

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LAKTİK ASİDİN MISIR KEPEĞİNDEN
FERMENTASYONLA ÜRETİMİ VE İYON
DEĞİŞTİRİCİ REÇİNELER İLE SAFLAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Tuğba KONCA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Kenan TUNÇ

Şubat 2021

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LAKTİK ASİDİN MISIR KEPEĞİNDEN
FERMENTASYONLA ÜRETİMİ VE İYON
DEĞİŞTİRİCİ REÇİNELER İLE SAFLAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Tuğba KONCA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 24/02/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Tuğba KONCA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana rehberlik eden, önerilerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kenan TUNÇ'a; tez izleme komitesinde yer alarak bilgi ve destekleriyle katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Salih Zeki YILDIZ'a,

Doktora eğitimim süresince sabırla ve özveriyle beni destekleyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak beni yönlendiren değerli Yüksek Gıda Mühendisi Sayın Ömer Faruk BALCI'ya,

Desteklerinden dolayı arkadaşım Uzm. Biyolog Alican Bahadır SEMERCİ'ye,

Hayatım boyunca beni koşulsuz destekleyen ve her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ	4
2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri	4
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Karbonhidrat Metabolizması	8
2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması	9
2.3.1. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakteriler	10
2.3.1.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	11
2.3.2. Laktik asit bakterilerinin diğer bazı cinslerinin genel özellikleri	11
2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik Ürünleri	14
2.4.1. Organik asitler	14
2.4.2. Bakteriyosinler	16
2.4.3. Diğer metabolik ürünler	18

2.5. Laktik Asit Bakterilerinden Sentezlenen Laktik Asit	21
--	----

BÖLÜM 3.

NİŞASTA ENDÜSTRİSİ ISLAK ÖĞÜTME PROSESİ	25
3.1. Islak Öğütme Prosesi Genel Özellikleri	25
3.2. Islak Öğütme Proses Aşamaları	30
3.2.1. Eleme.....	30
3.2.2. Islatma	31
3.2.3. Kırma (Öğütme)	33
3.2.4. Ayırma	33
3.2.4.1. Öz ayırma	34
3.2.4.2. Kepek ayırma	35
3.2.4.3. Gluten ayırma	36
3.2.4.4. Nişasta ayırma ve yıkama	38

BÖLÜM 4.

MISIR KEPEĞİ VE HİDROLİZASYON İŞLEMLERİ	39
4.1. Mısır Kepeği Genel Özellikleri	39
4.2. Hidrolizasyon İşlemleri	39

BÖLÜM 5.

FERMENTASYON	44
5.1. Fermentasyon Genel Özellikleri	44
5.2. Fermentasyon Çeşitleri	45
5.2.1. Kesikli tip fermentasyon	45
5.2.2. Sürekli tip fermentasyon	46
5.2.3. Kesikli besleme fermentasyonu	47
5.2.4. Anaerobik fermentasyon	47

5.2.5. Aerobik fermentasyon	48
5.2.6 Katı hal fermentasyonu	49
 BÖLÜM 6.	
LAKTİK ASİT SAFLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ	50
6.1. Saflaştırma Sistemlerinin Genel Özellikleri	50
6.2. İyon Değiştirici Reçineler	53
 BÖLÜM 7.	
MATERYAL VE YÖNTEM	61
7.1. Materyal	61
7.2. Besiyerinin ve Bakteri Kültürünün Hazırlanması	61
7.3. Mısır Kepeğinin Hidrolizasyonu	62
7.4. Maserasyon Suyunun Hazırlanması	65
7.5. Fermentör Düzenegi ve Fermentasyon Çalışmaları	66
7.6. Analiz Yöntemleri	68
7.6.1. Mikroorganizma konsantrasyonu / biyokütle tayini	68
7.6.2. Şeker konsantrasyonu tayini	68
7.6.3. Laktik asit tayini	69
7.7. İyon Değiştirici Reçine Uygulaması	72
 BÖLÜM 8.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	77
8.1. Fermentasyon Sonuçları.....	77
8.1.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları	77
8.1.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları	79
8.1.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları	81
8.2. İyon Değiştirici Reçine Uygulama Sonuçları	83

8.2.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulamasının laktik asit lęm sonuçları	88
8.2.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulamasının laktik asit lęm sonuçları	90
8.2.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulamasının laktik asit lęm sonuçları	92

BÖLÜM 9.

TARTIşMA VE SONUç	94
KAYNAKLAR	103
ZGEğMİş	112

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
atm	: Atmosfer basıncı
ATP	: Adenozintrifosfat
°C	: Derece santigrat
cm	: Santimetre
cm ³	: Santimetreküp
CO ₂	: Karbondioksit
COOH	: Karboksilik grup
CRA	: Corn Refiners Association
dk	: Dakika
DVB	: Divinilbenzen
EPS	: Ekzopolisakkarit
g	: Gram
GRAS	: Genel olarak güvenli kabul edilen
h	: Saat
HCl	: Hidroklorik asit
HMF	: Hidroksimetilfurfural
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
LA	: Laktik asit
LAB	: Laktik asit bakterileri
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
µm	: Mikrometre

mm	: Milimetre
MRS	: De Man, Rogosa and Sharpe
N	: Normalite
NaCl	: Sodyum klorür
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
pH	: Bir çözeltinin asitlik ve bazlık derecesi
PLA	: Polilaktik asit
R ²	: Regrasyon katsayısı
RI	: Refraktif İndeks
rpm	: revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SO ₂	: Kükürtdioksit
SO ₃ H	: Sülfonik asit grubu
sp.	: Species (tür)
spp.	: Türler
ssp.	: Subspecies (alttür)
UV	: Ultraviyole
v/v	: Hacimce yüzde
%	: Yüzde
w/v	: Hacimde ağırlıkça yüzde
w/w	: Ağırlıkça yüzde

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterilerindeki glikoz fermentasyonu	9
Şekil 2.2. Laktik asit izomerleri	23
Şekil 2.3. Laktik asidin kimyasal sentezi	23
Şekil 3.1. Mısır ve yan ürünleri	27
Şekil 3.2. Mısırdan üretilen ürünlerin kullanım alanları	28
Şekil 3.3. Nişasta endüstrisi ıslak öğütme prosesi	29
Şekil 3.4. Dane mısır	31
Şekil 3.5. Mısır özü	34
Şekil 3.6. Mısır gluteni	37
Şekil 3.7. Mısır nişastası	38
Şekil 4.1. Mısır kepeğinde kullanılan ön işlem yöntemleri ve olası etkileri	40
Şekil 6.1. Polimerik iyon değiştiricilerin şematik gösterimi	55
Şekil 6.2. Stiren-divinilbenzen kopolimerinin kimyasal yapısı	56
Şekil 6.3. Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinenin kimyasal yapısı	57
Şekil 6.4. Zayıf bazik anyon değiştirici reçinenin kimyasal yapısı	57
Şekil 6.5. Katyon ve anyon değiştirici reçinelerin kimyasal yapısının şematik diyagramı	58
Şekil 7.1. Mısır kepeği	62
Şekil 7.2. Maserasyon suyu	65
Şekil 7.3. Çalışmalarda kullanılan fermentör ve düzeneği	67
Şekil 7.4. %4 toplam şeker içeren test çözeltisinin standart grafiği	70
Şekil 7.5. %10 toplam şeker içeren test çözeltisinin standart grafiği	71
Şekil 7.6. %16 toplam şeker içeren test çözeltisinin standart grafiği	71
Şekil 7.7. Çalışmada kullanılan katyon değiştirici reçine	73
Şekil 7.8. Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinenin yıkama basamakları	74

Şekil 7.9. Zayıf bazik anyon değıştirici reçinenin yıkama basamakları	74
Şekil 7.10. İyon değıştirici reçine uygulamasının düzeneği	76
Şekil 8.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği	79
Şekil 8.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği	81
Şekil 8.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği	83
Şekil 8.4. Reçine uygulama prosesi	84
Şekil 8.5. Birinci çift katyon değıştirici reçine uygulaması besleme çıkış örnekleri	84
Şekil 8.6. Birinci çift katyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri	85
Şekil 8.7. Birinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması besleme çıkış örnekleri	85
Şekil 8.8. Birinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri	85
Şekil 8.9. İkinci çift katyon değıştirici reçine uygulaması besleme çıkış örnekleri	86
Şekil 8.10. İkinci çift katyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri	86
Şekil 8.11. İkinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması besleme çıkış örnekleri	87
Şekil 8.12. İkinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri	87
Şekil 8.13. İyon değıştirici uygulaması numuneleri	88
Şekil 9.1. Spesifik biyokütle artış hızı grafiği	97

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı fermente ürünler ve fermentasyonlarında kullanılan laktik asit bakterileri	5
Tablo 2.2. Bazı laktik asit bakterilerinin gıda endüstrisindeki fonksiyonel avantajları	6
Tablo 2.3. Bazı laktik asit bakterilerinin insan sağlığına etkisi	7
Tablo 2.4. LAB cinsleri ve özellikleri	10
Tablo 2.5. Bazı <i>Lactobacillus</i> türlerinin şeker fermentasyonu biçimleri	11
Tablo 2.6. Bakteriyosin üreten bazı laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriyosin çeşitleri ve etki spektrumları.....	17
Tablo 2.7. Ekzopolisakkarit üretebilen bazı laktik asit bakterileri	21
Tablo 2.8. Laktik asit uygulama alanları	22
Tablo 3.1. Mısır bileşenleri	26
Tablo 3.2. Islak öğütme prosesi ile mısırdan elde edilen ortalama ürün verimleri (kuru madde bazında)	27
Tablo 3.3. Maserasyon suyu bileşenleri	33
Tablo 3.4. Mısır özü bileşenleri	35
Tablo 3.5. Mısır kepeği bileşenleri	36
Tablo 3.6. Mısır gluteni bileşenleri	37
Tablo 5.1. Fermentasyonda geleneksel ve modern yöntem karşılaştırması	45
Tablo 6.1. Laktik asit ayırma proseslerinden bazılarının avantajları ve dezavantajları	52
Tablo 6.2. Bazı polimerik iyon değiştirici reçinelerin fonksiyonel grupları	57
Tablo 6.3. İyon yüklerine göre iyon değiştirici reçinelerin karşılaştırmaları	60
Tablo 7.1. MRS Broth besiyeri bileşenleri	62
Tablo 7.2. Mısır kepeği analiz sonuçları	63

Tablo 7.3. Şeker konsantrasyonu analizinde kullanılan HPLC'nin çalışma koşulları	63
Tablo 7.4. HMF analizinde kullanılan HPLC'nin çalışma koşulları	64
Tablo 7.5. Maserasyon suyu analiz sonuçları	66
Tablo 7.6. Çalışmada kullanılan iyon değiştirici reçinelerin özellikleri	72
Tablo 8.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları	78
Tablo 8.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları	80
Tablo 8.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları	82
Tablo 8.4. %9 toplam şeker içeren fermentasyon sonrası iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları	89
Tablo 8.5. %6 toplam şeker içeren fermentasyon sonrası iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları	91
Tablo 8.6. %3 toplam şeker içeren fermentasyon sonrası iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları	93
Tablo 9.1. Fermentasyon sıvısı kimyasal analiz sonuçları	95
Tablo 9.2. İyon değiştirici reçine uygulamalarının sonuç tablosu	101

ÖZET

Anahtar kelimeler: Mısır kepeği, fermentasyon, laktik asit, iyon değıştirici reçine

Birçok farklı alanda çeşitli kullanım özelliklerine sahip olan laktik asit, son yıllarda oldukça önemli bir endüstriyel ürün özelliğı kazanmıştır. Gıda, eczacılık, kozmetik, tıp gibi endüstrilerde kullanılması, pazarının hızlı bir şekilde büyümesini sağlamış, özellikle yeşil endüstrinin önem kazandığı günümüzde laktik asidin değeri artmıştır. Biyoçözünür bir malzeme olarak biyoplastik ana hammaddesi olan polilaktik asidin (PLA) üretilmesinde laktik asidin kullanılması, bu önemi daha da arttırmıştır. Laktik asidin üretilmesinde karbonhidrat kaynağı olarak değışik endüstrilerin karbonhidrat içeren atıklarından faydalanmak gerek geri dönüşümün sağlanabilmesi gerekse ucuz hammadde kaynağı bakımından önemlidir. Tarımsal işletmeler bu kaynağın en önemli olanlarından olup, nişasta ve şeker endüstrisi de bunlardan biridir. Mısırdan nişasta üreten işletmelerde yan ürün olarak ortaya çıkan mısır kepeğı yem endüstrisinde değerlendirilmektedir. Mısır kepeğinin sadece yem endüstrisinde değerlendirilmesi, içerdığı nişasta bakımından israf olarak düşünülebilir. Çünkü kepek üzerinde kalan nişasta ile birlikte selülozun bir kısmının hidrolizasyonu ile elde edilecek şekerin laktik asit üretiminde değerlendirilmesi ve geriye kalan hidrolize olmayan selülozun ise yine yem endüstrisinde değerlendirilmesi, kepeğın ekonomik değeriinden bir şey kaybettirmedığı gibi karbonhidrat kaynağı olarak kullanılması ekonomik değeri kazandırmaktadır.

Bu çalışmada, nişasta üretim endüstrisinde ıslak öğütme prosesi sonunda mısırdan yan ürün olarak elde edilen mısır kepeğinin içerdığı nişastanın ve selülozun hidrolizasyonu sonucu elde edilen ve substrat olarak kullanılan şekerin, fermentasyon yöntemi ile laktik asit üretiminde kullanılması amaçlanmıştır. Hidrolizasyon ile azami ölçüde şeker konsantrasyonu elde edilmesine ve fermentasyon veriminin yüksek tutulmasına etki edecek olan hidrolizasyon şartlarının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Üretilen laktik asit, iyon değıştirici reçine işlemleri uygulanarak fermentasyon sıvısından saflaştırılmaya çalışılmıştır. Hidrolizasyon işlemleri sonucunda en fazla %9 toplam şeker konsantrasyonu elde edilmiştir. Fermentasyon sonunda %71 oranında verim ile %6,12 laktik asit konsantrasyonuna ulaşılmıştır. İyon değıştirici reçine işlemleri sonucunda ise ortalama %98 oranında laktik asit kazanımı sağlanmıştır. Şeker konsantrasyonunun laktik asit üretim verimi üzerinde etkisini belirlemek amacıyla hidrolizasyon işlemleri sonucunda elde edilen %9 toplam şeker, %6 ve %3 oranlarına seyreltilerek fermentasyon çalışmaları ayrıca yapılmış olup, laktik asit üretim verimleri sırasıyla %73 ve %72 olarak belirlenmiştir. Seyreltilen şeker konsantrasyonlarının kullanıldığı fermentasyonlar sonucu elde edilen laktik asidin fermentasyon ortamından saflaştırılması işlemlerinde geri kazanım oranlarında düşüş olduğu belirlenmiştir.

LACTIC ACID PRODUCTION FROM CORN FIBER BY FERMENTATION AND PURIFICATION WITH ION-EXCHANGE RESINS

SUMMARY

Keywords: Corn fiber, fermentation, lactic acid, ion-exchange resin

Lactic acid is an important product that is used in a wide range of industrial area in recent years due to its different usage properties. Its use in industries such as food, pharmacy, cosmetics, and medicine has enabled its market to grow rapidly. Especially in today's world where the green industry is gaining importance the interest in lactic acid has increased. The use of lactic acid in the production of polylactic acid (PLA), which is the main raw material of bioplastic as a biodegradable material, has further increased this importance. In the production of lactic acid, it is important to benefit from carbohydrate-containing wastes of different industries as a source of carbohydrates in terms of both recycling and cheap raw material source. Starch and sugar industries are among the most important of this resource like agricultural industry. Corn fiber obtained as a by-product in industries producing starch from corn is utilized in the feed industry. Utilizing corn fiber only in the feed industry can be considered wasteful in terms of its starch content. The use of sugar obtained by both hydrolysis of the starch and part of cellulose in corn fiber in the lactic acid production and also the use of remaining non-hydrolyzed cellulose in feed industry, increases the economic value of fiber since it is used as a source of carbohydrate.

In this study, the sugar obtained by the hydrolysis of both the starch and the cellulose in the corn fiber produced as a by-product of corn after the wet-milling process of the starch production industry is aimed to be used as a substrate in the production of lactic acid by fermentation. It is aimed to determine the hydrolysis conditions that will keep the fermentation yield high and also obtain the maximum sugar concentration with hydrolysis. The lactic acid produced was tried to be purified from the fermentation medium by using an ion-exchange resin process. As a result of hydrolysis maximum 9% total sugar concentration was obtained. In fermentation, lactic acid concentration of 6,12% was achieved with a yield of 71%. As a result of the ion-exchange resin processes, an average of 98% lactic acid was provided. In order to determine the effect of sugar concentration on lactic acid production efficiency, 9% total sugar which is obtained as a result of hydrolysis processes was diluted to 6% and 3% and fermentation studies were also carried out. Lactic acid production yields were found as 73% and 72%, respectively. It was observed that the recovery rates, from the fermentation medium, of the lactic acid obtained as a result of fermentation using diluted sugar concentrations are reduced.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Günümüzde hem çevresel etki hem de kullanım ve ekonomik faydalarından dolayı biyolojik esasa dayalı kimyasal maddeler önem kazanmaya başlamıştır. Laktik asit gıda, kozmetik, eczacılık ve polimer endüstrisinde giderek artan oranda kullanımı sebebiyle öne çıkan önemli bir biyolojik esaslı kimyasal olmuştur.

Laktik aside yönelik küresel talebin, 2016 yılında 2,1 milyar dolar olduğu, 2025’lerde ise 9,8 milyar dolar olacağı belirtilmektedir (Manadhar ve Shah, 2020). Küresel yıllık üretimi ortalama 1 milyon ton olan laktik asidin, 2025 yılına kadar yıllık birleşik büyüme oranının (CAGR, compound annual growth rate) %18,7 olarak gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (URL-1, 2020). Bu büyümenin en büyük itici gücünün kaynaklarından birinin ise çevre dostu biyoçözünür termoplastik olan ve laktik asitten elde edilen polilaktik asidin (PLA) kullanım alanının genişlemesidir. Polilaktik asit; ambalajlama, ziraat, taşımacılık, tekstil, elektronik, tıp ve diğer endüstrilerde çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (Singh ve ark., 2017).

Laktik asidin hem üretim kaynaklarının araştırılması hem de üretimindeki hammadde kaynağına bağlı olan üretim prosesi ve verim şartlarının optimize edilmesi çalışmaları eski tarihlerden beri günümüze kadar devam etmektedir. Laktik asidin kullanım alanlarındaki önemi, kendine özgü ve ayrıcalıklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Fermentasyonla laktik asit üretiminde kullanılan temel karbonhidrat kaynağı şekerlerdir (Srivastava ve ark., 2015; Ameen ve Caruso, 2017).

Şekerler ve proteinler, fermentasyonda substrat kaynağının ana bileşenini oluşturan iki ana hammaddedir. Günümüzde, biyolojik atıklardan faydalananarak bu iki kaynağa erişebilmek, bir bakıma geri dönüşüm işlemlerinin esaslarından birini oluşturmaktadır.

Biyolojik selülozik içerikli atıkların geri kazanılmasına yönelik yapılan çok sayıda çalışmaların mevcudiyeti, kaynak ve proses çeşitliliğini ortaya çıkarmıştır.

Biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde substrat olarak kullanılan hammadde kaynakları arasında çeşitli tarımsal-endüstriyel yan ürünler ve atıklar bulunmakta olup, mısır ve işleme proseslerinden elde edilen ürünler de bunlar içerisinde yer almaktadır. Mısır (*Zea mays* L.), gerek gıda gerekse endüstriyel bir bitki olarak kullanımı bakımından, dünyada en çok üretilen hububatların başında yer almaktadır. Gittikçe yükselen bir artış eğilimi ile 2019-2020 hasat döneminde üretiminin yaklaşık 1,111 milyon tona ulaştığı, buna bağlı olarak da aynı dönem içerisinde yaklaşık 1,135 milyon ton kullanımının olduğu bildirilmiştir (URL-3, 2020).

2019 yılı verilerine göre mısırın kullanım alanları; %34,9 atık ve yem, %34,7 biyoetanol, %7,8 DDGS (dried distilled grain with solubles-çözünürler ile kurutulmuş damıtılmış tane-kullanım olarak hayvan beslemede), %2,8 yüksek fruktozlu mısır şurubu, %2,3 tatlandırıcılar, %1,5 nişasta, %1,0 alkolsüz içecekler/alkol, %1,1 tohum ve %1,4 diğerleri olarak belirtilmiştir (URL-3, 2020). Bu kadar geniş bir kullanım alanına sahip olan mısırın, biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde de kullanılması kaçınılmazdır. Dolayısıyla, mısır işleme prosesinin paralel bir gelişme göstermesinin de katkısıyla, mısıra bağlı biyoteknolojik ürünlerin gelişmesi ve yaygınlaşması doğal bir sonuçtur.

Mısırdan nişasta üretimi endüstrisinde, farklı yöntemler uygulanarak elde edilen ürünler oldukça geniş ve farklı alanlarda kullanılabilmektedirler. Üretilen yan ürünlerden mısır kepeği ise sadece hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir. Mısır kepeğinin, katma değeri yüksek ikincil ürünler üretilmesinde alternatif hammadde kaynağı olarak kullanımı, ekonomik ve çevreci yaklaşımlar açısından kayda değer bir gelişme olarak önem kazanmıştır.

Islak öğütme (wet-milling) prosesi, mısırdan nişasta üretimi teknolojisinde en fazla uygulanan prostestir. Kepek ayırma prosesinde, işletme maliyetlerinin yüksek olması bakımından kepek üzerinde bir miktar nişasta kalmaktadır. Kepek üzerinde kalan

nişasta ile birlikte selülozun bir kısmının farklı yöntemlerle hidroliz edilerek şekerlere dönüştürülmesi ve oluşan şekerlerin fermentasyonda karbonhidrat kaynağı olarak ve yine yan ürün olarak elde edilen proteince zengin maserasyon suyunun azot kaynağı olarak biyoteknolojide kullanılması, farklı bir uygulama olarak karşımıza çıkmıştır.

Bu çalışmada, nişasta üretim endüstrisinde ıslak öğütme prosesi sonunda mısırdan yan ürün olarak elde edilen mısır kepeğinin içerdiği nişastanın ve selülozun hidrolizasyonu sonucu elde edilen ve substrat olarak kullanılan şekerin, laktik asit fermentasyonu ile laktik asit üretiminde kullanılması amaçlanmıştır. Hidrolizasyon ile azami ölçüde şeker konsantrasyonu elde edilmesine ve fermentasyon veriminin yüksek tutulmasına etki edecek olan hidrolizasyon şartlarının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Üretilen laktik asidin fermentasyon ortamından saflaştırılmasına yönelik olarak, yeni ve üzerinde çalışılan bir metot olan iyon değiştirici reçine işlemi uygulanmıştır.

BÖLÜM 2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ

2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Endüstriyel olarak önem arz eden bakteri gruplarından biri olan laktik asit bakterileri (LAB) gıda üretimi, sağlığın düzenlenmesi ile makromoleküllerin, enzimlerin ve metabolitlerin üretimi dahil olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılırlar (Pfeiler ve Klaenhammer, 2007; Mokoena, 2017).

Laktik asit bakterileri, tabiatta yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar (Çon ve Gökalp, 2000).

Laktik asit bakterileri pek çok gıdaya doğal veya starter kültür olarak ilave edilerek, gıdaların olgunlaştırılması, üretimi, dayanıklılığının arttırılmasında önemli rol oynarlar (Salas ve ark., 2017; Admassie, 2018). Süt ve ürünlerinde (örn., yoğurt, kefir) asit oluşumu ve/veya aroma ve lezzet oluşumunda LAB kullanılmaktadır. Fermente et ürünlerinde (örn., sucuk) olgunlaşma süresini kısaltmak ve kontrol altına almak, dayanıklılık süresini uzatmak, ürüne renk, aroma ve lezzet kazandırmak amacıyla kullanılan mikroorganizmalardır (Yörük ve Güner, 2011; Matthews ve ark., 2017). Meyve ve sebzelerde ise fermentasyon ile laktik asit bakterisinin gelişimi sağlanarak ürün kalitesi arttırılmaktadır. Bitkisel ürünlerin ekonomik anlamda en çok dikkat çekenleri ise fermente meyve suları, turşular ve yağlardır (Dinçer ve ark., 2009). Bazı fermente ürünler ve fermentasyonlarında kullanılan laktik asit bakterileri Tablo 2.1.'de belirtilmiştir. Ayrıca bulundukları gıdalarda biyojen aminlerin oluşumu ve gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların gelişimleri engellenerek, daha sağlıklı, kaliteli ve standart bir ürün elde edilmektedir (Gao ve ark., 2019). Tablo 2.2.'de bazı laktik

asit bakterilerinin tipik örnekleri ve bu bakterilerin gıda endüstrisindeki fonksiyonel avantajları belirtilmektedir.

Tablo 2.1. Bazı fermente ürünler ve fermentasyonlarında kullanılan laktik asit bakterileri (Şengün, 2011; Erten ve ark., 2014)

Ürün	Laktik Asit Bakterileri
Peynir	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Yoğurt	<i>Enterococcus durans</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Kefir	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> sp.
Tereyağı	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Streptococcus</i> sp.
Sucuk	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Tarhana	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Turşu	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Şalgam	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus alimentarius</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>

Tablo 2.2. Bazı laktik asit bakterilerinin gıda endüstrisindeki fonksiyonel avantajları (Leroy ve ark., 2004)

Avantaj	Fonksiyonellik	Laktik asit bakterileri
Gıda koruması	* Bakteriyosin üretimi	
	- Süt ve süt ürünleri	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
	-Fermente et ürünleri	<i>Lactobacillus sakei</i> <i>Enterococcus faecium</i>
	-Fermente zeytinler	<i>Lactococcus plantarum</i>
	-Fermente sebzeler	<i>Lactococcus lactis</i>
Duyusal	* Ekzopolisakkarit üretimi	Birçok laktobasil ve streptokok
	* Amilaz üretimi	Birçok laktobasil
	* Aroma üretimi	Birçok suş
	* Molalaktik fermentasyon	<i>Oenococcus oeni</i>
Teknolojik	* Bakteriyofaj direnci	Birçok suş
	* Yoğurтта fazla asitliğin önlenmesi	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
Besinsel	* Nutrasötiklerin üretimi	
	- Düşük kalorili şekerler (örn., sorbitol ve mannitol)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	- Oligosakkaritlerin üretimi	<i>Lactococcus lactis</i>
	- B grubu vitaminlerin üretimi (örn., folik asit)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
	- Biyoaktif peptitlerin salınımı	Birçok suş
	* Toksik ve besinsel değeri olmayan maddelerin azaltımı	
	- L (+) laktik asit izomerinin üretimi	L (+) laktik asit üreten suşlar
	- Laktozun ve galaktozun ayrıştırılması	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	- Rafinozun soyadan ayrıştırılması	Birçok suş
	- Amilaz inhibitörlerinin ve polifenolik bileşiklerin azaltımı	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
	- Biyojenik aminlerin üretiminin azaltılması	<i>Enterococcus faecalis</i>

Laktik asit bakterileri (LAB), endüstriyel gıda fermentasyonunda yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grubudur. Karbonhidratların fermentasyonu sırasında ana nihai ürün olarak laktik asit üreten, gram-pozitif, spor oluşturmeyen, hareketsiz basil ve koklardır. Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilen, asit ve alkali ortamlara karşı dirençlilik gösterebilen, aerotolerant anaerob heterotrof mikroorganizma grubudur. Gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özellikte olup 10-45°C arası sıcaklıklarda gelişme gösterebilmektedirler (Wright ve Axelsson, 2019).

Laktik asit bakterilerinin besinlere sağladığı faydaların yanı sıra insanlar için de yararlı birçok etkisi bulunmaktadır. Bazı laktik asit bakterileri sağlığı geliştirici (probiyotik) özelliklere sahip olan faydalı mikroorganizmalar olarak düşünülmektedir (Zannini ve ark., 2016). Bu bakteriler besin sindirimine yardımcı olurlar ve özellikle bağırsakta mikrobiyal dengenin sağlanmasında rol oynarlar. Ayrıca bağışıklık sistemini destekleme, laktoz intoleransını azaltma, alerjik rahatsızlıkları azaltma, kan kolesterol seviyesini düşürme ve tümör oluşumunu inhibe etme gibi sağlık açısından birçok fayda da sağlamaktadırlar (Xiao ve ark., 2014). Bazı laktik asit bakterilerinin insan sağlığına etkisi Tablo 2.3.'te belirtilmiştir.

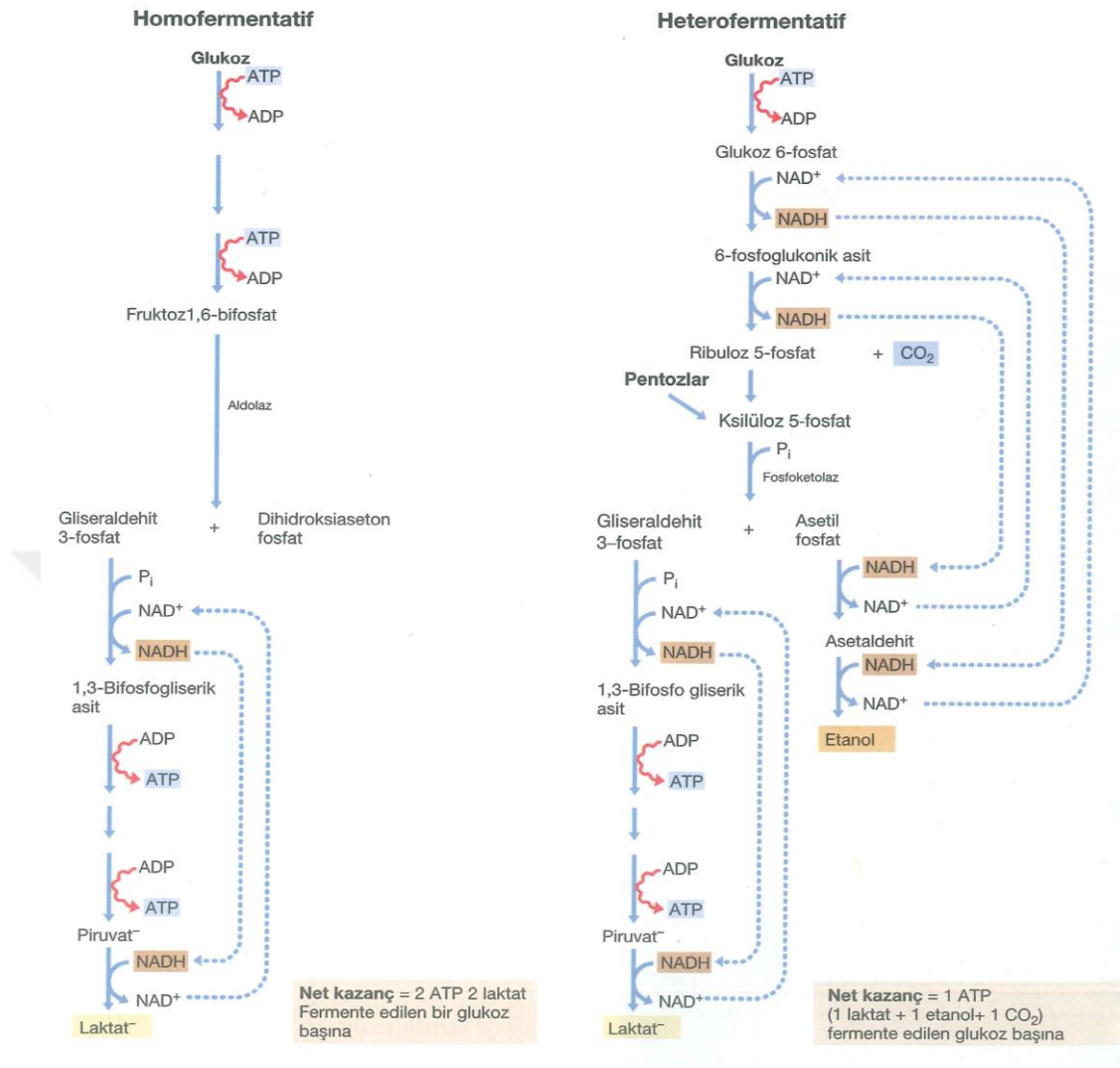
Tablo 2.3. Bazı laktik asit bakterilerinin insan sağlığına etkisi (Figuerola-Gonzalez ve ark., 2011; Ayivi ve ark., 2020)

Laktik Asit Bakterileri	İnsan Sağlığına Etkisi
<i>Lactobacillus casei</i>	İshalin şiddetini ve süresini azaltır. Crohn hastalığının semptomlarını hafifletir ve güçlü antimikrobiyal özelliklere sahiptir.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Patojen bakterilerin (<i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i>) gelişimini inhibe eden laktik asit salgılar. Serum kolesterol seviyelerini düşürür.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	İrritabl bağırsak sendromunun semptomlarını hafifletir. Gastrointestinal mikroflorayı modüle eder ve değiştirir.
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunu önler. İltihaplanmanın azaltılmasını sağlar.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kanserojen ürünlerin oluşumunu engelleyen kısa zincirli yağ asitleri üretir.

