)Ayırma Birimi; Analitik Kolon(lar)
- e)Ölçüm Birimi; Dedektör(ler)
- f)Yazım Birimi; kaydedici, İntegratör
- g)Atık Deposu



Şekil 2.12. HPLC cihazı akış şeması

Hareketli fazın akış hızı ayırma süresince aynı olmalıdır. Durgun fazda bozunma ve tıkanıklık, basınçta ve akış hızında değişikliğe neden olabilir. Pompa sisteminin düzgün çalışabilmesi için bu sistemin içerisinde hava kabarcığının olmamasına dikkat edilmelidir. Pompa yürütücü fazı deposundan olarak ilk önce enjeksiyon sistemine gönderir. Enjeksiyon sistemi otomatik veya manuel olmak üzere iki farklı şekilde olabilmektedir. Manuel olan bir sistemde örnek enjeksiyonu işleminin kolaylıkla yapılabilmesi ve çözücü akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için analiz edilecek örnek çok uçlu bir valfe gönderilir. Bu valf yardımıyla örneğin bulunduğu hareketli fazın kolana doğru taşınması sağlanır. HPLC analitik kolonlar, 2-8 mm iç çapına sahip, mikropartiküllerden veya peliküllerden yapılmış dolgu kolonlardır. Bu kolonlar paslanmaz çelikten veya kartuş şeklinde olabilmektedir. Bu sistemde gerekli koşullar iyi ayarlandığında, kolonda birbirinden ayrılan kompleks karışım, hareketli faz yardımıyla ölçüm birimi olan dedektöre taşınır. Dedektörün, maddenin derişimi ile orantılı bir özeliğini ölçülebilmesi için uygun koşullar sağlanmalıdır. Dedektör yardımıyla analiz edilecek maddelerin derişimi belirlenir (Toğrul, T.,1995)

Bu ayırma metodunda bileşenleri birbirinden ayırmak için yararlanılan önemli faktörlerden birisi de hareketli fazdır. Farklı polaritedeki organik çözücüler ile numunenin birlikte kolondan yürütülmesiyle daha iyi bir ayırma sağlanabilir. Ayırmada kullanılan hareketli fazın akış hızı genelde 10-60

ml/saat hızındadır. Bu akış hızını meydana getirebilmek için hareketli faza uygulanan basınç 30-400 atm arasında değişmektedir. Uygulanan basınç hareketli fazın viskozitesine, kolonun geçirme özelliğine, kolon dolgu maddesinin tanecik boyutuna bağlı olarak değişir. Kolonun boyunun artmasıyla ve kolonun dolgu maddesinin tanecik boyutunun azalmasıyla hareketli fazın akış hızında azalma meydana gelir. Hareketli fazın akış hızının değişmemesi için basıncın artırılması gerekir. Hareketli fazın akış hızı, dedektör çıkışına yerleştirilen hacmi belirli kaba sıvının dolmasıyla geçen zaman ölçülerek bulunur (Erdik ve ark., 2000).

HPLC ile yapılacak ayırmalar değişik yöntemler uygulanarak yapılır. Ayırmada kullanılan yöntem yapılan çalışmanın türüne, analiz edilecek numunelerin özelliklerine bağlıdır (Lindsay, 1987)

Genelde HPLC ayırma yöntemleri dağılma tipinde çalışmaktadır. Dağılma kromatografisi sabit ve hareketli fazın birbirine göre polar oluşuna bağlı olarak iki kısma ayrılır. Normal faz (NP), sabit haldeki fazın hareketli olan fazdan daha polar olduğu durumdur. Bunun içinde polarlığı az olan bileşikler durgun fazdan ilk olarak çıkmaktadırlar. Durgun fazda ilerleyen analitin tutulması hareketli fazın polarlığının artmasıyla azalır. Ters fazda ise (RP) sabit haldeki faz daha az polariteye sahiptir. Bu durumda polaritesi yüksek olan analitler sabit fazı daha çabuk terk etmektedirler. Ayırmada hareketli fazın hidrofob özelliği arttıkça analitin kolonda tutunması azalır. Genellikle HPLC sistemlerinde ters faz (RP) kullanılmaktadır. Zıt faz uygulamalarında da en yaygın olarak C18 kolonlar kullanılır (Skoog ve ark 1998).

Analitler kolonda ilerleyerek farklı zamanlarda kolondan ayrılır. Bu ayrılan analitler bir spektrometrik sistem yardımıyla analiz edilir. Ayrılan analitler UV ve görünür bölge ışınını geçirebilen bir numune hücresinden geçirilir. Numune hücresinden belirlenen dalga boyundaki ışınlar geçiriliyorken analitlerin yaptıkları absorbanlar bir dedektör yardımıyla belirlenerek kaydedilir. Genellikle dedektör olarak diyot serili dedektör

(DAD) kullanılmaktadır. Çift ışınlı bir cihazda, ışık kaynağından çıkan ışın demeti bir ayırıcı yardımıyla ikiye ayrılır. Bu ışıklardan biri analit içermeyen referans hücresinden, diğer ışın ise analit içeren hücreden geçirilerek, analitlerin absorpsiyonları bu ikisini farkı olarak hesap edilir. Böylece HPLC kromatogramları elde edilir (Jaffé and Orchin, 1964).

HPLC, fenolik maddelerin ayrılmasında kullanılan önemli bir metottur. Ters fazlı (RP) kolon kullanımı fenolik bileşikler ayırmada daha fazla yaygındır. Gıdalardan elde edilen fenolik analitler genellikle UV görünür dalga boyunda UV-Vis dedektörü ve DAD (diyot serili dedektör) ile ölçülmektedir (Nacz and Shahidi, 2004)

HPLC de polifenolik maddelerin belirlenmesinde, kolondan geçerkenki alıkonma zamanı temel alınmaktadır ve bu alıkonma zamanları bileşiklerin kimyasal yapısına bağlıdır. Hidroksitlenmiş ve glukozitlenmiş fenolik analitlerin kolonda alıkonma zamanı kısa gerçekleşirken, metillenmiş fenolik analitlerin kolonda alıkonma zamanı ise uzundur (Dao and Takeoka, 2002).

HPLC tekniğinde bir standardın konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrileri ve her bir standart" ın kolondan ayrılıp gelme zamanları belirlenir. Çeşitli standartların kalibrasyonu için sıralanan dalga boyları kullanılır. Bitki ekstraktlarının fenolik bileşimlerinin pikleri elde edildikten sonra, kalibrasyon eğrileriyle karşılaştırılarak bu bileşimlerin konsantrasyonları hesaplanır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Substrat

Laktik asit ve fenolik asit üretiminde kullanılmak üzere üretim ortamı için Tuborg A.Ş'den temin edilen bira atık mayşesi değerlendirilmiştir. Çalışmada substrat olarak kullanılan bira atığı besi yeri arabinoz, ksiloz ve glukoz içeren ağırlıklı bir üretim ortamıdır.

3.1.2. Fermantasyon sırasında kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmamızda bira atığından laktik asit ve fenolik asit üretimi için gerekli biyodönüşümü gerçekleştirebilecek üzere *Lactobacillus pentosus* suşları kullanılmıştır. Kùltürler Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yrd. Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK'ten temin edilmiştir. *Lactobacillus pentosus* O157, *Lactobacillus pentosus* O18, *Lactobacillus pentosus* O19 olmak üzere 3 farklı suş kullanılmıştır.

3.1.3. Deneylerde kullanılan besiyerleri

3.1.3.1.MRS Agar (Merck)

- ❖ Kazein peptonu 10,0 g/L;
- ❖ Et ekstraktı 10,0 g/L;
- ❖ Maya ekstraktı 4,0 g/L;
- ❖ D(+) Glukoz 20,0 g/L;
- ❖ K₂HPO₄ 2,0 g/L;
- ❖ Tween 80 1,0 g/L;
- ❖ di-Amonyum hidrojen sitrat 2,0 g/L;
- ❖ Sodyum asetat 5,0 g/L;
- ❖ MgSO₄ 0,2 g/L;
- ❖ MnSO₄ 0,04 g/L;
- ❖ Agar-agar 14,0 g/L

68,2 g MRS 1 litre saf suya eklenir. 121° C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.3.2.Fermantasyon ortamı

Ön işlemlerden geçen bira atık mayşesi asit hidrolizi sonucunda sıvı ve katı kısım olarak iki faza ayrılmıştır. Sıvı kısmında kalan hemiselülozidik şekerler laktik asit ve fenolik asit üretimi için fermantasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

Denemelerde *Lactobacillus pentosus* suşlarının gelişmesini sağlamak amacıyla laktik asit ve fenolik asitlerin üretimi için gerekli azot ve karbon kaynağının sağlanması için kullanılan üretim ortamında farklı azot kaynakları, maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, üre, tripton; karbon kaynağı olarak bira atığından elde edilen ksiloz, arabinoz ve glukoz kullanılmıştır. Kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta seçilmiştir. Hazırlanan üretim ortamında kullanılan azot kaynaklarının miktarları Çizelge 3.1’ de verilmiştir. Miktar hesaplamaları 10 g/L maya ekstraktında bulunan azot miktarına eş değer olacak şekilde her bir azot kaynağı için yapılmıştır. Üretimde 2 paralel ile çalışılmıştır.

Çizelge 3.1 *Lactobacillus pentosus* hücrelerinin gelişmesinde kullanılan üretim ortamının kullanılan azot kaynakları ve miktarları

Azot Kaynağı	% Azot	Miktar
Maya ekstraktı	9.8	10 g/L
Mısır ıslatma suyu	6.44	15.2 g/L
Pepton	14	7 g/L
Üre	47	2.08 g/L
Tripton	12.7	7.71 g/L

Laktik asit ve fenolik asitlerin üretimi için kullanılan üretim ortamındaki karbon kaynakları ve miktarları Çizelge 3.2 ‘de verilmiştir.

Çizelde 3.2 *Lactobacillus pentosus* hücrelerinin gelişmesinde kullanılan üretim ortamının kullanılan karbon kaynakları ve miktarları

Karbon Kaynağı	Miktar	Konsantre
Glukoz	3.48 g/L	3.9
Arabinoz	8.98 g/L	10.26
Ksiloz	17.5 g/L	20

Üretim ortamının şeker içeriğini istenilen düzeye getirmek için 20 °C’ deki sıcak su banyosunda konsantre edilmiştir. Son durumdaki Ksiloz içeriği 20 g/L, Arabinoz içeriği 10.26 g/L, Glukoz içeriği 3.9 g/L olduğu belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamının pH sı denemeye göre 6.0’ya NaOH (Sigma-Aldrich) ile ayarlanmıştır. Ortam pH’sını tamponlamak amacıyla CaCO₃ kullanılmıştır. Sterilizasyon, 121° C’de 15 dakika süreyle yapılmıştır.

3.1.4. Deneylerde kullanılan çözeltiler ve içerikleri

3.1.4.1. NaOH çözeltisi (10N)

Denemelerde fermantasyon ortamının pH’ını ayarlamak için 10N NaOH çözeltisi kullanılmıştır. 10N NaOH çözeltisi, 16g NaOH (Sigma-Aldrich) tartılarak 100 ml saf su içinde çözülürülerek hazırlanmıştır.

3.1.4.2 H₂SO₄ çözeltisi (% 1.25'lik)

Denemelerde kullanılan atık bira mayşesindeki hemiselülozidik şekerleri hidrolize etmek için % 1.25'lik H₂SO₄ (g/L) çözeltisi kullanılmıştır. Seyreltik asit çözeltisi kullanılan örnek miktarına göre hacme karşılık ağırlık olarak hesaplanmıştır.

3.1.4.3 HPLC mobil faz olarak kullanılan çözeltiler

Fermantasyon öncesindeki ön işlem görmüş atık bira mayşesinin şeker içeriğini belirlemek ve fermantasyon ortamında oluşan laktik asit ve fenolik asitlerin miktarını belirlemek amacıyla HPLC metodu kullanılmıştır. Şeker içeriğinin belirlenmesi için asetonitril-su (75:25) çözeltisi kullanılmıştır.

Fenolik asitler ve laktik asit analizleri için iki farklı mobil faz kullanılmıştır. Bunlardan birincisi solvent A, % 0.1'lik fosforik asit çözeltisi; ikincisi solvent B asetonitrildir. Mobil fazlar mavi bant filtreden (Macherey nagel) süzildükten sonra ultrasonik banyoda 15 dakika çözünmüş gazlarından uzaklaştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.1.5. Verim Hesapları

Efektif verim fermantasyon sonucunda oluşan laktik asitin, ortamda başlangıçta bulunan şeker oranına yüzdesel olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Efektif verim, \%} = \frac{P}{S_0}$$

P : Fermantasyon sonunda oluşan laktik asit, g/L

So: Başlangıçtaki karbonhidrat, g/L

Dönüşüm verimi, oluşan laktik asitin fermantasyonda harcanan şeker miktarına yüzdesel oranı olarak tanımlanmıştır. Bu değer fermantasyonda bakteriler tarafından kullanılan substratın ne kadarının laktik asit üretimi için

kullanıldığını göstermektedir. Substrat, ürünün yanı sıra biyomas oluşumu için de harcandığı için, harcanan substrat başına oluşan ürünün hesaplandığı bu terim önem kazanmaktadır.

$$\text{Dönüşüm verimi, \%} = \frac{P}{S_0 - S}$$

P : Fermantasyon sonunda oluşan laktik asit, g/L

So: Başlangıçtaki karbonhidrat, g/L

S : Fermentasyon sonunda kullanılmadan kalan şeker, g/L

Hacimsel verimlilik, birim zamanda oluşan laktik asit miktarı olarak tanımlanmıştır ve laktik asit oluşum hızını göstermektedir.

$$\text{Verimlilik (g/L/h)} = \frac{P_t}{t}$$

Pt : Belirli bir t saatinde ortamda bulunan laktik asit konsantrasyonu

t : süre(saat)

3.2.Yöntem

3.2.1. Deneyde Kullanılan Mikroorganizmaların Geliştirilmesi

Lactobacillus pentosus suşlarının geliştirilmesi amacı ile MRS Agar (Merck) besi yerlerine ekimleri yapılmıştır. Mikroorganizmalar stok kültürlerinden alınarak MRS içeren eğik besi yerlerine öze ile ekim yapılmıştır. Mikroorganizmaların gelişmesi amacıyla kültür şişeleri 37° C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

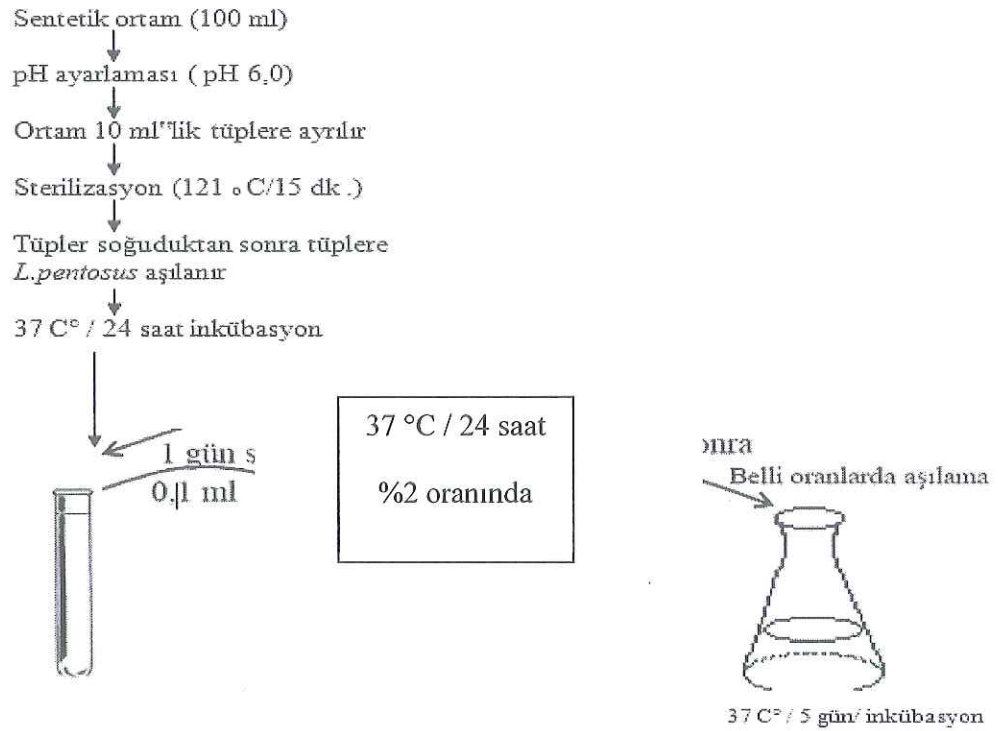
3.2.2. Deneyde Kullanılan Mikroorganizmaların Muhafazası

Stok kültürlerden alınarak MRS üzerinde geliştirilen *Lactobacillus pentosus* suşları daha sonra kullanılmak amacıyla stoklanmıştır.

Gelişen *Lactobacillus pentosus* suşları kültür şişelerin ağızları sıkı biçimde kapatılarak buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ saklanmıştır. 3 ayda bir mikroorganizmalar yeni MRS Agar üzerine aktararak stoklama işlemi devam ettirilmiştir.

3.2.3. Fermantasyon İçin Aşı Kültürü Hazırlanması

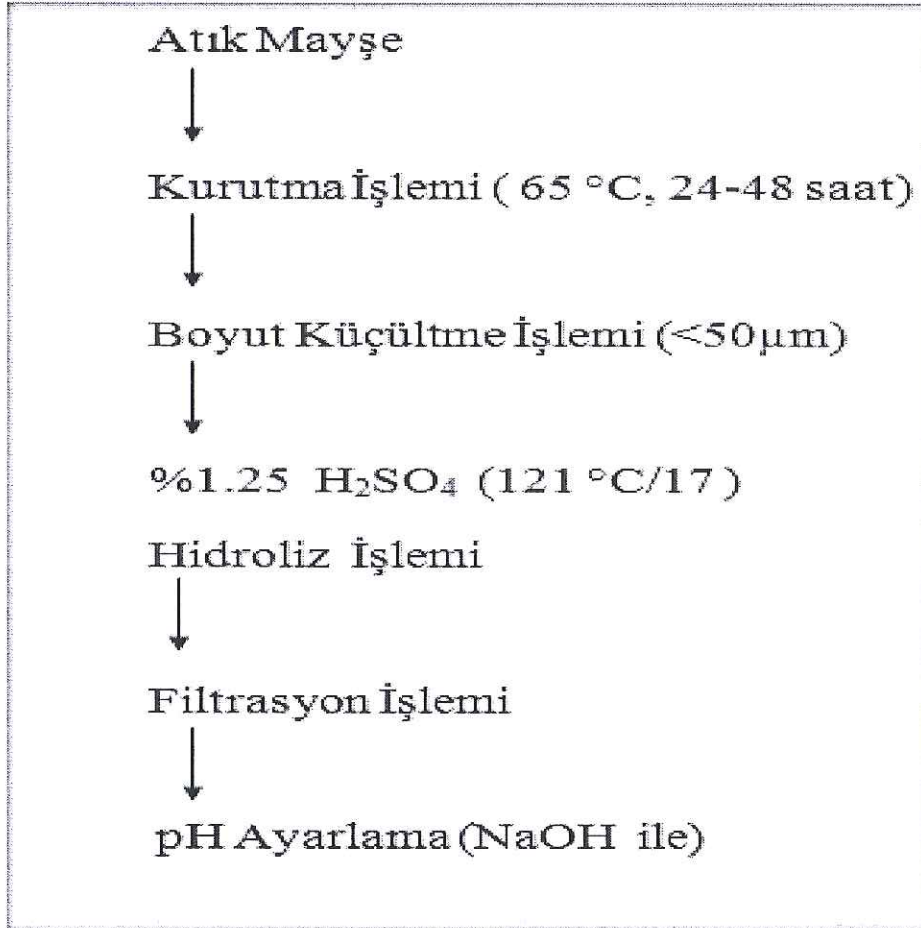
Çalışmada kullanılacak *Lactobacillus pentosus* suşları üretime başlanmadan 3 gün önce mikroorganizmayı canlandırmak ve aşılama koloni sayısını sabit tutabilmek için 10 ml'lik tüplere hazırlanmış sentetik ortama inoküle edilmiştir. Sentetik ortamda 37°C de 24 saat inkübe edildikten sonra %2 oranında fermantasyon ortamına aşılama yapılmıştır. Şekil 3.1' de fermantasyon için aşı kültürü hazırlanması şematik olarak gösterilmiştir.

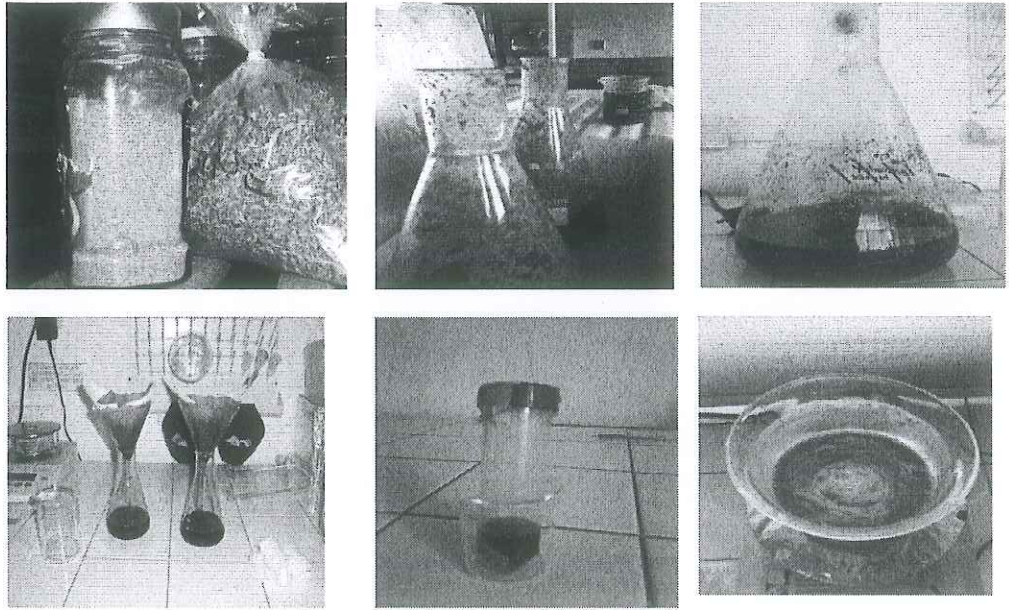


Şekil 3.1. Fermantasyon için aşı kültürü hazırlanması

3.2.4. Substrat olarak kullanılan bira atığı mayşesinin hazırlanması

Tuborg A.Ş' den alınan bira atık mayşesi fermantasyon prosesi için bazı ön işlemlerden geçirilmiştir. Şekil 3.2'de uygulanan ön işlemler verilmiştir.

