

HAVUÇ SUYU İÇEREN DOĞAL FERMANTASYON ORTAMINDA MUTANT
BİR *Yarrowia lipolytica* SUŞU İLE SİTRİK ASİT ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU

ŞİLAN URAK

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALINDA
YÜKSEK LİSANS DERECEŚİ İÇİN GEREKLİ ÇALIŞMALARI YERİNE
GETİREREK JÜRİ ONAYINA SUNULAN YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2013

Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Onayı

.....

Prof. Dr. Yaşar DÜRÜST

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak gerekli çalışmaları yerine getirdiğini onaylarım.

.....

Prof. Dr. Ömer ZORBA

Bölüm Başkanı

Okuduğumuz bu tezin Yüksek Lisans derecesinde bir tez olarak onaylanması, düşüncemize göre, amaç ve kalite olarak tamamen uygundur.

.....

Yrd. Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN

Tez Danışmanı

Jüri Üyeleri

1- Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

.....

2- Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR

.....

3- Yrd. Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN

.....

ÖZET

HAVUÇ SUYU İÇEREN DOĞAL FERMANTASYON ORTAMINDA MUTANT BİR *Yarrowia lipolytica* SUŞU İLE SİTRİK ASİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

URAK, Şilan

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Seda Karasu Yalçın

Mayıs, 2013, 128 Sayfa

Bu çalışmada, havuç suyu içeren doğal fermantasyon ortamında mutant bir suş olan *Yarrowia lipolytica* K-168'in üreme ve sitrik üretimi incelenmiştir. Bu ortamda, bağımsız değişken olarak seçilen başlangıç toplam şeker derişimi, başlangıç pH'ı, başlangıç irmikaltı un protein konsantratu derişimi ve sıcaklığın mayanın üreme ve sitrik asit üretimi üzerine birlikte etkileri araştırılmıştır. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak, 30 deney içeren bir tasarım oluşturulmuştur. Maksimum sitrik asit derişimi, maksimum sitrik asit üretim hızı, sitrik asit verimi, maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı ve özgül üreme hızı üzerine bu bağımsız değişkenlerin etkisi, yanıt yüzey yöntemi ile modellenmiştir. Bütün yanıtların bağımsız değişkenler ile derişimi karesel model ile ifade edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre; başlangıç toplam şeker derişiminin sitrik asit üretimini en fazla etkileyen yanıtlardan biri olduğu bulunmuştur. Başlangıç pH'ının etkisinin ise; sitrik asit üretimi ile ilgili tüm yanıtlar için önemsiz iken, özgül üreme hızı için önemli bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Sıcaklığın etkisinin, başlangıç toplam şeker derişimine bağılı olarak derişebileceği belirlenmiştir. İrmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişiminin lineer etkisinin, maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı haricindeki bütün yanıtlar için önemli olduğu bulunmuştur. Sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtların çoğunun bu bileşenin yüksek derişimlerinden olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Özgül üreme hızının ise; irmikaltı un protein konsantratu derişiminin artması ile arttığı bulunmuştur.

Yapılan nümerik optimizasyon ile; başlangıç toplam şeker derişiminin 190.83 g/L, başlangıç pH'ının 5.90, irmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişiminin 0.07 g/L ve sıcaklığın 27.86°C olduğu koşullar, optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Optimum koşulların birlikte kullanıldığı deneyde, maksimum sitrik asit derişimi, maksimum sitrik asit üretim hızı, sitrik asit verimi, maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı ve mikroorganizma özgül üreme hızı sırasıyla; 80.53 g/L, 0.374 g/L.sa, %42.21, 9.04 ve 0.0170 sa⁻¹ olarak bulunmuşlardır. Bu değerlerin optimizasyon ile öngörülen değerlere oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sitrik asit, *Yarrowia lipolytica*, yanıt yüzey yöntemi, havuç suyu, doğal fermantasyon ortamı, optimizasyon

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF CITRIC ACID PRODUCTION BY A MUTANT STRAIN OF *Yarrowia lipolytica* IN NATURAL FERMENTATION MEDIUM CONTAINING CARROT JUICE

URAK, Şilan

MSc, Food Engineering Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Seda Karasu Yalçın

May, 2013, 128 pages

In this study, growth and citric acid production of a mutant strain, *Y. lipolytica* K-168 was investigated in a natural fermentation medium containing carrot juice. In this medium, interactive effects of selected independent variables; initial total sugar concentration, initial pH, initial concentration of undersized semolina protein concentrate and temperature, on the growth and citric acid production of the yeast were investigated. An experimental design including 30 experiments was conducted by using the method of central composite design. Modelling the effects of these independent variables on maximum citric acid concentration, maximum citric acid production rate, citric acid yield, the ratio of maximum citric acid concentration to maximum isocitric acid concentration and specific growth rate were performed by response surface methodology. The variations of all of the responses with the independent variables were defined by a quadratic model. According to the results of variance analysis, initial total sugar concentration was found as one of the most important responses affecting citric acid production. The effect of initial pH was found as insignificant for the responses related to citric acid production, while it was found as significant for specific growth rate. It was determined that the effect of temperature changed by the initial sugar concentration. The linear effect of initial concentration of undersized semolina protein concentrate was found as significant for all of the responses except the ratio of maximum citric acid concentration to maximum isocitric acid concentration. It was determined that most of the responses related to citric acid production were adversely affected by high concentrations of this component. However, the specific growth rate was found to increase by the increase in initial concentration of undersized semolina protein concentrate.

By the numeric optimization performed; the conditions with 190.83 g/L initial sugar concentration, 5.90 initial pH, 0.07 g/L initial concentration of undersized semolina protein concentrate and 27.86°C were determined as optimum conditions. In the experiment in which optimum conditions were used together, maximum citric acid concentration, maximum citric acid production rate, citric acid yield, the ratio of maximum citric acid concentration to maximum isocitric acid concentration and specific growth rate were found as; 80.53 g/L, 0.374 g/L.h, 42.21%, 9.04 and 0.017 h⁻¹, respectively. These values were determined as very similar to the predicted values by the optimization

Key Words: Citric acid, *Yarrowia lipolytica*, response surface methodology, carrot juice, natural fermentation medium, optimization

TEŞEKKÜR

Desteğini, yardımını ve samimiyetini benden esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim süresince bana karşı hep yol gösterici olan, karşılaştığım beklenmedik problemlerin çözümünde sakince çözüm önerileri getiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda Karasu Yalçın'a,

Bu tez çalışmasında kullanılan *Yarrowia lipolytica* K-168'in ana suşu olan 57 suşunu bölümümüze sağlayarak, bu çalışmanın yapılmasına vesile olan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Z. Yeşim Özbaş'a,

Çalışmada kullanılan irmikaltı un protein konsantratını sağlayarak bu çalışmaya katkıda bulunan Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Erkan Yalçın'a,

Çalışmada sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi aşamasındaki değerli görüşleri ve yardımları için Hacettepe Üniversitesi İstatistik Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Özgür Yeniay'a,

BAP-2010.09.01.339 numaralı araştırma projesi ile bu tez çalışmasını destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına,

Çalışma esnasında havuç suyunun kimyasal analizlerinin yapılması sırasındaki yardımlarından dolayı Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim görevlisi Sayın Ahmet Yaman'a,

Proje ve tez aşamalarının sürdüğü yoğun ve stresli dönemimde beni yüreklendiren ve yanımda olan arkadaşlarıma,

Doğduğum günden itibaren beni hep en iyiye yönlendiren, maddi ve manevi desteklerini bir an olsun esirgemeyen, bulduğum konumun mimarı olan değerli annem, babam ve kardeşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Mikroorganizma.....	34
3.1.2. Besiyerleri.....	34
3.1.3. Havuç suyu.....	35
3.1.4. İrmikaltı un protein konsantratu.....	35
3.1.5. Deney düzeneği.....	35
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Havuç suyunun bazı kimyasal özelliklerinin belirlenmesi..	36
3.2.2. Fermantasyon ortamının hazırlanması ve aşılama.....	36
3.2.3. Sitrik asit analizi.....	37
3.2.4. İzositrik asit analizi.....	37
3.2.5. Glukoz ve fruktoz analizi.....	37

3.2.6. pH ölçümü.....	38
3.2.7. Maya sayısının belirlenmesi.....	38
3.2.8. Deney tasarımının oluşturulması.....	38
3.2.9. Bağımlı değişkenlerin (yanıtların) hesaplanması.....	40
3.2.9.1. Sitrik asit üretim hızı (Verimlilik).....	41
3.2.9.2. Sitrik asit verimi.....	41
3.2.9.3. Özgül üreme hızı.....	42
3.2.10. Bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi.....	42
3.2.11. Optimizasyon.....	43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	44
4.1. Havuç Suyunun Bazı Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	44
4.2. Deney Tasarımı ve Yanıtların Oluşturulması.....	45
4.3. Çeşitli Parametrelerin Bağımlı Değişkenler Üzerine Etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmesi.....	57
4.3.1. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi.....	57
4.3.2. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi.....	64
4.3.3. Sitrik asit verimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi.....	71
4.3.4. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi.....	78
4.3.5. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi.....	85
4.4. Yanıt Yüzey Yöntemi ile Yapılan Modellemelere Ait Genel	

Değerlendirme.....	93
4.5. Optimizasyon.....	97
5. SONUÇLAR.....	104
KAYNAKLAR.....	107
EKLER.....	117
EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ.....	117
EK 2. SİTRİK ASİT ANALİZİ.....	119
EK 3. MİKROORGANİZMA ÖZGÜL ÜREME HIZININ HESAPLANMASI.....	121
EK 4. ÖRNEK KONTUR GRAFİKLERİ.....	122
EK 5. HER BİR YANIT İÇİN DENEYSEL DEĞERLERE KARŞI TAHMİNSEL DEĞERLERİ GÖSTEREN GRAFİKLER.....	123
EK 6. İSTENEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU İLE YAPILAN OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER.....	126
EK 7. İSTENEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU İLE YAPILAN OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN GRAFİK.....	127
ÖZGEÇMİŞ.....	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Sitrik asit (Krebs) Döngüsü.....	11
Şekil 2.2. Üç faktörlü bir merkezi karma tasarımın şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.1. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimleri.....	48
Şekil 4.2. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimleri.....	48
Şekil 4.3. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimleri.....	49
Şekil 4.4. “19-24” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimleri.....	49
Şekil 4.5. “25-30” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimleri.....	50
Şekil 4.6. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri.....	50
Şekil 4.7. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri.....	51
Şekil 4.8. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri.....	51
Şekil 4.9. “19-24” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri.....	52
Şekil 4.10. “25-30” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri.....	52
Şekil 4.11. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri.....	53
Şekil 4.12. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri.....	53
Şekil 4.13. Şekil 4.5. “25-30” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimleri.....	54
Şekil 4.14. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri.....	54

Şekil 4.15. “25-30” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri.....	55
Şekil 4.16. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH’ının etkileri.....	59
Şekil 4.17. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve ırmıkaltı un protein konsantratu başlangıç derişiminin etkileri.....	60
Şekil 4.18. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri.....	61
Şekil 4.19. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç pH’ı ve ırmıkaltı un protein konsantratu başlangıç derişiminin etkileri.....	62
Şekil 4.20. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç pH’ı ve sıcaklığın etkileri.....	63
Şekil 4.21. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine ırmıkaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi ve sıcaklığın etkileri.....	63
Şekil 4.22. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH’ının etkileri.....	66
Şekil 4.23. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkileri.....	67
Şekil 4.24. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri.....	68
Şekil 4.25. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine İUP başlangıç derişimi ve başlangıç pH’ının etkileri.....	69
Şekil 4.26. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine sıcaklık ve başlangıç pH’ının etkileri.....	70
Şekil 4.27. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine sıcaklık ve İUP başlangıç derişiminin etkileri	71
Şekil 4.28. Sitrik asit verimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH’ının etkileri.....	72
Şekil 4.29. Sitrik asit verimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkileri.....	74
Şekil 4.30. Sitrik asit verimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri.....	75
Şekil 4.31. Sitrik asit verimi üzerine İUP başlangıç derişimi ve başlangıç	

pH'nın etkileri.....	76
Şekil 4.32. Sitrik asit verimi üzerine sıcaklığın ve başlangıç pH'nın etkileri.....	77
Şekil 4.33. Sitrik asit verimi üzerine sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri.....	78
Şekil 4.34. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın etkileri	79
Şekil 4.35. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişimin etkileri.....	81
Şekil 4.36. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri.....	82
Şekil 4.37. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç pH'nın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri.....	83
Şekil 4.38. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine sıcaklığın ve başlangıç pH'nın etkileri.....	84
Şekil 4.39. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri.....	85
Şekil 4.40. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın etkileri.....	88
Şekil 4.41. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişimin etkileri.....	89
Şekil 4.42. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri.....	90
Şekil 4.43. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç pH'nın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri.....	91
Şekil 4.44. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç pH'nın ve sıcaklığın etkileri.....	92
Şekil 4.45. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri.....	93

Şekil 4.46. <i>Y. lipolytica</i> K-168 ile, havuç suyu içeren doğal fermantasyon ortamında, optimum koşullarda sitrik asit derişimi, maya sayısı ve toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri.....	100
Şekil Ek 2.1. Sitrik asitin, asetik anhidrit ile verdiği tepkime.....	119
Şekil Ek 2.2. Sitrik asit çalışma doğrusu.....	120
Şekil Ek 3.1. 5 numaralı deney için oluşturulan lnN-t grafiği.....	121
Şekil Ek 4.1. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ının etkisini gösteren kontur grafiği.	122
Şekil Ek 4.2. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç pH'ı ve sıcaklığın etkisini gösteren kontur grafiği.....	122
Şekil Ek 5.1. Maksimum sitrik asit derişimi (Y_1) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler.....	123
Şekil Ek 5.2. Maksimum sitrik asit üretim hızı (Y_2) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler.....	123
Şekil Ek 5.3. Sitrik asit verimi (Y_3) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler.....	124
Şekil Ek. 5.4. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı (Y_4) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler.....	124
Şekil Ek 5.5. Özgöl üreme hızı (Y_5) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler.....	125
Şekil Ek 6.1. Design Expert® 8.0.7.1 programında nümerik optimizasyonda elde edilen çözümlere ait görüntüler.....	126
Şekil Ek 7.1. İstenen hedefe ulaşma fonksiyonunun, başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ı ile değişimi ($X_3 = 0.07$ g/L; $X_4 = 27.86^\circ\text{C}$).....	127

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. 2006-2012 yılları arasında Türkiye'nin sitrik asit ihracat ve ithalat miktarları ve maliyetleri.....	8
Çizelge 2.2. Sitrik asit üretebilen mikroorganizmalar “1-6” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değışimleri...	10
Çizelge 3.1. Merkezi karma tasarımda kullanılan bağımsız değışkenler.....	40
Çizelge 4.1. Deneylerde kullanılan havuç suyunun bazı bileşim özellikleri.....	45
Çizelge 4.2. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımımda bağımsız değışkenlerin gerçek değeri 46	46
Çizelge 4.3. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımımda bağımsız değışkenlerin kodlanmış değeri..... 47	47
Çizelge 4.4. Deneylerde hesaplanan maksimum sitrik asit derişimleri (Y_1), maksimum sitrik asit üretim hızları (Y_2), sitrik asit verimleri (Y_3), maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranları (Y_4) ve özgül üreme hızları (Y_5)..... 56	56
Çizelge 4.5. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), irmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) maksimum sitrik asit derişimi (Y_1) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları..... 58	58
Çizelge 4.6. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), irmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) maksimum sitrik asit üretim hızı (Y_2) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları..... 65	65
Çizelge 4.7. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), irmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) sitrik asit verimi (Y_3) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları..... 72	72
Çizelge 4.8. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), irmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4), $C_{sm}/C_{i\ m}(Y_4)$ üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları..... 79	79
Çizelge 4.9. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), irmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi (X_3) ve	

sıcaklığın (X_4), mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_5) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları.....	87
Çizelge 4.10. Sitrik asit üretiminin optimizasyonunda kullanılan değişkenlere ait hedef ile minimum ve maksimum değerler.....	98
Çizelge 4.11. Sitrik asit üretimi için belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için getirilen yaklaşımlar.....	99
Çizelge 4.12. <i>Y. lipolytica</i> K-168 ile, havuç suyu içeren doğal fermantasyon ortamında, optimum koşullarda yapılan çalışmada, yanıtlar için elde edilen değerler.....	101
Çizelge Ek 1.1. Deneylerde kullanılan YM agarın bileşen ve derişimleri.....	117
Çizelge Ek 1.2. Deneylerde kullanılan üreme ortamının bileşen ve derişimleri	117
Çizelge Ek 1.3. Deneylerde kullanılan fermantasyon ortamının bileşen ve derişimleri.....	118

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$C_{i\ m}$	Maksimum izositrik asit derişimi (g/L)
$C_{s\ m}$	Maksimum sitrik asit derişimi (Y_1 ; g/L)
$C_{s\ m}/C_{i\ m}$	Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı (Y_4)
F	F değeri
k	Bağımsız değışken sayısı
N	Mikroorganizma sayısı (cfu/mL)
P	Anlamlılık düzeyi
R^2	Belirtme katsayısı
$r_{s\ m}$	Maksimum sitrik asit üretim hızı (Y_2 ; g/L.sa)
S	Substrat derişimi (g/L)
S_o	Başlangıç substrat derişimi (g/L)
t	Zaman (sa)
$\ddot{U}$	Ürün derişimi (g/L)
X_1	Başlangıç toplam şeker derişimi (g/L)
X_1^2	Başlangıç toplam şeker derişiminin karesel etkisi
X_1X_2	Başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ı etkileşimi
X_1X_3	Başlangıç toplam şeker derişimi ve irmikaltı un protein konsantratı başlangıç derişimi etkileşimi
X_1X_4	Başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklık etkileşimi
X_2	Besiyeri başlangıç pH'ı

X_2^2	Besiyeri başlangıç pH'ının karesel etkisi
X_2X_3	Besiyeri başlangıç pH'ı ve ırmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi etkileşimi
X_2X_4	Besiyeri başlangıç pH'ı ve sıcaklık etkileşimi
X_3	İrmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi (g/L)
X_3^2	İrmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişiminin karesel etkisi
X_3X_4	İrmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi ve sıcaklık etkileşimi
X_4	Sıcaklık (°C)
X_4^2	Sıcaklığın karesel etkisi
x_i	Bağımsız değişkenin kodlanmış değeri
X_i	Karesel modeldeki lineer ifadeler için bağımsız değişkenin simgesi
X_j	Karesel modeldeki karesel ifadeler için bağımsız değişkenin simgesi
X_o	Bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değeri
y	Karesel modeldeki yanıt değeri
$Y_{\bar{u}/s_o}$	Sitrik asit verimi (Y_3 , %)
β_{ij}	Karesel modeldeki iki terimli etkileşim katsayısı
β_j	Karesel modeldeki lineer katsayı
β_{jj}	Karesel modeldeki ikinci dereceden katsayı
β_o	Karesel modeldeki sabit katsayı
μ	Mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_5 ; sa ⁻¹)

Kısaltmalar

AMP	Adenozin monofosfat
ANOVA	Varyans analizi
GDP	Guanizin difosfat
GTP	Guanizin trifosfat
İUP	İrmikaltı un protein konsantratu
K.O.	Kareler ortalaması
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
S.D.	Serbestlik derecesi
TCA	Trikarboksilik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

Birçok canlının oksijenli ortamdaki enerji üretim metabolizması sırasında ortaya çıkan ara ürünlerden biri olan sitrik asit, özellikle gıda endüstrisi başta olmak üzere, ilaç, kimyasal, kozmetik gibi bir çok endüstri dalında geniş kullanım alanına sahip bir organik asittir. Dünyada sitrik asitin %99'unun fermantasyon yolu ile üretildiği bildirilmektedir. Mikrobiyel sitrik asit üretiminin, endüstriyel etil alkol üretiminden sonra, dünyada ikinci büyük fermantasyon prosesi olduğu belirtilmektedir (Dhillon ve ark., 2013).

Sitrik asite duyulan ihtiyacın dünya çapında yıllık 1.7 milyon tonu aştığı (Dhillon ve ark., 2013) ve her yıl bu ihtiyacın %5 oranında arttığı bildirilmektedir (Liu ve ark., 2013; Dhillon ve ark., 2011c; Dhillon ve ark., 2013). Türkiye'de de sitrik asite duyulan ihtiyacın ve buna bağlı olarak ithal edilen sitrik asit miktarının her geçen yıl arttığı bilinmektedir. Son altı yılda Türkiye'ye ithal edilen sitrik asit miktarının yaklaşık iki kat arttığı bildirilmiştir (Dış Ticaret Raporları, TÜİK, 2013).

Mikrobiyel sitrik asit üretiminde, *Aspergillus niger*'in farklı suşlarının kullanıldığı proseslerin oldukça yaygın olduğu bilinmekte ve bu proseslerin literatürde “geleneksel üretim” olarak adlandırıldığı görülmektedir (Rymowicz ve ark., 2010). Ancak son yıllarda, *Yarrowia lipolytica*'nın da diğer bir potansiyel sitrik asit üreticisi olarak ilgi gördüğü ve endüstriyel sitrik asit üretiminde kullanıldığı bilinmektedir (Liu ve ark., 2013). *Y. lipolytica*'nın, üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmış,

biyoteknolojik açıdan önemli ve *Yarrowia* cinsini temsil eden tek tür olduğu belirtilmektedir (Öztürk Yalçın, 2007). Literatürde *Y. lipolytica* suşlarının, hücre dışı lipolitik ve proteolitik aktivitelerinin güçlü olması nedeniyle daha çok yağ, protein ve şeker içeren ortamlardan izole edildiği bildirilmektedir. Bu nedenle, en çok peynir gibi süt ürünlerinden, bunun yanında soya sosu ve et içeren salatalardan da izole edilebildiği bilinmektedir (Fröhlich-Wyder, 2003). *Y. lipolytica*'nın süt ürünlerinde en sık rastlanan maya türleri arasında yer aldığı ve peynir teknolojisinde iyi bir olgunlaştırma ajanı olduğu belirtilmektedir. Zorunlu aerobik olan bu maya türünün, laktik asit ve sitrik asiti kullanabildiği ve bu asitlerin derişimlerinin; %1 olduğu ortamlarda da gelişebildiği belirtilmektedir. Dimorfik bir maya olan *Y. lipolytica*'nın optimum gelişme sıcaklığının; 25-30 °C olduğu, ancak bu türün 5-10°C ile 33-37 °C'de de gelişebildiği bildirilmektedir (Fröhlich-Wyder, 2003; Karasu-Yalçın ve ark., 2011). Bu mayanın, sitrik asit üretimi yanında; lipaz, lipid, izositrik asit, piruvik asit, α -ketoglutarik asit gibi farklı biyoürün üretim proseslerinde de kullanılabildiği rapor edilmiştir (Finogenova ve ark., 2005).

Yüksek enerji ve hammadde gereksiniminin, sitrik asit üretim endüstrisinde ekonomik olarak olumsuzluklara yol açtığı belirtilmektedir (Dhillon ve ark., 2011b). Bu nedenle, üretimi daha ekonomik hale getirmek için; sitrik asit veriminin artırılması, daha ucuz substrat kaynaklarının kullanılması ve kullanılan suşlar üzerinde genetik modifikasyonlar gibi uygulamalar yapılabilmektedir. Sitrik asit üretim veriminin artırılabilmesi için, proses parametrelerinin optimizasyonuna ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Üretimin optimum koşullarda yapılmasının, maksimum proses veriminde çalışma olanağı sağladığı belirtilmektedir (Imandi ve ark., 2008). Proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve

matematiksel tekniklerin birlikte kullanılmasına olanak veren yanıt yüzey yönteminin son yıllarda fermantasyon proseslerinin optimizasyonunda sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (Baş ve Boyacı, 2007; Aghaie ve ark., 2009; Dhillon ve ark., 2011b). Birden fazla değişkenin aynı anda kullanılmasını ve değişkenler arasındaki etkileşimlerin de belirlenmesini sağlayan bu yöntemin sitrik asit üretiminin optimizasyonunda kullanıldığı çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (Imandi ve ark., 2008; Bari ve ark., 2009; Betiku ve Adesina, 2013; Dhillon ve ark., 2011b; Dhillon ve ark., 2013).

Son yıllarda, yüksek maliyetli substratlara alternatif olarak, ucuz ve kolay bulunabilen substratların kullanılmasının, sitrik asit üretim maliyetini düşürmede oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Dhillon ve ark., 2011a; Hamdy, 2013). Ucuz ve kolay bulunabilen substrat kaynakları olarak, özellikle gıda endüstrisi kaynaklı bazı yan ürünler, atıklar veya hammaddeler dikkat çekmektedir. Bu kapsamda; meyve posaları ve kabukları, peyniraltı suyu, şeker pancarı ve şeker kamışı melası, buğday kepeği, bitkisel yağlar ve ham gliserin gibi bir çok doğal substrat kaynağının kullanılabildiği çalışmalar rapor edilmiştir (Hamdy, 2013).

Bu çalışmada, sitrik asit üretiminde doğal fermantasyon ortamı olarak havuç suyu kullanılmıştır. Havucun, dünya yaş sebze üretiminde yaklaşık 34 milyon ton ile ilk ona girdiği (Ekonomi Bakanlığı Yaş Meyve ve Sebze Sektörü Raporları, 2012), 2011 yılında ise; havuç üretiminin 35.658 milyon ton olduğu bildirilmiştir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Carrot>). Türkiye’de 2010 yılında havuç üretiminin yaklaşık 593 ton olduğu rapor edilmiştir (Türkiye Tarım Sektörü Raporu,

2010). Akdeniz İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği Değerlendirme Raporu'na göre (2012); 2011-2012 yılları arasında, havucun, ihracatı yapılan yaş sebzeler arasında ilk on sırada yer aldığı bildirilmiştir. Bol miktarda A vitamini içeren havucun B, C, D ve E vitaminleri açısından da oldukça zengin olduğu bilinmektedir. Havuç suyunun, bu vitaminler yanında, karbonhidrat açısından da zengin olduğu ve şeker olarak sakkaroz, glukoz ve fruktoz içerdiği belirtilmektedir (Cazor ve ark., 2006). İçerdiği bazı aminoasitler ve yağ asitlerinin de, havuç suyunun besinsel değerini arttırdığı bildirilmiştir (Puchao ve Ramborn, 2004). Yapılan bir çalışmada, havuç suyunun glukoz ile desteklendiği takdirde, *Y. lipolytica* ile sitrik asit üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Karasu Yalçın, 2012). Ancak bu ortamda sitrik asit üretimini etkileyen parametrelerin araştırıldığı ve üretimin artırılmasına yönelik bir çalışma rapor edilmemiştir.

Bu tez çalışmasında; mutant bir suş olan *Y. lipolytica* K-168 ile, havuç suyu içeren doğal fermantasyon ortamında, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, farklı parametrelerin sitrik asit üretimi üzerine birlikte etkileri incelenmiştir. Çalışmada, parametreler arasındaki etkileşimin belirlenmesi ve yanıtlar üzerine bu parametrelerin etkilerinin modellenmesi amaçlanmıştır. Havuç suyu içeren ortamda sitrik asit üretiminin artırılması amacı ile optimum fermantasyon koşulları belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Sitrik asit; birçok bitki, hayvan ve mikroorganizmanın ortak metaboliti olan bir trikarboksilik asittir. Kapalı formülü $C_6H_8O_7$ olan sitrik asitin renksiz olduğu ve suda kolayca çözünbildiği bilinmektedir. Sitrik asitin biyolojik olarak parçalanabildiği; çevre dostu, ekonomik ve güvenli olduğu belirtilmektedir (Argumeenal ve Venkappaya, 2013). Bu organik asit; turuncgiller, ananas, armut, şeftali ve incir gibi çeşitli meyvelerde doğal bir bileşen olarak bulunmaktadır (Grewal ve Kalra, 1995).

Sitrik asit; bakır, demir, mangan, magnezyum ve kalsiyum gibi metaller ile tuzlar oluşturabilmektedir (Argumeenal ve Venkappaya, 2013). Bu tuzlar endüstride emülsifiyer olarak ve koagülasyonu önlemek amacı ile kullanılırlar. Ayrıca, hayvansal ve bitkisel yağların bulunduğu ortamlarda antioksidan olarak işlev görürler. Sitrik asit, metallerle şelat oluşturduğu için, demir gibi iz metallerce katalizlenen oksidasyonları azaltmaktadır (Mattey, 1992). Sitrik asitin, suda çözündüğünde oldukça iyi tamponlama kapasitesine sahip olduğu ve bu etkisini pH 2.5-6.5 arasında gösterdiği bilinmektedir (Dhillon ve ark., 2011c).

Dünyada üretilen sitrik asitin %70'inin gıda endüstrisinde, %12'sinin eczacılıkta, %18'inin ise kimyasal, kozmetik ve temizlik materyalleri gibi diğer endüstri dallarında kullanıldığı belirtilmektedir (Darouneh ve ark., 2009; Dhillon ve ark., 2011c). Sitrik asit; gıda endüstrisinde asitliği düzenleyici, aroma geliştirici, antioksidan, koruyucu ve emülsifiyer olarak kullanılabilir. Sitrik asitin gıdanın tadı üzerine iki farklı etkisinin olduğu bildirilmiştir. Bunlar; ağızda asidik tat bırakması ve diğer aromaları kuvvetlendirmesidir (Mattey, 1992). Sitrik asit, jöleler ve reçellerde aroma arttırıcı ve koruyucu olarak kullanılabilir. Gazlı ve gazsız alkolsüz içeceklerde kullanıldığında; asidik tadı arttırdığı ve meyve aromasını kuvvetlendirdiği belirtilmektedir. Meyve ve sebze sularında stabilizatör olarak da işlev gördüğü bildirilmektedir. Elma şarabında esmerleşmeyi ve oksidasyonu engellediği; hayvansal ve bitkisel yağlarda diğer antioksidanlarla birlikte sinerjetik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Dondurulmuş meyvelerde, asitliği arttırdığı ve iz metalleri bağlayarak askorbik asitin oksidasyonunu engellediği, ayrıca; oksidatif enzimlerin inaktivasyonunu sağladığı bilinmektedir (Grewal ve Kalra, 1995; Soccol ve ark., 2006; Max ve ark., 2010). Sitrik asit, deniz ürünlerinde askorbik asit ile birlikte kullanıldığında, acılaşmaya neden olan prooksidanlar ile şelat oluşturmakta ve bu şekilde bozulmaya neden olan enzimleri inaktif hale getirebilmektedir. Sitrik asit, eritorbik asit veya sodyum eritorbat gibi antioksidanlar ile beraber kullanıldığında renk ve lezzet bozulmasını önleyebilmektedir. Genellikle 100-200 ppm antioksidana %0.1-0.3 oranlarında ilave edilerek kullanılabilir (Altuğ, 2009).

Peynirlerde ve dondurmalarda emülsifiyer, asitlendirici ve antioksidan olarak kullanılabildiği belirtilmektedir. Ayrıca, şekerlik endüstrisinde kullanıldığında sakkarozun inversiyonunu sağlayarak kristalizasyonu engellediği ve meyve aromasını geliştirdiği bildirilmektedir (Grewal ve Kalra, 1995; Soccol ve ark., 2006; Max ve ark., 2010).

Gıda, ilaç, kimyasal, kozmetik ve içecek endüstrisindeki çeşitli uygulamalarından dolayı sitrik asite duyulan ihtiyacın dünya çapında yıllık 1.4 milyon tonu aştığı (Liu ve ark., 2013) ve her yıl bu ihtiyacın %5 oranında arttığı bildirilmiştir (Dhillon ve ark., 2011b). Türkiye İstatistik Kurumu'ndan alınan bilgilere göre; 2009 yılında Türkiye'ye yaklaşık 25 bin ton sitrik asit ithal edilmiş, bu miktar 2012 yılında 42 bin tonu aşmıştır (Dış Ticaret Raporları, TÜİK, 2013). Çizelge 2.1'de yer alan bilgilere göre, 2006-2012 yılları arasında Türkiye'ye ithal edilen sitrik asit miktarının iki kat arttığı görülmektedir.

Sitrik asitin saf olarak ilk kez 1784'te Scheele tarafından limon suyundan izole edildiği bildirilmiştir. Sitrik asitin ticari üretiminin ilk defa 1860'ta İngiltere'de, İtalya'dan ithal edilen limonlar kullanılarak başladığı rapor edilmiştir. 1893'te Wehmer'in, *Penicillium glaucum* kültürü ile kalsiyum okzalat üretimi sırasında, sitrik asitin de üretildiğini gözlemesi, bundan sonraki çalışmalarda küf türlerinin sitrik asit üretimi amacı ile incelenmesine öncülük etmiştir (Grewal ve Kalra, 1995). *A. niger* ile bir

yüzey fermantasyon prosesinin kullanıldığı Currie'nin çalışmasının, ticari sitrik asit üretiminin temelini oluşturduğu belirtilmektedir (Grewal ve Kalra, 1995). 1950'lerde ABD'de derin fermantasyon prosesinin geliştirildiği ve bu prosesin sitrik asit üretimi için bir dönüm noktası olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Grewal ve Kalra, 1995).

Çizelge 2.1. 2006-2012 yılları arasında Türkiye'nin sitrik asit ihracat ve ithalat miktarları ve maliyetleri (Dış Ticaret Raporları, TÜİK, 2013)

Yıl	İhracat miktarı (kg)	İthalat miktarı (kg)	İhracat maliyeti (Dolar)	İthalat maliyeti (Dolar)
2006	417.201	21.048.478	493.284	17.176.403
2007	677.609	31.454.688	799.230	29.313
2008	678.869	35.086.346	1.021.963	42.328.989
2009	653.056	25.786.986	774.908	27.326.937
2010	467.128	35.343.598	686.424	36.626.854
2011	511.856	40.419.885	776.506	48.223.674
2012	975.605	42.397.972	854.567	44.840.640

Birçok küf, bakteri ve maya türünün çeşitli substratlardan sitrik asit üretiminin araştırıldığı ve bazı türlerin sitrik asit ürettiğinin ortaya konduğu belirtilmektedir (Dhillon ve ark., 2011c). Çizelge 2.2'de verilen bu türler arasından, günümüzde geleneksel olarak *A. niger*'e ait suşlardan melas, glukoz veya fruktoz içeren ortamlarda sitrik asitin ticari üretiminin yapıldığı

bilinmektedir (Kamzalova ve ark., 2011). Fakat son yıllarda mayalar da diğer bir potansiyel sitrik asit üreticisi olarak ilgi görmektedir. Mayalardan *Y. lipolytica*'nın yüksek verimlerde sitrik asit üretebildiği ve ticari üretimde kullanıldığı bilinmektedir. Bunun nedenleri arasında; *Y. lipolytica*'nın glukoz, fruktoz, etil alkol, gliserin, bunun yanında bitkisel yağlar, yağ asitleri ve ham gliserin gibi doğal substrat kaynaklarının bulunduğu ortamlarda gelişebilmesi ve sitrik asit üretebilmesi verilmektedir (Liu ve ark., 2013). Sitrik asit üretiminde *A. niger*'e kıyasla *Y. lipolytica* kullanılmasının bundan başka avantajları da bulunmaktadır. Örneğin; düşük çözünmüş oksijen derişimlerine olan hassasiyetinin çok az olduğu bilinmektedir. *Y. lipolytica*'nın kullanılması; doğal substrat kullanım olanaklarının daha fazla olması, daha yüksek ürün verimi ve genetik modifikasyon tekniklerinin daha kolay uygulanmasından dolayı da daha avantajlı görülmektedir (Liu ve ark., 2013). Ayrıca; mayaların küflere kıyasla daha yüksek substrat konsantrasyonlarında gelişebildikleri ve metal iyonu toleranslarının daha yüksek olduğu bilinmektedir (Kamzolova ve ark., 2011).

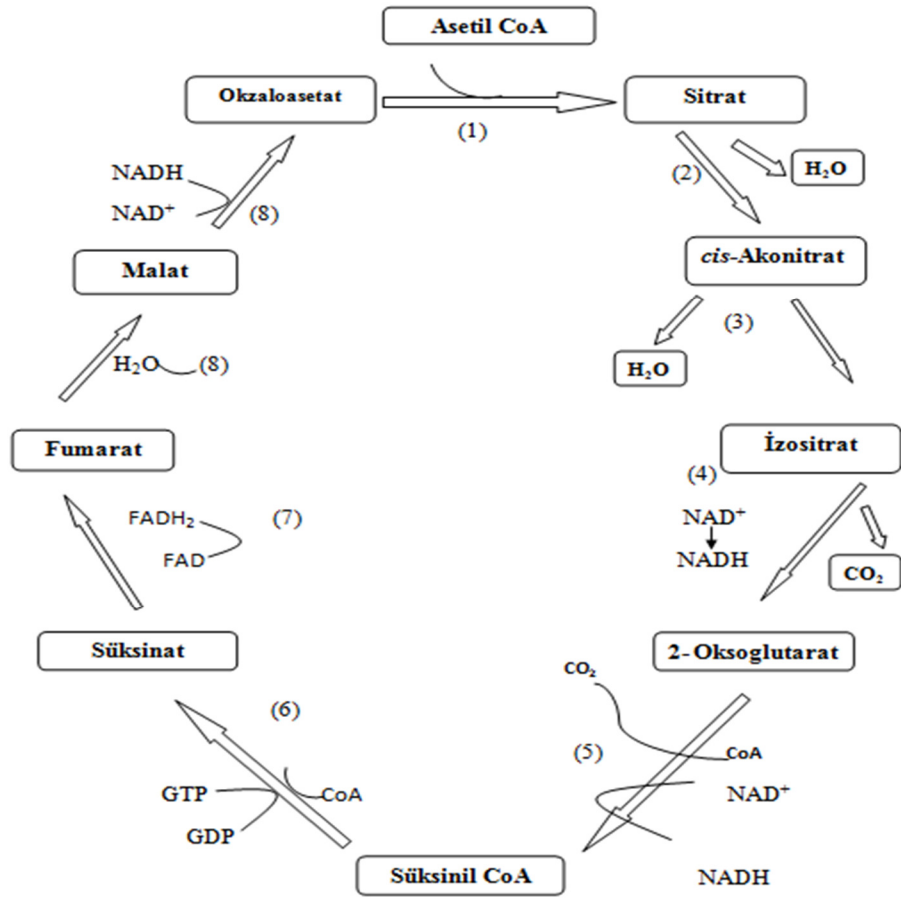
Sitrik asit üretiminde metabolizma ürünlerinden biri olan izositrik asitin de üretimi, mayaların kullanıldığı prosesler için bir dezavantaj olarak verilmektedir. Mayaların kullanıldığı bazı proseslerde, üretilen sitrik asit derişimine yakın derişimlerde izositrik asitin de üretilerildiği bilinmektedir. İzositrik asit, fermantasyon ortamında %5'in üzerindeki derişimlerde bulunduğunda, sitrik asitin ortamdaki ayırımı ve saflaştırılması

zorlaştırdığı bildirilmektedir (Rywińska ve ark., 2011). Bu nedenle, izositrik asit üretimi düşük olan maya suşlarının seçimi veya ortam parametrelerinin, izositrik asit üretiminin azalacağı şekilde modifikasyonu önerilmektedir (Rymowicz ve ark., 2010).