2.2. Laktik Asit Bakterilerin Karbonhidrat Metabolizması

Laktik asit bakterileri karbonhidrat mekanizmalarına göre homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki ayrı alt gruba ayrılmaktadır. Homofermentatif laktik asit bakterileri; glikozu EMP (Embden Meyerhoff Parnas) yolu ile pirüvata indirgeyip, son ürün olarak laktik asit oluşturur. Heterofermentatif laktik asit bakterileri; glikozu HMP (Hekzozmonofosfat) yoluyla parçalayarak laktik asidin yanı sıra karbondioksit (CO_2), etanol, asetik asit ve formik asit gibi yan ürünler oluştururlar. Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan laktik asidin miktarı türlere göre değişkenlik göstermektedir (Martinez ve ark., 2013; Pereira ve ark., 2020). Şekil 2.1. bu iki grubun glikozu fermente ederken izledikleri yolları özetlemektedir.

Fermentasyonda gözlenen farklılıklar glikolizdeki anahtar enzim olan aldolazın bulunup bulunmamasından kaynaklanır. Heterofermentasyon yapan bakteriler aldolazdan yoksun olduğu için fruktoz bifosfatı trioz fosfata yıkamazlar. Bunun yerine, glukoz-6 fosfat'ı 6-fosfoglukonat'a oksitlerler ve daha sonra bunu pentoz fosfat'a dekarboksile ederler. Bu ürün de fosfoketolaz enzimiyle trioz fosfat ve asetilfosfat oluşturmak üzere yığılır. Heterofermentasyon yapanlarda trioz fosfat, sonuçta laktik aside çevrilir ve bu arada 1 mol ATP oluşturulur. Bununla birlikte, redoks dengesinin sağlanabilmesi için üretilen asetilfosfat, pentoz fosfat üretimi sırasında oluşturulan NADH'tan gelen elektronları kabul eder ve etanole çevirir. Bu olay sırasında ATP kazancı yoktur. Bu nedenle heterofermentatifler, homofermentatifler gibi glukozdan 2 mol ATP değil, sadece 1 mol ATP üretirler. Heterofermentatifler 6-fosfoglukonatı dekarboksile ettiklerinden, fermentasyon ürünü olarak CO_2 oluşturdukları halde, homofermentatifler ya çok az CO_2 oluştururlar ya da hiç CO_2 oluşturmazlar (Madigan ve Martinko, 2010; Ganzle, 2015).



Şekil 2.1. Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterilerindeki glukoz fermentasyonu

2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri morfolojik, fizyolojik ve metabolik özellikleri ile birlikte filogenetik olarak birbirine yakın olan: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinslerini içermektedir (Tablo 2.4). *Bifidobacterium* cinsi ise filogenetik olarak laktik asit bakterilerinden farklı olmasına rağmen, bazı tipik özellikleri bakımından benzer olduğundan LAB içerisinde yer almaktadır (Axelsson, 2004).

Tablo 2.4. LAB cinsleri ve özellikleri (Hutkins, 2019)

Cins	Hücre morf.	Ferm. Tipi	Büyüme (°C)		Büyüme (pH)		Laktik asit izomeri
			10	45	4,4	9,6	
<i>Lactobacillus</i>	basil	homo/hetero	±	±	±	-	D, L, DL
<i>Lactococcus</i>	kok	homo	+	-	±	-	L
<i>Leuconostoc</i>	kok	hetero	+	-	±	-	D
<i>Oenococcus</i>	kok	hetero	+	+	±	-	D
<i>Pediococcus</i>	kok	homo	±	±	+	-	D, L, DL
<i>Streptococcus</i>	kok	homo	-	+	-	-	L
<i>Tetragenococcus</i>	kok	homo	+	-	-	+	L
<i>Aerococcus</i>	kok	homo	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium</i>	basil	hetero	+	-	-	-	L
<i>Enterococcus</i>	kok	homo	+	+	+	+	L
<i>Vagococcus</i>	kok	homo	+	-	±	-	L
<i>Weissella</i>	kokoid	hetero	+	-	±	-	D, L, DL

2.3.1. *Lactobacillus* cinsi bakteriler

Lactobacillus cinsi bakteriler; Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Lactobacillales takımı ve Lactobacillaceae familyası içerisinde yer almaktadır. Düz, eğri ve zincir oluşturabilen, küçük çomak şeklinde de görülebilen, 0,5-2,0 µm çaplı, 1,5-10 µm uzunluğunda olan bakterilerdir (Hutkins, 2019). Hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz-oksidad negatif bakterilerdir (Hammes ve Hartel, 2006). Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerobik olup, %5 CO₂'li ortamda ve genellikle 5-53°C'de gelişme gösterebilirler. Asidurik veya asidofilik özellik gösterebilmekte olup, gelişimleri için optimum pH değeri 5,5-6,2 arasındadır. Patojen özellik göstermezler, aksine oluşturdukları antibakteriyel özellikteki maddeler sayesinde saprofit ve patojen bakterilerin gelişmelerini engellerler (Ray, 2014).

Lactobacillus, çok çeşitli fenotipik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklere sahip türleri içeren heterojen bir cinstir. Fermentasyon çeşitlerine göre homofermentatifler ve obligat/fakültatif heterofermentatifler olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.5.) (Idler ve ark., 2015)

Tablo 2.5. Bazı *Lactobacillus* türlerinin şeker fermentasyonu biçimleri (Wright ve Axelsson, 2019)

Homofermentatif	Fakültatif Heterofermentatif	Obligat Heterofermentatif
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus buchnerii</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>		

Karbonhidrat kullanımının metabolizması hem şekerin türüne (örn., heksozlar, pentozlar) hem de fermentasyon tipine bağlıdır. Genel olarak, fermentasyon tipleri heksozlar ve pentozların kullanımında farklılık gösterir. Heksozların fermentasyonu homofermentatif ve obligat heterofermentatif laktik asit bakterileriyle, pentozların fermentasyonu ise fakültatif heterofermentatif laktik asit bakterileriyle ilişkilendirilmektedir (Idler ve ark., 2015).

2.3.1.1. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*

Homofermentatif, 1-3 µm çapında ve tipik ipliksi form oluşturmaya eğilimli yapıdadır. Tekli veya çiftli çubuk şeklinde, beyazdan açık griye kadar pigmentsiz olup, granüllü yapısı metilen mavisi ile boyandığında görülebilir. 15-52°C arasında gelişebilirken, optimum gelişme sıcaklığı 42-43°C'dir. Gelişme ve çoğalma faktörü olarak besin gereksinimleri çok yüksektir. Bazı vitaminler (kalsiyum pantotenat, niasin, riboflavin gibi B kompleks vitaminler) ve aminoasitler bakterinin gelişimine katkıda bulunur (Hebert ve ark., 2004). Morfolojik ve birçok fizyolojik özelliği bakımından *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'a çok benzer. D (-) laktik asit üretir (Idler ve ark., 2015).

2.3.2 Laktik asit bakterilerinin diğer bazı cinslerinin genel özellikleri

- Lactococcus* cinsi bakteriler; gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Morfolojik olarak 0,5-1,5 µm çapında, kısa zincirler oluşturan kokoid yapıdadırlar. Genellikle 10-40°C arasındaki

sıcaklıklarda gelişebilmekte olup, optimum gelişme sıcaklıkları 30°C'dir. Nötre yakın pH değerlerinde iyi gelişim gösterebilmektedirler ve pH 4,5 civarında gelişimleri durmaktadır. Türler tipik olarak %4,0 (w/v) NaCl varlığında gelişebilmektedirler; sadece *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* türü %2,0 NaCl'yi tolere edebilmektedir. Laktokoklar, glikoz fermentasyonunun baskın son ürünü olarak L-laktik asit üretmektedirler. Karmaşık ve değişken beslenme gereksinimleri vardır ve tipik olarak bitkiler, hayvanlar ve bunların ürünlerinde yaşarlar (Sun ve ark., 2014).

Lactococcus cinsine ait türler: *Lactococcus lactis* (*cremoris*, *lactis*, *hordniae* ve *tructae* alt türleri dahil), *Lactococcus taiwanensis*, *Lactococcus hirilactis*, *Lactococcus fujiensis*, *Lactococcus nasutitermitis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus petauri*, *Lactococcus formosensis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus reticulitermitis*, *Lactococcus chungangensis*, *Lactococcus plantarum* ve *Lactococcus laudensis*. Genellikle süt ürünleri uygulamalarında *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *cremoris* türleri kullanılmaktadır. Bazı türler ise patojen özellik göstermektedir. Örneğin, *Lactococcus garvieae* ve *Lactococcus piscium*, tatlı su ve deniz balıklarının su ürünleri yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açan önemli patojenlerdir (Wright ve Axelsson, 2019).

- b. *Leuconostoc* cinsi bakteriler; gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, spor üretmeyen, fakültatif anaerobik bakterilerdir. Morfolojik olarak zincir ve grup şeklinde kok veya oval yapıdadırlar. Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C arasındadır. Heterofermentatif bakterilerdir. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda metabolik son ürün olarak D-laktik asidin yanı sıra asetik asit, etanol ve CO₂ meydana getirirler (Sun ve ark., 2014).

Leuconostoc türleri, genellikle süt ve süt ürünlerinde, bitkisel materyallerde ve et gibi fermente ürünlerde bulunmaktadır. Bu grup bakterilerin türleri tereyağı aromasından sorumludur, ayrıca peynir üretimi için starter kültür olarak kullanılmakta olup, diasetil üretimleri sonucu süt ürünlerine lezzet

vermektedir. Negatif etkileri olarak ise paketlenmiş, soğutulmuş et ve et ürünlerinin bozulmalarından sorumlu olmaları karşımıza çıkmaktadır (Liu ve ark., 2014).

Leuconostoc cinsine ait türler: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc palmae* ve *Leuconostoc miyukkimchii* (Sun ve ark., 2014).

- c. *Pediococcus* cinsi bakteriler; gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, hareketsiz, mikroaerofilik bakterilerdir. Morfolojik olarak 0,6-1,0 µm çapında, kok şeklinde ve tetrat oluşturan yapıdadırlar. Homofermentatif bakterilerdir. Optimum gelişme sıcaklıkları 25-40°C aralığında olup, türlere göre farklılık göstermektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebilme özelliğine sahiptirler (Sun ve ark., 2014).

Pediokoklar, glikozu L-laktik aside dönüştüren *Pediococcus claussenii* türü dışında DL-laktik asit üretirler. Fruktoz ve selobiyoz tüm türler tarafından, galaktoz ve maltoz ise çoğu tür tarafından fermente edilebilmektedir (Wright ve Axelsson, 2019).

Bu gruptaki bakteriler yeşil sebze fermentasyonunda, peynir ve sucuk üretiminde ise starter kültür olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hububatların fermentasyonunda da kullanılmaktadırlar. Bakteriyosin üreterek et ürünlerindeki bozulmaya engel olabilmektedirler (König ve Fröhlich, 2017).

Pediococcus cinsine ait türler: *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus claussenii*, *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus stilesii*, *Pediococcus ethanolidurans*, *Pediococcus siamensis*, *Pediococcus argentinicus* ve *Pediococcus lolii* (Sun ve ark., 2014).

- d. *Weissella* cinsi bakteriler; gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmayan, fakültatif anaerobik bakterilerdir. Morfolojik olarak çubuk veya kokoid yapıdadırlar. Heterofermentatif bakterilerdir. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda metabolik son ürün olarak D- veya DL-laktik asidin yanı sıra asetik asit, etanol ve CO₂ meydana getirirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 15°C olup, bazı türler 42-45°C arasındaki sıcaklıklarda gelişim gösterebilmektedirler (Fusco ve ark., 2015). *Weissella* türlerinin habitatları değişkendir ve en yaygın olarak fermente gıdalarda bulunmaktadır. Bazı türleri şeker kamışı, çiğ süt, fermente et ve balık ürünlerinde bulunmaktadır (Wright ve Axelsson, 2019).

Weissella cinsine ait türler: *Weissella beninensis*, *Weissella ceti*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Weissella diestrammenae*, *Weissella fabalis*, *Weissella fabaria*, *Weissella ghanensis*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella koreensis*, *Weissella minor*, *Weissella oryzae*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella soli*, *Weissella thailandensis*, *Weissella uvarum* ve *Weissella viridescen* (Kamboj ve ark., 2015).

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik Ürünleri

Laktik asit bakterileri laktik fermentasyonlar sonucu organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler veya bakterisidal proteinler gibi çeşitli bileşikler üretirler. Bu metabolik ürünler gıdanın tadı, kokusu, rengi ve dokusu üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir, ayrıca gıdaların raf ömrünü uzatmak ve patojenik organizmaların büyümesini engellemek gibi etkilere de sahiptirler (O'Bryan ve ark., 2015).

2.4.1. Organik asitler

Organik asitlerin, fermentasyon süresince birçok üründen farklı mikroorganizmalar tarafından önemli miktarlarda üretildiği eski tarihlerden beri bilinmektedir. Bu asitlerin, gıdanın pH'ını düşürerek istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini

engelleyici etkileri sayesinde fermente gıdalarda raf ömrü uzatılabilmektedir (Çelikyurt ve Arıcı, 2008).

Laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve benzoik asit laktik asit bakterileri tarafından üretilen organik asitlerdendir (O'Bryan ve ark., 2015). Organik asitlerin inhibisyon mekanizması dissosiyasyon olmamış yapıları ve pH'ı düşürme özellikleri ile ilgilidir. Çözünmemiş formdaki lipofilik asitler, hücre zarından difüze olarak hücre içerisinde ayrılmaktadır. Serbest kalan H⁺ iyonları sayesinde sitoplazmanın asitliği artmaktadır. Hücre içinde çözünmeleri ve sitoplazmadaki pH düşüşü sonucu duyarlı organizmalarda hücre ölümü meydana gelmektedir (Dalie ve ark., 2010; Akpınar ve Kılıç, 2012).

Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından asetik asit yüksek oranda, propiyonik asit ise eser miktarda üretilmektedir. Bu asitlerin antimikrobiyal açıdan laktik asitten daha etkili olmaları, asitlik sabitlerinin laktik asitten daha yüksek (laktik asit 3,8, asetik asit 4,8, propiyonik asit 4,9) olmasından kaynaklanmaktadır. Asetik asit ve propiyonik asit, laktik asit ile sinerjik olarak etki oluşturmaktadır. Laktik asidin ortamın pH'ını düşürmesi, asetik asidin ve propiyonik asidin toksisitelerinin artmasını sağlamaktadır (Akpınar ve Kılıç, 2012; Ray, 2014).

Asetik asit (CH₃-COOH), heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından karbonhidrat metabolizması sonucu açığa çıkan metabolik bir üründür. Birçok gıdada bakterilerin, küf ve mayaların gelişimini engellemek veya yaşayabilirliklerini azaltmak amaçlı kullanılmaktadır. Genel olarak %0,2 oranında kullanımı bakteriyostatik etkiye sahipken, %0,3 oranında kullanımı bakterisidal etki göstermektedir. Bakteriler üzerindeki etkisi pH'a bağlı olmakla beraber bakterisidal etkisi düşük pH'larda etkili olmaktadır (Reis ve ark., 2012). Et ürünlerinde kontaminasyonu önlemek, düşük pH'lı içeceklerde ve gıdalarda mayalar tarafından bozulmayı önlemek gibi birçok işlem için kullanılmaktadır (Theron ve Lues, 2011). Asetik asit ve tuzları özellikle salamura ürünlerde, salata soslarında, mayonez ve ketçapta antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır (Çelikyurt ve Arıcı, 2008).

Propiyonik asit ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$), heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından karbonhidrat metabolizması sonucu asetat ve CO_2 ile birlikte az miktarda açığa çıkan metabolik bir üründür. Propiyonik asit ve tuzları gıdalarda fungistatik ajan olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin büyümelerini kontrol etmede ve yaşayabilirliklerini azaltmada etkilidir. Propiyonik asit; fırıncılık ürünlerinde ve bazı süt ürünlerinde (peynir ve tereyağı) küflerin kontrolü için kullanılırken, bazı taze meyvelerde ve meyve sularında bakteri ve mayaların gelişmesini engellemek için kullanılmaktadır (Reis ve ark., 2012). Ayrıca antimikrobiyal özelliğinden dolayı gıdalarda yenabilir kaplama veya film olarak kullanılmaktadır (Theron ve Lues, 2011).

Benzoik Asit ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-COOH}$), gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan koruyucudur. Özellikle antifungal ajan olarak kullanılmaktadır (Reis ve ark., 2012). Bazı laktik asit bakterileri sütte doğal olarak bulunan bazı asitleri benzoik aside dönüştürebildiğinden, süt ürünleri doğal olarak benzoik asit içerebilir. Süt fermentasyonu için kullanılan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus* türleri, benzoik asit üretebilen laktik asit bakterilerindendir (Garmiene ve ark., 2010).

2.4.2. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, mikroorganizmalar tarafından ribozomal olarak sentezlenmiş, düşük molekül ağırlıklı, antimikrobiyal peptitler olarak tanımlanmaktadır (Mozzi ve ark., 2016). Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yanı sıra bazı arkeler de dahil olmak üzere, laktik asit bakterileri, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalar çeşitli bakteriyosinler üretebilmektedir. Bunlar arasında, laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler toksik değildir ve gıda işleme, tarımsal üretim ve biyotıp alanlarında uygulama potansiyeline sahiptirler (Zhang, 2019).

Laktik asit bakterilerinden özellikle *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinsleri tarafından bakteriyosinlerin üretimi oldukça yaygındır. Ancak bu cinsler içinde bulunan türler

arasında da bakteriyosin üretim sıklığı birbirinden farklılık gösterebilmektedir. Örnek olarak, *Lactococcus lactis* türünün 45 alt türünden 35'inin, *Lactobacillus acidophilus* türünün ise 52 alt türünden 33'ünün bakteriyosin ürettiği bilinirken, diğer türlerde yalnız birkaç suşun bakteriyosin ürettiği bilinmektedir (Çon ve Gökalp, 2000). Bakteriyosin sentezleyen bazı laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriyosin çeşitleri ve etki spektrumları Tablo 2.6.'da belirtilmektedir.

Tablo 2.6. Bakteriyosin üreten bazı laktik asit bakterileri, ürettikleri bakteriyosin çeşitleri ve etki spektrumları (Çon ve Gökalp, 2000)

Bakteriyosin üreten bakteri	Üretilen bakteriyosin	Etki spektrumu
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Laktosin B	Laktobasiller
	Laktosin F	Laktobasiller ve Enterokoklar
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helvetisin J	Laktobasiller
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Laktosin B	Laktik asit bakterileri, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> sporları
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakasin A	Laktobasiller, Leukonostoklar, Enterokoklar ve <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram Pozitif Bakteriler
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Nisin	Gram Pozitif Bakteriler
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	D Laktostrepsins	Laktokoklar, Streptokoklar ve Laktobasiller
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediosin AcH	Laktobasiller, Pediokoklar, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> ve <i>Clostridium botulinum</i> sporları

Özellikle, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin bakteriyosini, ticarileştirilmiş olup, süt, et ve konserve gıdalarda doğal bir gıda koruyucusu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Juturu ve Wu, 2018; Zhang, 2019). Gıda koruyucusu olarak kullanımlarının temel nedenleri arasında; GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen)

statüsünde yer almaları, ökaryotik hücrelere karşı aktif ya da toksik olmamaları, gıda kaynaklı patojen ve çürükçül mikroorganizmalara karşı nispeten geniş spektrumda (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria* spp., *Enterococcus* spp.) antimikrobiyal etki göstermeleri bulunmaktadır (Reis ve ark., 2012; Mozzi ve ark., 2016).

Bakteriyosinlerin gıda endüstrisinde kullanımı, kimyasal koruyucuların kullanımlarının azaltılabilmesinin yanı sıra ısıtma işlem yoğunluğunun ve diğer geleneksel işlemlerin azaltılmasına da olanak sağlayarak, duyuşsal özellikleri ve besinsel değerleri daha iyi ve korunaklı ürünler elde edilmesine yardımcı olmaktadır (Reis ve ark., 2012).

2.4.3. Diğer metabolik ürünler

- a. Hidrojen peroksit (H_2O_2): Flavoprotein oksidaz enziminin varlığı sonucu aerobik koşullarda laktik asit bakterileri tarafından sentezlenmektedir. H_2O_2 'nin antimikrobiyal etkisi, enzimlerin denatüre olmasından ve membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olan sülfidril gruplarının oksidasyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca H_2O_2 , mikrobiyal DNA'ya zarar verebilen hidroksil radikalleri gibi sitotoksik oksijen türleri meydana getirmesinden dolayı güçlü bir oksitleyici ajandır (O'Bryan ve ark., 2015).

Laktik asit bakterilerinden özellikle *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türleri aerobik şartlar altında önemli miktarlarda H_2O_2 üretmektedir. Bakterilerin, küflerin ve mayaların hem vejetatif hem de spor formları üzerinde güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bazı gıdalarda özellikle süt ürünlerinde koruyucu olarak, bazı meyve ve sebzelerin sterilizasyonunda, gıda ambalajlarında ise dezenfeksiyon maddesi olarak kullanılmaktadır (Sağdıç ve ark., 2015). İnhibitör etkisinin yanı sıra fermente et ürünlerinde nihai ürünün acılaşmasını ve renginin solmasını arttırdığı için duyuşsal özellikleri etkilemektedir (Reis ve ark., 2012).

- b. Dasetil: Laktik asit bakterilerinden *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin bazı türleri tarafından sitrat fermentasyonu sırasında üretilmektedir. Diğer metabolitlerle sinerjik etki oluşturarak düşük pH değerlerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Dasetil, gram pozitif bakteriler üzerinde bakteristatik aktivite gösterirken, gram negatif bakteriler üzerinde bakterisidal etki göstermektedir. Gıda endüstrisinde içecekler, fırıncılık ürünleri, şekerlemeler ve diğer bazı ürünlerde lezzet artırıcı, ayrıca fermente süt ürünlerinde önemli bir tat ve aroma bileşeni olarak kullanılmaktadır (Sağdıç ve ark., 2015).
- c. Karbondioksit (CO₂): Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından heksozların fermentasyonu sonucunda laktik asit, asetik asit ve etanol gibi maddelerin yanı sıra karbondioksit de üretilmektedir. CO₂'nin enzimatik dekarboksilasyon ile inhibe edici anaerobik ortam oluşturarak ve membran lipid tabakasında birikip zar geçirgenliğini bozarak antimikrobiyal etki sağladığı düşünülmektedir. İnhibisyon derecesi mikroorganizmalar arasında çeşitlilik göstermektedir. Ortamda %10 oranında CO₂ bulunması toplam bakteri yükünü azaltabilirken, %20-50 oranında bulunması ise güçlü bir antifungal etki sağlayabilir. Fakültatif anaerobik mikroorganizmaların gelişmesi ise karbondioksitin varlığı ile değişmemektedir (Akpınar ve Kılıç, 2012).
- d. Etanol (Etil alkol): Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından şeker fermentasyonu sonucu üretilen metabolik bir üründür. Bakteriyel sporlar üzerinde etkili olmamakla birlikte, patojenik bakterilerin vejetatif hücreleri üzerinde bakterisidal etki gösterir. Etanolün mikroorganizmalar üzerindeki inhibe edici etkisi moleküler ağırlığına, konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlıdır (Sağdıç ve ark., 2015). En etkili etil alkol konsantrasyonunun %70 olduğu, uzun süreli dezenfeksiyon için %50'lik konsantrasyonun en uygun olduğu, %75'ten fazla konsantrasyonda ise etkisinin azaldığı belirtilmektedir (Çon ve Gökalp, 2000).

Etanolün antimikrobiyal aktivitesi, hücrede bulunan proteinlerin denatürasyonundan ve aynı zamanda sitoplazmik zarın lipid yapısına zarar vererek zarın işlevselliğinin kaybolmasından kaynaklanmaktadır. Etanol, zayıf difüzyonu ve organik asitler tarafından inaktivasyonu nedeniyle gıda koruyucu maddesi olarak tavsiye edilmemekle birlikte, bazı antimikrobiyal bileşiklerin etkinliğini arttırmaktadır (Sağdıç ve ark., 2015).

- e. Yağ Asitleri: Bazı *Lactococcus* ve *Lactobacillus* türleri, lipolitik aktivitelerinin bir sonucu olarak önemli miktarda yağ asidi üretebilmektedirler. Yağ asitleri zincir uzunluklarına, konsantrasyonuna ve ortamın pH değerine bağlı olarak antifungal aktivite göstermektedirler (Sağdıç ve ark., 2015).

Yağ asitleri etkinliğinin genel mekanizması, hücre zarının yapısını bozarak zar geçirgenliğinin artması ve hücre içi elektrolitlerin ve proteinlerin fungus hücrelerinden kurtarılması olarak açıklanabilir. Ekşi hamurdan izole edilmiş bir *Lactobacillus* türünün *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. ve *Monilia* sp. türlerinin büyümesini inhibe ederek bütirik, kaproik, propiyonik ve valerik asitlerini ürettiği bildirilmektedir. Bu yağ asitlerinin arasında, kaproik asit, diğer asitlerle birlikte sinerjik hareket eden ana antifungal bileşiktir (Albayrak, 2017).

- f. Ekzopolisakkaritler (EPS): Kapsül şeklinde bakteriyel hücre yüzeyinde bulunan veya yapışkan bir şekilde hücre dışı ortama salgılanan hücre dışı polimerik yapılardır. EPS'ler genel olarak şeker ve şeker türevlerinin monosakkarik kalıntılarından oluşmaktadır ve bitkiler, algler, fungi ve bakteriler tarafından üretilmektedir (Dilna ve ark., 2015; Ai ve ark., 2015). Ekzopolisakkarit üretebilen bazı laktik asit bakterileri Tablo 2.7.'de belirtilmektedir.

Tablo 2.7. Ekzopolisakkarit üretebilen bazı laktik asit bakterileri (Milci ve Yaygın, 2005)

Laktik asit bakterileri			
<i>Lactobacillus</i> Cinsi	<i>Streptococcus</i> Cinsi	<i>Lactococcus</i> Cinsi	<i>Leuconostoc</i> Cinsi
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>		

Ekzopolisakkaritler ıda endüstrisinde emülgatör, sabitleyici, kıvamlaştırıcı, jelleştirici ve su bağlayıcı madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tıpta kan akışını iyileştirici bir ajan olarak, doku kültürlerinde mikro taşıyıcı olarak ve immobilizasyon matrisi olarak da kullanılabilirler. EPS'lerin bileşimi, yapısı ve moleküler ağırlığı gibi yapısal özellikleri biyolojik işlevlerini desteklemektedir (Yıldız ve Karataş, 2018).

Dekstran, alternan, reuteran, levan ve kefiran dahil olmak üzere laktik asit bakterilerinden çok çeşitli ekzopolisakkaritler üretilmektedir (Zafar ve ark., 2018). LAB tarafından üretilen ve GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde yer alan EPS'ler başta süt endüstrisinde olmak üzere, et ve sebze gibi çiğ gıda ürünlerinin fermentasyonunda uygulanmaktadır (Soyuçok ve ark., 2016).

2.5. Laktik Asit Bakterilerinden Sentezlenen Laktik Asit

Laktik asit, fermentasyon metoduyla veya kimyasal sentezle üretilir. Daha saf laktik asit üretimi, geri kazanılabilir ve düşük maliyetli hammadde kullanımı, daha az enerji tüketimi ve daha kolay operasyon şartları gibi avantajlardan dolayı, endüstriyel fermentasyon prosesi daha cazip üretim metodu olarak önem kazanmıştır (Komesu ve ark., 2017).

Günümüzde laktik asit üretiminde hammadde olarak; şeker kamışı/şeker pancarı posası-melası, kahve kabuk-posası, meyve atıkları, buğday-pirinç-arpa kepeği gibi daha çok tarımsal ve/veya işlenmiş tarımsal atık ürünleri (Danner ve ark., 2000; John ve ark., 2007; Ghaffar ve ark., 2014) kullanıldığı gibi, lignoselulozik atıklar (Zhang ve ark., 2014), nişastalı atıklar (Kanpiengjai ve ark., 2014) ve biyoetanol üretim atıkları (Moon ve ark., 2014) da kullanılmaktadır.

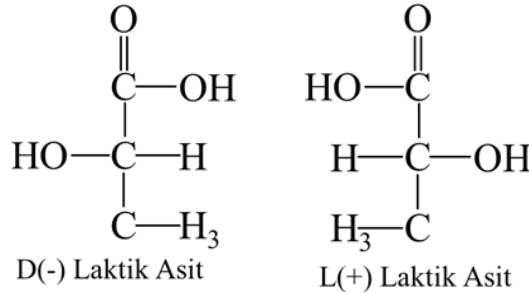
Laktik asit ve türevleri, çeşitli endüstrilerde farklı uygulamalar için kullanılmaktadır (Tablo 2.8.). Emülgatör ve yüzey aktif ajan olarak laktik asit esterlerinin kullanımı oldukça yaygındır. Laktik asidin mono ve di gliserid esterleri güçlü emülgatörlerdir (Ameen ve Caruso, 2017).