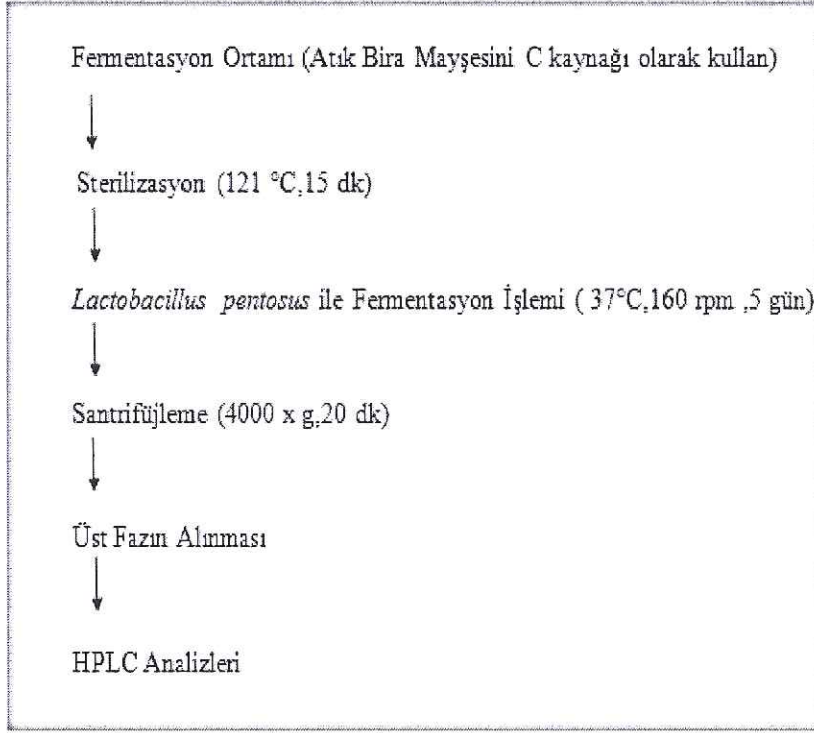




Şekil 3.2. Atık bira mayşesine uygulanan ön işlemler

3.2.5. Fermantasyon

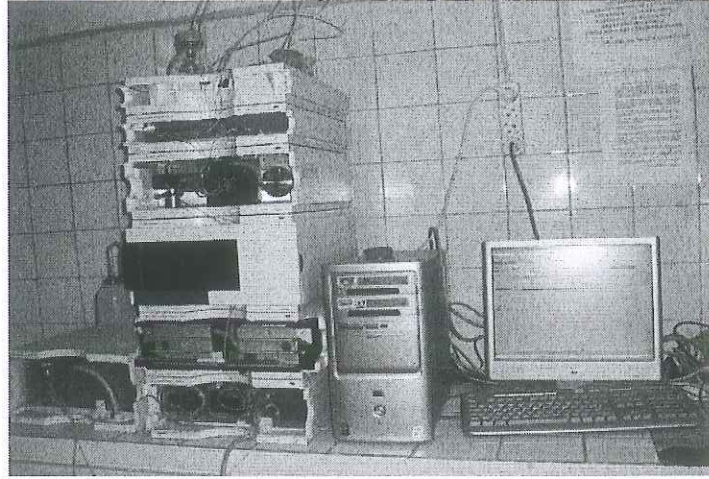
Erlenlerde yapılacak üretim için ön işleminden geçirilen atık bira mayşesi ilave edilecek azot kaynaklarıyla birlikte otoklav ile sterilizasyonu (121°C , 15 dk) yapılmıştır. Fermantasyon çalkalamalı (160 rpm) olarak 5 gün, 37°C 'de gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon işlemi boyunca her 12 saatte bir 3ml örnekler alınmış ve örnekler ışık geçirmeyen cam kültür şişelerinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmıştır. Şekil 3.3 'de laktik asit ve fenolik asitlerin üretiminde kullanılan çalkalamalı inkübatör gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Laktik asit ve fenolik asitlerin üretiminde kullanılan çalkalamalı inkübator

12 saat aralıklarla 5 gün boyunca üretim ortamından alınan örnekler HPLC cihazında analiz edilebilecek saflığa ulaşması için 0,45 mikrometrelik membran filtreden (Sartorius şırınga ucu filtre PTFE) geçirilerek steril tüplere aktarılmıştır.

Fenolik asit miktarı ve laktik asit miktarı bu analizler sonucunda bulunmuştur. Şekil 3.4' de Laktik asit ve fenolik asitlerin üretimi için kullanılan HPLC cihazı gösterilmektedir.



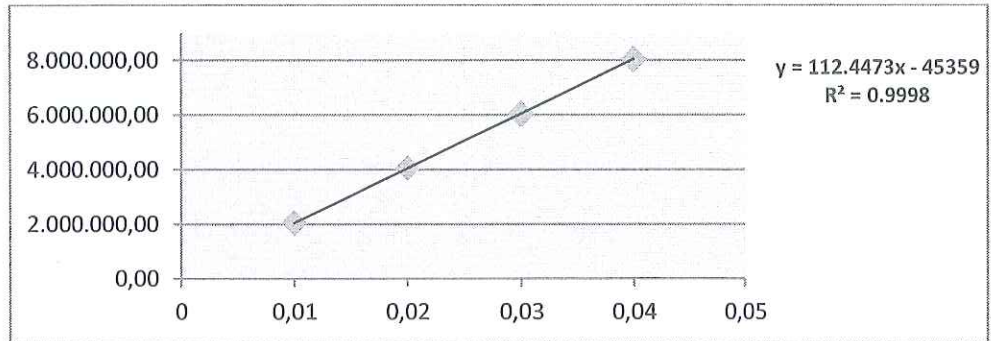
Şekil 3.4 Laktik Asit Ve Fenolik Asitlerin Analizlerinde Kullanılan (Agilant 1200) HPLC

3.3. Analiz Yöntemleri

3.3.1. Fermantasyon öncesindeki atık bira mayşesinin şeker içeriğinin HPLC ile belirlenmesi

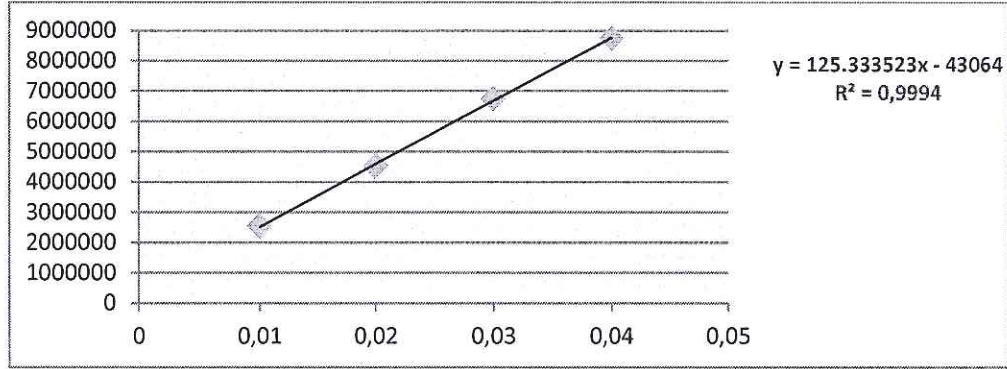
Ön işlem uygulanan bira atık mayşesinin şeker içeriği HPLC ile belirlenmiştir. Glukoz, arabinoz ve ksiloz standart çözeltileri 2000 pm konsantrasyonunda hazırlanmış ve 5, 10, 15, 20 mg/L enjeksiyon miktarı kullanılarak standart eğriler çizilmiştir. Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7 'de analizlenen şekerlere ait standart eğriler verilmiştir.

Glukoz için kalibrasyon grafiği;



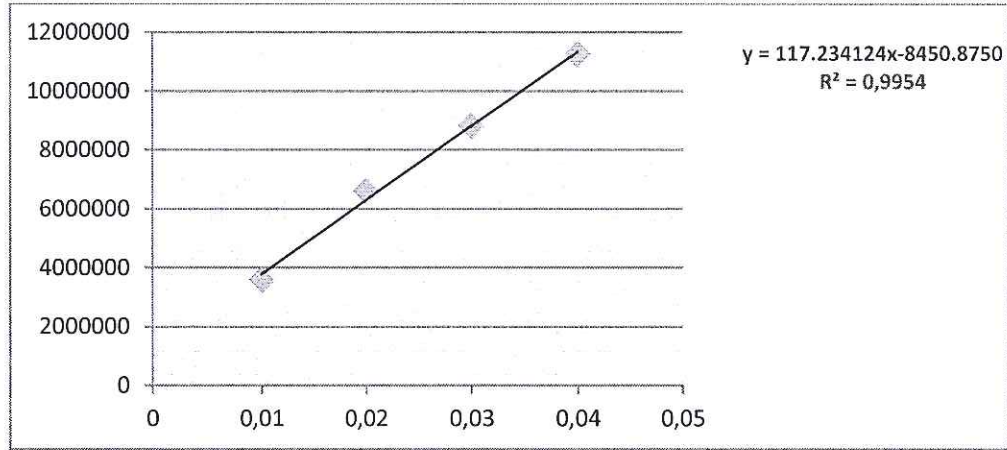
Şekil 3.5 Glukozun standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

Arabinoz için kalibrasyon grafiği;



Şekil 3.6 Arabinozun standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

Ksiloz için kalibrasyon grafiği;



Şekil 3.7 Ksilozun standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

HPLC şeker analizlerinde Agilant 1200 marka HPLC cihazı kullanılmış olup analiz koşulları Çizelde 3.3'de gösterilmiştir.

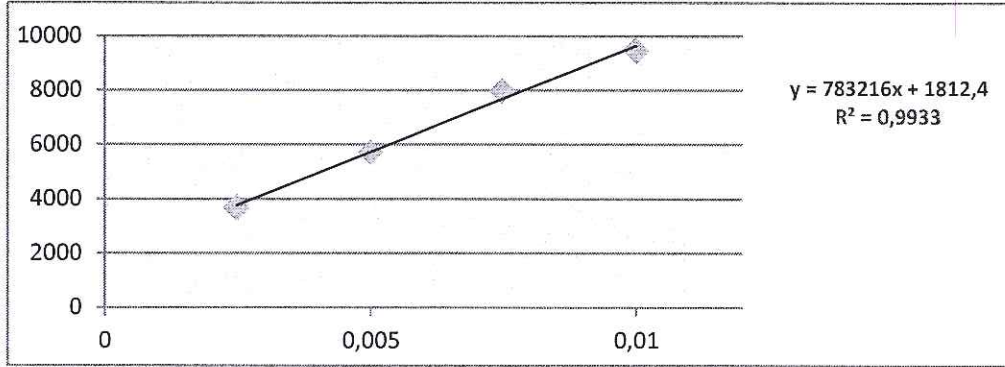
Çizelde 3.3 Şeker miktarı analizi için HPLC koşulları

<u>Özellik</u>	<u>Değerler</u>
Kolon	Aminex HPX-87H katyon değişim kolonu
Kolon uzunluğu	300 mm
Kolon çapı	7.8 mm
Partikül büyüklüğü	9 µm
Kolon temizleme çözücüler	5% CH ₃ CN in 5mM H ₂ SO ₄ , 30% CH ₃ CN in 5mM H ₂ SO ₄
Hareketli faz	Asetonitril-Su (75:25)
Akış hızı	0.6 ml min ⁻¹
Sıcaklık	45°C
Dedektör	Refraktif index

3.3.2. Fermantasyon boyunca oluşan fenolik asit miktarının HPLC ile belirlenmesi

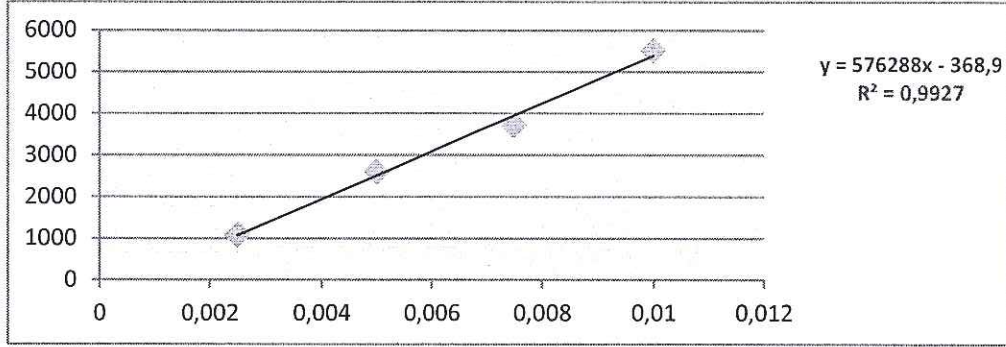
Örneklerdeki kafeik asit, vanilik asit, gallik asit, kumarik asit, ferulik asit, sinamik asit ve sinapik asit miktarlarının tayini için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Fenolik asit standartları 500 pm konsantrasyonunda hazırlanmış ve farklı enjeksiyon oranları kullanılarak standart eğriler çizilmiştir (Şekil 3.8 – Şekil 3.14).

Siringik asit için kalibrasyon grafiği;



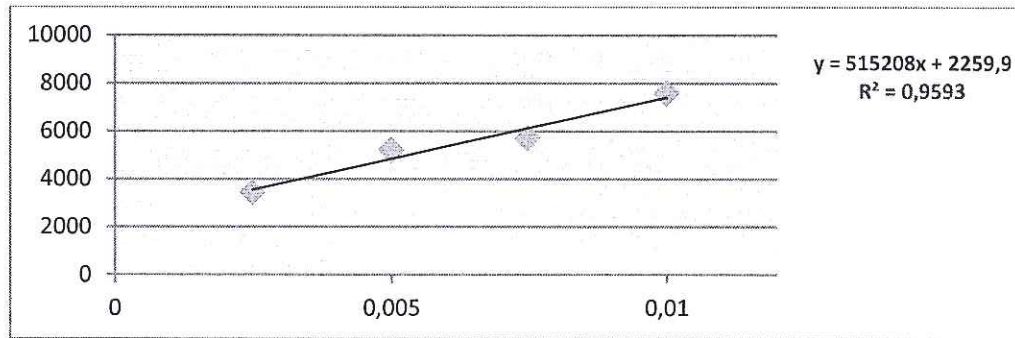
Şekil 3.8 Şiringik asitin standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

Sinapik asit için kalibrasyon grafiği;

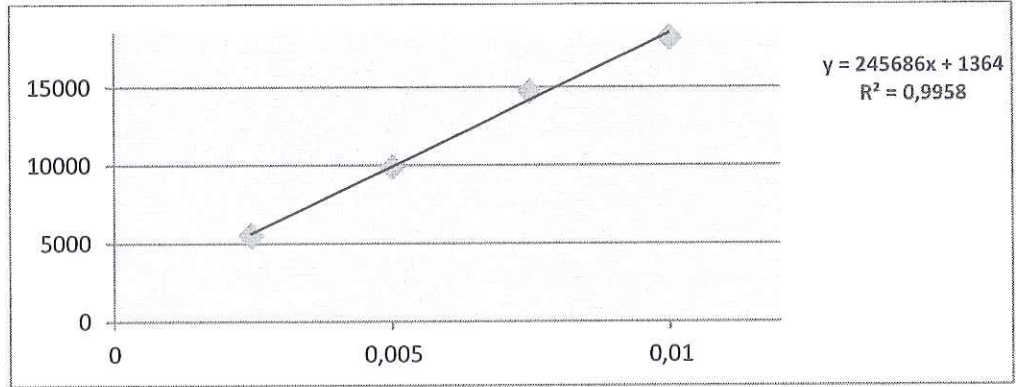


Şekil 3.9 Sinapik asitin standart Eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

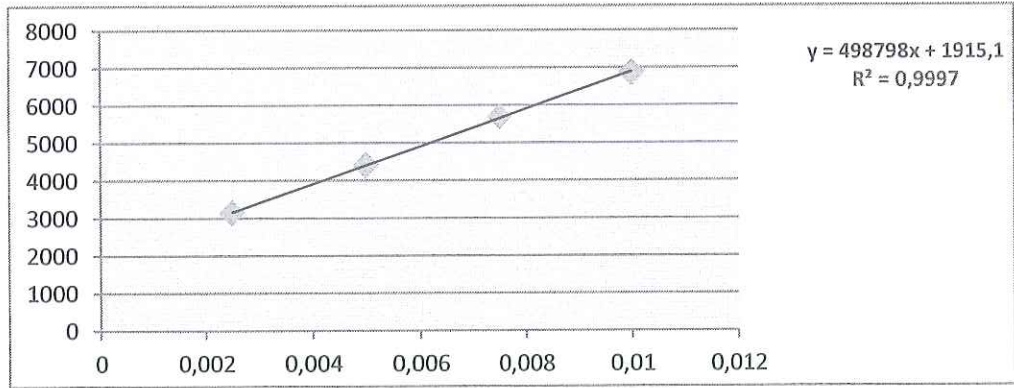
Hidroksibenzoik asit için kalibrasyon grafiği;



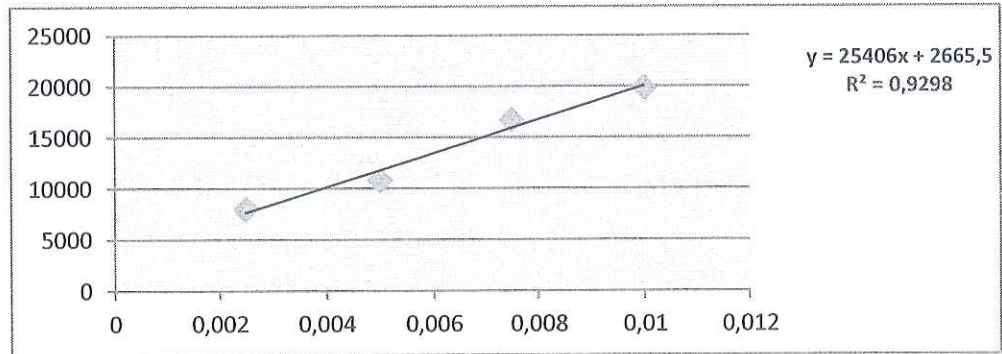
Şekil 3.10 Hidroksibenzoik asitin standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

Gallik asit için kalibrasyon grafiği;

Şekil 3.11 Gallik asitin standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

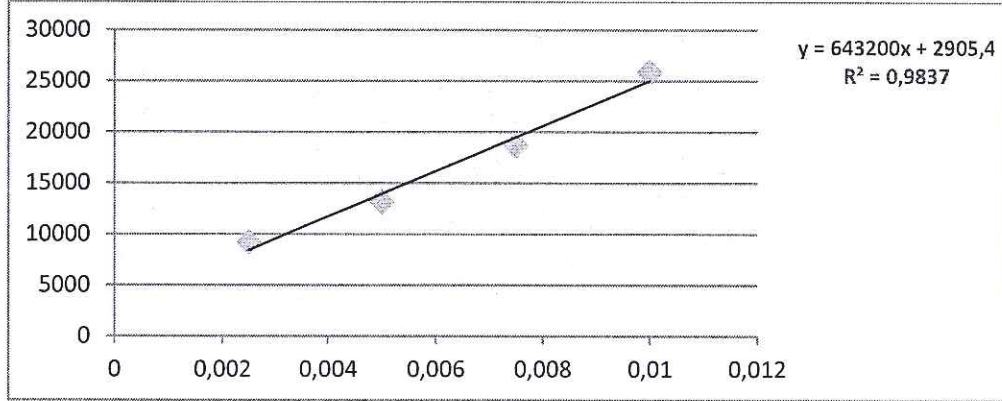
Ferulik asit için kalibrasyon grafiği;

Şekil 3.12 Ferulik asitin standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

Vanilik asit için kalibrasyon grafiği;

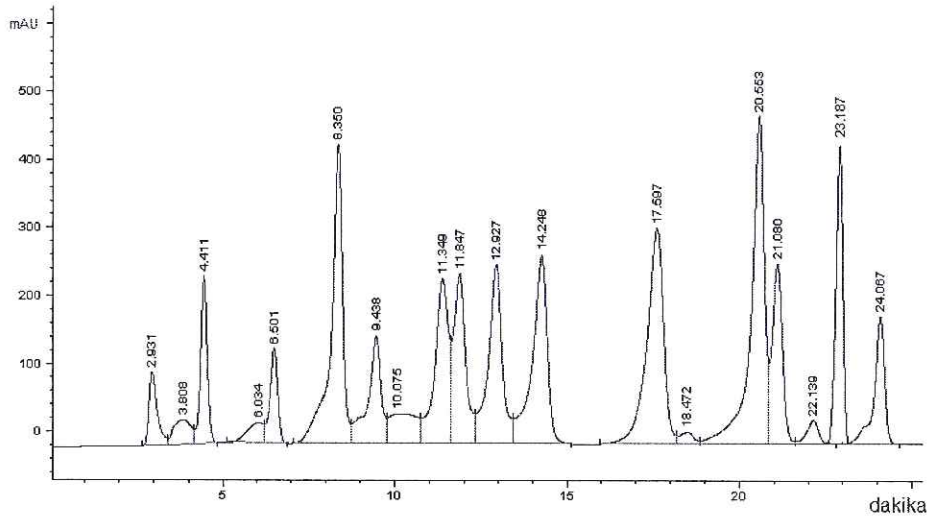
Şekil 3.13 Vanilik asitin standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

p-Kumarik asit için kalibrasyon grafiği;



Şekil 3.14 Kumarik asitin standart eğrisi (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

HPLC analizi sonucunda fenolik asitlerin alıkonma sürelerini gösteren örnek bir kromatogram Şekil 3.15 'de gösterilmektedir.



Şekil 3.15 Fenolik asitlerin alıkonma sürelerini gösteren örnek bir kromatogram

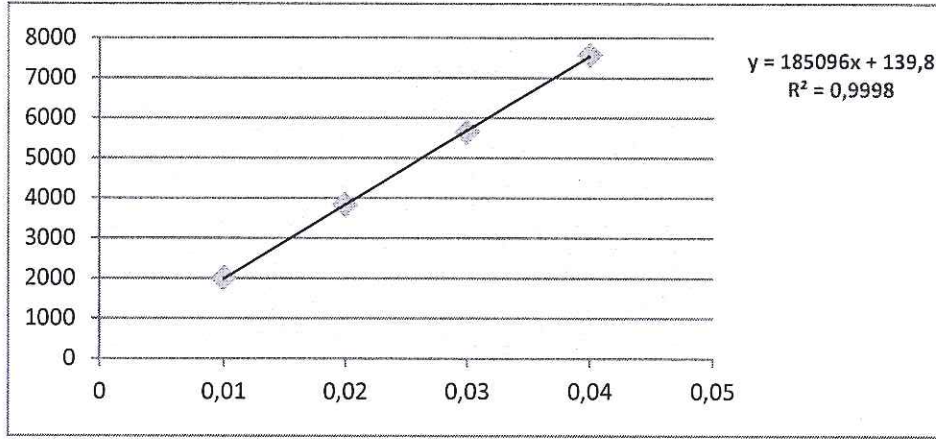
Fermentasyon ortamından alınan örnekler ise 0,45 µm'ik membran filtreden (Sartorius şırınga ucu filtre PTFE) geçirildikten sonra analiz edilmiştir. Mobil fazlar ise mavi bant filtreden geçirildikten sonra 15 dakika ultrasonik su banyosunda degaze edilmiştir. HPLC analizlerinde Agilent 1200 marka HPLC cihazı kullanılmış olup analiz koşulları Çizelde 3.4 'de gösterilmiştir. 0- 30dk B fazından 30-40 dk A fazından olmak üzere mobil faz akış programı kullanılmıştır.

Çizelde 3.4 Fenolik asit miktarı analizi için HPLC koşulları

<u>Özellik</u>	<u>Değerler</u>
Kolon	C18 kolon
Kolon uzunluğu	250 mm
Kolon çapı	4.6 mm
Partikül büyüklüğü	5 µm
Kolon temizleme çözücüleri	5% CH ₃ CN in 5mM H ₂ SO ₄ , 30% CH ₃ CN in 5mM H ₂ SO ₄
Hareketli faz	A fazı :%0,1'lik fosforik asit B fazı : Asetonitril
Akış hızı	0,8 ml/dakika
Sıcaklık	35 °C
Dedektör	HPLC-DAD
Enjeksiyon hacmi	20 µL

3.3.3. Fermantasyon boyunca oluşan laktik asit miktarının HPLC ile belirlenmesi

Örneklerdeki laktik asit miktarı tayini için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Laktik asit standardı 1000 ppm konsantrasyonunda hazırlanmış ve 5, 10, 15, 20 mg/L enjeksiyon oranları kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Farklı enjeksiyon oranları kullanılarak standart eğri çizilmiştir (Şekil 3.16). tüm analizlerde 3 paralel olarak çalışılmıştır.