Çizelge 2.2. Sitrik asit üretebilen mikroorganizmalar (Dhillon ve ark., 2011c)

Küf	<i>A. niger</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus fonsecaeus</i> , <i>Aspergillus luchensis</i> , <i>Aspergillus phoenicus</i> , <i>Aspergillus wentii</i> , <i>Aspergillus saitoi</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Absidia</i> spp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Eupenicillium</i> spp., <i>Mucor piriformis</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium janthinellu</i> , <i>Penicillium luteum</i> , <i>Penicillium restrictum</i> , <i>Talaromyces</i> spp., <i>Trichoderma viride</i> , <i>Ustilina vulgaris</i>
Maya	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida catenula</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida intermedia</i> , <i>Hansenula</i> spp., <i>Pichia</i> spp., <i>Debaromyces</i> spp., <i>Torula</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp., <i>Kloeckera</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Zygosaccharomyces</i> spp., <i>Yarrowia lipolytica</i>
Bakteri	<i>Arthrobacter paraffinens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Corynebacterium</i> spp.

Sitrik asitin, hücrede Krebs döngüsü ile üretilen bir ara ürün olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1). Glikoliz ile üretilip daha sonra Krebs döngüsüne katılan Asetil-CoA, okzaloasetik asit ile bir kondenzasyon reaksiyonu ile birleşmekte ve sitrat sentetaz enzimi aracılığı ile sitrik asit oluşmaktadır (Demain ve Sanchez, 2006). Literatürde rapor edilen birçok çalışmada, hücrede sitrik asit üretiminin ve birikiminin oldukça karmaşık olduğu ifade edilmektedir (Max ve ark., 2010).



(1: sitrat sentetaz, 2,3: akonitaz, 4: izositrat dehidrogenaz, 5: 2-oksoqlutarat dehidrogenaz, 6: süksinat tiyokinaz, 7: süksinat dehidrogenaz, 8: fumaraz, 9: malat dehidrogenaz)

Şekil 2.1. Sitrik asit (Krebs) Döngüsü (Lehninger ve ark., 1993)

Sitrik asit fermantasyonunda, akonitaz ve izositrat dehidrogenaz enzimlerinin anahtar enzimler oldukları bildirilmektedir. Bu enzimlerin aktivitelerinin azalmasının, üretim sırasında sitrat sentetaz enziminin aktivitesinde artmaya neden olduğu belirtilmektedir. Akonitaz enziminin aktivitesinin, Fe^{+2} iyonlarının yüksek derişimlerinde azaldığı bilinmektedir. Bu da sitrik asit fermantasyonunu olumlu yönde etkileyen bir faktör olarak verilmektedir. İzositrat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin de potasyum

ferrosiyanür ve tiamin gibi maddelerle azaltılarak, sitrik asit üretiminin artırıldığı bildirilmiştir (Deveci, 2008).

A. niger ile sitrik asit üretiminde, ortamın Mn^{+2} iyonlarınca kısıtlanması, hücrede sitrik asit birikimini arttıran faktörler arasında verilmektedir. Bunun, izositrat dehidrogenaz aktivitesini azalttığı ve sitrat sentetaz aktivitesini arttırdığı bildirilmektedir (Demain ve Sanchez, 2006). İzositrat dehidrogenaz aktivitesinin azalması ile, izositrik asit α -ketoglutarata parçalanamamakta, bu da akonitaz aktivitesini durdurmaktadır. Bunun sonucunda, sitrik asitin ortamda biriktiği bildirilmektedir. Ayrıca; izositrat dehidrogenaz enziminin kofaktörleri olan Mn^{+2} ve Mg^{+2} iyonları ile sitrik asitin şelat oluşturabildiği bilinmektedir. Sitrik asitin bu katyonlarla şelat oluşturmasının da, enzimin aktivitesini azalttığı ve sonuç olarak, sitrik asit birikimini arttırdığı bildirilmiştir.

Mayaların sitrik asit metabolizmasında, hücre içi AMP ve azot miktarının azalması, sitrik asit birikiminin başlaması için gerçekleşen en önemli aşama olarak verilmektedir. Bunun, aktivite için AMP'ye ihtiyaç duyan izositrat dehidrogenazın inhibisyonu ile sonuçlandığı ve sitrik asit birikiminin arttığı belirtilmektedir. *C. guilliermondii*'nin, sodyum floroasetat ve trans-akonitik asit gibi inhibitörlerin varlığında, önemli miktarda sitrik asit üretebildiği rapor edilmiştir. Bu inhibitörlerin, TCA çevrimini akonitaz enziminin aktivite gösterdiği aşamada bloke ettiği bildirilmiştir (Demain ve Sanchez, 2006).

Karbon kaynağının yeterince bulunduğu ortamlarda azot kısıtlamasının, mayanın sitrik asit üretiminde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Sitrik asitin, azot kısıtlaması ile indüklenen bir aktif taşıma sistemi ile hücreden dışarıya salındığı belirtilmektedir. Bu taşıma sisteminin, izositrik asitin varlığında, öncelikli olarak sitrik asiti taşıma konusunda seçici olduğu da bildirilmiştir (Demain ve Sanchez, 2006).

Mikrobiyel sitrik asit üretimini etkileyen en önemli ortam parametrelerinden birisi; kullanılan substratın türü ve başlangıç derişimidir. Genellikle, karbon kaynağı olarak karbonhidrat içeren ortamlarda, substrat derişiminin arttırılmasının sitrik asit üretimini olumlu etkilediği belirtilmektedir (Dhillon ve ark., 2011c). *A. niger* ile yapay fermantasyon ortamında yapılan bir çalışmada, 160 g/L başlangıç sakkaroz derişiminde çalışıldığı zaman maksimum sitrik asit derişiminin 50 g/L olduğu bulunmuştur (Honecker ve ark., 1989). Farklı başlangıç şeker derişimleri içeren incir ekstraktı ile yapılan bir çalışmada; en yüksek sitrik asit derişiminin, 20.5 g/L olarak, 200 g/L başlangıç şeker derişiminde elde edildiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada; 100 ve 150 g/L başlangıç şeker derişimlerinde elde edilen maksimum sitrik asit derişimlerinin ise sırasıyla; 8 ve 15 g/L oldukları ifade edilmiştir. Şeker derişiminin daha fazla artmasıyla ise; sitrik asit derişiminin azaldığı bildirilmiştir (Roukas ve Kyriakides, 2002). Bir başka çalışmada; *Y. lipolytica* NBRC 1658 ve yerli bir suş olan *Y. lipolytica* 57 ile mikrobiyel sitrik asit üretimi, glukoz veya fruktozun kullanıldığı kesikli sistemde incelenmiştir. En yüksek sitrik asit derişimi (65.1 g/L), yerli suş ile 200 g/L

fruktoz içeren ortamda elde edilmiştir. Her iki suş için de, başlangıç glukoz veya fruktoz derişiminin 100-200 g/L arasında olduğu koşullarda, sitrik asit üretimi için en iyi sonuçların elde edildiği ifade edilmiştir (Karasu-Yalçın ve ark., 2009a). Farklı *Y. lipolytica* suşları ile yapılan bir başka çalışmada; substrat olarak glukoz ve gliserin, fermentasyon ortamında ayrı ayrı veya karışım halinde kullanılmıştır. Karbon kaynağının başlangıç derişiminin 150 g/L olarak kullanıldığı söz konusu çalışmada; sitrik asit üretim hızı ve sitrik asit verimi için en yüksek sonuçların, gliserin içeren ortamda ve iki mutant suş ile elde edildiği belirtilmiştir (Rywińska ve ark., 2009b).

Y. lipolytica ile sitrik asit üretiminde karbon kaynağı olarak etil alkolün kullanıldığı bir çalışmada; 0.01-18.0 g/L arasındaki etil alkol derişimlerinde çalışılmış, 4.5 g/L'nin üzerindeki etil alkol derişimlerinde sitrik asit ve izositrik asit üretiminin tamamen inhibe olduğu belirtilmiştir. Maksimum sitrik asit (14.2-19.2 g/L) ve izositrik asit (6.4-8.7 g/L) derişimlerinin, 0.01 ile 1.0 g/L arasındaki etil alkol derişimlerinde elde edildiği bildirilmiştir (Finogenova ve ark., 2002).

Mikrobiyel sitrik asit üretiminde karbon kaynağı olarak polialkollerin de kullanılabildiği bilinmektedir. *A. niger* ile yapılan bir çalışmada, mannitol ve ksilitolün sitrik asit üretimine olan etkileri, yüzey kültür ve derin kültür yöntemleri uygulanarak araştırılmıştır. En yüksek miktarda sitrik asit, mannitol ile desteklenen kültür ortamlarında elde edilmiştir. Bu miktar,

yüzey kültür ve derin kültür yöntemleri için sırasıyla, 17.3 ve 16.3 g/L olarak bulunmuştur. Sadece sakkaroz kullanılan kontrol örneklerinde ise; sırasıyla her iki yöntem için elde edilen sitrik asit miktarları 16.0 ve 15.3 g/L olarak verilmiştir. Söz konusu çalışmada, kültür ortamlarının ksilitol ile desteklenmesi sitrik asit üretimini arttırmamıştır. Ksilitol ile desteklenmiş ortamlardan elde edilen sitrik asit miktarlarının her iki yöntem için sırasıyla 11.0 ve 11.9 g/L olduğu belirtilmiştir. Buna göre mannitolün, derin fermentasyonda sitrik asit derişimini arttırıcı etkisinin çok daha fazla olduğu ifade edilmiştir (Peksel ve ark., 2003). Karasu Yalçın ve ark. (2009b) tarafından, gliserin ve mannitolün substrat olarak kullanıldığı ve iki *Y. lipolytica* suşu ile yapılan bir çalışmada; verim ve maksimum sitrik asit derişimine ait en iyi sonuçlar, başlangıç gliserin derişiminin 120 ve 160 g/L olduğu ortamlarda elde edilmiştir. Mannitol içeren ortamda ise, maksimum sitrik asit derişimi ve verime, her iki suş için de 120 g/L başlangıç substrat derişiminde ulaşıldığı belirtilmiştir (Karasu Yalçın ve ark., 2009b). Bir başka çalışmada; *Y. lipolytica*'nın asetat-negatif mutantları ile, kesikli beslemeli sistemde sitrik asit üretiminin incelendiği ve substrat olarak gliserinin kullanıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, gliserin derişimi 200 g/L olarak kullanıldığında, maksimum 139 g/L sitrik asit üretilbildiği belirtilmiştir (Rywińska ve ark., 2009a). Rywińska ve ark. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; sürekli sistemde, mutant bir *Y. lipolytica* suşunun substrat olarak gliserin içeren ortamda 97.8 g/L sitrik asit ürettiği rapor edilmiştir.

Fermantasyon ortamındaki mineraller ve derişimleri, mikrobiyel sitrik asit üretimini etkileyen kritik faktörler arasında verilmektedir. *A. niger*'in, üremesi için ortamda iz elementlere ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (Max ve ark., 2010; Argumeenal ve Venkappayya, 2013). Ancak, sitrik asit üretimi için, özellikle derin fermantasyonda çinko, mangan, demir, bakır gibi ağır metallerin sınırlı derişimde bulunması gerektiği bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, yüksek sitrik asit verimi için mangan derişiminin 3 mg/L'ye kadar düşmesi gerektiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, ortama 10 mg/L mangan eklenmesiyle sitrik asit birikiminin %50 azaldığı belirtilmiştir (Max ve ark., 2010). Sitrik asit üretimi üzerine demirin etkisi de çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Demirin etkisinin, akonitaz enzimini inaktive etmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Akonitaz enziminin kofaktör olarak demir içerdiği bilinmektedir. Minerallerin sitrik asit üretimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, demirin etkisinin kullanılan suşa da bağlı olabileceği ifade edilmiştir (Abou-Zeid ve Ashy, 1984). Finogenova ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, hücre içi çinko ve demir miktarlarının, *Y. lipolytica* N1 suşunun üremesi ve sitrik asit üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ortamdaki azot derişiminin kısıtlı olduğu durumda, hücre içi çinko derişiminin 0.23 mg/g'dan 1.0 mg/g'a yükselmesi ile, sitrik asit miktarının 5.4 g/L'den 21.6 g/L'ye yükseldiği belirtilmiştir. Aynı koşullarda izositrik asit derişiminin 0.5 g/L'den 6.4 g/L'ye ulaştığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada; azot kısıtlaması altında, hücre içi demir derişiminin 0.13 mg/g'dan 2.5 mg/g'a çıkması ile, sitrik asit derişiminin 5.5 g/L'den 21.8 g/L'ye; izositrik asit derişiminin ise; 5.2

g/L'den 10.3 g/L'ye kadar yükseldiği bildirilmiştir (Finogenova ve ark., 2002). Karasu-Yalçın ve ark. (2010) tarafından *Y. lipolytica* suşları ile yapılan bir çalışmada, glukoz içeren sentetik fermantasyon ortamında mineral kaynağı olarak demir ve bakır tuzlarının kullanılmasının, sitrik asit üretimini inhibe ettiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada; ortama 0.008 g/L çinko sülfat eklenmesinin, *Y. lipolytica* 57 suşunun sitrik asit üretimini arttırdığı rapor edilmiştir.

Sitrik asit fermantasyonunu etkileyen önemli faktörlerden bir diğeri de, besiyerinin başlangıç pH'ıdır. Küflerin kullanıldığı proseslerde; pH'ın iki açıdan önemli olduğu belirtilmektedir. İlk olarak, küf sporlarının çimlenebilmesi için 5.0'in üzerindeki pH'lara ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir. İkinci olarak; sitrik asit üretimi için pH'ın 2.0'nin altında olması gerektiği bilinmektedir. *A. niger* ile yürütülen proseslerde, düşük pH değerlerinin, istenmeyen organik asitlerin (okzalik asit ve glukonik asit) üretimini inhibe ettiği belirtilmiştir (Dhillon ve ark., 2011c). *A. niger* ile, incir ekstraktı içeren ortamda yapılan bir çalışmada ise; yüksek pH değerlerinde de sitrik asit üretimi açısından olumlu sonuçlar alınmıştır. Ortam başlangıç pH'ının 3'ten 4'e yükselmesi ile sitrik asit ve glukonik asit derişimlerinin arttığı, pH 4-6 arasında az miktarda azaldığı ve 7'den yüksek pH'larda ise; tekrar arttığı belirtilmiştir. En yüksek sitrik asit derişimi (20.5 g/L) pH 7'de kaydedilmiştir. Biyokütle kuru ağırlığı ve sitrik veriminin pH 3-8'de sabit kaldığı bildirilmiştir (Roukas ve Kyriakides, 2002). Sitrik asit üretiminde mayaların kullanıldığı proseslerde ise; pH'ın 5.0'in üzerinde

olması gerektiği bilinmektedir. Bunun en önemli nedeni, pH 5.0'in altında mayanın metabolizmasının eritritol, arabitol ve mannitol gibi polialkollerin üretimine yönelmesidir (Roehr ve ark., 1993). Düşük pH değerlerinde ayrıca; hücre mitokondri ve sitoplazma membranlarından sitrat geçişinin de inhibe edildiği bildirilmektedir (Anatassiadis ve Rehm, 2005).

Ortamdaki azot kaynağının türü ve derişiminin de, sitrik asit üretimini doğrudan etkilediği bilinmektedir. Yapay ortamda yapılan çalışmalarda genellikle, ortam pH'ının düşmesine yol açan amonyum tuzlarının, özellikle amonyum nitrat ve amonyum sülfatın kullanıldığı belirtilmektedir. Bunun yanında; üre, maya veya malt özütü gibi diğer azot kaynaklarının da kullanıldığı bilinmektedir (Max ve ark., 2010). Bazı doğal ortamların, azot açısından zengin olduğu ve nadiren azot kaynağına ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, sitrik asitin azot yokluğunda biriktiği bildirilmiştir. Ayrıca; sürekli kültür ile sitrik asit üretimi için azot sınırlandırılmasının oldukça önemli olduğu ifade edilmiştir (Max ve ark., 2010).

Sitrik asit üretimi, oksijenli ortamda gerçekleştiği için, endüstriyel sitrik asit üretiminde havalandırma, en önemli parametre olarak kabul edilmektedir. Havalandırmanın temel amacı, mikrobiyel gelişim için uygun miktarda oksijen sağlanmasıdır. Sitrik asit birikiminin, çözünmüş oksijen derişiminin artışıyla arttığı bildirilmektedir (Dhillon ve ark., 2011c). Yeterli çözünmüş

oksijen derişiminin, ancak etkin bir karıştırma ile sağlanabileceğı bilinmektedir. Ancak; yüksek karıştırma hızları, yüksek kayma gerilime neden olabildiğinden, hücre üzerinde olumsuz etkileri de görülebilmektedir (Crolla ve Kennedy, 2004). Yapılan bir çalışmada; çözünmüş oksijen derişiminin (%5-60) maya gelişimi, sitrik asit üretimi ve 0.2 mg/g ve 2,5 mg/g hücre içi demir derişiminde enzim aktivitelerine olan etkisi araştırılmıştır. Sitrik ve izositrik asit derişimlerinin, çözünmüş oksijen derişimi ve hücre içi demir içeriğinden önemli ölçüde etkilendiğı belirlenmiştir. Düşük demir derişimlerinde, çözünmüş oksijen derişiminin %60'tan %20'ye indirilmesinin, sitrik ve izositrik asit üretimini sırasıyla, 2.2 ve 2.9 kat azalttığı bildirilmiştir (Finogenova ve ark., 2002).

Sitrik asit üretiminde, proses verimini etkileyen fiziksel değişkenlerden bir diğeri, inkübasyon sıcaklığıdır. Fungusların gelişim sıcaklığı 20-55°C gibi geniş bir aralıktayken, optimum sıcaklığın kullanılan substratın türüne ve ortam bileşimine göre değişebileceğı bildirilmektedir (Dhillon ve ark., 2011c). *Candida lipolytica* ile yapılan bir çalışmada; üreme ve sitrik asit üretimi için gerekli optimum sıcaklık aralığının 26-30°C olduğu bildirilmiştir (Crolla ve Kennedy, 2001). Ayrıca, hücre üremesi ve sitrik asit üretimi için gerekli optimum sıcaklıkların birbirinden farklı olabileceğı de bilinmektedir (Dhillon ve ark., 2011c). Karasu-Yalçın ve ark. (2010) tarafından iki *Y. lipolytica* suşu ile yapılan bir çalışmada; maya suşlarının üremesi için en iyi sonuçlar 20°C'de alınırken, sitrik asit üretimi için en uygun sıcaklığın 30°C olduğu belirlenmiştir. Patates atığında gelişen *A.*

niger MAF-3 ile yapılan bir çalışmada, sitrik asit üretimi için optimum fermentasyon sıcaklığı 25°C olarak belirtilmiştir (Afifi, 2011). *A. niger* ile katı hal fermentasyonu kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, karayosun içeren ortamda sitrik asit üretimi için optimum sıcaklığın 32°C olduğu bildirilmiştir (Barrington ve ark., 2009).

Son yıllarda, sitrik asit üretim veriminin arttırılması için yapılan çalışmaların arttığı görülmektedir. Bu kapsamda; bilinen yapay karbon kaynaklarının yanısıra, ucuz, kolay bulunabilen doğal substrat kaynaklarının kullanımına yönelik çalışmalar dikkat çekmektedir. Sitrik asit üretimi amacıyla üzüm posası, elma posası ultrafiltrasyon artığı, portakal ve ananas artığı, mandalina kabuk artıkları, manyok küspesi, kivi kabuğu, pirinç, pirinç kepeği, muz kabukları, incir ekstraktı, ayçiçeği yağı, peynir altı suyu, üzüm şırası, patates nişastası hidrolizatı ve buğday kepeği gibi endüstriyel artıkların ve yan ürünlerin etkin kullanımı ile ilgili birçok çalışma rapor edilmiştir (Pandey ve ark., 2000; Roukas ve Kyriakides, 2002; Kumar ve ark., 2003; Deveci, 2008; Kamzolova ve ark., 2008; Karasu Yalçın ve ark., 2009c; Aguilar ve ark., 2010; Karthiyekan ve Sivakumar, 2010; Kuforiji ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2010; Dhillon ve ark., 2011a; Dhillon ve ark., 2011b; Khaleel ve ark., 2012; Betiku ve Adesina, 2013).

Bitkisel yağların, lipazlar ve bazı organik asitlerin mikrobiyel üretiminde substrat olarak kullanılabildiği bilinmektedir (Kamzolova ve ark., 2005; Kamzalova ve ark., 2011). Mikrobiyel lipolitik enzimler, bitkisel ve

hayvansal yağların ana bileşeni olan triaçilgliserolü hidrolize ederek gliserol ve yağ asitlerini oluştururlar. 1970'lerin başında, *Y. lipolytica*'nın hücre duvarından bazı lipazlarının izole edildiği rapor edilmiştir. Daha sonra, *Y. lipolytica*'nın ortam bileşimine ve kültür koşullarına bağlı olarak, birçok lipaz enzimini üretebildiği belirlenmiştir. Kamzolova ve ark. (2008) tarafından, *Y. lipolytica* suşları ile yapılan bir çalışmada; sitrik asit üretiminde substrat kaynağı olarak ayçiçek yağı kullanılmıştır. Kesikli beslemeli sistemin kullanıldığı çalışmada; mutant bir suş ile 150 g/L derişiminde sitrik asit üretilbildiği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada; *Y. lipolytica* ile sitrik asit üretiminde substrat kaynağı olarak kolza yağı kullanılmıştır. *Y. lipolytica* VKM Y-2373 suşunun, kolza yağı içeren fermentasyon ortamında yaklaşık 80 g/L sitrik asit üretilbildiği rapor edilmiştir (Kamzolova ve ark., 2011). Çelik (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, yerli bir maya suşu olan *Y. lipolytica* TEMYL3 ile sitrik asit üretimi, glukoz, gliserin ve ayçiçek yağı içeren ortamlarda incelenmiş ve en iyi sonucun ayçiçek yağı içeren ortamda elde edildiği bildirilmiştir. Bu ortamda üretilen sitrik asitin maksimum derişiminin 66.20 g/L olduğu belirtilmiştir (Çelik, 2012).

Sitrik asit üretiminde kullanılabilen bir diğer doğal substrat kaynağı olarak, elma posası verilmektedir. Elma suyu ekstraksiyonu sonrasında kalan artığın taze meyve ağırlığının yaklaşık %25-35 ini oluşturduğu ve %12.3 oranında fermente edilebilir şeker içerdiği belirtilmektedir. Katı hal fermentasyonu ile sitrik asit üretiminde *A. niger*'in kullanıldığı bir çalışmada, substrat kaynağı

olarak elma posası kullanılmış ve ortam koşulları optimize edilmiştir. En yüksek sitrik asit veriminin (4.6 g/100 g posa), %4 (v/w)'lük metanol kullanımı ile, inkübasyondan 5 gün sonra ve 30°C'de elde edildiği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2010). Çalışmada; elma posasının yüksek verimde sitrik asit üretimi için umut verici bir substrat olduğu ifade edilmiştir.

A. niger ile sitrik asit üretiminde fermantasyon ortamı olarak pancar melasının kullanıldığı bir çalışmada; ortama %0.5-2.0 derişiminde metanol ve etanol gibi düşük molekül ağırlıklı alkollerin eklenmesinin etkisi araştırılmıştır. Bu ortama, %1.5 metanol ve %1 etanol eklenmesi ile, sırasıyla 49.33 ve 40.85 g/L derişimlerinde sitrik asit üretildiği belirtilmiştir. Optimum koşullar altında, metanol ve etanolün *A. niger*'in hücre membranı geçirgenliğini arttırdığı ve sitrik asitin fermantasyon ortamında daha fazla biriktiği bildirilmiştir (Nadeem ve ark., 2010).

A. niger ile yapılan bir çalışmada; manyok küspesi, şekerpancarı küspesi ve sebze lifi içeren ortamlarda sitrik asit üretiminin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Çalışmada, 13.64 g sitrik asit/100 g kuru substrat düzeyinde verim alınan manyok küspesinin, sitrik asit üretimi amacı ile önerilebilecek bir substrat kaynağı olabileceği belirtilmiştir (Pandey ve ark., 2000). Betiku ve Adesina (2013) tarafından yapılan bir çalışmada; *A. niger* ile sitrik asit üretiminde doğal substrat kaynağı olarak patates nişastası hidrolizatı kullanılmıştır. Bu fermantasyon ortamında sitrik asit üretiminin

optimizasyonunun yapıldığı çalışmada; hidrolizat başlangıç derişiminin 153.77 g/L olduğu optimum koşullarda, 83 g/L sitrik asit üretildiğı bildirilmiştir.

Muz kabuğu, karbonhidrat ve diğerk besin maddeleri bakımından zengin bir organik atık olduğu için; yapılan bir çalışmada, *A. niger* ile sitrik asit üretiminde substrat kaynağı olarak seçilmiştir (Karthiyekean ve Sivakumar, 2010). Çalışmanın sonucunda, yaklaşık 170 g/kg düzeyinde sitrik asit üretilebildiğı ve muz kabuğunun sitrik asit üretiminde ucuz alternatif ortam olarak kullanılabilecek bir tarımsal artık olduğu sonucuna varılmıştır (Karthiyekean ve Sivakumar, 2010). Bir başka çalışmada; *A. niger* ile sitrik asit üretiminde ananas artıkları kullanılmıştır. Bu küfün iki suşu ile yapılan çalışmada en yüksek verim, nem içeriğı %54.4 ve %63.4 olan ananas artıklarında sırasıyla %46.4 ve %45.4 olarak bulunmuştur. Çalışmada ayrıca, substratlara %1-3 oranında metanol ilavesinin verimde azalmayla neden olduğu rapor edilmiştir (Kuforiji ve ark., 2010).

Son yıllarda doğal fermantasyon ortamı olarak kullanılabilen endüstriyel artıklardan bir diğeri de, peyniraltı suyudur. Peyniraltı suyunda, *Y. lipolytica* NBRC 1658 ve *Y. lipolytica* 57 ile sitrik asit üretiminin amaçlandığı bir çalışmada, en iyi sonuçlar fruktozla desteklenmiş olan peynir altı suyu ile elde edilmiştir. Bu ortamda elde edilen maksimum sitrik asit derişimi, 57 ve NBRC 1658 suşu için sırasıyla, 49.23 ve 32.65 g/L olarak rapor edilmiştir (Karasu Yalçın ve ark., 2009c). Aynı çalışmada, üzüm şırası da sitrik asit

biyoüretimi için alternatif bir doğal substrat kaynağı olarak önerilmiştir. *Y. lipolytica* NBRC 1658 ve *Y. lipolytica* 57 suşlarının üzüm şirasındaki glukozu kullanarak, maksimum 32.09 ve 10.39 g/L derişimlerinde sitrik asit üretebildikleri belirtilmiştir (Karasu Yalçın ve ark., 2009c). Sitrik asit üretimi amacı ile peyniraltı suyunun kullanıldığı bir başka çalışmada; peyniraltı suyu farklı derişimlerde galaktoz, sakkaroz ve glukoz ile desteklenmiş ve farklı parametrelerin *A. niger* ile sitrik asit üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Söz konusu çalışmada, %15 sakkaroz ve %1 metil alkol içeren peyniraltı suyu ortamında, maksimum 106.5 g/L sitrik asit üretilebildiği bildirilmiştir (El Holi ve Al-Delaimy, 2003).

Sitrik asit üretiminde proses veriminin arttırılabilmesi için alınabilecek önlemlerden bir diğeri; kullanılan suşlar üzerinde genetik modifikasyonların yapılmasıdır (Sahasrabudhe ve Sankpal, 2001). Bu amaçla en sık kullanılan yöntemlerden birisinin, mutasyon ile yeni suşların geliştirilmesi olduğu bilinmektedir. Mutasyon uygulamalarında; γ -ışınları, UV ışınları ve kimyasal mutasyon sıklıkla kullanılmaktadır (Soccol ve ark., 2006). Kimyasal ve fiziksel mutasyon uygulamasının ardından, suşun hedeflenen özelliği kazanıp kazanmadığının tespiti için, genellikle yüksek miktarda koloninin bu bakımdan incelenmesi gerekmektedir (Sahasrabudhe ve Sankpal, 2001; Finogenova ve ark., 2008). *Y. lipolytica*'nın birçok suşunun, karbon kaynağı olarak asetatı etkin bir şekilde kullanabildiği bilinmektedir. Son yıllarda, asetat kullanımı baskılanmış birçok mutant *Y. lipolytica* suşunun karakterize edildiği belirtilmektedir. Hücrede asetatın kullanımının,

sitrik asit üretiminde önemli role sahip olan glioksilat çevrimi ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca; Asetil-CoA sentetaz enzimi bloke edilmiş olan mutantlar da tanımlanmıştır. Bu sayede, glioksilat çevriminin indüklenmesi için gerekli olan Asetil-CoA aktivitesinin baskılandığı bildirilmiştir (Barth ve Gaillardin, 1997). Yapılan bir çalışmada (Finogenova ve ark., 2008); UV ışığı ve N-metil-NT-nitro-N-nitrozogüadin (NTG) kullanılarak, *Y. lipolytica* VKM Y-2373 suşunun mutantları elde edilmiş, asetat ve sitratı kullanamayan mutantlar seçilmiştir. NTG ve UV ışığının birlikte kullanıldığı çalışmada; yaklaşık 1000 koloninin incelenmesi ile tespit edilen mutantın, ana suştan %43.9 fazla sitrik asit üretebildiği rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada *A. niger*, hem UV, hem de kimyasal mutasyona uğratılarak, sitrik asit üretiminin artırılması amaçlanmıştır (Javed ve ark., 2010). Çalışmada, kimyasal mutajen olarak etidyum bromür ve NTG'nin kullanıldığı, sitrik asit üretimi açısından en iyi sonuçların da etidyum bromür ile muamele edilmiş olan suş ile alındığı rapor edilmiştir. Bu mutant suş ile, muz kabuklarını içeren ortamda, katı hal fermentasyonu ile 67.72 mg/mL sitrik asit üretildiği bildirilmiştir. *A. niger* ile yapılan bir başka çalışmada; mutasyon uygulamalarında UV ışığı, etil metan sülfonat ve NTG'nin kullanıldığı belirtilmiştir (Lotfy ve ark., 2007). Çalışmada, en iyi sonucu veren suşun UV uygulaması ile elde edildiği ve bu suş ile %60.25 sitrik asit verimine ulaşılabildiği rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada; *Y. lipolytica*'nın sitrik asit üretiminin artırılması amacı ile UV ışığı ve etil metan sülfonat kullanılarak mutasyon yapılmıştır (Karasu Yalçın, 2012). Çalışmada; 18 adet asetat kullanımı baskılanmış suşun

seçildiği ve bunlar arasından en iyi sonucu, etil metan sülfonat ile muamele edilmiş olan suşun verdiği bildirilmiştir. Seçilen mutant suş ile glukoz içeren ortamda elde edilen maksimum sitrik asit derişiminin, ana suş ile elde edilenden %57 daha fazla olduğu ifade edilmiştir (Karasu Yalçın, 2012). Rymowicz ve ark. (2006) tarafından yapılan bir başka çalışmada, üç adet asetat-negatif mutant suşun, gliserin içeren ortamda sitrik asit üretimleri incelenmiştir. İncelenen mutant suşlardan birisi ile, 124 g/L derişiminde sitrik asit üretilebildiği belirtilmiştir.

Mikrobiyel sitrik asit üretiminde, proses veriminin arttırılması veya bu amaçla farklı substratların kullanılabilmesi amacıyla, mutasyon dışında başka genetik modifikasyonların da yapılabildiği bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada; *Kluyveromyces marxianus*'un inulinaz enzimini kodlayan geni, *Y. lipolytica*'ya klonlanmış ve böylece, *Y. lipolytica*'nın substrat kaynağı olarak inülini kullanması sağlanmıştır (Liu ve ark., 2010). Sözkonusu çalışmada; bu sayede, inülin içeren yer elması ve hindiba gibi doğal substrat kaynaklarının sitrik asit üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada; inülini kullanabilen bu yeni suşun, inülin içeren ortamda sitrik asit üretiminin arttırılması amacıyla, inülinazı kodlayan genin aşırı ifadesi gerçekleştirilmiştir (Liu ve ark., 2013). Bunun sonucunda, *Y. lipolytica*'nın inülin içeren ortamda 84 g/L sitrik asit üretebildiği rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada; *Y. lipolytica*'nın sakkarozu kullanabilmesi için, *S. cerevisiae*'nın invertaz enzimini kodlayan *SUC2* geninin, *Y. lipolytica*'ya aktarıldığı bildirilmiştir. Bunun sonucunda,

karbon kaynağı olarak sakkaroz içeren melasın da, *Y. lipolytica* tarafından sitrik asit üretiminde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Fickers ve ark., 2004).

Sitrik asit üretim veriminin artırılması ve buna bağlı olarak prosesin daha ekonomik hale getirilmesini amaçlayan işlemlerden bir diğeri, ortam parametrelerinin optimizasyonudur. Birden fazla parametre içeren bir proseste, bir parametreyi değiştirirken, diğerlerini sabit seviyelerde tutarak, uygun çalışma koşullarının belirlenmesi, “aynı anda tek değişken” tekniği olarak adlandırılmaktadır. Bu tekniğin en önemli dezavantajı, değişkenlerin interaktif etkilerini içermemesi ve parametrelerin prosese etkilerinin tam olarak tanımlanamamasıdır (Imandi ve ark., 2008; Uzunoğulları, 2010). Bu problemin aşılabilmesi için, çok parametrelili çalışmalarda yanıt yüzey yönteminin kullanılması önerilmektedir. Yanıt yüzey yönteminin, “denemelerin optimum koşullara ulaşması” ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirildiği ve tanımlandığı bildirilmektedir (Koç ve Kaymak Ertekin, 2010). Mümkün olan en az sayıda gözlem değeri ile yanıt yüzeyi üzerinde yanıt değişkeninin maksimum değerini aldığı noktaya ulaşılması amaçlanan deneme düzenleri ortaya konmuştur (Turan ve Altundoğan, 2011). İlk olarak kimya endüstrisine uygulandığı belirtilen yanıt yüzey yöntemi, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Baş ve Boyacı, 2007; Koç ve Kaymak Ertekin, 2010).

Yanıt yüzey yönteminin en önemli avantajları arasında; kolay optimizasyon imkanı, az sayıda deneysel veri ile maksimum bilgiye ulaşılması, etkin parametreleri eş zamanlı olarak değiştirebilme imkanı, parametreler arasındaki etkileşimin belirlenebilmesi ve önemsiz parametrelerin belirlenebilmesi verilmektedir (Turan ve Altundoğan, 2011). Genel olarak, yanıt yüzey yönteminin üç aşamadan (eleme denemeleri, bölge araştırması ve işlemin veya ürünün optimizasyonu) oluştuğu bilinmektedir. Eleme denemeleri, daha az sayıda ve daha verimli esas deneme yapılmasına olanak sağlamaktadır. İkinci aşama olan bölge araştırmasında amaç, eleme denemeleri ile belirlenen bağımsız değişkenlerin sistemin yanıtında oluşturdukları değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlemektir. Yanıt yüzey yönteminin üçüncü aşamasının, optimum noktaya yaklaşıldığında başladığı ifade edilmiştir. Gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde; lineer olmayan modeller, genellikle ikinci dereceden polinom modeller veya üssel modeller kullanılır. Uygun bir model elde edildikten sonra, bu modelin optimum noktanın araştırılmasında kullanıldığı belirtilmektedir (Koç ve Kaymak Ertekin, 2010).