Tablo 2.8. Laktik asit uygulama alanları (Bhalla ve ark., 2007)

Endüstri	Uygulamalar
Gıda	Koruyucu, asitleştirici, tamponlama maddesi, hamur yumuşatıcı
Tıp	Ortopedik implantlar, kontrollü ilaç salınımı, diyaliz çözeltileri (sodyum laktat)
Eczacılık	Merhemler, losyonlar, sivilce karşıtı çözeltiler, nemlendiriciler (sodyum laktat ve amonyum laktat), çürük önleyici madde (kalsiyum laktat) ve dikişler için biyolojik olarak parçalanabilir polimerler
Tekstil	Boyamada sabitleyici (antimon laktat)
Metal	Plastikleştirici ve korozyon önleyici, lehim temizleyici
Deri	Asitleştirici
Kimya	Etil / bütül laktat

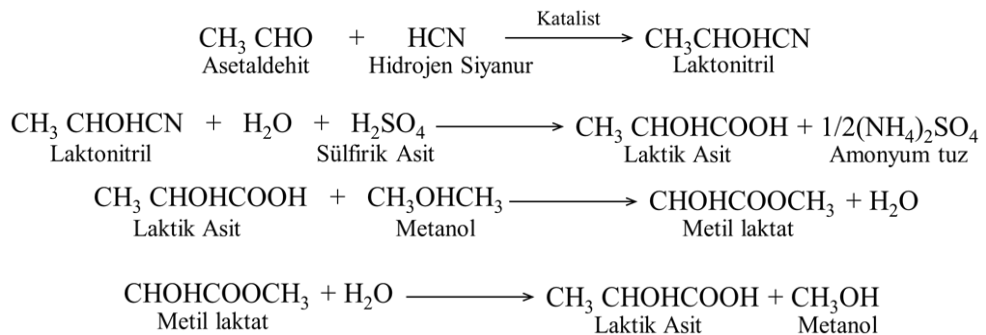
Genel olarak, birçok fermente üründe bulunan ve ilk olarak 1780’de İsveç bilim insanı Wilhelm Scheele tarafından ekşi sütte bulunmasıyla keşfedilen laktik asit, renksiz veya sarımsı renkte, sıvı (15°C’de 1 atm) ve kokusuzdur. Su, alkol ve eterde çözünür fakat kloroformda çözünmez. Hidroksil ve karboksil gruplarından dolayı %20 ve daha yüksek orandaki çözeltilerinde dimer (laktit) oluşturur. 2-hidroksipropiyonik asit olarak adlandırılan laktik asidin molekül ağırlığı 90,08 mol/g, kaynama noktası 122°C ve erime noktası 17°C’dir. Kapalı kimyasal formülü $C_3H_6O_3$ olan laktik asit, D(-) ve

L(+) olmak üzere iki farklı optik-aktif izomerik formu vardır (Şekil 2.2.) (Masutani ve Kimura, 2015).



Şekil 2.2. Laktik asit izomerleri (Masutani ve Kimura, 2015)

Her iki izomer formunun fiziksel ve kimyasal özellikleri aynı olup, sadece optik olarak aktif olan diğer moleküllerle birleştiğinde farklılık gösterir. L(+) laktik asit, D(-) laktik asite nazaran canlı hücrelerde daha fazla bulunur. Her iki formun karışım halinde bulunduğu rasemik çözeltiler de bulunmaktadır. L(+) ve D(-) laktik asit formları daha çok fermentasyon prosesi ile üretilirken, rasemik çözeltiler sadece laktik asidin kimyasal metotla sentezlenmesi sonucu elde edilir (Miller ve ark., 2011; Taskila ve Ojamo, 2013). Ticari olarak, kimyasal metotla üretilen laktik asit, laktonitrilden elde edilmektedir. Kimyasal sentezde ilk önce, hidrojen siyanür atmosferik basınçta asetaldehit ile reaksiyona girerek laktonitril oluşturulur. Elde edilen laktonitril distilasyon metodu ile saflaştırıldıktan sonra, sülfirik veya hidroklorik asitle hidroliz edilerek laktik asit ve amonyum tuzu oluşturulur. Daha sonra laktik asit metanol ile esterifiye edilerek metil laktat elde edilir. Metil laktat asit katalizörlüğünde su ile hidroliz edilerek metanol ve laktik asit oluşturulduktan sonra, distilasyonla laktik asit saflaştırılır (Şekil 2.3.) (Ghaffar ve ark., 2014).



Şekil 2.3. Laktik asidin kimyasal sentezi (Ghaffar ve ark., 2014)

Bazı özel endüstriyel uygulamalarda, laktik asidin saf izomer formları, rasemik karışımlarından daha değerlidir. Örneğin, polilaktik asit (PLA) sentezinde, L(+) veya D(-) laktik asit kullanılmaktadır (Komesu ve ark., 2017).

Polilaktik asit; şeker kamışı, mısır gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilen biyoçözünür, termoplastik bir polimerdir. Kolay işlenebilirliği, biyouyumluluğu ve biyoçözünürlüğü ile birçok avantaj sağlayan ve gittikçe genişleyen kullanım alanları kazanan bir malzemedir. Ancak L, D ve DL izomerlerinin oluşturduğu polimer yapısı doğrudan polimerin fiziksel ve mekanik özellikleri ile biyobozunurluk hız oranını etkilemektedir. Daha çok L izomerik formu kullanılarak üretilen PLA, 170-183°C sıcaklığa kadar erimeye dayanabilmekte ve rasemik formdan elde edilen PLA'dan (1,24 g/cm³) daha yüksek (1,25-1,29 g/cm³) yoğunluğa sahiptir. Gerilme kuvveti ve sertliği polietilen tereftalat ile, işlenebilirliği ise polisitiren ile benzer karakteristikler göstermesine rağmen darbe mukavemeti ve dayanım limitleri daha zayıf kalmaktadır (Karande ve ark., 2015).

BÖLÜM 3. NIŞASTA ENDÜSTRİSİ ISLAK ÖĞÜTME PROSESİ

3.1. Islak Öğütme Prosesi Genel Özellikleri

Biyolojik olarak doğada bol miktarda bulunan makromoleküllerden biri polisakkaritlerdir. Bitkilerin temel yapısını oluşturan ve kompleks bir karbonhidrat olan polisakkaritlerin temel kimyasal yapısını glikozidik bağlar oluşturur. Homopolisakkaritler ve Heteropolisakkaritler olmak üzere iki ana gruba ayrılan polisakkaritlerin en çok bilinenlerinden bazıları; selüloz, nişasta, pektin ve kitin'dir (Averous ve Pollet, 2012).

Bitkilerin enerji kaynağını oluşturan nişasta, bitkinin köklerinde ve tohumlarında bulunur. En fazla tahıllardan elde edilen nişastanın endüstriyel kaynağı buğday ve mısırdır. Tarihi milattan önce 7000'li yıllar ve öncesine kadar dayanan ve mısırın atası olarak kabul edilen teosinte bitkisinin melezleştirilmesiyle günümüz mısır çeşitlerine ulaşıldığı düşünülmektedir. Nişastanın ise ilk defa Mısır Krallığı öncesi dönemde papirüs yapraklarının sağlamlaştırılması için buğdaydan elde edildiği ve yapıştırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Schwartz ve Whistler, 2009).

Tarımsal açıdan, kolay yetiştirilebilmesi, değişik iklimlere uyum sağlayabilmesi, kolay hasat yapılabilmesi, depolanabilmesi ve nakliyesi, özellikle yüksek miktarda nişasta içermesi gibi nedenlerden dolayı endüstriyel olarak mısırdan nişasta elde edilmesini, dolayısıyla mısırın ön plana çıkmasını sağlamıştır. Endüstriyel nişasta üretiminin ortalama %85 ve daha fazlasının mısırdan sağlandığı tahmin edilmektedir (Eckhoff ve Watson, 2009). Mısırın bileşenlerinin ortalama değerleri Tablo 3.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Mısır bileşenleri (Eckhoff ve Watson, 2009)

Bileşen	Aralık	Ortalama
Nem (% ıslak bazda)	7-23	16,70
Niştasta (% kuru bazda)	64-78	71,30
Protein (% kuru bazda)	8-14	9,91
Yağ (% kuru bazda)	3,1-5,7	4,45
Kül (oksit, % kuru bazda)	1,1-3,9	1,42
Pentoglikanlar (ksiloz olarak, % kuru bazda)	5,8-6,6	6,20
Ham Lif (% kuru bazda)	1,8-3,5	2,66
Lif (*NDR, % kuru bazda)	8,3-11,9	9,50
Selüloz+lignin (*ADR, % kuru bazda)	3,3-4,3	3,30
Toplam şeker (glikoz olarak, % kuru bazda)	1-3	2,58
Karotenoidler (mg/kg)	5-40	30

*ADR: Asit deterjan kalıntısı; NDR: Nötral deterjan kalıntısı

19. yüzyılın başlarından beri geliştirilen ve uygulanan yöntemlerden, mısırın kuru olarak işlenmesi (dry-milling), sulu ortamda işlenerek (wet-milling) niştastanın eldesi ve bu iki yöntemin kombinasyonu şeklinde uygulanan prosesler mevcuttur. Bu prosesler içinde en fazla kabul gören proses, ıslak öğütme prosesidir. Günümüzde de endüstriyel olarak uygulanan proses, büyük oranda ıslak öğütme prosesidir (Rausch, 2012). Son 75 yıl içerisinde gerek verimlilik gerekse kalite bakımından bu prosesin, mühendislik, makine ve otomasyon temeline dayandırılarak gelişmesi sağlanmıştır (Eckhoff ve Watson, 2009).

Niştasta endüstrisinde ıslak öğütme (wet-milling) prosesi, mısır ana bileşenlerinin (niştasta, öz, kepek ve protein yani gluten) birbirinden ayrıştırılarak ayrı ayrı ürünler elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 3.1.). Bu proses ile oldukça yüksek derecede saflaştırılmış akışta niştasta ayrıştırılır ve geri kazandırılır. Bu yöntemle elde edilen niştastanın safiyeti %99,5'i geçmektedir (Rausch ve Belyea, 2006).



Mısır

Mısır Özü

Mısır Kepeği

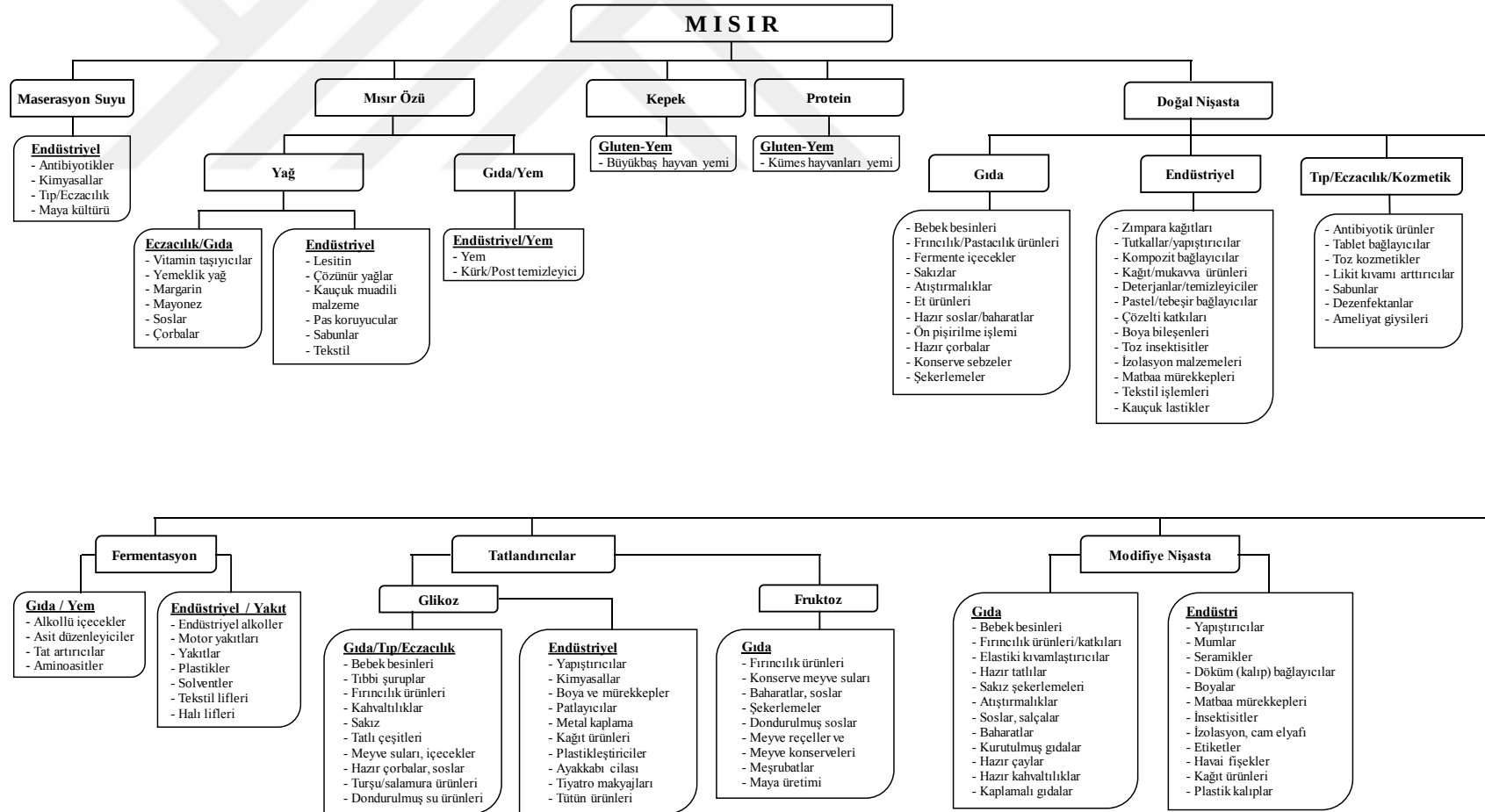
Mısır Gluteni

Şekil 3.1. Mısır ve yan ürünleri

Islak öğütme prosesi ile mısırdan elde edilen ortalama ürün verimleri (kuru madde bazında) Tablo 3.2.'de belirtilmiştir. Elde edilen mısır özü, mısır kepeği ve mısır gluteni nişasta yan ürünleri olarak isimlendirilmektedir. Mısır özü, mısır özü yağının ana hammaddesi; mısır kepeği, büyükbaş ve küçükbaş hayvanlar için yem hammaddesi; mısır gluteni ise özellikle kanatlı hayvanlar ve balıklar için yem hammaddesi olarak oldukça değer taşımaktadır (Rausch, 2012). Nişasta endüstrisinde mısırdan üretilen nişasta çeşitlerinin, glikoz-fruktoz şuruplarının ve yan ürünlerin (mısır özü, mısır kepeği, mısır gluteni, maserasyon suyu) farklı endüstrilerdeki kullanım alanları Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

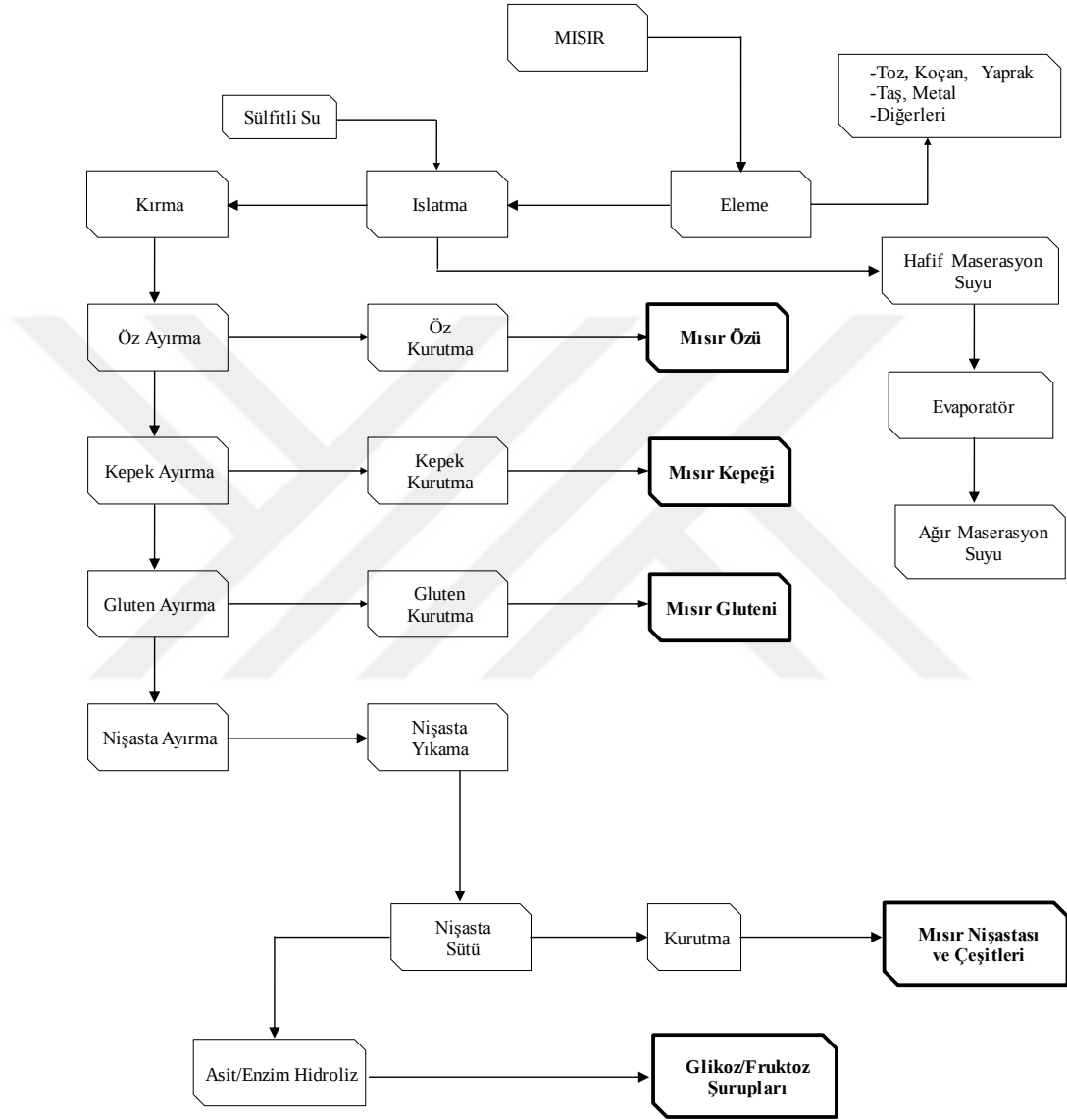
Tablo 3.2. Islak öğütme prosesi ile mısırdan elde edilen ortalama ürün verimleri (kuru madde bazında) (Singh ve ark., 2010; Ramírez ve ark., 2009)

Mısır Bileşenleri	%
Öz	8,0
Kepek	18,5
Nişasta	67,1
Gluten	6,4



Şekil 3.2. Mısırdan üretilen ürünlerin kullanım alanları (Rausch ve ark., 2019)

Islak öğütmede mısırın bileşenlerine ayrılmasını sağlamak için uygulanan işlemler: mısır eleme, ıslatma (steeping), kırma (öğütme) ve ayırma (öz ayırma, kepek ayırma, gluten ayırma ve nişasta ayırma/yıkama) (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Nişasta endüstrisi ıslak öğütme prosesi

3.2. Islak Öğütme Proses Aşamaları

3.2.1 Eleme

Dane halinde dökme olarak tesise gelen mısır (Şekil 3.4.), büyük kantarlarda tartıldıktan sonra mısır haznesine boşaltılır ve buradan hava akımı altında çalışan üç kademeli elek sistemine alınarak eleme işleminden geçirilir. İlk kademe olan elek, nispeten geniş çaplı gözenek yapısındadır. Bu kademedede, daha çok mısır içerisinde bulunan büyük hacimli koçan, yaprak, taş, metal gibi sonraki proses kademelerinde ekipmanlara zarar verebilecek parçalar ayrılır. İkinci kademedede temiz dane mısır ayrılarak depolanacakları silolara gönderilir. Son kademedede ise gerek hasat gerekse nakliye gibi manipülasyonlar sonucu oluşan kırık mısır ve kırma işlemine elverişli olmayan küçük daneli mısırlar ayrılarak farklı bir siloya gönderilir. Bütün bu işlemler esnasında, eleme sistemi içerisindeki hava akımı vasıtasıyla mısır içerisinde bulunan bütün tozlar filtre sistemi vasıtasıyla toz toplama tankına alınarak tozlardan da arındırılmış olur. Ayrılan kırık mısırlar, doğrudan yem endüstrisine gönderilirken; ince mısır kabuklarından oluşan tozlar toplanır ve mısır kepeği içerisine karıştırılarak değerlendirilir.

Kırık ve hasarlı mısırlar, sonraki proses aşamalarında, su absorblama oranları kapasitesine bağlı olarak ıslatma işlemi sürelerine olumsuz etkileri, proses pH stabilite dengelerini ve ıslatma işlemi sırasında proses kuru madde dengelerini bozmasından ve erken çözünmesinden dolayı hat tıkanmalarına neden olduğundan proseste istenmezler (Rausch ve ark., 2019).



Şekil 3.4. Dane mısır

3.2.2. Islatma

Islatma işlemi (steeping); mısırın, değirmenlerde kırılmaya alınmadan önce, optimum düzeyde parçalanması ve bileşenlerinin optimum verimde ayrılmasını sağlamak amacıyla yapılan ıslatma işlemidir ve proses verimini doğrudan etkilediğinden oldukça kritik öneme sahiptir. Islatma, mısırın 45-55°C’de %0,1-0,2 kükürtdioksit (SO_2) ihtiva eden su içerisinde ortalama 30 ile 48 saat bekletilmesi işlemidir. Bu süre içerisinde mısır, bünyesine suyu alarak ortalama %40-50 nem seviyesine ulaşır. Aynı zamanda, mısır içerisinde bulunan çözünür maddelerin, ıslatma suyu içerisinde geçmesi sağlanmış olur. İşlem sonunda mısır daneleri, parmaklar arasına alınıp sıkıldığında, yeteri oranda ezilecek kadar yumuşak duruma gelmiş olur. Böylece, mısır kırılırken içindeki öz, hasar görmeden kolaylıkla dane içerisinden çıkar, sonrasında ise iç kabuk kısmına kısmen bağlı olan nişasta, kabuktan ve diğer bileşenlerden ayrılır.

Islatma işleminin ilk safhasında, laktik asit bakterilerinin fermentasyon süreci başlamaktadır. Laktik asit bakterileri, ıslatma suyu içerisinde %2 konsantrasyona kadar laktik asit üretebilirler. Üretilen laktik asit ortam pH'ını düşürdüğünden diğer organizmaların büyümesini de sınırlamaktadır. Bu sürecin uzunluğu ıslatma suyu içerisinde bulunan SO₂ konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek SO₂ konsantrasyonlarında laktik asit bakterilerinin faaliyeti duracağından asit üretimi gerçekleşemez. Laktik asit, hidroliz etkisiyle mısır dış kabuğunun zayıflamasına ve kırılmasına neden olduğundan SO₂'nin mısır danesi içerisine daha iyi nüfuz ederek mısır bileşenlerinin daha iyi ayrılmasına büyük bir katkı sağlamaktadır. Bu nedenle SO₂ konsantrasyonu ıslatma prosesi için önemlidir (Eckhoff ve Watson, 2009).

SO₂'nin, dış kabuğun gevşetilmesine ve proteolitik enzimler üzerine etki ederek, protein bağlarının zayıflatılmasıyla ıslatma süresinin kısaltılmasına katkı sağladığı bilinmektedir (Serna-Saldivar, 2010; Rausch, 2012).

Islatma işlemi sonunda, mısırdaki albüminler ve globülinler ile laktik asit, fitik asit, mineraller ve B-vitaminleri ıslatma suyuna geçmekte ve ıslatma suyunun doygunluğa erişmesinden dolayı daha fazla difüzyon gerçekleşmemektedir. Bu durumda, ıslatma suyuna taze su ilave edilir. Doygunlaşan su, Hafif Maserasyon Suyu (LSW-Light Steep Water) olarak adlandırılır. Hafif maserasyon suyunun, evaporatörlerde bir miktar suyu uçurulup konsantre hale getirilir. Konsantre edilmiş hafif maserasyon suyu, Ağır Maserasyon Suyu (HSW-Heavy Steep Water) olarak adlandırılır ve kuru maddesi %38-45 arası ayarlanır. Kuru madde, büyük bir oranda protein ihtiva ettiğinden; ağır maserasyon suyu, yem endüstrisi için değerli bir ürün olup, fermentasyon besiyerlerinde azot kaynağı olarak da kullanılabilir (Rausch ve ark., 2003; Li, Xu ve ark., 2016). Maserasyon suyu bileşenleri Tablo 3.3.'te belirtilmiştir.

Tablo 3.3. Maserasyon suyu bileşenleri (Lawford ve Rousseau, 1997)

Bileşenler	%
Kuru madde	46,04
Protein	50,22
Yağ	0,35
Kül	19,48
*NDF	0,23
Kalsiyum	0,11
Fosfor	3,21
Sodyum	0,19
Magnezyum	1,21
Potasyum	3,84

*NDF: Nötral deterjan selülozu (lif)

3.2.3. Kırma (Öğütme)

Islatma işlemi sonrası mısır, stator ve rotor şeklinde iki adet dişli disk plakadan oluşan değirmenlere alınır. Değirmen dönüş hızı dakikada 1800 devire kadar çıkabilir. Plaka aralığı hassas bir şekilde ayarlanan değirmende, danelerin kırılma-ezilme arası bir baskı ile, mısır özüne hasar vermeyecek şekilde, içerisinden özün çıkması sağlanır.

Öz hasar gördüğü takdirde, içerisindeki yağ dışarıya sızdığı için, hem mısır özü yağı üretiminde verim kaybına neden olmakta hem de proses içerisine sızan yağ sonraki proses aşamalarında ayırma etkinliğini azalttığından, nişastada kalite ve verim kayıplarına sebebiyet vermektedir (Eckhoff ve Watson, 2009).

3.2.4. Ayırma

Islak öğütme prosesi fiziksel ayırma işlemlerinden oluşmaktadır. Bileşenlerin sahip olduğu özgül ağırlık farklılıkları, ayırma işlemlerinin temelini oluşturmaktadır.

3.2.4.1. Öz ayırma

Yağ içeriğinden dolayı, mısır özü en hafif özgül ağırlığa sahiptir ve bundan dolayı ilk önce mısır özü diğer bileşenlerden ayrılır (Şekil 3.5.). Ayırma işlemi için, siklon sistemi kullanılmaktadır. Tesis kapasitesine göre, belirli sayıda siklon paralel olarak kullanılabilir. Ürün, mısır özünün ayrışmasını sağlayacak ve yeterli miktarda merkez kaç kuvvetini oluşturacak kadar bir basınç altında siklona beslenir. Diğer bileşenlerden daha hafif özgül ağırlığa sahip olan mısır özü, siklonun üst kısmından, diğer bileşenler ise alt kısmından çıkarak ayrılır. Alt kısımdan çıkanlar kepek ayırma prosesine giderken; üst kısımdan çıkan öz ise daha verimli bir ayırma için yıkama eleklerine gönderilir.



Şekil 3.5. Mısır özü

Dikey elek yüzeyinin üst kısmından beslenen ürün, elek alt kısmına gelerek, elek ön yüzeyinden alınır. Diğer bileşenler, su ile birlikte eleğin arka kısmına düşer. Yıkama elekleri, özün ortalama tane büyüklüğüne göre, gözenek aralıkları ve tel açıları ayarlanmış eleklerdir. Birkaç seri yıkama işleminden geçen öz, helezon tip sıkma preslerine alınır. Preslerde yeteri kadar suyu alındıktan sonra, içerisinden buhar geçirilen boru demetlerinden oluşan öz kurutucularda ortalama %5 nem oranına kadar

kurutulup, boru hatlarındaki hava vasıtasıyla, öz silolarına gönderilir (Eckhoff ve Watson, 2009; Rausch ve ark., 2019). Mısır özü bileşenleri Tablo 3.4.'te belirtilmiştir.

Tablo 3.4. Mısır özü bileşenleri (Eckhoff ve Watson, 2009)

Bileşenler	%
Nişasta	7,6
Protein	10,7
Yağ	58,9

3.2.4.2. Kepek ayırma

Öz ayrıldıktan sonra geriye kalan ürün, içerisinde bulunan kepeğin yıkanarak ayrılması işlemine tabi tutulur. Bu işlem, öz ayırma işleminde olduğu gibi, kepeğin yıkanarak ayrılmasına uygun şekilde tasarlanmış ve seri şekilde birbirine bağlanmış elekler sisteminden oluşmaktadır. Esas amaç, kepek içerisinde kalan nişastanın kepekten ayrıştırılarak, su fazına geçirilmesiyle nişasta veriminin artırılmasıdır.

Eleklerin gözenek açıklığı 50µm'den 150µm'ye kadar değişebilir. Ayrı ayrı her bir eleğe beslenen ürünün elek üstünde kalan ve kepek içeriği olarak daha zengin olan kısmı, bir önceki eleğe tekrar beslenerek kepek içerisinde kalan nişastanın azami seviyede alınması sağlanır. Böylece son elekten çıkan sulu ürün bir sonraki gluten ayırma prosesine gönderilirken, kepek içeriği zengin olan ürün, fazla suyu alınmak üzere helezon tip kepek preslere alınarak sıkılır ve buradan kepek kurutucuya gönderilir.

Genel olarak, kepek kurutma işlemi, içerisinde buhar geçirilen boru demetlerinden oluşan tüp kurutucularda aşamalı olarak gerçekleşir. İlk aşamada yaklaşık %75 oranında kurutulan kepek, yem endüstrisine daha faydalı olacak şekilde içerisine ağır maserasyon suyu ilave edilerek protein miktarı ortalama %20'lere çıkarılır ve ikinci aşama kurutucuya gönderilir. Burada nihai nem oranı ortalama %12 olacak şekilde kurutulduktan sonra, boru hatlarındaki hava vasıtasıyla kepek silolarına gönderilir

(Eckhoff ve Watson, 2009; Rausch ve ark., 2019). Mısır kepeği bileşenleri Tablo 3.5.'te belirtilmiştir.

Tablo 3.5. Mısır kepeği bileşenleri (Eylen ve ark., 2011)

Bileşenler	%(w/w)
Monomerik şekerler	<1
Niştasta	16
Selüloz	14
Hemiselüloz (toplam)	39
Arabinoz	12
Ksiloz	18
Galaktoz	3,3
Mannoz + Ramnoz	2,0
Glukuronik asit	3,7
Ferulik asit (esterleri)	3,1
Kumarik asit (esterleri)	0,3
Asetik asit (esterleri)	3,2
Protein	10
Lignin	5,7

3.2.4.3. Gluten ayırma

Bileşenleri ayırma işleminin son aşaması, gluten ve niştastanın ayrıştırılmasıdır. Bu işlem, yüksek devirli döner makineler olan separatörler vasıtasıyla yapılır. Separatörler, içerisinde çok küçük belirli aralıklarla üst üste dizilmiş, konik şeklinde ve belirli çapta disklerden oluşan, endüstriye özel tasarlanmış makinelerdir. Ayırma prensibi yine, özgül ağırlık farkından kaynaklanan ve dakikada ortalama 6000 devir dönme etkisiyle oluşturulan merkezkaç kuvveti etkisiyle parçacıkların ayrıştırılmasına dayanmaktadır.

İlk aşamada, öz ve kepekten arındırılan, niştasta ve gluten karışımı ürün, yıkama suyu ile birlikte makinenin üst kısmından beslenir. Özgül ağırlığı daha ağır olan niştasta

partikülleri merkezden dışa, disklerin arasına doğru hareketiyle makinanın dış haznesine toplanırken, özgül ağırlığı daha hafif olan gluten merkeze toplanarak makinanın üst tarafına doğru hareket etmesi sağlanır ve buradan tahliye edilir. Bu yöntemle ayrıştırılan gluten, tekrar ikinci bir separatöre gönderilir. Burada, su ile gluten bir miktar daha ayrıştırılarak, glutenin konsantre hale gelmesi sağlanır. İlk ayrışmada %6-7 kuru madde gluten içeren karışımın kuru maddesi %16-17'lere yükseltilir. Bu nedenle, bu separatör aynı zamanda gluten konsantratör olarak adlandırılır. Ancak, bu haliyle gluten yine de yüksek miktarda su içerdiğinden kurutma işleminde yüksek enerji kullanımı gerektirecektir.

Enerji maliyetini düşürmek için gluten, tekrar döner vakum filtrelerle gönderilerek, kuru maddesi ortalama %55-60'a yükseltilir ve kurutucuya gönderilir. Kurutucudan çıkan ürün, genel ve kabul görmüş bir standart olarak ortalama %12 nem ihtiva eder (Şekil 3.6.) (Eckhoff ve Watson, 2009; Rausch ve ark., 2019). Mısır gluteni bileşenleri Tablo 3.6.'da belirtilmiştir.