Şekil 3.16 Laktik asit kalibrasyon doğrusu (x=HPLC de belirlenen alan, y= ppm cinsinden miktar)

Fermantasyon ortamından laktik asit analizi için alınan örnekler ise 0,45µm" lik membran filtreden (Sartorius şırınga ucu filtre PTFE) geçirildikten sonra analiz edilmiştir. Mobil fazlar ise mavi bant filtreden geçirildikten sonra 15 dakika ultrasonik su banyosunda degaz edilmiştir. HPLC analizlerinde Agilent 1200 marka HPLC cihazı kullanılmış olup analiz koşulları Çizelde 3.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Laktik asit miktar analizi için HPLC koşulları

Özellik	Değerler
Kolon	C18 kolon
Kolon uzunluğu	250 mm
Kolon çapı	4.6 mm
Partikül büyüklüğü	5 µm
Kolon temizleme çözücüler	5% CH ₃ CN in 5mM H ₂ SO ₄ , 30% CH ₃ CN in 5mM H ₂ SO ₄
Hareketli faz	0,01M H ₂ SO ₄
Akış hızı	0.7 ml/dakika
Sıcaklık	Oda Sıcaklığı
Dedektör	HPLC-DAD
Enjeksiyon hacmi	10 µL

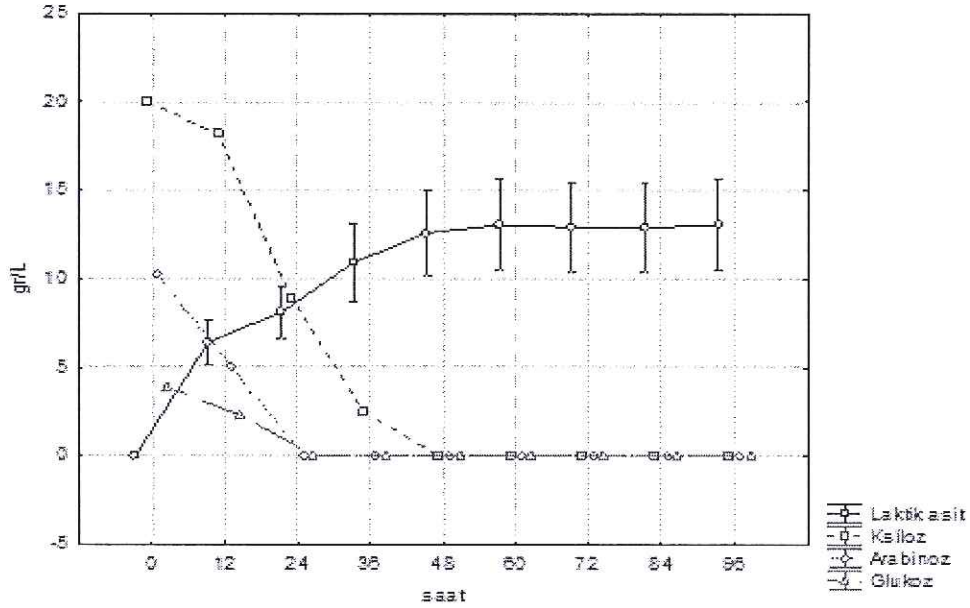
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Lactobacillus pentosus ile laktik asit ve fenolik asitlerin üretiminde bira atık mayşesi kullanmamız mikroorganizmanın fermente edebileceği hemiselülozidik madde içeriği yüksek olmasından dolayıdır. *Lactobacillus pentosus* mikroorganizmasından yararlanılarak gerçekleştirilen fenolik asit ve laktik asit üretiminde uygun mikroorganizma suşu, uygun azot kaynağı belirlenmiştir. Materyal kısmında özellikleri belirtilen, mikroorganizmanın gelişim gösterdiği kültür ortamında 37 °C sıcaklıkta ve 24 saat sürede kültürler geliştirildikten sonra ön işleminden geçirilmiş hemiselülozca zengin, farklı azot kaynakları içeren fermentasyon ortamında laktik asit ve fenolik asit üretimi sağlanmıştır. Laktik asit ve fenolik asitler için en uygun suşun, en uygun azot kaynağının belirlenmesi ve üretim miktarlarının hesaplanması gerçekleştirilmiştir. Üretim koşulları ve üretim sonucundaki hesaplamalar analizler kısmında belirtilmiştir.

4.1. Laktik asit üretimine ait analiz sonuçları

Laktik asit bakterileri bira mayşesi gibi gıda atıklarındaki hemiselülozik şekerleri gıda katkı maddesi olan bazı bileşenlere dönüştürebilmektedir. Bu dönüşümden önce selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi karmaşık polimerik bileşenlerinin hidrolize edilerek yıkılması gerekmektedir (Bustos et al.,2004). Bira atık mayşesi selüloz, hemiselüloz, lignin ve yüksek protein içeriğinden dolayı besinsel değeri yüksek bir maddedir. Atık bira mayşesinde en fazla bulunan monosakkaritler ise ksiloz, arabinoz ve glukozdur (Mussatto, 2009). Şekil 4.1 te bira atık mayşesinden (BMA) laktik asit fermentasyonuna ait kinetik profil gösterilmiştir.

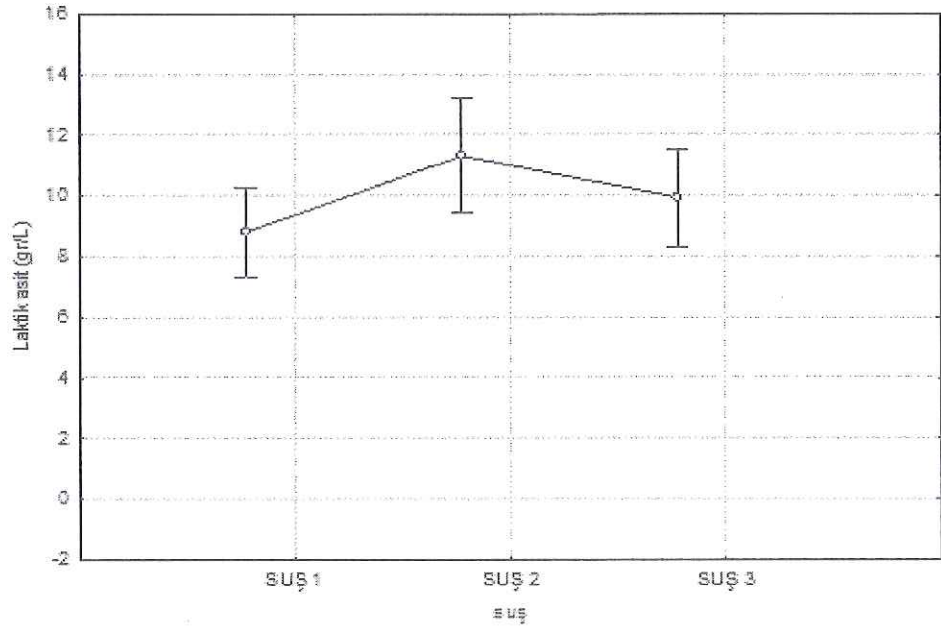
Şekil 4.1’de bira atık mayşesinden (BMA) laktik asit fermentasyonuna (g/L) ilişkin % 95’lik güven aralığında laktik asit, ksiloz, arabinoz ve glukozun istatistiksel değerlendirme sonucu ortalama değerleri verilmiştir.



Şekil 4.1. Laktik Asit Fermantasyonuna Ait Kinetik Profil (*Lactobacillus pentosus* O 157, *Lactobacillus pentosus* O 18, *Lactobacillus pentosus* O 19; maya ekstraktı, tripton, pepton, üre, mısır ıslatma suyu; 96 saat)

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi ortalama değerlerin en yükseğine 48. saatte ulaşılmıştır. Süreç içerisinde arabinoz, ksiloz, glukoz değerlerinde düşüşüne karşı laktik asit miktarında artış olduğu saptanmıştır.

Farklı *Lactobacillus pentosus* suşları da bu deneme dahilinde denenmiş ve maksimum laktik asit üretimi yapan suş araştırılmıştır. Bunun için *Lactobacillus pentosus* O 157, *Lactobacillus pentosus* O 18, *Lactobacillus pentosus* O 19 kodlu suşlar denenmiş ve en yüksek laktik asit verimi *Lactobacillus pentosus* O 18 kod numaralı suştan elde edilmiştir. Şekil 4.2 de elde edilen sonuçlar grafik şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Laktik Asit Miktarı Grafikselleştirilmesi. (Suş 1 : *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2 : *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3 : *Lactobacillus pentosus* O 19)

Grafikte de görüldüğü gibi laktik asit üretimi için en iyi Suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) daha sonra Suş 3 (*Lactobacillus pentosus* O 19) ve en az laktik asit üretimi gerçekleştiren Suş 1 (*Lactobacillus pentosus* O 157) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Çizelge 4.1'de üç farklı suşlara ait laktik asit üretimine ait verim değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1 Farklı *Lactobacillus pentosus* suşları ile bira mayşe atığından laktik asit üretiminde elde edilen en yüksek verim değerleri (maya ekstraktı)

Organizma	Laktik asit (g/L)	Şeker (g/L)	Kalan Şeker (g/L)	Efektif verim, %	Dönüşüm verimi, %	Verimlilik (g/L/h)
<i>Lactobacillus pentosus</i> O157	13.6	34.16	7.62	39,81	51,24	0,82
<i>Lactobacillus pentosus</i> O 18	22.4	34.16	5.21	65,57	77,35	1,36
<i>Lactobacillus pentosus</i> O 19	15.5	34.16	7.21	45,37	57,51	0,94

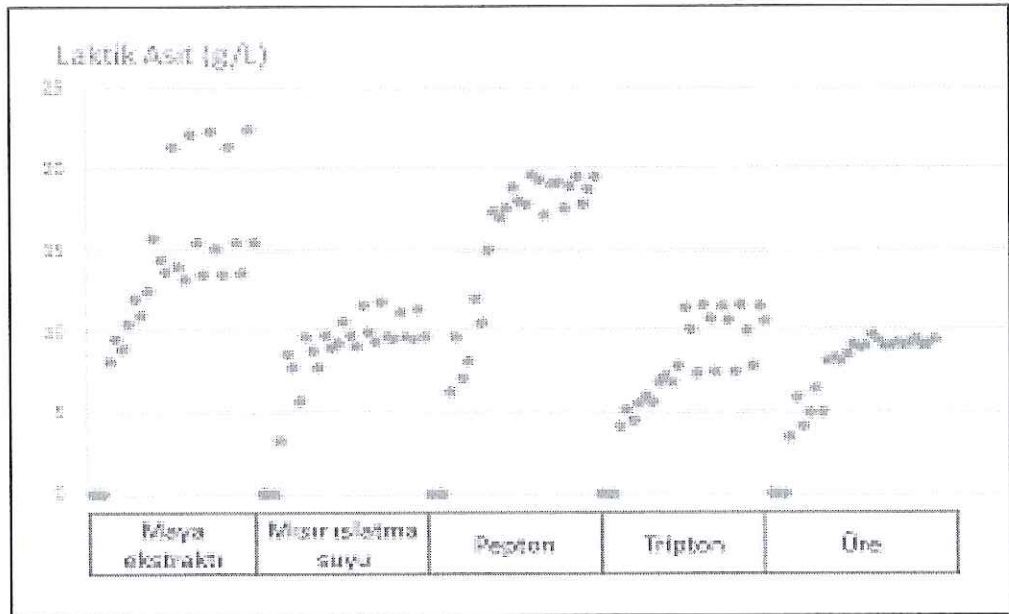
Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi en iyi sonuç Suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir. Bu laktik asit bakterisi ile % 65,57 efektif veim ve % 77,35 dönüşüm verimi elde dilmiş ve fermantasyon sonunda 22,4 g/L laktik asit elde edilmiştir. Denenen diğer suşlarda düşük verimlilikte ve düşük miktarda laktik asit üretimi gözlenmiştir.

Lactobacillus pentosus O 18 mikroorganizmasına ait laktik asit üretiminde süreye karşı karbonhidratların tüketimine ait veriler Şekil 4.3'te verilmiştir.

Saat	Ksiloz(g/L)	Arabinoz	Glukoz
0.	20	10,26	3,9
12.	18,2	5,14	2,3
24.	8,9	2.4	1.2
36.	2,5	2.4	1.2
48.	1.6	2.4	1.2
60.	1.6	2.4	1.2
72.	1.6	2.4	1.2

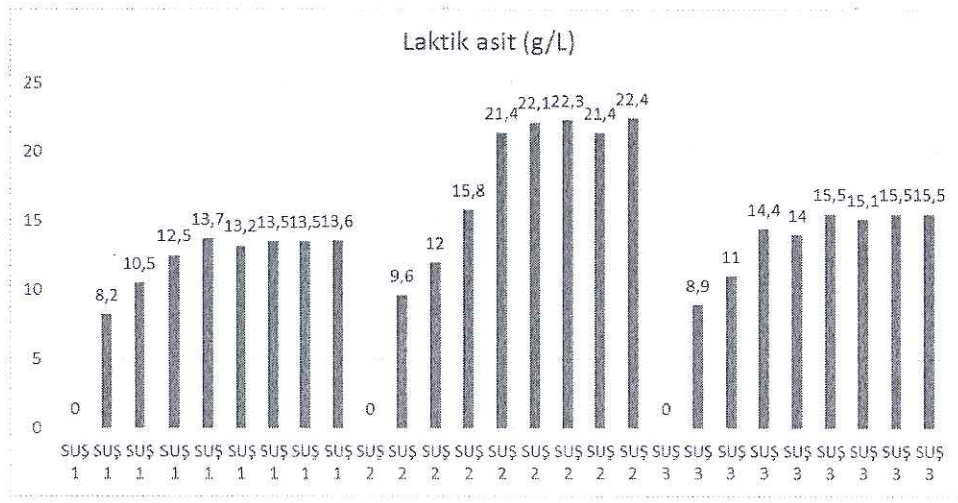
Şekil 4.3 Laktik asit üretiminde karbonhidratların tüketimine ait değerler

Çalışmada farklı azot kaynakları olarak; maya ekstaktı (ME), mısır ıslatma suyu (MIS), pepton, tripton ve üre ile çalışılmış ve bu azot kaynaklarının laktik asit üretimine etkisi incelenmiştir. Laktik asit üretiminin farklı azot kaynaklarına göre dağılımı Şekil 4.4' te verilmiştir. Dağılıma bakıldığında en yüksek noktadaki kümeler maya ekstaktı ile elde edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.4. Farklı azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde laktik asit konsantrasyonlarının dağılımı (Suş 1 : *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2 : *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3 : *Lactobacillus pentosus* O 19, 96 saat)

Maya ekstraktı ile verimin en yüksek olması bağlantısı ile sadece maya ekstraktı ile yapılan üretimler Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde farklı suşların laktik asit konsantrasyon etkileri (Suş 1: *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3: *Lactobacillus pentosus* O 19)

Şekil 4.5 'te görüldüğü gibi en yüksek değer *Lactobacillus pentosus* O 18 (22,4 g/L) ve 48. saatte elde edildiği görülmektedir.

Laktik asit üretiminde maya ekstraktı ve farklı suşların değerlendirilmesine parametreler arasındaki ilişkinin belirlenmesinde LSD testi kullanılmıştır. Sonuçlar istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Üretim sonrası uygulanması gereken ayırma ve saflaştırma işlemleri göz önüne alındığında laktik asit üretiminde daha iyi sonuç elde edilen maya ekstraktının azot kaynağı olarak kullanımının daha uygun olduğunu düşünülmüştür.

Musatto ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada %50 glukoz içeren ve ilave besin maddesi içermeyen bira atığı ortamında *L.debruecki* ile 5.4 g/L laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu üretimde glukoz tüketimi % 73 verimliliktedir. Farklı miktarlarda inokülümün kıyaslandığı bu çalışmada en iyi sonuç litrede 1 g kuru hücre içerenden elde edilmiş olup pH azalmasının

glukoz tüketimi ve laktik asite dönüştürme kapasitesini etkilediği bulunmuştur.

Arvid ve ark. (2002) lignoselülozidik materyal olan buğday kabuğundan elde edilen hemiselülozidik hidrolizattan *L.brevis* ve *L.pentosus* ile laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu hidrolizattan asit ve ya enzimatik hidrolizden 11-12 g/L fermente edilebilir şeker bulunmuştur. *L.brevis* tek başına %51 *L.pentosus* % 61 verimlilikle üretim gerçekleştirmiştir. Ancak her iki mikroorganizma da birlikte kullanıldığı ortamda verim % 95' e kadar yükselmiştir.

Bustos ve ark. (2005) *L.pentosus* ile şarap üretiminden arda kalan yongadan elde edilen hemiselülozidik hidrolizattan laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu hidrolizat 12 g/L glukoz, 17.5 g/L ksiloz ve 4.3 g/L arabinoz içerdiği belirlenmiştir. Bu üretimde en önemli yan ürün olarak asetik asit de bulunmuştur. Asetik asit üretimin glukoz tüketiminden daha sonra meydana gelmesinden yola çıkarak asetik asitin ksiloz ve arabinoz tüketimine bağlı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. *L.pentosus* glukoz yokluğunda homofermentatif yoldan heterofermentatif yola kaydığında yola çıkarak fakültatif heterofermentatif bir mikroorganizma olduğu belirtilmiştir. *L.pentosus* heksos varlığında Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yol izini, pentozların varlığında fosfoketolaz yol izini kullanmaktadır. Şeker içeriği daha önce belirlenen hidrolizatlar vakumlu evaporatörde 35.4 g/L glukoz, 52.3 ksiloz ve 13 g/L arabinoz' a yükseltilmiştir. Bu koşullar altında 46.6 g/L laktik asit üretimi gerçekleşmiştir.

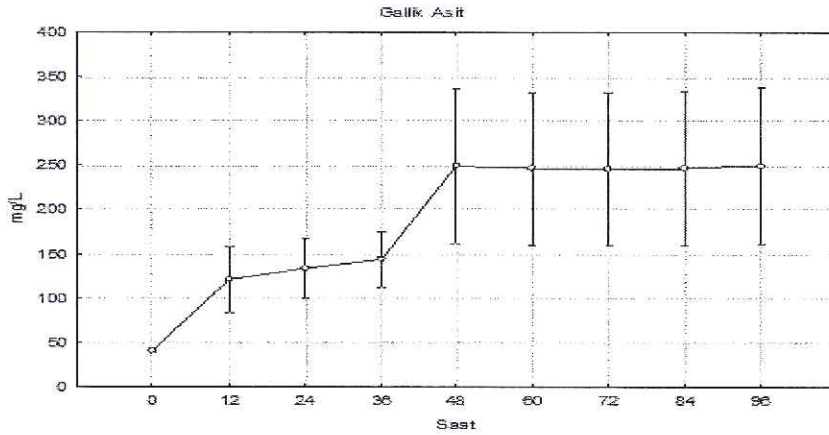
Musatto ve ark. (2005) bira mayşe atığının hemiselülozidik fraksiyonlarını elde etmek amacıyla farklı durumlarda seyreltik asit hidroliz çalışmaları yapmışlardır. Bu koşullar sıvı/katı oranı (8-12 g/g), sülfürik asit konsantrasyonu (100-140 mg/g) kuru madde ve (17-37dk) reaksiyon süresi olup en çok ksiloz içeren ve iyi fermente olabilir koşulları belirlemek amacıyla denemeler yapılmıştır. Denemeler sonunda sıvı/katı oranı 8 g/g, 100mg/g sülfürik asit ile hidroliz ve 17 dk reaksiyon süresi en iyi koşullar

olarak belirtilmiştir. Bu koşullar altında hemiselülozik şekerlerin ekstraksiyon verimi (% 92.7) olduğu bulunmuştur.

Moldes ve ark. (2006) seyreltik sülfürik asit ile farklı lignoselülozik madde bakımından zengin olan zirai atıklardan hemiselülozik şekerlerin elde edilmesi ve *L.pentosus* ile laktik asit üretimi gerçekleştirmişlerdir. Üzüm cibresi, mısır koçanı ve arpa kabuğunun asit ile hidrolizinde ligninden gelen toksik maddelerin de araştırıldığı çalışmada en iyi koşullarda laktik asit üretimi arpa kabuğundan elde edilmiştir. (33 g/L). Pentozların en yüksek verimle üzüm cibresinden asit hidrolizi ile elde edildiği belirtilmiştir. (0.76 g/g). Sonuç olarak *L.pentosus*'un hemiselülozik şekerleri (özellikle glukoz, arabinoz ve ksiloz) substrat inhibisyonuna maruz kalmayarak fermente edebildiği belirtilmiştir.

4.2. Gallik asit üretimine ait analiz sonuçları

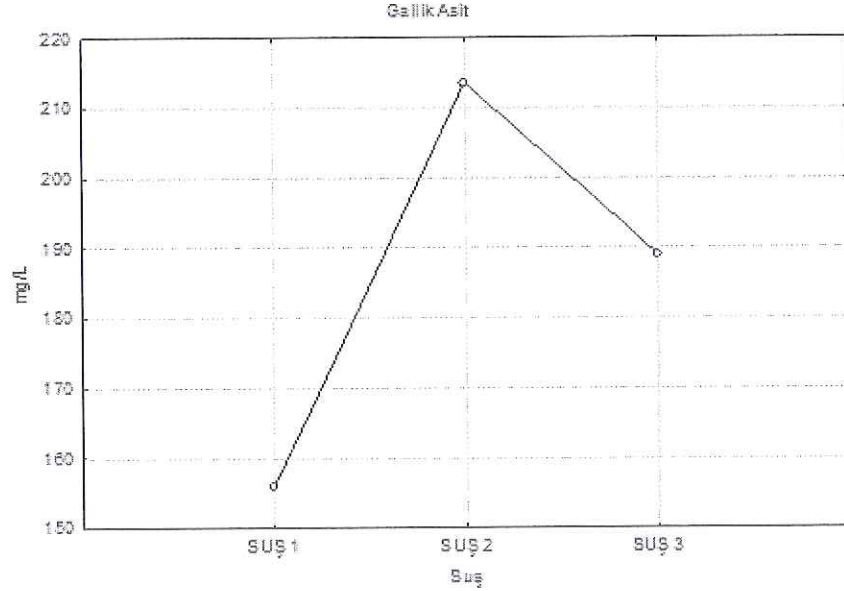
Şekil 4.6' te gallik asit üretimine ait ilişkin % 95'lik güven aralığında istatistiksel değerlendirmeler sonucu üç farklı suş, beş farklı azot kaynağı ve 96 saat süresince elde edilen ortalama değerler verilmiştir.



Şekil 4.6 Gallik Asit Üretimine Ait Kinetik Profil

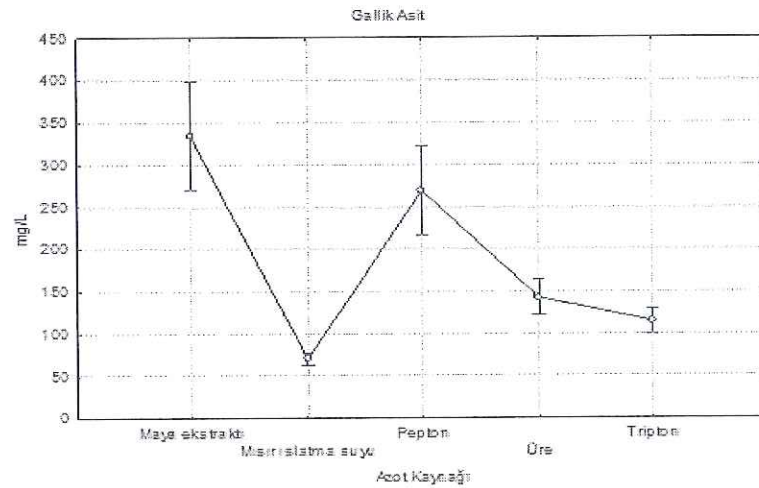
Grafikte de görüldüğü gibi maksimum değerlere 48. saatte ulaşılmıştır. Daha sonraki saatlerde değişim olmamıştır.