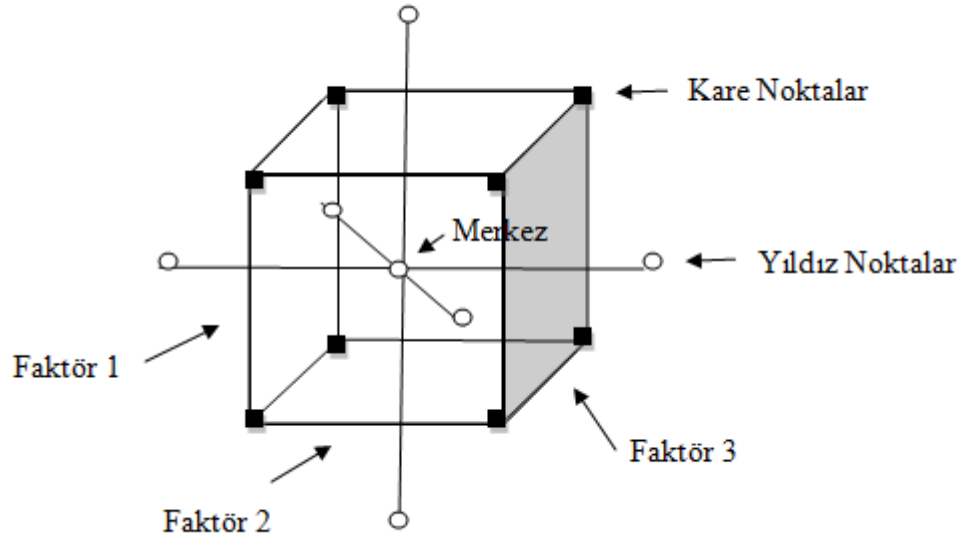
Deneysel tasarım olarak da bilinen istatistiksel tasarım, en az sayıda deneyle maksimum bilgi elde etmek için deneylerin nasıl planlanacağı ve yapılacağının metodu olarak ifade edilmektedir. Deneysel tasarımın, sistemlerin fonksiyonlarla ifade edilmesini ve çok sayıda olan değişkenler

arasındaki önemli etkileşimlerin ortaya konulmasını sağladığı bildirilmektedir (Bevilacqua ve ark., 2010). Bir veya birden fazla yanıt üzerinde birkaç bağımsız değişkenin potansiyel etkisinin olduğu deneysel durumlarda uygulandığı bilinmektedir. Deneysel tasarımın, optimum koşullarda belirlenen tahmini yanıt değerlerinin elde edilmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Yanıt değişkeni deneysel çıktı olarak gözlenirken, deneylerin tasarımında bağımsız değişkenler kontrol edilmektedir. Değişkenlerin eş zamanlı değiştirilmesinin, tek bir değişkenin değiştirilerek yürütüldüğü geleneksel deney yöntemlerine göre daha kısa sürede ve daha az deneysel çalışma ile sonuca ulaşmayı sağladığı belirtilmektedir. Deneysel çalışmaların tasarlanması ve optimizasyonunda kullanılan tasarım türlerinden bazıları; faktöriyel tasarım, merkezi karma (kompozit) tasarım, Box-Behnken tasarımı, üç düzeyli tasarım, hibrid tasarım, bir faktör tasarım, pentagonal tasarım, hegzagonal tasarım, D-optimal tasarım, kullanıcı tanımlı tasarım şeklinde sıralanabilmektedir (Turan ve Altundoğan, 2011).

Merkezi karma tasarım, grafik oluşturmayı sağlayan, genişletilmiş merkez noktaları içeren deneysel tasarım metodudur. Şekil 2.2’de üç faktörlü bir merkezi karma tasarımın şematik gösterimi yer almaktadır.

Üç faktörlü tasarımda deneysel noktaların yerleşimi, bir kübe benzetilmektedir. Bu metotta, her bir faktör için belirlenen bir merkez noktası bulunmaktadır. Merkezden eşit uzaklıkta yer alan kare noktalar,

deney tasarımındaki +1 ve -1 olarak kodlanmış değerleri temsil etmektedir. Yıldız noktalar ise; merkezden $\pm \alpha$ birim uzaklıkta bulunan noktalardır (Bevilacqua ve ark., 2010). Merkezi karma tasarımın en büyük avantajı, küp noktalar olan ana tasarım noktalarının dışında da deneysel noktalara olanak vermesidir. Şekil 2.2’de gösterilen küp modelinin bir küre içerisine yerleştirildiği düşünüldüğünde, yıldız noktaların bu kürenin yüzeyinde yer aldığı belirtilmektedir (Bevilacqua ve ark., 2010). Bu tasarımın en önemli özelliğinin, aksenal mesafenin ve merkez noktasındaki tekrarların belirlenebilmesi olduğu bildirilmektedir (Uzunoğulları, 2010).



Şekil 2.2. Üç faktörlü bir merkezi karma tasarımın şematik gösterimi (Bevilacqua ve ark., 2010; Turan ve Altundoğan, 2011)

Proseslerin optimizasyonunda; genellikle sistemin performansını veya ürünün kalite kriterlerini belirleyen çok sayıda yanıtla eş zamanlı olarak

alışılmaktadır. Bu yanıtların bazılarının maksimum seviyede tutulması, bazılarının minimum seviyede tutulması, bazılarının da kabul edilebilir değerler veya hedef değer alması istenmektedir. Birçok durumda, yanıtların birbirleri ile rekabet halinde olduğu, bir yanıtın geliştirilmesinin diğer bir yanıt üzerinde olumsuz bir etki oluşturabildiği belirtilmektedir. Bu yüzden, optimizasyon çalışmalarında sistemi karakterize eden tüm yanıtların hep birlikte ele alınması gerekmektedir. Ancak bu durumda, optimizasyonun oldukça karmaşık bir hal aldığı bilinmektedir. Çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümünde; lineer olmayan programlama yaklaşımı, yanıtların izohips eğrileri çizilerek st üste yerleştirilmesi ve “istenilen hedefe ulaşma” fonksiyonu yaklaşımı gibi yaklaşımların kullanıldığı bildirilmektedir (Koç ve Kaymak Ertekin, 2010).

“İstenen hedefe ulaşma” fonksiyonunun ilkesi; tüm yanıtların, boyutsuz “desirability fonksiyonu” olarak tanımlanan tek bir fonksiyon altında toplanmasını ve bu fonksiyonun arzu edilen sonuçları verecek şekilde maksimum seviyede tutulmasını içermektedir. Farklı skalaya sahip yanıtların birlikte incelenebilmesi, yanıtların tek bir fonksiyona kolayca dönüştürülebilmesi, kalitatif ve kantitatif yanıtların kullanılabilmesi bu yöntemin önemli avantajları arasında verilmektedir. İstenen hedefe ulaşma fonksiyonu, tüm yanıtların bir araya getirildiği, 0 ile 1 arasında değişen tek bir yanıt indeksi olup, bu değerin 1’e yaklaşması araştırmacının belirlediği kriterlerin sağlandığını belirtmektedir (Bevilacqua ve ark., 2010; Koç ve Kaymak Ertekin, 2010). Optimizasyon çalışmasında her bir yanıt için

seçilen kritere bağlı olarak, farklı hedefler kullanılabildiği bilinmektedir. Bu hedefler; “maksimum”, “minimum”, “hedef değer atanması” veya “belirli bir aralıkta olması” şeklinde tanımlanmaktadır (Koç ve Kaymak Ertekin, 2010).

Yanıt yüzey yönteminin, sitrik asit üretiminin optimizasyonunda kullanıldığı çok sayıda çalışma rapor edilmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada; hurma yağı endüstrisi artıklarıını içeren bir ortamda *A. niger* ile sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, deney tasarımıının merkezi karma tasarım metodu ile yapıldığı ve optimizasyonda sakkaroz başlangıç derişimi ile mineral ve aşı derişimlerinin bağımsız değişken olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, sadece sitrik asit verimi yanıt olarak kullanılarak optimum koşulların belirlendiği rapor edilmiştir (Bari ve ark., 2009). Barrington ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *A. niger* ile karayosun içeren ortamda sitrik asit üretiminin incelenmesinde, 2³ faktöriyel dizayn ile yapılan deney tasarımında havalandırma hızı, yatak derinliği ve sıcaklık faktörleri kullanılmıştır. Maksimum sitrik asit derişimi ve sitrik asit verimi yanıt olarak kullanılarak optimum koşulların belirlendiği ve bu koşullarda yapılan deneyde, optimizasyonda getirilen yaklaşıma yakın sonuçlar elde edildiği ifade edilmiştir (Bari ve ark, 2009). *Y. lipolytica* ile ananas artıklarıını içeren ortamda yapılan bir çalışmada, maya özütü derişimi, nem miktarı ve substrat derişiminin değişken olarak kullanıldığı bir merkezi karma tasarımın yapıldığı bildirilmiştir (Imandi ve ark., 2008). Söz konusu çalışmada belirlenen optimum koşullarda, 202.35 g

sitrik asit/kg kuru madde derişiminde sitrik asit üretilebildiğı rapor edilmiştir. *Y. lipolytica* ile yapılan bir başka çalışmada; biyodizel üretiminin yan ürünü olan gliserinden sitrik asit üretimi amaçlanmıştır. Çalışmada, başlangıç gliserin derişimi, maya özütü derişimi ve çeşitli tuzlardan oluşan çözeltinin miktarı değişken olarak kullanılarak, Doehlert metodu ile deney tasarımının yapıldığı belirtilmiştir. Yanıt olarak sadece maksimum sitrik asit derişiminin kullanıldığı çalışmada, belirlenen optimum koşullarda 77.39 g/L sitrik asit üretilebildiğı bildirilmiştir (Imandi ve ark, 2007). Dhillon ve ark. (2011a) tarafından yapılan bir çalışmada, *A. niger* ile elma posası içeren ortamda sitrik asit üretiminin optimizasyonu amacı ile yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı rapor edilmiştir. Çalışmada, etil alkol derişimi, metil alkol derişimi ve nem miktarının bağımsız değişken olarak; sitrik asit derişimi ve verimin yanıt olarak seçildiğı ifade edilmiştir. Metil alkol derişimi ve nem miktarının maksimum sitrik asit derişimi üzerindeki etkilerinin oldukça önemli bulunduğu bildirilmiştir (Dhillon ve ark., 2011a).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Tez çalışmasında, mutant bir maya suşu olan *Yarrowia lipolytica* K-168 ile çalışılmıştır. Bu suş, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde daha önce yapılan bir çalışma kapsamında elde edilmiştir (Karasu Yalçın, 2012). *Y. lipolytica* K-168, asetat kullanımı baskılanmış olan bir mutant suştur. Bu suşun, yerli bir maya suşu olan *Y. lipolytica* 57'nin kimyasal mutasyona uğratılması ile elde edildiği bilinmektedir.

Maya suşu, çalışma süresince Yeast Extract Malt Extract (YM) agar besiyerinde yatık kültür halinde 4°C'de saklanmış ve belirli zamanlarda, aynı ortam kullanılarak aktifleştirilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri

Araştırmada kullanılan besiyerleri ve bileşimleri, EK 1'de verilmiştir.

3.1.3. Havuç suyu

Tez çalışmasında, fermentasyon ortamında ana bileşen olarak havuç suyu kullanılmıştır. Çalışmanın başında; belirli bir satış noktasından oldukça fazla miktarda havuç temin edilerek, katı meyve sıkacağı (Philips HR 1854) yardımı ile suyu sıkılmış ve deneylerde kullanılacak havuç suyu elde edilmiştir. Her deneyde aynı bileşimde havuç suyunun kullanılabilmesi için, elde edilen havuç suyu, küçük miktarlara bölünerek, derin dondurucuda -18°C’de saklanmıştır.

3.1.4. İrmikaltı un protein konsantratu

Makarna endüstrisi artıklarından biri olan irmikaltı undan elde edilmiş olan protein konsantratu, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Hububat Teknolojisi Laboratuvarı’ndan sağlanmıştır. İrmikaltı un protein konsantratu (İUP), fermentasyon ortamına azot kaynağı olarak eklenmiştir.

3.1.5. Deney düzeneğı

Deneyler, kesikli sistemde, sıcaklığı ve çalkalama hızı kontrol edilebilen çalkalamalı su banyosunda (Nüve ST-402) gerçekleştirilmiştir. Sadece 21.5°C’de yapılan 10 numaralı deney için, soğutmalı çalkalamalı inkübatör (Daihan Wisecube WIS-30R) kullanılmıştır. 100 mL’lik fermentasyon ortamı, 300 mL’lik erlenlerde hazırlanmıştır. Çalışma süresince çalkalama hızı 100 vuru/dak olarak sabit tutulmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Havuç suyunun bazı kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan havuç suyunun; glukoz, fruktoz, mannitol, sitrik asit ve toplam azot miktarları belirlenmiştir. Glukoz ve fruktoz analizi, D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kiti (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, İrlanda) kullanılarak, spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Mannitol miktarı D-mannitol/L-arabitol kiti (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, İrlanda) ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Toplam organik azot miktarının belirlenmesinde, Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (Chang, 1998). Havuç suyunda toplam kuru madde (Bradley, 1998) ve titrasyon asitliği (Sadler ve Murphy, 1998) analizleri de yapılmıştır.

3.2.2. Fermantasyon ortamının hazırlanması ve aşılama

Havuç suyunun toplam şeker ve azot miktarları düşük olduğundan, ortam karbon kaynağı olarak glukoz, azot kaynağı olarak da İUP ile desteklenmiştir. Glukoz çözeltisi ayrı hazırlanıp, havuç suyuna sterilizasyondan sonra eklenmiştir. Doğal fermantasyon ortamında, havuç suyu saf su ile %50 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Bu seyreltme, glukoz çözeltisinin eklenmesi sırasında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, fermantasyon ortamında tamponlayıcı olarak 40 g/L derişiminde CaCO₃ kullanılmıştır. Ortamların sterilizasyonu, otoklavda 121°C’de 15 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. Bileşimi EK 1’de verilmiş olan üreme ortamında,

28°C’de 24 saat süre ile aktifleştirilen maya kültürü, fermantasyon ortamlarına %5 (v/v) düzeyinde aşılanmıştır.

3.2.3. Sitrik asit analizi

Fermantasyon ortamlarındaki sitrik asit derişimleri, piridin-asetik anhidrit analiz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Marier ve Boulet, 1958; Kumar ve ark., 2003).

Fermantasyon ortamlarından belirli zaman aralıklarında alınan örnekler, 5000 rpm’de 20 dakika süre ile santrifüjlenmişler ve üstte kalan çözelti kısımları sitrik asit analizinde kullanılmıştır. Sitrik asit derişimi, 420 nm dalga boyunda, spektrofotometrik olarak ve daha önceden hazırlanan çalışma doğrusu kullanılarak belirlenmiştir (EK 2).

3.2.4. İzositrik asit analizi

Fermantasyon ortamlarındaki izositrik asit derişimleri, spektrofotometrik olarak, D-izositrik asit enzimatik test kiti (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, İrlanda) kullanılarak tayin edilmiştir.

3.2.5. Glukoz ve fruktoz analizi

Fermantasyon ortamlarındaki glukoz ve fruktoz derişimleri, spektrofotometrik olarak, D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kiti (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, İrlanda) yardımı ile belirlenmiştir.

3.2.6. pH ölçümü

Çalışma boyunca fermentasyon ortamındaki pH ölçümleri ve ayarlamaları, Hanna 2211 (Almanya) marka pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.2.7. Maya sayısının belirlenmesi

Deneyler sırasında, fermentasyon ortamlarından belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak, kültürün serum fizyolojik içerisinde seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan, YM agar besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir. 28°C’de 48 saat inkübasyonun ardından koloni sayımları yapılarak, cfu/mL cinsinden maya sayısı hesaplanmıştır.

3.2.8. Deney tasarımının oluşturulması

Havuç suyu içeren doğal fermentasyon ortamında sitrik asit üretiminin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu amacı ile; başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH’ı (X_2), irmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklık (X_4), bağımsız değişken olarak seçilmişlerdir.

Havuç suyunda şeker olarak glukoz, fruktoz ve sakkarozun bulunduğu belirtilmektedir (Cazor ve ark., 2006). *Y. lipolytica*’nın, sakkarozu kullanamadığı bilinmektedir (Fickers ve ark., 2004). Havuç suyundaki glukoz ve fruktoz, “toplam şeker” olarak kabul edilmiştir. Bu doğal kaynakta, mayanın kullanabileceğı bir diğer karbon kaynağı ise, mannitoldür. Havuç suyundaki mannitol ve toplam şeker

derişimi çok düşük olduğu için ve ortam glukoz ile desteklendiğinden, hazırlanan ortamlardaki temel substrat glukoz olmuştur. Ancak, havuç suyu glukoz kadar, maya tarafından kullanılabilen diğerk şeker olan fruktoz da içerdii için, fermantasyon ortamlarına glukoz eklenirken toplam indirgen şeker temelinde (glukoz ve fruktoz) düşünölmüştür. Bu nedenle, deney tasarımındaki X_1 , “başlangıç toplam şeker derişimi” olarak ifade edilmiştir.

Parametre etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenebilmesi için, Merkezi Karma Tasarım (Central Composite Design) yöntemine göre bir deney tasarımı oluşturulmuştur. Bu amaçla, Design Expert® 8.0.7.1 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı kullanılmıştır. Deney tasarımı, -2, -1, 0, +1, +2 olarak kodlanmış 5 düzeyde yapılmış, merkez noktasında 6 tekrar kullanılmıştır. Tasarımda deney sayısı, Eşitlik 3.1 temelinde, aynı program yardımı ile hesaplanmıştır. Bu eşitlikte k, bağımsız değişken sayısını ifade etmektedir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 6 \quad (3.1)$$

Deney tasarımındaki bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri ise, Eş. 3.2 yardımı ile hesaplanmıştır. Bu eşitlikte; x_i kodlanmış değeri, X_i bağımsız değişkenin gerçek değerini, X_0 bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değerini ve ΔX ise, düzeyler arasındaki farkı ifade etmektedir.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad (3.2)$$

Deney tasarımıda kullanılan bağımsız değişkenler ile minimum ve maksimum değerleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Merkezi karma tasarımıda kullanılan bağımsız değişkenler

Bağımsız değişken	Simge (birim)	Minimum değer	Maksimum değer
Başlangıç toplam şeker derişimi	X_1 (g/L)	20.00	260.00
Başlangıç pH’ı	X_2	3.75	8.75
İUP başlangıç derişimi	X_3 (g/L)	0.00	8.00
Sıcaklık	X_4 (°C)	21.5	35.5

3.2.9. Bağımlı değişkenlerin (yanıtların) hesaplanması

Hazırlanan deney tasarımı doğrultusunda gerçekleştirilen deneylerde, fermentasyon ortamlarından belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin sitrik asit derişimi, maya sayıları ve toplam indirgen şeker derişimleri belirlenmiş ve bunların zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuştur.

Oluşturulan grafikler kullanılarak, her deney için yanıt olarak seçilen; maksimum sitrik asit derişimleri ($C_{s\ m}$; Y_1), maksimum sitrik asit üretim hızları ($r_{s\ m}$; Y_2), ürün verimleri ($Y_{Ü/S}$; Y_3), maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranları ($C_{s\ m}/C_{i\ m}$; Y_4) ve özgül üreme hızları (μ ; Y_5) hesaplanmıştır. Bütün grafiklerin oluşturulmasında ve hesaplamaların yapılmasında, Origin Pro 8 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılmıştır.

3.2.9.1. Sitrik asit üretim hızı (verimlilik)

Sitrik asit üretim hızı (r_s), birim zamanda üretilen sitrik asit derişiminin zamanla değişimini ifade etmektedir (Eş. 3.3). Sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulduktan sonra, elde edilen eğim değerlerinden, maksimum sitrik asit üretim hızları ($r_{s\ m}$) hesaplanmıştır. Bu eşitlikte $\dot{U}$; ürün derişimini, t ; zamanı ifade etmektedir.

$$r_s = \frac{d\dot{U}}{dt} \quad (3.3)$$

3.2.9.2. Sitrik asit verimi

Ürün verimi, kullanılan substrat başına oluşan ürün miktarını ifade etmektedir. Sitrik asit verimi, Eş. 3.4 ile ifade edilmektedir (Shuler ve Kargi, 2002).

$$Y_{\dot{U}/S_0} = -\frac{\Delta\dot{U}}{\Delta S} \quad (3.4)$$

Çalışmada, tasarlanan her deney için sitrik asit verim yüzdeleri, Eş. 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitlikte $C_{s\ m}$; maksimum sitrik asit derişimini, S ; fermantasyon sonundaki toplam şeker derişimini, S_0 ise; başlangıç toplam şeker derişimini ifade etmektedir.

$$Y_{\dot{U}/S_0} = -\frac{C_{s\ m}}{S - S_0} 100 \quad (3.5)$$

3.2.9.3. Özgöl üreme hızı

Kesikli sistemde, üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma üreme hızı, Eş. 3.6 ile gösterilmektedir. Bu eşitlikte yer alan μ (saat⁻¹), mikroorganizma özgöl üreme hızını ifade etmektedir. Özgöl üreme hızı, mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki üreme hızının mikroorganizma sayısına oranı olarak tanımlanmaktadır. Üssel üreme bölgesindeki özgöl üreme hızının maksimum seviyede ve sabit olduğu bilinmektedir (Göksungur, 2009).

Tez çalışmasında, özgöl üreme hızının hesaplanmasında, Eş. 3.6 kullanılmıştır (EK 3). Burada N; mikroorganizma sayısını (cfu/mL) ifade etmektedir.

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = \frac{d \ln N}{dt} \quad (3.6)$$

3.2.10. Bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi

Seçilen bağımlı değişkenlerin; başlangıç toplam şeker derişimi, başlangıç pH'ı, İUP başlangıç derişimi ve sıcaklık ile değişimlerini gösteren bağıntılar, çoklu regresyon analizi ile, Design Expert® 8.0.7.1 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Tez çalışmasında, yanıtların modellenmesinde Eş. 3.7'de gösterilen; hem lineer modeli, hem de ikinci dereceden polinom modelini içeren karesel model kullanılmıştır. Burada, y; yanıt, X_i ve X_j bağımsız değişkenler, β_0 ; sabit katsayı, β_j , β_{ij}

ve β_{ij} de sırasıyla; lineer, ikinci dereceden ve iki terimli etkileşim katsayılarını ifade etmektedir.

$$y = \beta_o + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.7)$$

Türetilen her model için, proses değişkenleri arasındaki etkileşimlerin ve değişkenlerin önemlilik derecelerinin belirlenmesi amacıyla, aynı program yardımı ile varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır.

3.2.11. Optimizasyon

Çalışmada, havuç suyu içeren doğal fermantasyon ortamında sitrik asit üretimi için optimum koşulların belirlenmesi amacı ile, nümerik optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla, “istenilen hedefe ulaşma” fonksiyonu kullanılmıştır. Belirlenen hedefler doğrultusunda optimizasyon, Design Expert® 8.0.7.1 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı yardımı ile yapılmıştır.

Optimizasyonda, yanıtlardan maksimum sitrik asit derişimi, sitrik asit üretim hızı ve sitrik asit veriminin maksimum olması hedeflenmiştir. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı ve özgül üreme hızının ise, hesaplanan sınırlar içerisinde olması hedeflenmiştir. Hedefler belirlenirken; maksimum sitrik asit derişimi, sitrik asit üretim hızı ve sitrik asit verimi en önemli yanıtlar olarak seçilmişlerdir. Hedeflerin belirlenmesinin ardından, optimizasyon için bir dizi çözüm önerileri elde edilmiştir. Bu önerilerden, özellikle önemli olarak belirlenmiş olan yanıtları esas alarak ve istenen hedefe ulaşma fonksiyonunun 1 olmasına dikkat edilerek, en uygun olan kombinasyon seçilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, havuç suyu içeren doğal fermentasyon ortamında *Y. lipolytica* K-168 mutant suşunun üreme ve sitrik asit üretimi incelenmiştir. Kullanılan fermentasyon ortamında maya suşunun sitrik asit üretimi için gerekli optimum koşullar, yanıt yüzey yöntemi ile belirlenmiştir.

Öncelikle, sitrik asit üretimini birincil olarak etkileyeceği düşünülen dört parametre (başlangıç toplam şeker derişimi, ırmıkaltı un protein konsantratı başlangıç derişimi, başlangıç pH'ı ve sıcaklık) seçilmiştir. Merkezi karma tasarım yöntemi ile, bu dört parametrenin bağımsız değişken olarak kullanıldığı bir deney tasarımı oluşturulmuştur. Bu doğrultuda yapılan deneylerin ardından, optimizasyon için yanıt olabilecek bağımlı değişkenler hesaplanmıştır. Her yanıtın bağımsız değişkenler ile değişimi modellenmiş; elde edilen yanıtlar, optimum koşulların belirlenmesinde kullanılmıştır.

4.1. Havuç Suyunun Bazı Kimyasal Özellikleri

Deneylerde kullanılan havuç suyunun bazı bileşim özellikleri, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Havuç suyunun pH'ı 6.58 olarak ölçülmüştür.

Havuç suyunun sterilizasyondan sonraki glukoz ve fruktoz derişimleri de ölçülmüştür. Steril havuç suyunun sırasıyla 8.62 ve 8.83 g/L derişimlerinde glukoz

ve fruktoz içerdği belirlenmiştir. Toplam 17.45 g/L olan indirgen şeker miktarının havuç suyunun %50 seyreltilmesi sırasında yarıya inmesi nedeni ile; glukoz eklenmemiş havuç suyundaki başlangıç toplam şeker derişimi, 8.73 g/L olarak alınmıştır. Bu miktar, glukoz eklenen fermentasyon ortamlarındaki başlangıç toplam şeker derişimi ayarlanırken, göz önünde bulundurulmuştur.

Havuç suyunun 0.58 g/L sitrik asit içerdği belirlenmiş, bu miktar %50 seyreltilmiş olan havuç suyunda 0.29 g/L olmuştur. Deneylerde, belirli zaman aralıklarında alınan örneklerdeki sitrik asit miktarlarının hesaplanmasında, her ölçülen değerden bu miktar çıkartılmıştır.

Çizelge 4.1. Deneylerde kullanılan havuç suyunun bazı bileşim özellikleri

Bileşen	Derişim
Glukoz (g/L)	8.22 ± 0.156
Fruktoz (g/L)	8.69 ± 0.021
Mannitol (g/L)	1.47 ± 0.071
Sitrik asit (g/L)	0.58 ± 0.042
Titrasyon asitliği (malik asit cinsinden, %)	0.11 ± 0.014
Kuru madde (%)	8.03 ± 0.226
Toplam azot (%)	0.12 ± 0.028

4.2. Deney Tasarımı ve Yanıtların Oluşturulması

Merkezi karma tasarım metoduna göre yapılan deney tasarımı, Çizelge 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Tasarımda, 30 farklı deney kombinasyonu elde edilmiştir. Elde edilen

deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlere ait gerçek değerler, Çizelge 4.2’te görülmektedir. Çizelge 4.3.’te ise, bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri görülmektedir.

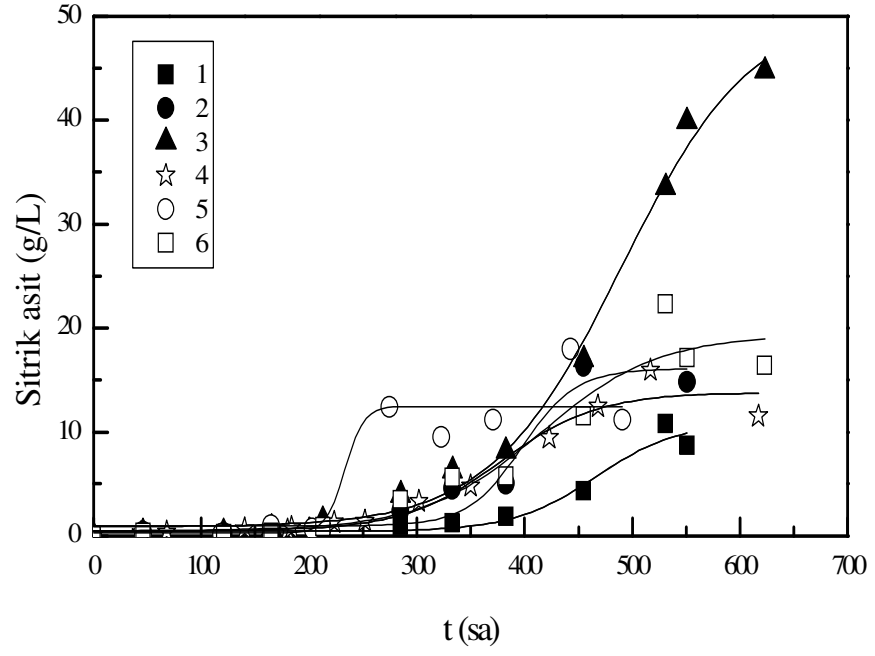
Çizelge 4.2. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri

Deney no.	X ₁ (g/L)	X ₂	X ₃ (g/L)	X ₄ (°C)
1	140.00	6.25	8.00	28.50
2	140.00	6.25	4.00	28.50
3	260.00	6.25	4.00	28.50
4	80.00	5.00	6.00	32.00
5	80.00	7.50	6.00	32.00
6	140.00	6.25	4.00	28.50
7	140.00	3.75	4.00	28.50
8	200.00	7.50	2.00	25.00
9	200.00	7.50	6.00	32.00
10	140.00	6.25	4.00	21.50
11	20.00	6.25	4.00	28.50
12	200.00	5.00	2.00	32.00
13	140.00	6.25	4.00	28.50
14	80.00	7.50	2.00	25.00
15	200.00	5.00	6.00	32.00
16	140.00	6.25	0.00	28.50
17	80.00	5.00	2.00	25.00
18	140.00	6.25	4.00	28.50
19	80.00	7.50	6.00	25.00
20	200.00	7.50	6.00	25.00
21	200.00	7.50	2.00	32.00
22	140.00	6.25	4.00	35.50
23	80.00	5.00	6.00	25.00
24	200.00	5.00	6.00	25.00
25	80.00	7.50	2.00	32.00
26	140.00	6.25	4.00	28.50
27	200.00	5.00	2.00	25.00
28	140.00	8.75	4.00	28.50
29	80.00	5.00	2.00	32.00
30	140.00	6.25	4.00	28.50

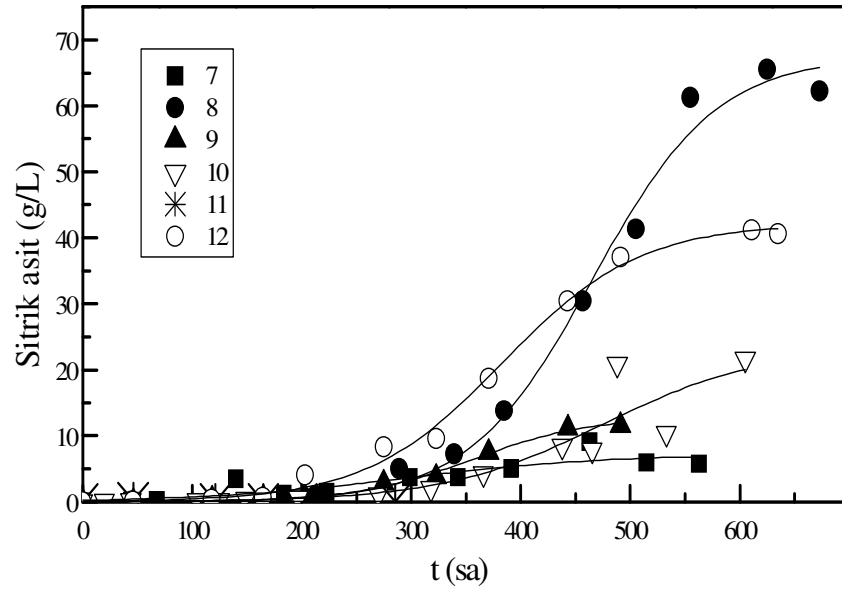
Çizelge 4.3. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri

Deney no.	X ₁ (g/L)	X ₂	X ₃ (g/L)	X ₄ (°C)
1	0	0	2	0
2	0	0	0	0
3	2	0	0	0
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	1	1
6	0	0	0	0
7	0	-2	0	0
8	1	1	-1	-1
9	1	1	1	1
10	0	0	0	-2
11	-2	0	0	0
12	1	-1	-1	1
13	0	0	0	0
14	-1	1	-1	-1
15	1	-1	1	1
16	0	0	-2	0
17	-1	-1	-1	-1
18	0	0	0	0
19	-1	1	1	-1
20	1	1	1	-1
21	1	1	-1	1
22	0	0	0	2
23	-1	-1	1	-1
24	1	-1	1	-1
25	-1	1	-1	1
26	0	0	0	0
27	1	-1	-1	-1
28	0	2	0	0
29	-1	-1	-1	1
30	0	0	0	0

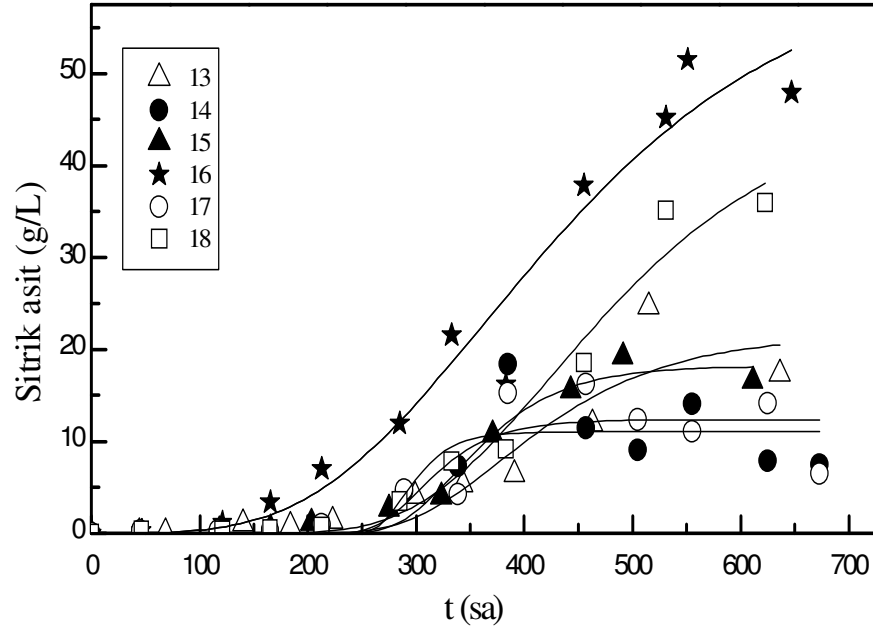
Yapılan dizayna göre uygulanan deneylerde elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.1-4.5'te görölmektedir. Hesaplanan maya sayılarının zamanla değişimleri ise; Şekil 4.6-4.10'da verilmiştir.