Tablo 3.6. Mısır gluteni bileşenleri (Eckhoff ve Watson, 2009)

Bileşenler	%
Nişasta	25,8
Protein	50,7
Yağ	3,7



Şekil 3.6. Mısır gluteni

3.2.4.4. Nişasta ayırma ve yıkama

Glutenden ayrılan nişasta, içerisinde küçük siklonlar demetinden oluşan bataryalar şeklinde ve bu bataryaların birbirine seri halde bağlanmasıyla oluşturulan yıkama sistemine alınır. Çalışma prensibi, siklonların çalışma prensibi ile aynıdır. Burada, ters akım yöntemiyle, bir taraftan temiz ve taze yumuşak su beslenirken diğer taraftan sulu nişasta beslenir. Böylece, nişasta içerisinde bulunan protein ve diğer safsızlıklar bataryanın üst çıkışından alınır, alt çıkıştan ise temiz ve ortalama %40 kuru madde nişasta içeren ürün alınır. Endüstride, bu ürün Nişasta Sütü olarak isimlendirilmektedir. Elde edilen nişasta sütünün nişasta içeriği ortalama %99,5 saflıktadır. Nişasta sütü; doğal nişasta, modifiye nişasta ve prejelatinize nişastanın ana hammaddesi olarak kullanılır.

Nişasta sütü, santrifüj kurutucuya gönderilir. Santrifüj kurutucu, iç kısmı nişasta tanelerini geçirmeyecek ölçüde gözenek yapısına sahip bir filtre bezi ile kaplı olan, belirli bir devirle döndürülen hazneye sahip makinedir. Beslenen nişasta sütü, dönme hareketiyle suyu filtrenin dış kısmına atarken, filtre yüzeyinde nişasta keki oluşturur. Böylece %40 oranında nişasta içeren nişasta sütünün kuru maddesi ortalama %65'e yükseltilir. Bu işlemdeki amaç, yine kurutma prosesinde enerjiden tasarruf sağlamaktır. %35 neme sahip nişasta keki, flash kurutucuda ortalama %12 nem içerecek şekilde kurutulur (Şekil 3.7.) (Eckhoff ve Watson, 2009; Rausch ve ark., 2019).



Şekil 3.7. Mısır nişastası

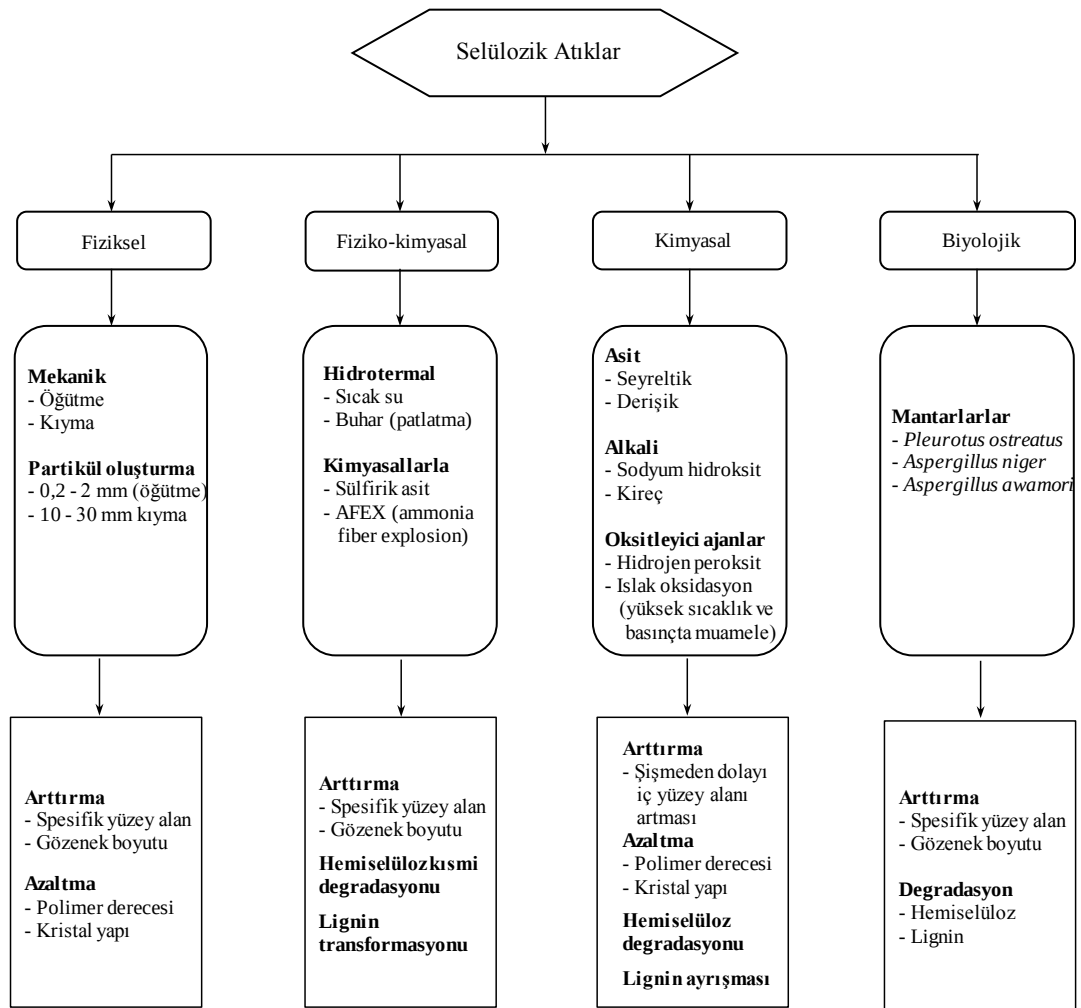
BÖLÜM 4. MISIR KEPEĞİ VE HİDROLİZASYON İŞLEMLERİ

4.1. Mısır Kepeği Genel Özellikleri

Mısır kepeği, ıslak öğütme prosesinin bir yan ürünü olarak ortaya çıkar ve düşük oranda protein içerdiğinden yem olarak değerlendirilmesi uygun karşılanmamaktadır. Bu nedenle, yüksek oranda protein içeren ve yine bir yan ürün olan maserasyon suyu veya mısır gluteni ile karıştırılıp protein değeri artırılır ve genelde bu şekilde yem endüstrisinde değerlendirilir (Dien ve ark., 2006).

4.2. Hidrolizasyon İşlemleri

Mısır kepeğine, fermentasyon öncesi bir takım ön işlemler uygulanması gerekmektedir. Ön işlem uygulamalarında amaç, hidroliz aşamasında açığa çıkarılacak olan şekerlerin veriminin ve üretim oranı veriminin iyileştirilmesidir. Mısır kepeği için birçok ön işlem yöntemi geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Ön işlem sürecinin genel verimliliği; fermentasyonda biyokütlenin gelişmesini inhibe edecek bileşiklerin oluşumu ve yüksek oranda substratın açığa çıkması arasındaki denge ile ilişkilidir. Ön işlem uygulamaları genel olarak; fiziksel, fiziko-kimyasal, kimyasal ve biyolojik süreçler olarak sınıflandırılabilir (Şekil 4.1.). Bu yöntemler tek tek uygulanabildiği gibi kombinasyonlu olarak da uygulanabilmektedir (Talebna ve ark., 2010).



Şekil 4.1. Mısır kepeğinde kullanılan ön işlem yöntemleri ve olası etkileri (Talebniya ve ark., 2010)

Fiziksel işlemler, malzemenin yüzey alanını ve gözenek boyutunu arttırmaya yönelik, kıyma veya öğütme şeklindedir. Bu amaçla farklı yapıda değirmenler ve öğütücüler gibi ekipmanlar kullanılmaktadır. Bu işlem, malzemenin kristal ve polimer yapısını değiştirerek, absorblamayı ve substrat olarak enzim hidroliz etkinliğini arttırmayı sağlamaktadır.

Fiziko-kimyasal işlemlerde, malzeme sıcak su veya buhar ile hidrotermal sıcaklığa maruz bırakılır. Daha sonra, sülfirik asit veya amonyak ile muamele edilir. Sıcaklık, pH ve nem lignoselülozik bileşenlerin çözünürlüğüne doğrudan etki eden parametrelerdir. Hemiselüloz; fraksiyon, termal ve kimyasal etkilere karşı oldukça hassas yapıdadır. Hemiselüloz basınç altında su içerisinde ve 150°C'nin üstündeki

sıcaklıklarda çözünür hale geçmektedir. Ancak, daha yüksek sıcaklıklarda (170-230°C), oligomerik şeker fraksiyonun oluşumu, bazı istenmeyen yan ürünlerin de meydana gelmesine neden olmaktadır (Talebna ve ark., 2010). Asetik asit, formik asit, levulinik asit, furalaldehit, 2-furalaldehit (furfural), 5-hidroksimetil-2-furalaldehit gibi yan bileşikler enzimler ve bakteriler üzerinde inhibitör etki oluşturmakta olup fermentasyon prosesini olumsuz etkilemektedirler (Zhang ve ark., 2016).

Kimyasal işlemler; asit, alkali ve oksitleyici ajan gibi kimyasal maddeler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler arasında, sülfürik asit kullanılarak yapılan seyreltik asit ön işlemi en yaygın kullanılan yöntemdir. Kullanılan kimyasalın türüne bağlı olarak, ön işlem, lignoselülozun yapısal bileşenleri üzerinde farklı etkilere sahip olabilir. Alkali ve ıslak oksidasyon ön işlemleri, lignin çözündürmesinde daha etkiliyken; seyreltik asit ön işlemi hemiselüloz çözündürmesinde daha etkilidir.

Biyolojik ön işlemler; lignin ve hemiselülozun parçalanması için özellikle çürükçül mantarların kullanılmasını içerir. Lignin degradasyonu, peroksidad ve lakkaz gibi lignini parçalayan enzimlerin etkisiyle meydana gelir. Biyolojik ön işlem için uygun mantarlar, lignin için daha yüksek afiniteye sahip olmalı ve lignini karbonhidrat bileşenlerinden daha hızlı degradasyona uğratmalıdır. Biyolojik ön işlemler diğer ön işlem uygulamalarına göre çevre dostudur ve daha az enerji kullanımı gerektirir. Fakat, bu işlemin hidroliz reaksiyonu oranı çok düşüktür ve ticari olarak uygulanabilir olması için büyük bir iyileştirme gerektirir (Talebna ve ark., 2010).

Weil ve ark. (1998) çalışmalarında mısır kepeğinin 220-260°C aralığındaki sıcak su ile işleme tabi tutulmasının kullanılan enzimlerin hidroliz etkisini arttırdığını tespit etmişlerdir. Isı kontrollü olarak yaptıkları çalışmalarında; yaklaşık %4,4 kuru madde/su oranındaki karışımın 50-60 dakika süreyle 220, 240, 260°C derecelerde ve 10 saniyeden daha az süreyle, pH 5,0-7,0 aralığında bekletilmesi sonucu selülozun %33-84 oranında enzim hidrolizinin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bunun, sıcak su işlemine tabi tutulmamış kepek işlemine göre %17 daha fazla glikoz açığa çıkardığı belirtilmiştir. Aynı zamanda, yüksek ısıdaki buharın bir nevi patlama etkisiyle lignin, hemiselüloz ve selüloza penetrasyonu arttırırken, asit oluşumu ile selülozun pozitif bir

etki olarak oto-hidroliz sonucunda parçalandığı ifade edilmiştir. Dolayısıyla, ısıtma işlemi sırasında parçalanmayı hızlandırması bakımından asit ilavesi yapılmasının önerildiği belirtilmiştir.

Saha ve Bothast (1999) yaptıkları çalışmada, %20 nişasta, %14 selüloz ve %35 hemiselüloz içeren mısır kepeğinin; sıcak su, alkali ve seyreltik asit ve enzim sakkarifikasyonu prosesleri ile nişasta, selüloz ve hemiselülozun monomerik şekerlere dönüşümünün sağlandığı belirtilmiştir. 121°C’de 1 saat süreyle sıcak su işleminin, nişasta ve selülozun enzim hidrolizasyonu ile şekere dönüşümünün kolaylaştırdığını, fakat hemiselüloz üzerinde bu etkinin görülemediği tespit edilmiştir. Benzer neticenin alkali muamelesi ile de elde edildiği ifade edilmektedir. Hemiselüloz ve nişastanın seyreltik sülfürik asit (H₂SO₄) (%0,5-1,0 v/v) ile 121°C’de monomerik şekerlere parçalandığı saptanmıştır. Mısır kepeğinin (%15 katı madde), %0,5 (v/v) seyreltik H₂SO₄ kullanılarak 121°C’de 1 saat süre ile ve sonrasında pH 5,0’a nötralize edildikten sonra selülaz ve β -glukosidaz enzimleri kullanılarak yapılan sakkarifikasyon sonucu %85-100 teorik verim elde edildiği belirtilmiştir.

Noureddini ve ark. (2009), mısır kepeği ve alkol üretiminde kullanılan tahıllardaki lignoselülozik maddelerin seyreltik asit kullanılarak monomerik şekerler ve furfurallara hidrolizasyonunu çalışmışlardır. %5’ten %20’ye kadar (w/w) %5 aralıklarla katı madde ihtiva eden biyokütleyi, %0,5’ten %1,5’e kadar (v/v) %0,5 aralıklarla arttırarak, sülfürik asit ile 120°C ve 140°C’lerde 20-30 dakika tutarak hidrolizasyon çalışmaları yapmışlardır. En yüksek monomerik şeker veriminin, en düşük kuru madde konsantrasyonunda, en yüksek asit konsantrasyonu ile 140°C’de ısıtma işlemi sonucu elde edildiğini belirtmişlerdir. Furfuralların ise 120°C’de en düşük konsantrasyonda olduğu neticesine varmışlardır.

Noureddini ve ark. (2009) yaptıkları bir diğer çalışmada, mısır kepeğinde aşamalı olarak hidroliz işlemleri uygulamışlardır. Substrat konsantrasyonu %15 (kuru madde) ve sülfürik asit konsantrasyonu %1 olarak ayarlanan uygulamada, hidrolizasyon sıcaklığı 120°C’de tutulmuştur. İlk basamak hidrolizasyonun tamamlanmasından sonra, sıvı kısım ayrılmış ve ikinci kademe hidrolizasyonunda tekrar substrat olarak

kullanılmıştır. Her uygulamanın sonrasında yapılan analizlerde, monomerik şeker oluşumunun lineer olarak artış gösterdiği belirtilmiştir. Hidrolizasyon süresinin ortalama 30 dakikada gerçekleştiği, bu süre sonundan itibaren hidrolizasyonun yavaşladığı ancak sürenin arttırılmasının zorlu da olsa monomerik şekerlerin artmasını sağladığı saptanmıştır. Bu artışın ise hemiselülozik bileşiklerin parçalanmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir. Hidroliz işlemlerinde sırasıyla birinci, ikinci ve üçüncü kademelerde; %50,7, %52,7 ve %45,7'lik verimler elde edilmiştir. Akabinde uygulanan enzim hidrolizasyonlarında ise sırasıyla, %22,4, 78,5, 63,1 ve 52,5'lik verim elde edilmiştir. Yine, prosesinde laktik asit, asetik asit, süksinik asit, levulinik asit, gliserol ve HMF gibi kimyasalların oluştuğu ve bu kimyasalların oluşumunun substratın kendisinden, uygulanan ısı işlemin oluşan şekerlerin parçalanmasına sebep olduğundan veya fermentasyon sırasında yan ürün olarak açığa çıkabileceği belirtilmiştir.

Dien ve ark. (2006), sıcak su ile ısı işleme tabi tutulmuş mısır kepeğinden, geleneksel hidroliz enzimleri kullanarak monosakkaritlerin eldesinin fizibilitesi konusunda bir çalışma yapmışlardır. Sıcak su işleminin, bir ksiloz polimeri olan ksilanın çözünmesinde oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Ancak, ksilanın monosakkaritlere hidroliz edilmesi gerekliliği ve hidrolizi gerçekleştirmek için, ticari olarak piyasada bulunan mevcut ksilanaz enzimlerinin etkili olmaması ayrı bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle, mısır kepeği ksilanının hidrolize karşı direnç göstermesinin bu etkinliği daha da düşürdüğü belirtilmiştir.

Martinez ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, H_2SO_4 ve $NaOH$ 'ın hemiselülozun ve ligninin çözünürlüğüne etkisini araştırmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda yapılan denemelerde; asidin hemiselülozu ve lignini daha fazla çözdüğü, alkali uygulamanın ise lignini çözdüğü ancak ksilanı çok düşük oranda çözdüğü belirtilmiştir. Alkali işleminden sonra, hemiselüloz ve ligninde şişme gözlemlendiği, fakat %20 (w/w)'den daha düşük konsantrasyonlarda karbonhidratların çözünürlüğünü sağlamadığı tespitinde bulunulmuştur.

BÖLÜM 5. FERMENTASYON

5.1. Fermentasyon Genel Özellikleri

Fermente olmuş gıda ve içeceklerin varlığı mikrobiyomların, genomların ve saf kültürlerin keşfedilmesinden öncesine dayanmaktadır. Fermente gıdalar, insanoğlunun tükettiği işlenmiş gıdalar içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. Bu, insanların bilerek veya fermente gıdalar üretmek amacıyla yapmış oldukları bir işlem olmayıp, gıdaların açıkta ve herhangi bir koruyucu önlem olmadan bırakılması sonucu doğal olarak meydana gelen bir oluşumdur.

Fermente gıdaların keşfedilmesinde fermentasyon şartları ve kontrolünün belirlenmesi ise yüzyıllar almıştır. Birçok fermente gıdanın üretilmesi birbirinden bağımsız, değişebilen ve tamamen deneysel ve tecrübeye dayalı olarak gelişmiştir. Bu gelişime paralel olarak kullanılan hammaddeler, yöntemler ve teknolojiler de büyük bir gelişim ve farklılık göstermektedir. Geçmişte ve günümüzde uygulanan yöntemler karşılaştırıldığında, Tablo 5.1.'de belirtilen farklılıklar özetlenebilir (Hutkins, 2019).

Fermentasyon teknolojisi; enerji üretimi, materyal, gıda, kimya ve eczacılık endüstrilerinde uygulama alanı olan bileşiklerin üretimi için mikrobiyal canlıların ve enzimlerin kullanımını içeren alan olarak tanımlanabilir. Biyolojik bir proses olan fermentasyonda; mayalar, bakteriler ve mantarlar kompleks substratları kullanarak, endüstriyel ölçüde basit bileşiklere dönüştürürler. Genelde organik asitler ve alkol, fermentasyonun ana ürünleridir. Antibiyotikler, enzimler ve büyüme/gelişim faktörleri ise ikincil metabolitler olarak ortaya çıkmaktadır (Kuila ve Sharma, 2018).

Tablo 5.1. Fermentasyonda geleneksel ve modern yöntem karşılaştırması (Hutkins, 2019)

Geleneksel Yöntem	Modern Yöntem
Küçük ölçekli	Büyük ölçekli
Steril olmayan ortam	Isıl işlemlili ortam
Açık ve kontaminasyona açık	Kapalı ve aseptik
Manuel	Otomasyon
Fermentasyon süresine duyarlı değil	Fermentasyon süresine hassas
Değişken kalite değerleri	Tutarlı kalite değerleri
Güvenlik kriterleri düşük	Güvenlik standartları ön planda
Kullanılan kültür ile ilgili bilgi yok	Kullanılan kültür ile ilgili bilgi fazla

5.2. Fermentasyon Çeşitleri

Biyoreaktörler kullanılarak yapılan fermentasyonlar; tasarlanan biyoreaktörün çeşidine, substrat şekline, besleme çeşidine ve mikroorganizmaların kullanım amacı ve şekli gibi faktörlere bağlı olarak farklı çeşitlerde olabilirler. Bunlardan sekiz tane ana farklı fermentasyon metodu belirtilebilir.

5.2.1. Kesikli tip fermentasyon

Bu fermentasyonda belirli miktardaki sterilize edilmiş besiyeri, başlangıçta fermentöre konulur. Belirli miktarda, uygun mikroorganizma ilave (inokule) edilir ve belirli sürede gerekli optimal şartlarda fermentasyonun ilerlemesi sağlanır. Fermentasyon süresince mikroorganizma büyüyerek çoğalır ve metabolitleri üretir. Aynı besi ortamında çoğalan mikroorganizma ve metabolitler, fermentasyon sonunda alınarak, ürün uygun bir prosesle ayrılarak alınır (Chisti, 2010; Okafor ve Okeke, 2018).

Kesikli (batch) tip fermentasyon metodunun en büyük avantajı, operasyon kolaylığı ile kontaminasyon riskinin ve mutasyon olasılığının çok düşük olmasıdır. Dezavantajlar olarak ise fermentasyon başlangıcında her defasında taze ve sterilize besi ortamı hazırlanması, her fermentasyonun sonunda fermentör ve bağlı ekipmanların temizlenmesi ve sterilize edilmesi, mikroorganizma ve metabolitlerin

aynı besi ortamında birikmesi nedeniyle konsantrasyon artışından dolayı mikroorganizma aktivitesinin azalması ve substratların etkin olarak kullanılamaması gibi hususlar sıralanabilir. Bu nedenlerden dolayı istenilen verim değişkenlik gösterir ve işletme maliyetleri yüksektir (Abdel-Rahman ve ark., 2013; Okafor ve Okeke, 2018).

5.2.2. Sürekli tip fermentasyon

Kapalı sistem fermentasyondur. Taze hazırlanmış besi sürekli veya kesikli olarak fermentöre beslenirken, diğer taraftan beslenen miktar kadar ürün ve mikroorganizma fermentörden otomatik olarak sürekli ve aynı oranda alınır. Bu yöntemle, fermentasyon hacmi ve besi ortamının aynı düzeyde muhafaza edilmesi sağlanır. Sürekli tip fermentörde, azami verim eldesi için fermentasyon süresi uzundur. Bu nedenle zaman kaybı ve operasyon maliyetleri düşüktür. Sürekli tip fermentasyon, tek aşamalı bir fermentasyon olabileceği gibi; fermentasyon kültürünün bir miktarının çıkıştan alınıp sirküle edilerek, tekrar fermentöre ilave edilmesiyle Sirkülasyon Tip Fermentasyon veya iki veya daha fazla sayıda fermentörün belirli bir düzen içerisinde çalıştırılmasıyla Çok Aşamalı Tip Fermentasyon olabilir (Chisti, 2010; Okafor ve Okeke, 2018).

Sürekli fermentasyon süreci, mikrobiyal büyüme aktivitesi veya ürün oluşumu ile izlenmektedir. Bu yöntemler; Turbidostat Metot (mikroorganizma konsantrasyon oranı kontrol altında) ve Kemostat Metot (besi besleme oranı ve ürün çıkış oranı kontrol altında) olarak tanımlanmaktadır (Okafor ve Okeke, 2018).

Sürekli tip fermentasyon metodunun avantajları; operasyon duruşları çok az veya yoktur, başlangıç mikroorganizma miktarı ilavesi çok düşüktür, mikroorganizmaların substrat kullanım oranları optimum düzeydedir ve istenilen ürünün üretim sürekliliğidir. Sürekli tip fermentasyon metodunun dezavantajları; fermentasyon süresinin uzun olmasından dolayı kontaminasyon ve mutasyon risklerinin fazla olması, elde edilen ürünün sürekli olarak ekstrakte edilmesinden dolayı firelerin ve atıkların artması, fermentasyonda kullanılan mikroorganizmaların büyüme

karakteristikleri ile elde edilen ürünlerin sentezi hakkındaki dinamik bilgilerin eksikliği ve belirsizliğidir (Abdel-Rahman ve ark., 2013; Okafor ve Okeke, 2018).

5.2.3. Kesikli besleme fermentasyonu

Kesikli fermentasyon metodunun bir çeşit modifiye edilmiş şeklidir. Bu proseste fermentasyon devam ederken substrat belirli aralıklarla ilave edilir. Ortamda bulunan glikoz veya diğer karbonhidratlar ya da azot konsantrasyonlarının ikincil metabolitlerin katabolize edilmesinin baskılanmasının önlenmesi amacıyla kesikli besleme fermentasyon metodu tercih edilmektedir. Bu nedenle, kritik besi bileşenleri başlangıçta düşük miktarda verilir ve daha sonraki aşamalarda düşük dozlarda ilave edilir. Böylece besi kaynağı optimum düzeyde tutulmuş olur. Penisilin gibi bazı antibiyotiklerin üretimi için uygun bir metottur (Chisti, 2010; Okafor ve Okeke, 2018).

Kesikli besleme (fed-batch) fermentasyon metodunun avantajları; çalışma süresinin uzunluğuna bağlı olarak yüksek mikroorganizma konsantrasyonlarına ulaşılabilir, mikroorganizma gelişme ve büyüme oranındaki sapmalar düşüktür. Ayrıca bu metot kontrollü miktarda substrat besleme imkanı sağlar. Spesifik bir substratın besleme konsantrasyonunun kontrol altında tutulabilmesi, spesifik bir ürünün veya yan ürünün üretilmesinin kontrol altında tutulmasını sağlamaktadır. Kesikli besleme fermentasyon metodunun dezavantajları; beslenen substrat konsantrasyonlarının ölçümleri için özel analitik yöntemlerin gerekliliği, kullanılan mikroorganizmanın fizyolojisinin ve üretkenliğinin iyi bilinmesinin gerekliliği ve bunlara bağlı olarak operasyonun daha ustalıkla kişiler tarafından yürütülmesi gerekliliği olarak sıralanabilir (Abdel-Rahman ve ark., 2013; Okafor ve Okeke, 2018).

5.2.4. Anaerobik fermentasyon

Oksijensiz ortamda yapılan fermentasyon çeşidir. Zorunlu anaerob veya fakültatif anaerob mikroorganizma çeşidine göre iki tip uygulama mevcuttur. Anaerobik fermentasyonda, fermentörün üst kısmında bulunan hava bir pompa vasıtasıyla azot, argon gibi inert bir gaz beslenerek tahliye edilir veya fermentörün üst yüzeyi

karbondioksit gibi bir gazla doldurulur. Karıştırılmadan sabit duran veya viskozitesi yüksek bir fermentasyon sıvısı oksijensiz bir ortam sağlar. Oksijensiz bir ortam sağlamak için bazen, sterilizasyondan hemen sonra mikroorganizma fermentörün dip kısmına inokule edilebilir (Chisti, 2010; Okafor ve Okeke, 2018).

Karbondioksit, hidrojen, metan gibi ekonomik değeri olan bazı gazların yan ürün olarak üretilmesi bakımından oldukça avantajlıdır. Büyük endüstriyel tesislerin arıtma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksijensiz ortamın sağlanması için ilave ekipmanların kullanımı veya viskozitesi daha yüksek fermentasyon sıvısı kullanılması gibi ilave maliyet gerektiren işlemler, bu metodun dezavantajı olarak belirtilmektedir (Chisti, 2010; Okafor ve Okeke, 2018).

5.2.5. Aerobik fermentasyon

Oksijenli ortamda yapılan fermentasyondur. Ticari proseslerin ve kullanılan fermente ürünlerin büyük bir çoğunluğu bu yöntemle elde edilmektedir. Fermentasyon, yüzey veya daldırma şeklinde olabilmektedir (Chisti, 2010; Okafor ve Okeke, 2018).

- a. Yüzey Fermentasyonu, spor oluşturan mikroorganizmalar için tercih edilen fermentasyon tipidir. Susstrat sıvı veya katı olabilir. Mikroorganizma substratın yüzeyindedir. Bu nedenle, mikroorganizmanın oksijen ve besin kullanımı gibi fermentasyon süresinde farklı şartlar altında bulunabilmesi fermentasyonun dezavantajları arasında görülmektedir.
- b. Daldırma Yöntemli (Submerged) Fermentasyonda, mikroorganizma sıvı haldeki besi yeri içerisinde büyür. Besi ortamı, mekanik olarak serpilerek veya karıştırılarak mikroorganizmanın homojen bir ortamda bulunması sağlanır. Endüstriyel fermentasyonların genelinde, bu tip fermentasyon metodu uygulanmaktadır.

5.2.6. Katı hal fermentasyonu

Katı Hal (Solid-State) Fermentasyonda, kullanılacak olan mikroorganizmaların büyüme ve metabolizması, parçacıkları arasında sadece gaz (hava) bulunan fakat, çok az veya neredeyse hiç serbest su bulunmayan katı materyallerden oluşan bir matriks içerisinde gerçekleşir. Matriks içerisine tutturulmuş mikroorganizmaların, su, karbonhidrat, fosfor, azot ve sülfür gibi ana besin kaynaklarının, matriks dışından matriks içerisindeki parçacıklar arasından difüzyonunu sağlayacak özelliğe sahip olması gerekir. Katı hal fermentasyonu katı, sıvı ve gaz olmak üzere üç fazlı heterojen bir prosestir. Bu nedenle, biyoproseslerde ve ürün geliştirmelerdeki potansiyel yararlarından dolayı, son senelerde oldukça araştırılmış ve geliştirilmiştir. Düşük enerji ihtiyacı, yüksek ürün verimliliği, sıvı atık miktarının düşük olması ve bakteriyel kontaminasyon riskinin az olması gibi nedenler, bu tip fermentasyon prosesini ön plana çıkarmıştır. Son yıllarda, önemli bazı biyomoleküllerin üretimi ile gıda, eczacılık, tekstil, biyokimya ve biyoenerji alanlarında kullanılmaktadır (Berovic, 2019).

BÖLÜM 6. LAKTİK ASİT SAFLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

6.1. Saflaştırma Sistemlerinin Genel Özellikleri

Laktik asit üretiminin en önemli aşamalarından biri; laktik asidin, üretim ortamından ayrıştırılarak geri kazanılması ve saflaştırılmasıdır. Suyu karşı yüksek afinite göstermesi, su ile azeotropik bir özellik oluşturması ve sıcaklığa bağlı olarak dimer oluşturması gibi hususlardan dolayı laktik asidin üretim ortamından geri kazanılması zor ve maliyetli bir süreçtir. Laktik asidin fermentasyon ortamından ayrıştırılması ve saflaştırılması ile ilgili farklı teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyon, reaktif distilasyon, membran prosesi ve iyon değiştirici metotlarıdır (Komesu ve ark., 2017a). Bu metotların avantajları ve dezavantajları Tablo 6.1.'de belirtilmiştir.

Çöktürme metodu; fermentasyon sırasında oluşan laktik asidin nötralizasyonu ve fermentasyon pH'nın ayarlanması için kalsiyum hidroksit kullanılmaktadır. Laktik asidin kalsiyum hidroksit ile nötralizasyonu sonucu kalsiyum laktat oluşmaktadır. Kalsiyum laktat, fermentasyon bitiminde ortama sülfürik asit ilave edilerek laktik asit ve kalsiyum sülfata dönüştürülmektedir. Bu bir çöktürme reaksiyonu olduğundan kalsiyum sülfat dibe çöker, sonrasında santrifüj işlemi ile ayrıştırılır. Bu metotta, kullanılan kalsiyum hidroksitin çözünürlüğü çok fazla düşük olduğundan (20°C'de 1,25g/L, maksimum 1,7g/L) nötralizasyonda büyük oranlarda kullanımını gerektirmektedir. Bu da fermentasyon hacminin büyümesine, ürün konsantrasyonunun düşmesine ve bunlara bağlı olarak maliyetlerin yükselmesine sebebiyet vermektedir. Ayrıca bu proseste kullanılan sülfürik asit ve işlem sonucunda oluşan kalsiyum sülfatın bertarafı, aynı şekilde maliyetleri arttıran en büyük etkidir (Li ve ark., 2016; Oliveira ve ark., 2017).

Sıvı-sıvı ekstraksiyon metodunda; ayırma işlemi, çözünen maddenin, değişik çözücüler içerisindeki çözünürlük farklılığına dayanmaktadır. Laktik asidin suya karşı daha düşük afinite göstermesini sağlayan etil eter, etil asetat, izoamil alkol, hekzanol gibi çözücüler kullanılabilir. Etil eterin bahsedilen diğer çözücülere göre daha yüksek seçiciliğe sahip olduğu belirtilmektedir (Komesu ve ark., 2017a). Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda etkili bir ayırma için büyük bir ekstraksiyon yüzey alanı gerektirdiğinden ve kullanılan çözücülerin fermentasyon ortamına yüksek toksik etki bırakabildiğinden dolayı bu yöntemin maliyetleri arttırıcı unsurlar olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir (Gao ve ark., 2009).