Aynı fenolik asitin eldesi üretim sırasında kullanılan suşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek değeri suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir (Şekil 4.7) .



Şekil 4.7 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Gallik Asit Miktarı Grafiksel Gösterimi.(Suş 1: *Lactobacillus pentosus* O15, Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3: *Lactobacillus pentosus* O 19)

Üretim sırasında kullanılan farklı azot kaynaklarının etkisi değerlendirildiğinde belirgin farklılıklar ortaya çıkmıştır (Şekil4.8).



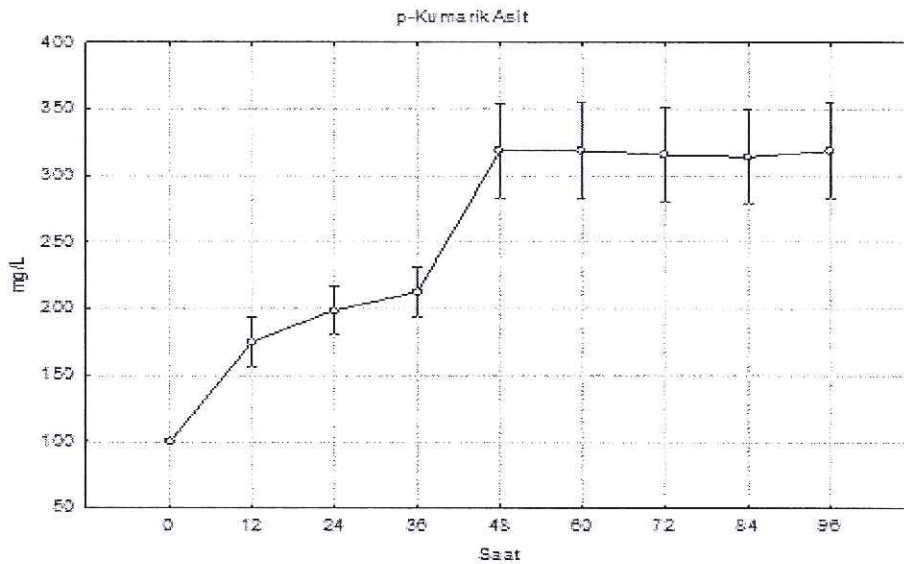
Şekil 4.8 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Üretimlerde Laktik Asit Konsantrasyonları (Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18; Maya ekstraktı)

Şekilde görüldüğü gibi en iyi sonuç maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra kullanabilecek azot kaynağı pepton olduğu belirlenmiştir. Yapılan LSD testi sonucu farklı azot kaynakları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). En yüksek değer suş 2 ve maya ekstraktı kullanılarak yapılan üretimden elde edilmiştir.

Bira atık mayşesinin hemiselülozidik şekerlerin asit hidrolizi sonucu galik asit üretimine ait çalışmaya rastlanmamıştır.

4.3. p-Kumarik Asit Üretimine Ait Analiz Sonuçları

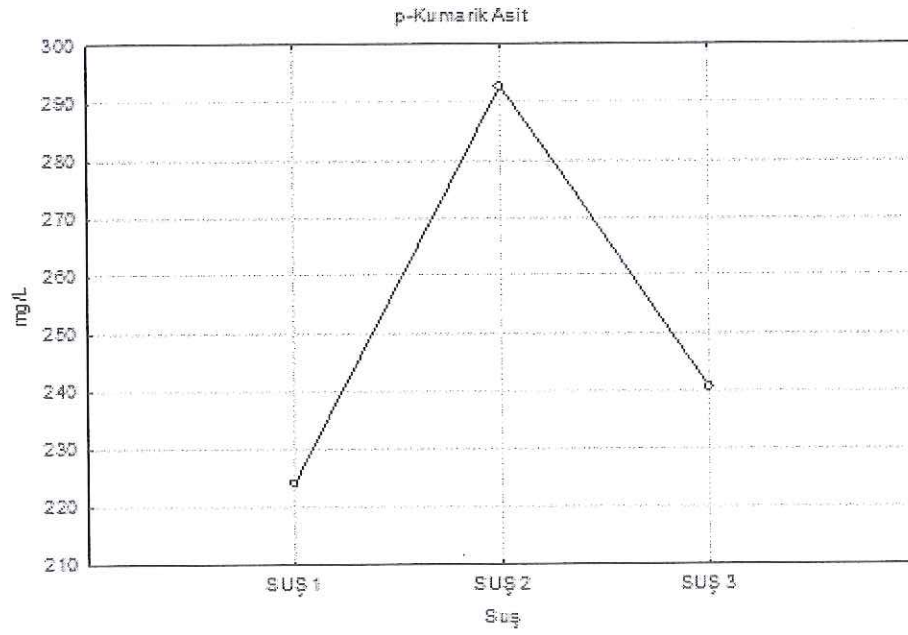
Şekil 4.9'da p-Kumarik asit üretimine ilişkin % 95'lik güven aralığında istatistiksel değerlendirmeler sonucu üç farklı suş, beş farklı azot kaynağı ve 96 saat süresince elde edilen ortalama değerler verilmiştir



Şekil 4.9 p-Kumarik asit üretimine ait kinetik profil

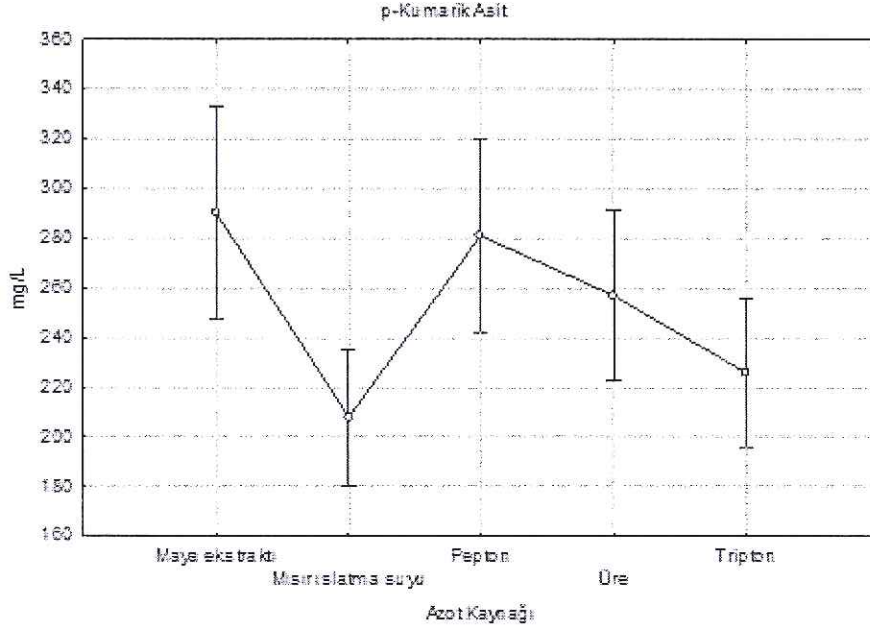
Grafikte de görüldüğü gibi maksimum değerlere 48. saatte ulaşılmıştır. Daha sonraki saatlerde değişim olmamıştır.

Aynı fenolik asitin eldesi üretim sırasında kullanılan suşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek değeri suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Gallik Asit Miktarı Grafikselleştirilmesi. Suş 1 (*Lactobacillus pentosus* O157), Suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18), Suş 3 (*Lactobacillus pentosus* O 19)

Üretim sırasında kullanılan farklı azot kaynaklarının etkisi değerlendirildiğinde belirgin farklılıklar belirgin sonuçlar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen p-Kumarik Asit Konsantrasyonları (Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18; Maya ekstraktı)

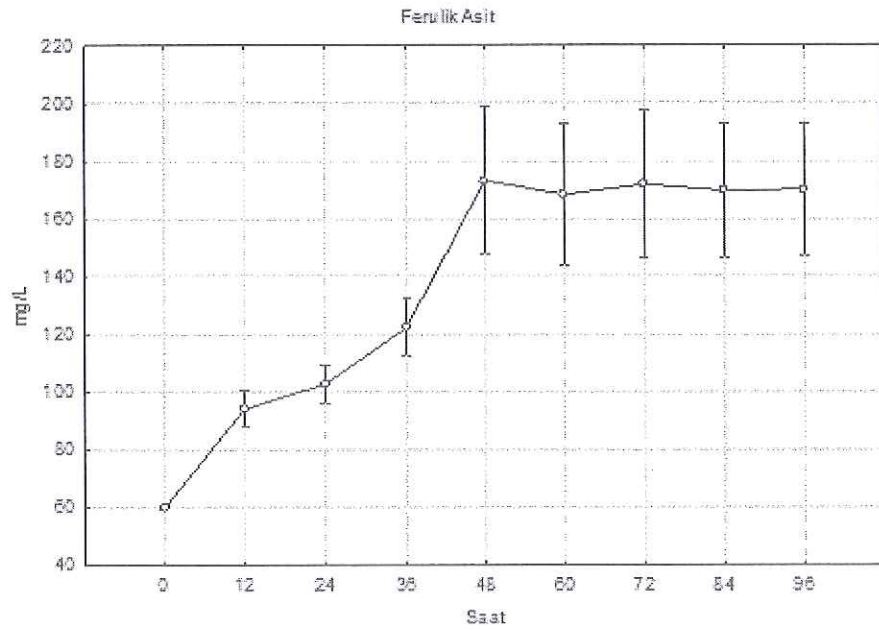
Şekilde görüldüğü gibi en iyi sonuç maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra kullanabilecek azot kaynağı pepton olduğu belirlenmiştir. Yapılan LSD testi sonucu farklı azot kaynakları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). En yüksek değer suş 2 ve maya ekstraktına ait üretimden elde edilmiştir.

Bira atık mayşesinin hemiselülozidik şekerlerin asit hidrolizi sonucu p-Kumarik asit asit üretimine ait çalışmaya rastlanmamıştır.

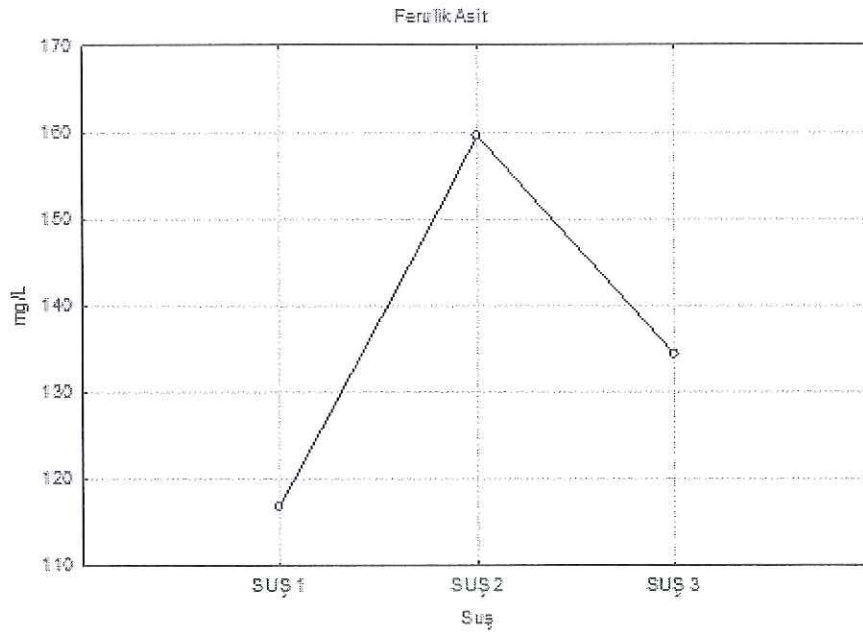
4.4. Ferulik asit üretimine ait analiz sonuçları

Şekil 4.12' de ferulik asit üretimine ilişkin % 95'lik güven aralığında istatistiksel değerlendirmeler sonucu üç farklı suş, beş farklı azot kaynağı ve 96 saat süresince elde edilen ortalama değerler verilmiştir

Ferulik asit değerlerinin üretim sırası boyunca (96 saat) verileri Şekil 4.12'de verilmiştir.



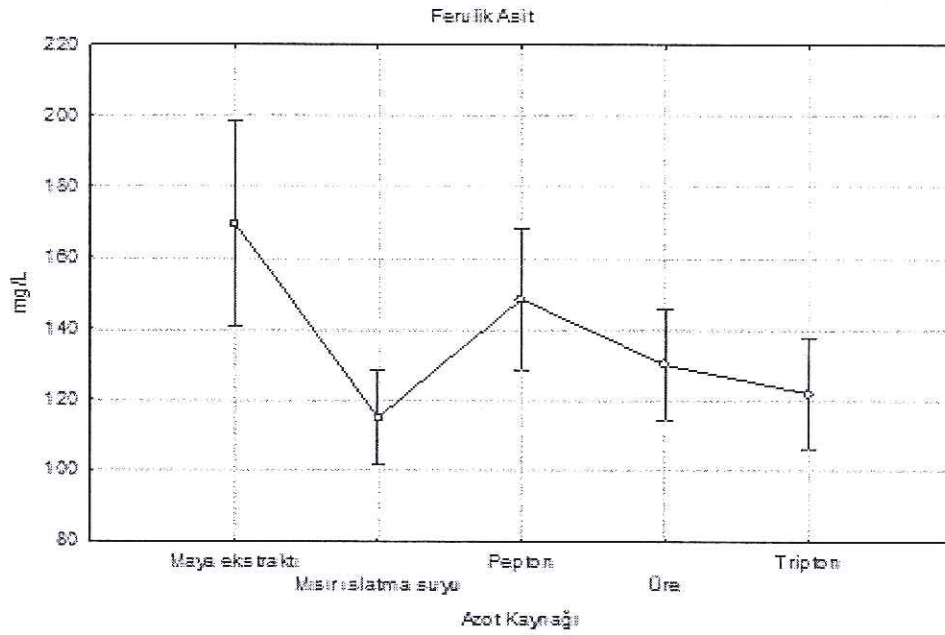
Şekil 4.12 Ferulik Asit Üretimine Ait Kinetik Profil



Şekil 4.13 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Gallik Asit Miktarı
Grafiksel Gösterimi (Suş 1: *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3 : *Lactobacillus pentosus* O 19)

Grafikte de görüldüğü gibi maksimum değerlere 48. saatte ulaşılmıştır. Daha sonraki saatlerde değişim olmamıştır. Aynı fenolik asitin eldesi üretim sırasında kullanılan suşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek değeri suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir (Şekil 4.13).

Üretim sırasında kullanılan farklı azot kaynaklarının etkisi değerlendirildiğinde belirgin farklılıklar belirgin sonuçlar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.14).



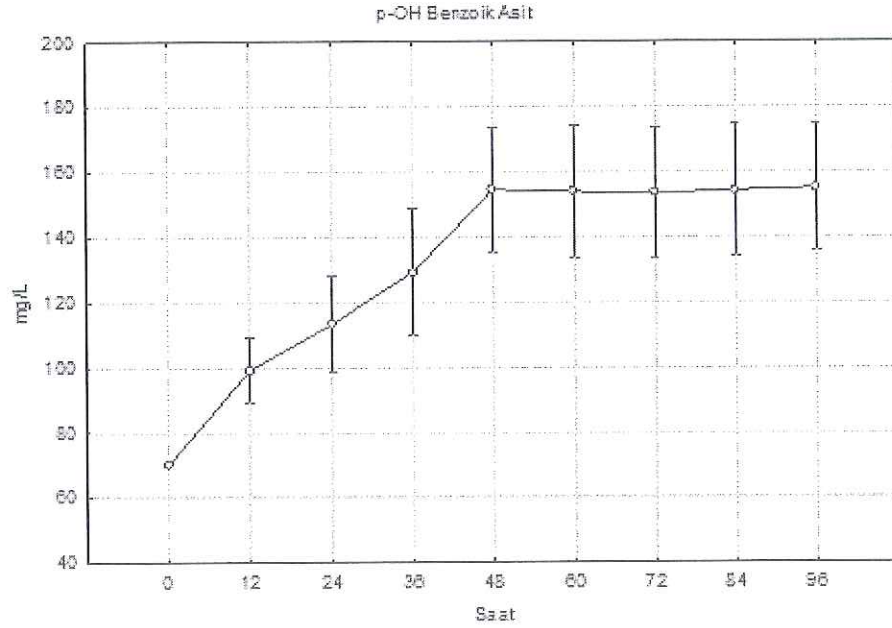
Şekil 4.14 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Ferulik Asit Konsantrasyonları

Şekilde görüldüğü gibi en iyi sonuç maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra kullanabilecek azot kaynağı pepton olduğu belirlenmiştir. Yapılan LSD testi sonucu farklı azot kaynakları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). En yüksek değer suş 2 ve maya ekstraktına ait üretimden elde edilmiştir.

Bira atık mayşesinin hemiselülozidik şekerlerin asit hidrolizi sonucu ferulik asit asit üretimine ait çalışmaya rastlanmamıştır.

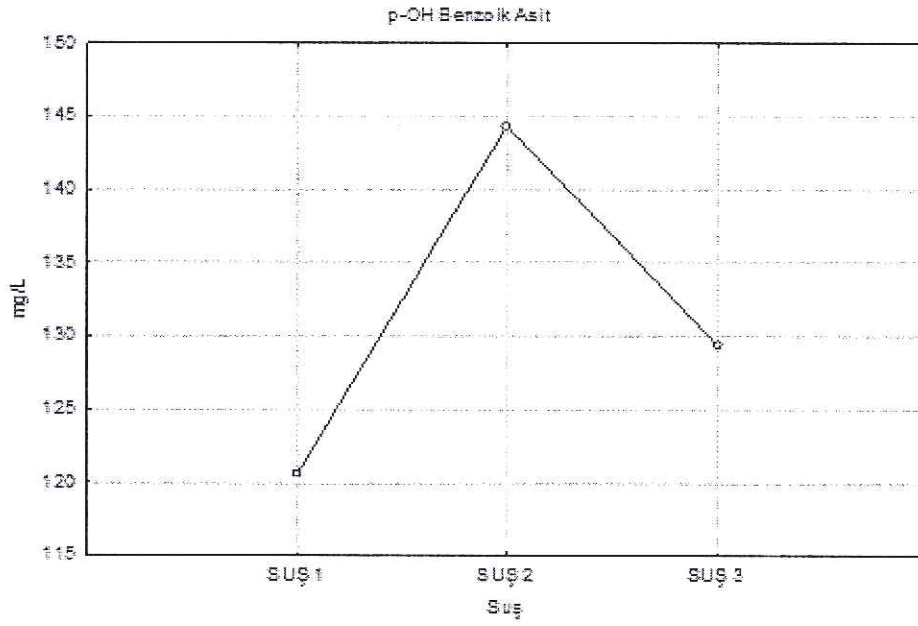
4.5. p-OH Benzoik asit üretimine ait analiz sonuçları

Şekil 4.15' de p-OH benzoik asit üretimine ilişkin % 95'lik güven aralığında istatistiksel değerlendirmeler sonucu üç farklı suş, beş farklı azot kaynağı ve 96 saat süresince elde edilen ortalama değerler verilmiştir.



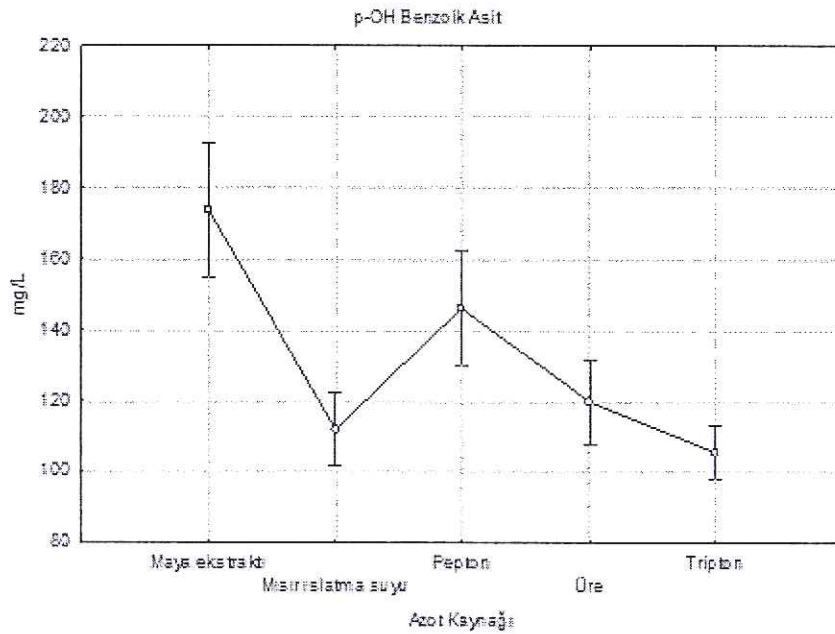
Şekil 4.15 p-OH Benzoik asit üretimine ait kinetik profil

Grafikte de görüldüğü gibi maksimum değerlere 48. saatte ulaşılmıştır. Daha sonraki saatlerde değişim olmamıştır. Aynı fenolik asitin eldesi üretim sırasında kullanılan suşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek değeri suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen p-OH Benzoik Asit Miktarı Grafikselsel Gösterimi. (Suş 1: *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3 : *Lactobacillus pentosus* O 19)

Üretim sırasında kullanılan farklı azot kaynaklarının etkisi değerlendirildiğinde belirgin farklılıklar belirgin sonuçlar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Üretimde p-OH Benzoik Asit Konsantrasyonları

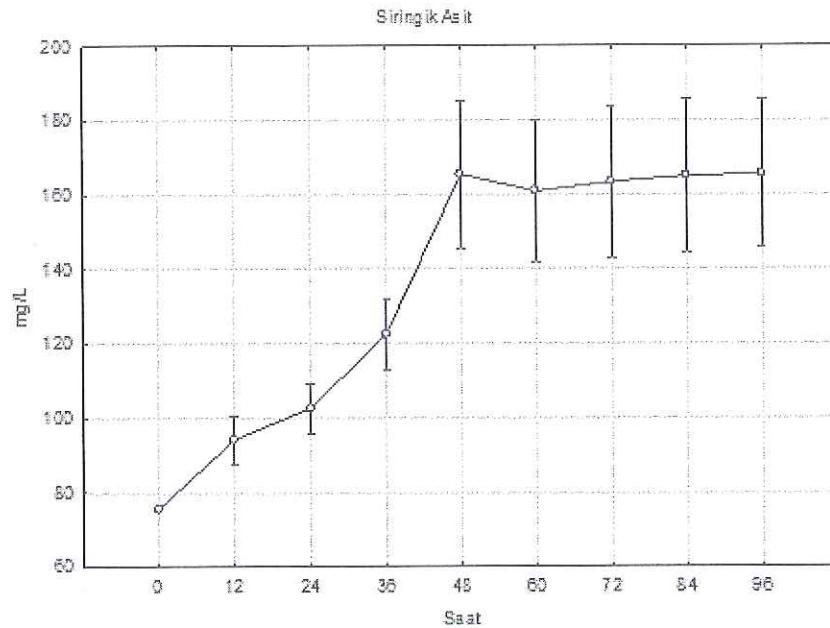
Şekilde görüldüğü gibi en iyi sonuç maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra kullanabilecek azot kaynağı pepton olduğu belirlenmiştir. Yapılan LSD testi sonucu farklı azot kaynakları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). En yüksek değer suş 2 ve maya ekstraktına ait üretimden elde edilmiştir.