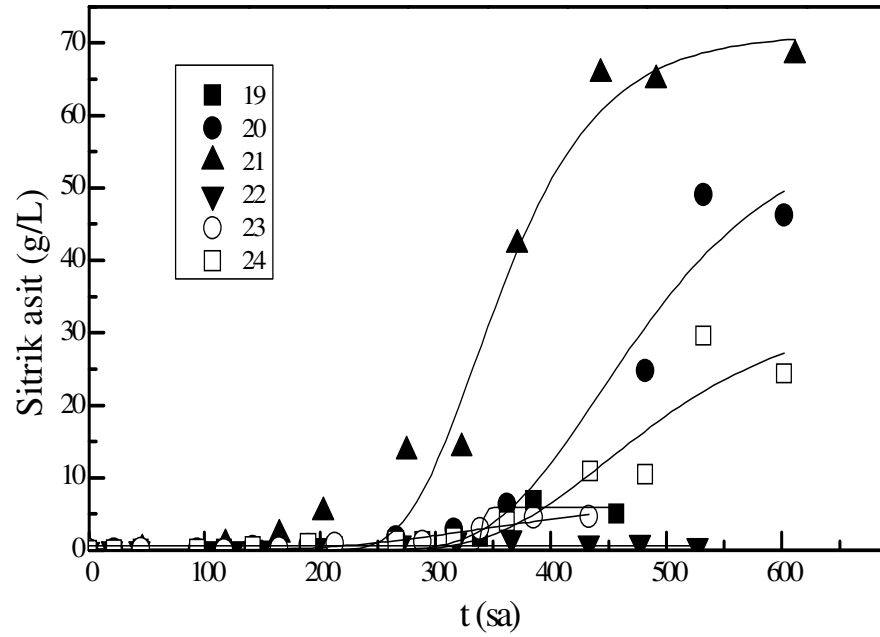
Şekil 4.1. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değışimleri



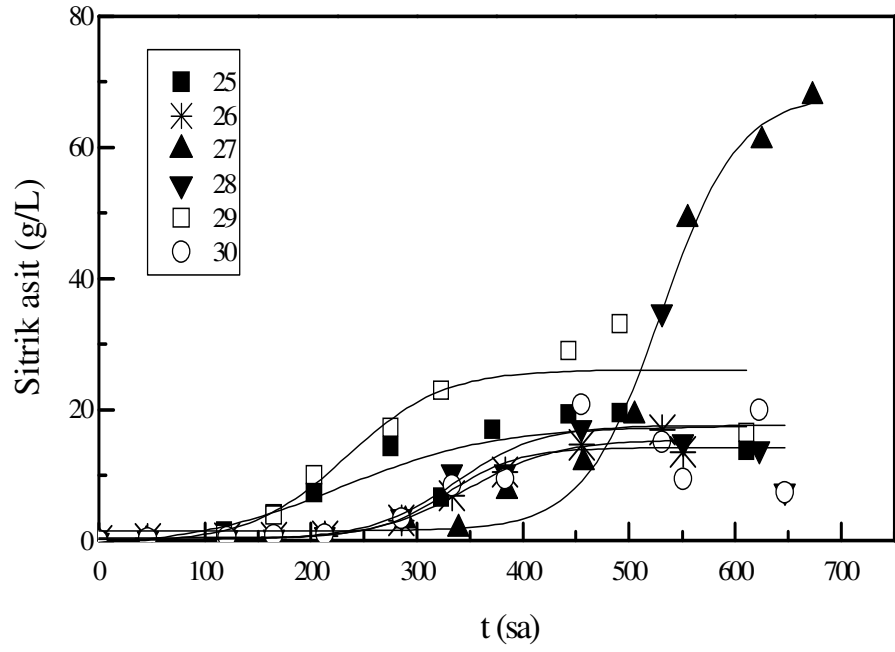
Şekil 4.2. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değışimleri



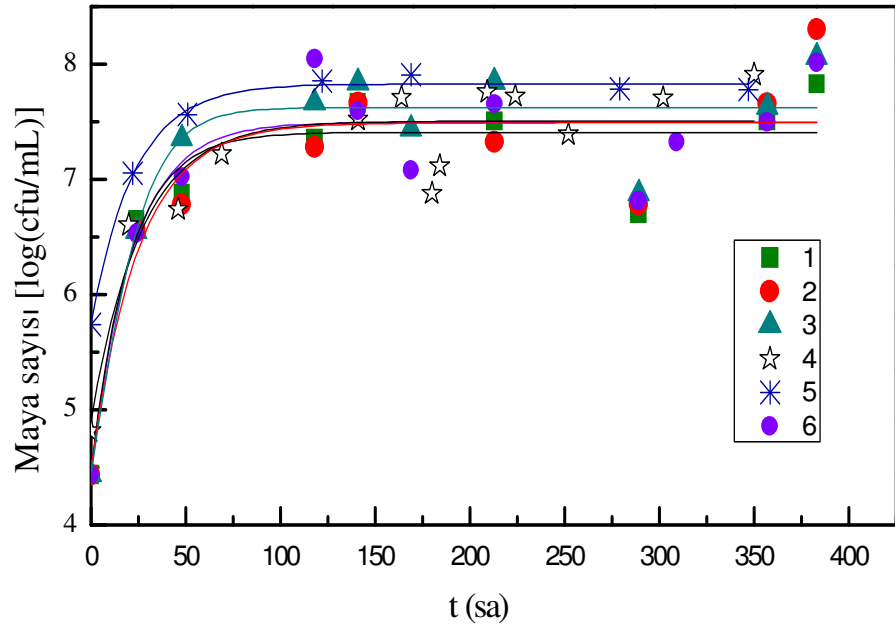
Şekil 4.3. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değışimleri



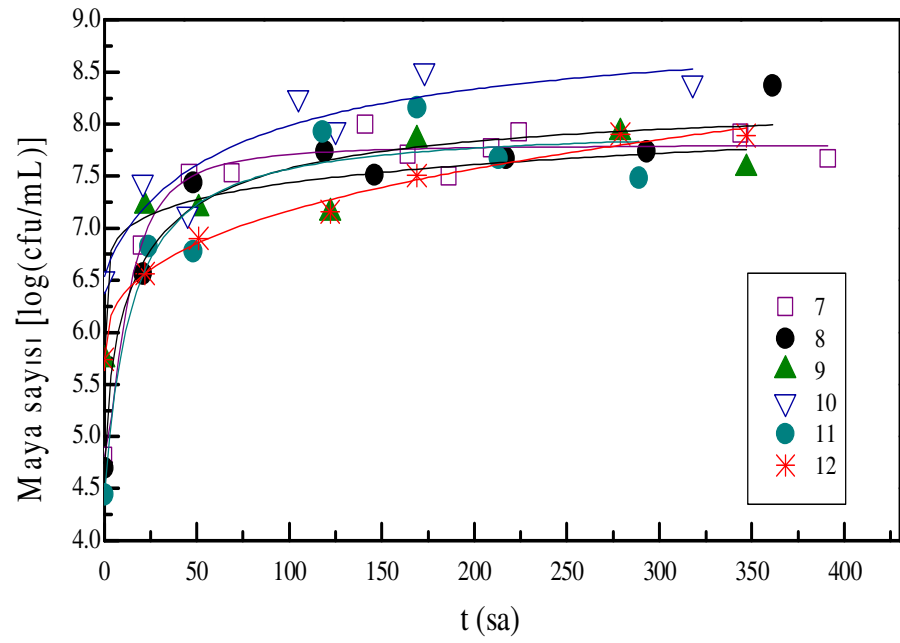
Şekil 4.4. “19-24” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değışimleri



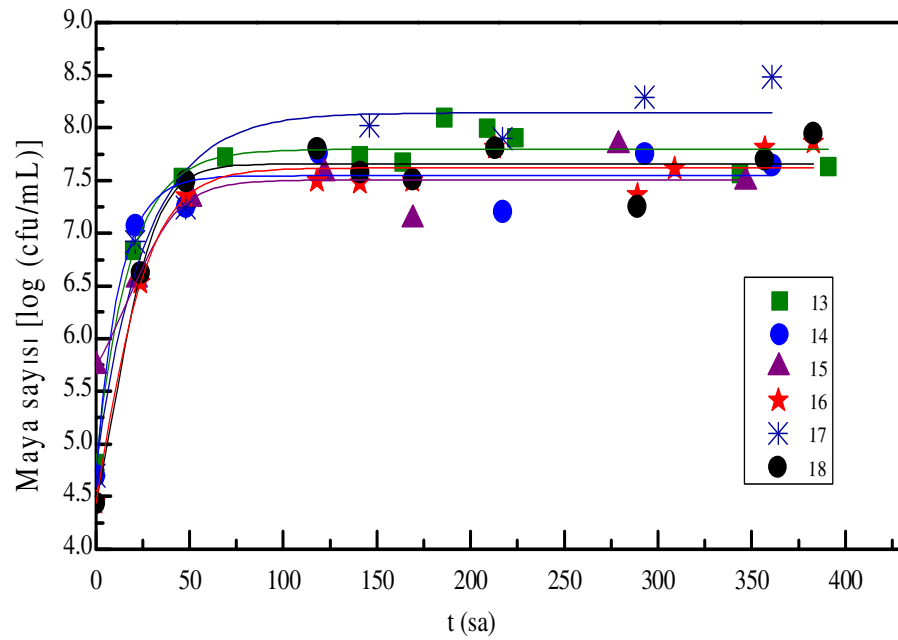
Şekil 4.5. “25-30” numaralı deneyler için elde edilen sitrik asit derişimlerinin zamanla değışimleri



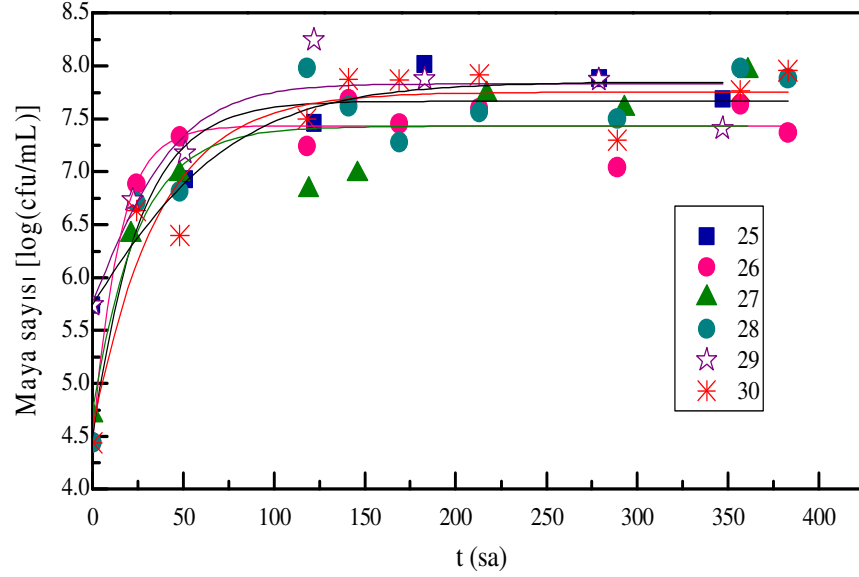
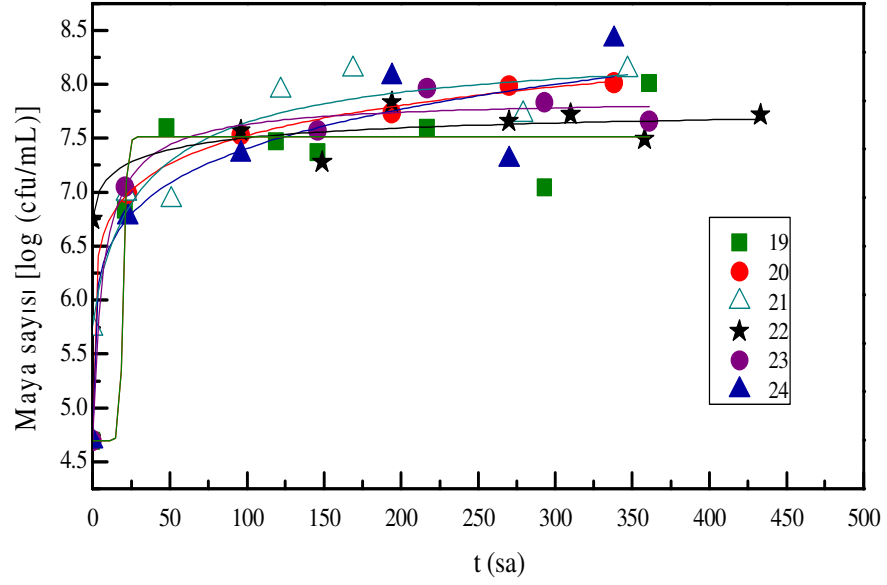
Şekil 4.6. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değışimleri



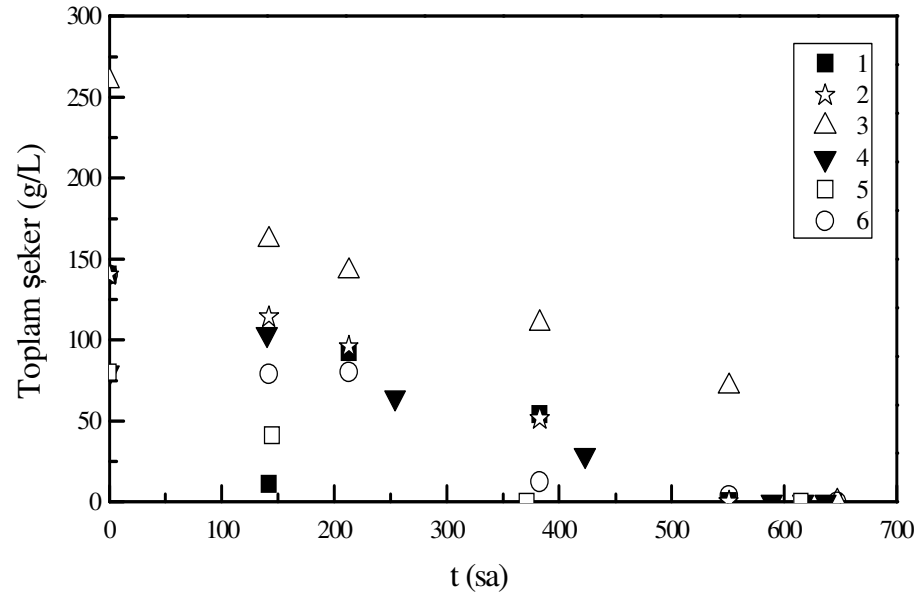
Şekil 4.7. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri



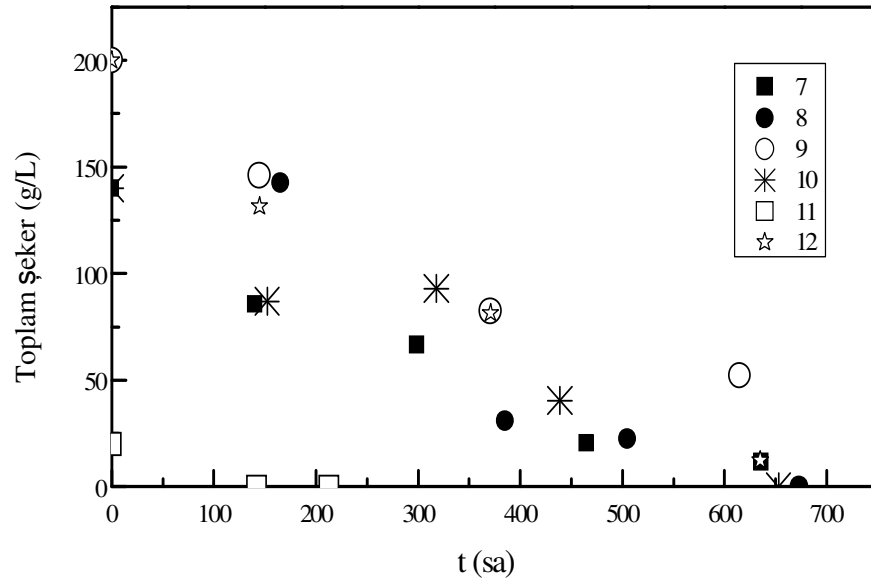
Şekil 4.8. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri



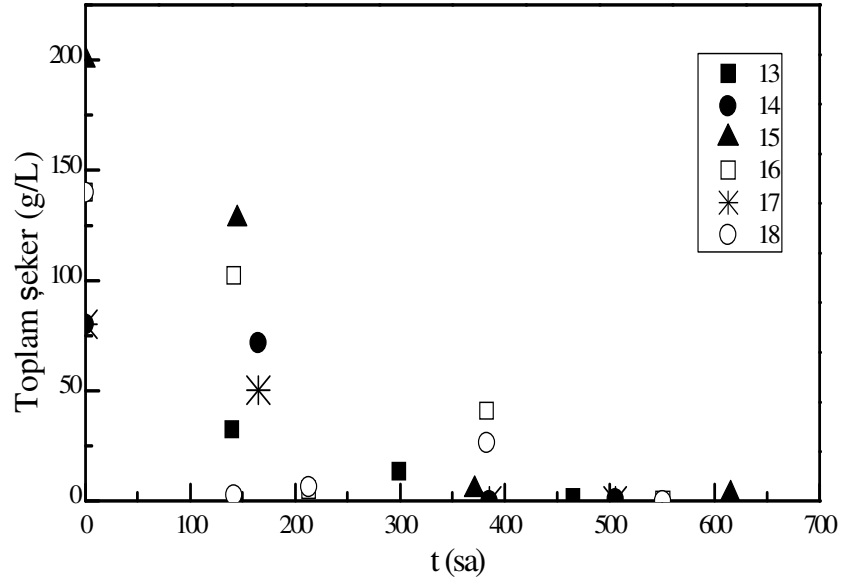
Şekil 4.11-4.15’te, ölçülen toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri görülmektedir.



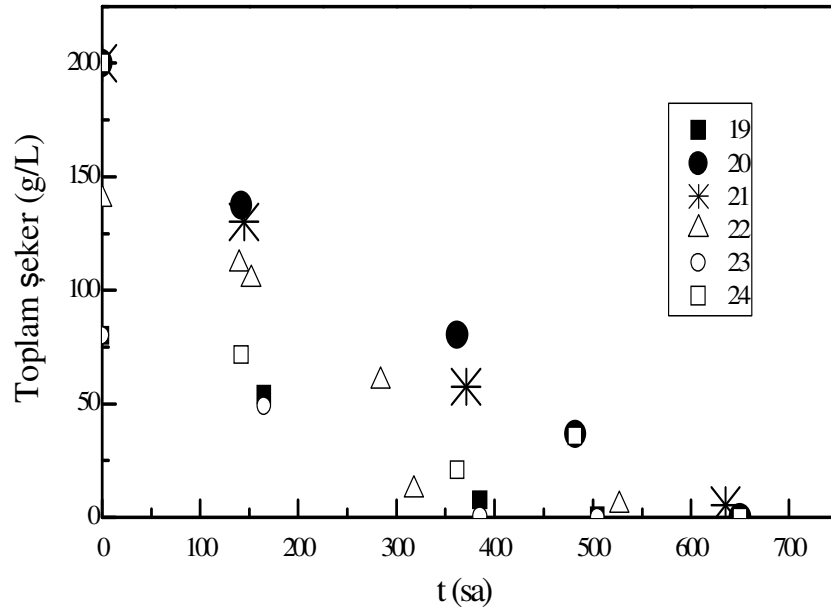
Şekil 4.11. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri



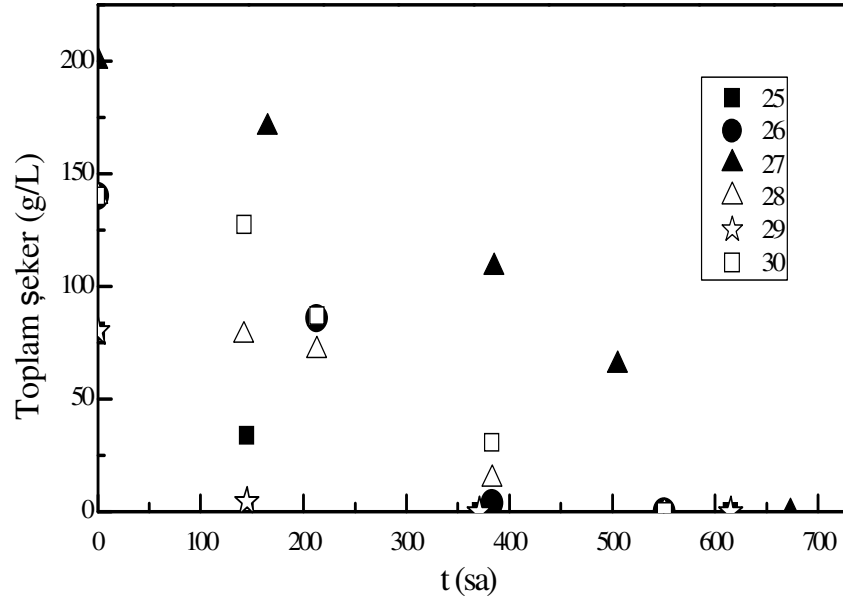
Şekil 4.12. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri



Şekil 4.13. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri



Şekil 4.14. “19-24” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri



Şekil 4.15. “25-30” numaralı deneyler için elde edilen toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.1-4.15 kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen yanıtlar, Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Maksimum sitrik asit derişimi olan Y_1 ’in en yüksek değeri 68.14 g/L ve en düşük değeri 0.21 g/L olarak bulunmuştur. Sitrik asit üretim hızı olan Y_2 , 0.01-0.354 g/L.sa arasında değışirken, sitrik asit verimleri (Y_3) % 1.05-36.84, Y_4 olarak ifade edilen maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranları 3.65-95.63 aralığında hesaplanmıştır. Özgöl üreme hızlarının (Y_5), 0.0027-0.0260 sa^{-1} arasında değıştiğı saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Deneylerde hesaplanan maksimum sitrik asit derişimleri (Y_1), maksimum sitrik asit üretim hızları (Y_2), sitrik asit verimleri (Y_3), maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranları (Y_4) ve özgül üreme hızları (Y_5)

Deney no.	Y_1 (g/L)	Y_2 (g/L.sa)	Y_3 (%)	Y_4	Y_5 (sa ⁻¹)
1	9.89	0.059	7.08	70.64	0.0170
2	15.98	0.129	11.40	79.22	0.0158
3	45.82	0.265	17.62	38.50	0.0144
4	13.71	0.024	17.13	8.41	0.0120
5	12.45	0.027	15.56	9.80	0.0085
6	18.92	0.111	13.52	94.60	0.0136
7	6.81	0.022	5.31	7.25	0.0094
8	65.76	0.304	32.91	17.21	0.0110
9	11.88	0.060	8.04	9.00	0.0130
10	20.10	0.121	14.36	10.81	0.0260
11	0.21	0.007	1.05	10.50	0.0097
12	41.37	0.172	22.04	13.16	0.0027
13	20.56	0.112	21.55	76.07	0.0152
14	11.12	0.126	14.09	3.94	0.0176
15	17.77	0.107	9.04	3.65	0.0055
16	51.39	0.235	36.84	7.12	0.0150
17	12.58	0.125	15.72	5.52	0.0140
18	37.61	0.128	12.85	87.01	0.0141
19	5.92	0.026	7.45	26.91	0.0307
20	47.69	0.114	23.85	26.94	0.0310
21	68.14	0.294	34.99	5.47	0.0047
22	1.59	0.010	1.17	3.82	0.0030
23	4.74	0.037	5.93	5.80	0.0172
24	27.19	0.129	13.59	5.42	0.0135
25	17.39	0.064	21.73	4.95	0.0037
26	15.30	0.089	10.94	95.63	0.0120
27	66.75	0.354	33.38	21.46	0.0129
28	13.08	0.108	9.34	72.67	0.0150
29	26.07	0.074	32.58	7.78	0.0048
30	14.19	0.112	10.15	89.47	0.0122

4.3. Çeşitli Parametrelerin Bağımlı Değişkenler Üzerine Etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmesi

4.3.1. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi

Maksimum sitrik asit derişimi (Y_1) üzerine; başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) etkileri, Eş. 4.1 ile gösterilen karesel model ile ifade edilmiştir.

$$\begin{aligned} Y_1 = & -192.565 + 0.89517X_1 + 7.23955X_2 + 1.21263X_3 + 8.90744X_4 \\ & + 0.042175X_1X_2 - 0.055807X_1X_3 - 0.030801X_1X_4 - 0.027750X_2X_3 \\ & - 0.11843X_2X_4 - 0.23562X_3X_4 + 6.21730 \times 10^{-4} X_1^2 - 0.65873X_2^2 \\ & + 1.03612X_3^2 - 0.65655X_4^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Eşitlik 4.1 ile oluşturulan modele ait varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.5'te verilmiştir. Buna göre, türetilen model önemli bulunmuş, modelin belirtme katsayısı, $R^2 = 0.875$ olarak elde edilmiştir. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç substrat derişimi ve İUP başlangıç derişiminin lineer etkileri oldukça önemli bulunmuştur. Çizelge 4.5'te; maksimum sitrik asit derişimi üzerine bu iki parametrenin ikili etkileşimlerinin de önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca, başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileşimi ile, İUP başlangıç derişiminin karesel etkisi de önemli bulunmuştur. Elde edilen varyans analizi sonuçlarına göre, maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç pH'ının lineer ve karesel etkileri önemsiz ($P > 0.05$) bulunmuştur. Besiyeri başlangıç pH'ının diğer parametreler ile etkileşimlerinin de önemsiz olduğu görülmektedir.

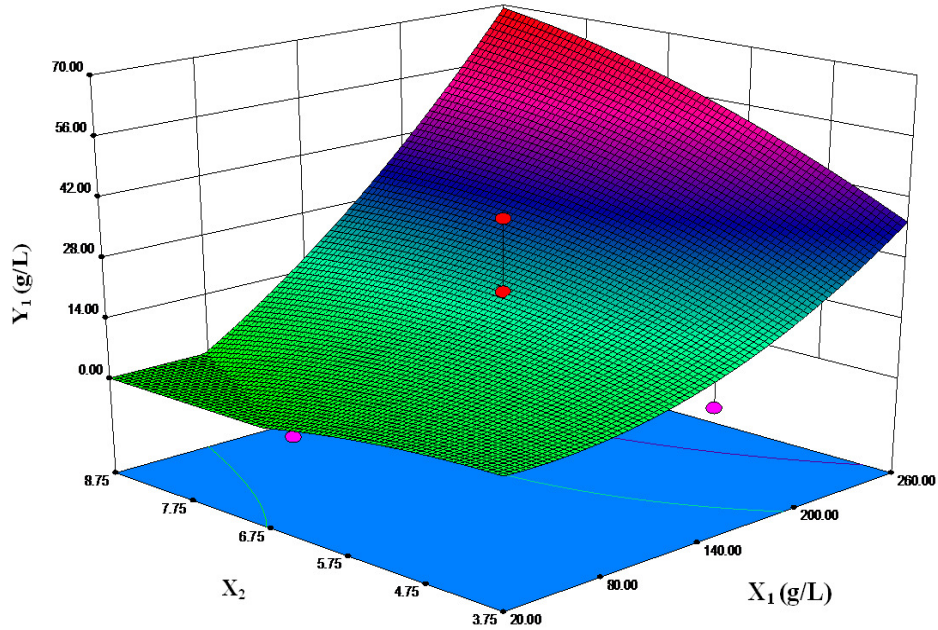
Çizelge 4.5. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) maksimum sitrik asit derişimi (Y_1) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F	R ²
Model	14	702.68	7.50**	0.875
X_1	1	4642.32	49.56**	
X_2	1	76.01	0.81	
X_3	1	2621.49	27.99**	
X_4	1	204.11	2.18	
X_1X_2	1	160.09	1.71	
X_1X_3	1	717.57	7.66*	
X_1X_4	1	669.39	7.15*	
X_2X_3	1	0.08	8.221×10^{-4}	
X_2X_4	1	4.30	0.046	
X_3X_4	1	43.86	0.47	
X_1^2	1	137.41	1.47	
X_2^2	1	29.06	0.31	
X_3^2	1	471.13	5.03*	
X_4^2	1	17.74	0.19	
Uyum eksikliği	10	102.25	1.34	
Hata	5	76.50		
Genel	29			

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

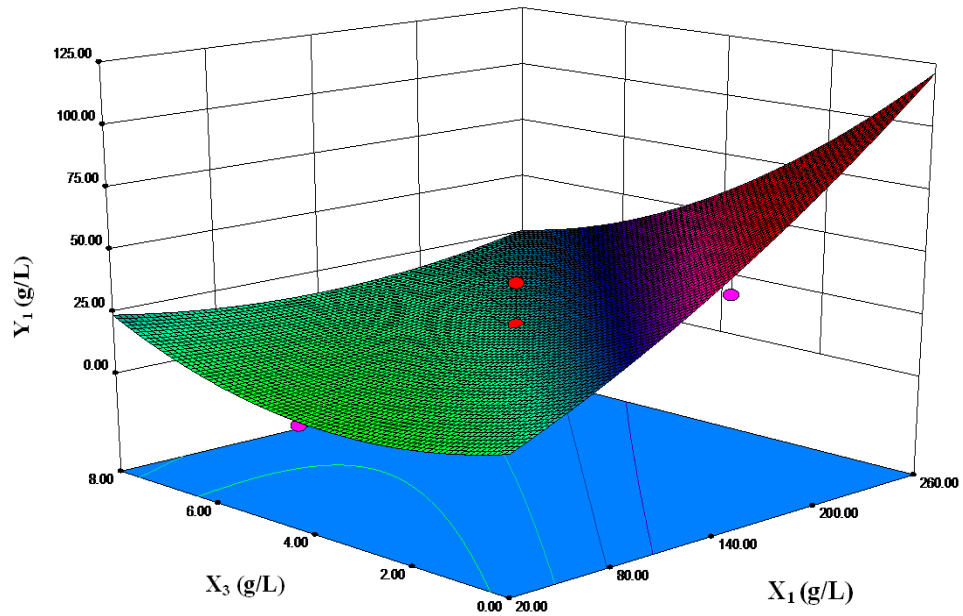
Şekil 4.16-4.21'de, maksimum sitrik asit derişimi üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri verilmiştir. Oluşturulan grafiklerde kullanılan parametreler dışındaki bağımsız değişkenler için, merkez noktasındaki

değerler kullanılmıştır. Şekil 4.16'da verilen yanıt yüzey grafiğinde, başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın maksimum sitrik asit derişimi üzerine etkileri görülmektedir. Yanıt yüzeyindeki kırmızı-pembe renkler, yanıt için yüksek değerleri, yeşil renk ise; düşük değerleri simgelemektedir. Grafiğe göre, belirli bir pH değerinde başlangıç toplam şeker derişiminin artması ile, maksimum sitrik asit derişimi artmaktadır. Bu etkinin, yüksek pH değerlerinde daha belirgin olduğu görülmektedir. Özellikle düşük toplam şeker derişimlerinde, maksimum sitrik asit derişimi üzerine pH'nın etkisinin önemsiz olduğu Şekil 4.16'da da görülmektedir. Yaklaşık 140 g/L'nin üzerindeki toplam şeker derişimlerinde ise; başlangıç pH'nın artması ile maksimum sitrik asit derişiminin bir miktar arttığı belirlenmiştir. Şekil 4.16'ya ait kontur grafiği, örnek olarak EK 4'te sunulmuştur.



Şekil 4.16. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın etkileri ($X_3 = 4.00$ g/L, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

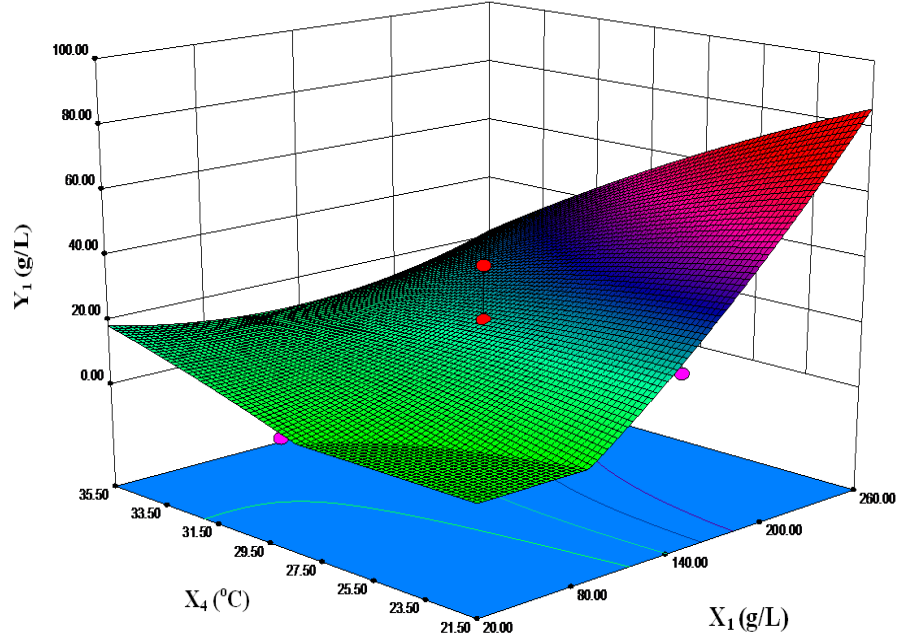
Şekil 4.17’de, maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkileri verilmiştir. Düşük toplam şeker derişimlerinde, İUP başlangıç derişimindeki değişimin, maksimum sitrik asit derişimini fazla etkilemediği görölmektedir. Ancak, özellikle 200 g/L’nin üzerindeki şeker derişimlerinde, İUP miktarının azalması ile, maksimum sitrik asit derişiminin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur.



Şekil 4.17. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

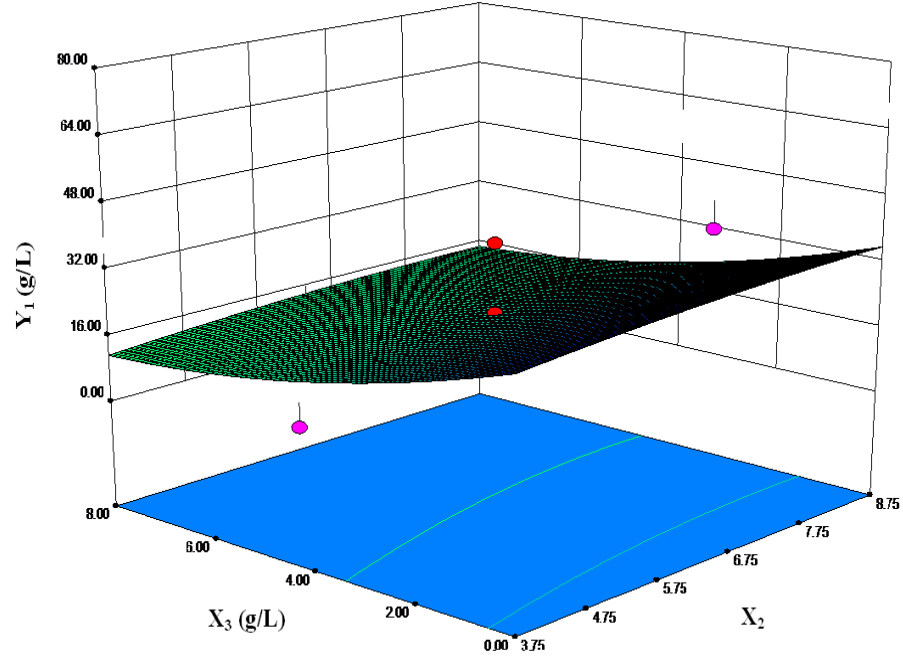
Başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın, maksimum sitrik asit derişimi üzerine etkileri, Şekil 4.18’deki grafikte verilmiştir. Yaklaşık 30°C ’nin üzerindeki sıcaklıklarda, sitrik asit üretiminin olumsuz etkilendiği görölmektedir. Bu bölgede, başlangıç toplam şeker derişimini arttırmanın, sitrik asit üretimini fazla etkilemediği bulunmuştur. Ancak 30°C ’nin altındaki sıcaklıklarda, başlangıç toplam şeker

derişiminin maksimum sitrik asit derişimi üzerine etkisinin önemli olduğu gör÷lmektedir.



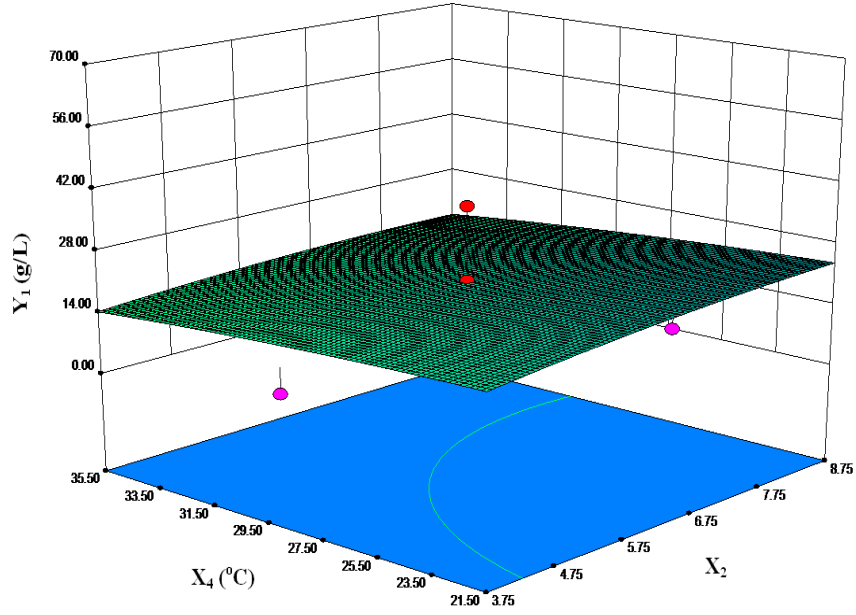
Şekil 4.18. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_3 = 4.00$ g/L)

Şekil 4.19’da, maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç pH’ı ve İUP başlangıç derişiminin etkileri gör÷lmektedir. İncelenen pH aralığında, İUP başlangıç derişiminin artması ile, maksimum sitrik asit derişiminin azaldığı bulunmuştur. İrmikaltı un protein konsantratu başlangıç derişiminin yüksek olduğu durumda, pH’daki değışimin maksimum sitrik asit derişimini fazla etkilemediği belirlenmiştir. Ancak bu bileşenin düşük derişimlerinde ve sıfır olduğu durumda, pH’nın artması ile maksimum sitrik asit derişiminin bir miktar arttığı gör÷lmektedir.

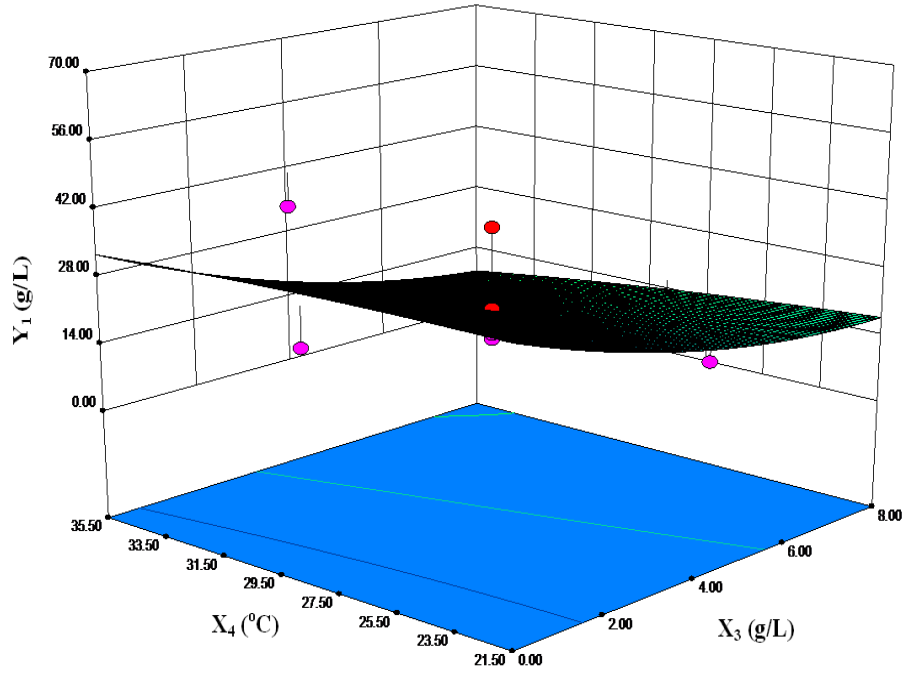


Şekil 4.19. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç pH'ı ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

Şekil 4.20'de verilen grafikte, başlangıç pH'ı ve sıcaklığın, maksimum sitrik asit derişimi üzerindeki etkileri görölmektedir. Başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin merkez noktadaki değerlerinin kullanıldığı bu grafikte; sıcaklık ve pH'nın maksimum sitrik asit derişimi üzerine fazla bir etkisinin olmadığı görölmektedir. Kullanılan bağımsız değişkenlerden; İUP başlangıç derişimi ve sıcaklığın maksimum sitrik asit derişimi üzerine etkileri, Şekil 4.21'deki grafikte gösterilmiştir. Çalışılan aralıktaki bütün sıcaklıklarda, İUP başlangıç derişiminin azalmasının, sitrik asit üretimi üzerinde olumlu etki yarattığı görölmektedir. Düşük İUP başlangıç derişimlerinde, sıcaklığın artırılmasının maksimum sitrik asit derişimini fazla etkilemediği belirlenmiştir. Ancak, bu bileşenin 8 g/L'ye yakın derişimlerinde, sıcaklığın artırılması ile, maksimum sitrik asit derişiminin azaldığı bulunmuştur.