Reaktif distilasyon; kimyasal reaksiyon ve distilasyonun aynı sistem içerisinde gerçekleştirilmesi işlemidir. Özellikle sıvı faz tersinir kimyasal reaksiyonlarda kullanılır. Reaksiyonla daha kolay damıtılabilen ürünler elde edilir ve böylece dönüşüm ve seçicilik artar. Bu işlemde; fermentasyon sıvısındaki laktik asit ilk olarak esterleştirme reaksiyonuna tabi tutulur (örn: laktik asit + etanol $\rightarrow$ etil laktat + su). Daha sonra da hidrolizasyon aşamasında etil laktat, laktik asit ve etanole hidrolize edilir (etil laktat + su $\rightarrow$ laktik asit + etanol). Esterleştirme veya hidroliz reaksiyonu genellikle sülfürik asit gibi homojen katalizörlerle katalize edilir. Esterleştirme işlemi için bütanol ve metanol gibi alkoller de reaktant olarak kullanılabilir. Bu işlemin dezavantajları arasında; esterleştirme işleminde kullanılan solventlerin uçuculuk özellikleri, reaksiyon sürelerine bağlı olarak büyük hacimlerde distilasyon kolonu gereksinimi ve yüksek debi ihtiyacı gibi hususlar yer almaktadır. Katalizör olarak katı haldeki iyon değiştirici reçinelerin kullanımının avantajlı olabileceği belirtilmiştir (Komesu ve ark., 2017b).

Membran prosesi; organik asitlerin geri kazanım sürecinde uyarlanabilirlikleri ve seçicilikleri nedeniyle membran teknolojileri kullanılmaktadır. Membran ayırma ile yüksek saflık ve yüksek verim elde edilebilir. Organik asitlerin ayrılması için kullanılan ana membran filtrasyonları; mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon, ters osmoz, pervaporasyon ve elektrodializdir. Bu yöntemler, oldukça yüksek saflıkta ve yüksek verimde ürün elde edilebilmesine imkan tanımaktadır. Membran ayırma yöntemleri yüksek verimli ayırma gerçekleştirebilse de prosesin yüksek enerji tüketimi

ve membranların pahalı olması, ayrıca mevcut teknolojide membranların hızlı bir şekilde kirlenmesi ve tıkanması karşılaşılan dezavantajlardandır (Li ve ark., 2016).

Tablo 6.1. Laktik asit ayırma proseslerinden bazılarının avantajları ve dezavantajları (Komesu ve ark., 2017b)

Ayırma prosesi	Avantajlar	Dezavantajlar
Çöktürme	Endüstriyel tesislerde kolay uygulanabilirlik Kolay operasyon işlemleri	Yüksek sülfürik asit tüketimi Saflaştırma prosesinde çevre kirliliğine neden olan alçı taşı (gypsum) oluşumu Düşük ürün saflığı
Sıvı-sıvı ekstraksiyon	Alçıtaşı üretimi yok Termal bozunma riskinde azalma	Ekstraksiyonda kullanılan kimyasalların geri kazanımı için ters ekstraksiyon ya da distilasyon gibi rejenerasyon işlemlerinin gerekmesi Geleneksel ekstraksiyon ajanlarının elverişsiz dağılım katsayıları göstermesi Ürün saflığının yüksek olmaması
Membran prosesi	Üretim ölçeğinde esneklik Yüksek seçicilik Yüksek düzeyde saflaştırma Geleneksel fermentörlerle entegrasyon imkanı, böylelikle ekipman yatırım maliyetinin düşmesi	Yüksek membran maliyeti Membran kirlenmesi Polarizasyon sorunları Ölçeklendirme zorluğu
Reaktif distilasyon	Reaksiyon ve ayırmanın aynı aparat içerisinde entegre olarak yapılabilirliği Yüksek düzeyde saflaştırma Daha düşük enerji tüketimi	Karmaşık süreç Sıvı fazdaki tersinir kimyasal reaksiyonlara özel olarak uygulanması Homojen katalizör kullanımından kaynaklanan korozyon ve ayrılma sorunları

6.2. İyon Değiştirici Reçineler

İyon değiştiricilerin keşfinin temeli, 18. yüzyılın sonlarına doğru, iyon kavramının ve elektrolitik çözeltilerin teorisinin gelişmesine dayanmaktadır. Michael Faraday'ın iyonlar kavramı ve sonrasında Svante Arrhenius'un elektrolitik çözeltiler teorisi, iyon değiştiricilerin bilimsel olarak keşfi açısından kritik öneme sahiptir. Çünkü bu kavramlar esasında hem organik hem de inorganik polielektrolitleri kapsamaktadır ki, bu zıt yüklü iyonlardan oluştuğu anlamı taşımaktadır. Geleneksel elektrolitlerin aksine yüklü iyonlardan biri polimerik (organik iyon değiştiriciler) veya kristal (inorganik iyon değiştiriciler) bir yapıya tutturulmuştur (Zagorodni, 2007).

İyon değiştirme prosesi; likit fazda bulunan mobilize iyonların katı faz içerisinde bağlı olarak bulunan sabit (immobilize) iyonlar ile yer değiştirme işlemi olarak tarif edilebilir. İyon değiştiriciler katı malzemelerdir veya çevresindeki ortamda bulunan aynı yüklü iyonlarla kendi üzerinde bulunan iyonları değiştirebilen yüksek molekül ağırlıklı polielektrolit maddelerdir. Meydana gelen iyon değişim işlemi tersinirdir ve stokiyometrik olarak birbiriyle eşdeğer değişim gösterirler. Başka bir bakış açısıyla iyon değiştiriciler, yüksek molekül yapısına sahip anyonlar veya katyonlar olup, eşit miktarda hidrojen ve hidroksil iyonlarının değişimi ile yüksek moleküllü tuzların oluşumudur. Katı haldeki asit iyonunun bir baz ile nötralizasyonu durumunda, polielektrolite bağlı bulunan katyon, ortamda bulunan karşı bir katyon ile yer değiştirebilir. Bu proses katyon değiştirici proses olarak belirtilir (Harland, 2007).

İdeal bir iyon değiştirici için karakterize edilen özellikler:

- a. Homojen ve rejenere edilebilir hidrofilik bir yapıda olmalı,
- b. Kontrol edilebilir ve etkili iyon değiştirici kapasitesi taşımalı,
- c. Hızlı iyon değiştirme özelliğinde olmalı,
- d. Kimyasal stabiliteye sahip olmalı,
- e. Fiziksel stabilite olarak, mekaniksel sağlamlık ve dayanıklılık özelliğine sahip olmalı,

- f. Büyük ölçekli tesisler için, hidrolik tasarım gerekliliklerini karşılayacak homojen parçacık büyüklüğünde ve etkili yüzey alanına sahip olmalıdır (Harland, 2007).

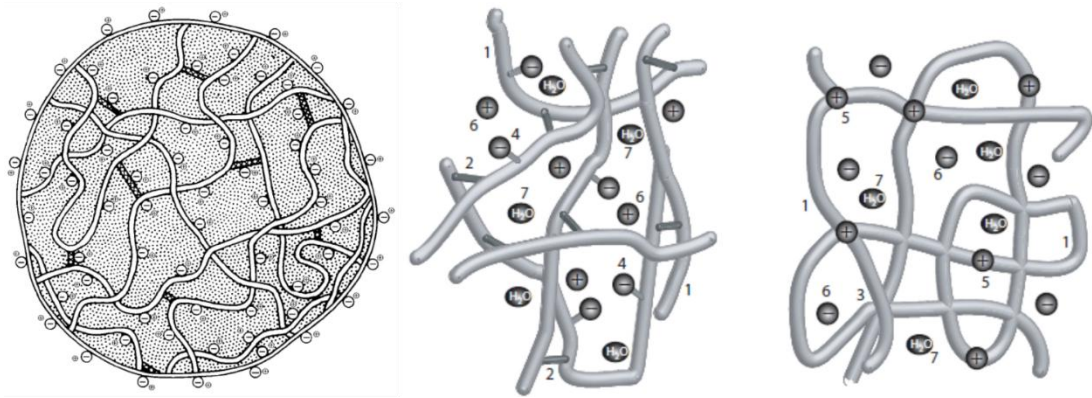
Mevcut iyon değiştirici çeşitleri arasında, inorganik iyon değiştiricilerin önemi azımsanmayacak kadar olmasına rağmen, sentetik iyon değiştiriciler daha çoğunlukta ve önem bakımından öne çıkmaktadır. Bu durum, sentetik iyon değiştiricilerin mekanik, termal, fiziksel ve kimyasal bakımdan daha dayanıklı olmalarından kaynaklanmaktadır. İnorganik iyon değiştiricilerin önemi, oldukça yüksek sıcaklıklara ve yoğun radyasyona dayanabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle radyoizotop ayırmalarında ve nükleer atık problemlerinin çözümünde kullanılmaktadır. Ayrıca birçok katalitik uygulamalarda oldukça avantaj sağlamaktadır.

İyon değiştirici reçineler farklı kimyasal kompozisyonlarda bulunmakla birlikte, tipik olarak metal oksitlerin, hidroksitlerin, polivalent metallerin çözünmeyen asit tuzları, heteropoliasit tuzları ve/veya karışımlarından oluşmaktadır. Zeolitler, titanatlar, siliko-titanatlar, zirkonyum ve diğer geçiş elementleri fosfatlarından yapılan iyon değiştiriciler örnek olarak verilebilir (Zagorodni, 2007).

Sentetik iyon değiştiricilerin tanımlanmasında üç faktör ön plana çıkmaktadır:

- a. Ana iskeletin veya matriksin yapımında kullanılan hammadde
- b. Çözünürlüğü düşüren ve çapraz bağ oluşumunu sağlayan kimyasal ajanlar
- c. İyon değişimini sağlayan iyonik grupların tipi ve sayısı

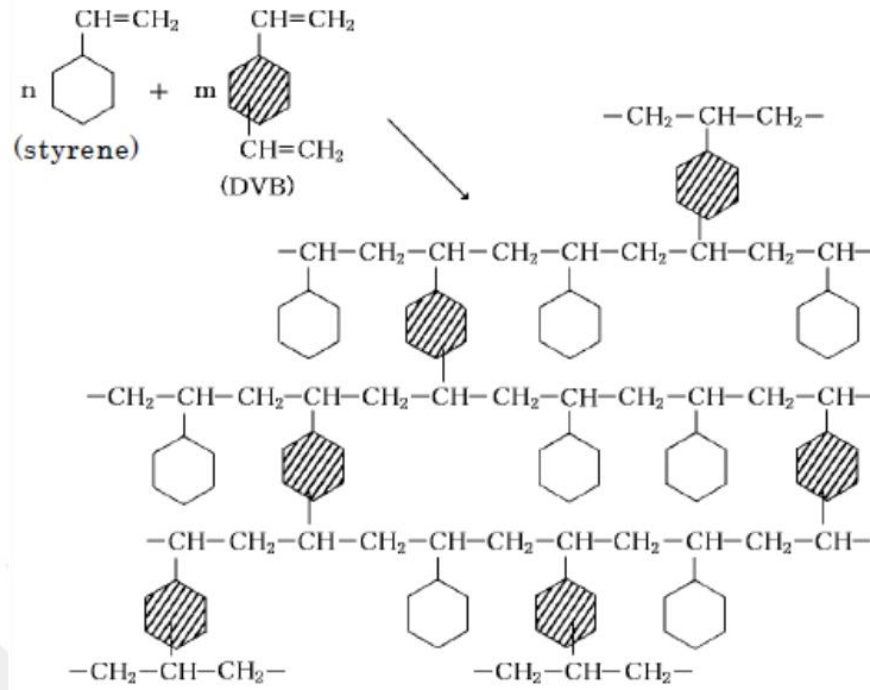
Matriks oluşumunda, esasında polimerizasyon ve polikondensasyon sentez rotası izlenmektedir. Ancak polimerizasyon reçinelerinin, polikondensasyon reçinelerine göre daha yüksek termal ve kimyasal stabiliteye sahip olmalarından dolayı önemi daha fazladır. Kuvvetli asidik ve kuvvetli bazik tip iyon değiştiricilerin üretilmesinde ana hammadde olarak genelde stiren kullanılmaktadır. Stiren, kendisiyle ve divinilbenzen ile polimerize (çapraz bağlama) edilmektedir (Şekil 6.1.) (Zagorodni, 2007).



Şekil 6.1. Polimerik iyon değiştiricilerin şematik gösterimi. 1. Polimerik zincir; 2. Çapraz bağ; 3. Fiziksel çapraz (düğüm) noktası; 4. Zincire bağlı negatif yüklü kation değiştirici grup; 5. Zincir içerisindeki pozitif yüklü anyon değiştirici grup; 6. Karşılık gelen iyon; 7. Su (Zagorodni, 2007, Diaion Manual, 2008)

Sentetik iyon değiştirici reçineler, polimer ağ yapılarına göre jel (gel), makro gözenek (macroporous), makro kafes yapı (macroreticular), iso gözenek (isoporous) gibi farklı tiplerde olmakta ve adlandırılmaktadır (Dorfner, 1990).

Polimer matriks yapının elde edilmesi için, stiren ve divinilbenzen polimerizasyonu ile oluşturulan ağı yapı jel (gel) tip iyon değiştirici reçine olarak bilinir. Jel olarak isimlendirilmesinin nedeni, makroskopik olarak homojen bir ağ yapısına sahip olması ve elastik özellik göstermesidir. Aslında, jel tip iyon değiştirici reçineler polimer ağ yapıları içerisinde gözenek bulundurmazlar. Stiren ve divinilbenzen oranları değiştirilerek elde edilecek reçine özellikleri değiştirilebilir. Bu önemli husus, reçinenin şişme (swelling) özelliğini doğrudan etkiler. Bu nedenle jel tip reçineler, çok hızlı şişebilme özelliğine sahip olup, şişme sonucu ağ yapılarındaki genişlemeden dolayı yüksek moleküllü iyonların reçine içerisine geçişini kolaylaştırırlar (Dorfner, 1990). Stiren-divinilbenzen kopolimerinin kimyasal yapısı Şekil 6.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 6.2. Stiren-divinilbenzen kopolimerinin kimyasal yapısı (Diaion Manual, 2008)

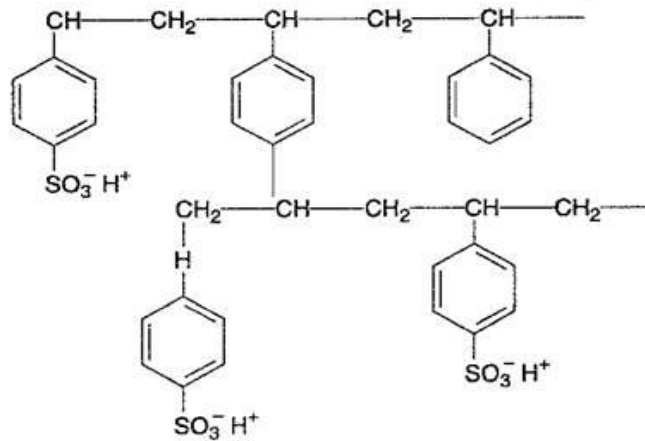
Makro gözenek reçineler (macroporous), oldukça yüksek oranda çapraz bağlardan oluşurlar. Yüksek oranda iyonik yük kapasitesi olan, yoğun ve çapraşık yapı olarak oldukça heterojen bir dağılım gösterirler. Bu nedenle, makropor reçineler, inorganik iyonlar için jel tip reçinelere göre çok daha büyük çekim kuvveti (afinite) gösterirler. Bu çekim kuvvetinden dolayı, bazen iyon değiştirebilme oranları fark edilebilir derecede yavaş olur. Ancak büyük ve yüksek moleküllü iyonik gruplar söz konusu olduğunda, makropor reçinelerin, özelliklerinden dolayı önemi ortaya çıkar. Çünkü makropor reçineler, fonksiyonel iyonik gruplar içeren gözeneklere sahiptir ve bundan dolayı iyon difüzyonunun ve serbest bırakılmasının oldukça kolay sağlandığı reçinelerdir (Zagorodni, 2007).

Sentetik reçineler üretilirken, çapraz bağlı polimer matriks içerisine iyonik fonksiyonel gruplar yerleştirilir. $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ gibi iyonik gruplar polimer iskelet yapısına doğrudan veya dolaylı bir şekilde bağlanabilir (Nasef ve Ujang, 2012). Kimyasal olarak bağ oluşturan iyonik fonksiyonel gruplar ve fonksiyonel gruplara göre iyon değiştirici reçinenin tipi Tablo 6.2.'de belirtilmiştir.

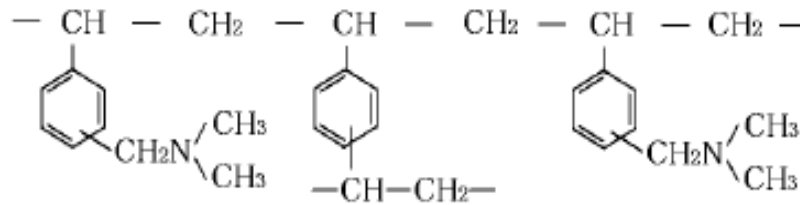
Tablo 6.2. Bazı polimerik iyon değiştirici reçinelerin fonksiyonel grupları (Nasef ve Ujang, 2012)

Anyon değiştirici reçinelerin fonksiyonel grupları	Katyon değiştirici reçinelerin fonksiyonel grupları
$\equiv N^+$	$-SO_3H$
$=N$	$-PO_3H_2$
$=NH$	$-COOH$
$-NH_2$	$-OH$

Fonksiyonel grupların kimyasal özellikleri, aynı zamanda iyon değiştirici reçinelerin tipini de tanımlar. Anyon ve kation değiştiriciler pozitif ve negatif yüklü grupları ihtiva ederler, dolayısıyla, anyonları ve kationları değiştirebilirler (şekil 6.3., şekil 6.4.). Kuvvetli ve zayıf elektrolitler de benzer şekilde, fonksiyonel grupların çözünürlük özelliklerine göre kuvvetli ve zayıf iyon değiştiriciler olarak tanımlanırlar (Zagorodni, 2007).

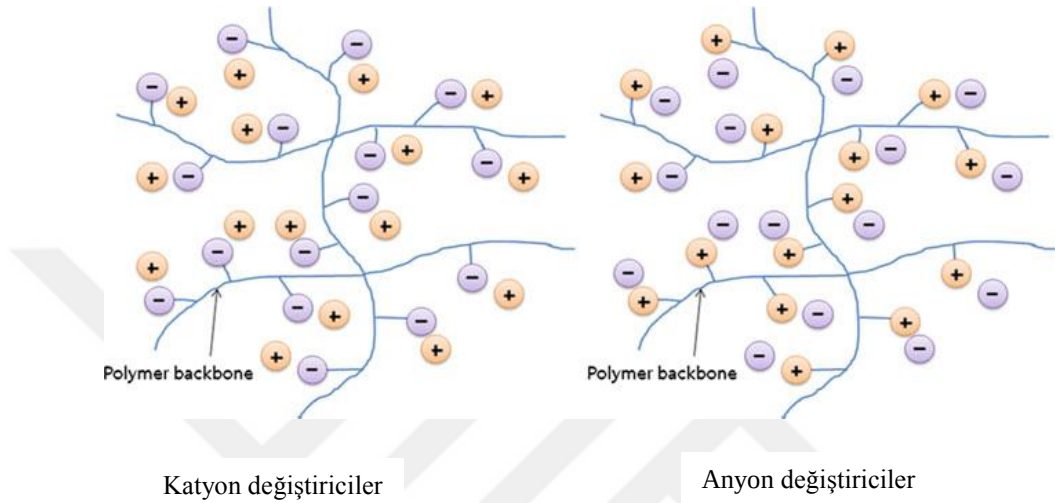


şekil 6.3. Kuvvetli asidik kation değiştirici reçinenin kimyasal yapısı (Diaion Manual, 2008; Park, 2012)



şekil 6.4. Zayıf bazik anyon değiştirici reçinenin kimyasal yapısı (Diaion Manual, 2008; Park, 2012)

İyon değiştirici reçinelerin üretimi esnasında sülfonik asit ($-SO_3H$) ve kuaterner amonyum ($\equiv N^+$) gibi fonksiyonel iyonik gruplar reçine ağ yapısı içerisine yerleştirilir. Bu iyonlar, polimer yapısı içerisinde kimyasal olarak bağlı bulunduklarından “sabitlendirilmiş (fixed) iyonlar” olarak adlandırılırlar. Hareketli (mobil) iyonlar, sabit tutulan bu iyonlar vasıtasıyla nötralize edilirler (şekil 6.5.) (Park, 2012).



şekil 6.5. Katyon ve anyon değiştirici reçinelerin kimyasal yapısının şematik diyagramı (Park, 2012)

Çapraz bağlı reçine yoğunluğu, divinilbenzen (DVB) ile stiren arasındaki orana bağlı olarak, çapraz bağ derecesine göre değişkenlik gösterir. Yani, DVB miktarı arttıkça kopolimer içerisindeki çapraz bağ oranı artacağından, yoğunluğu yüksek iyon değiştirici reçine elde edilir. DVB oranı azaldığında çapraz bağlar seyrekleşeceğinden elde edilen reçinenin yoğunluğu da azalır. DVB’nin stirene oranı ortalama %8 olduğunda, standart çapraz bağın gerçekleştiği ifade edilmektedir (Diaion Manual, 2008).

Stiren ve DVB kopolimerinin su absorblama özelliği bulunmamaktadır. İyon değiştirici fonksiyonel gruplar eklendiğinde, su absorblama özelliği kazanmaktadırlar. Dolayısıyla, iyon değiştirici fonksiyonel grup eklenmiş reçineler su içerisine bırakıldığında bir miktar su absorblayarak şişer (swelling). Bu, tutturulmuş iyonlarla karşılık gelen mobil iyonlar arasındaki hidrasyon reaksiyonundan ve osmotik basıncıtan kaynaklanmaktadır. Hidrasyon ve şişme olayı doğunluğa ulaştığında biter. Bu nedenle reçineler su içerisine bırakıldığında, hacimsel olarak bir miktar genleşir.

Bu aynı zamanda reçinenin çapraz bağ oranını göstermesi açısından önemlidir. Çapraz bağ oranı arttıkça, su absorblama kapasitesi azalacaktır (Park, 2012; Diaion Manual, 2008).

İyon değiştirici reçineler oluşturulurken polimer matriks içerisine yerleştirilen iyonik fonksiyonel gruplar, reçinenin tipi, iyon değiştirme kapasitesi gibi özelliklerini belirlerken, aynı zamanda fonksiyonel iyonik grupların da mobil iyonlar için seçicilik özelliğini de beraberinde getirir (Diaion Manual, 2008). İyon yüklerine göre iyon değiştirici reçinelerin karşılaştırmaları Tablo 6.3.'te belirtilmiştir.

Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçineler genel olarak, her pH ortamında iyonlarına ayrışırlar, nötral tuzlarda bile iyon değiştirme yapabilirler, yüksek bir reaksiyon hız oranına sahiptirler. HCl ve H₂SO₄ ile kolaylıkla rejenere edilirler.

Zayıf bazik anyon değiştirici reçineler ise amonyum hidroksit gibi zayıf bazik özelliktedir. Nötral ve zayıf asidik çözeltilerde ayrışırlar. Değiştirilen iyonun hidroliz olması kolaydır. NaOH, Na₂CO₃ veya NH₄OH ile teorik değerlerden daha az miktarlarda kolaylıkla rejenere edilirler. Reaksiyon hız oranları düşüktür (Diaion Manual, 2008).

Tablo 6.3. İyon yüklerine göre iyon değıştirci reçinelerin karşılaştırmaları (Diaon Manual, 2008)

Kuvvetli Asidik İyon Değıştirci Reçineler	Zayıf Asidik İyon Değıştirci Reçineler
Suda çözünmez, kuvvetli asidik mineral asitler	Suda çözünmez, zayıf asidik organik asitler
Nötral tuzlarda bile katyon değıştirebilirler	Bazlarda (NaOH) ve bazik tuzlarda (CaHCO ₃) katyon değıştirebilirler fakat, nötral tuzlarda değıştiremezler
Düşük konsantrasyonlu çözeltilerdeki katyon seçicilikleri [Ba ²⁺ > Ca ²⁺ > Mg ²⁺] [K ⁺ > NH ₄ ⁺ > Na ⁺ > H ⁺]	Kuvvetli Asidik Katyon Değıştircilerle hemen hemen aynı fakat H ⁺ seçiciliğı divalent katyonlardan daha yüksek
Kuvvetli Bazik İyon Değıştirci Reçineler	Zayıf Bazik İyon Değıştirci Reçineler
Suda çözünmez, kuvvetli bazik, NaOH gibi	Suda çözünmez, zayıf bazik, amonyum hidroksit gibi
Nötral tuzlarda bile anyon değıştirebilirler	Mineral asitlerle ve NH ₄ Cl gibi asidik tuzlarla anyon değıştirebilirler fakat, normal şartlarda asidik tuzlarla anyon değıştiremezler
Düşük konsantrasyonlu çözeltilerde anyon seçicilikleri; SO ₄ ²⁻ > HSO ₄ ⁻ > NO ₃ ⁻ > Cl ⁻ > HCO ₃ ⁻ > OH ⁻	Anyon seçicilikleri; OH ⁻ > SO ₄ ²⁻ > NO ₃ ⁻ > Cl ⁻

BÖLÜM 7. MATERİYAL VE YÖNTEM

7. 1. Materyal

Fermentasyon çalışmalarında kullanılan ve homofermentatif bir bakteri olan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 7830 suşu, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi'nden liyofilize olarak temin edilmiştir.

Mısır ve kepeği ve maserasyon suyu İstanbul'da faaliyet göstermekte olan PNS Pendik Nişasta San. A.Ş. fabrikasından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan kimyasallar: MRS Broth (Merck), Demir III Klorür (Merck), Sodyum Hidroksit (Merck), Hidroklorik Asit (Merck), Sülfürik Asit (Merck), Laktik Asit (Merck).

Mısır kepeğinin hidrolizasyon işlemlerinde kullanılan enzimler: Bakteriyel alfa amilaz (Termamyl Supra, Novozymes), Glukoamilaz-pullulunaz (Optimax 4060, DuPont), Fungal alfa amilaz (Fungamyl, Novozymes), Pullulunaz (Promozyme, Novozymes).

Laktik asit saflaştırma işlemlerinde kullanılan iyon değiştirici reçineler: Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine (DIAION UBK08, Mitsubishi), zayıf bazik anyon değiştirici reçine (RELITE RAM1S, Mitsubishi).

7. 2. Besiyerinin ve Bakteri Kültürünün Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan MRS Broth besiyerinin bileşenleri Tablo 7.1.'de belirtilmiştir. Liyofilize haldeki mikroorganizma MRS Broth besiyerine aktarılmış olup stok kültür olarak kullanılmaktadır. Fermentasyon öncesi taze bakteri kültürleri hazırlanmaktadır.

Tablo 7.1. MRS Broth besiyeri bileşenleri (Hayek ve ark., 2019)

Bileşenler	(g/L)
Kazein peptonu	10,0
Et özütü	8,0
Maya özütü	4,0
D (+) Glukoz	20,0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,0
Tween 80	1,0
Di-amonyum hidrojen sitrat	2,0
Sodyum asetat	5,0
Magnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,04

7. 3. Mısır Kepeğinin Hidrolizasyonu

Fermentasyon çalışmalarında substrat olarak mısır kepeğinin (Şekil 7.1.) ve üzerinde kalan (bağıl) nişastanın hidrolizasyonu ile elde edilen şeker, karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 7.1. Mısır kepeği

Mısır kepeğinde yapılan analizlerin (kuru madde bazında) sonuçları Tablo 7.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 7.2. Mısır kepeği analiz sonuçları

Analiz	Sonuç	Metot (URL-2, 2019)	Kullanılan Cihaz
Serbest nişasta	%6,5	CRA	Polarimetre – BellinghamStanley
Bağıl nişasta	%14,5	CRA	Polarimetre – BellinghamStanley
Toplam nişasta	%21	CRA	Polarimetre – BellinghamStanley
Protein	%7	CRA – Kjeldahl	Gerhardt Kjeldahtherm KB8, Vapodest40
Yağ	%0,99	CRA – Soxhelet	Gerhardt Soxtherm 2000
Nem	%6	CRA	Mettler Toledo HB43

Kepek, laboratuvar değirmeninde (Retsch ZM200) öğütüldü. Toplamda 450 g kuru madde bazında kepek alınarak 4500 mL distile su ile tamamlandı. Üzerine %50'lik (w/v) H₂SO₄ ilave edilerek 1,6, 1,8 ve 2,2 pH değerlerinde ara ara karıştırılarak ortalama 24 saat bekletildi. Sonrasında 121°C'de, 1 atm basınç altında 45, 90 ve 180 dk otoklavlandı.

Her bir pH değeri ve otoklavlama süresi sonunda hidroliz edilen nişastanın HPLC ve HMF (Hidroksimetilfurfural) analizleri yapıldı. İşlemler sonucunda en yüksek şeker konsantrasyonu ile en düşük HMF konsantrasyonu 1,8 pH değerinde ve 90 dk'lık otoklavlama süresi sonucunda elde edildi. Tekrarlanan çalışmalarda bu şartlar altında sonuçların birbirine uygun olduğu belirlendi. Şeker konsantrasyonu ve HMF analizlerinde kullanılan HPLC'lerin çalışma koşulları Tablo 7.3. ve Tablo 7.4.'te belirtilmiştir.

Tablo 7.3. Şeker konsantrasyonu analizinde kullanılan HPLC'nin çalışma koşulları

HPLC	Kolon	Taşıyıcı Faz	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	Kolon Sıcaklığı	Detektör
Agilent 1100	Sugar Pak	Su	0,5 mL/dk	20 µL	80°C	RI

Tablo 7.4. HMF analizinde kullanılan HPLC'nin çalışma koşulları

HPLC	Kolon	Taşıyıcı Faz	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	Kolon Sıcaklığı	Detektör
Agilent 1100	Waters Bondapak	Potasyum fosfat mono bazik	0,8 mL/dk	50 µL	25°C	UV

Otoklavlama işlemi sonrasında oluşan kepek bulamacı fermentöre boşaltılıp, 2,5 N NaOH kullanılarak pH 5,2'ye ayarlandı. Fermentör 80°C'ye ayarlanarak, yüksek ısıya dayanıklı (heat-stable) bakteriyal alfa amilaz enzimi (Termamyl Supra, Novozymes) ilave edildi. Her 3 saatte bir numune alınarak nişastanın hidrolizi sonucu oluşan şekerlerin HPLC analizi yapıldı. Ortalama 8 saat sonra maksimum şeker konsantrasyonu değerine ulaşıldığı belirlendi. Sonrasında fermentörün sıcaklığı 55 °C'ye düşürüldü ve ortamın pH'ı 4,8'e ayarlandı. Fermentöre diğer enzimler; glukoamilaz-pullulunaz (Optimax 4060, DuPont), fungal alfa amilaz (Fungamyl, Novozymes) ve pullulunaz (Promozyme, Novozymes) ilave edildi. Her 6 saatte bir numune alınarak nişastanın hidrolizi sonucu oluşan şekerlerin HPLC analizi yapıldı. Ortalama 24 saatin sonunda belirlenen enzim konsantrasyonlarında ortalama %9'luk toplam şeker değerlerine ulaşıldı.