Bira atık mayşesinin hemiselülozidik şekerlerin asit hidrolizi sonucu p-OH Benzoik asit asit üretimine ait çalışmaya rastlanmamıştır.

4.6. Şiringik asit üretimine ait analiz sonuçları

Şekil 4.18'de şiringik asit üretimine ilişkin % 95'lik güven aralığında istatistiksel değerlendirmeler sonucu üç farklı suş, beş farklı azot kaynağı ve 96 saat süresince elde edilen ortalama değerler verilmiştir.

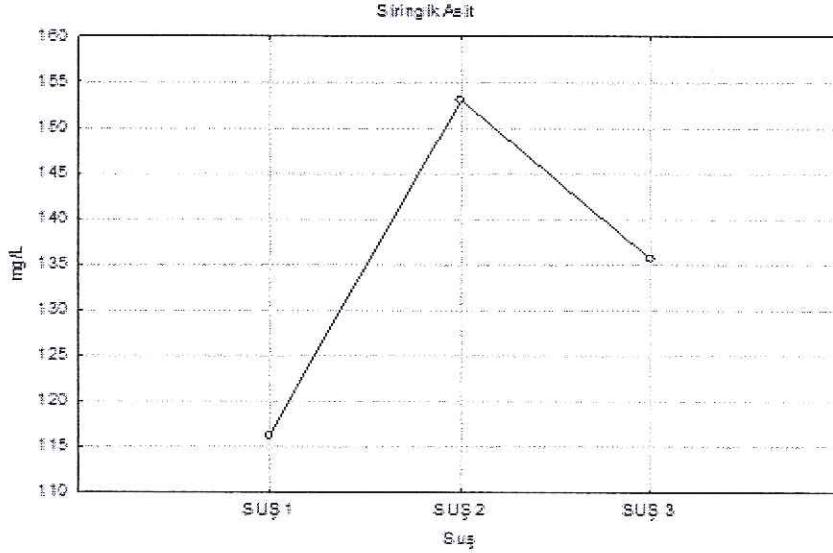
Şiringik asit değerlerinin üretim sırası boyunca (96 saat) verileri Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18 Şiringik Asit Üretimine Ait Kinetik Profil

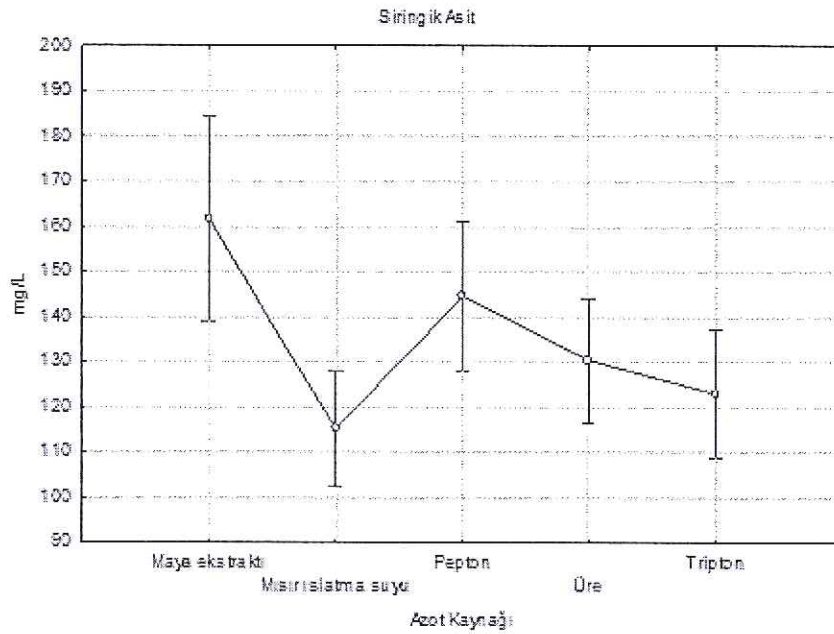
Grafikte de görüldüğü gibi maksimum değerlere 48. saatte ulaşılmıştır. Daha sonraki saatlerde değişim olmamıştır.

Aynı fenolik asitin eldesi üretim sırasında kullanılan suşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek değeri suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen p-OH Benzoik Asit Miktarı Grafikselsel Gösterimi. (Suş 1: *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3: *Lactobacillus pentosus* O 19)

Üretim sırasında kullanılan farklı azot kaynaklarının etkisi değerlendirildiğinde belirgin farklılıklar belirgin sonuçlar ortaya çıkmıştır (Şekil4.20).



Şekil 4.20 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Şiringik Asit Konsantrasyonları

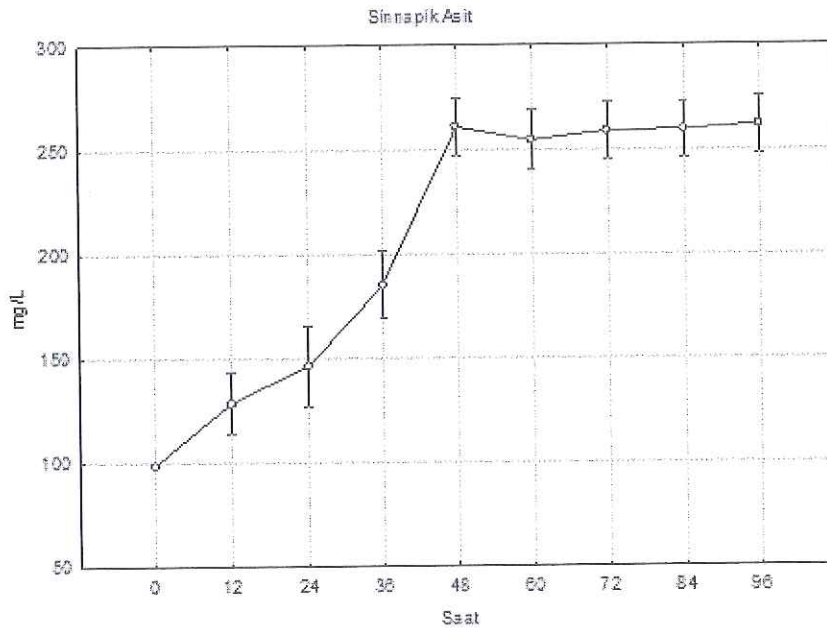
Şekilde görüldüğü gibi en iyi sonuç maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra kullanabilecek azot kaynağı pepton olduğu belirlenmiştir. Yapılan LSD testi sonucu farklı azot kaynakları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). En yüksek değer suş 2 ve maya ekstraktına ait üretimden elde edilmiştir.

Bira atık mayşesinin hemiselülozidik şekerlerin asit hidrolizi sonucu şiringik asit asit üretimine ait çalışmaya rastlanmamıştır.

4.7. Sinapik asit üretimine ait analiz sonuçları

Şekil 4.21'de sinapik asit üretimine ilişkin % 95'lik güven aralığında istatistiksel değerlendirmeler sonucu üç farklı suş, beş farklı azot kaynağı ve 96 saat süresince elde edilen ortalama değerler verilmiştir.

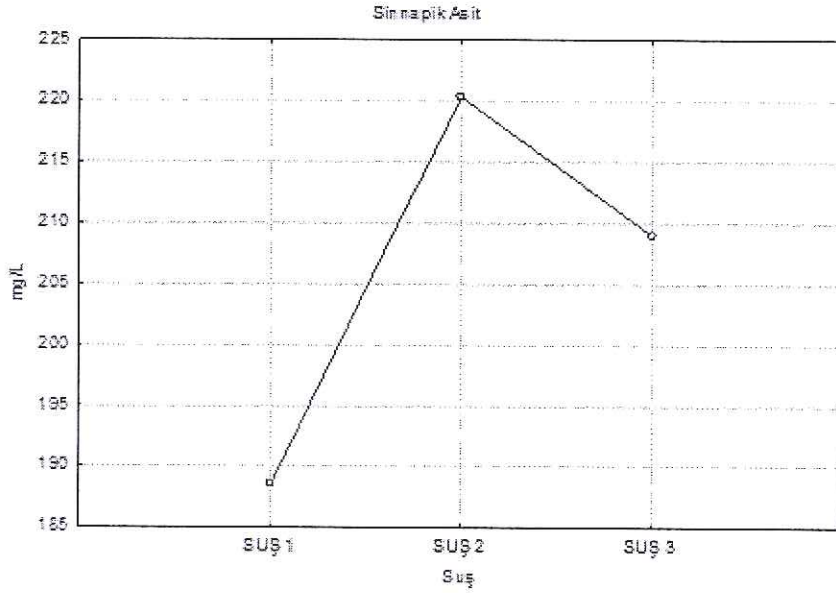
Sinapik asit değerlerinin üretim sırası boyunca (96 saat) verileri Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21 Sinapik asit üretimine ait kinetik profil

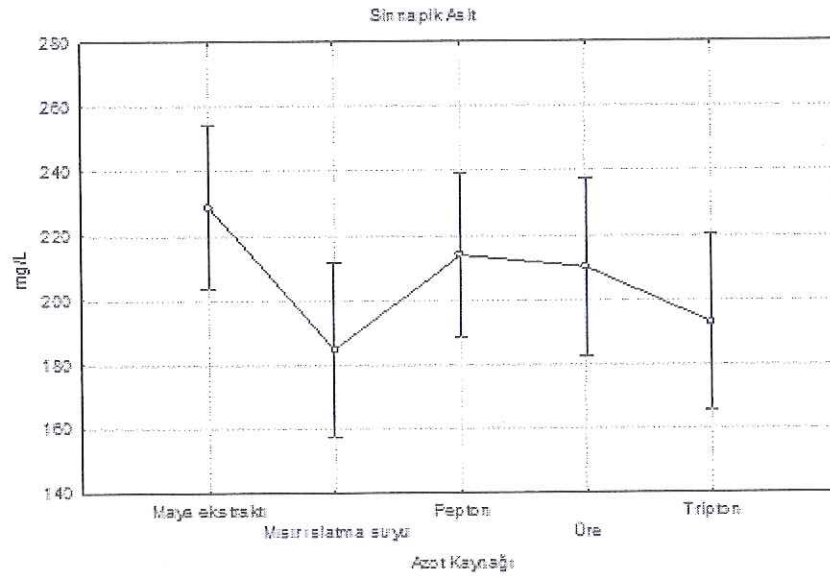
Grafikte de görüldüğü gibi maksimum değerlere 48. saatte ulaşılmıştır. Daha sonraki saatlerde değişim olmamıştır.

Aynı fenolik asitin eldesi üretim sırasında kullanılan suşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek değeri suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Sinapik Asit Miktarı Grafikselsel Gösterimi. (Suş 1: *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3: *Lactobacillus pentosus* O 19)

Üretim sırasında kullanılan farklı azot kaynaklarının etkisi değerlendirildiğinde belirgin farklılıklar belirgin sonuçlar ortaya çıkmıştır (Şekil4.23).



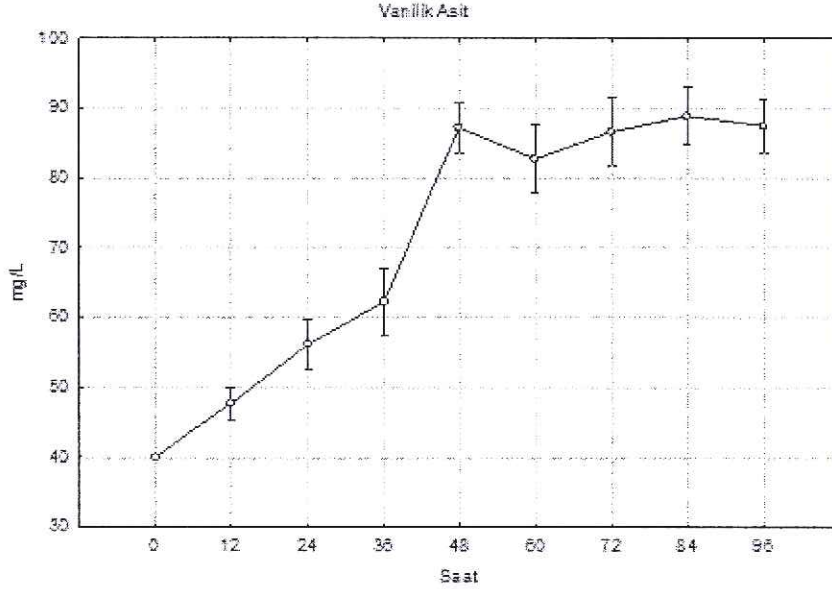
Şekil 4.23 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Sinapik Asit Konsantrasyonları

Şekilde görüldüğü gibi en iyi sonuç maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra kullanabilecek azot kaynağı pepton olduğu belirlenmiştir. Yapılan LSD testi sonucu farklı azot kaynakları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). En yüksek değer suş 2 ve maya ekstraktına ait üretimden elde edilmiştir.

Bira atık mayşesinin hemiselülozidik şekerlerin asit hidrolizi sonucu sinapik asit asit üretimine ait çalışmaya rastlanmamıştır.

4.8. Vanilik asit üretimine ait analiz sonuçları

Şekil 4.24'de sinapik asit üretimine ilişkin % 95'lik güven aralığında istatistiksel değerlendirmeler sonucu üç farklı suş, beş farklı azot kaynağı ve 96 saat süresince elde edilen ortalama değerler verilmiştir.

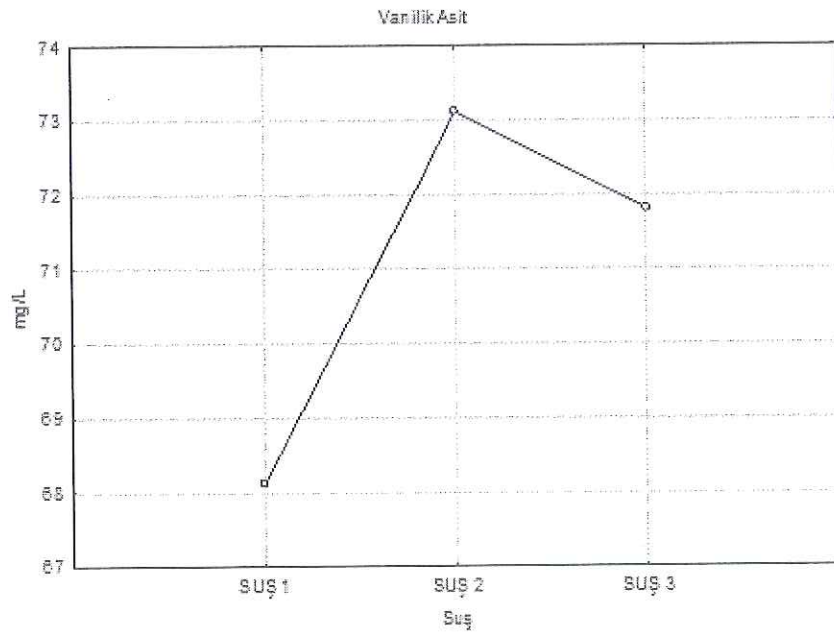


Şekil 4.24 Vanilik asit üretimine ait kinetik profil

Vanilik asit değerlerinin üretim sırası boyunca (96 saat) verileri Şekil 4.24 'te verilmiştir.

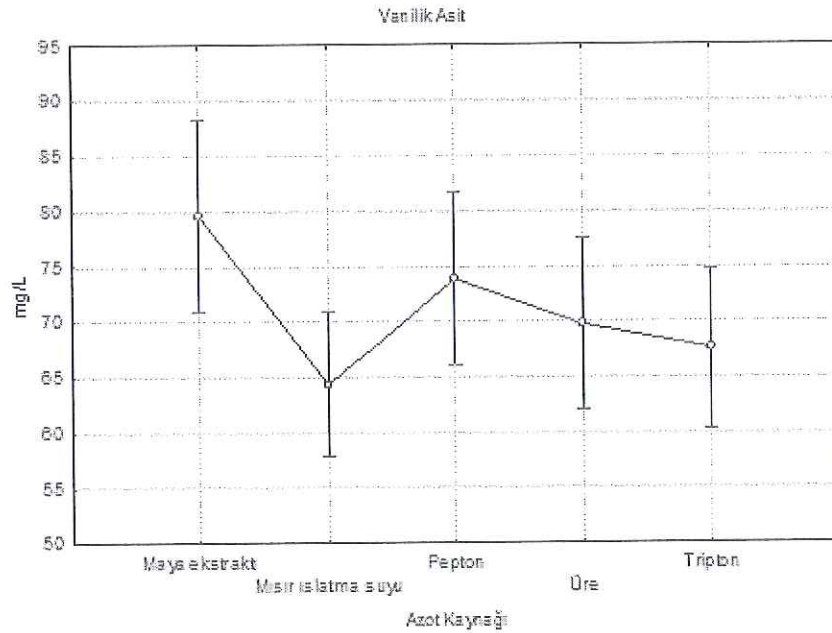
Grafikde de görüldüğü gibi maksimum değerlere 48. Saatte ulaşılmıştır. Daha sonraki saatlerde değişim olmamıştır.

Aynı fenolik asitin eldesi üretim sırasında kullanılan suşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek değeri suş 2 (*Lactobacillus pentosus* O 18) ile elde edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 Farklı Suşlarla Yapılan Denemelerde Elde Edilen Vanilik Asit Miktarı Grafikselleştirilmesi. (Suş 1: *Lactobacillus pentosus* O157, Suş 2: *Lactobacillus pentosus* O 18, Suş 3: *Lactobacillus pentosus* O 19)

Üretim sırasında kullanılan farklı azot kaynaklarının etkisi değerlendirildiğinde belirgin farklılıklar belirgin sonuçlar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.26)



Şekil 4.26 Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Gerçekleştirilen Vanilik Asit Konsantrasyonları

Şekilde görüldüğü gibi en iyi sonuç maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra kullanabilecek azot kaynağı pepton olduğu belirlenmiştir. Yapılan LSD testi sonucu farklı azot kaynakları arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). En yüksek değer suş 2 ve maya ekstraktına ait üretimden elde edilmiştir.

Bira atık mayşesinin hemiselülozidik şekerlerin asit hidrolizi sonucu vanilik asit üretimine ait çalışmaya rastlanmamıştır.

Fermantasyon öncesi ve sonrası analiz sonuçlarına bakarak BAM' in *Lactobacillus pentosus* ile fermantasyonunda en fazla hidroksisinamik asitler olan ferulik asit ve kumarik asit bulunduğunu ortaya çıkmıştır.

Mussatto ve ark. (2007) bira atık mayşesinden alkali hidrolizi ile gıda, sağlık, kozmetik ve fermokolojik uygulamalarda kullanımı ilgi çeken bileşikler olan ferulik asit ve kumarik asit ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. NaOH % 1, 1.5 ve 2 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda, sıcaklık 20, 100 ve 120 °C, reaksiyon süresi 30, 60 ve 90 dk da denemeler yapılarak en iyi hidroliz koşullarını araştırmışlardır. İstatiksel analiz kullanılan çalışmada en iyi alkali hidrolizi koşulları %2 NaOH konsantrasyonu, 120 °C sıcaklıkta ve 90 dk reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altına 145,3 mg/L ferulik asit, 138,8 mg/L kumarik asit elde edilmiştir. Bu da çözünen ligninin her gramında 9,65 mg/L ferulik asit 9,22 mg/L kumarik asit olduğu bulunmuştur.

Yine benzer bir çalışmada Mussatto ve ark. (2007) bira atık mayşesi içerisindeki 12,44 g/L çözünebilen ligninin asit ile hidrolizi bazı fenolik asitlerin (vanilik asit, şirinjik asit, p-hidroksibenzoik asit ve kumarik asit) elde edildiğini belirtmişlerdir. pH 2,15- 12,56 arasında on farklı değerde çalışılmıştır ve pH değişimine bağlı olarak fenolik asitlerin %32-74 arasında elde edildiği belirtilmiştir. pH'nın 7,7 den düşük lduğu çalışmalarda önemli oranda lignin dönüşümü gerçekleştiği belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada Mussatto ve ark. (2013) yılında yaptıkları bir çalışmada bira atık mayşesinin etanol, metanol, aseton ve su gibi farklı solventlerle antioksidant fenolik bileşiklerin elde edilmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada kullanılan her bir çözücünün fenolik bileşikleri elde etme açısından farklı etkilerinin olduğu ve elde edilen fenoliklerin hepsinin antioksidant özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. % 60 v/v aseton çözeltisinin toplam fenoller ve antioksidant bileşikler elde etmede en iyi sonucu verdiğini bulmuşlardır. Aseton (% 60 v/v) çözeltisinin hem daha verimli hem de daha ucuz oluşu kullanım açısından avantaj oluşturduğunu belirtmişlerdir.

5.SONUÇ

Bu çalışmada, *Lactobacillus pentosus* ile bira üretiminin son yıllarda değerli olduğu farkına varılan bira mayşe atığından laktik asit ve fenolik asit üretimi gerçekleştirilmiş ve bu üretimin verimli olabilmesi için en uygun suş ve azot kaynağı için üretim koşulları araştırılmıştır.

Bira mayşe atığındaki hemiselülozu kullanabilen laktik asit bakterisine ait üç suş ile çalışılmış ve en iyi üretimi sağlayan *Lactobacillus pentosus* 018 seçilmiştir.

Çalışmanın birinci aşamasında bira fabrikasından temin edilen bira atık mayşesi ön işlemlerden geçirilerek içeriğinde hemiselülozidik şekerler hidroliz edilmiş ve farklı azot kaynakları da ortama ilave edilip *Lactobacillus pentosus* ile fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Üç farklı suş (*Lactobacillus pentosus* O 157, *Lactobacillus pentosus* O 18, *Lactobacillus pentosus* O 19) ve beş farklı azot kaynağı (maya ekstaktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton ve üre) kullanılarak laktik asit üretimi için elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Üretim sırasında kullanılan azot kaynakları arasında en yüksek verim maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Aynı koşullarda fenolik asitlere olan etkisinin de araştırıldığı çalışmada, gallik asit, kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, vanilik asit ve sinapik asit miktarlarının fermentasyon sonucunda arttığı belirlenmiştir. Fermentasyon öncesi ve sonrası analiz sonuçlarına bakarak bira atık mayşesinin *Lactobacillus pentosus* ile fermentasyonunda en fazla artış hidroksisinamik asitler grubundan olan ferulik ait (60-175 mg/L) ve p- kumarik asit (100-322,5 mg/L) olarak bulunmuştur.