Şekil 4.20. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç pH'ı ve sıcaklığın etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_3 = 4.00$ g/L)



Şekil 4.21. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine İUP başlangıç derişimi ve sıcaklığın etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_2 = 6.25$)

4.3.2. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi

Maksimum sitrik asit üretim hızı (Y_2) üzerine; başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) etkileri, Eş. 4.2 ile gösterilen karesel model ile ifade edilmiştir. Türetilen modele ait belirtme katsayısı $R^2 = 0.933$ olarak bulunmuştur.

$$\begin{aligned} Y_2 = & -0.16012 + 2.3134 \times 10^{-3} X_1 + 0.022512 X_2 - 0.05509 X_3 + 0.015392 X_4 \\ & + 2.25 \times 10^{-5} X_1 X_2 - 2.28646 \times 10^{-4} X_1 X_3 - 4.25595 \times 10^{-5} X_1 X_4 - 3.325 \times 10^{-3} X_2 X_3 \\ & + 2.04286 \times 10^{-3} X_2 X_4 + 1.9375 \times 10^{-3} X_3 X_4 + 2.67072 \times 10^{-6} X_1^2 - 5.20667 \times 10^{-3} X_2^2 \\ & + 3.09115 \times 10^{-3} X_3^2 - 6.53912 \times 10^{-3} X_4^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

Kullanılan bağımsız değişkenlerin maksimum sitrik asit üretim hızı üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.6'da verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, türetilen model oldukça önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur. Başlangıç toplam şeker derişimi, İUP başlangıç derişimi ve sıcaklığın lineer etkilerinin, maksimum sitrik asit üretim hızı için önemli oldukları görülmektedir (Çizelge 4.6). Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine, başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişimi etkileşiminin de önemli olduğu bulunmuştur. Bunun dışındaki parametre etkileşimlerinin önemsiz ($P > 0.05$) bulunduğu görülmektedir. Besiyeri başlangıç pH'ının lineer etkisi ve dört bağımsız değişkenin karesel etkilerinin de önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.22-4.27'de, maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri görülmektedir. Oluşturulan grafiklerde

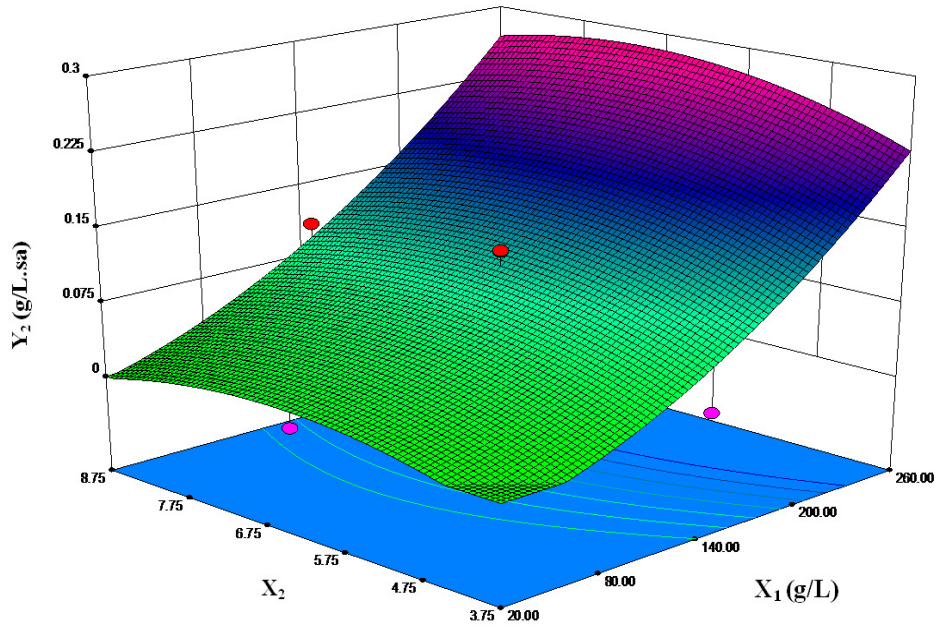
kullanılan parametreler dışındaki bağımsız değişkenler için, merkez noktasındaki değerler kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) maksimum sitrik asit üretim hızı (Y_2) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F	R ²
Model	14	0.016	14.84**	0.933
X_1	1	0.100	93.27**	
X_2	1	1.134×10^{-3}	1.06	
X_3	1	0.075	70.08**	
X_4	1	0.016	14.74**	
X_1X_2	1	4.556×10^{-5}	0.04	
X_1X_3	1	0.012	11.27**	
X_1X_4	1	1.278×10^{-3}	1.20	
X_2X_3	1	1.106×10^{-3}	1.03	
X_2X_4	1	1.278×10^{-3}	1.20	
X_3X_4	1	2.943×10^{-3}	2.75	
X_1^2	1	2.536×10^{-3}	2.37	
X_2^2	1	1.815×10^{-3}	1.70	
X_3^2	1	4.193×10^{-3}	3.92	
X_4^2	1	1.760×10^{-3}	1.65	
Uyum eksikliği	10	1.498×10^{-3}	7.05*	
Hata	5	2.123×10^{-4}		
Genel	29			

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

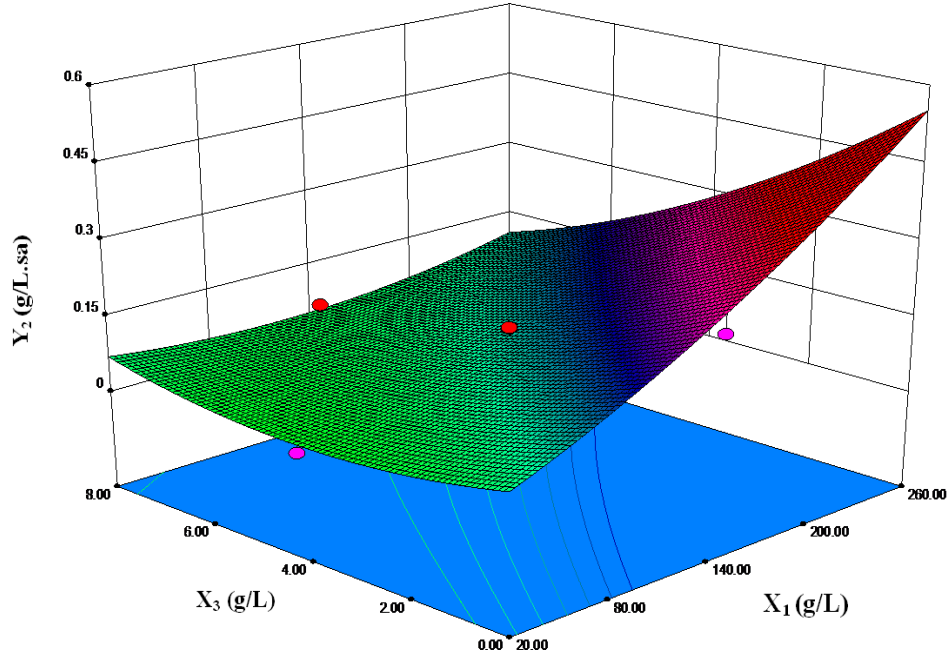
Şekil 4.22’de verilen grafikte; yaklaşık 4.75’ten küçük pH değerlerinde ve yaklaşık 50 g/L’nin altındaki toplam şeker derişimlerinde maksimum sitrik asit üretim hızının olumsuz etkilendiği görülmektedir. Yaklaşık 4.75’in üzerindeki pH değerlerinde, başlangıç toplam şeker derişiminin artması ile Y_2 yanıtının arttığı belirlenmiştir. Ancak bu artışın, pH 5.75-7.75 aralığında daha fazla olduğu bulunmuştur. Belirli bir toplam şeker derişiminde pH’nın arttırılmasının, sitrik asit üretim hızını fazla etkilemediği görülmektedir.



Şekil 4.22. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH’ının etkileri ($X_3 = 4.00$ g/L, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafiği, Şekil 4.23’te verilmiştir. Bu iki parametrenin Y_2 üzerine olan etkileri ile, Y_1 üzerine olan etkilerinin benzer olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.17). Düşük başlangıç toplam şeker derişimlerinde, İUP başlangıç derişimindeki değişimin, sitrik asit üretim hızını fazla

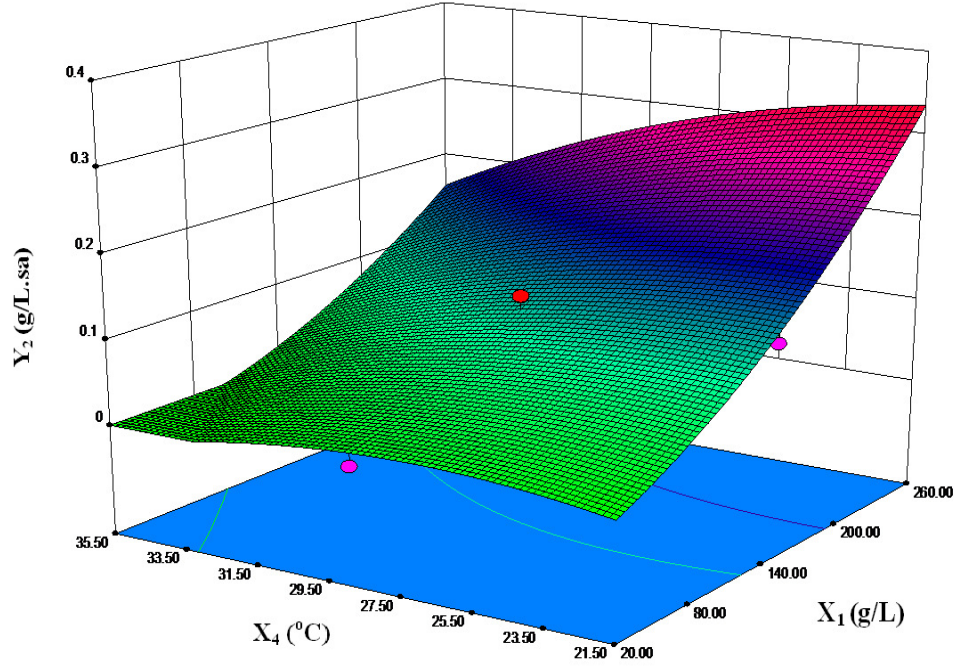
etkilemediği, ancak yüksek toplam şeker derişimlerinde oldukça fazla etkilediği bulunmuştur. İUP başlangıç derişiminin düşük ve başlangıç toplam şeker derişiminin yüksek olduğu ortamlarda Y_2 yanıtının en yüksek değerlerine ulaştığı, Şekil 4.23'teki grafikte görölmektedir.



Şekil 4.23. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

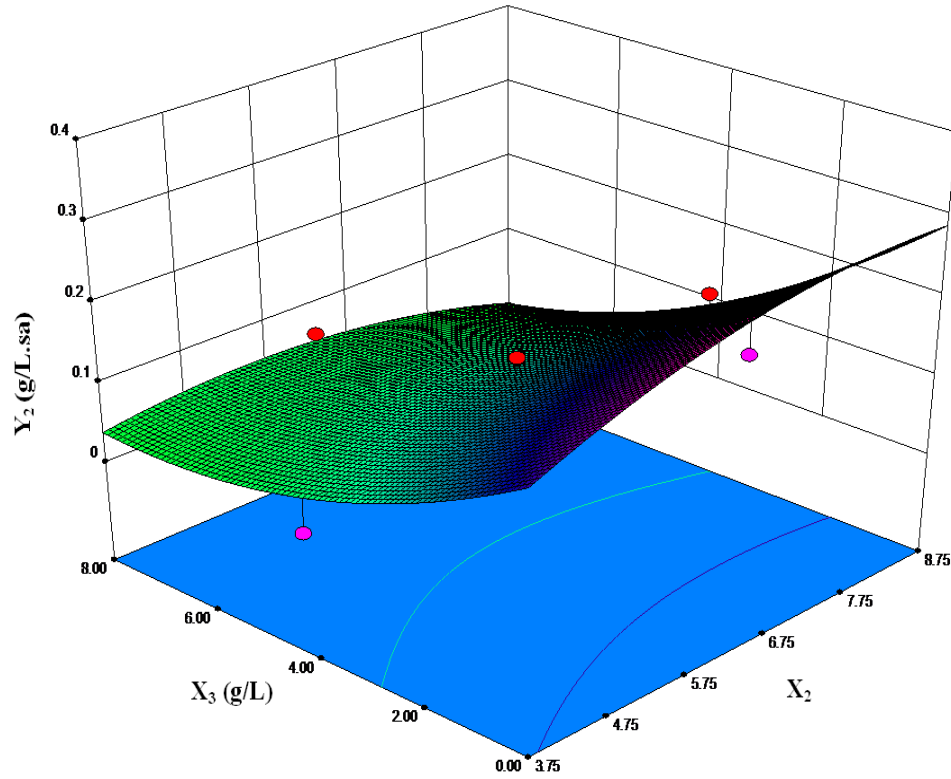
Şekil 4.24'te, maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri görölmektedir. Yaklaşık 80 g/L'nin altındaki toplam şeker derişimleri ve 33.5°C 'nin üzerindeki sıcaklıkların Y_2 yanıtını oldukça olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Başlangıç toplam şeker derişiminin artırılması ile sitrik asit üretim hızının, 31.5 - 33.5°C aralığında bir miktar arttığı belirlenmiştir. Bu artışın, 31.5°C 'nin altındaki sıcaklıklarda daha fazla olduğu grafikte görölmektedir. Yüksek şeker derişimlerinde, sıcaklığın artırılmasının, maksimum sitrik asit üretim hızını

olumsuz etkilediği bulunmuştur. Ancak, özellikle 20-140 g/L toplam şeker derişimi aralığında, sıcaklığın 25.5-31.5°C arasında değişmesinin, Y_2 yanıtını fazla etkilemediği belirlenmiştir.



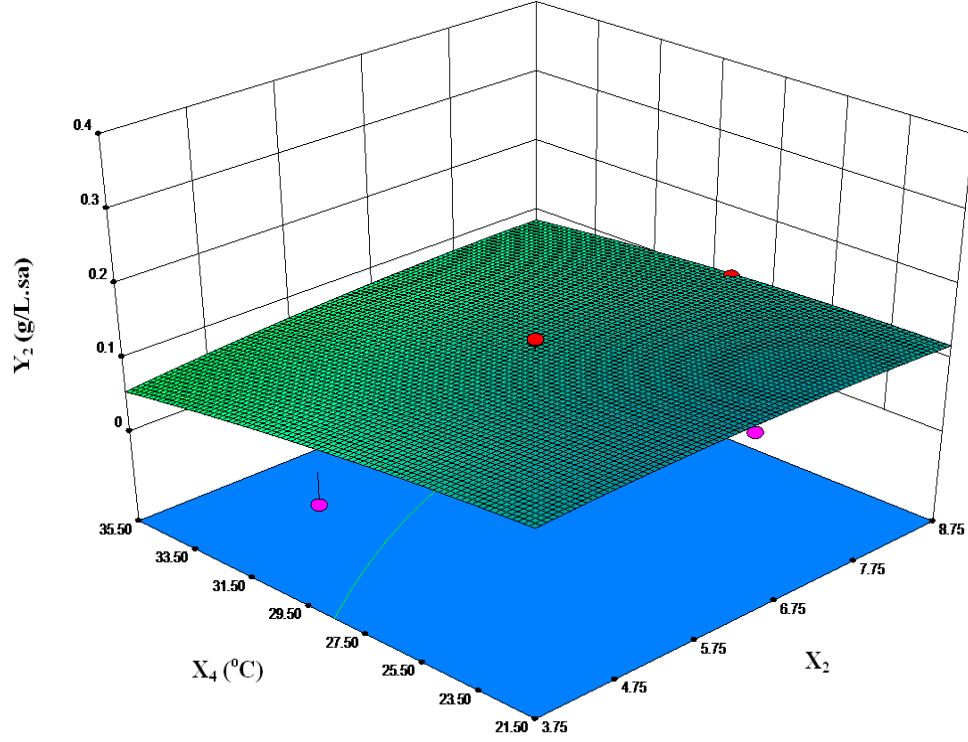
Şekil 4.24. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_3 = 4.00$ g/L)

Şekil 4.25'te, maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine İUP başlangıç derişimi ve başlangıç pH'nın etkileri görülmektedir. Artan İUP başlangıç derişiminin özellikle yüksek başlangıç pH'larında maksimum sitrik asit üretim hızını düşürdüğü gözlenmektedir. Bunun yanında, 4.00-8.00 g/L İUP başlangıç derişimi aralığında, besiyeri başlangıç pH'nın önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ancak, yaklaşık 4.00 g/L'nin altındaki İUP başlangıç derişimlerinde, pH'nın artması ile Y_2 yanıtının arttığı, en yüksek değerlerine de yaklaşık 6.75-7.75 pH aralığında ulaştığı bulunmuştur.



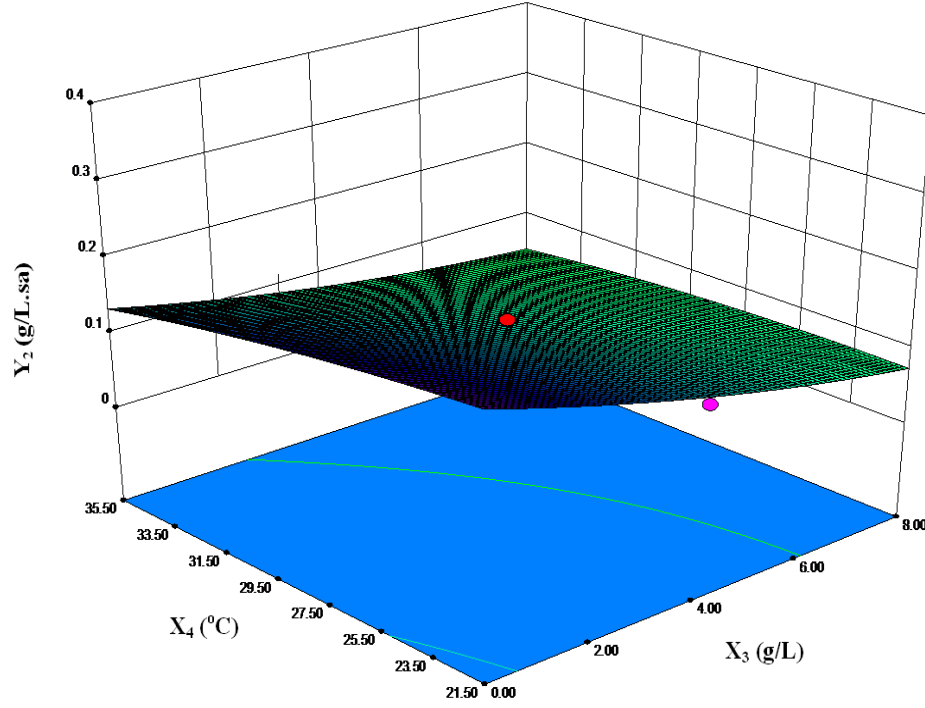
Şekil 4.25. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine İUP başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_4 = 28.5$ °C)

Besiyeri başlangıç pH'ı ve sıcaklığın, maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine etkileri, Şekil 4.26'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde, bu iki parametre arasındaki etkileşimin Y_2 açısından önemli olmadığı görülmektedir. X_1 ve X_3 parametrelerinin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak oluşturulan bu grafikte, maksimum sitrik asit üretim hızının düşük olduğu ve sıcaklık ve pH değişimlerinden fazla etkilenmediği gözlenmektedir.



Şekil 4.26. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine sıcaklık ve başlangıç pH'nın etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_3 = 4.00$ g/L)

Şekil 4.27'de, sıcaklık ve İUP başlangıç derişiminin Y_2 üzerine etkileri görülmektedir. Çalışılan sıcaklık aralığında, İUP başlangıç derişimi arttıkça, maksimum sitrik asit üretim hızının azaldığı bulunmuştur. Ancak bu azalmanın, yüksek sıcaklıklarda daha belirgin olduğu görülmektedir. Benzer şekilde, belirli bir İUP başlangıç derişiminde sıcaklığın artması ile hız değerlerinin azaldığı, ancak bu azalmanın yüksek İUP başlangıç derişimlerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın merkez noktadaki değerleri için çizilen bu grafikte, sitrik asit üretim hızının genellikle düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.27. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine sıcaklık ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_2 = 6.25$)

4.3.3. Sitrik asit verimi üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi

Sitrik asit verimi (Y_3) üzerine; başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) etkileri, yanıt yüzey metodu ile modellenmiş ve türetilen karesel model, Eş. 4.3 ile gösterilmiştir. Türetilen modele ait belirtme katsayısı $R^2 = 0.788$ olarak bulunmuştur. İncelenen bağımsız değişkenlerin sitrik asit verimi üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları ise; Çizelge 4.7'de verilmiştir.

$$\begin{aligned}
Y_3 = & -87.72284 - 0.5436X_1 + 1.73483X_2 - 5.34874X_3 + 5.02242X_4 \\
& + 0.028558X_1X_2 - 0.016016X_1X_3 - 0.021854X_1X_4 + 0.23025X_2X_3 \\
& - 0.14500X_2X_4 - 0.14545X_3X_4 + 7.20197 \times 10^{-5} X_1^2 - 0.15567X_2^2 \\
& + 0.85388X_3^2 - 0.010876X_4^2
\end{aligned} \tag{4.3}$$

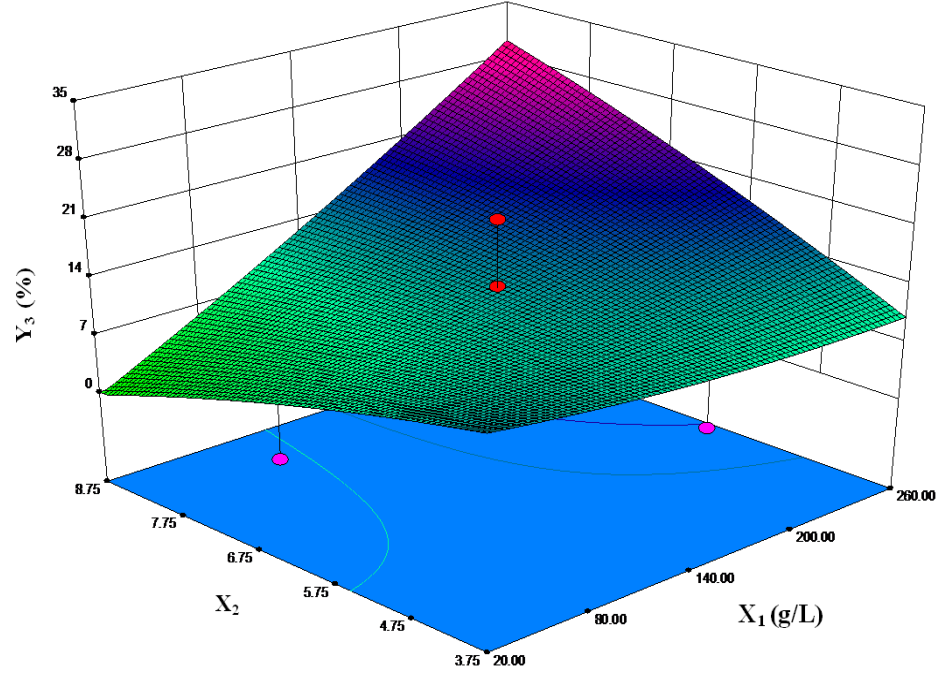
Çizelge 4.7. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) sitrik asit verimi (Y_3) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F	R ²
Model	14	163.20	3.97**	0.788
X_1	1	271.96	6.62*	
X_2	1	12.43	0.30	
X_3	1	1153.29	28.08**	
X_4	1	6.19	0.15	
X_1X_2	1	73.40	1.79	
X_1X_3	1	59.10	1.44	
X_1X_4	1	337.00	8.21*	
X_2X_3	1	5.30	0.13	
X_2X_4	1	6.44	0.16	
X_3X_4	1	16.59	0.40	
X_1^2	1	1.84	0.05	
X_2^2	1	1.62	0.04	
X_3^2	1	319.98	7.79*	
X_4^2	1	0.49	0.01	
Uyum eksikliği	10	52.87	3.03	
Hata	5	17.47		
Genel	29			

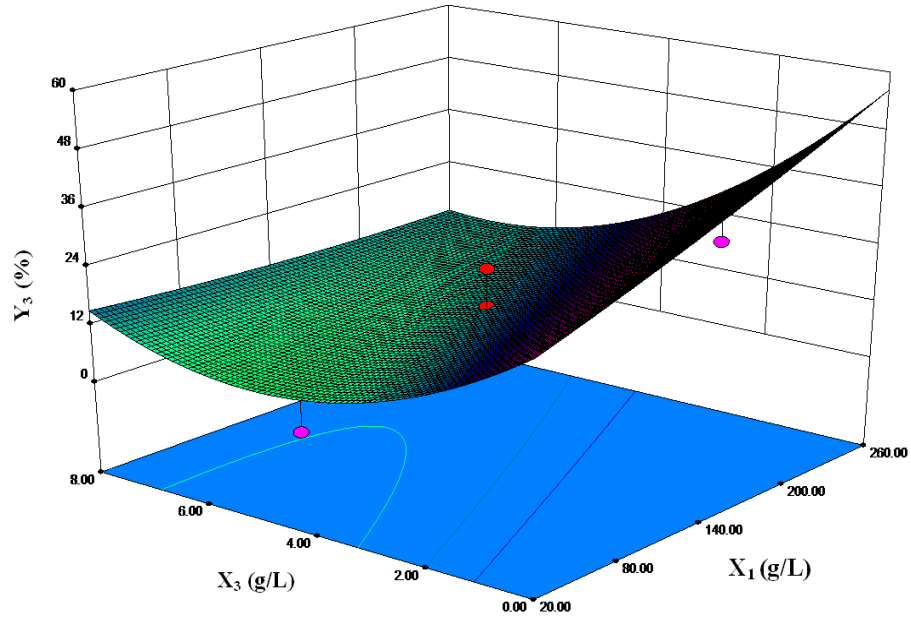
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Çizelge 4.7’de verilen varyans analizi sonuçlarına göre, türetilen model önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. Sitrik asit verimi üzerine, başlangıç toplam şeker derişiminin lineer etkisi ile İUP başlangıç derişiminin lineer ve karesel etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca; başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklık etkileşiminin verim üzerine etkisi de önemli bulunmuştur. Bu yanıt için de, başlangıç pH’ının lineer ve karesel etkisinin ve diğer parametrelerle etkileşiminin önemsiz ($P>0.05$) olduğu görölmektedir.

Başlangıç toplam şeker derişimi ve besiyeri başlangıç pH’ının sitrik asit verimi üzerine etkileri, Şekil 4.28’deki grafikte görölmektedir. Düşük toplam şeker derişimlerinde (20-80 g/L), pH’ın artması ile sitrik asit veriminin azaldığı, toplam şeker derişiminin yüksek olduğu (140-260 g/L) durumlarda ise; pH’daki artışın, verimi arttırdığı bulunmuştur. Başlangıç pH’ı 3.75-4.75 aralığında iken, başlangıç toplam şeker derişiminin Y_3 üzerine fazla bir etkisinin olmadığı görölmektedir. Ancak yüksek pH değerlerinde, başlangıç toplam şeker derişiminin artması ile verimin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Sitrik asit verimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkileri Şekil 4.29’da verilmiştir. İUP başlangıç derişiminin yüksek olduğu durumlarda (6.00-8.00 g/L), başlangıç toplam şeker derişimindeki değişimin, sitrik asit verimi üzerine fazla bir etkisinin olmadığı görölmektedir. Ancak İUP başlangıç derişimi sifıra yaklaştıkça, başlangıç toplam şeker derişiminin artması ile verimin oldukça arttığı bulunmuştur. Bütün toplam şeker derişimlerinde, İUP başlangıç derişiminin 4.00-6.00 g/L olduğu aralıkta verim için en düşük değerler elde edilmiştir.

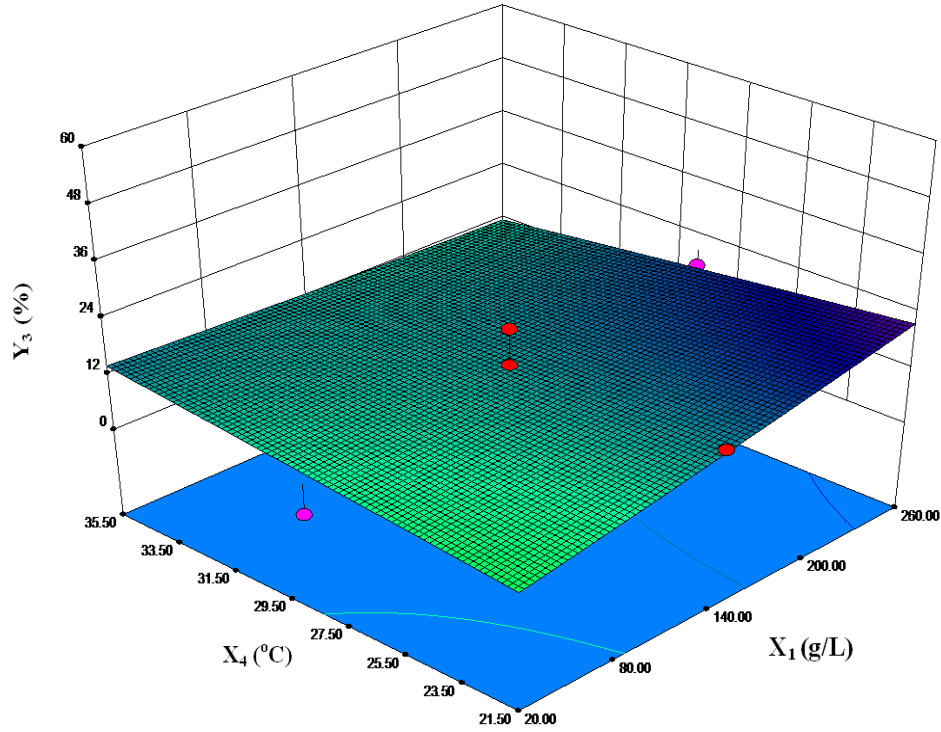


Şekil 4.28. Sitrik asit verimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın etkileri ($X_3 = 4.00$ g/L, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)



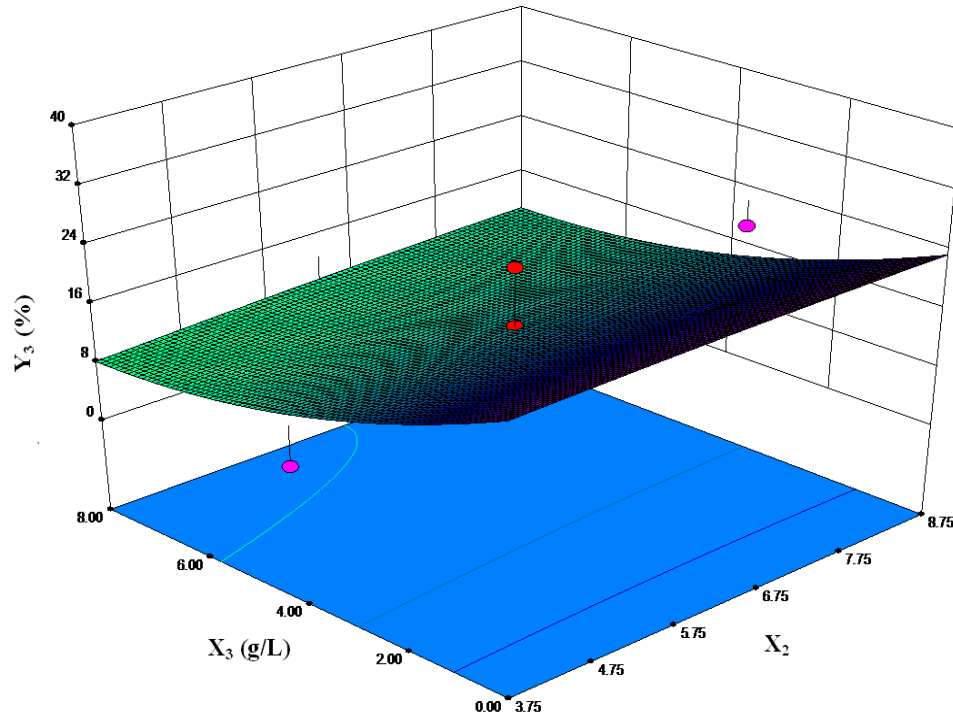
Şekil 4.29. Sitrik asit verimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

Şekil 4.30’da verilen yanıt yüzey grafiğinde, başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın sitrik asit verimi üzerindeki etkileri görölmektedir. Grafiğe göre; düşük başlangıç toplam şeker derişimlerinde sıcaklığın arttırılmasının verim üzerinde olumlu etkisi bulunurken, yüksek toplam şeker derişimlerinde bu etkinin olumsuz olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık yaklaşık 21.5-25.5 °C aralığında iken, başlangıç toplam şeker derişimindeki artış, verimi arttırmıştır. 33.5-35.5°C aralığındaki sıcaklıklarda ise; başlangıç toplam şeker derişiminin artmasının, sitrik asit verimi üzerinde olumsuz etki yarattığı bulunmuştur. İUP başlangıç derişiminin 4.00 g/L olduğu durum için çizilen bu grafikte, verim değeriinin düşük olduğu görölmektedir.



Şekil 4.30. Sitrik asit verimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_3 = 4.00$ g/L)

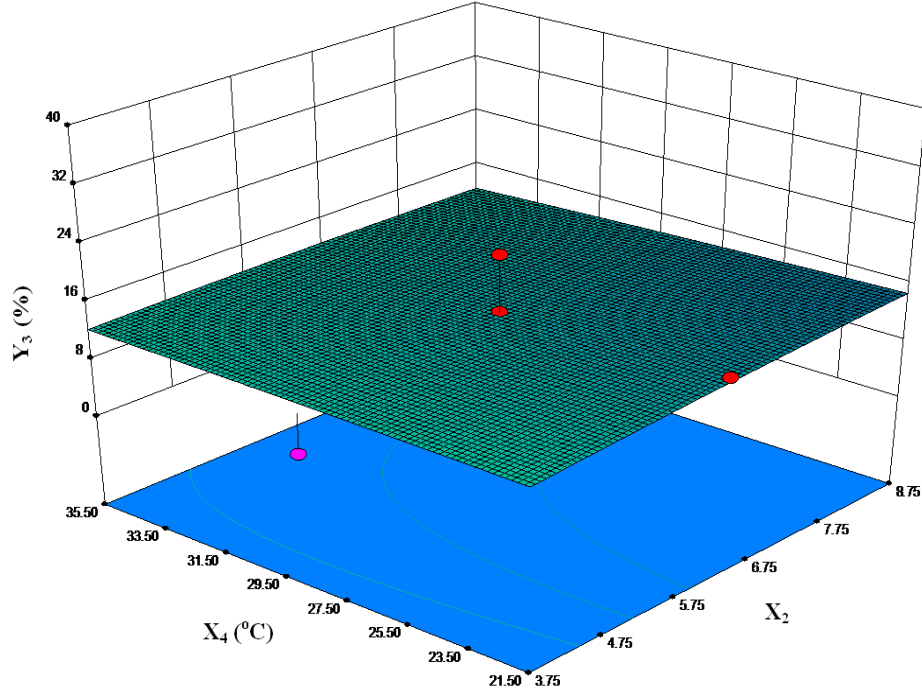
İUP başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının sitrik asit verimi üzerine etkilerini gösteren Şekil 4.31'de; İUP başlangıç derişimindeki azalmanın verimi olumlu yönde etkilediğı görölmektedir. Bu etkinin, yüksek pH değerlerinde daha belirgin olduğı bulunmuştur. Çalışılan aralıkta, belirli bir İUP başlangıç derişimi için, başlangıç pH'ındaki değışimin sitrik asit verimi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Sitrik asit verimi üzerine İUP başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

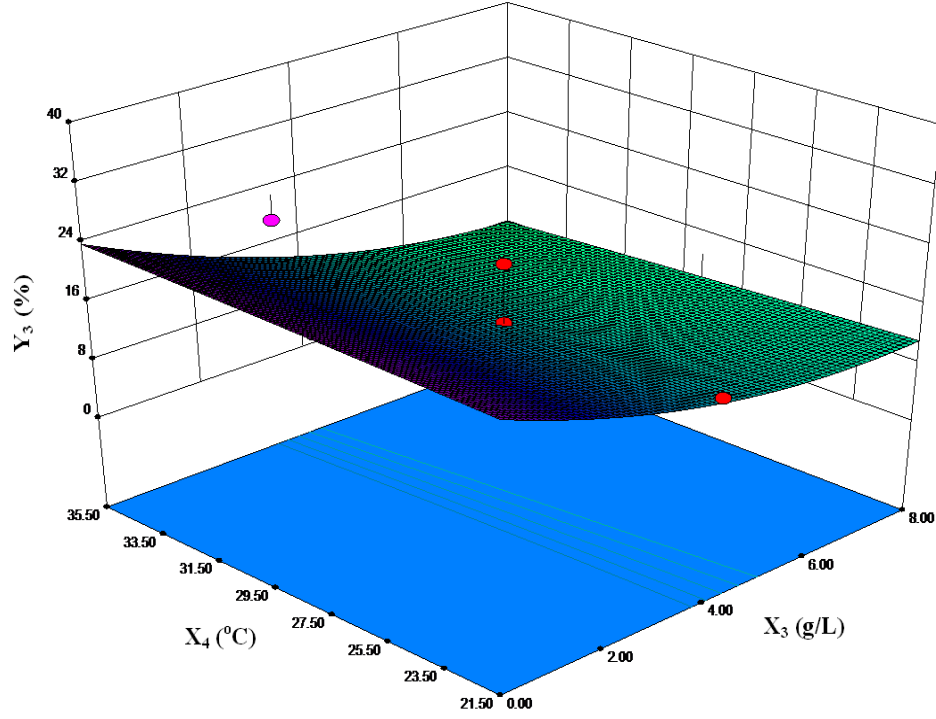
Şekil 4.32, sitrik asit verimi üzerine sıcaklığın ve başlangıç pH'ının etkilerini göstermektedir. Bütün başlangıç pH değerlerinde, sıcaklığın arttırılması ile, verimin bir miktar azaldığı bulunmuştur. Yüksek sıcaklıklarda, başlangıç pH'ındaki

değişimin, verimi fazla etkilemediği belirlenmiştir. Düşük sıcaklıklarda ise; başlangıç pH'ındaki artışın verimi bir miktar arttırdığı bulunmuştur.



Şekil 4.32. Sitrik asit verimi üzerine sıcaklığın ve başlangıç pH'ının etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_3 = 4.00$ g/L)

Sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin sitrik asit verimi üzerindeki etkilerini gösteren Şekil 4.33'e göre; bütün sıcaklıklarda, İUP başlangıç derişiminin artması ile verimin azaldığı belirlenmiştir. İUP başlangıç derişiminin düşük olduğu durumlarda (0-2 g/L), sıcaklığın artması ile sitrik asit veriminin bir miktar arttığı görülmektedir. Yüksek İUP başlangıç derişimlerinde (6-8 g/L) ise; sıcaklıktaki artışın, sitrik asit verimini olumsuz etkilediği bulunmuştur.