Bakteriyal alfa amilaz; yüksek sıcaklıkta nişasta polimerlerinin kristal yapısının bozulması sonucu enzim etkinliğini arttırarak nişasta polimerinin alfa 1-4 ile alfa 1-6 glikozidik bağlarını rastgele, düzensiz bir şekilde hidroliz ederek, diğer enzimlerin rahatça kullanabileceği daha düşük zincir yapılı polimerler (oligomerler) elde edilmesini sağlar. Glukoamilaz; doğrudan alfa 1-4 bağları üzerinde etkilidir. Oligomerlerdeki bağları kopararak monomerik şekerlerin ortaya çıkmasını sağlar. Pullulunaz; doğrudan alfa 1-6 bağları üzerinde etkilidir. Alfa 1-6 bağları parçalandığında ortaya çıkan alfa 1-4 bağlarının Glukoamilaz tarafından daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Fungal alfa amilaz; nişasta polimer zincirindeki dallanmış noktalardaki glikozidik bağların koparılmasıyla, uzun ve dallanmış durumdaki nişastanın, zincir kalıntısı bırakmayacak şekilde hidrolizini

gerçekleştirerek, diğer enzimlerin kullanmasına hazır hale getirmektedir (Dien ve ark., 2006; Nouredini ve ark., 2009; Eylon ve ark., 2011; Kumar ve ark., 2018).

Enzim işlemleri sonrası kepek bulamacı süzülüp filtre edildi, sonrasında da 4200 rpm de ortalama 1 saat santrifüj (Centaur 2 MSE) yapıldı. Likit faz ayrılarak fermentasyon sıvısı elde edildi, geriye kalan tortu kısmı ise atıldı.

%9'luk toplam şeker konsantrasyonunda elde edilen fermentasyon sıvısının toplam şeker konsantrasyonu, %6 ve %3 olarak ayarlanıp, fermentasyonlar ayrı ayrı yapıldı.

7.4. Maserasyon Suyunun Hazırlanması

Fermentasyon çalışmalarında mikroorganizma büyüme ortamında azot kaynağı olarak maserasyon suyu (Şekil 7.2.) kullanılmıştır. Fermentasyona başlanılmadan önce, maserasyon suyu 121°C'de, 1 atm basınç altında 15 dakika boyunca steril edilmiştir.



Şekil 7.2. Maserasyon suyu

Laktik asit bakterilerinin besiyeri olan MRS Broth besiyerinin reçetesindeki toplam protein içeriği %2,2 olarak belirtilmiştir (Kazein peptonu 10 g/L, Et özütü 8 g/L, Maya özütü 4 g/L).

Maserasyon suyunun, fermentasyon sıvısındaki protein oranını ayarlamak için, kuru madde oranı ve protein değeri belirlendi (Tablo 7.5.). Fermentasyon ortamındaki nihai protein oranı %3 olacak şekilde hesaplanarak hazırlandı.

Tablo 7.5. Maserasyon suyu analiz sonuçları

Analiz	Sonuç	Metot (URL-2, 2019)	Kullanılan Cihaz
Kuru madde	%42	CRA	Mettler Toledo HB43
Protein	%41	CRA - Kjeldahl	Gerhardt Kjeldahtherm KB8, Vapodest40

7.5. Fermentör Düzenegi ve Fermentasyon Çalışmaları

Çalışmalarda 7 L hacminde, paslanmaz çelikten fermentör kullanılmıştır (Şekil 7.3.). Fermentör; otomatik kontrollü ısıtma (veya soğutma) sağlayabilmek amacıyla cidarlı-su sirkülasyonlu, pH ve karıştırıcı hızı kontrollüdür. Fermentörün içerisinde vorteks oluşumunun önlenmesini sağlayan dalgakıranlar mevcuttur. Fermentör kapağı üzerinde giriş-çıkış boru bağlantıları (mikroorganizma ilavesinin ve pH kontrolü için baz ilavesinin yapıldığı), karıştırıcı (farklı karıştırma hızlarına ayarlanabilen, dört kanatlı) ve pH elektrodu (Smartpat PH 8570, Krohne) yer almaktadır. Fermentörün alt yan kısmında numune alınmasını sağlayan küresel vana bulunmaktadır. Fermentörün yan kısmında ise iki adet dozaj pompası (AnTech LARA DS) mevcuttur.



Şekil 7.3. Çalışmalarda kullanılan fermentör ve düzeneği

Fermentasyon çalışmalarında, mikroorganizma olarak, homofermentatif laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 7830 suşu kullanılmıştır. Fermentasyon sıvısı olarak; mısır kepeğinin ve üzerindeki bağlı nişastanın hidrolizasyonu sonucu oluşan substrat ve azot kaynağı olarak maserasyon suyu kullanılmıştır.

Mısır kepeğinin hidrolizasyonu sonucu elde edilen ve HPLC analizi ile belirlenen %9'luk toplam şeker konsantrasyonunda olan fermentasyon sıvısının toplam şeker konsantrasyonu %6 ve %3 oranlarında seyreltilerek, ayrıca fermentasyon sıvısının protein oranı %3 olacak şekilde maserasyon sıvısının eklenmesiyle, fermentasyon çalışmaları ayrı ayrı ve üçer tekrarlı olarak yapılmıştır.

Fermentasyonlar; 5,5 L çalışma hacminde, 5,5-6,5 pH aralığında, 42°C sabit sıcaklıkta, 200 rpm devir hızında, kesikli fermentasyon işlemi ile gerçekleştirildi. pH aralığının 5,5-6,5 arasında tutulması için 1,5 N'lik NaOH kullanıldı.

Çalışmalar süresince sabit karıştırma hızında ve sıcaklıkta; tüketilen substrat konsantrasyonu, üretilen laktik asit konsantrasyonu ve biyokütle takip edildi ve tablolara kaydedildi.

7.6. Analiz Yöntemleri

Fermentasyon süresince, fermentasyon ortamından her dört saatte bir alınan 30 mL’lik örneklerde biyokütle, şeker konsantrasyonu ve laktik asit konsantrasyonu analizleri yapılarak veriler elde edilmiştir.

7.6.1. Mikroorganizma konsantrasyonu / biyokütle tayini

Mikroorganizma konsantrasyonu ölçümünde; biyokütlenin daha kolay ve etkin çökmesi için pH 1,5-2,0 arası olacak şekilde asidifiye edilen 30 mL’lik örnekler 4200 rpm de 1,5 saat süresince santrifüj (Centaur 2 MSE) edilmiştir. Süpernatant kısımları ayrılan örnekler 105°C etüvde (Gallenkamp Oven 300) sabit tartıma gelene kadar bekletilerek kurutulmuştur. Sonrasında hassas terazide (Mettler Toledo ML204T, hassasiyet 0,0001 g) tartımları alınmıştır. Ayrılan süpernatant kısımlar şeker ve laktik asit analizleri için kullanılmıştır.

7.6.2. Şeker konsantrasyonu tayini

Şeker konsantrasyonu analizleri için HPLC cihazı kullanılmıştır (URL-2, 2019). Cihazın çalışma koşulları Tablo 7.3’te belirtilmiştir.

7.6.3. Laktik asit tayini

Laktik asit tayininde birçok yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında; titrimetrik ölçüm, HPLC, enzimatik yöntem, laktik asidin oksidasyon metodu (laktik asidin, asetik aldehite oksidasyonu sonucu aldehitin bisülfid metodu ile belirlenmesi) ve yeni, geliştirilmeye açık ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça iyi

sonuçlar veren spektrofotometrik yöntem bulunmaktadır (Borshchevskaya ve ark., 2016).

Çalışmalarımızda, laktik asit tayini için titrimetrik ölçümler ile birlikte spektrofotometrik ölçümler de yapılmıştır. Her iki ölçüm metodu ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış olup, sonuçların birbirleri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Kullandığımız spektrofotometrik metot; laktat iyonlarının, Demir (III) klorür ile reaksiyonu sonucu oluşan rengin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Borshchevskaya ve ark. (2016) laktik asidin spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada (korelasyon katsayısı 0,9999), laktik asit içeren test zltilerinin (50 μ L), 2 mL %0,05-%0,3 aralığındaki Demir (III) klorür konsantrasyonlarında, reaksiyon sonucu oluşan renk 390 nm’de ölçülmüştür. Optimum değerlerin %0,2’lik Demir (III) klorür konsantrasyonunda elde edildiği belirtilmiştir. Ölçümler sonucu bulunan laktik asit konsantrasyonları HPLC metodu sonuçları ile karşılaştırılmış ve sonuçlar arasındaki farkın güvenilirlik limitleri içerisinde kaldığı belirtilmiştir.

Yaptığımız çalışmada; fermentasyon sıvısı ve %10 laktik asit içeren stok test zltileri hazırlanmıştır. Toplam şeker konsantrasyonunun, absorbans ölçümleri üzerindeki etkisini tespit edebilmek amacıyla fermentasyon sıvıları %4, %10 ve %16 toplam şeker içerecek şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır.

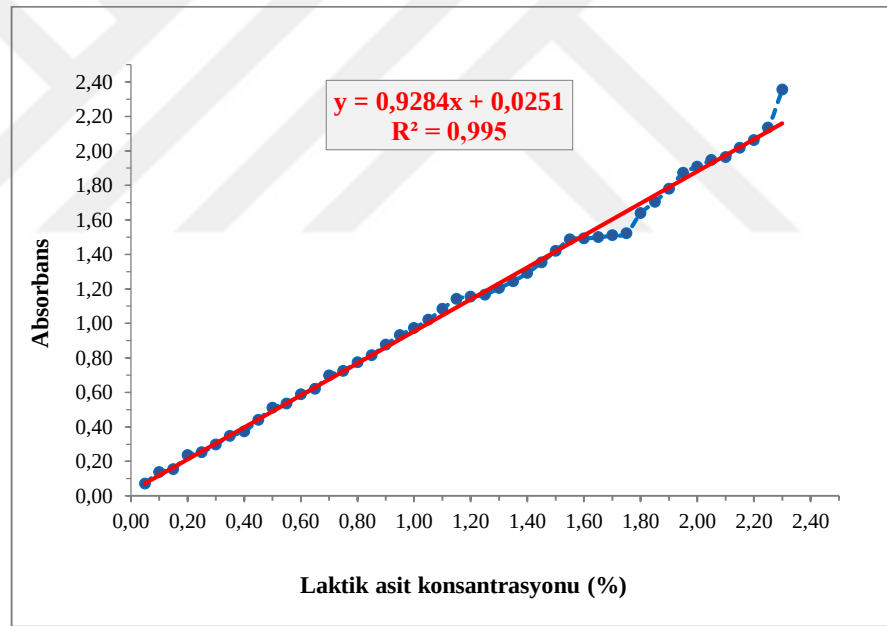
Spektrofotometre ölçümlerinde, hazırlanan stok test zltilerinden %0,05’er aralıklarla dilüsyon yapılarak hazırlanan, %0,05-2,0 laktik asit konsantrasyon aralığındaki 40 adet çözülti kullanılmıştır. Hazırlanan zltilerin %0,05 konsantrasyondaki Demir (III) klorür’n (Merck) ile reaksiyonları sonucu oluşan renk ölçümleri, 390 nm dalga boyunda, oda sıcaklığında ($25\pm 5^\circ\text{C}$) yapılmıştır.

Demir (III) klorür zltisinin stabilitesi, hızlı değişim gösterdiğinden, taze hazırlanmış zltiler kullanılmıştır. Ölçümler, zltiler hazırlandıktan sonra maksimum 15 dk içerisinde yapılmıştır. Ayrıca, spektrofotometrenin en stabil, en hassas ve en tekrarlanabilir ölçüm değerleri %0,05 Demir (III) klorür

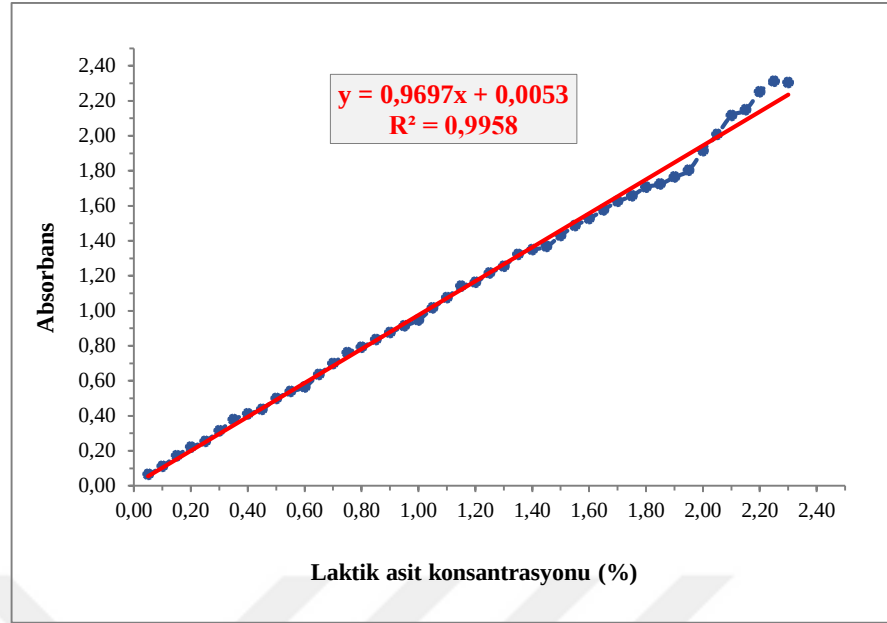
konsantrasyonunda elde edildiğinden dolayı, Demir (III) klorür için optimum konsantrasyon %0,05 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen absorbans ölçüm değerleri ile regrasyon analizi (excel) yapılmıştır. Her bir stok test çözeltisi için elde edilen analizlerin sonucu doğrusal denklem elde edilmiş olup, elde edilen denklemlerin regrasyon sonuçlarındaki R^2 değerleri; sırasıyla, 0,9950, 0,9958 ve 0,9980 olarak hesaplanmıştır (Şekil 7.4., Şekil 7.5., Şekil 7.6.).

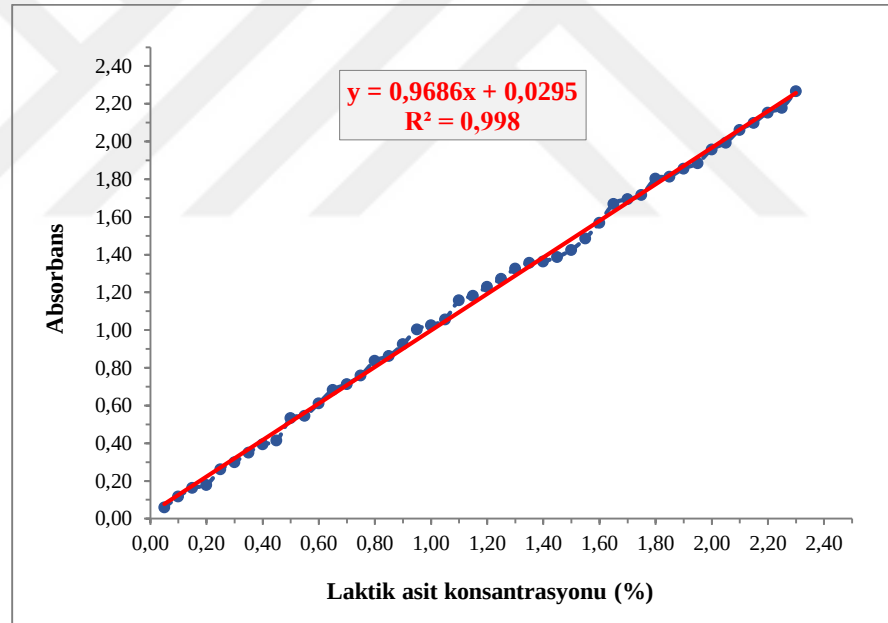
R^2 değerlerine göre, her ne kadar toplam şeker konsantrasyonunun absorbans değerleri üzerinde çok etkili olmadığı sonucuna varılmış olursa da en yüksek regrasyon katsayısı elde edilen %16 toplam şeker konsantrasyonu ihtiva eden fermentasyon sıvısının test sonucu kullanılmıştır.



Şekil 7.4. %4 toplam şeker içeren test çözeltisinin standart grafiği



Şekil 7.5. %10 toplam şeker içeren test çözeltisinin standart grafiği



Şekil 7.6. %16 toplam şeker içeren test çözeltisinin standart grafiği

7.7. İyon Değiştirici Reçine Uygulaması

Fermentasyon çalışmaları sonucu üretilen laktik asidin, yeni bir yöntem olarak uygulanmaya başlanan iyon değiştirici reçine yöntemi ile fermentasyon ortamından saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır (Şekil 7.10.).

İyon değiştirici işlemi; herhangi bir matriks içerisine veya üzerine tutturulmuş aktif bir iyonun, çözelti (fermentasyon sıvısı) içerisinde bulunan iyonik madde (karşıt iyon) ile yer değiştirmesi temeline dayanmaktadır (Li ve ark., 2016; Komesu ve ark., 2017a).

Çalışmalarımızda, fermentasyon sıvısından laktik asit saflaştırılması işleminde kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine (DIAION UBK08, Mitsubishi) (Şekil 7.7.) ve zayıf bazik anyon değiştirici reçine (RELITE RAM1S, Mitsubishi) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan iyon değiştirici reçinelerin özellikleri Tablo 7.6.'da belirtilmiştir.

Tablo 7.6. Çalışmada kullanılan iyon değiştirici reçinelerin özellikleri (Diaion Manual, 2008)

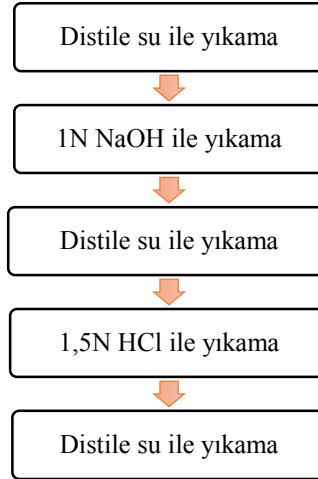
Ticari ismi	RELITE RAM1S (Mitsubishi)	DIAION™ UBK08 (Mitsubishi)
Cinsi	Zayıf Bazik Anyon Değiştirici	Kuvvetli Asidik Katyon Değiştirici
Matriks	Stiren-divinilbenzen	Stiren-divinilbenzen
Fonksiyonel grup	Tersiyer amin	Sülfonik asit
İyonik form	Cl ⁻	Na ⁺
Maksimum çalışma sıcaklığı (°C)	80	120
pH çalışma aralığı	0-9	0-14
Rejenerant	NaOH	HCl
Rejenerant konsantrasyonu (%)	NaOH 2-6	HCl 4-10



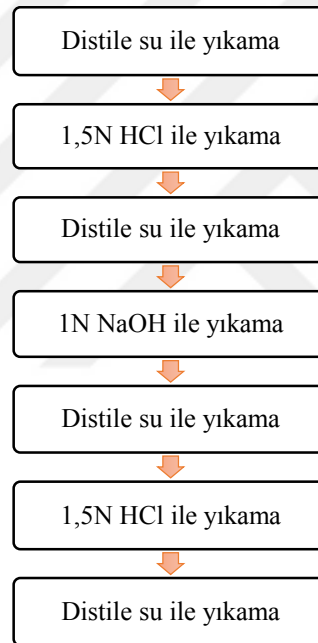
Şekil 7.7. Çalışmada kullanılan katyon değiştirici reçine

İyon değiştirici reçine uygulamasında proses basamakları aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

- a. Biyokütle ve diğer tortulardan arındırmak için, fermentasyon sıvısı 4200 rpm'de 1,5 saat santrifüjden geçirildi.
- b. Çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- c. Tedarik edilen reçinelerdeki hem kirlilikleri uzaklaştırmak hem de ilk kullanımlarına hazırlamak için, reçineler sırasıyla aşağıdaki yıkama işlemlerinden geçirilmiştir (Şekil 7.8., Şekil 7.9.). Asidik katyon değiştirici reçine; aktif grup olarak Na^+ formunda olan yükünü H^+ formuna dönüştürmek için, HCl ile yıkanır. Zayıf bazik anyon değiştirici reçine; aktif grup olarak serbest bazik formunda olan yükünü Cl^- iyonik formuna dönüştürmek için, HCl ile yıkanır.



Şekil 7.8. Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinenin yıkama basamakları



Şekil 7.9. Zayıf bazik anyon değiştirici reçinenin yıkama basamakları

- d. Kullanıma hazır hale getirilmiş reçineler, sabit yatak çalışma (fixed-bed operation) prensibinde hazırlanan kolonlar içerisine yerleştirildi. 4,2 cm iç çapında ve 90 cm boyunda fiber-glass kolonlar kullanıldı. Kolonların alt çıkış kısmına, akışı engellemeyecek kadar sayıda yaklaşık 2 mm çapında delikler açılan EPDM (Ethylene Propylene Diene Monomer) türü conta yerleştirilmiştir. Reçine kaçaklarını önlemek için contanın üzerine ise ince bir tabaka halinde ham pamuk yerleştirilmiştir. Reçinelerin yeterli genleşme

seviyelerine ulaşmaları için, her iki reçine de ortalama 24 saat distile su içerisinde bekletilmiştir.

- e. Her iki kolonda da reçine seviyesi 80 cm olarak ayarlanmıştır.
- f. Kolonlardan birine kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinesinden 930 g, diğerine ise zayıf bazik anyon değiştirici reçinesinden 776 g yerleştirildi.
- g. Ürün; 14 mL/dk akış oranında yukarıdan aşağıya doğru, dozaj pompaları tarafından her iki kolon içerisine beslenmiştir.
- h. Reçineden çıkan üründen her 300 mL’de bir numune alınarak pH ve laktik asit miktarı analizleri yapılmıştır.
- i. Ölçüm sonuçlarına göre besleme ve çıkıştaki laktik asit konsantrasyonları birbirine yaklaştığında reçinenin doyumluk derecesine ulaştığı yani laktik asit tutma kapasitesinin maksimum seviyeye ulaştığı belirlenir.
- j. Reçinede kalan laktik asidin, su ile alınabilecek kısmını elde etmek için reçineler distile su ile yıkandı. Ne kadar yıkama suyu kullanılacağına karar vermek için, yıkama devam ederken belirli aralıklarda alınan örneklerde pH ölçümleri yapıldı.
- k. Yıkama sularındaki laktik asit konsantrasyonu titrimetrik ölçüm ile belirlendi ve sonuçlar tablolara kaydedildi.
- l. Yıkama işlemi gerçekleştirilen reçinelerin, ilk önce reçine yüzeyinde kalıntı oluşturabilecek ve rejenarasyon etkinliğini düşürecek, fermentasyon sıvısı kaynaklı protein ve yağ gibi kirliliklerden arındırılması için NaOH ile yıkandı. Sonrasında reçine, distile su ile yıkandı, NaOH giderildikten sonra HCl ile yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra tekrar distile su ile yıkandı. Böylelikle reçineler tekrar kullanıma hazır hale getirildi. Çalışma sırasında rejenerasyon işlemleri, reçineler boşaltılmadan kolonlar içerisinde yapılmıştır.



řekil 7.10. İyon deęiřtirici reęine uygulamasının dűzeneęi

BÖLÜM 8. ARAŞTIRMA BULGULARI

8.1. Fermentasyon Sonuçları

8.1.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları

Fermentasyona; %8,94 toplam şeker ve 1,327 g/L mikroorganizma konsantrasyonu ile başlanılmıştır. Belirlenen koşullarda fermentasyon 75 saatte gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince her dört saatte bir alınan 30 mL'lik örneklerde biyokütle, toplam şeker ve laktik asit analizleri yapılarak veriler elde edilmiştir.

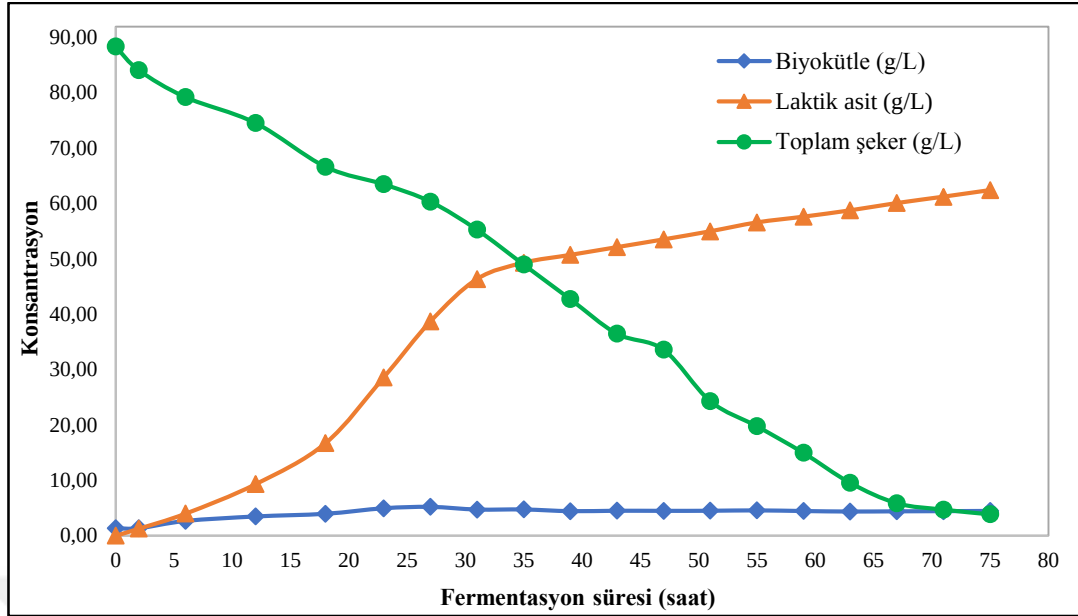
Fermentasyona 1,32 g/L biyokütle konsantrasyonu ile başlanılmış olup fermentasyon süresi içerisinde bu değer maksimum 5,2 g/L, ortalamada ise 4,04 g/L olmuştur.

Fermentasyon sonunda laktik asit üretimi titrimetrik metot ile 62,42 g/L hesaplanırken, spektrofotometrik metot ile 60,74 g/L olarak ölçülmüştür. Toplam verimlilik ise 0,71 (g laktik asit/g toplam şeker) olarak hesaplanmıştır. Mikroorganizma, şeker ve laktik asit konsantrasyonlarına ait sonuçlar Tablo 8.1.'de belirtilmiştir. Fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği Şekil 8.1.'de gösterilmiştir.

Fermentasyon sonunda, ortalama %71 verimle elde edilen laktik asit konsantrasyonu %6,2 olarak belirlenmiştir.

Tablo 8.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları

Zaman (saat)	Mikroorganizma Konsantrasyonu (g/L)	Şeker Konsantrasyonu		Laktik Asit Konsantrasyonu (g/L)	
		Glikoz Kons. (g/L)	Toplam Şeker Kons. (g/L)	Titrasyon	Spektrofotometre
0	1,327	53,8913	89,48	0,00	0,00
2	1,337	29,7803	84,11	1,28	1,24
6	2,647	15,5036	79,24	4,00	5,08
12	3,457	7,5968	74,58	9,31	7,52
18	3,943	3,3274	66,66	16,70	21,68
23	4,943	1,3882	63,50	28,61	27,94
27	5,190	0,5506	60,36	38,69	37,80
31	4,713	0,2000	55,28	46,36	45,30
35	4,723	0,0644	48,99	49,31	45,98
39	4,417	0,0181	42,74	50,72	48,80
43	4,493	0,0043	36,50	52,12	51,25
47	4,473	0,0010	33,61	53,52	50,09
51	4,490	0,0002	24,32	54,98	51,51
55	4,560	0,0000	19,79	56,58	55,13
59	4,440	0,0000	14,96	57,62	56,15
63	4,350	0,0000	9,56	58,77	59,33
67	4,390	0,0000	5,87	60,08	58,33
71	4,420	0,0000	4,72	61,23	59,58
75	4,460	0,0000	3,87	62,42	60,74
Toplam verimlilik: g laktik asit / g toplam şeker = 0,71					



Şekil 8.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği

8.1.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları

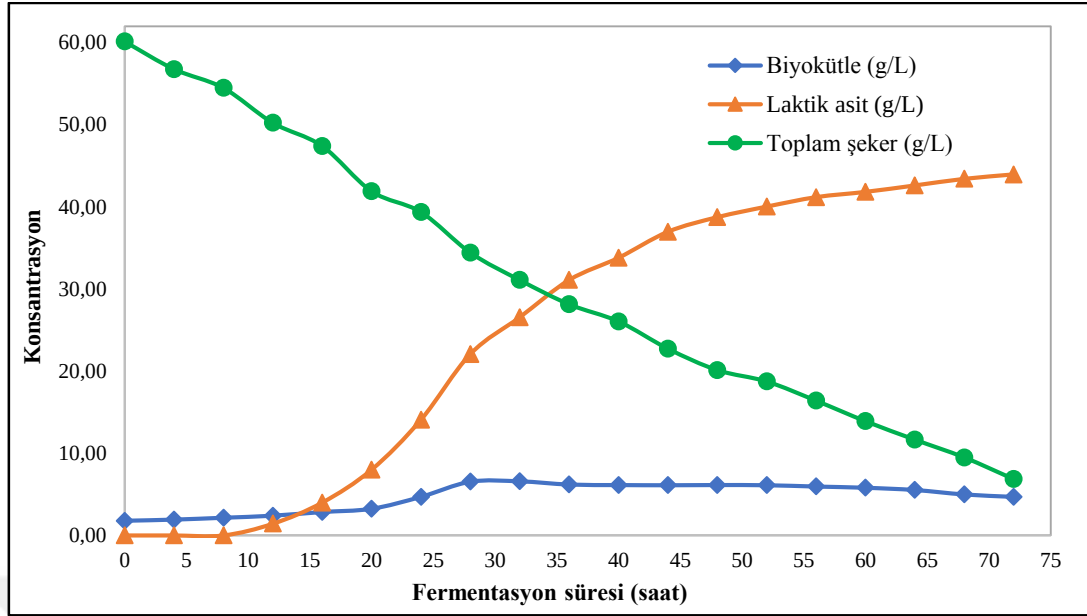
Fermentasyona; %6,0 toplam şeker ve 1,770 g/L mikroorganizma konsantrasyonu ile başlanılmıştır. Belirlenen koşullarda fermentasyon 72 saatte gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince her dört saatte bir alınan 30 mL'lik örneklerde biyokütle, toplam şeker ve laktik asit analizleri yapılarak veriler elde edilmiştir. Fermentasyona 1,77 g/L biyokütle konsantrasyonu ile başlanılmış olup fermentasyon süresi içerisinde bu değer maksimum 6,59 g/L, ortalamada ise 4,72 g/L olmuştur.

Fermentasyon sonunda laktik asit üretimi titrimetrik metot ile 43,97 g/L hesaplanırken, spektrofotometrik metot ile 42,65 g/L olarak ölçülmüştür. Toplam verimlilik ise 0,73 (g laktik asit/g toplam şeker) olarak hesaplanmıştır. Mikroorganizma, şeker ve laktik asit konsantrasyonlarına ait sonuçlar Tablo 8.2.'de belirtilmiştir. Fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği Şekil 8.2.'de gösterilmiştir.

Fermentasyon sonunda, ortalama %73 verimle elde edilen laktik asit konsantrasyonu %4,4 olarak belirlenmiştir.