Fenolik asitlerin ve laktik asitin bira atığındaki hemiselülozidik şekerlerin hidrolizi sonucunda *Lactobacillus pentosus* ile üretimine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalar bira atığındaki ligninden ekstrakte edilen fenolik asitler ve selülozu kullanarak laktik asit üretimine yöneliktir. Asit hidrolizi ile yüksek oranda ksilozdan laktik asit ve

fenolik asit üretimi bu alanın açığı olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın bu açığı kapatacağı ve laktik asit ve fenolik asit içeren çeşitli tarımsal atıklarının değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalar için bir ön çalışma niteliği taşımaktadır. Çalışma neticesinde bira mayşe atığından biyodönüşüm yolu ile laktik asit ve hidroksisinamik asit grubu asitlerin elde edilebileceği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alberto, M.R., Farias, M.E., and Manca de Nadra, M.C.,** 2001, Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* growth and metabolism of organic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4359–4363.
- Aiba, S., Humphrey, A.E. and Millis, N.F.,** 1973, Biochemical Engineering, Second Education, University of Tokyo Press.
- Akçelik, M. ve Ayhan, K.,** 1992, Laktik asit bakterilerinin tedavi edici rolü, *Biyoteknoloji Haber Bülteni*, 5: 2-3 s.
- Aliyu, S. and Bala, M.,** 2011, Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications, *African Journal of Biotechnology* Vol, 324-331 pp.
- Altuntas, E.G., Cosansu, S. and Ayhan, K.,** 2010b, Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin producing strain *Pediococcus* sp., *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2): 28-31 pp.
- Altuntaş, E.G., Ayhan, K., Okcu, G., Erkanlı, K., Balcı, M.H. ve Sonakın, S.S.,** 2010a, Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri, *Gıda*, 35(3): 197-203 s.
- Angelino, S. A. G. F.,** 1991, Beer. In: Volatile compounds in foods and beverages, eds. H Henk Maarse, Marcel Dekker, Inc., New York, 581-616 pp.
- Anonim,** 1997. Methods of Analysis, The Institute of Brewing, London.
- Anonim,** 2013, Bira Üretim Basamakları, <http://www.ege.4mg.com/arpa/malt/bira.html>.
- Anonim,** 2014 , <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenols> .
- Arvid, G., Jansson, G., Schmidte, A. S. And Ahring, B. K.,** 2002, Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*, *Bioresource Techonolgy*, 81: 217-283 pp.
- Bayrak, A.,** 2006, Gıda Aromaları, Baran Ofset, Ankara 497 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Bertolome , B., Faulds, C. B. and Williamson, G., 1997, Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain, *Journal of Cereal Science*. 25: 285-288 pp.
- Bilaloğlu, G.V., ve Harmandar, M., 1999, Flavonoidler, Aktif Yayınevi,İstanbul, 334-354 s.
- Bustos, G., Cruz, J. M., Moldes, A. B., and Domínguez, J. M., 2004,Production of fermentable media from vine-trimming wastes and Bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus* , *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(15), 2105–2112 pp.
- Bustos, G., Cruz, J. M., Moldes, A. B., and Domínguez, J. M., 2005, Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Using *Lactobacillus Pentosus*, *Biotechnology Progress*, 21, 793-798 pp.
- Crueger, W., and Crueger, A., 1990, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 2nd ed., Sinauer Associates, Inc., USA, 357s.
- Campos, F. M., Couto, J.A. and Hogg, T.A., 2003., Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*,94:167–174.
- Canbaş, A. ve Fenercioğlu, H., 1984, Şalgam suyu üzerinde bir araştırma, *Gıda* 9(5): 299-286 s.
- Cavin, J.F., Andioc,V., Etievant, P.X. and Divies, C., 1993, Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids, *American Journal of Enology and Viticulture*, 44: 76-80.
- Cemeroğlu, B., 2004, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 1: 77-88 s.
- Chaillou, S., Lokman, B. C., Leer, R. J., Posthuma, C., Postma, P. W., and Pouwels, P.H., 1998, Functional Expression in *Lactobacillus Plantarum* of *xylP* Encoding the Isoprimeverose Transporter of *Lactobacillus pentosus*, *Journal of Bacteriology* 180, 2312–2320 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Chkikvishvili, I.D. and Gogiyo, N.N.**, 1995, Flavonoids of mandarin fruit wastes and their fungistatic effect on the fungus *Phoma tracheiphila*, *Applied Biochemical Microbiology*, 31 :3, 292-296 pp.
- Connolly, A., Piggott, O. C. and FitzGerald, R.J.**, 2013, Characterisation of protein-rich isolates and antioxidative phenolic extracts from pale and black brewers' spent grain, *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1670–1681 pp.
- Cortacera-Ramirez S., Castro M. H. B., Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., and Fernandez-Gutierrez A.**, 2003, Analysis of Beer Components by Capillary Electrophoretic Methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (7,8): 440-455 pp.
- Cosansu, S., Geornaras, I., Ayhan, K. and Sofos, J.N.**, 2010, Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* 13 and its antimicrobial substance in a dry fermented sausage sucuk and in turkey breasts, *Journal of Food and Nutrition Research*, 49(4): 206-214 pp.
- Coşkun, F.**, 2006, Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2: 27-33 s.
- Couto, J.A., Campos, F.M., Figueiredo, A.R. and How, T.A.**, 2006, Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols, *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 166-171 pp.
- Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., and Parajó, J. C.**, 2000, *Food Biotechnology* 14, 79–97 pp.
- Cruz, J. M., Domínguez, J. M., Domínguez, H., and Parajó, J. C.**, 2000, D- X Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization, *Biotechnology Letters* 22, 1895–1898 pp.
- Cruz, M. J., Moldes, B. A., Bustos, G., Torrado, A., and Domínguez, M. J.**, 2007, Integral utilisation of barley husk for the production of food additives, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1000–1008 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Curiel, J.A., Rodríguez, H., Landete, J. M., and Muñoz, R., 2010, Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids, *Food Chemistry* 120,225-229 pp.
- Curtin, V., 1983, Molasses-general considerations, National Feed Ingredients Association West Moines, Iowa, A.B.D.
- Çon, A. H. ve Gökarp, H. Y., 2000, Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30:180-190 s.
- Cosansu, S. ve Ayhan, K., 2002, Fermente ürünler ve mikrobiyolojik bozulmaları, *Gıda Teknolojisi Derneği*, 27: 33 s.
- Dao, L. and Takeoka G., 2002, Anthocyanins in methods of analysis for functional foods and nutraceuticals, CRC Pres LLC.
- Domínguez, J. M., Cao, N. J., Gong, C. S., and Tsao, G. T., 1997, Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects, *Bioresource Technology* 61,85- 90 pp.
- Du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E. and Krieger-Weber, S., 2010, *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures, *Food Bioprocess Technology*, 4: 876-906 pp.
- Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T. and İhsanoğlu, E. E., 2000, Denel Organik Kimya, *Ankara Üniversitesi*, Ankara, 133-136 s.
- Ertugay, Z. ve Certel, M., 1995, Biyoteknoloji 1, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 13-18 s.
- Ferguson L.D., and Harris P.J.A., 1999, Protection against cancer by wheat bran:role of dietary fibre and phytochemicals, Cancer Society R Research Centre, University of Auckland Faculty of Medicine and Health Science, New Zealand. *European Journal of Cancer Prevention* 8, 17-25 pp.
- Fischer, U. A., Carle, R., and Kammerer, D.R., 2011, Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. 15;127(2):807-21 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Fickert, B., and Schieberle P.**, 1998. Identification of The Key Odorants in Barley Malt Using GC/MS Techniques and Odour Dilution Analyses. *Nahrung*, 42: 371-375 pp.
- Fukumoto, L. R., and Mazza, G.**, 2000, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A. S., and Ahring, B. K.**, 2002, Lactic acid Production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus Pentosus* and *Lactobacillus brevis* *Bioresource Technology* 81(3),217–223 pp.
- Göğüş, F. and Fadiloğlu, S.**, 2006, Food Chemistry, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 319-339 pp.
- Göksungur, Y., and Güvenç, U.**, 1997 , batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus Delbrueckii*, *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 69, 399-404 pp.
- Guzman-Lopez, O., Loera, U., Parada, J. L., Castillo-Morales, A., Martinez- Ramirez, C., Augur, C., Gaime-Perraud, I., and Saucedo-Castaneda, G.**, 2009, Microcultures of lactic acid bacteria: characterization and selection of strains, optimization of nutrients and gallic acid concentration. *Microbiol Biotechnology* 36:11–20 pp.
- Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Alvarez, P. J. and Moreno-Arribas, M. V.**, 2006, Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analitica Chimica Acta*, 563: 116–125.
- Hofvendahl, K., and Hahn-Hagerdal, B.**, 1997, L(+)-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lctobacilli and Lactococci, *Enzyme and Microbal Technology*, 20, 301-307 pp.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M.**, 2008, Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı, *Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1): 1–6 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Jaffé H.H. and Orchin M.**, 1964, Theory and applications of ultraviolet spectroscopy, 96 *John Wiley and Sons*, New York.
- Juven, B., Henis, Y. and Jacoby, B.**, 1972, Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein, *Journal of Applied Bacteriology*, 35: 721-732 pp.
- Kammarer, D., Carle, R., and Schiber, A.**, 2004, Characterization of phenolics acids in black carrots (*Daucus carota* spp. *sativus* var. *atrorubensa alef* by high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrophotometry*, 18(12): 1331-1340.
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S. ve Cabaroğlu, T.**, 2006, Bazı Üzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri, II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 309-312 s.
- Kahyaoğlu, M. and Konar, V.**, 2006, The utilize of industrial waste substrate for rhamnolipid biosurfactants production and application potential, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1352-3055 pp.
- Khidzir, K. M., Noorlidah, A., and Agamuthu, P.**, 2010, Brewery Spent Grain: Chemical Characteristics and utilization as an Enzyme Substrate. *Malaysian J. Sci.* 29(1): 41-51.
- Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K., Kim, J.J., Chun, S.C. and Kim, E.H.**, 2008, Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7265-7270 pp.
- Knudsen, F. B.**, 1999. "Fermentation, Principles and Practices." The Practical Brewer. Edited By John T. McCabe. Wauwatosa Wisconsin: Master Brewers Association of America-Technical Quarterly.
- Köksal, G.**, 2008, Şeftali meyvesinde fenolik madde dağılımı ve pulpa işleme sırasında değişimi, Ankara Üniversitesi Doktora Tezi, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Kuleaşan, H.**, 2002, Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlanması, sınıflandırılması ve bunların bazı gıda kaynaklı patojenler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, Ank. Üniv. Fen Bil. Enst., Doktora Tezi, 82 s.
- Kurtuluş, M.**, 2010, Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşleme Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Lewis, J. M., and Young, T. W.**, 1995, Brewing, Chapman and Hall, London.
- Lide, D.**, 1995, CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press Inc., 107 pp.
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., and Penttälä, M.**, 1998. Recent Advances in The Malting and Brewing Industry. *Journal of Biotechnology*, 65: 85-98 pp.
- Madsen, H.L., and Betelsen, G.**, 1995, Spices as antioxidants, *Trends in Food Science and Technology*, 6, 271-277 pp.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémés, C. and Jiménez, L.**, 2004, Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747 pp.
- Mangas, J.J., Suarez, B., Picinelli, A., Moreno, J. and Blanco, D.**, 1997, Differentiation by phenolic profile of apple juices prepared according to two membrane techniques, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45 (12), 4777-4784 pp.
- Marinova, E. M., Yanishlieva, N. V. I., and Kostova, I. N.**, 1994, Antioxidative action of the ethanolic extract and some hydroxycoumarins of *Fraxinus ornus* bark. *Food Chemistry* 51:125-132.
- Martinez-Castellanos, G., Pelayo-Zaldívar, C., Pérez-Flores, L.J. , López-Luna, A., Gimeno, M., Eduardo Bárzana, E. and Shirai, K.**, 2011, Postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) quality preservation by *Lactobacillus plantarum*, *Postharvest Biology and Technology*, 59: 172-178 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Meneses, G. T. N., Martins, S., Teixeira, A. J., and Mussatto, I. S., 2013, Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains, *Separation and purification Technology*, 152–158 pp.
- Moldes, A. B., Alonso, J. L., and Parajó, J. C., 2001, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76(3), 279–284 pp.
- Moldes, B. A., Torrado, A., Converti, A., and Domínguez, M.J., 2006, Complete Bioconversion of Hemicellulosic Sugars From Agricultural Into Lactic Acid by *Lactobacillus pentosus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 219-227 pp.
- Montealegre, R. R, Peces, R. R., Vozmediano, J. L. C., Gascuena, J. M., and Mussatto, S. I. and Roberto, I. C., 2004, Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* *Bioresource Technology* 93, 1–10 pp.
- Mussatto, S. I., and Roberto, I. C., 2005, Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:2453- 2460.
- Mussatto, S. I., and Roberto, I. C., 2006, Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 268-274 pp.
- Mussatto, S. I., and Roberto, I. C., 2006, Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications, *Journal of Cereal Science* 43:1–14 pp.
- Mussatto S. I., Dragone, G. and Roberto, I. C., 2007,. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkalinehydrolysis of brewer's spent grain, *Industrial Crops and Products*. 25: 231-237 pp.
- Mussatto, S. I., Dragone, G. and Roberto, I.C., 2007a, Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain, *Industrial Crops and Products* 25 :231–237 pp.
- Mussatto S.I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, I.M. and Roberto, I.C., 2007b, Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol. Lett.* 29: 1973- 1976 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Mussatto, S. I., and Roberto, I. C., 2008a,** Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulps obtained from brewer's spent grain. *Cellulose* 15:641-649 pp.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Mancilha, L.M. and Roberto, I.C., 2008b,** Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain, *Biochemical Engineering Journal* 40: 437-444 pp.
- Mussatto, S. I., and Roberto, I. C., 2008,** Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*, *Process Biochemistry*, 43: 540-546 pp.
- Mussatto, S.I., 2009,** Biotechnological Potential of Brewing Industry By Products. In: Singh nee' Nigam P, Pandey A (eds.). *Biotechnology for Agro- Industrial Residues Utilization*, Springer, 313-326. DOI 10.1007/978-1-4020-9942-7 16.
- Mutlu, S. F., 1990,** Ayçiçeği bitkisinin sap ve tohum kabuklarının enzimatik yöntemlerle şekere dönüşümü, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, 1-30 s.
- Naczk, M. and Shahidi, F., 2004,** Extarction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111 pp.
- Oban, S., 2008,** Melastan fermentasyonla laktik asit üretiminin optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği, Adana.
- Okçu, G., Güneş, E. ve Ayhan, A., 2011,**Laktik asit fermantasyonunda fenolik bileşikler ve önemi, *Ordu Üniversitesi Bilim Tenolojisi Dergisi*,1(1) :50-63 s.
- Omay, D. ve Güvenilir, Y., 2011,** Yemekhane atıklarından fermantasyonla laktik asit üretimi, *Ekoloji* 20, 80, 42-50 s.
- Panesar, S. P., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. and Bunko, K., 2007,** Bioutilization of whey for lactic acid production. *food chemistry, America-Technical Quarterly*, 105:1-14 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Parajó, J. C., Domínguez, H., and Domínguez, J. M., 1995, *Bioprocess engineering* 13, 125–131 pp.
- Parisi, F., 1989, Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates, *Advances Biochemical Engineering*, 38, 53-87 pp.
- Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S., and Codina, C., 2006, An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* 97, 137–150 pp.
- Peyrat-Maillard, M. N., Bonnelly, S., and Berset, C., 2000, Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection, *Talanta* 51, 709-716.
- Reinold, M.R., 1997, Manual Prático De Cervejaria, first ed. Aden Editora e Comunicacões Ltda, São Paulo, p. 214.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L. and Roze's, N., 2000, Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine, *Journal of Applied Microbiology*, 88: 1065–1071.
- Rivas, B., Domínguez, J. M., Domínguez, H., and Parajó, J. C. ,2002, *Enzyme and Microbial Technology* 31, 431–438 pp.
- Robertson, J.A.I., Anson. K.J.A., Treimo, J., Faulds, C.B., Brocklehurst, T.F., Eijsink, V.G.H., and Waldron, K.W., 2010, Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT Food Science Technology* 43: 890-896.
- Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V., Caliari, V., Genovese, M.I., Goncalves, A.S.S., and Fett, R., 2011, Phenolic compounds content and Antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil, 174–179 pp.
- Rodriguez, H., Curiel J. A., Landete, J. M., Rivas, B., Felipe, F. L., Cordoves, C. G., Mancheno, J. M. and Munoz, R., 2009, Food phenolics and lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 132: 79-90 pp.
- Romero, E.G., 2005, Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis v vinifera* varieties grown in a warm climate, 13(3): 3492–3510p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Ruiz-Barba, J.L., Garrido-Fernández, A. and Jiménez-Díaz, R., 1991,** Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against *Lactobacillus plantarum*, *Letters in Applied Microbiology*, 12: 65–68 pp.
- Stead, D., 1993,** The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 75: 135–141.
- Sofos, J.N. and Geornaras, I., 2010,** Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products, *Meat Science*, 86: 2-14 pp.
- Saldamlı, İ., 2007,** Gıda Kimyası, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 463-492 s.
- Sene, L., Arruda, P.V., Oliveira, S.M.M., and Felipe M.G.A., 2011,** Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*, *Brazily Journal Microbiology*, 42(3): 1141–1146 pp.
- Seven, A. ve Ayhan, K., 1999,** Starter kültür kullanılarak tamponlanmış ortamda havuç turşusu üretimi, XI. Kükem kongresi, 23(2): 9 s.
- Shahidi, F. and Naczk, M., 1995,** Food Phenolics, Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 199-225 pp.
- Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1998,** Principles of instrumental analysis, fifth edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing”, US, *Bilim Yayıncılık*, Ankara.
- Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G., and Straub, R. J., 2001,** Lactic acid properties, applications and production *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92(6), 518–523 pp.
- Sroka, Z., and Cisowski, W., 2003,** Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology* 41, 753-758.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S.J., 1995,** Principles of Fermentation Technology, Butterworth- Heinemann Elsevier Science, İngiltere.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Stead, D.**, 1993, The effect of hydroxycinnamic acids on the growth winespoilage lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 75: 135-141 pp.
- Szwajgier, D., Waśko, A., Targoński, Z., Niedźwiadek, M., and Bancarzewska, M.**, 2010, The Use of a Novel Ferulic Acid Esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the Release of Phenolic Acids from Brewer's Spent Grain, *Journal of the Institute of Brewing* 116(3), 293–303 pp.
- Tangüler, H., Yağmur, G., and Erten, H.**, 2007b, Mitokondriyal mutantların bira aroma maddeleri üzerine etkisi, *Gıda*, 32 (5): 251-257 s.
- Tapiero, H., Tew, K. D., Nguyen, B. A.G., and Mathe, G.**, 2002, Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 200-207.
- Telefoncu, A.**, 1995, Biyoteknoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No:152, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 357 s.
- Temiz, A. ve Yılmaz, R.**, 2003, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(3): 19-42 s.
- Toğrul, T.**, 1995, Enstrumental Analiz , Ankara Üniversitesi, Ankara, 19-38 s.
- Tunail, N.**, 2009, Mikrobiyoloji, Pelin Ofset, Ankara, 448 s.
- Türker, İ. ve Canbaş, A.**, 1995, Malt ve bira teknolojisi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No: 4 Ders Kitapları Yayın No: 2, Adana.
- Türker, İ., and Canbaş, A.**, 2001, Malt ve bira teknolojisi, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No : 4, Ders Kitapları Yayın No : A-2, Adana, 300 ss.
- Tüzün, C.**, 2002, Biyokimya, 4. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., and Vázquez, M.**, 2002, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(5), 505–512 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Tyree, R. W., Clausen, E. C., and Gaddy, J. L., 1990, *Biotechnology Letters* 12(1), 51–56 pp.
- Valenzuela, M. B., Jones, C. W., and Agrawal, P. K., 2006. Energy fuels 20 1744–1752 pp.
- Wee, Young. Jung., Kim, Jin. Nam., and Ryu, Hwa.Won., 2006, Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications, *Food Technology Biotechnolology*, 44 (2) 163–172 pp.
- Whiting, C.G. and Coggins, R.A., 1969, Quinate metabolism by lactobacilli, *Biochemical Journal*, 115: 60-61 pp.
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P. and Christakopoulos, P., 2008, Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*, *Bioresource Technology* 99 :5427–5435 pp.
- XU, P., HUA, D. and MA, C., 2007, Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production, *Trends in Biotechnology*, 25: 571-576 pp.
- Zannini, Emanuele., 2012, Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment, *European Food Research and Technology* 235,767–778 pp.
- Zhang, y., Rossow, W.B., Stackhouse, P., Romanou, A. and Wielicki, B. A., 2007, Decadal variations of global energy and ocean heat budget and meridional energy transports inferred from recent global data sets, *Journal of Geophysical Research*, 112 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Sakine AYHAN 1988 yılında Bergama’da doğmuş ve İlk, Orta ve Lise öğretimini burada tamamlamıştır. 2006-2012 yılları arasında lisans eğitimini Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde tamamlamıştır. 2012 yılında Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde Doç.Dr. Hatice Kalkan Yıldırım danışmanlığında Biyoteknoloji bilim dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

EKLER

EK 1 HPLC Analizleri

EK 1.1 Sırası ile glukoz, arabinoz, ksiloz standartları, örnek ve örnek+standart pikleri

EK 1.2 Laktik asit standart ve örnekte bulunan miktarını gösteren pikler

EK 1.3 Fenolik asit standartlarına ait ve örnekte bulunan miktarını gösteren pikler

EK 2 Fenolik asitler için ANOVA Analizleri

EK 2.1 Gallik aside ait LSD değerleri

EK 2.2 p-OH aside ait LSD değerleri

EK 2.3 p- Kumarik aside ait LSD değerleri

EK 2.4 Ferulik aside ait LSD değerleri

EK 2.5 Şiringik aside ait LSD değerleri

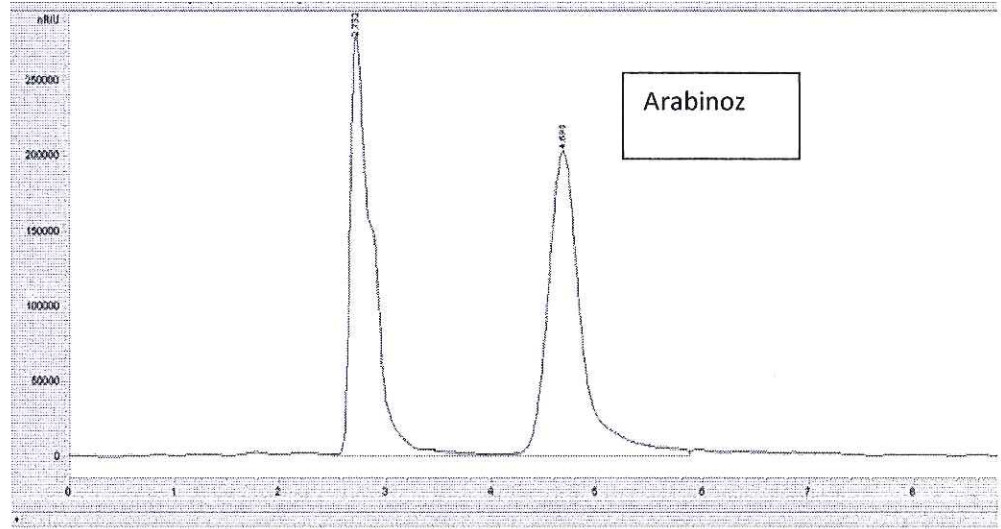
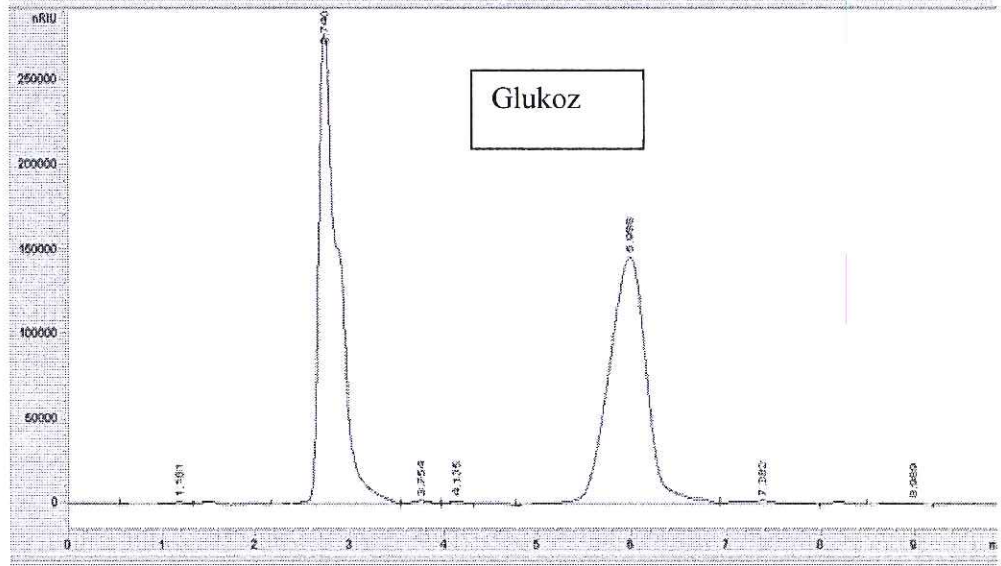
EK 2.6 Sinapik aside ait LSD değerleri