Şekil 4.33. Sitrik asit verimi üzerine sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_2 = 6.25$)

4.3.4. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi

Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) sitrik asit üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği bu çalışmada hesaplanan Y_4 yanıtı, maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı ($C_{s\ m}/C_{i\ m}$) olmuştur. Bağımsız değişkenlerin Y_4 üzerindeki etkileri yanıt yüzey yöntemi ile modellenmiş ve Eş. 4.4'teki karesel model elde edilmiştir. Türetilen modele ait varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.8'de verilmiştir.

$$\begin{aligned}
Y_4 = & -2101.92404 + 1.83475X_1 + 132.12719X_2 + 29.77598X_3 + 110.30689X_4 \\
& - 2.63333 \times 10^{-3} X_1 X_2 - 0.021365 X_1 X_3 - 8.48810 \times 10^{-3} X_1 X_4 + 1.643300 X_2 X_3 \\
& - 0.57971 X_2 X_4 - 0.15571 X_3 X_4 - 5.11343 \times 10^{-3} X_1^2 - 9.30773 X_2^2 \\
& - 3.70333 X_3^2 - 1.85344 X_4^2
\end{aligned} \quad (4.4)$$

Çizelge 4.8 Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4), $C_{s\ m}/C_{i\ m}$ (Y_4) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

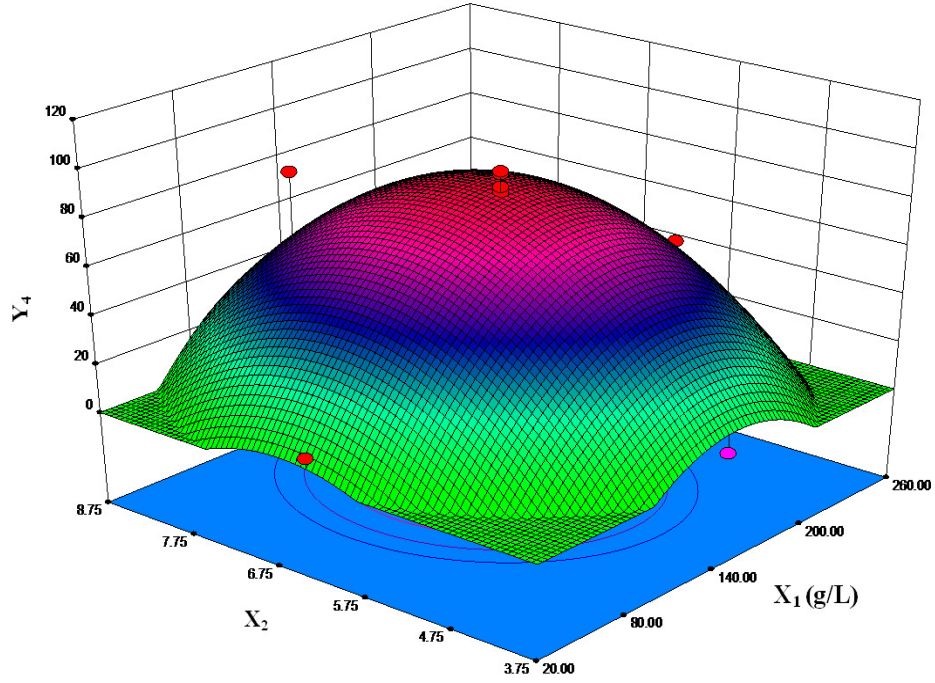
Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F	R ²
Model	14	2017.29	7.01**	0.867
X_1	1	302.46	1.05	
X_2	1	1118.75	3.89	
X_3	1	857.77	2.98	
X_4	1	175.83	0.61	
$X_1 X_2$	1	0.62	2.168×10^{-3}	
$X_1 X_3$	1	105.17	0.37	
$X_1 X_4$	1	50.84	0.18	
$X_2 X_3$	1	269.94	0.94	
$X_2 X_4$	1	102.92	0.36	
$X_3 X_4$	1	19.01	0.066	
X_1^2	1	9294.63	32.29**	
X_2^2	1	5801.38	20.15**	
X_3^2	1	6018.78	20.91**	
X_4^2	1	1419.38	49.12**	
Uyum eksikliği	10	399.94	6.28*	
Hata	318.33	5	63.67	
Genel	32559.85	29		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

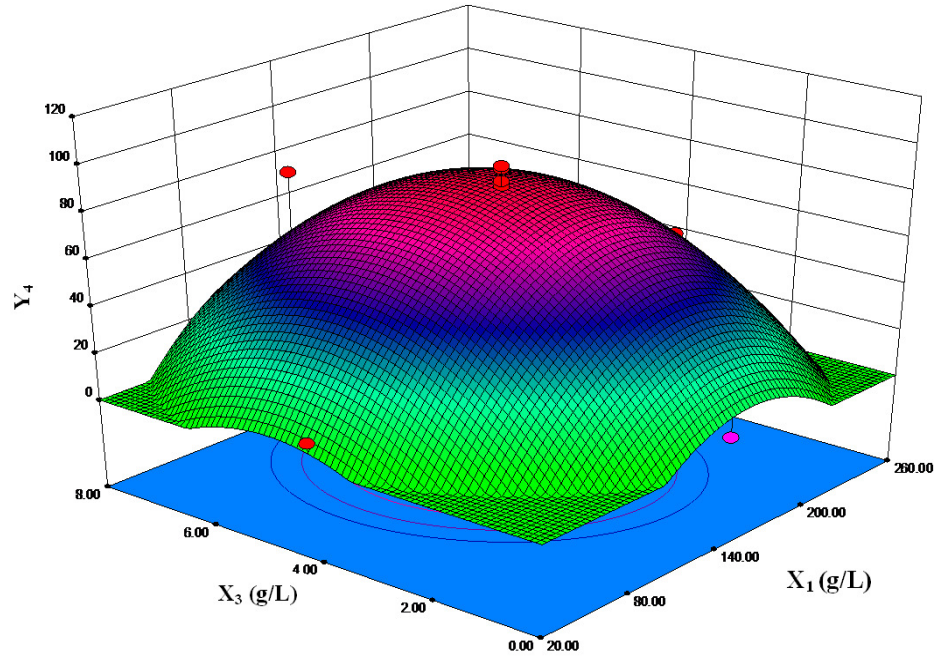
Eşitlik 4.4'e ait belirtme katsayısı, $R^2 = 0.867$ olarak bulunmuştur. Çizelge 4.7'de, oluşturulan karesel modelin önemli olduğu görülmektedir. Y_4 yanıtı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi, başlangıç pH'ı, İUP başlangıç derişimi ve sıcaklığın karesel etkilerinin oldukça önemli ($P<0.01$) olduğu bulunmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre; bu parametrelerin lineer etkileri ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin önemsiz ($P>0.05$) olduğu görülmektedir.

Şekil 4.34'te, başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ının; maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine etkileri verilmiştir. Düşük toplam şeker derişimlerinde (20-80 g/L); başlangıç pH'ının hem düşük (3.75-5.75) hem yüksek (7.75-8.75) olduğu durumlarda, Y_4 yanıtı için sıfıra yakın değerler elde edilmiştir. Aynı şekilde; yüksek (200-260 g/L) toplam şeker derişimlerinde de bahsedilen düşük ve yüksek pH değerlerinde benzer olumsuz etki gözlenmektedir.

Başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin; maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine etkilerinin verildiği Şekil 4.35'te, 20-80 g/L arasındaki düşük toplam şeker derişimlerine ait bölgede, İUP başlangıç derişiminin düşük (0.00-4.00 g/L) ve yüksek (7.00-8.00 g/L) olduğu durumlarda Y_4 yanıtının sıfıra yakın olduğu görülmektedir. Bunun yanında 200 g/L ile 260 g/L arası toplam şeker derişimlerinde de Y_4 yanıtının fazla değişmediği açıkça görülmektedir. Y_4 yanıtının en yüksek olduğu koşulların, İUP başlangıç derişimi için yaklaşık 4.00-6.00 g/L, başlangıç toplam şeker derişimi için ise; yaklaşık 140-200 g/L olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.35).

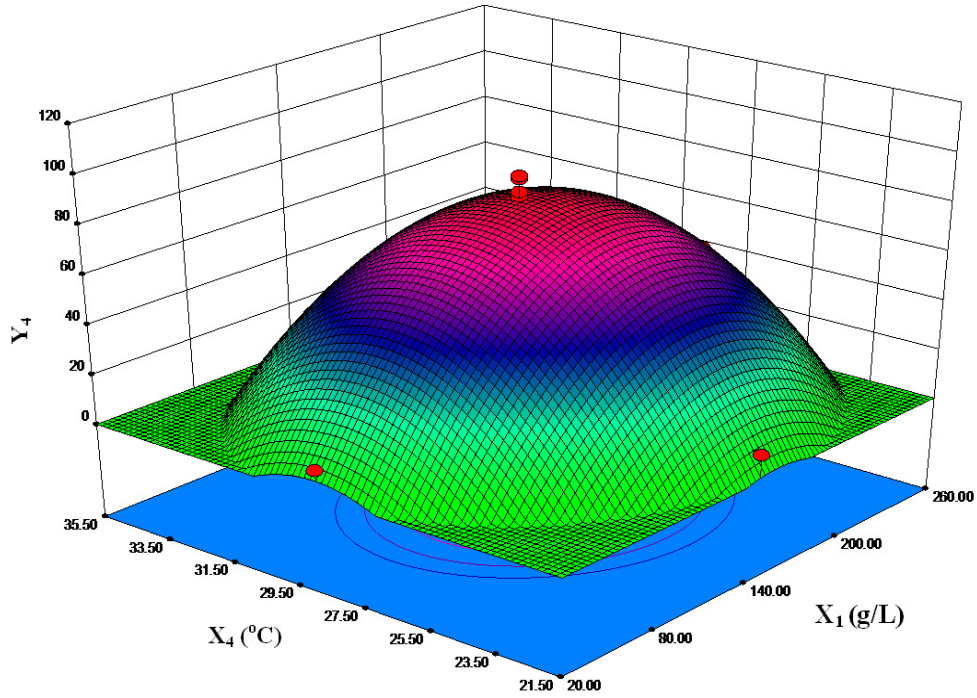


Şekil 4.34. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın etkileri ($X_3 = 4.00$ g/L, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)



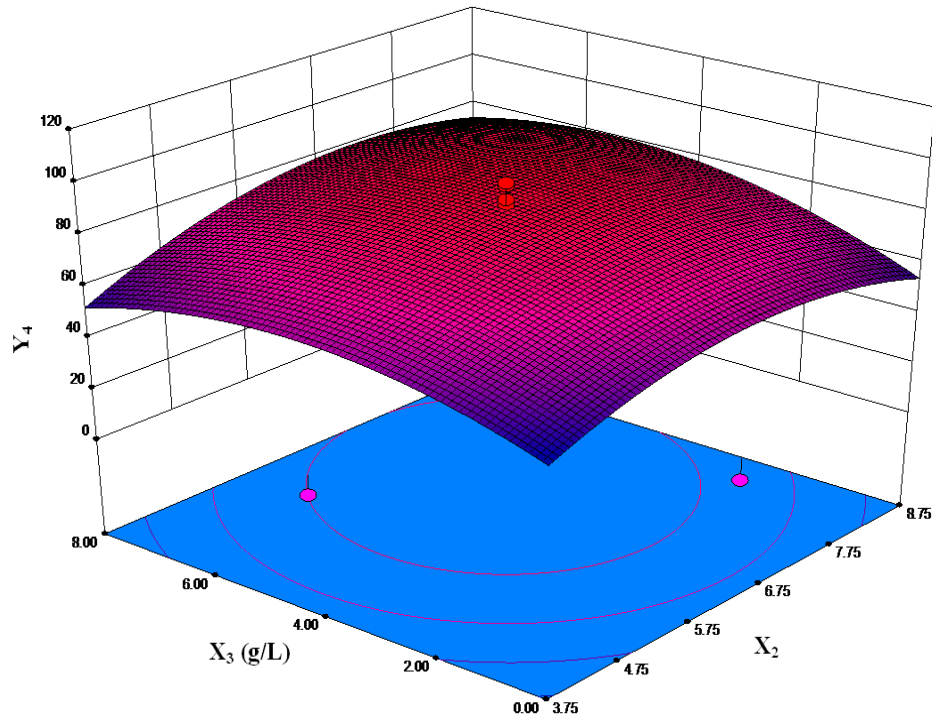
Şekil 4.35. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişimin etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

Başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın; Y_4 üzerine olan etkileri Şekil 4.36'da verilmiştir. Düşük ($21.5-25.5^{\circ}\text{C}$) sıcaklıklar ve yüksek ($31.5-36.5^{\circ}\text{C}$) sıcaklıklardan Y_4 yanıtının oldukça olumsuz etkilendiği grafikte görülebilmektedir. En yüksek sonuçlar $27.5-31.5^{\circ}\text{C}$ aralığında elde edilmiştir. Bu aralıkta; toplam şeker miktarının artması ile Y_4 yanıtının başlangıçta arttığı, ancak yaklaşık 170 g/L 'nin üzerindeki şeker derişimlerinde bu yanıtın azaldığı belirlenmiştir. Başlangıç toplam şeker derişiminin $140-200 \text{ g/L}$ olduğu bölgede, sıcaklığın artması ile maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranının arttığı, ancak, 29.5°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda, sıcaklık artışı ile beraber bu oranda bir azalma olduğu gözlenmiştir.



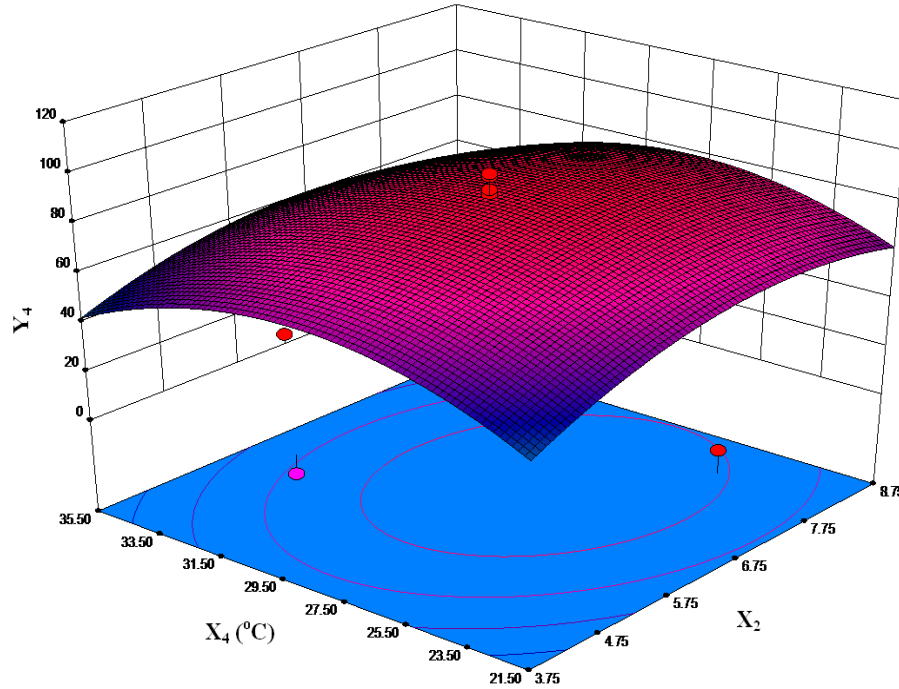
Şekil 4.36. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri ($X_2 = 6.25 \text{ g/L}$, $X_3 = 4.00 \text{ g/L}$)

Şekil 4.37’de, maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç pH’ının ve İUP başlangıç derişiminin etkileri görölmektedir. Çalışılan aralıktaki İUP başlangıç derişimleri için, başlangıç pH’ının artması ile Y_4 ’ün arttığı, ancak pH’nın yaklaşık 6.75’in üzerinde olduğu durumlarda yanıtta bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bütün başlangıç pH değerleri için, İUP derişiminin yaklaşık 4.00 g/L’ye kadar arttırılması ile, Y_4 ’ün arttığı, bunun üzerindeki İUP derişimlerinde ise azaldığı bulunmuştur. Bu etkinin, pH 5.75-7.75 aralığında daha belirgin olduğu görölmektedir.



Şekil 4.37. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç pH’ının ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_1 = 140.00$ g/L, $X_4 = 28.5$ °C)

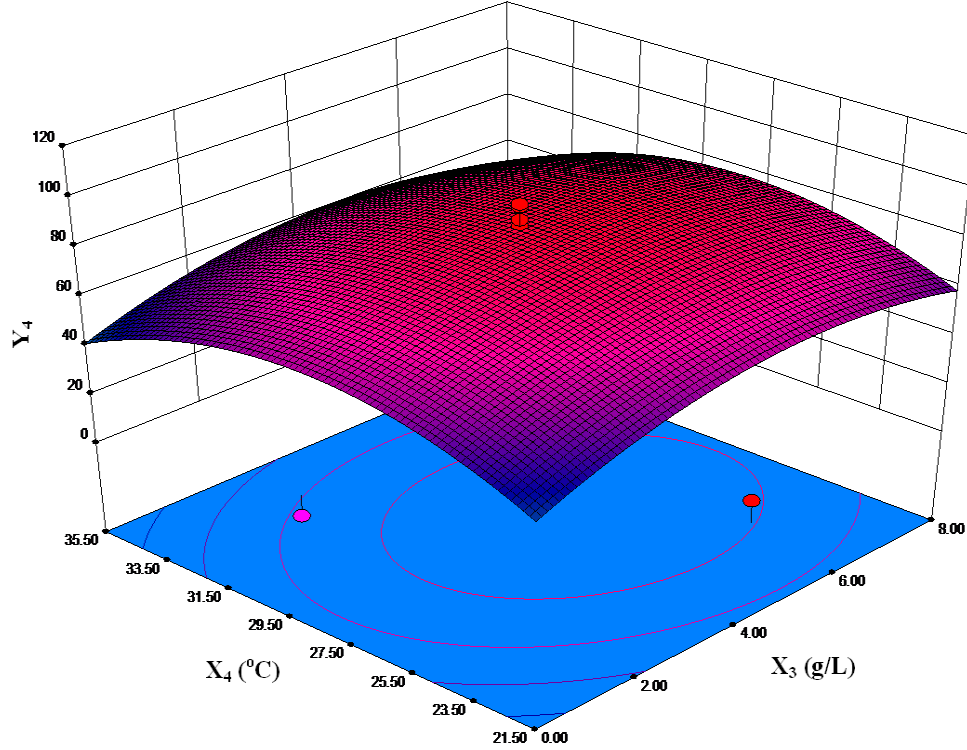
Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine sıcaklığın ve başlangıç pH'ının etkilerinin verildiğı Şekil 4.38'de; sıcaklığın 27.5-31.5°C, başlangıç pH'ının da 5.75-7.75 aralığında olduğı bölgelerde Y_4 için olumlu sonuçlar alındığı görölmektedir. Yanıt yüzeyinin, yaklaşık olarak bu aralıklar dışındaki bölgelerinde, Y_4 değeriinde azalmalar olduğı belirlenmiştir. Bu grafiğe ait kontur grafiğı, örnek olarak EK 4'te sunulmuştur.



Şekil 4.38. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine sıcaklığın ve başlangıç pH'ının etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_3 = 4.00$ g/L)

Sıcaklık ve İUP başlangıç derişiminin maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerindeki etkileri, Şekil 4.39'daki yanıt yüzey grafiğinde gösterilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi, her iki parametrenin düşük değerlerinde, Y_4 için daha düşük sonuçlar alındığı belirlenmiştir. Aynı şekilde;

sıcaklığın 33.5°C'nin üzerinde, İUP başlangıç derişiminin de 6.00 g/L'nin üzerinde olduğu durumlarda benzer etki görölmüştür. Y_4 için en yüksek değerler, X_3 yaklaşık 4.00-6.00 g/L, X_4 ise yaklaşık 27.5-29.5°C aralığında olduğunda elde edilmiştir.



Şekil 4.39. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_2 = 6.25$)

4.3.5. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi

Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4) mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_5) üzerindeki etkileri,

yanıt yüzey yöntemi ile modellenmiş ve Eş. 4.5'teki karesel model ile ifade edilmiştir.

$$\begin{aligned}
 Y_5 = & -0.014914 - 9.6422 \times 10^{-5} X_1 + 0.012819 X_2 - 1.21694 \times 10^{-3} X_3 \\
 & + 8.772114 \times 10^{-4} X_4 + 1.05 \times 10^{-5} X_1 X_2 + 1.77083 \times 10^{-6} X_1 X_3 \\
 & + 2.38095 \times 10^{-6} X_1 X_4 + 8.1 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 3.97143 \times 10^{-4} X_2 X_4 \\
 & - 1.23214 \times 10^{-4} X_3 X_4 - 1.69560 \times 10^{-7} X_1^2 - 3.66667 \times 10^{-4} X_2^2 \\
 & + 9.42708 \times 10^{-5} X_3^2 + 1.70068 \times 10^{-7} X_4^2
 \end{aligned} \tag{4.5}$$

Türetilen modele ait varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.9'da verilmiştir. Model önemli bulunmuş, eşitliğe ait belirtme katsayısı $R^2 = 0.873$ olarak elde edilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi, sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtlar için genellikle önemli bulunmuş olan başlangıç toplam şeker derişiminin lineer etkisi, özgül üreme hızı için önemsiz ($P > 0.05$) bulunmuştur. Ayrıca; incelenen diğer yanıtların hepsi için önemsiz bulunan başlangıç pH'ının etkisi, özgül üreme hızı için önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). İUP başlangıç derişimi ve sıcaklığın da lineer etkilerinin önemli olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.9'da dikkat çeken başka bir sonuç, İUP başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ı etkileşiminin özgül üreme hızı üzerindeki etkisinin önemli bulunmasıdır. Bu iki değişkenin etkileşiminin diğer yanıtlardan hiçbirisi için önemli olmadığı bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.5, 4.6, 4.7, 4.8). Bütün parametrelerin karesel etkilerinin özgül üreme hızı üzerindeki etkileri, önemsiz bulunmuştur.

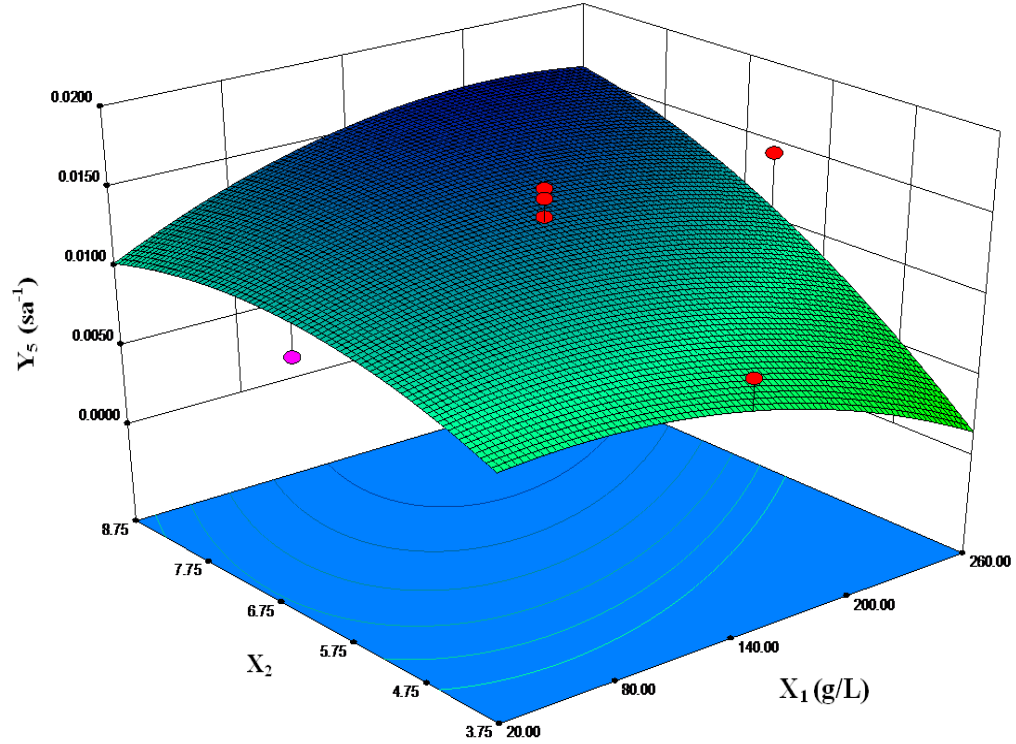
Çizelge 4.9. Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1), başlangıç pH'ı (X_2), İUP başlangıç derişimi (X_3) ve sıcaklığın (X_4), mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_5) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F	R ²
Model	4	8.865x10 ⁻⁵	7.38*	0.873
X_1	1	9.600 x10 ⁻⁷	0.080	
X_2	1	9.923 x10 ⁻⁵	8.26*	
X_3	1	1.707x10 ⁻⁴	14.21*	
X_4	1	8.050x10 ⁻⁴	67.05*	
X_1X_2	1	9.923x10 ⁻⁶	0.83	
X_1X_3	1	7.225x10 ⁻⁷	0.060	
X_1X_4	1	4.000 x10 ⁻⁶	0.33	
X_2X_3	1	6.561x10 ⁻⁵	5.46*	
X_2X_4	1	4.830 x10 ⁻⁵	4.02	
X_3X_4	1	1.190x10 ⁻⁵	0.99	
X_1^2	1	1.022x10 ⁻⁵	0.85	
X_2^2	1	9.003 x10 ⁻⁶	0.75	
X_3^2	1	3.900 x10 ⁻⁶	0.32	
X_4^2	1	1.190 x10 ⁻¹⁰	9.915x10 ⁻⁶	
Uyum eksikliği	20	1.682 x10 ⁻⁵	7.07*	
Hata	5	2.378 x10 ⁻⁶		
Genel	29			

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

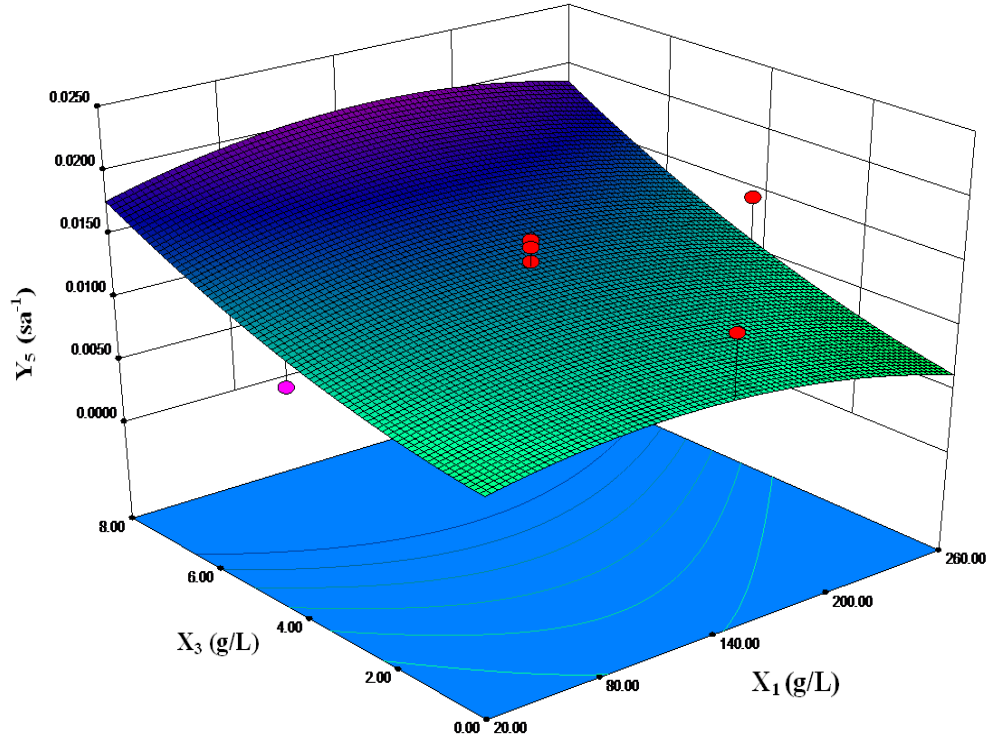
Şekil 4.40'ta, başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ının özgül üreme hızı üzerindeki etkileri görülmektedir. Başlangıç pH'ının 5.75'in üzerinde olduğu yanıt yüzey bölgesinde, toplam şeker derişiminin artması ile özgül üreme hızının bir miktar arttığı, ancak 140 g/L'nin üzerindeki toplam şeker derişimlerinde fazla

değişmediği bulunmuştur. Başlangıç pH'ının 5.75'in altında olduğu bölgede ise; toplam şeker derişimi 20-140 g/L aralığında iken özgül üreme hızının fazla değişmediği görülmektedir. Ancak; 140 g/L'nin üzerindeki toplam şeker derişimlerinde özgül üreme hızının belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmektedir. Belirli bir toplam şeker derişiminde başlangıç pH'ındaki artışın, özgül üreme hızını arttırdığı belirlenmiştir. Ancak bu artışın özellikle yüksek şeker derişimlerinde oldukça belirgin olduğu görülmektedir (Şekil 4.40).



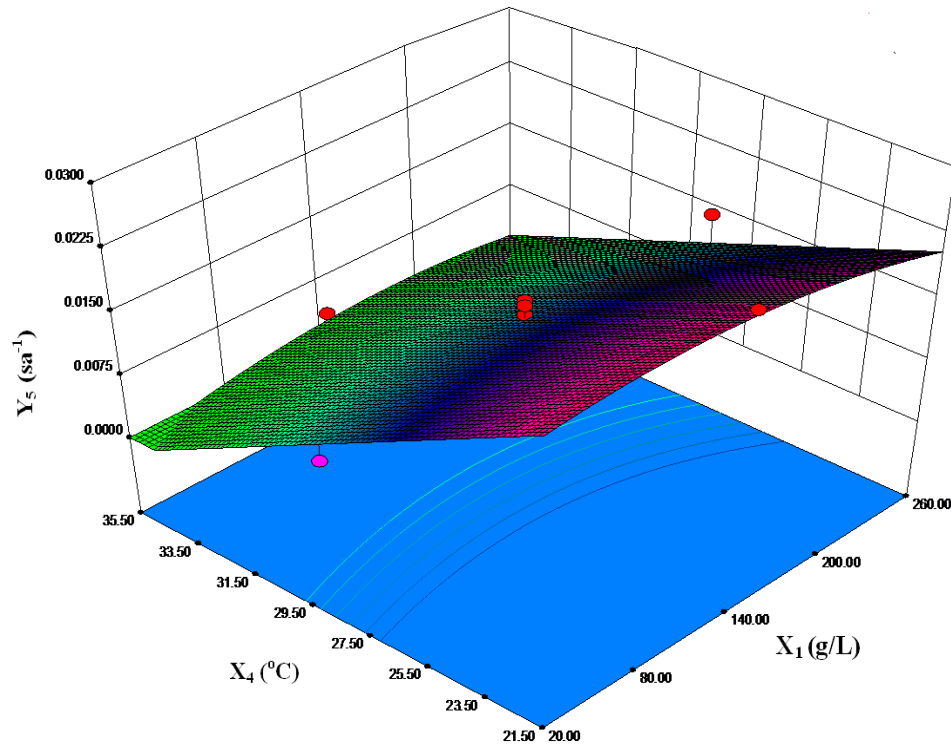
Şekil 4.40. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ının etkileri ($X_3 = 4.00$ g/L, $X_4 = 28.5^\circ\text{C}$)

Başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişimin özgül üreme hızı üzerindeki etkileri, Şekil 4.41’de verilmiştir. İUP başlangıç derişiminin arttırılmasının, mikroorganizma üremesini desteklediği belirlenmiştir. Daha önce incelenen grafiklerde (Bkz. Şekil 4.17, 4.23, 4.29, 4.35); sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtların, yüksek İUP derişimlerinden oldukça olumsuz etkilendiği belirlenirken, Şekil 4.41’de özgül üreme hızı üzerindeki etkinin tamamen farklı olduğu görölmektedir. Belirli bir İUP başlangıç derişiminde, toplam şeker miktarındaki değişimin, özgül üreme hızını fazla etkilemediği belirlenmiştir. Ancak, özellikle yüksek İUP başlangıç derişimleri için; 20-140 g/L toplam şeker derişimi aralığında özgül üreme hızının arttığı, 200-260 g/L toplam şeker derişimi aralığında ise azaldığı görölmektedir.



Şekil 4.41. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişimin etkileri ($X_2 = 6.25$, $X_4 = 28.5^{\circ}\text{C}$)

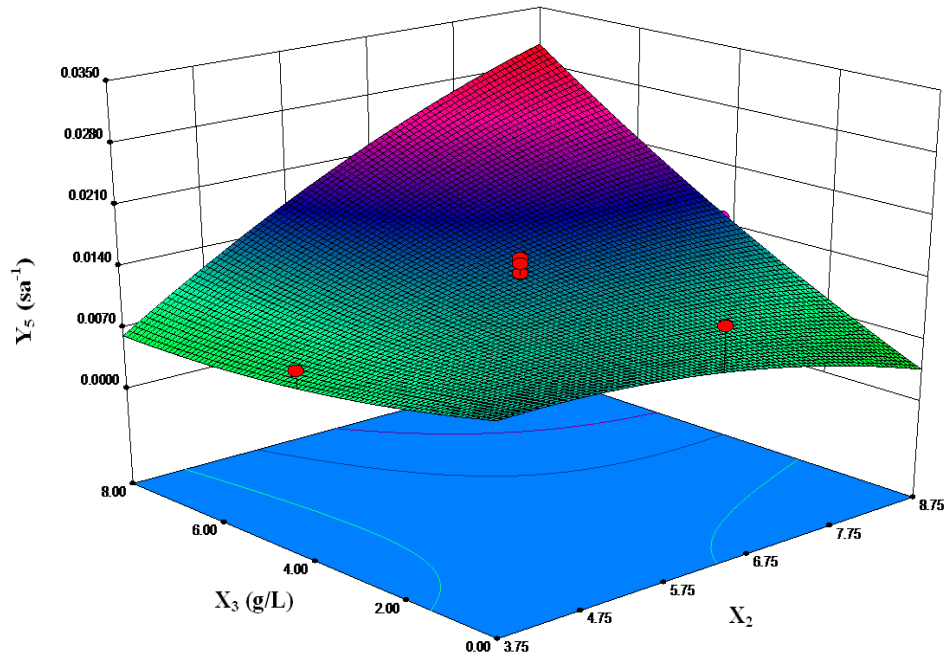
Başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın, mikroorganizma özgül üreme hızı üzerindeki etkileri, Şekil 4.42'deki yanıt yüzey grafiğinde görölmektedir. İncelenen sıcaklık aralığında, sıcaklık artışı ile özgül üreme hızının azaldığı belirlenmiştir. Başlangıç pH'ı ve İUP başlangıç derişimi için merkez noktadaki değerlerin kullanıldığı bu grafikte; belirli bir sıcaklık değerinde, başlangıç toplam şeker derişiminin çalışılan aralıkta artması veya azalmasının, özgül üreme hızını fazla etkilemediği görölmektedir.



Şekil 4.42. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve sıcaklığın etkileri ($X_2 = 6.25$ g/L, $X_3 = 4.00$ g/L)

Şekil 4.43'te, mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç pH'ının ve İUP başlangıç derişiminin etkileri verilmiştir. Başlangıç pH'ı 3.75-4.75 aralığında iken, İUP başlangıç derişimindeki değişimin, özgül üreme hızını fazla etkilemediği

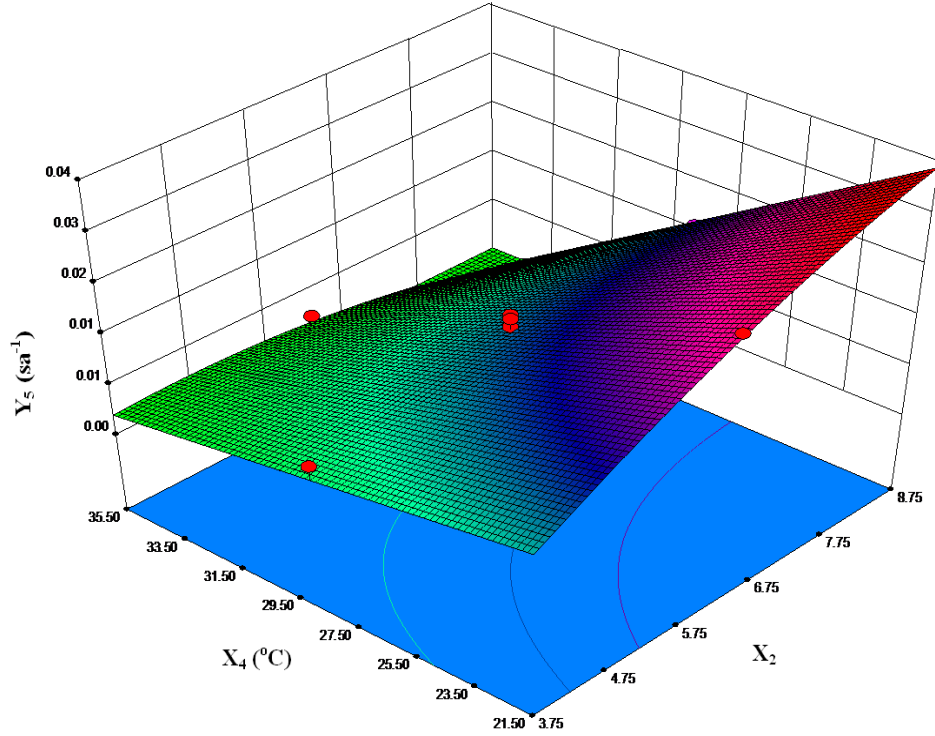
bulunurken, pH 4.75'in üzerinde İUP başlangıç derişiminin artması ile özgül üreme hızının arttığı bulunmuştur. Düşük İUP başlangıç derişimlerinde, başlangıç pH'ının özgül üreme hızı üzerine fazla bir etkisi bulunmazken, 2.00 g/L'nin üzerindeki İUP derişimlerinde başlangıç pH'ının artması ile özgül üreme hızının arttığı belirlenmiştir. Bu etkinin, 8.00 g/L'ye yakın İUP başlangıç derişimlerinde oldukça belirgin olduğu görölmektedir.