Tablo 8.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları

Zaman (saat)	Mikroorganizma Konsantrasyonu (g/L)	Şeker Konsantrasyonu		Laktik Asit Konsantrasyonu (g/L)	
		Glikoz Kons. (g/L)	Toplam Şeker Kons. (g/L)	Titrasyon	Spektrofotometre
0	1,770	27,4680	60,17	0,00	0,00
4	1,910	11,3058	56,80	0,00	0,00
8	2,140	4,4658	54,51	0,00	0,00
12	2,390	1,6264	50,26	1,42	1,38
16	2,840	0,5590	47,43	4,00	3,88
20	3,233	0,1698	41,92	8,01	7,77
24	4,690	0,0485	39,39	14,09	13,67
28	6,540	0,0121	34,44	22,09	21,43
32	6,587	0,0027	31,11	26,57	25,78
36	6,193	0,0006	28,15	31,11	30,18
40	6,133	0,0001	26,07	33,82	32,80
44	6,110	0,0000	22,74	36,99	35,88
48	6,137	0,0000	20,13	38,76	37,60
52	6,110	0,0000	18,75	40,05	38,85
56	5,950	0,0000	16,41	41,20	39,96
60	5,803	0,0000	13,91	41,84	40,59
64	5,527	0,0000	11,66	42,62	41,35
68	4,980	0,0000	9,49	43,43	42,12
72	4,687	0,0000	6,86	43,97	42,65
Toplam verimlilik: g laktik asit / g toplam şeker = 0,73					



Şekil 8.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği

8.1.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları

Fermentasyona; %3,0 toplam şeker ve 1,523 g/L mikroorganizma konsantrasyonu ile başlanılmıştır. Belirlenen koşullarda fermentasyon 52 saatte gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince her dört saatte bir alınan 30 mL'lik örneklerde biyokütle, toplam şeker ve laktik asit analizleri yapılarak veriler elde edilmiştir. Fermentasyona 1,52 g/L biyokütle konsantrasyonu ile başlanılmış olup fermentasyon süresi içerisinde bu değer maksimum 5,75 g/L, ortalamada ise 4,15 g/L olmuştur.

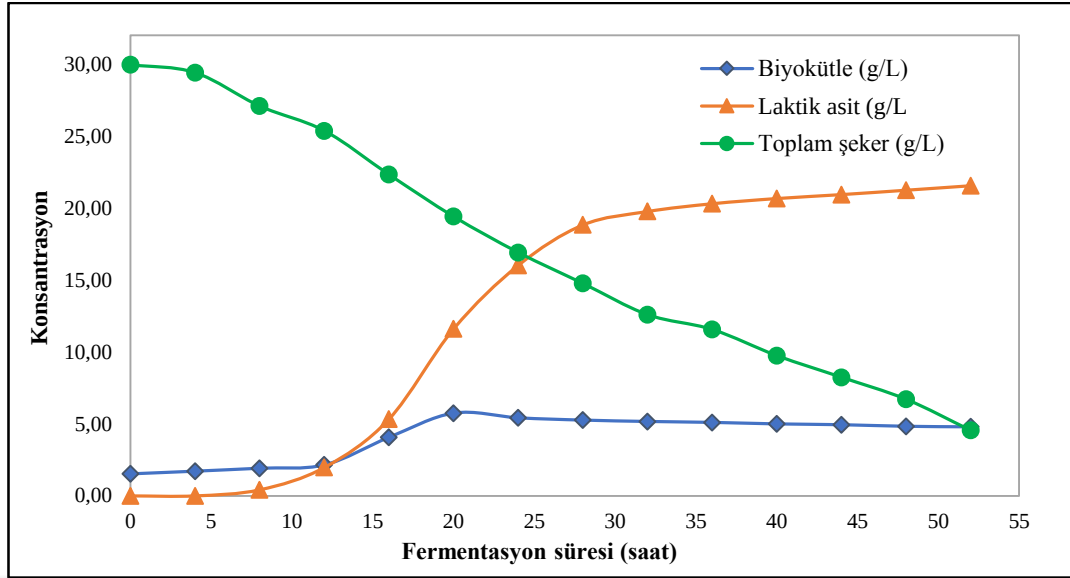
Fermentasyon sonunda laktik asit üretimi titrimetrik metot ile 21,55 g/L hesaplanırken, spektrofotometrik metot ile 20,91 g/L olarak ölçülmüştür. Toplam verimlilik ise 0,72 (g laktik asit/g toplam şeker) olarak hesaplanmıştır. Mikroorganizma, şeker ve laktik asit konsantrasyonlarına ait sonuçlar Tablo 8.3.'te belirtilmiştir. Fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği Şekil 8.3.'te gösterilmiştir.

Fermentasyon sonunda, ortalama %72 verimle elde edilen laktik asit konsantrasyonu %2,1 olarak belirlenmiştir.

Tablo 8.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyon sonuçları

Zaman (saat)	Mikroorganizma Konsantrasyonu (g/L)	Şeker Konsantrasyonu		Laktik Asit Konsantrasyonu (g/L)	
		Glikoz Kons. (g/L)	Toplam Şeker Kons. (g/L)	Titrasyon	Spektrofotometre
0	1,523	12,0960	29,95	0,00	0,00
4	1,710	4,5602	29,41	0,00	0,00
8	1,916	1,5833	27,08	0,42	0,41
12	2,147	0,5149	25,37	1,97	1,91
16	4,063	0,1474	22,32	5,33	5,17
20	5,747	0,0367	19,41	11,60	11,25
24	5,420	0,0079	16,91	16,02	15,54
28	5,260	0,0015	14,76	18,83	18,26
32	5,167	0,0002	12,59	19,76	19,17
36	5,101	0,0000	11,56	20,30	19,69
40	4,997	0,0000	9,74	20,66	20,04
44	4,940	0,0000	8,24	20,94	20,31
48	4,830	0,0000	6,71	21,24	20,60
52	4,793	0,0000	4,55	21,55	20,91

Toplam verimlilik: g laktik asit / g toplam şeker = 0,72



Şekil 8.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyonun laktik asit-biyokütle ve şeker grafiği

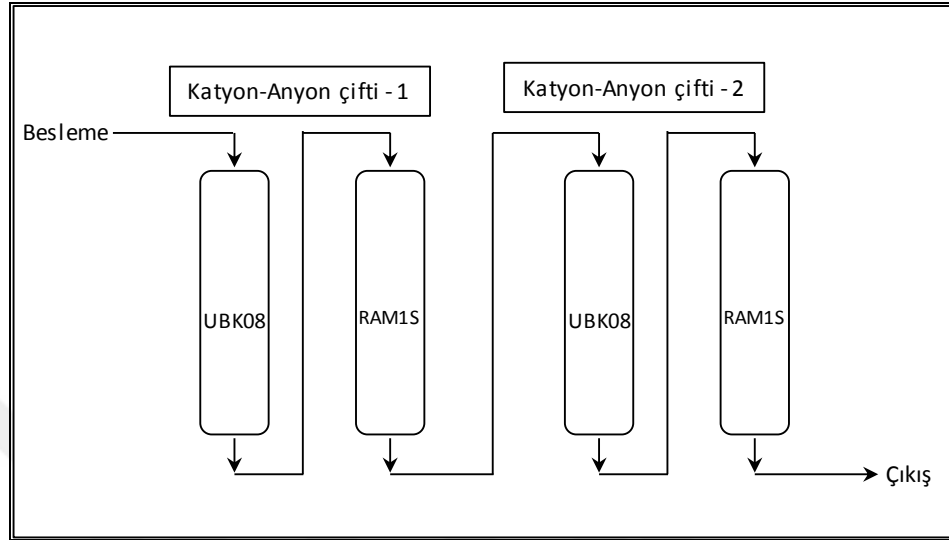
8.2. İyon Değiştirici Reçine Uygulama Sonuçları

Fermentasyonlar sonucu üretilen laktik asidin, fermentasyon ortamından saflaştırılması işlemi için iyon değiştirici reçine yöntemi uygulanmıştır. İyon değiştirici prosesi; reçinenin aktif grubu üzerinde bulunan iyon ile fermentasyon sıvısı içerisinde bulunan karşı iyonun yer değiştirmesi temeline dayanmaktadır.

Laktik asit saflaştırılması işleminde kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine (DIAION UBK08, Mitsubishi) ve zayıf bazik anyon değiştirici reçine (RELITE RAM1S, Mitsubishi) kullanılmıştır.

Reçine uygulamasında, Şekil 8.4.'te belirtilen yöntem izlenmiştir. Bu yöntemde ürün, ilk önce katyon değiştirici reçineden (UBK08) geçirilerek daha saf bir ürün elde edildikten sonra laktik asidin fermentasyon sıvısından saflaştırılmasında daha etkin olan anyon değiştirici reçineden (RAM1S) geçirilmiştir. Böyle bir uygulama ile katyon değiştirici ve anyon değiştirici kolonları ile bir çift oluşturulmuştur. Bundan sonra bu geçişler birinci çift ve ikinci çift olarak adlandırılacaktır.

Anyon değiştirici reçineden çıkan ürün tekrar aynı yöntemle sırasıyla kasyon ve anyon değiştirici reçinelerden ikinci kez geçirilerek (double-pass) daha saf ürün elde edilmeye çalışılmıştır.



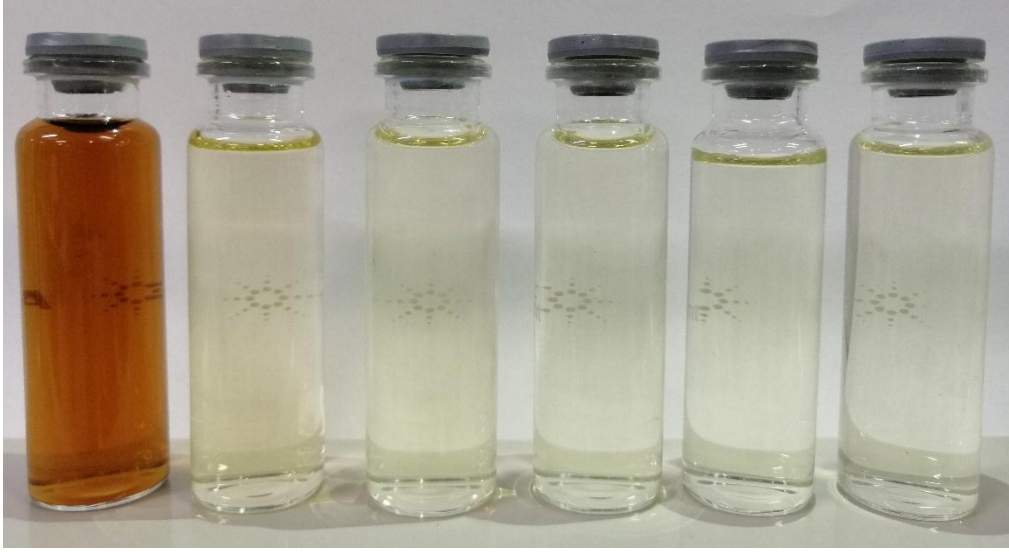
şekil 8.4. Reçine uygulama prosesi

Her reçine kolonunun çıkışındaki yıkama sularından örnek alınarak, laktik asit konsantrasyonu titrimetrik ölçüm ile belirlendi ve sonuçlar tablolara kaydedildi.

Reçine uygulama işlemleri sonucu her çift geçişlerdeki ürünlere ait görseller şekil 8.5., şekil 8.6., şekil 8.7., şekil 8.8., şekil 8.9., şekil 8.10., şekil 8.11., şekil 8.12., şekil 8.13.'te gösterilmiştir.



şekil 8.5. Birinci ift kasyon değiştirici reçine uygulaması besleme çıkış rnekleri



Şekil 8.6. Birinci çift katyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri



Şekil 8.7. Birinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması besleme çıkış örnekleri



Şekil 8.8. Birinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri



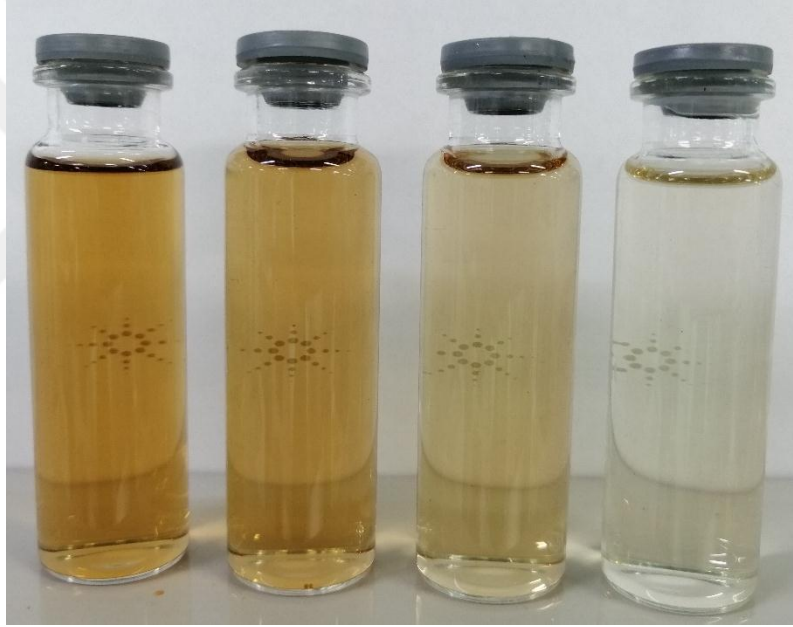
Şekil 8.9. İkinci çift katyon değıştirici reçine uygulaması besleme çıkış örnekleri



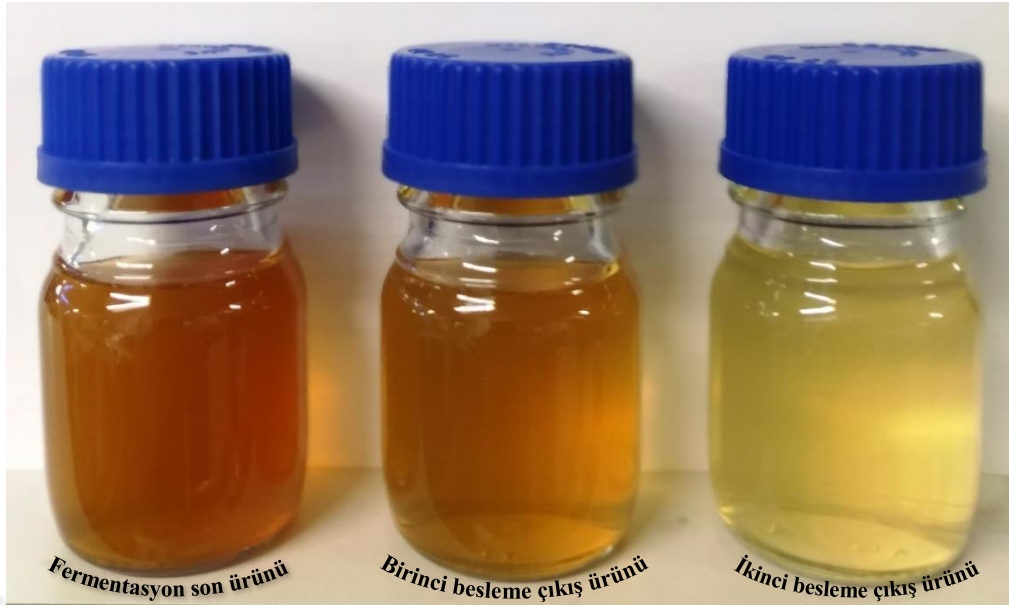
Şekil 8.10. İkinci çift katyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri



Şekil 8.11. İkinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması besleme çıkış örnekleri



Şekil 8.12. İkinci çift anyon değıştirici reçine uygulaması yıkama çıkış örnekleri



Şekil 8.13. İyon değıştirici uygulaması numuneleri

8.2.1. %9 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değıştirici reçine uygulamasının laktik asit ölçüm sonuçları

%9 toplam şeker içeren fermentasyon sıvısının kullanımı ile gerçekleştirilen fermentasyon sonunda; ortalama %71 verimle %6,2 konsantrasyonda üretilen laktik asidin, fermentasyon ortamından saflaştırılma işlemlerine ait iyon değıştirici reçine uygulamasının sonuçları Tablo 8.4.'te verilmiştir.

İyon değıştirici reçine prosesinde; birinci çift geçişlerde katyon değıştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %26,78 olurken, bu oran ikinci çift geçişlerde %40,78 olmuştur. Reçine kapasitesi [kolonda kalan laktik asit miktarı (g) / reçine miktarı (g)] birinci çift geçişte ortalama 0,040 iken ikinci çift geçişte kapasite ortalaması 0,019 olmuştur. Reçine kapasitesindeki bu düşüş oranı, doğrudan birinci çiftten geçiş sonunda, dilüsyondan kaynaklanan laktik asit konsantrasyonunun düşmesinden kaynaklanmaktadır. Oysa, konsantrasyondan kaynaklanan reçine kapasitesi düşüşü, kolonlarda tutulan laktik asit miktarlarına, oransal olarak, pozitif bir etki göstermiş ve bir artışa neden olmuştur.

Benzer durum anyon değiştirici reçine kolonlarında da g r lm şt r. Birinci  ift geçişlerde anyon değiştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %69,74 iken, ikinci çift geçişlerde %63,23 olmuştur. Ancak bu fark katyon değiştirici reçine kolonlarında olduğu kadar yüksek değildir. Yine, reçine kapasitelerine bakıldığında, birinci çift geçişlerde ortalama 0,088 iken, ikinci çift geçişlerde 0,022 olmuştur. Kapasitelerdeki bu düşüş yine laktik asit konsantrasyonundaki düşüşten kaynaklanmaktadır.

İşlemler sonunda, toplam laktik asit kazanımlarının ortalama %98,68 olarak tespit edilmiş olup, laktik asit kaybının %1,32 olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

Tablo 8.4. %9 toplam şeker içeren fermentasyon sonrası iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları

		1. ÇİFT		2. ÇİFT	
		UBK08	RAM1S	UBK08	RAM1S
Reçine miktarı	g	930,0	776,0	930,0	776,0
BESLEME					
Besleme miktarı	mL	2160	1565	2080	1750
Besleme LA konsantrasyonu	%	6,32	6,21	2,12	1,52
Beslemedeki LA miktarı	g	138,18	98,35	44,21	26,63
�IKIş					
�ıkış miktarı	mL	1610	1400	1720	1580
Çıkıştaki LA konsantrasyonu	%	6,21	2,12	1,52	0,62
Çıkıştaki LA miktarı	g	101,18	29,76	26,18	9,79
Kolonda kalan LA miktarı	g	37,00	68,59	18,03	16,84
Reçine kapasitesi (Kolonda kalan g LA/g Reçine)		0,040	0,088	0,019	0,022
SU İLE YIKAMA					
Yıkama suyu miktarı	mL	1664	3550	1864	2430
Yıkama suyundaki LA konsantrasyonu	%	2,10	1,90	0,93	0,68
Çıkıştaki LA miktarı	g	35,03	67,59	17,33	16,51
Rejenerasyonda kazanılan LA	g	35,03	67,59	17,33	16,51
İyon değiştirici işlemi sonu toplam LA kazanımı	g	136,21	97,35	43,51	26,30
	%	98,57	98,98	98,41	98,75

8.2.2. %6 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulamasının laktik asit ölçüm sonuçları

%6 toplam şeker içeren fermentasyon sıvısının kullanımı ile gerçekleştirilen fermentasyon sonunda; ortalama %73 verimle %4,4 konsantrasyonda üretilen laktik asidin, fermentasyon ortamından saflaştırılma işlemlerine ait iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları Tablo 8.5.'te verilmiştir.

İyon değiştirici reçine prosesinde; birinci çift geçişlerde katyon değiştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %29,0 olurken, bu oran ikinci çift geçişlerde %45,55 olmuştur. Reçine kapasitesi [kolonda kalan laktik asit miktarı (g) / reçine miktarı (g)] birinci çift geçişte ortalama 0,024 iken ikinci çift geçişte kapasite ortalaması 0,017 olmuştur. Reçine kapasitesindeki bu düşüş oranı, doğrudan birinci çiftten geçiş sonunda, dilüsyondan kaynaklanan laktik asit konsantrasyonunun düşmesinden kaynaklanmaktadır. Oysa, konsantrasyondan kaynaklanan reçine kapasitesi düşüşü, kolonlarda tutulan laktik asit miktarlarına, oransal olarak, pozitif bir etki göstermiş ve bir artışa neden olmuştur.

Benzer durum anyon değiştirici reçine kolonlarında da görülmüştür. Birinci çift geçişlerde anyon değiştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %61,24 iken, ikinci çift geçişlerde %55,66 olmuştur. Ancak bu fark katyon değiştirici reçine kolonlarında olduğu kadar yüksek değildir. Yine, reçine kapasitelerine bakıldığında, birinci çift geçişlerde ortalama 0,050 iken, ikinci çift geçişlerde 0,012 olmuştur. Kapasitelerdeki bu düşüş yine laktik asit konsantrasyonundaki düşüşten kaynaklanmaktadır.

İşlemler sonunda, toplam laktik asit kazanımlarının ortalama %95,67 olarak tespit edilmiş olup, laktik asit kaybının %4,33 olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

Tablo 8.5. %6 toplam şeker içeren fermentasyon sonrası iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları

		1. ÇİFT		2. ÇİFT	
		UBK08	RAM1S	UBK08	RAM1S
Reçine miktarı	g	930,0	776,0	930,0	776,0
BESLEME					
Besleme miktarı	mL	1730	1710	2150	1750
Besleme LA konsantrasyonu	%	4,40	3,68	1,61	0,96
Beslemedeki LA miktarı	g	76,72	63,32	34,66	16,80
ÇIKIŞ					
Çıkış miktarı	mL	1515	1525	1970	1355
Çıkıştaki LA konsantrasyonu	%	3,60	1,61	0,96	0,55
Çıkıştaki LA miktarı	g	54,76	24,54	18,87	7,43
Kolonda kalan LA miktarı	g	21,95	38,78	15,79	9,37
Reçine kapasitesi (Kolonda kalan g LA/g Reçine)		0,024	0,050	0,017	0,012
SU İLE YIKAMA					
Yıkama suyu miktarı	mL	1105	2470	2550	2020
Yıkama suyundaki LA konsantrasyonu	%	1,75	1,46	0,56	0,42
Çıkıştaki LA miktarı	g	19,37	36,10	14,27	8,47
Rejenerasyonda kazanılan LA	g	19,37	36,10	14,27	8,47
İyon değiştirici işlemi sonu toplam LA kazanımı	g	74,13	60,64	33,14	15,90
	%	96,63	95,77	95,60	94,67

8.2.3. %3 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulamasının laktik asit ölçüm sonuçları

%3 toplam şeker içeren fermentasyon sıvısının kullanımı ile gerçekleştirilen fermentasyon sonunda; ortalama %72 verimle %2,2 konsantrasyonda üretilen laktik asidin, fermentasyon ortamından saflaştırılma işlemlerine ait iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları Tablo 8.6.'da verilmiştir.

İyon değiştirici reçine prosesinde; birinci çift geçişlerde katyon değiştirici kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %26,74 olurken, bu oran ikinci çift geçişlerde %27,53 olmuştur. Reçine kapasitesi [kolonda kalan laktik asit miktarı (g) / reçine miktarı (g)] birinci çift geçişte ortalama 0,011 iken ikinci çift geçişte kapasite ortalaması 0,009 olmuştur.

Benzer durum anyon değiştirici kolonlarında da görölmüştür. Birinci çift geçişlerinde anyon değiştirici kolonlarda kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %27,46 iken, ikinci çift geçişlerde %33,43 olmuştur. Yine, reçine kapasitelerine bakıldığında, birinci çift geçişlerde ortalama 0,011 iken, ikinci çift geçişlerde 0,008 olmuştur. Kapasitelerdeki bu düşüş yine laktik asit konsantrasyonundaki düşüşten kaynaklanmaktadır.

İşlemler sonunda, toplam laktik asit kazanımlarının ortalama %93,43 olarak tespit edilmiş olup, laktik asit kaybının %6,57 olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

Tablo 8.6. %3 toplam şeker içeren fermentasyon sonrası iyon değiştirici reçine uygulamasının sonuçları

		1. ÇİFT		2. ÇİFT	
		UBK08	RAM1S	UBK08	RAM1S
Reçine miktarı	g	930,0	776,0	930,0	776,0
BESLEME					
Besleme miktarı	mL	1730	1700	2250	1650
Besleme LA konsantrasyonu	%	2,16	1,80	1,40	1,15
Beslemedeki LA miktarı	g	37,47	30,66	31,53	18,98
ÇIKIŞ					
Çıkış miktarı	mL	1525	1590	1990	1490
Çıkıştaki LA konsantrasyonu	%	1,80	1,40	1,15	0,85
Çıkıştaki LA miktarı	g	27,45	22,24	22,85	12,64
Kolonda kalan LA miktarı	g	10,02	8,42	8,68	6,34
Reçine kapasitesi (Kolonda kalan g LA/ g Reçine)		0,011	0,011	0,009	0,008
SU İLE YIKAMA					
Yıkama suyu miktarı	mL	1150	2100	1050	2400
Yıkama suyundaki LA konsantrasyonu	%	0,70	0,30	0,65	0,20
Çıkıştaki LA miktarı	g	8,04	6,29	6,82	4,79
Rejenerasyonda kazanılan LA	g	8,04	6,29	6,82	4,79
İyon değiştirici işlemi sonu toplam LA kazanımı	g	35,49	28,53	29,67	17,43
	%	94,73	93,06	94,10	91,81

BÖLÜM 9. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nişasta endüstrisi ıslak öğütme prosesinde farklı işlemler uygulanarak, mısırdan nişasta üretimi sonucu yan ürün olarak mısır kepeği ve maserasyon suyu elde edilmektedir. Mısırın diğer bileşenlerinden ayrıştırılan kepek, üzerinde kalan nişastanın ekonomik olarak maksimum düzeyde alınabilmesi için kademeli yıkama işlemine tabi tutulmaktadır. İşlem sonunda nişastasız alınan kepek kurutulmakta ve yem sanayisinde değerlendirilmektedir. Mısır kepeğinin tedarik edildiği ilgili fabrika tarafından yem sanayisine gönderilen kepek üzerinde kalan toplam nişastanın %16-26 aralığında olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada; mısır kepeği, kimyasal hidrolizasyon işlemine tabi tutularak, üzerinde kalan nişasta ve kısmen selüloz şekere dönüştürülerek laktik asit fermentasyonunda substrat olarak kullanılmıştır. Fermentasyonda azot kaynağı olarak ise maserasyon suyu kullanılmıştır. Fermentasyon sonunda üretilen laktik asidin fermentasyon ortamından saflaştırılması için, yeni ve üzerinde çalışılan bir yöntem olan iyon değiştirici reçine uygulamaları kullanılmıştır. Bu çalışmanın aşamalarına ait sonuçlar kısımlar halinde sunulmuştur.

a. Mısır kepeği hidrolizasyonuna ait sonuçlar ve değerlendirme

Çalışmalarımızda hidrolizasyon işlemlerinde mısır kepeği %50'lik (w/v) H_2SO_4 ilave edilerek 1,6, 1,8 ve 2,2 pH değerlerinde ara ara karıştırılarak ortalama 24 saat bekletildi. Sonrasında 45, 90 ve 180 dk otoklavlandı. Her bir pH değeri ve otoklavlama süresi sonunda hidroliz edilen nişastanın HPLC ve HMF analizleri yapıldı. İşlemler sonucunda en yüksek şeker konsantrasyonu ile en düşük HMF konsantrasyonu 1,8 pH değerinde ve 90 dk'lık otoklavlama süresi sonucunda elde edildi. Tekrarlanan çalışmalarda bu şartlar altında sonuçların birbirine uygun olduğu belirlendi.

Literatür çalışmalarında; hidrolizasyon çalışmalarında, asit konsantrasyonu, sıcaklık ve zaman arasında bulunan korelasyonlarda; düşük asit konsantrasyonlarında ve yüksek sıcaklıklarda hidrolizin daha iyi gerçekleştiği ancak reaksiyonlar sonucu açığa çıkan HMF gibi yan bileşiklerin hem bakteri aktivasyonu hem de monomerik şekerlerin çözünürlüğünü negatif yönde etkilediği belirtilmiştir (Perez ve ark., 2007; Ahring ve ark., 2016; Mathew ve ark., 2016; Liu ve ark., 2016).

Ayrıca literatür çalışmalarında; mısırdan elde edilen yem ürünlerinin (mısır kepeği, mısır koçanı ve mısır sapı) asit ve ısı ile hidrolizasyonu sonucu fumarik asit ve formik asit gibi organik asitlerin oluştuğu belirtilmiştir (Noureddini ve ark., 2009; Noureddini ve Byun, 2010; Eylen ve ark., 2011). Fermentasyon çalışmalarımızın sonunda; fermentasyon sıvısı analiz sonuçlarına göre, literatür çalışmalarında da belirtilen, organik asitlerin oluştuğu belirlenmiştir (Tablo 9.1.).

Tablo 9.1. Fermentasyon sıvısı kimyasal analiz sonuçları

Analiz	Sonuç	Yöntem
Fumarik asit	0,07 g/L	HPLC UV
Laktik asit	21,75 g/L	HPLC UV
Malik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV
Sitrik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV
Quinik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV
Bütirik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV
İzobütirik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV
Oksalik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV
Propionik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV
Tartarik asit	Tespit edilmedi (g/L)	HPLC UV

Mısır kepeğinin hidrolizasyonu sonucu, HPLC analizi ile belirlenen, %9'luk toplam şeker konsantrasyonu içeren fermentasyon sıvısı elde edilmiştir. Bu sıvıdan bir miktar alınarak toplam şeker konsantrasyonları %6 ve %3 olacak şekilde seyreltilmiştir. Ayrıca fermentasyon sıvılarının protein oranı %3 olacak şekilde maserasyon suyu ilave edilmiştir. Fermentasyon çalışmaları; %9, %6 ve %3 toplam şeker içerecek şekilde ayrı ayrı yapılmıştır. Fermentasyon çalışmaları süresince sabit karıştırma

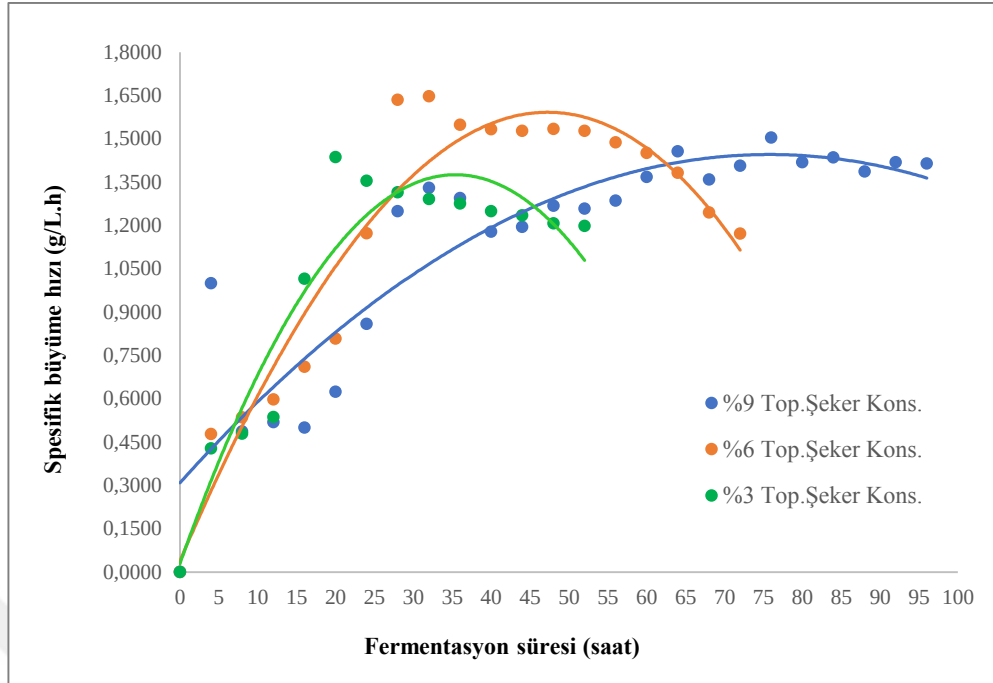
hızında ve sıcaklıkta; tüketilen substrat konsantrasyonu, üretilen laktik asit konsantrasyonu ve biyokütle takip edilmiştir.

b. Fermentasyonlara ait sonuçlar ve değerlendirme

Kesikli fermentasyon yönteminin kullanıldığı fermentasyon çalışmalarında, mikroorganizma olarak, homofermentatif laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 7830 suşu kullanılmıştır.