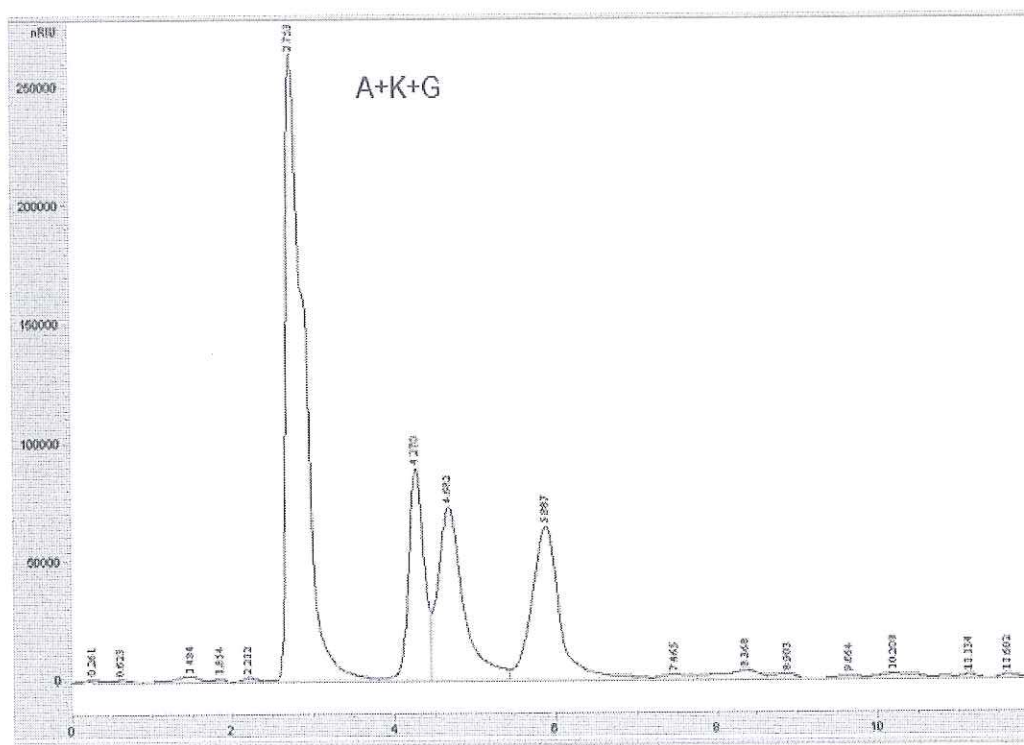
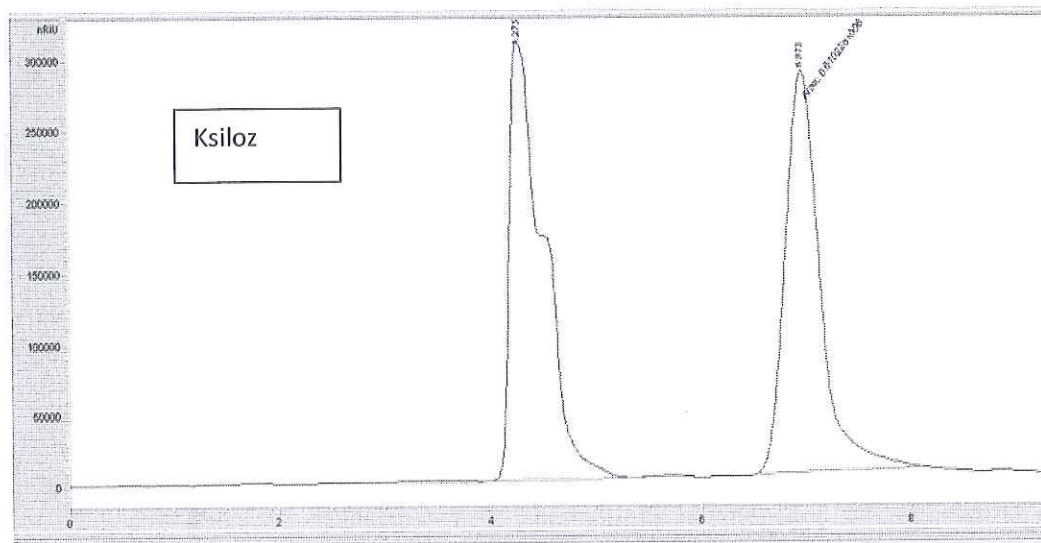
EK 2.7 Vanilik aside ait LSD değerleri

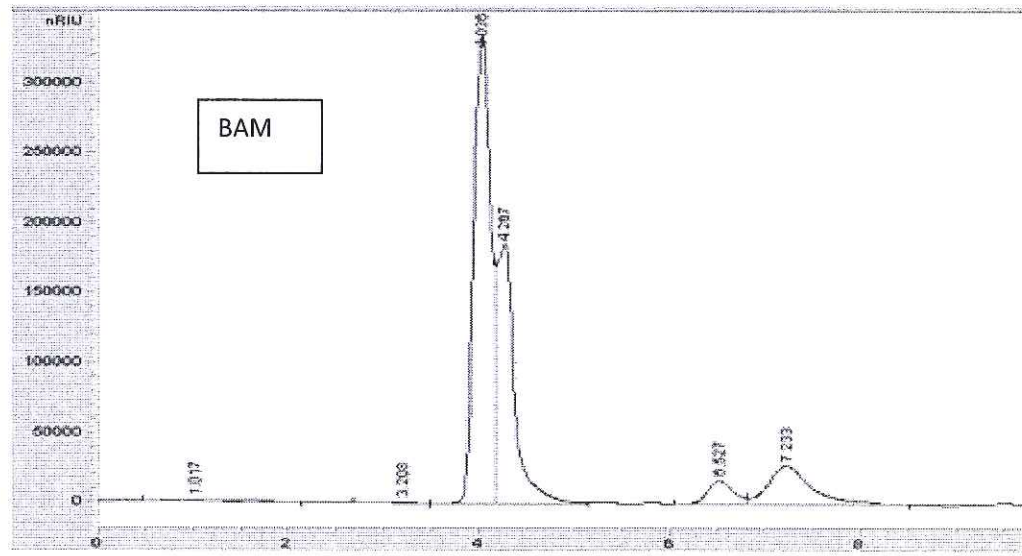
EK 3 Laktik asit için ANOVA Analizleri

EK 1 HPLC Analizleri

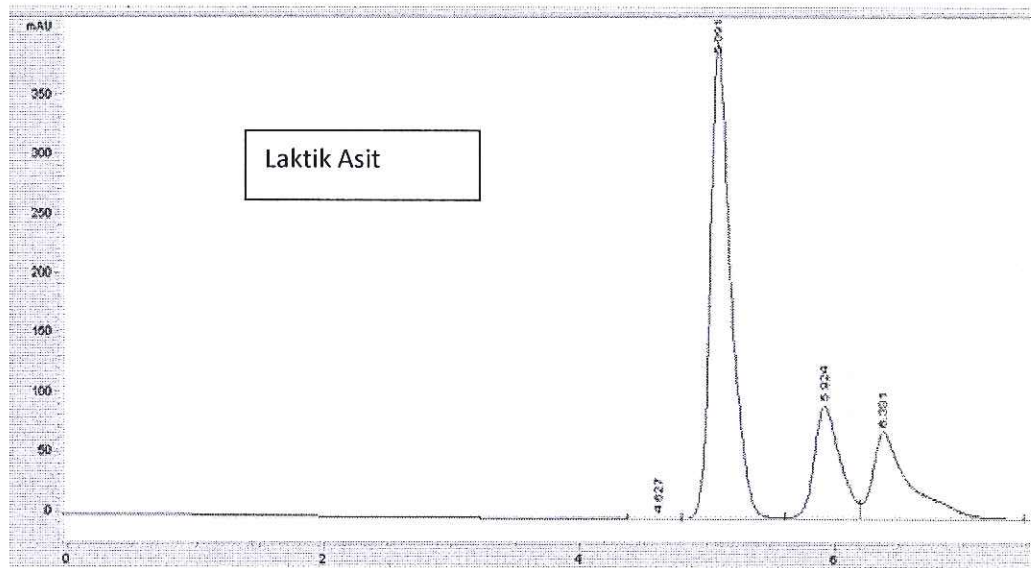
EK 1.1 Sırası ile glukoz, arabinoz, ksiloz standartları, örnek ve örnek+standart pikleri

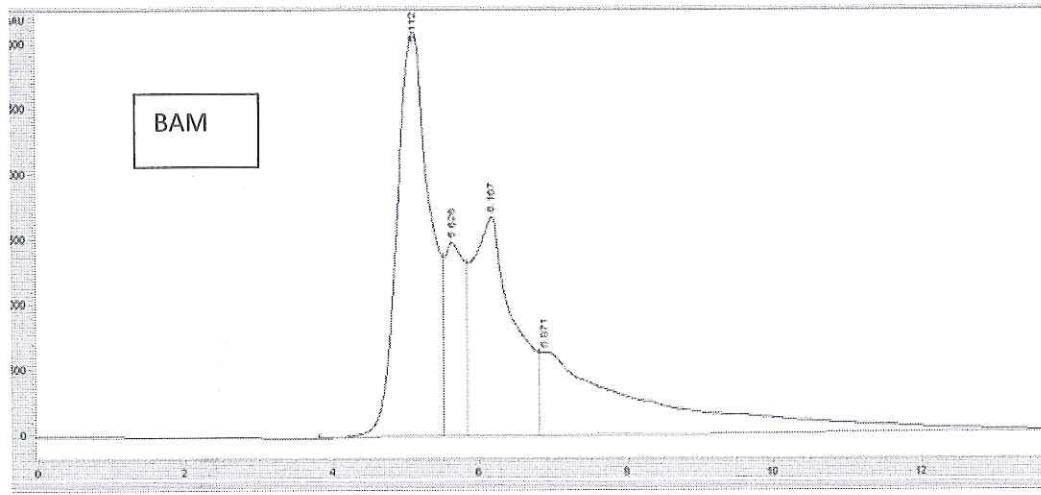




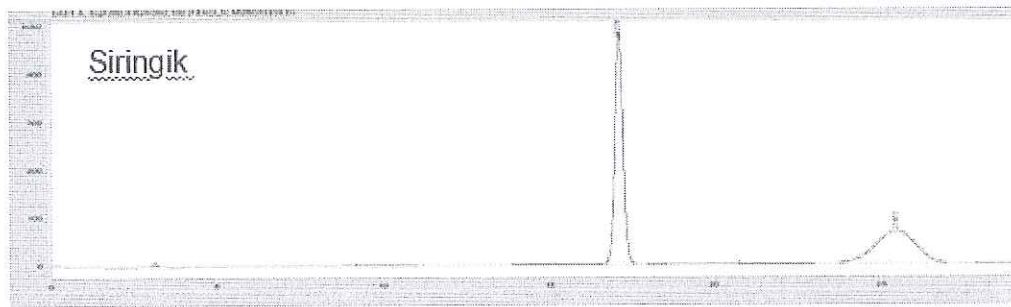
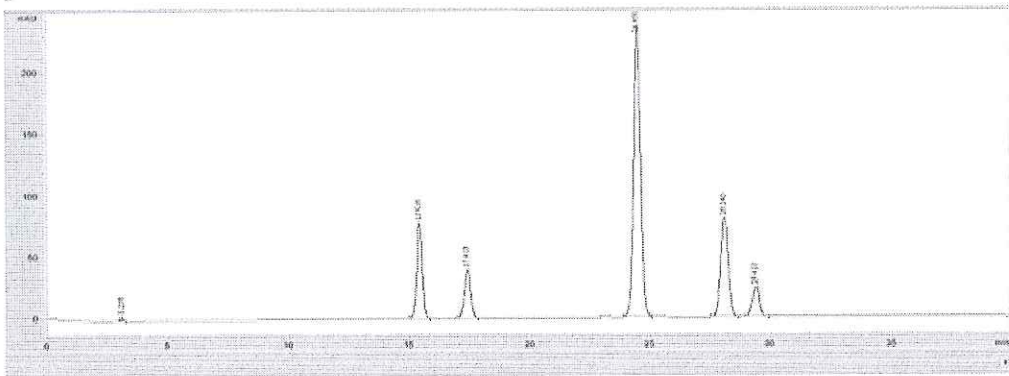


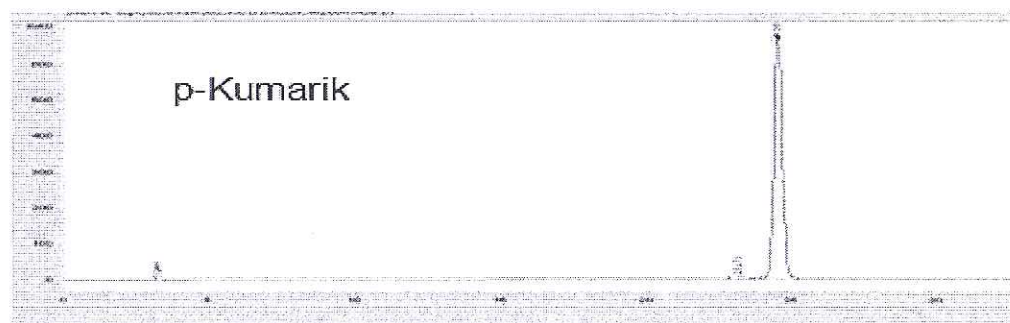
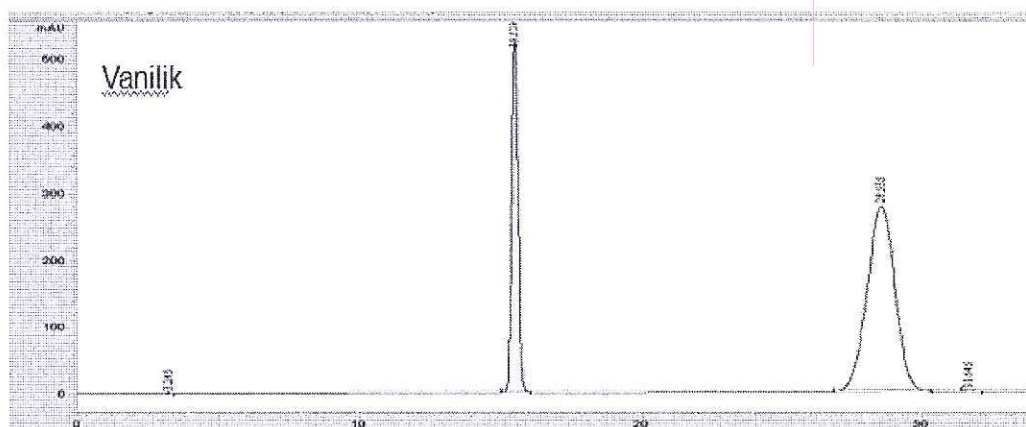
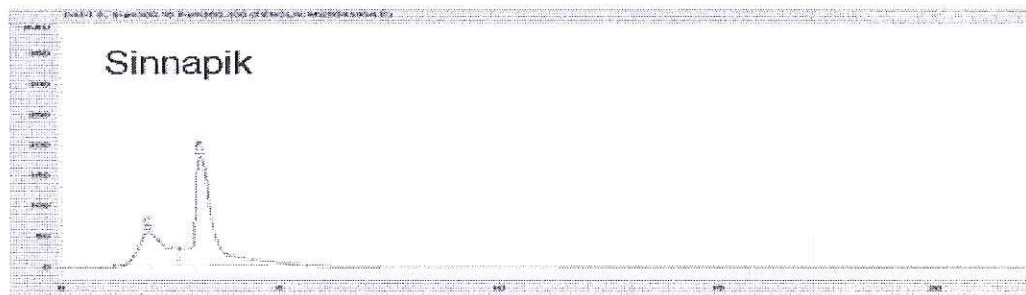
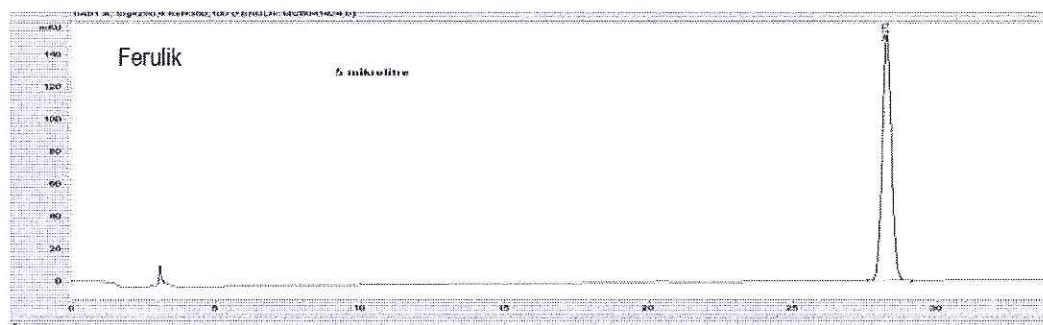
EK 1.2 Laktik asit standart ve örnekte bulunan miktarını gösteren pikler

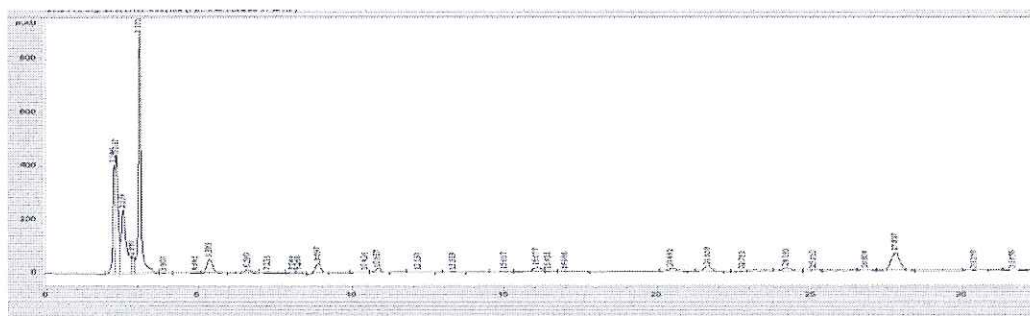




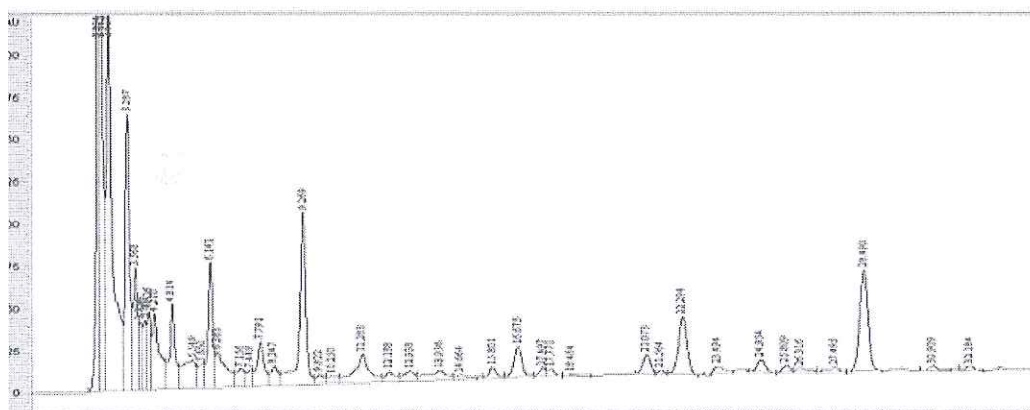
EK 1.3 Fenolik asit standartlarına ait ve örnekte bulunan miktarını gösteren pikler



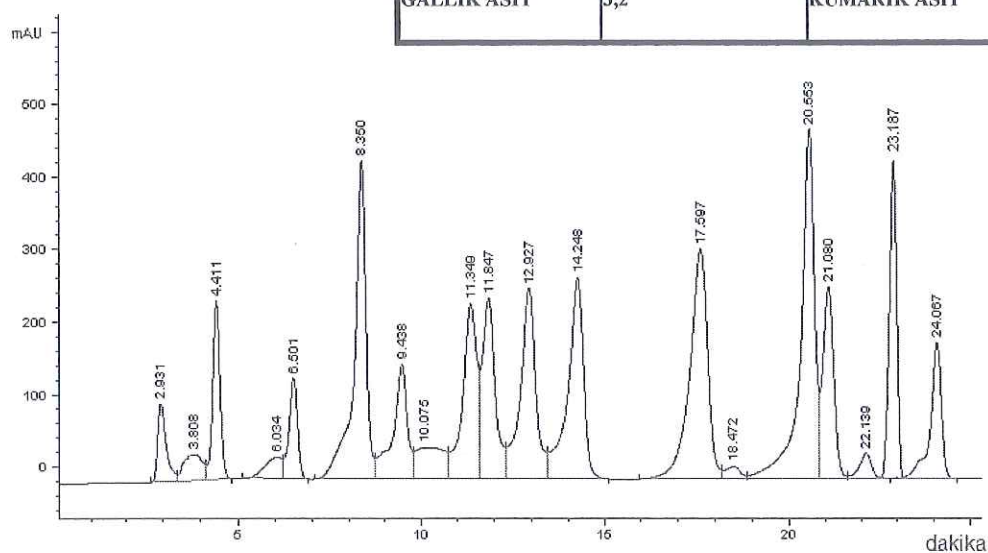




C



Arlkanyazyma	Dakika	Arlkanyazyma	Dakika
ŞİRİNJİK	17,076	FERULİK ASİT	28,2
SİNNAPİK	3,174	SİNNAMİK ASİT	28,74
HİDROKSİBENZOİK	14,5	VANİLİK ASİT	15,45
GALLİK ASİT	3,2	KUMARİK ASİT	24,316