Şekil 4.43. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç pH'ının ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_1 = 140.00$ g/L, $X_4 = 28.5$ °C)

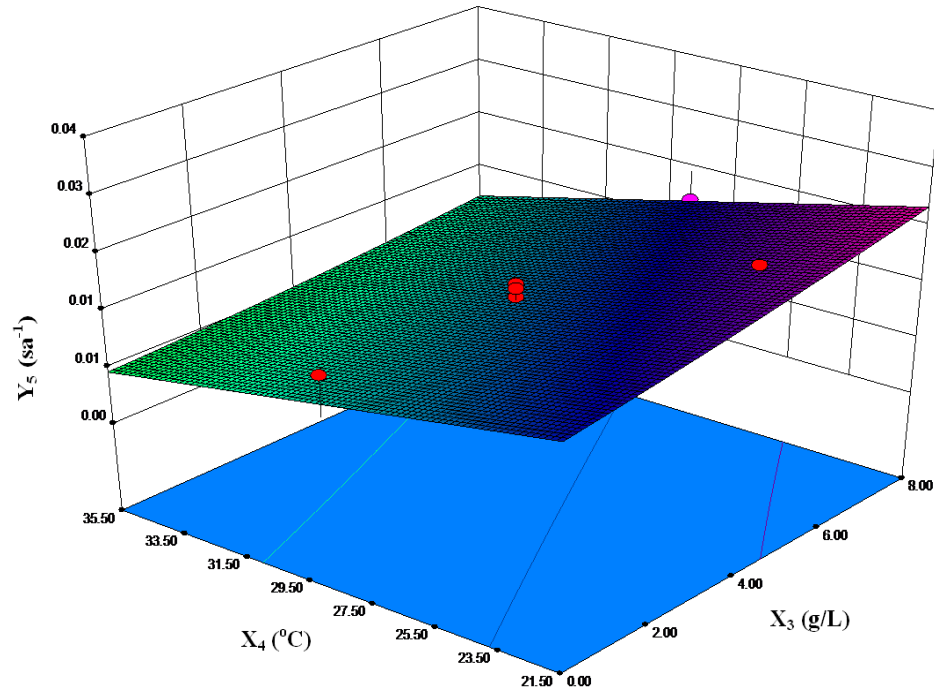
Besiyeri başlangıç pH'ı ve sıcaklığın, mikroorganizma özgül üreme hızı üzerindeki etkileri Şekil 4.44'te görölmektedir. Genel olarak, yüksek pH ve yüksek sıcaklıkların özgül üreme hızını oldukça olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Başlangıç pH'ının özellikle 3.75-4.75 olduğu aralıkta özgül üreme hızının düşük olduğu ve sıcaklık değişiminden fazla etkilenmediği bulunmuştur. Bunun yanında; özellikle 5.75'in

üzerindeki başlangıç pH değerlerinde, sıcaklığın azalması ile özgül üreme hızının arttığı görülmektedir. Grafikten görüldüğü gibi, 35.5°C'ye yakın sıcaklık değerlerinde özgül üreme hızı çok düşük olup, pH 6.75'e kadar başlangıç pH'ından fazla etkilenmemiştir. Ancak, başlangıç pH'ı 6.75'in üzerine çıktığında, özgül üreme hızının daha da azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.44. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine başlangıç pH'ının ve sıcaklığın etkileri ($X_1 = 140.00$ g/L, $X_3 = 4.00$ g/L)

Sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin mikroorganizma özgül üreme hızı üzerindeki etkileri, Şekil 4.45'te verilmiştir. Belirli bir sıcaklık değerinde İUP başlangıç derişiminin arttırılmasının, özgül üreme hızını az bir miktar arttırdığı belirlenmiştir. Sabit İUP başlangıç derişimlerinde ise, sıcaklıktaki azalmanın özgül üreme hızını arttırmasının daha belirgin olduğu görülmektedir. Grafiğe göre, düşük sıcaklık ve yüksek İUP derişimlerinde özgül üreme hızı açısından olumlu sonuçlar alınmıştır.



Şekil 4.45. Mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine sıcaklığın ve İUP başlangıç derişiminin etkileri ($X_1 = 140$ g/L, $X_2 = 6.25$)

4.4. Yanıt yüzey yöntemi ile yapılan modellemelere ait genel değerlendirme

Çalışmada kullanılan beş yanıtın her birinin bağımsız değişkenler ile değişimi, karesel model ile ifade edilmiştir. Türetilen modellere ait R^2 değerlerinin 0.788-0.933 aralığında değiştiği bulunmuştur. Bu değerler, türetilen modellerin deneysel veriler ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Modelin önemli bulunması yanında, R^2 değerinin 0.75'in üzerinde olmasının, modelin uygunluğunu ifade ettiği belirtilmektedir (Dhillon ve ark., 2011a). Bunun yanında, dört parametrenin geniş aralıklarda kullanılmasının, yüksek R^2 'ye sahip modellerin oluşturulmasını güçleştirdiği bildirilmektedir (Aktaş ve ark., 2006).

Elde edilen deneysel verilere karşı modele ait tahminsel verilerin yer aldığı grafikler ise; EK 5’te sunulmuştur.

Sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtlar için en önemli parametrelerden birinin, başlangıç toplam şeker derişimi olduğu bulunmuştur. Özellikle maksimum sitrik asit derişimi ve sitrik asit üretim hızının, başlangıç toplam şeker derişiminden oldukça fazla etkilendiği belirlenmiştir. Imandi ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, *Y. lipolytica* ile sitrik asit üretiminde substrat olarak biyodizel üretim artığı olan ham gliserin kullanılmış, bağımsız değişkenler olarak başlangıç substrat derişimi, maya özütü başlangıç derişimi ve tuz derişimi seçilmiştir. Sözkonusu çalışmada, başlangıç substrat derişiminin maksimum sitrik asit derişimi üzerine etkisinin oldukça önemli olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada, sakkaroz içeren ortamda *A. niger* ile sitrik asit üretimi üzerine, başlangıç sakkaroz derişiminin etkisinin oldukça önemli bulunduğu ifade edilmiştir (Aghaie ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında, diğer parametrelerle etkileşimine de bağlı olmak üzere, genellikle başlangıç toplam şeker derişiminin yüksek olduğu ortamlarda sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtlar için daha iyi sonuçlar alındığı bulunmuştur. Ancak $C_{s\ m}/C_{i\ m}$ oranı için daha farklı bir sonuç ortaya konmuştur. Bu yanıtın, başlangıç toplam şeker derişimi 20-80 g/L ve 200-260 g/L olduğu aralıkta oldukça düştüğü belirlenmiştir. Bu etkinin; toplam şeker derişiminin düşük olduğu ortamlarda sitrik asit üretiminin çok düşük, şeker derişiminin yüksek olduğu ortamlarda ise, izositrik asit üretiminin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sitrik asit üretimi ile ilgili bazı yanıtların, genellikle başlangıç pH’ının 5.75-7.75 olduğu aralıkta daha yüksek oldukları bulunmuştur. Ancak, başlangıç pH’ının etkisi

özgül üreme hızı dışındaki bütün yanıtlar için önemsiz bulunmuştur. Bunun, başlangıç pH'ı için geniş bir aralıkta yanıtlar açısından benzer sonuçlar alınmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Mayalar tarafından sitrik asit üretiminde ortam pH'ının 5.0'in üzerinde olması gerektiği bildirilmektedir (Anatassiadis ve Rehm, 2005). Daha düşük pH değerlerinin üretim üzerindeki olumsuz etkisi, bu çalışmada da ortaya konmuştur. Ayrıca; başlangıç pH'ının etkisi önemsiz bulunmasına rağmen, bu parametrenin İUP başlangıç derişimi ile etkileşimi önemli bulunmuştur.

Havuç suyunun toplam azot miktarı çok düşük olduğu için, bu çalışmada İUP ile desteklenmiştir. Ancak, yüksek toplam şeker derişimlerinde, çalışılan aralıktaki yüksek İUP başlangıç derişimlerinden, sitrik asit üretiminin olumsuz etkilendiği bulunmuştur. İUP başlangıç derişiminin düşük olduğu ortamlarda maksimum sitrik asit derişimi, sitrik asit üretim hızı ve sitrik asit verimi için yüksek sonuçlar alınırken, özgül üreme hızı için bunun tersi bir durum gözlenmiştir. Yüksek İUP başlangıç derişimlerinin maya üremesini desteklediği sonucuna varılmıştır. Mayalar tarafından sitrik asit üretiminde, ortamdaki azot kaynağı ve derişiminin kritik parametrelerden biri olduğu bilinmektedir. Karbon kaynağının yeterli olduğu durumda, hücrede sitrik asit üretiminin, hücre içi azot derişiminin azalması ile başladığı bildirilmektedir (McKay ve ark., 1994). Ayrıca; sitrik asitin, azot kısıtlaması ile indüklenen bir aktif taşıma sistemi ile hücreden dışarıya salındığı belirtilmektedir (Demain ve Sanchez, 2006). Bu nedenle, ortama azot kaynağının çok fazla eklenmesinin, sitrik asit üretimini yavaşlattığı sonucuna varılmıştır. Ancak, İUP başlangıç derişiminin bu etkisi, belirgin olarak sadece yüksek toplam şeker derişimlerinde görülmüştür. İUP başlangıç derişimi ile toplam şeker derişiminin etkileşimlerinin Y_1 ve Y_2 üzerindeki etkilerinin önemli bulunması, bu araştırmanın dikkat çeken sonuçlarından biridir.

Sıcaklığın etkisinin, ortamdaki başlangıç toplam şeker derişimine bağı olarak değışebileceğı belirlenmiştir. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine sıcaklığın etkisi oldukça önemli bulunmuştur. Maksimum sitrik asit derişimi ve sitrik asit üretim hızları üzerine sıcaklığın etkisi, özellikle yüksek toplam şeker derişimlerinde belirgin bir şekilde gözlenebilmiştir. Bu koşullarda her iki yanıtın da 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklardan olumsuz etkilendiğı belirlenmiştir. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı için en yüksek sonuçlar 27.5-31.5°C aralığında alınmıştır. Bu aralıkta ve başlangıç toplam şeker derişiminin 140-200 g/L olduğı durumda, bu oranın başlangıçta arttığı, 29.5°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise azaldığı bulunmuştur. Özgöl üreme hızı için ise; sıcaklığın etkisinin toplam şeker derişimine bağımlılığının diğere yanıt kadar belirgin olmadığı bulunmuştur. Üreme için en iyi sonuçlar, 21.5°C'ye yakın sıcaklıklarda alınmış, özgöl üreme hızı üzerine sıcaklığın etkisi de önemli bulunmuştur. Literatürde, sitrik asit üretiminde yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı ve sıcaklığın parametre olarak seçildiğı çalışmalarda, sıcaklığın sitrik asit üretimi üzerine etkisinin önemli bulunduğı görölmektedir. Barrington ve ark (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, substrat kaynağı olarak karayosun içeren ortamda *A. niger* ile sitrik asit üretiminde; havalandırma hızı, sıcaklık ve yatak derinliğinin parametre olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Sözkonusu çalışmada, sıcaklığın lineer etkisinin ve havalandırma hızı ile etkileşiminin oldukça önemli bulunduğı rapor edilmiştir. Çalışmada ayrıca; 22-32°C arasında çalışıldığı ve bu aralıkta sıcaklık artışının sitrik asit derişimini ve verimini olumlu etkilediğı bildirilmiştir (Barrington ve ark., 2009).

Yanıtlar üzerine kullanılan parametrelerin etkileri genel olarak değıerlendirildiğinde, özgöl üreme hızı için alınan bazı sonuçların, sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtlardan

farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu farklılık, en belirgin şekilde, İUP başlangıç derişiminin etkisinin incelendiğı çalışmada gözlenmiştir.

4.5. Optimizasyon

Seçilen yanıtların, yanıt yüzey metodu ile modellenmesinin ardından, havuç suyu içeren doğal fermantasyon ortamında, *Y. lipolytica* K-168 suşu ile sitrik asit üretiminin optimizasyonu, “istenen hedefe ulaşma fonksiyonu” yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, sitrik asit üretimi için optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, özellikle maksimum sitrik asit derişimi, sitrik asit üretim hızı ve sitrik asit verimi önemli yanıtlar olarak kabul edilmiş ve maksimum olmaları hedeflenmiştir. Y_4 yanıtı olan, maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı, sitrik asit üretimi ile ilgili çalışmalarda önemli bir parametre olarak verilmektedir (Rymowicz ve ark., 2010). Bu nedenle, optimizasyonda bu yanıt da kullanılmıştır. Ancak, bu oranın maksimum olması, her zaman sitrik asit derişiminin de maksimum olduğunu göstermemektedir. Bazı durumlarda, sitrik asit üretimi düşük olmasına rağmen; izositrik asit üretimi de düştüğü için, bu oran yüksek olabilmektedir. Bu nedenle, Y_4 yanıtı için maksimum olma hedefi belirlenmemiş, hesaplanan sınırlar içerisinde kalması istenmiştir.

Sitrik asit, ikincil bir metabolit olduğundan, üretimi için gerekli optimum koşulların genellikle mikroorganizma üremesi için gerekli optimum koşullardan farklı olduğu belirtilmektedir (Dhillon ve ark., 2011c). Bu fark, bu çalışmada verilmiş olan yanıt

yüzey grafiklerinden de (Bkz. Şekil 4.16-4.45) görülebilmektedir. Bu çalışmada birincil amaç sitrik asit üretiminin optimizasyonu olduğu için, özgül üreme hızının maksimum olması hedeflenmemiştir. Çizelge 4.10'da, sitrik asit üretiminin optimizasyonunda kullanılan değişkenler, belirlenen hedefler ve değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.10. Sitrik asit üretiminin optimizasyonunda kullanılan değişkenlere ait hedef ile minimum ve maksimum değerler

Değişken	Hedef	Minimum değer	Maksimum değer
Başlangıç toplam şeker derişimi (X_1 ; g/L)		80	260
Başlangıç pH'ı (X_2)		5.00	7.50
İUP başlangıç derişimi (X_3 ; g/L)		0.00	2.00
Sıcaklık (X_4 ; °C)		25	32
Maksimum sitrik asit derişimi (Y_1 ; g/L)	Maksimum	0.21	68.14
Sitrik asit üretim hızı (Y_2 ; g/L.sa)	Maksimum	0.007	0.354
Sitrik asit verimi (Y_3 ; %)	Maksimum	1.05	36.84
Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı (Y_4)	Belirlenen aralıkta	3.65	95.63
Özgül üreme hızı (Y_5 ; sa ⁻¹)	Belirlenen aralıkta	0.0027	0.0310

Sitrik asit üretimi için belirlenen optimum koşullar ve bu koşullarda yanıtlar için öngörülen değerler, Çizelge 4.11'de verilmiştir. Burada verilen koşullar, optimizasyon çalışması sonucunda elde edilen 39 çözüm arasından seçilmiştir (EK 6 ve 7). Önerilen çözümler arasından en uygun olanı seçilirken, istenen hedefe ulaşma

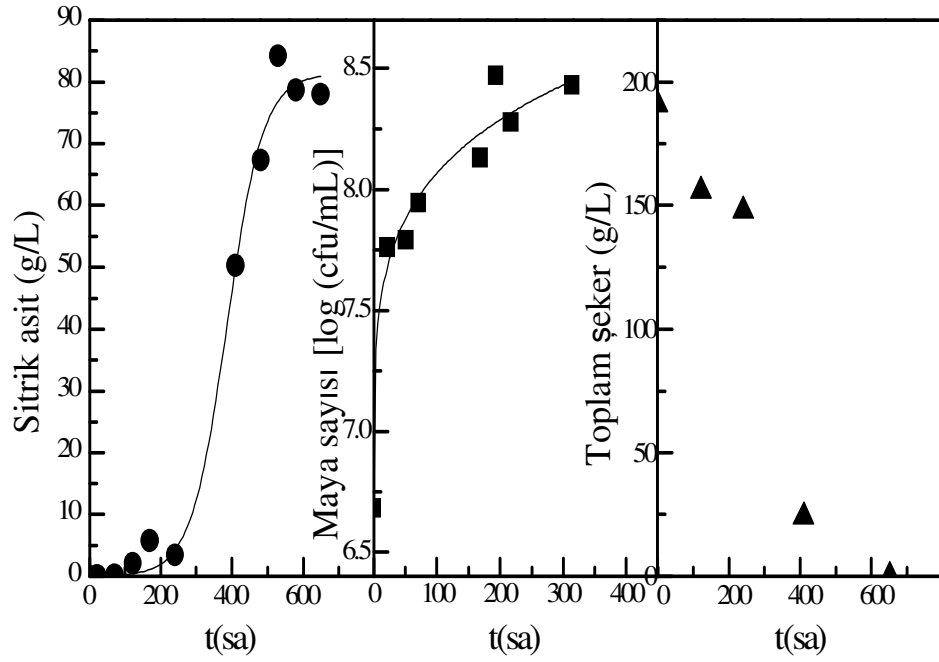
fonksiyonunun 1 olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca; Y_1 , Y_2 , Y_3 yanıtlarının olabildiğince yüksek, Y_4 yanıtının ise; 10'un üzerinde olmasına dikkat edilmiştir. Buna göre; başlangıç toplam şeker derişiminin 190.83 g/L, başlangıç pH'ının 5.90, İUP başlangıç derişiminin 0.07 g/L ve sıcaklığın 27.86°C olduğu koşullar, optimum koşullar olarak belirlenmiştir.

Optimum koşullar kullanıldığında, 81.09 g/L maksimum sitrik asit derişimine ulaşılabilceği yaklaşımı getirilmiştir. Sitrik asit üretim hızı ve verim için ise sırasıyla; 0.382 g/L.sa ve %46.48 değerleri verilmiştir. Bu koşullarda, maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranının 10.76, özgül üreme hızının ise, 0.01 sa⁻¹ olacağı öngörölmüştür.

Çizelge 4.11. Sitrik asit üretimi için belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için getirilen yaklaşımlar

X_1 (g/L)	X_2	X_3 (g/L)	X_4 (°C)	Y_1 (g/L)	Y_2 (g/L.sa)	Y_3 (%)	Y_4	Y_5 (sa ⁻¹)
190.83	5.90	0.07	27.86	81.09	0.382	46.48	10.76	0.0100

Bu tez çalışmasında, belirlenen optimum koşulların aynı anda kullanıldığı bir deney daha gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde, optimum koşullarda, yanıtlar için öngörölen değerlere uygulamada ne kadar ulaşılabilceği test edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyde elde edilen sitrik asit derişimi, maya sayısı ve toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.46'da verilmiştir.



Şekil 4.46. *Y. lipolytica* K-168 ile, havuç suyu içeren doğal fermantasyon ortamında, optimum koşullarda sitrik asit derişimi, maya sayısı ve toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri.

Şekil 4.46 kullanılarak, uygulamada elde edilen gerçek yanıtlar hesaplanmış ve Çizelge 4.12’de sunulmuştur. Maksimum sitrik asit derişimi, 80.53 g/L olarak bulunmuştur. Bu değerin, bu yanıt için öngörülen değere oldukça yakın olduğu görülmektedir. Diğer yanıtlar için de, optimizasyonda öngörülen değerlere yaklaşık sonuçlar elde edilmiştir. Genel olarak, sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtlar, hedeflenen değerlerden biraz daha düşük bulunurken, özgül üreme hızı için daha yüksek bir değer hesaplanmıştır. Optimizasyon sırasında maksimum olması hedeflenmiş olan yanıtlar için, deney tasarımındaki deneylerde elde edilenin üzerinde değerler elde edilebilmiştir. Örneğin; maksimum sitrik asit derişimi, tasarımıdaki deneylerde en fazla 68.14 g/L olarak elde edilebilmişken, optimizasyon ile, bu değer 80.53 g/L’ye çıkarılabilmektedir. Benzer şekilde, sitrik asit üretim hızı ve ürün veriminin maksimum

değerleri, deneylerde sırasıyla, 0.354 g/L.sa ve %36.84 olarak belirlenirken; optimizasyon ile bu değerler, 0.374 ve %42.21'e yükselmiştir.

Çizelge 4.12. *Y. lipolytica* K-168 ile, havuç suyu içeren doğal fermentasyon ortamında, optimum koşullarda yapılan çalışmada, yanıtlar için elde edilen değerler

Y₁ (g/L)	Y₂ (g/L.sa)	Y₃ (%)	Y₄	Y₅ (sa⁻¹)
80.53	0.374	42.21	9.04	0.0170

Bu çalışmada, belirlenen optimum koşullarda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ve literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığında, yüksek sitrik asit derişimi ve verimine ulaşıldığı sonucuna varılmıştır. Imandi ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, ham gliserin içeren ortamda optimizasyon ile sitrik asit üretiminin arttırıldığı ifade edilmiş ve optimum koşullarda *Y. lipolytica* ile maksimum 77.39 g/L sitrik asit üretilebildiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada, *A. niger* ile kaolin içeren ortamda, optimum koşullarda üretilen sitrik asit derişimi 73.12 g/L olarak ifade edilmiştir (Aghaie ve ark., 2009). Dhillon ve ark. (2011a) tarafından elma posası içeren ortamda katı hal fermentasyonu ile yapılan bir çalışmada, *A. niger*'in optimum koşullarda maksimum 187 g/kg kuru madde düzeyinde sitrik asit ürettiği bildirilmiştir. Kumar ve Jain (2008) tarafından, sakkaroz ile desteklenmiş şeker kamışı küspesi içeren ortamda *A. niger* ile elde edilen sitrik asit verimi %41.56, maksimum sitrik asit üretim hızı 0.064 g/100g kuru madde.sa ve özgül üreme hızı 0.043 sa⁻¹ olarak verilmiştir. Diğer bir çalışmada; *Y. lipolytica*'nın asetat-negatif bir mutant suşu kullanılarak, biyodizel üretim artığı olan ham gliserin içeren ortamda, kesikli sistemde elde edilen maksimum sitrik asit derişimi, sitrik asit verimi ve verimlilik değerlerinin sırasıyla; 112 g/L, %60 ve 0.71 g/L.sa olduğu belirtilmiştir

(Rymowicz ve ark., 2010). *A. niger*'in mutant bir suşu ile, muz kabuklarını içeren ortamda optimum koşullarda yapılan bir çalışmada; 67.72 mg/mL derişiminde sitrik asit üretilbildiği bildirilmiştir (Javed ve ark., 2010). *Y. lipolytica*'nın sitrat-negatif mutant bir suşu ile yapılan bir başka çalışmada; substrat olarak ayçiçek yağı içeren ortamda sitrik asit derişiminin 150 g/L'ye ulaştığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, mutant olmayan ana suşun, sitrik asit derişimine çok yakın derişimde izositrik asit ürettiği, mutant suşun ise, sadece sitrik asit ürettiği bildirilmiştir.

Fermente edilebilir substratları içeren veya bu substratlar ile desteklenen doğal ortamların sitrik asit üretiminde kullanılmasının, her zaman olumlu sonuç vermediği bilinmektedir. Bunun en önemli nedeninin, bu karmaşık ortamların bileşiminden kaynaklandığı bildirilmektedir (Roukas ve Kodzekidou, 1997; Dhillon ve ark., 2011c). Özellikle bileşimde yer alan ağır metal iyonlarının, belirli bir derişimin üzerinde yer aldıklarında, sitrik asit metabolizmasında inhibitör olarak işlev gördükleri bilinmektedir. Bu nedenle, literatürde bazı doğal ortamların sitrik asit üretimi amacı ile kullanılabilmesi için, bu ortamların çeşitli deiyonizasyon işlemleri ile veya şelat ajanlar yardımıyla bu metal iyonlarından arındırılması gerektiği bildirilmektedir (Dhillon ve ark., 2011c). Bu çalışmada, havuç suyunda böyle bir işlem uygulanmadan yüksek derişimde sitrik asit üretimi sağlanabilmiştir. Ancak, literatürde mutant suşlar ile çeşitli ortamlarda yapılan bazı çalışmalarda 100 g/L'nin üzerinde sitrik asit derişimine ulaşıldığı görülmektedir. Havuç suyunun; çeşitli karbonhidratlar, pürinler, primidinler, aminoasitler, yağ asitleri ve vitaminlerin yanında; demir, kalsiyum, magnezyum, çinko ve selenyum metallerini içerdiği bildirilmektedir (Puchoo ve Ramborn, 2004; Bergqvist ve ark., 2006). İleride yapılabilecek çalışmalarda, havuç suyunun bileşiminde yapılabilecek

modifikasyonların, sitrik asit üretimi üzerindeki etkilerinin belirlenebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada yapılan optimizasyon sonucunda, fermantasyon ortamının çok düşük derişimde (0.07 g/L) İUP ile desteklenebileceği bulunmuştur. İUP, makarna endüstrisi artıklarından biri olan irmikaltı undan elde edilmiş bir ürün olup, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanılması, ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Sitrik asit üretiminin artırılması için düşük miktarda kullanılabileceğinin yanısıra, maya üremesini de önemli ölçüde desteklediği ortaya konmuştur. Bu açıdan, irmikaltı undan elde edilmiş olan bu protein konsantratinin çeşitli biyoürün üretimlerinin gerçekleştirileceği farklı fermantasyon ortamlarında da azot kaynağı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, havuç suyu içeren doğal bir fermantasyon ortamında, mutant bir suş olan *Y. lipolytica* K-168'in üreme ve sitrik asit üretiminin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi ve sitrik asit üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Araştırmada elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir:

1. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine özellikle başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin lineer etkilerinin oldukça önemli olduğu bulunmuştur. Bu iki faktörün etkileşimi, başlangıç toplam şeker derişimi ile sıcaklığın etkileşimi ve İUP başlangıç derişiminin karesel etkisi de önemli bulunmuştur.
2. Maksimum sitrik asit üretim hızı üzerine, başlangıç pH'ı haricindeki bütün parametrelerin lineer etkileri oldukça önemli bulunmuştur. Ayrıca; başlangıç toplam şeker derişimi ile İUP başlangıç derişiminin etkileşiminin de, maksimum sitrik asit derişimini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir.
3. Sitrik asit verimi üzerine, başlangıç toplam şeker derişimi ve İUP başlangıç derişiminin lineer etkilerinin ve İUP başlangıç derişiminin karesel etkisi önemli bulunmuştur.
4. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine sadece kullanılan parametrelerin karesel etkileri önemli bulunmuştur.
5. Özgül üreme hızı üzerine, besiyeri başlangıç pH'ı, İUP başlangıç derişimi ve sıcaklığın lineer etkileri önemli bulunmuştur. Ayrıca, başlangıç pH'ı ve İUP

başlangıç derişiminin etkileşiminin de özgül üreme hızını önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir.

6. Başlangıç toplam şeker derişiminin etkisi, özgül üreme hızı haricindeki bütün yanıtlar için önemli bulunmuştur. Başlangıç pH'ının etkisi ise; sitrik asit üretimi ile ilgili yanıtlar için önemsiz iken, sadece özgül üreme hızı için önemli bulunmuştur. İUP başlangıç derişiminin lineer etkisi de, $C_{s\ m}/C_{i\ m}$ oranı haricindeki bütün yanıtlar için önemli bulunmuştur. Bunun yanında; sıcaklık ve başlangıç pH etkileşiminin, hiçbir yanıt için önemli olmadığı bulunmuştur.

7. Maksimum sitrik asit derişimi, maksimum sitrik asit üretim hızı ve sitrik asit verimi için, genellikle İUP başlangıç derişiminin düşük olduğu durumlarda daha iyi sonuçlar alındığı belirlenmiştir. Ancak İUP başlangıç derişiminin etkisinin, ortamdaki başlangıç toplam şeker derişimi ile de ilişkili olduğu bulunmuştur. Özgül üreme hızı için en iyi sonuçların ise; İUP başlangıç derişiminin yüksek olduğu ortamlarda alındığı belirlenmiştir.

Sitrik asit üretim hızı ve maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranının, genellikle başlangıç pH'ının 5.75-7.75 olduğu aralıkta daha yüksek oldukları bulunmuştur. Özgül üreme hızı için ise, bu aralıkta böyle bir etki görülmemiştir.

8. Yapılan nümerik optimizasyon sonucunda, belirlenen hedefler doğrultusunda optimum koşullar; başlangıç toplam şeker derişimi için 190.83 g/L, başlangıç pH'ı için, 5.90, İUP başlangıç derişimi için 0.07 g/L ve sıcaklık için 27.86°C olarak verilmiştir. Bu koşullarda; maksimum sitrik asit derişiminin 81.09 g/L, maksimum

sitrik asit üretim hızının 0.382 g/L.sa, sitrik asit veriminin %46.48, $C_{s\ m}/C_{i\ m}$ oranının 10.76 ve özgül üreme hızının 0.0100 sa⁻¹ olacağı öngörülmüştür.

9. Belirlenen optimum koşulların kullanılması ile yapılan çalışmada; maksimum sitrik asit derişimi 80.53 g/L, maksimum sitrik asit üretim hızı 0.374 g/L.sa, sitrik asit verimi %42.21, $C_{s\ m}/C_{i\ m}$ oranı 9.04 ve özgül üreme hızı 0.0170 sa⁻¹ olarak bulunmuştur.

10. Bu araştırmada, havuç suyunun sitrik asit üretiminde kullanılabilmesi için optimum fermentasyon koşulları ortaya konmuştur. Araştırmada yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen sonuçların, kullanılan mutant suş ile gelecekte yapılabilecek büyük ölçekli üretimler için faydalı olabileceği düşünülmektedir. Seyreltilmiş havuç suyunda, yapay bileşen olarak sadece glukoz ve CaCO₃ ile desteklenerek, optimum koşullarda önemli miktarda sitrik asit üretilebileceği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçların, sadece havuç suyu değil, havuç kaynaklı gıda endüstrisi artıklarının da değerlendirilmesi hakkında fikir verebileceği ve bu sayede sitrik asit üretiminin daha ekonomik hale gelmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Araştırmada azot kaynağı olarak kullanılan irmikaltı un protein konsantratu da, makarna sanayi artığı olan irmikaltı undan elde edilen doğal bir bileşendir. Bu bileşenin fermentasyon ortamında kullanılabileceğinin ortaya konmasının da, makarna sanayi artıklarının değerlendirilmesi amacıyla yapılabilecek çalışmalar için umut verici olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abou-Zeid, A.A., Ashy, M.A., 1984. Production of citric acid: a review, *Agricultural Wastes*, 9, 51-76.

Afifi, M.M., 2011. Naturally occurring microorganisms of industrial waste for citric acid production by solid state fermentation, *Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 377-386.

Aghaie, E., Pazouki, M., Hosseini, M.R., Ranjbar, M., Ghavipanjeh, F., 2009. Response surface methodology (rsm) analysis of organic acid production for kaolin beneficiation by *Aspergillus niger*, *Chemical Engineering Journal*, 147, 245-251.

Aguilar, M., Vidal, L.G., Constaneda, F.P.G., Gomez, A.L., 2010. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production, *Bioresource Technology*, 101, 3506–3513.

Akdeniz İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği Değerlendirme Raporu, Türkiye Geneli, 2012. http://www.google.com.tr/url?sa=f&rct=j&url=http://www.akib.org.tr/files/downloads/arastirmaraporlari/ysm/eylul_2012 Erişim tarihi: Ekim, 2012.

Aktaş, N., Boyacı, İ.H., Mutlu, M., Tanyolaç, A., 2006. Optimization of lactose in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM), *Biosource Technology*, 97, 2252-2259.

Altuğ, T., 2009. Gıda Katkı Maddeleri, Sidaş Medya Ltd.Şti, İzmir, 268s, ISBN 978-975-97408-0-1.

Anastasiadis, S., Rehm, H.J., 2005. Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177, *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(2), 26-42.

Argumeenal, A.R., Venkappaya, D., 2013. An overview of citric acid production, LWT - Food Science and Technology, 50, 367-370.

Bari, M.N., Alam, M.Z., Muyibi, S.A., Jamal, P., Al-Mamun, A., 2009. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs, Bioresource Technology, 100, 3113-3120.

Barrington, S., Kim, J.S., Wang, L., Kim, J.W., 2009. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor, Korean Journal of Chemical Engineering, 26(2), 422-427.

Barth, G., Gaillardin, C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia*, FEMS Microbiology Reviews, 19(4), 219-237.

Baş, D., Boyacı, İ.H., 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, Journal of Food Engineering, 78, 836-845.

Bayraktar, E., 1998. Tutuklanmış *A. niger* ile sitrik asit üretiminin gerçekleştiği üç fazlı dolgulu kolon biyoreaktörün modellenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 154s.

Betiku, E., Adesina, O.A., 2013. Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate, Biomass and Bioenergy, Doi: 10.1016/j.biombioe.2013.02.034

Bergqvist, S.W., Andlid, T., Sandberg, A.S., 2006. Lactic acid fermentation stimulated iron adsorption by caco-2 cells is associated with increased soluble iron content in carrot juice, British Journal of Nutrition, 9, 705-711.

Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., 2010. Design of Experiments: A powerful tool in food microbiology. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, vol. 2, 1419-1429.

Bradley, R.L., 1998. Moisture and Total Solid Analysis, Nielsen, S.S. (Ed), Aspen Publishers, Inc., USA, 119-139. ISBN 0-8342-1203-X.

Cazor, A., Deborde, C., Moing, A., Rolin, D., This, H., 2006. Sucrose, glucose, and fructose extraction in aqueous carrot root extracts prepared at different temperatures by means of direct NMR measurements, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(13), 4681-4686.

Chang, S.K.C., 1998. Protein Analysis. Food Analysis, Nielsen, S.S. (Ed), Aspen Publishers, Inc., USA, S 237-249. ISBN 0-8342-1203-X.

Çelik, G., 2012. Tanısı yapılmış olan *Yarrowia lipolytica* strainlerinin organik asit (sitrik asit, izositrik asit) üretim kapasitelerinin taranması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, 107s.

Darouneh, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Seifkordi, A., Rajabi, A., 2009. Citric acid production: Surface culture versus submerged culture, *African Journal of Microbiology Research*, 3(9), 541-545.

Demain, A.L., Sanchez, S., 2006. Microbial Synthesis of Primary Current Advances and Future Prospects, *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, El-Mansi, E.M.T., Bryce, C.F.A., Demain, A.L., Alman, A.R. (Ed), CRC Press, Boca Raton, USA, 99-129, ISBN 0-8493-5334-3.

Deveci, E.Ü., 2008. Portakal atıklarından *Aspergillus niger* filamentli fungusu kullanarak sitrik asit üretiminde değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 217s.

Dhillon, G.S., Brar, S.K., Kaur, S., Verma, M., 2013. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor, *Industrial Crops and Products*, 41, 78– 84.

Dhillon, G.S., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., 2011a. Enhanced solid-state citric acid bio-production using apple pomace waste through surface response methodology, *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1045–1055.

Dhillon, G.S., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., 2011c. Recent advances in citric acid bio-production and recovery, *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 505-529.

Dhillon, G.S., Brar, S.T., Verma, M., Tyagi, R.D., 2011b. Apple pomace ultrafiltration sludge - A novel substrate for fungal bioproduction of citric acid: Optimization studies, Food Chemistry, 128, 864-871.

Dış Ticaret Raporları, Türkiye İstatistik Kurumu. http://www.tuik.gov.tr/VeriTabanlari.do?ust_id=4&vt_id=7 Erişim tarihi: Ocak, 2013.

El-Holi, M.A., Al-Delaimy, K.S., 2003. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*, African Journal of Biotechnology, 2(10), 356-359.

Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., Nicaud, J.M., 2004. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications, FEMS Yeast Research, 5, 527-543.

Finogenova, I.V., Kamzolova, S.V., Dedyukhina, N.V., Shiskanova, N.V., Il'chenko, A.P., Morgunov, I.G., Chernyavskaya, O.G., Sokolov, A.P., 2002. Biosynthesis of citric acid and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia Lipolytica* N1 under continuous cultivation, Applied Microbiology and Biotechnology, 59(4-5), 493-500.

Finogenova, I.V., Puntus, I.F., Kamzolova, S.V., Lilunina, Y.N., Monastyrskaya, S.E., Morgunov, I.G., Boronin, A.M., 2008. Mutant *Yarrowia lipolytica* strains producing citric acid from glucose, Applied Biochemistry and Microbiology, 44(2), 197-202.

Finogenova, T.V., Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V., Chernyavskaya, O.G., 2005. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A Review of Prospects, Applied Biochemistry and Microbiology, 41(5), 418-425.

Fröhlich-Wyder, M.T., 2003. Yeasts in Dairy Products. Yeasts in Food, Boekhaut T, Robert V. (ed), B.Behr's Verlag, GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany, 209-237, ISBN 0-8493-1926-9.

Göksungur, Y., 2009. Reaction and Fermentation Kinetics in Food Engineering. Sidas Medya Ltd.Şti, İzmir, 143s, ISBN 978-9944-5660-1-8.

Grewal, H.S., Kalra, K.L., 1995. Fungal production of citric acid, *Biotechnology Advances*, 13(2), 209-234.

Hamdy, H.S., 2013. Citric acid production by *Aspergillus niger* grown on orange peel medium fortified with cane molasses, *Annals of Microbiology*, 63(1), 267-278.

Honecker, S., Bisping, B., Yang, Z., Rehm, H.J., 1989. Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 17-24.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Carrot> Erişim tarihi: Mart, 2013.

Imandi, S.B., Bandaru, V.V.R., Somalanka, R., Bandaru, S.R., Garapati, H.R., 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproducts glycerol using Doehlert experimental design, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1367-1372.

Imandi, S.B., Bandaru, V.V.R., Somalanka, R., Bandaru, S.R., Garapati, H.R., 2008. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste, *Bioresource Technology*, 99, 4445-4450.

Javed, S., Asgher, M., Sheikh, M.A., Nawaz, H., 2010. Strain improvement through UV and chemical mutagenesis for enhanced citric acid production in molasses-based solid state fermentation, *Food Biotechnology*, 24(2), 165-179.

Kamzolova, S.V., Lunina, J.N., Morgunov, I.G., 2011. Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1965–1976.

Kamzolova, S.V., Finogenova, T.V., Morgunov, I.G., 2008. Microbiological production of citric and isocitric acids from sunflower oil, 46(1), 51-59.

Kamzolova, S.V., Morgunov, I.G., Aurich, A., Perevoznikova, O.A., Shishkanova, N.V., Stottmeister, U., Finogenova, T.V., 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat, *Food Technology and Biotechnology*, 43(2), 113–122.