Çalışmalarımızda; %9 toplam şeker içeren fermentasyon sıvısının kullanımı ile yapılan fermentasyonun sonucunda %71'lik laktik asit verimi elde edilirken; daha düşük toplam şeker konsantrasyonlarındaki çalışmalarda (%6'lık ve %3'lük) verimsel açıdan benzer sonuçlar (sırasıyla, %73 ve %72) elde edilmiştir. Bu sonuçlar, toplam şeker konsantrasyonlarındaki düşüşün (mevcut çalışmamızda %3'e kadar düşürülen) verim üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir.

Aynı benzerlik spesifik biyokütle artış hızlarında da kendini göstermektedir. %9'luk toplam şeker konsantrasyonundaki fermentasyonda ortalama hız 1,13 g/L.h olarak belirlenirken; bu değer %6'lık toplam şeker konsantrasyonundaki fermentasyonda 1,15 g/L.h olarak hesaplanmıştır. %3'lük toplam şeker konsantrasyonundaki fermentasyonda ise spesifik biyokütle artış hızı 1,00 g/L.h olarak hesaplanmıştır (Şekil 9.1.). %3'den daha düşük toplam şeker konsantrasyonlarına geçildiğinde; substrat konsantrasyonuna bağlı olarak fermentasyon süreleri oldukça kısılacağı gibi aynı zamanda spesifik büyüme hızının daha da düşebileceğini göstermektedir.



Şekil 9.1. Spesifik biyokütle artış hızı grafiği

Literatürde farklı substrat kaynaklarından farklı mikroorganizmalar kullanılarak laktik asit üretim çalışmaları yapılmış olup, değişken üretim verimliliklerinin elde edildiği çalışmalar mevcuttur. Shen ve Xia (2006) substrat olarak mısır koçanı ve mikroorganizma olarak immobilize *Lactobacillus delbrueckii* bakterisi kullandıkları fermentasyon çalışmalarında, laktik asit üretim verimini 0,90 olduğunu belirtmişlerdir. Mısır koçanı ile yapılan farklı bir fermentasyon çalışmasında ise mikroorganizma olarak *Rhizopus* sp. kullanılmış, laktik asit üretim verimi 0,82 olarak belirtilmiştir (Miura ve ark., 2004). Cui ve ark. (2011) mısır saplarından laktik asit üretim çalışmalarında *Lactobacillus* cinsine ait iki farklı tür bakteri kullanmış olup, üretim veriminin 0,70 - 0,80 aralığında olduğu belirtmişlerdir.

Literatürdeki verimlilik değerleri ile çalışmamızdaki verimlilik değerleri arasında farklar mevcuttur. Bu durum, kullanılan substrat kaynağının, mikroorganizmaların ve fermentasyon yönteminin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde, mısır kepeği ile ilgili laktik asit fermentasyon çalışmasına rastlanılmamıştır.

c. İyon değiştirici reçine uygulamalarına ait sonuçlar ve değerlendirme

Çalışmalarımızda, fermentasyonlar sonucu elde edilen laktik asidin, fermentasyon ortamından saflaştırılması amacı ile iyon değiştirici reçine uygulaması yapılmıştır.

Reçine üreticisi firmalar ile yapılan görüşmeler neticesinde genel olarak kuvvetli katyonik iyon değiştirici reçineler tavsiye edilmesi nedeniyle ilk aşamada bu tip bir reçine ile çalışma başlatılmıştır. Reçinelerin yapısı ve fonksiyonel yükü incelendiğinde; kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinelerin fiziksel dayanıklılığı, iyon değiştirme kapasitesi, reçine verimliliği, rejenerasyon kolaylığı ve ekonomikliği gibi faktörler ön plana çıkmaktadır.

Proses sonunda veriler incelendiğinde, kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinenin fermentasyon sıvısında bulunan mineral iyonlarının değişiminde çok iyi görev yaptığı, oldukça yüksek bir verim ve ürün kalitesi elde edildiği gözlemlenmiştir. Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinenin iyon seçicilik özelliğine bakıldığında; $Ba^{++} > Ca^{++} > Mg^{++}$ ile $K^{+} > NH_4^{+} > Na^{+} > H^{+}$ şeklinde olduğundan, laktik asitten ziyade ortam içerisindeki mineral değişimi gerçekleştiğinden, saflaştırma (purification, deashing) işlevinde çok başarılı olduğu görülmüştür (Zagorodni, 2007; Park, 2012).

Zayıf bazik anyon değiştirici reçineler, alkali çözeltilerde ayrışma sağlayamadıklarından iyon değiştirme işlevini iyi yapamazlar. NaCl ve Na₂SO₄ nötral tuzlarda ayrışma sağlayamazlar. HCl ve H₂SO₄ gibi mineral asitlerde ve NH₄Cl gibi zayıf baz tuzlarında iyon değişimi işlevini yapabilirler (Zagorodni, 2007; Park, 2012). Zayıf bazik anyon değiştiricilerde dezavantaj olarak gözüken, yakalanan iyonların kolaylıkla hidroliz olması ve tekrar serbest kalabilmesi; laktik asidin fermentasyon sıvısından ayrılabilmesinin kolaylaştırılabileceği düşüncesinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu sebepten zayıf bazik anyon değiştirici reçinelerin, kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinelere nazaran daha işlevsel olacağı düşünülmüş ve laktik asidin fermentasyon sıvısından saflaştırılmasının kolay olacağı düşüncesiyle, çalışmalarımızda zayıf bazik anyon değiştirici reçine, ikinci bir seçenek olarak görölüp, çalışma yapılmıştır.

Literatür çalışmalarında laktik asit saflaştırma işleminde kullanılan bazik anyon değiştirici reçineler karşılaştırıldığında; zayıf bazik anyon değiştirici reçinelerin, kuvvetli bazik anyon değiştirici reçinelere göre laktik asit geri kazanımının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (John ve ark., 2008; Gullon ve ark., 2010).

Reçine uygulamasında, fermentasyon son ürünü, ilk önce katyon değiştirici reçineden geçirilerek daha saf bir ürün elde edildikten sonra laktik asidin fermentasyon sıvısından saflaştırılmasında daha etkin olan anyon değiştirici reçineden geçirilmiştir. Böyle bir uygulama ile katyon değiştirici ve anyon değiştirici kolonları ile bir çift oluşturulmuştur. Anyon değiştirici reçineden çıkan ürün tekrar aynı yöntemle sırasıyla katyon ve anyon değiştirici reçinelerden ikinci kez geçirilerek (double-pass) daha saf bir ürün elde edilmeye çalışılmıştır.

1. %9 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulaması

İyon değiştirici reçine prosesinde; birinci çift geçişlerde katyon değiştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %26,78 olurken, bu oran ikinci çift geçişlerde %40,78 olmuştur. Reçine kapasitesi [kolonda kalan laktik asit miktarı (g) / reçine miktarı (g)] birinci çift geçişte ortalama 0,040 iken ikinci çift geçişte kapasite ortalaması 0,019 olmuştur. Reçine kapasitesindeki bu düşüş oranı, doğrudan birinci çiftten geçiş sonunda, dilüsyondan kaynaklanan laktik asit konsantrasyonunun düşmesinden kaynaklanmaktadır. Oysa, konsantrasyondan kaynaklanan reçine kapasitesi düşüşü, kolonlarda tutulan laktik asit miktarlarına, oransal olarak, pozitif bir etki göstermiş ve bir artışa neden olmuştur.

Benzer durum anyon değiştirici reçine kolonlarında da görülmüştür. Birinci çift geçişlerde anyon değiştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %69,74 iken, ikinci çift geçişlerde %63,23 olmuştur. Ancak bu fark katyon değiştirici reçine kolonlarında olduğu kadar yüksek değildir. Yine, reçine kapasitelerine bakıldığında, birinci çift geçişlerde ortalama 0,088 iken, ikinci çift geçişlerde 0,022 olmuştur. Kapasitelerdeki bu

düşüş yine laktik asit konsantrasyonundaki düşüşten kaynaklanmaktadır. İşlemler sonunda, toplam laktik asit kazanımlarının ortalama %98,68 olarak tespit edilmiş olup, laktik asit kaybının %1,32 olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

2. %6 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulaması

İyon değiştirici reçine prosesinde; birinci çift geçişlerde katyon değiştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %29,0 olurken, bu oran ikinci çift geçişlerde %45,55 olmuştur. Reçine kapasitesi [kolonda kalan laktik asit miktarı (g) / reçine miktarı (g)] birinci çift geçişte ortalama 0,024 iken ikinci çift geçişte kapasite ortalaması 0,017 olmuştur. Reçine kapasitesindeki bu düşüş oranı, doğrudan birinci çiftten geçiş sonunda, dilüsyondan kaynaklanan laktik asit konsantrasyonunun düşmesinden kaynaklanmaktadır. Oysa, konsantrasyondan kaynaklanan reçine kapasitesi düşüşü, kolonlarda tutulan laktik asit miktarlarına, oransal olarak, pozitif bir etki göstermiş ve bir artışa neden olmuştur.

Benzer durum anyon değiştirici reçine kolonlarında da görülmüştür. Birinci çift geçişlerde anyon değiştirici reçine kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %61,24 iken, ikinci çift geçişlerde %55,66 olmuştur. Ancak bu fark katyon değiştirici reçine kolonlarında olduğu kadar yüksek değildir. Yine, reçine kapasitelerine bakıldığında, birinci çift geçişlerde ortalama 0,050 iken, ikinci çift geçişlerde 0,012 olmuştur. Kapasitelerdeki bu düşüş yine laktik asit konsantrasyonundaki düşüşten kaynaklanmaktadır. İşlemler sonunda, toplam laktik asit kazanımlarının ortalama %95,67 olarak tespit edilmiş olup, laktik asit kaybının %4,33 olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

3. %3 toplam şeker içeren fermentasyona ait iyon değiştirici reçine uygulaması

İyon değiştirici reçine prosesinde; birinci çift geçişlerde katyon değiştirici kolonlarında kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %26,74 olurken, bu oran ikinci çift geçişlerde %27,53 olmuştur. Reçine kapasitesi

[kolonda kalan laktik asit miktarı (g) / reçine miktarı (g)] birinci çift geçişte ortalama 0,011 iken ikinci çift geçişte kapasite ortalaması 0,009 olmuştur.

Benzer durum anyon değiştirici kolonlarında da görülmüştür. Birinci çift geçişlerinde anyon değiştirici kolonlarda kalan laktik asit miktarı, beslenen miktara göre ortalama %27,46 iken, ikinci çift geçişlerde %33,43 olmuştur. Yine, reçine kapasitelerine bakıldığında, birinci çift geçişlerde ortalama 0,011 iken, ikinci çift geçişlerde 0,008 olmuştur. Kapasitelerdeki bu düşüş yine laktik asit konsantrasyonundaki düşüşten kaynaklanmaktadır. İşlemler sonunda, toplam laktik asit kazanımlarının ortalama %93,43 olarak tespit edilmiş olup, laktik asit kaybının %6,57 olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

İyon değiştirici işlemleri sonuçlarına göre; anyon değiştirici reçinelerin katyon değiştirici reçinelere göre, gerek kolonlarda tutulan laktik asit miktarının gerekse reçine kapasitelerinin, daha yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir (Tablo 9.2.). Bu ise, anyon değiştirici reçinenin katyon değiştirici reçineye göre daha iyi bir saflaştırma işlevi yaptığını göstermektedir.

Tablo 9.2. İyon değiştirici reçine uygulamalarının sonuç tablosu

Fermentasyon substrat başlangıç konsantrasyonu	%	9,0		6,0		3,0	
Fermentasyon sonu laktik asit konsantrasyonu	g / L	6,22		4,40		2,16	
Reçine kapasitesi (kolonda kalan g LA / g reçine)	Kolon çift geçişleri	1. çift	2. çift	1. çift	2. çift	1. çift	2. çift
	Katyon değiştirici	0,043	0,018	0,024	0,017	0,011	0,009
	Anyon değiştirici	0,085	0,021	0,05	0,012	0,011	0,008
İyon değiştirici işlemi sonu toplam laktik asit kazanımı	%	98,51		95,67		93,43	
İyon değiştirici işlemi sonu toplam laktik asit kaybı	%	1,49		4,33		6,57	

Çevreye uyum ve ekonomik açıdan, biyolojik geri dönüşümün önemli olduğu günümüzde, nişasta endüstrisinde yan ürün olarak üretilen mısır kepeğinden, ikincil bir hammadde kaynağı olarak faydalanmanın laktik asit üretiminde değerlendirebileceği farklı bir seçenek olarak önerilebilir. Fermentasyon verimliliğinin artırılması çalışmaları için, alternatif mikroorganizmalar (bakteri, maya, küf) kullanılabilir ve karbonhidrat kaynağı olarak kullanılacak şekerlerin elde edilmesinde kullanılan hidrolizasyon yöntemleri daha da geliştirilebilir. Ayrıca, nihai ürün olan laktik asidin, fermentasyon ortamından saflaştırılması yöntemi olarak iyon değiştirici reçinelerin gelecekte öneminin artacağı öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902.
- Admassie, M. 2018. A review on food fermentation and the biotechnology of lactic acid bacteria. *World Journal of Food Science and Technology*, 2(1), 19-24.
- Ahring, B.K., Traverso, J.J., Murali, N., Srinivas, K. 2016. Continuous fermentation of clarified corn stover hydrolysate for the production of lactic acid at high yield and productivity. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 162-169.
- Ai, L., Guo, Q., Ding, H., Guo, B., Chen, W., Cui, S.W. 2015. Structure characterization of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W from skim milk. *Food Hydrocolloids*, 56, 134-143.
- Akpınar, D., Kılıç, G.B. 2012. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antifungal bileşenler. *Gıda*, 37(1), 47-54.
- Albayrak, Ç. 2017. Antifungal Aktivite Üreten Laktik Asit Bakterileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Dergisi*, 14(1), 79-85.
- Ameen, S.M., Caruso, G. 2017. *Lactic Acid in the Food Industry*. Springer, Italy, pp. 1-41.
- Averous, L., Pollet, E. 2012. Biodegradable Polymers. In: *Environmental Silicate Nano-Biocomposites*, Springer-Verlag, London, pp. 13-40.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition, Seppo Salminen, Atte von Wright, Arthur Ouwehand (eds), Marcel Dekker, Inc., USA, pp. 1-66.
- Ayivi, R.D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S.O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R.C., Ibrahim, S.A. 2020. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*, 1(3), 202-232.
- Berovic, M. 2019. Cultivation of Medicinal Mushroom Biomass by Solid-State Bioprocessing in Bioreactors, In: *Solid State Fermentation: Research and Industrial Applications*. Susanne Steudler, Anett Werner, Jay J. Cheng (eds), Springer Nature, Switzerland, pp. 3-22.
- Bhalla, T.C., Sharma, N.N., Sharma, M. 2007. Production of metabolites, industrial enzymes, amino acids, organic acids, antibiotics, vitamins and single cell proteins. *Journal of Environmental Sciences*, 6, 34-78.

- Borshchevskaya, L.N., Gordeeva, T.L., Kalinina, A.N., Sineokii, S.P. 2016. Spectrophotometric Determination of Lactic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(8), 755-758.
- Chisti, Y. 2010. Fermentation Technology. In: *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success*, Wim Soetaert, Erick J. Vandamme (eds), Wiley-VCH, Newyork, pp. 149-171.
- Cui, F., Li, Y., Wan, C. 2011. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource technology*, 102(2), 1831-1836.
- Çelikyurt, G., Arıcı, M. 2008. Gıda Koruyucusu Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Organik Asitler ve Önemi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 1023-1026.
- Çon, A.H., Gökalp, A.H. 2000. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 30, 180-190.
- Dalie, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F. 2010. Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370-380.
- Danner, H., Madzingaidzo, L., Holzer, M., Mayrhuber, L., Braun, R. 2000. Extraction and purification of lactic acid from silages. *Bioresource Technology*, 75(3), 181-187.
- Diaion Manual. 2008. Properties of Ion Exchange Resins. In: *Diaion Manual of Ion Exchange Resins and Synthetic Adsorbents*, Mitsubishi Chemical Corporation, Japan.
- Dien, B.S., Li, X-L., Iten, L.B., Jordan, D.B., Nichols, N.N., O'Bryan, P.J., Cotta, M.A. 2006. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1137-1144.
- Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., Nampoothiri, K.M. 2015. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H. 2009. Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. *Gıda*, 35(1), 55-62.
- Dorfner, K. 1990. Introduction to Ion Exchange and Ion Exchangers. In: *Ion Exchangers*, Walter de Gruyter & Co., Berlin, Germany.
- Eckhoff, S.R., Watson, S.A. 2009. Corn and Sorghum Starches: Production. In: *Starch: Chemistry and Technology*, Third edition, James BeMiller, Roy Whistler (eds), Elsevier, USA, pp. 374-430.
- Erten, H., Ağırman, B., Gündüz, C.P., Çarşamba, E., Sert, S., Bircan, S., Tangüler, H. 2014. Importance of Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Food Processing. In: *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*, Abdul Malik, Zerrin Erginkaya, Saghir Ahmad, Hüseyin Erten (eds.), Springer, New York, pp. 351-379.

- Eylen, D.V., Dongen, F., Kabel, M., Bont, J. 2011. Corn fiber, cobs and stover: enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. *Bioresource Technology*, 102(10), 5995-6004.
- Figuerola-Gonzalez, I., Quijano, G., Ramirez, G., Cruz-Guerrero, A. 2011. Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1341-1348.
- Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G-S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., Franz, C.M.A.P. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 155.
- Ganzle, M.G. 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
- Gao, Z., Daliri, E. B. M., Wang, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X., Ding, T. 2019. Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens: A Review. *Journal of Food Protection*, 82(3), 441-453.
- Gao, M.T., Shimamura, T., Ishida, N., Nagamori, E., Takahashi, H., Umemoto, S., Omasa, T., Ohtake, H. 2009. Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant. *Enzyme and microbial technology*, 44(5), 350-354.
- Garmiene, G., Salomskiene, J., Jasutiene, I., Macioniene, I., Miliauskiene, I. 2010. Production of benzoic acid by lactic acid bacteria from *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* genera in milk. *Milchwissenschaft*, 65(3), 295.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., Mehmood, S. 2014. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Science*, 7(2), 222-229.
- Gullon, B., Alonso, J.L., Parajo, J.C. 2010. Ion-exchange processing of fermentation media containing lactic acid and oligomeric saccharides. *Industrial&engineering chemistry research*, 49(8), 3741-3750.
- Hammes, W.P., Hertel, C. 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, In: *The Prokaryotes Vol 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, Third Edition, Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt (eds), Springer Science&Business Media, pp. 320-323.
- Harland, C.E. 2007. *Ion Exchange: Theory and Practice*, Second Edition, Royal Society of Chemistry, UK.
- Hayek, S.A., Gyawali, R., Aljaloud, S.O., Krastanov, A., Ibrahim, S.A. 2019. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, 86(4), 490-502.
- Hebert, E.M., Raya, R.R., Giori, G.S. 2004. Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* in a Chemically Defined Medium. *Current Microbiology*, 49(5), 341-345.
- Hutkins, R.W. 2019. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, Second Edition, Blackwell Publishing, USA, pp. 1-54.

- Idler, C., Venus, J., Kamm, B. 2015. Microorganisms for the Production of Lactic Acid and Organic Lactates. In: *Microorganisms in Biorefineries*, Birgit Kamm (ed), Springer Berlin Heidelberg, Germany, pp. 224-235.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*, 74(3), 524-534.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2008. L (+)-Lactic acid recovery from cassava bagasse based fermented medium using anion exchange resins. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6), 1241-1248.
- Juturu, V., Wu, J.C. 2018. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2187-2200.
- Kamboj, K., Vasquez, A., Balada, J-M. 2015. Identification and significance of *Weissella* species infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1204.
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Pathom-aree, W., Khanongnuch, C. 2014. Starchy Effluent from Rice Noodle Manufacturing Process as Feasible Substrate for Direct Lactic Acid Production by *Lactobacillus plantarum* S21J. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(2), 217-220.
- Karande, R.D., Abitha, V.K., Rane, A.V., Mishra, R.K. 2015. Preparation of Polylactide from Synthesized Lactic Acid and Effect of Reaction Parameters on Conversion. *Journal of Materials Science and Engineering with Advanced Technology*, 12, 1-37.
- Komesu, A., Maciel, M.R.W., Maciel Filho R. 2017. Separation and Purification Technologies for Lactic Acid-A Brief Review. *BioResources*, 12(3), 6885-6901.
- Komesu, A., de Oliveira J.A.R., da Silva Martins, L.H., Maciel, M.R.W., Maciel Filho, R. 2017a. Lactic acid production to purification: a review. *BioResources*, 12(2), 4364-4383.
- Komesu, A., Maciel, M.R.W, de Oliveira, J.A.R., da Silva Martins, L.H., Maciel Filho, R. 2017b. Purification of lactic acid produced by fermentation: focus on non-traditional distillation processes. *Separation & Purification Reviews*, 46(3), 241-254.
- König, H., Fröhlich, J. 2017. Lactic Acid Bacteria. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Helmut König, Gottfried Uden, Jürgen Fröhlich (eds), Second Edition, Springer International Publishing, Germany, pp. 3-42.
- Kuila, A., Sharma, V. 2018. *Principles and Applications of Fermentation Technology*, Scrivener Publishing, Wiley, USA, pp. 1-15.
- Kumar, D., Juneja, A., Singh, V. 2018. Fermentation technology to improve productivity in dry grind corn process for bioethanol production. *Fuel Processing Technology*, 173, 66-74.
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D. 1997. Corn Steep Liquor as a Cost-Effective Nutrition Adjunct in High-Performance *Zymomonas* Ethanol Fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63(1), 287-304.

- Leroy, F., Vuyst, L.D. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67-78.
- Li, Q.Z., Jiang, X.L., Feng, X.J., Wang, J.M., Sun, C., Zhang, H. B., Xian, M., Liu, H.Z. 2016. Recovery processes of organic acids from fermentation broths in the biomass-based industry. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(1), 1-8.
- Li, X., Xu, W., Yang, J., Zhao, H., Pan, C., Ding, X., Zhang, Y. 2016. Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. *Animal Nutrition*, 2(3), 229-233.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. 2014. Biodiversity of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*. Heping Zhang, Yimin Cai (eds), Springer, Netherlands, pp. 103-203.
- Liu, Q., Li, W., Ma, Q., An, S., Li, M., Jameel, H., Chang, H.M. 2016. Pretreatment of corn stover for sugar production using a two-stage dilute acid followed by wet-milling pretreatment process. *Bioresource technology*, 211, 435-442.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Onbirinci Baskıdan Çeviri, Cumhur Çökmüş (ed), Palme Yayıncılık, Ankara, syf. 374-379.
- Manandhar, A., Shah, A. 2020. Techno-Economic Analysis of Bio-Based Lactic Acid Production Utilizing Corn Grain as Feedstock. *Processes*, 8(2), 199.
- Martinez, P.M., Bakker, R., Harmsen, P., Gruppen, H., Kabel, M. 2015. Importance of acid or alkali concentration on the removal of xylan and lignin for enzymatic cellulose hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 64, 88-96.
- Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., González, J.M.D., Converti, A., Oliveira, R.P.S. 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70-83.
- Masutani, M., Kimura, Y. 2015. PLA Synthesis: From the Monomer to the Polymer. In: *Poly(lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications*, Alfonso Jimenez, Mercedes A. Peltzer, Roxana A. Ruseckaite (eds), The Royal Society of Chemistry, UK, pp. 3-37.
- Mathew, A.K., Parameshwaran, B., Sukumaran, R.K., Pandey, A. 2016. An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. *Bioresource technology*, 199, 13-20.
- Matthews, K.R., Kniel, K.E., Montville, T.J. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Fermentation Products. In: *Food Microbiology: An Introduction*, Fourth Edition, ASM Press, USA, pp. 478-497.
- Milci, S., Yaygın, H. 2005. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *Gıda*, 30(2), 123-129.
- Miller, C., Fosmer, A., Rush, B., McMullin, T., Beacom, D., Suominen, P. 2011. Industrial production of lactic acid. In: *Comprehensive biotechnology*, Murray Moo-Young (ed), Second edition, Academic press, USA, pp. 179-188.

- Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J.B., Bin, C.H., Okabe, M. 2004. Production of L-lactic acid from corncob. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(3), 153-157.
- Mokoena, M.P. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Moon, S.K., Wee, Y.J., Choi, G.W. 2014. Utilization of by-products derived from bioethanol production process for cost-effective production of lactic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 1525-1531.
- Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. 2016. Novel Developments in Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria, In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, Second Edition, Wiley Blackwell, UK, pp. 80-92.
- Nasef, M.M., Ujang, Z. 2012. Introduction to Ion Exchange Processes. In: *Ion Exchange Technology 1: Theory and Materials*. Mohammad Luqman (ed), Springer, pp. 1-40.
- Nouredдини, H., Byun, J. 2010. Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber. *Bioresource technology*, 101(3), 1060-1067.
- Nouredдини, H., Byun, J., Yu, T-J. 2009. Stagewise Dilute-Acid Pretreatment and Enzyme Hydrolysis of Distillers' Grains and Corn Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(2), 553-567.
- O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Ndahetuye, J.B. 2015. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: types and mechanisms of action. In: *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, Taylor, T.M. (ed), Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 117-136.
- Okafor, N., Okeke, B.C. 2018. Fermentors and Operation of Fermentation Equipment. In: *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, Second Edition, CRC Press, USA.
- Oliveira, R.A., Alexandri, M., Komesu, A., Venus, J., Vaz Rossell, C.E., Filho, R.M. 2020. Current advances in separation and purification of second-generation lactic acid. *Separation & Purification Reviews*, 49(2), 159-175.
- Park, J-S. 2012. Structure, Synthesis, and General Properties of Ion Exchangers. In: *Ion Exchange Technology 1: Theory and Materials*. Mohammad Luqman (ed), Springer, pp. 211-232.
- Pereira, G.V.M., Neto, D.P.C., Junqueira, A.C.O., Karp, S.G., Letti, L.A.J., Júnior, A.I.M., Soccol, C.R. 2020. A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*, 36(2), 135-167.
- Perez, J.A., Gonzalez, A., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P. 2007. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel- ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(10), 929-938.

- Pfeiler, E.A., Klaenhammer T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, 15(12), 546- 553.
- Ramírez, E.C., Johnston, D.B., McAloon, A.J., Singh, V. 2009. Enzymatic corn wet milling: engineering process and cost model. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 1-9.
- Rausch, K. 2012. Phytochemicals from Corn: a Processing Perspective, In: *Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*, Chantal Bergeron, Danielle Julie Carrier, Shri Ramaswamy (eds), Wiley, UK.
- Rausch, K.D., Belyea, R.L. 2006. The future of coproducts from corn processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128(1), 47-86.
- Rausch, K.D., Hummel, D., Johnson, L.A., May, J.B. 2019. Wet Milling: The Basis for Corn Biorefineries, In: *Corn Chemistry and Technology*, Sergio O. Serna-Saldivar (ed), Third Edition, Elsevier, UK, pp. 501-533.
- Rausch, K.D., Thompson, C.I., Belyea, R.L., Tumbleson, M.E. 2003. Characterization of light gluten and light steep water from a corn wet milling plant. *Bioresource Technology*, 90(1), 49-54.
- Ray, B. 2014. Microorganisms Used in Food Fermentation, In: *Fundamental Food Microbiology*, Fifth Edition, CRC Press, Florida, ISBN 0-8493-1610-3, pp. 120-125, 211-214.
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B. 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.
- Sağdıç, O., Tornuk, F., Öztürk, İ., Karasu, S., Yılmaz, M.T. 2015. Biological Preservation of Foods. In: *Microbial Food Safety and Preservation Techniques*, V. Raviskantharai, Jamuna A. Bai (eds), CRC Press, USA, ISBN 978-1-4665-9307-7, pp. 454-464.
- Saha, B.C., Bothast, R.J. 1999. Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corn Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76(2), 65-77.
- Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., Coton, E. 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation-a review. *Microorganisms*, 5(3), 37.
- Schwartz, D., Whistler, R. 2009. History and Future of Starch. In: *Starch: Chemistry and Technology*, Third edition, James BeMiller, Roy Whistler (eds), Elsevier, USA, pp. 1-10.
- Serna-Saldivar, S.O. 2010. *Cereal Grains Properties, Processing and Nutritional Attributes*, CRC Press, Florida.
- Shen, X., Xia, L. 2006. Lactic acid production from cellulosic waste by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1109-1114.
- Singh, V., Johnston, D.B., Neoh, S.L. 2010. Enzymatic corn wet milling process: Enzyme optimization & commercial trial. *Industrial Biotechnology*, 6(1), 34-40.

- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P.K. 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. 3 Biotech, 7(1), 15.
- Soyuçok, A., Ekiz, T., Kılıç, G.B. 2016. Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5, 332-344.
- Srivastava, A.K., Tripathi, A.D., Jha, A., Poonia, A., Sharma, N. 2015. Production, optimization and characterization of lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 from utilizing agro-industrial byproduct (cane molasses). Journal of Food Science and Technology, 52(6), 3571-3578.
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., Zhang, H. 2014. Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. Heping Zhang, Yimin Cai (eds), Springer, Netherlands, pp. 1-101.
- Şengün, İ.Y. 2011. Fermente gıdaların üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri. Biological Diversity and Conservation, 4(1), 42-53.
- Talebniya, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresource Technology, 101(3), 4744-4753.
- Taskila, S., Ojamo, H. 2013. The current status and future expectations in industrial production of lactic acid by lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes. Marcelino Kongo (ed), IntechOpen, Croatia, pp. 615-632.
- Theron, M.M., Lues, J.F.R. 2011. Organic acids and food preservation, CRC Press, USA, pp. 21-55.
- URL-1, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>. Erişim Tarihi: 04.11.2020
- URL-2, Analytical Methods of Corn Refiners Association, <https://corn.org/analytical-methods/>. Erişim Tarihi: 04.01.2019
- URL-3, World of Corn Brochure-National Corn Growers Association: Corn Usage by Segment 2019, <http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2020.pdf>. Erişim tarihi: Mayıs 2020
- Weil, J.R., Sarikaya, A., Rau, S-L., Goetz, J., Ladisch, C.M., Brewer, M., Hendrickson, R., Ladisch, M.R. 1998. Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water. Applied Biochemistry and Biotechnology, 73(1), 1-17.
- Wright, A., Axelsson, L. 2019. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fifth Edition, Gabriel Vinderola, Arthur C. Ouwehand, Seppo Salminen, Atte von Wright (eds), CRC Press, Florida, ISBN 978-0-8153-6648-5, pp. 1-57.
- Xiao, J., Zhang, Y., Yang, Z. 2014. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In: Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice, Heping Zhang, Yimin Cai (eds), Springer, ISBN 978-94-017-8841-0, pp. 303-350.
- Yıldız, H., Karataş, N. 2018. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. Process Biochemistry, 72, 41-46.

- Yörük, G.N., Güner, A. 2011. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve Weissella türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 6(2), 163-176.
- Zafar, S.B., Siddiqui, N.N., Shahid, F., Qader S.A., Aman, A. 2018. Bioprospecting of indigenous resources for the exploration of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(1), 17-22.
- Zagorodni, A.A. 2007. Ion Exchange Materials: Properties and Applications, Elsevier, UK.
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(3), 1121-1135.
- Zhang, Q. 2019. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins, In: Lactic Acid Bacteria Bioengineering and Industrial Applications, Wei Chen (ed), Springer, China, pp. 61-93.
- Zhang, Y., Chen, X., Luo, J., Qi, B., Wan, Y. 2014. An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22. Bioresource Technology, 158, 396-399.
- Zhang, K., Pei, Z., Wang, D. 2016. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. Bioresource Technology, 199, 21-33.