EK 2 Fenolik asitler için ANOVA Analizleri

EK 2.1 Gallik aside ait LSD değerleri

LSD test; variable Gallik Asit (sakine bira atık)																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between M/S = 9728.1, df = 120.00																	
Cell No.	Suş	Azot Kaynağı	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
			296.00	61.482	193.30	128.71	100.36	384.67	79.356	321.01	155.91	126.96	322.33	70.767	292.53	143.10	116.46
1	SÜŞ 1	Maya ekstraktı		0.000002	0.029086	0.000467	0.000050	0.058910	0.000008	0.591622	0.003156	0.000410	0.572202	0.000004	0.940589	0.001322	0.000183
2	SÜŞ 1	Mısır islatma suyu	0.000002		0.005378	0.150803	0.404776	0.000000	0.701363	0.000000	0.044471	0.161665	0.000000	0.842064	0.000002	0.081742	0.239407
3	SÜŞ 1	Pepton	0.029086	0.005378		0.167359	0.047867	0.000071	0.015701	0.006947	0.422903	0.156203	0.006401	0.009513	0.034855	0.262449	0.100998
4	SÜŞ 1	Üre	0.000467	0.150803	0.167359		0.543108	0.000000	0.290586	0.000066	0.559642	0.969944	0.000059	0.215102	0.000604	0.757500	0.792550
5	SÜŞ 1	Tripton	0.000050	0.404776	0.047867	0.543108		0.000000	0.652330	0.000006	0.234495	0.568323	0.000005	0.525737	0.000067	0.359767	0.729744
6	SÜŞ 2	Maya ekstraktı	0.058910	0.000000	0.000071	0.000000	0.000000		0.000000	0.173532	0.000003	0.000000	0.182570	0.000000	0.049514	0.000001	0.000000
7	SÜŞ 2	Mısır islatma suyu	0.000000	0.701363	0.015701	0.290586	0.652330	0.000000		0.000001	0.182272	0.308007	0.000001	0.853755	0.000011	0.172937	0.426486
8	SÜŞ 2	Pepton	0.591622	0.000000	0.006947	0.000066	0.000006	0.173532	0.000001		0.000549	0.000057	0.977360	0.000000	0.541373	0.000208	0.000024
9	SÜŞ 2	Üre	0.003156	0.044471	0.422903	0.559642	0.234495	0.000003	0.102272	0.000549		0.534621	0.000498	0.069543	0.003957	0.783378	0.397797
10	SÜŞ 2	Tripton	0.000410	0.161665	0.156203	0.969944	0.568323	0.000000	0.308007	0.000057	0.534621		0.000051	0.229236	0.000530	0.729028	0.821718
11	SÜŞ 3	Maya ekstraktı	0.572202	0.000000	0.006401	0.000059	0.000005	0.182570	0.000001	0.977360	0.000498	0.000051		0.000000	0.522793	0.000188	0.000021
12	SÜŞ 3	Mısır islatma suyu	0.000004	0.842064	0.009513	0.215102	0.525737	0.000000	0.853755	0.000000	0.069543	0.229236	0.000000		0.000005	0.122409	0.327753
13	SÜŞ 3	Pepton	0.940589	0.000002	0.034855	0.000604	0.000067	0.049514	0.000011	0.541373	0.003957	0.000530	0.522793	0.000005		0.001682	0.000240
14	SÜŞ 3	Üre	0.001322	0.081742	0.262449	0.757500	0.359767	0.000001	0.172937	0.000208	0.783378	0.729028	0.000188	0.122409	0.001682		0.567678
15	SÜŞ 3	Tripton	0.000183	0.239407	0.100998	0.792550	0.729744	0.000000	0.426486	0.000024	0.397797	0.821718	0.000021	0.327753	0.000240	0.567678	

EK 2.2 p-OH aside ait LSD değerleri

LSD test; variable p-OH Benzoik Asit (sakine bira atık)																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 1147.9, df = 120.00																	
Cell No.	Suş	Azot Kaynağı	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
			161.68	102.10	138.43	107.47	93.489	186.48	118.64	159.86	140.36	116.39	173.16	115.08	140.28	111.64	106.80
1	SUS 1	Maya ekstraktı		0.000294	0.148183	0.000933	0.000036	0.123118	0.000064	0.909357	0.184404	0.005370	0.473765	0.004211	0.182820	0.002177	0.000812
2	SUS 1	Mısır islatma suyu	0.000294		0.024690	0.737502	0.590784	0.000001	0.302351	0.000436	0.018158	0.372772	0.000019	0.418087	0.018369	0.551243	0.769060
3	SUS 1	Pepton	0.148183	0.024690		0.054860	0.005720	0.003204	0.217765	0.182369	0.904406	0.170085	0.031670	0.146271	0.908256	0.098093	0.049026
4	SUS 1	Üre	0.000933	0.737502	0.054860		0.383274	0.000002	0.485333	0.001356	0.041632	0.577410	0.000072	0.634509	0.042108	0.794045	0.966830
5	SUS 1	Tripton	0.000036	0.590784	0.005720	0.383274		0.000000	0.117888	0.000061	0.004006	0.154234	0.000062	0.179015	0.004065	0.257915	0.406265
6	SUS 2	Maya ekstraktı	0.123118	0.000001	0.003204	0.000002	0.000000		0.000043	0.998155	0.004604	0.000025	0.405874	0.000018	0.004539	0.000007	0.000002
7	SUS 2	Mısır islatma suyu	0.000064	0.302351	0.217765	0.485333	0.117888	0.000043		0.011076	0.176586	0.887931	0.000877	0.823673	0.178129	0.661975	0.459785
8	SUS 2	Pepton	0.909357	0.000436	0.182369	0.001356	0.000061	0.008155	0.011076		0.224514	0.007467	0.406656	0.005898	0.222682	0.003103	0.001185
9	SUS 2	Üre	0.184404	0.018158	0.904406	0.041632	0.004006	0.004604	0.176586	0.224514		0.136094	0.42184	0.116131	0.996123	0.074752	0.037740
10	SUS 2	Tripton	0.000061	0.372772	0.170085	0.577410	0.154234	0.000025	0.887931	0.007467	0.136094		0.000543	0.934712	0.137357	0.768940	0.549394
11	SUS 3	Maya ekstraktı	0.473765	0.000019	0.031670	0.000072	0.000002	0.405874	0.000877	0.406656	0.042184	0.000543		0.000409	0.041707	0.000190	0.000061
12	SUS 3	Mısır islatma suyu	0.004211	0.418087	0.146271	0.634509	0.179015	0.000018	0.823673	0.005896	0.116131	0.934712	0.000409		0.117247	0.830161	0.605219
13	SUS 3	Pepton	0.182820	0.018369	0.908256	0.042108	0.004065	0.004538	0.178129	0.222682	0.996123	0.137357	0.041707	0.117247		0.075532	0.038178
14	SUS 3	Üre	0.002177	0.551243	0.098093	0.794045	0.257915	0.000007	0.661975	0.003103	0.074752	0.768940	0.000190	0.830161	0.075532		0.762176
15	SUS 3	Tripton	0.000812	0.769060	0.049026	0.966830	0.406265	0.000002	0.459785	0.001185	0.037740	0.549394	0.000061	0.605219	0.038178	0.762176	

EK 2.3 p- Kumarik aside ait LSD değerleri

LSD test; variable p-Kumarik Asit (sakine bira atik)															
Probabilities for Post Hoc Tests															
Error: Between MS = 7532,7, df = 120,00															
Cell No.	Suş	Azot Kaynağı	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
			267,99	178,53	252,67	222,84	198,00	314,23	250,22	331,97	296,76	270,59	288,10	195,14	258,92
1	SUş 1	Maya ekstraktı		0,030724	0,708693	0,272059	0,089731	0,260608	0,664889	0,120516	0,483352	0,949436	0,623936	0,077535	0,824999
2	SUş 1	Mısır islatma suyu	0,030724		0,072496	0,280963	0,635084	0,001206	0,082295	0,000272	0,004579	0,026272	0,008445	0,685463	0,051744
3	SUş 1	Pepton	0,708693	0,072496		0,467480	0,184030	0,135005	0,952457	0,054945	0,283371	0,662138	0,388191	0,162326	0,878737
4	SUş 1	Üre	0,272059	0,280963	0,467480		0,544839	0,027356	0,504590	0,008706	0,073345	0,245543	0,113352	0,499687	0,379647
5	SUş 1	Tripton	0,089731	0,635084	0,184030	0,544839		0,005286	0,204280	0,001384	0,017301	0,078567	0,029562	0,944473	0,139100
6	SUş 2	Maya ekstraktı	0,260608	0,001206	0,135005	0,027356	0,005286		0,120325	0,665475	0,870009	0,288229	0,524206	0,004299	0,178951
7	SUş 2	Mısır islatma suyu	0,664889	0,082295	0,952457	0,504590	0,204280	0,120325		0,047981	0,257657	0,619539	0,358410	0,180778	0,831967
8	SUş 2	Pepton	0,120516	0,000272	0,054945	0,008706	0,001384	0,665475	0,870009		0,391165	0,136196	0,285792	0,001102	0,076734
9	SUş 2	Üre	0,483352	0,004579	0,283371	0,073345	0,017301	0,670009	0,257657	0,391165		0,523680	0,832812	0,014389	0,358973
10	SUş 2	Tripton	0,949436	0,026272	0,662138	0,245543	0,078567	0,288229	0,619539	0,136196	0,523680		0,669416	0,067652	0,776019
11	SUş 3	Maya ekstraktı	0,623936	0,008445	0,388191	0,113353	0,029562	0,524208	0,358410	0,285792	0,832812	0,669418		0,024868	0,477135
12	SUş 3	Mısır islatma suyu	0,077535	0,685463	0,162326	0,498687	0,944473	0,004299	0,180778	0,001102	0,014389	0,067652	0,024868		0,121689
13	SUş 3	Pepton	0,824999	0,051744	0,878737	0,379647	0,139100	0,178951	0,831967	0,076734	0,358973	0,776019	0,477135	0,121689	
14	SUş 3	Üre	0,685463	0,074677	0,988872	0,475964	0,188581	0,131483	0,963469	0,053256	0,277259	0,652157	0,380672	0,166470	0,867850
15	SUş 3	Tripton	0,151891	0,458096	0,287863	0,735463	0,788706	0,011320	0,315573	0,003226	0,833955	0,134796	0,055517	0,735687	0,224686

EK 2.4 Ferulik aside ait LSD değerleri

LSD test; variable Ferulik Asit (sakine bira atik)															
Probabilities for Post Hoc Tests															
Error: Between MS = 2266,7, df = 120,00															
Cell No.	Suş	Azot Kaynağı	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
			145,83	99,856	124,67	111,49	102,24	197,63	134,34	169,61	152,13	144,28	165,49	110,78	150,92
1	SUş 1	Maya ekstraktı		0,042683	0,347521	0,128585	0,054461	0,022711	0,609661	0,291524	0,779421	0,944858	0,382901	0,120835	0,821010
2	SUş 1	Mısır islatma suyu	0,042683		0,271159	0,605177	0,915411	0,000028	0,127001	0,002352	0,021515	0,050073	0,004126	0,627392	0,024660
3	SUş 1	Pepton	0,347521	0,271159		0,558205	0,319781	0,001492	0,667093	0,047476	0,223421	0,383974	0,071425	0,537197	0,244380
4	SUş 1	Üre	0,128585	0,605177	0,558205		0,681145	0,000199	0,310557	0,010794	0,072648	0,146643	0,017853	0,974776	0,081468
5	SUş 1	Tripton	0,054461	0,915411	0,319781	0,681145		0,000042	0,155243	0,003266	0,026098	0,063523	0,005854	0,704459	0,032063
6	SUş 2	Maya ekstraktı	0,022711	0,000028	0,001492	0,000199	0,000042		0,005822	0,214255	0,644846	0,019019	0,154676	0,000178	0,039536
7	SUş 2	Mısır islatma suyu	0,609661	0,127001	0,667093	0,310557	0,155243	0,005822		0,118734	0,429572	0,659858	0,167806	0,295809	0,461566
8	SUş 2	Pepton	0,291524	0,002352	0,047476	0,010794	0,003266	0,214255	0,118734		0,437664	0,261252	0,654582	0,009691	0,406665
9	SUş 2	Üre	0,779421	0,021515	0,223421	0,072648	0,026098	0,044846	0,429572	0,437664		0,726942	0,552915	0,067849	0,957055
10	SUş 2	Tripton	0,944858	0,050073	0,383974	0,146643	0,063523	0,019019	0,659858	0,261252	0,726942		0,346513	0,138158	0,767703
11	SUş 3	Maya ekstraktı	0,382901	0,004126	0,071423	0,017853	0,005854	0,154676	0,167806	0,854582	0,552915	0,346513		0,016248	0,517556
12	SUş 3	Mısır islatma suyu	0,120935	0,627392	0,537197	0,974776	0,704459	0,000178	0,295809	0,009891	0,067849	0,138158	0,016248		0,076189
13	SUş 3	Pepton	0,821010	0,024660	0,244380	0,081468	0,032063	0,039536	0,461566	0,406665	0,957055	0,767703	0,517556	0,076189	
14	SUş 3	Üre	0,380760	0,244777	0,949578	0,516599	0,290175	0,001829	0,713643	0,054826	0,248172	0,419298	0,081725	0,496424	0,270732
15	SUş 3	Tripton	0,231337	0,399471	0,795378	0,744056	0,461266	0,000630	0,490827	0,025467	0,140504	0,259177	0,039767	0,720282	0,155384

EK 2.5 Şiringik aside ait LSD değerleri

		LSD test variable Şiringik Asit (sakine bira atık)														
		Probabilities for Post Hoc Tests														
		Error: Between MS = 1599,5, df = 120,00														
Cell No.	Suş Azot Kaynağı	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
1	SUŞ 1 Maya ekstraktı	147,43	94,756	125,47	110,24	103,30	172,31	135,34	164,34	148,39	144,86	165,76	115,64	143,98	132,59	120,69
2	SUŞ 1 Mısırlatma suyu	0,006045	0,246128	0,060777	0,203845	0,189362	0,522481	0,371375	0,959645	0,891441	0,332835	0,094270	0,854838	0,432477	0,158492	0,171396
3	SUŞ 1 Pepton	0,006045	0,195638	0,412816	0,651117	0,000071	0,033276	0,000339	0,005214	0,008927	0,000257	0,269942	0,010162	0,046959	0,171396	0,171396
4	SUŞ 1 Üre	0,246128	0,105838	0,420887	0,241876	0,014316	0,601181	0,041295	0,226295	0,305675	0,034575	0,603227	0,327999	0,706181	0,800317	0,800317
5	SUŞ 1 Tripton	0,050777	0,412816	0,420887	0,713182	0,001302	0,185467	0,04647	0,045205	0,068775	0,003675	0,774981	0,076005	0,238145	0,580502	0,580502
6	SUŞ 2 Maya ekstraktı	0,020849	0,651117	0,241878	0,713182	0,000374	0,091683	0,001552	0,018295	0,018295	0,018295	0,018295	0,018295	0,018295	0,018295	0,018295
7	SUŞ 2 Mısırlatma suyu	0,189362	0,000071	0,014316	0,001302	0,000374	0,052152	0,126517	0,490207	0,614735	0,109255	0,298015	0,647734	0,884006	0,438341	0,438341
8	SUŞ 2 Pepton	0,522481	0,033275	0,601181	0,185467	0,091683	0,052152	0,126517	0,490207	0,614735	0,109255	0,298015	0,647734	0,884006	0,438341	0,438341
9	SUŞ 2 Üre	0,371375	0,000339	0,041295	0,004647	0,001552	0,673275	0,126517	0,398925	0,303195	0,940445	0,110955	0,282639	0,094612	0,022241	0,022241
10	SUŞ 2 Tripton	0,959649	0,005214	0,226295	0,045205	0,018295	0,208805	0,490207	0,398925	0,303195	0,940445	0,110955	0,282639	0,094612	0,022241	0,022241
11	SUŞ 3 Maya ekstraktı	0,891441	0,008927	0,305675	0,068775	0,023037	0,147805	0,614735	0,303195	0,851605	0,269585	0,123805	0,962931	0,516394	0,202235	0,202235
12	SUŞ 3 Mısırlatma suyu	0,332835	0,001257	0,034575	0,003875	0,001217	0,726583	0,109255	0,940445	0,358972	0,269685	0,006912	0,250190	0,080989	0,018351	0,018351
13	SUŞ 3 Pepton	0,094270	0,269942	0,603227	0,774981	0,513742	0,003215	0,298015	0,614735	0,109255	0,298015	0,614735	0,109255	0,298015	0,614735	0,614735
14	SUŞ 3 Üre	0,854838	0,010162	0,327999	0,076005	0,032595	0,135385	0,647734	0,282639	0,815355	0,962931	0,250190	0,135385	0,546806	0,219001	0,219001
15	SUŞ 3 Tripton	0,432477	0,046959	0,706181	0,238145	0,122815	0,037155	0,884006	0,094612	0,403525	0,516394	0,080989	0,370435	0,546806	0,528989	0,528989

EK 2.6 Sinapik aside ait LSD değerleri

		LSD test variable Sinapik Asit (sakine bira atık)														
		Probabilities for Post Hoc Tests														
		Error: Between MS = 4651,4, df = 120,00														
Cell No.	Suş Azot Kaynağı	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
1	SUŞ 1 Maya ekstraktı	212,11	155,46	204,12	194,47	176,67	244,19	200,80	226,93	222,19	207,67	230,37	197,29	210,10	213,36	194,04
2	SUŞ 1 Mısırlatma suyu	0,080582	0,804184	0,584157	0,272470	0,320414	0,725592	0,645614	0,754478	0,890283	0,571221	0,645614	0,950226	0,969185	0,575204	0,575204
3	SUŞ 1 Pepton	0,080582	0,132727	0,227353	0,510582	0,090689	0,161014	0,028073	0,404962	0,107009	0,021475	0,195692	0,091788	0,074225	0,232403	0,232403
4	SUŞ 1 Üre	0,804184	0,132727	0,764450	0,394825	0,215110	0,917871	0,479384	0,575204	0,912399	0,415945	0,832045	0,852813	0,774461	0,754478	0,754478
5	SUŞ 1 Tripton	0,584157	0,227353	0,764450	0,580351	0,124606	0,844168	0,314605	0,390262	0,682120	0,266356	0,930197	0,627673	0,557862	0,989544	0,989544
6	SUŞ 2 Maya ekstraktı	0,272470	0,510582	0,394823	0,580351	0,037605	0,454340	0,120573	0,159392	0,336877	0,097472	0,522468	0,300476	0,256075	0,589844	0,589844
7	SUŞ 2 Mısırlatma suyu	0,320414	0,090689	0,215110	0,124606	0,037605	0,179659	0,592460	0,495116	0,258229	0,668023	0,147242	0,291141	0,339471	0,121469	0,121469
8	SUŞ 2 Pepton	0,725592	0,161014	0,917871	0,844168	0,454340	0,179659	0,417817	0,507151	0,831238	0,359605	0,913219	0,772878	0,696841	0,833928	0,833928
9	SUŞ 2 Üre	0,645614	0,028073	0,479384	0,314606	0,120573	0,592460	0,417817	0,882930	0,550125	0,915134	0,358351	0,601536	0,673547	0,308381	0,308381
10	SUŞ 2 Tripton	0,754478	0,040062	0,575204	0,390262	0,159392	0,495116	0,507151	0,892830	0,652304	0,799655	0,440168	0,707574	0,783981	0,383106	0,383106
11	SUŞ 3 Maya ekstraktı	0,890283	0,107009	0,912399	0,682120	0,336877	0,258229	0,631238	0,550125	0,652304	0,481522	0,747418	0,939795	0,859845	0,672542	0,672542
12	SUŞ 3 Mısırlatma suyu	0,571221	0,021475	0,195692	0,091788	0,074225	0,232403	0,668023	0,359605	0,915134	0,799655	0,481522	0,305623	0,529652	0,597707	0,260832
13	SUŞ 3 Pepton	0,645614	0,195692	0,832045	0,930197	0,522468	0,147242	0,913219	0,358351	0,440168	0,747418	0,305623	0,690989	0,618175	0,919787	0,919787
14	SUŞ 3 Üre	0,950226	0,091788	0,852813	0,627673	0,300476	0,291141	0,772878	0,601536	0,707574	0,939795	0,529652	0,690989	0,919513	0,618420	0,618420
15	SUŞ 3 Tripton	0,969185	0,074225	0,774461	0,557862	0,256075	0,339471	0,896841	0,673547	0,783981	0,859845	0,597707	0,618175	0,919513	0,549267	0,549267

EK 2.7 Vanilik aside ait LSD değerleri

LSD test, variable Vanilik Asit (sakine bira atık)																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between IJS = 394,26, df = 120,00																	
Cell No.	Suş	Azot Kaynağı	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			76,500	63,471	71,411	64,244	64,911	82,889	66,600	75,178	71,572	69,397	79,354	62,977	74,956	73,355	68,411
1	SUŞ 1	Maya ekstraktı		0,166515	0,587876	0,192827	0,218095	0,496203	0,292332	0,887902	0,599541	0,449410	0,760925	0,151130	0,869221	0,737505	0,389215
2	SUŞ 1	Mısır ıslatma suyu	0,166515		0,397977	0,934292	0,877995	0,040171	0,738756	0,213484	0,388501	0,527901	0,092305	0,957960	0,222247	0,293086	0,598637
3	SUŞ 1	Pepton	0,587876	0,397977		0,445388	0,488757	0,222514	0,608201	0,688097	0,986296	0,829967	0,397775	0,369344	0,705602	0,835786	0,749143
4	SUŞ 1	Üre	0,192827	0,934292	0,445388		0,943335	0,048655	0,801738	0,245097	0,435250	0,583043	0,109094	0,892489	0,254768	0,332320	0,657017
5	SUŞ 1	Tripton	0,218095	0,877995	0,488757	0,943339		0,057148	0,657116	0,274906	0,478069	0,632659	0,125451	0,836621	0,285381	0,368775	0,709122
6	SUŞ 2	Maya ekstraktı	0,496203	0,040171	0,222514	0,048655	0,057145		0,084384	0,411675	0,229034	0,152065	0,705395	0,035440	0,398372	0,310492	0,124561
7	SUŞ 2	Mısır ıslatma suyu	0,292332	0,738756	0,608201	0,801738	0,857116	0,084384		0,361292	0,596257	0,766623	0,175554	0,699369	0,373823	0,471686	0,846902
8	SUŞ 2	Pepton	0,887902	0,213484	0,688097	0,245097	0,274906	0,411678	0,361292		0,700772	0,537993	0,656247	0,194898	0,981099	0,845975	0,471138
9	SUŞ 2	Üre	0,599541	0,388501	0,986296	0,435250	0,478066	0,229034	0,596257	0,700772		0,816604	0,407392	0,360301	0,718393	0,849222	0,736166
10	SUŞ 2	Tripton	0,449410	0,527901	0,829967	0,583043	0,632655	0,152065	0,766623	0,537993	0,816604		0,289535	0,494112	0,553708	0,673090	0,916320
11	SUŞ 3	Maya ekstraktı	0,760925	0,092305	0,397779	0,109094	0,125451	0,706393	0,175554	0,656247	0,407392	0,289538		0,082723	0,639240	0,522815	0,244668
12	SUŞ 3	Mısır ıslatma suyu	0,151130	0,957960	0,369344	0,892489	0,836621	0,035440	0,699369	0,194898	0,360301	0,494112	0,082723		0,203097	0,269722	0,562607
13	SUŞ 3	Pepton	0,869221	0,222247	0,705602	0,254768	0,285381	0,398372	0,373823	0,981099	0,718393	0,553708	0,639240	0,203097		0,846462	0,485795
14	SUŞ 3	Üre	0,737505	0,293086	0,835788	0,332320	0,368775	0,310493	0,471865	0,845975	0,849222	0,673090	0,522815	0,269722	0,864562		0,598309
15	SUŞ 3	Tripton	0,389215	0,598637	0,749143	0,657017	0,709122	0,124561	0,846902	0,471138	0,736166	0,916320	0,244668	0,562607	0,485795	0,598309	

EK 3 Laktik asit için ANOVA Analizleri

LSD Test; Variable: Laktik asit (sakine bira atık)			
Marked differences are significant at p < ,05000			
suş	{1}	{2}	{3}
	M=8,7988	M=11,309	M=9,9429
SUŞ 1 {1}		0,034048	0,330717
SUŞ 2 {2}	0,034048		0,245918
SUŞ 3 {3}	0,330717	0,245918	

LSD Test; Variable: Laktik asit (sakine bira atık)					
Marked differences are significant at p < ,05000					
Azot Kaynağı	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=13,170	M=8,2396	M=14,131	M=7,1441	M=7,3985
Maya ekstraktı {1}		0,000247	0,463742	0,000010	0,000021
Mısır ıslatma suyu {2}	0,000247		0,000015	0,403771	0,521299
Pepton {3}	0,463742	0,000015		0,000000	0,000001
Üre {4}	0,000010	0,403771	0,000000		0,846049
Tripton {5}	0,000021	0,521299	0,000001	0,846049	