Karasu Yalçın, S., 2012. Enhancing citric acid production of *Yarrowia lipolytica* by mutagenesis and using natural media containing carrot juice and celery byproducts, Food Science and Biotechnology, 21(3), 867-874.

Karasu Yalçın, S., Bozdemir, M.T., Özbaş, Z.Y., 2009a. A comparative study on citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains in two different media, Indian Journal of Biotechnology, 8(4), 408-417.

Karasu Yalçın, S., Bozdemir, M.T., Özbaş, Z.Y., 2009b. A comparative study of the effects of glycerol and mannitol on citric acid production by two *Yarrowia lipolytica* strains, Romanian Biotechnological Letters, 14(6), 4870-4881.

Karasu Yalçın, S., Bozdemir, M.T., Özbaş, Z.Y., 2009c. Utilization of whey and grape must for citric acid production by two *Yarrowia lipolytica* strains, Food Biotechnology, 23, 266-283.

Karasu Yalçın, S., Bozdemir, M.T., Özbaş, Z.Y., 2010. Effects of different fermentation conditions on growth and citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains, Chemical And Biochemical Engineering Quarterly, 347-360.

Karasu Yalçın, S., Şenses Ergül, Ş., Özbaş, Z.Y., 2011. Peynir mikroflorasındaki mayaların önemi, Gıda, 36(1), 55-62.

Karthiyekan, A., Sivakumar, N., 2010. Citric acid production by koji fermentation using banana peel as a novel substrate, Bioresource Technology, 101, 5552-5556

Khaleel, H., Ali, Q., Zulkali, M., Daud, M., 2012. Economic benefit from the optimization of citric acid production from rice straw through Plackett-Burman design and central composite design, Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 36, 81 - 93.

Koç, B., Kaymak-Ertekin, F., 2010. Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları, Gıda, 35(1), 63-70.

Kuforiji, O.O, Kuboye, A.O., Odunfa, S.A., 2010. Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production, *International Journal of Plant Biology*, 1(4), 19-21.

Kumar, A., Jain, V.K., 2008. Solid state fermentation studies of citric acid production, *African Journal of Biotechnology*, 7(5), 644-650.

Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A., 2003. Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 38(12), 1725–1729.

Kumar, D., Verma, R., Bhalla, T.C., 2010. Citric acid production by *Aspergillus niger* van. Tieghem MTTC 281 using waste apple pomace as a substrate, *Journal of Food Science and Technology*, 47, 458–460.

Kurtzman C.P., Boekhout, T., Robert, V., Fell, J.W., Deak, T., 2003. Methods to identify yeasts. *Yeasts in Food*, Boekhout T, Robert, V. (ed), B.Behr's Verlag, GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany, 209-237, ISBN 0-8493-1926-9.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1993. *Principles of Biochemistry*, 1013 s, Worth Publishers, New York, USA, ISBN 0-87901-711-2.

Liu, X.Y., Chi, Z., Liu, L.G., Madzak, C., Chi, Z.M., 2013. Both decrease in ACL1 gene expression and increase in ICL1 gene expression in marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* expressing INU1 gene enhance citric acid production from inulin, *Unesco Chinese Center of Marine Biotechnology*, 15(1), 26-36.

Liu, X.Y., Chi, Z., Liu, L.G., Madzak, C., Chi, Z.M., 2010. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase, *Metabolic Engineering*, 12, 469-476.

Lotfy, W.A., Ghanem, K.M., Elhelow, E.R., 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies, *Bioresource Technology*, 98, 3464-3469.

Marier, J.R., Boulet, M., 1958. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method, Journal of Dairy Science, 41, 1683-1692.

McKay, I.A., Maddox, I.S., Brooks, J.D., 1994. High specific rates of glucose utilisation under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2, Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 73-78.

Mattey, M., 1992. The Production of Organic Acids, Critical Reviews in Biotechnology, 12(1-2), 87-132.

Max, B., Salgado, J.M., Rodriguez, N., Cortes, S., Attilio, C., Domínguez, J.M., 2010. Biotechnological production of citric acid, Brazilian Journal of Microbiology, 41, 862-875.

Nadeem, A., Syed, Q., Baig, S., Irfan, M., Nadeem, M., 2010. Enhanced Production of citric acid by *Aspergillus niger* M-101 using lower alcohols. Turkish Journal of Biochemistry, 35, 7-13.

Öztürk Yalçın, H.T., 2007. Beyaz peynirlerde bozulmaya neden olan *Y. lipolytica* ve *D. hansenii*'nin fenotipik ve genotipik identifikasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, 207s.

Pandey, A., Soccal, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T, Vanderberghe, L.P.S., Mohan, R., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse, Bioresource Technology, 74, 81-87.

Peksel, A., Tokatman, A.K., Arısan Ataç, İ., 2003. *Aspergillus niger* kullanılarak sitrik asit üretimi sırasında bazı poliollerin verim üzerine etkisinin araştırılması, Yıldız Teknik Üniversitesi Dergisi, 4, 1-6.

Puchooa, D., Ramborn, R., 2004. A study on the use of carrot juice in the tissue culture of *Daucus carota*, African Journal of Biotechnology, 3, 248-252.

Rane, K.D., Sims, K.A., 1996. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: effect of nitrogen and biomass concentration on yield and productivity, *Biotechnology Letters*, 18(10), 1139-1144.

Roehr, M., Kubicek, C.P., Komínek, J., 1993. *Biotechnology*, Vol.6, Rehm, H.C. and Reed, G. (Ed), Verlagsgesellschaft, Germany, 388-395, ISBN 0 444 50 6578.

Roukas, T., Kotzekidou, P., 1997. Pretreatment of date syrup to increase citric acid production, *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 273-276.

Roukas, T., Kyriakides, M.L., 2002. Optimization study for the production of citric and gluconic acid from fig water extract by *Aspergillus niger* in surface fermentation, *Food Biotechnology*, 16(1), 17-28.

Rymowicz, W., Fatykhov, A.R., Kamzolova, S.V., Rywinska, A., Morgunov, I.G., 2010. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch and cell recycle regimes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 971-979.

Rymowicz, W., Rywinska, A., Zarowska, R., Juszczuk, P., 2006. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*, *Chemical Papers*, 60(5), 391-394.

Rywińska, A., Juszczuk, P., Wojtatowicz, M., Rymowicz, W., 2011. Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Biotechnology*, 152, 54-57.

Rywińska, A., Rymowicz, W., Zarowska, B., Wojtatowicz, M., 2009a. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation, *Food Technology and Biotechnology*, 47(1), 1-6.

Rywińska, A., Rymowicz, W., Zarowska, B., Skrzypiński, A., 2009b. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1217-1224.

Sadler, G.D., Murphy, P.A., 1998. pH and Titratable Acidity. *Food Analysis*, Nielsen, S.S. (Ed), Aspen Publishers, Inc., USA, 99-118. ISBN 0-8342-1203-X.

Sahasrabudhe, N.A., Sankpal, N.V., 2001. Production of organic acids and metabolites of fungi for food industry, Applied Mycology and Biotechnology (vol 1). Khachatourians, G.G. and Arora, D.K. (ed.), Elsevier, Amsterdam, 307-345, ISBN 0-444-50657-8.

Shuler, M.L., Kargi, F., 2002. Bioprocess Engineering, Basic Concepts Prentice Hall, Inc., USA, 553s, ISBN 0-13-081908-5.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Pandey, A., 2006. New perspectives for citric acid production and application, Food Technology and Biotechnology, 44(2), 141-149.

Turan, M.D., Altundoğan, H.S., 2011. Hidrometalurjik araştırmalarda yanıt yüzey yöntemlerinin kullanımı, Madencilik, 50(3), 11-23.

Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı Yaş Meyve ve Sebze Sektörü, Sektör Raporları, İhracat Genel Müdürlüğü, Tarım Ürünleri Daire Başkanlığı, 2012. http://www.ekonomi.gov.tr/upload/DE8CF22A-D8D3-8566-45206A26011B6009/2012_yili_kur_mdk_rap.pdf Erişim tarihi: Ocak, 2013

Türkiye Cumhuriyeti Başbakanlık Yatırım Destek ve Tanıtım, Türkiye Tarım Sektörü Raporu, Türkiye’de Yaş Meyve-sebze Üretimi, Temmuz, 2010. <http://www.invest.gov.tr/tr-TR/infocenter/publications/Documents/TARIM.SEKTORU.PDF> Erişim tarihi: Aralık, 2012.

Uzunoğulları, P., 2010. Patates atığında *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretimi ve cevap yüzey yöntemi ile proses koşullarının optimizasyonu, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, 79s.

EKLER

EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

Çalışma boyunca maya kültürlerinin geliştirildiği ve saklandığı Yeast Extract Malt Extract (YM) agar besiyeri, kullanılan üreme ortamı ve fermantasyon ortamı aşağıda yer almaktadır (Çizelge Ek 1.1, Çizelge Ek 1.2, Çizelge Ek 1.3).

Çizelge Ek 1.1. Deneylerde kullanılan YM agarın bileşen ve derişimleri (Kurtzman ve ark., 2003)

Bileşen	Derişim (g/L)
Glukoz	10.0
Maya özütü	3.0
Malt özütü	3.0
Pepton	5.0
Agar	15.0

Çizelge Ek 1.2. Deneylerde kullanılan üreme ortamının bileşen ve derişimleri (Rane ve Sims, 1996)

Bileşen	Derişim (g/L)
Glukoz	30.0
Maya özütü	2.0
NH ₄ Cl	2.0
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0

Çizelge Ek 1.3. Deneylerde kullanılan fermantasyon ortamının bileşen ve derişimleri

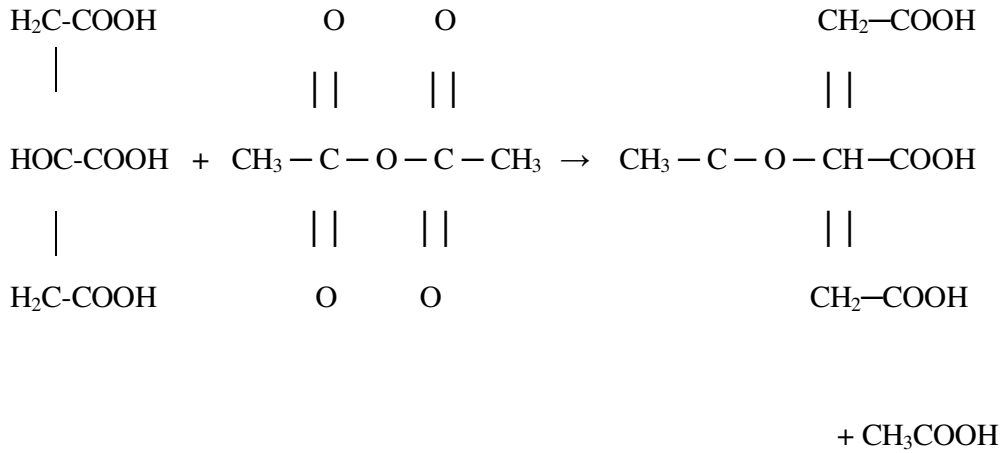
Bileşen	Miktar
Toplam şeker	Değişken
İUP	Değişken
CaCO ₃	40 g/L

Fermantasyon ortamındaki bileşenler, %50 seyreltilmiş havuç suyu içerisinde çözüldürülmüştür. Ayrıca, toplam şekerin derişimi, havuç suyuna glukoz eklenerek ayarlanmıştır.

EK 2. SİTRİK ASİT ANALİZİ

EK 2.1. Piridin-Asetik Anhidrit Analiz Yönteminin Prensibi ve Uygulanışı

Piridin-asetik anhidrit analiz yöntemi, sitrik asitin renkli esterinin oluşturulması ve spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde piridin, ortamda su tutucu ve baziklendirici olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Sitrik asit ile asetik anhidritin verdiği tepkime, Şekil Ek 2.1’de verilmiştir.



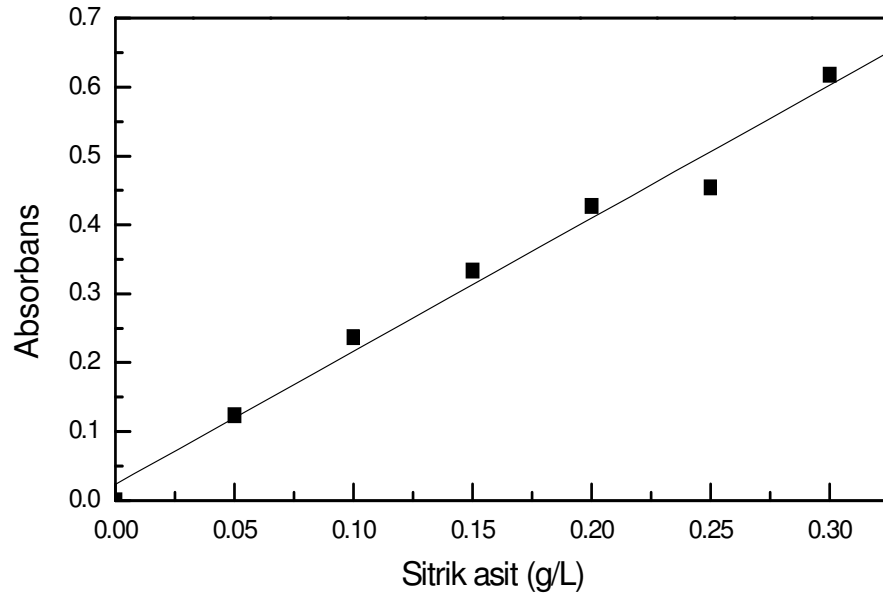
Şekil Ek 2.1. Sitrik asitin, asetik anhidrit ile verdiği tepkime (Bayraktar, 1998).

Piridin-asetik anhidrit analiz yönteminde, fermentasyon ortamından alınarak santrifüjlenen örneklerin çözelti kısımları kullanılmaktadır. Öncelikle örnek, 25-200 mg/L sitrik asit içerecek şekilde, belirli oranlarda seyreltilmektedir. 1 mL seyrelti üzerine 1.30 mL piridin eklenip karıştırıldıktan sonra, karışımın üzerine 5.70 mL asetik anhidrit eklenmekte ve bu örnekler karıştırıldıktan sonra hiç bekletilmeden, 32°C sabit sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika tutulmaktadır. Bu aşamada, renk

dönüşümü 30 dakikada tamamlanmakta ve oluşan renk 32°C’de veya 22-29°C’lerde 30 dakika kararlı kalabilmektedir. Örnekteki sitrik asit miktarı, 420 nm dalga boyunda, spektrofotometrik olarak belirlenmektedir.

EK 2.2. Sitrik Asit Çalışma Doğrusu

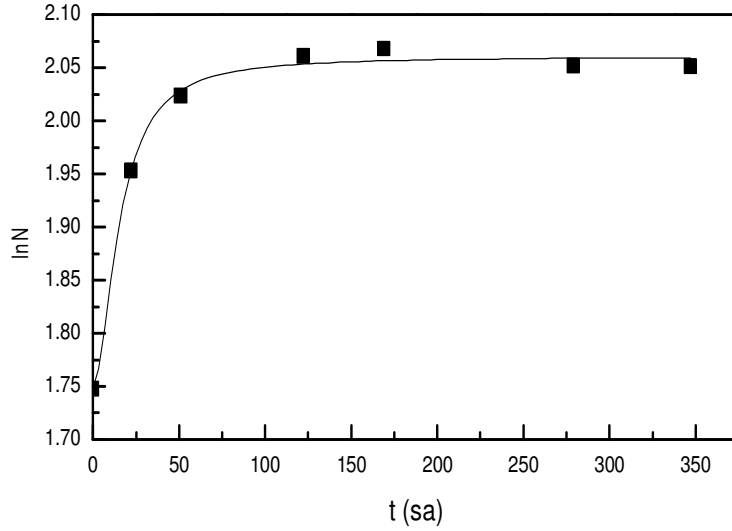
Çalışmada, sitrik asit analizinin ardından sitrik asit derişiminin hesaplanması sırasında, Şekil Ek 2.2’de verilen çalışma doğrusundan yararlanılmıştır.



Şekil Ek 2.2. Sitrik asit çalışma doğrusu ($y = 0.0232 + 1.9328 x$; $R^2 = 0.991$)

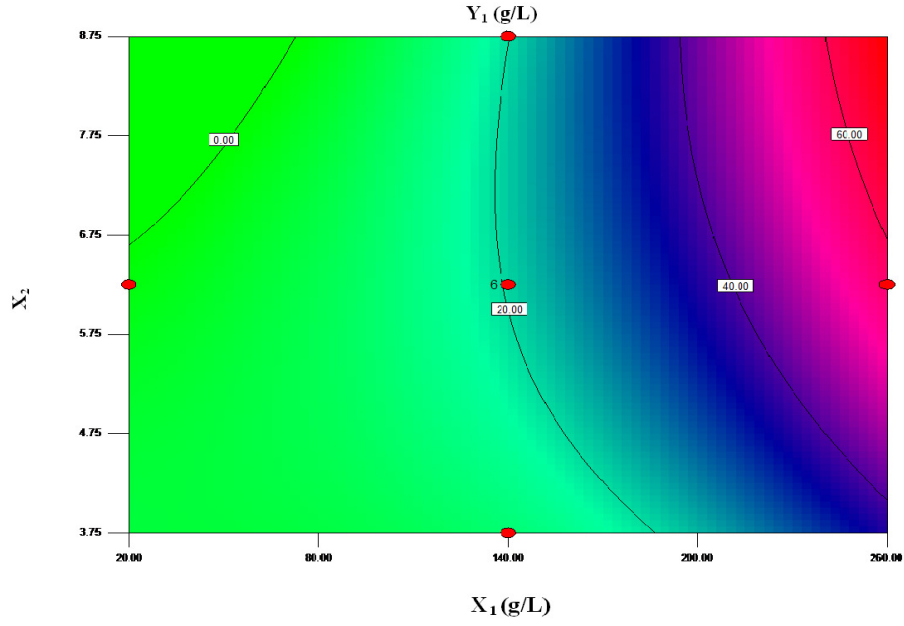
EK 3. MİKROORGANİZMA ÖZGÜL ÜREME HIZININ HESAPLANMASI

Mikroorganizma özgül üreme hızı, Bölüm 3.2.9.3'te verilen eşitlikler yardımı ile hesaplanmıştır. Şekil Ek 3.1'de, *Y. lipolytica* K-168 suşu için, substrat olarak 80 g/L başlangıç derişiminde glukoz içeren fermantasyon ortamında yapılan 5 numaralı deneyde elde edilen mikroorganizma derişimlerinin $\ln$ 'lerinin zamanla değişimleri yer almaktadır. Bu grafikten yararlanılarak, mayanın üssel üreme bölgesi tespit edilmiştir. Saptanan doğrusal bölgedeki maksimum özgül üreme hızı $\mu_{\max} = 0,0085 \text{ sa}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

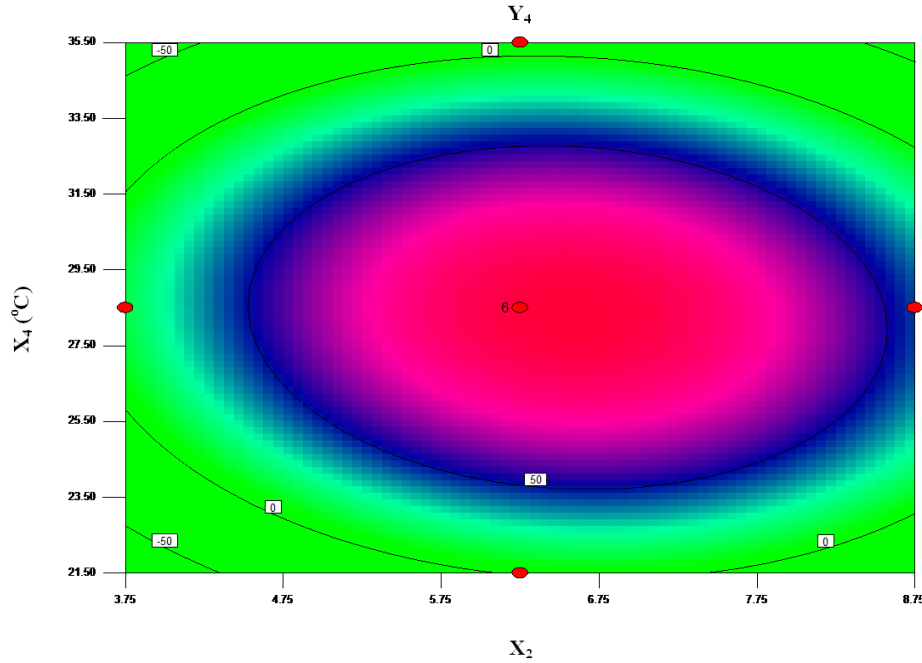


Şekil Ek 3.1. 5 numaralı deney için oluşturulan $\ln N$ -t grafiği

EK 4. ÖRNEK KONTUR GRAFİKLERİ

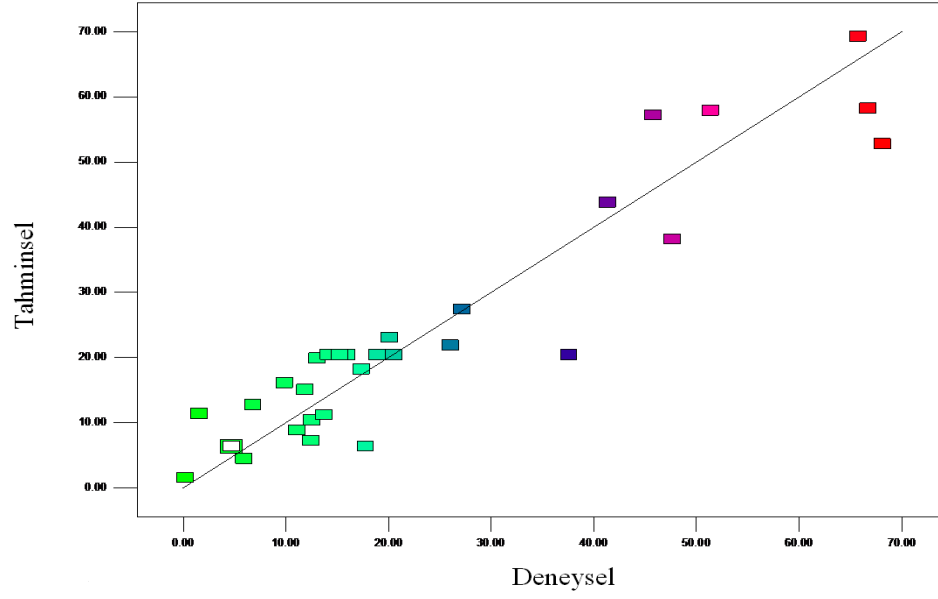


Şekil Ek 4.1. Maksimum sitrik asit derişimi üzerine başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'nın etkisini gösteren kontur grafiğı

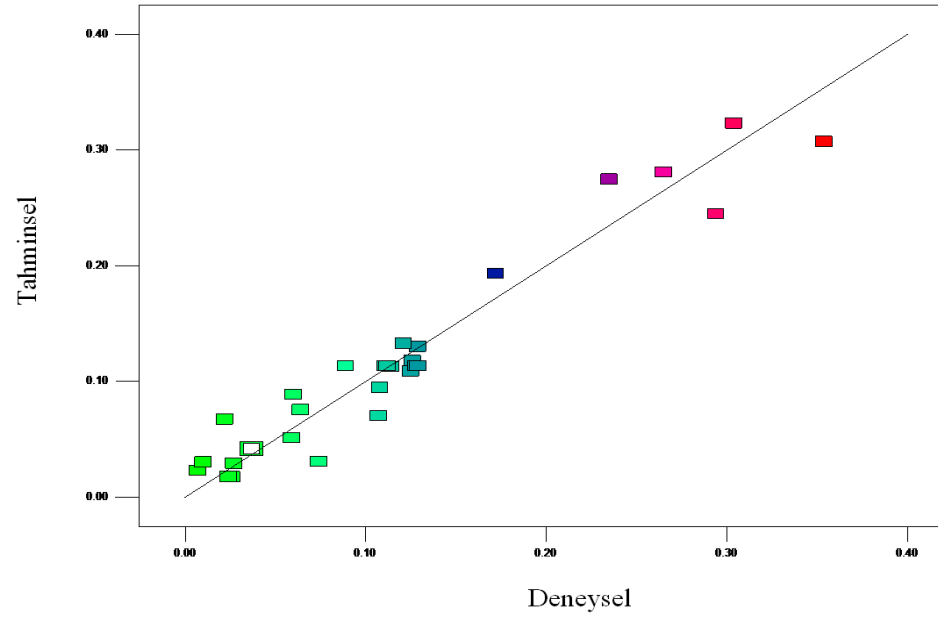


Şekil Ek 4.2. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı üzerine başlangıç pH'ı ve sıcaklığın etkisini gösteren kontur grafiğı

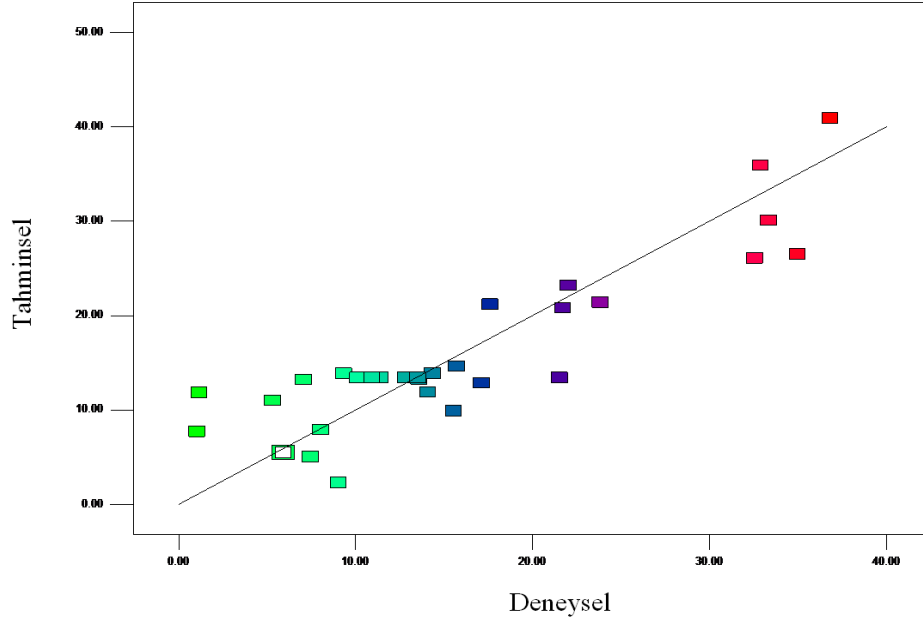
EK 5. HER BİR YANIT İÇİN DENEYSEL DEĞERLERE KARŞI TAHMİNEL DEĞERLERİ GÖSTEREN GRAFİKLER



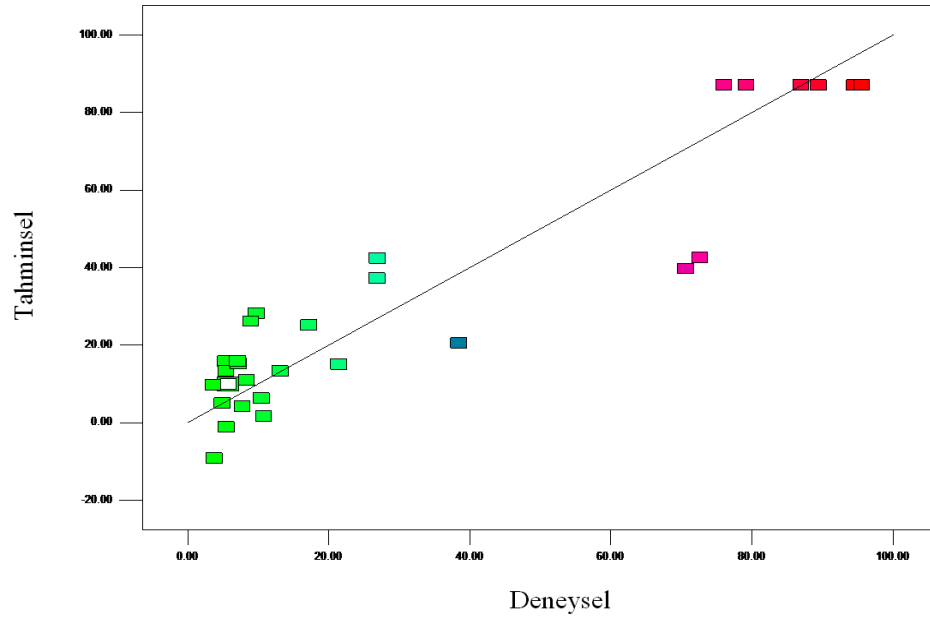
Şekil Ek 5.1. Maksimum sitrik asit derişimi (Y_1) için deneysel değere karşı modele ait tahminsel değere



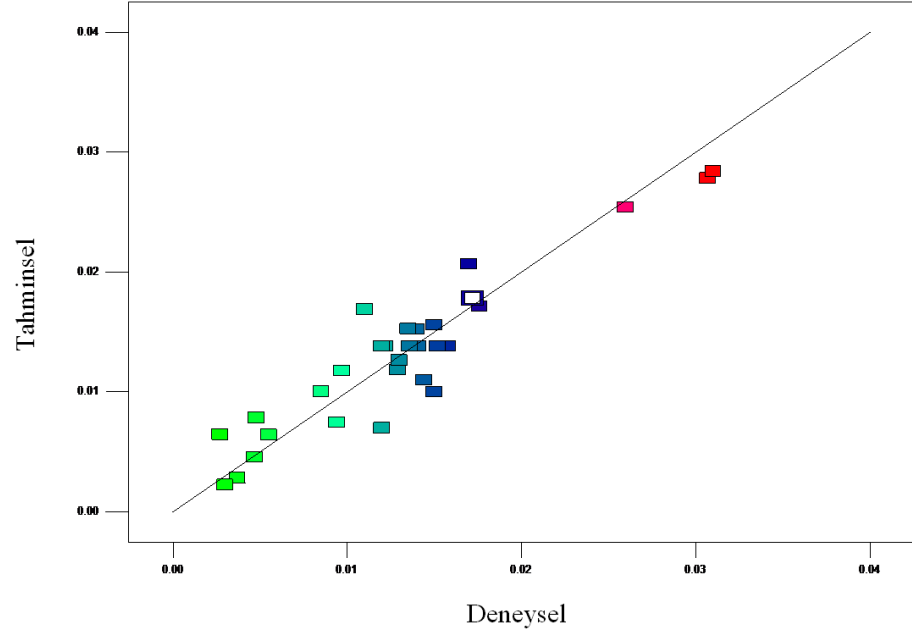
Şekil Ek 5.2. Maksimum sitrik asit üretim hızı (Y_2) için deneysel değere karşı modele ait tahminsel değere



Şekil Ek 5.3. Sitrik asit verimi (Y_3) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler



Şekil Ek. 5.4. Maksimum sitrik asit derişiminin maksimum izositrik asit derişimine oranı (Y_4) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler



Şekil Ek 5.5. Özgül üreme hızı (Y_5) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler

EK 6. İSTENEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU İLE YAPILAN OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER

Notes for BİZİM DİZAYN-Sİ

Design (Actual)

- Summary
- Graph Columns
- Evaluation
- Analysis
 - R1:Y1 (g/L) (Analyze)
 - R2:Y2 (g/L.sa) (Analyze)
 - R3:Y3 (%) (Analyze)
 - R4:Y4 (Analyzed)
 - R5:Y5 (1/sa) (Analyze)
- Optimization
 - Numerical
 - Graphical
 - Point Prediction
 - Confirmation

Solutions Tool

- Report
- Ramps
- Bar Graph
- Pop-Out View

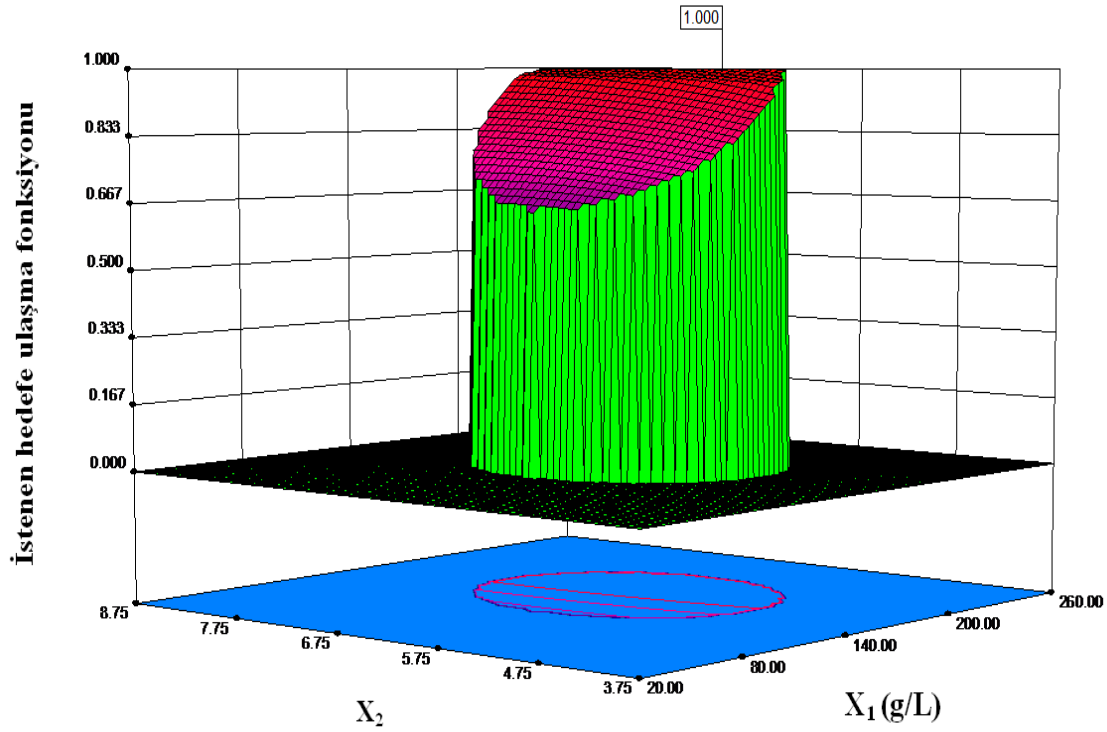
Solutions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	254.30	7.03	1.89	27.76	91.53	0.418033	40.0552	5.3631	0.0101	1.000														
2	234.78	5.41	1.78	25.68	79.62	0.391956	37.083	5.85601	0.0105	1.000														
3	249.74	6.75	1.62	29.43	85.64	0.398908	37.1287	4.56921	0.0074	1.000														
4	190.83	5.90	0.07	27.86	81.09	0.382057	46.4807	10.7567	0.0100	1.000														
5	243.70	6.91	1.81	25.57	93.70	0.426223	43.5352	4.83311	0.0133	1.000														
6	228.25	7.26	1.52	29.42	78.98	0.36477	36.941	15.3575	0.0078	1.000														
7	211.39	7.34	1.81	25.42	76.92	0.356976	38.7371	22.4983	0.0153	1.000														
8	240.56	6.81	1.33	29.67	85.36	0.395228	38.5754	5.7701	0.0070	1.000														
9	215.80	6.22	0.50	28.56	87.06	0.404913	44.7659	11.9069	0.0086	1.000														
10	234.89	5.42	1.20	28.13	81.73	0.391989	38.3898	7.79485	0.0082	1.000														
11	218.24	7.45	1.15	30.23	78.11	0.358762	38.1888	5.23381	0.0060	1.000														
12	181.41	7.28	0.77	25.34	72.92	0.363324	41.199	10.6396	0.0138	1.000														
13	171.78	6.56	0.12	27.08	73.12	0.359407	44.0862	15.0754	0.0109	1.000														
14	247.93	6.25	1.39	27.90	91.12	0.428586	40.8952	6.99626	0.0088	1.000														
15	233.94	7.22	1.30	29.17	86.07	0.395323	40.0942	7.65134	0.0077	1.000														
16	194.31	7.32	0.92	26.45	76.99	0.370088	41.5066	19.1557	0.0121	1.000														
17	211.65	7.23	0.80	29.32	82.15	0.377649	41.8489	10.9894	0.0072	1.000														
18	223.67	6.85	0.89	26.05	94.10	0.441694	46.9829	5.48366	0.0117	1.000														
19	231.07	6.71	1.33	29.68	80.18	0.372923	37.3152	15.0233	0.0074	1.000														
20	200.53	5.44	0.41	27.28	79.29	0.381091	43.6887	10.0032	0.0102	1.000														
21	187.24	7.12	0.09	28.87	81.43	0.376554	46.3227	5.27473	0.0075	1.000														

39 Solutions found

Şekil Ek 6.1. Design Expert® 8.0.7.1 programında nümerik optimizasyonda elde edilen çözümlere ait görüntüler

EK 7. İSTENEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU İLE YAPILAN OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN GRAFİK

İstenen hedefe ulaşma fonksiyonu ile yapılan nümerik optimizasyonda, İUP başlangıç derişiminin ve sıcaklığın optimum değerlerlerinde olduğu durumda; istenen hedefe ulaşma fonksiyonunun başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ı ile değışimi, Şekil Ek 7.1'de verilmiştir.



Şekil Ek 7.1. İstenen hedefe ulaşma fonksiyonunun, başlangıç toplam şeker derişimi ve başlangıç pH'ı ile değışimi ($X_3 = 0.07$ g/L; $X_4 = 27.86^\circ\text{C}$)

ÖZGEÇMİŞ

İsim, Soyisim : Şilan URAK
Sürekli Adres : Mevlana mah. Türk-iş Sitesi no:44 Ataşehir/ İSTANBUL
Son aldığı derece ve yılı : Yüksek lisans, 2013
Doğum Yeri ve Yılı : Fatih, 22.04.1989
Orta Öğretimi : Nuri Cingilloğlu Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi, İstanbul, 2007

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üniversite Öğretimi	Yıllar
Yüksek lisans	2011-2013
Lisans	2007-2011

İŞ TECRÜBESİ

Sentez Kalite Kontrol Laboratuvarı Ltd. Şti (Stajer)	Ağustos, 2010
İstanbul Cevizli Halk Ekmek Fabrikası (Stajer)	Haziran, 2009