

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RHIZOPUS ORYZAE' DEN LAKTİK ASİT ÜRETİMİ

Şule BULUT

114352

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANLARI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Murat ELİBOL

114352

2001

ELAZIĞ



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***RHIZOPUS ORYZAE'* DEN LAKTİK ASİT ÜRETİMİ**

Şule BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez ,03/01/2022 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

İmza

İmza

İmza

Danışman: Doç.Dr. Murat ELİBOL

Prof.Dr.Dursun ÖZER

Doç.Dr. Gülbeyi DURSUN



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***RHIZOPUS ORYZAE* ' DEN LAKTİK ASİT ÜRETİMİ**

Şule BULUT

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı

2001, Sayfa 106

Bu çalışmada, küf mantarı olan *Rhizopus oryzae*' den laktik asit üretimi için gerekli proses şartları hem erlenlerde hem de biyoreaktörde incelenmiştir. Laktik asit üretimine, karbon kaynağının, başlangıç pH'sının, karıştırma hızının ve başlangıç spor konsantrasyonunun etkisi izlenmiştir. Erlenlerde, mikroorganizma serbest ve poliüretan destek maddesine tutuklanmak üzere iki farklı biçimde kullanılmıştır. Erlenlerde serbest haldeki mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda, 5 farklı karbon kaynağının (glikoz, sakkaroz, melas, keçiyoynuzu ve buğday kepeği) laktik asit üretimine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca karbon kaynağının direkt olarak kullanılmasının veya bazı ön işlemlerden geçirilerek (kaynatma, ekstrakte etme, bazı katkı maddeleri ilave etme v.b.) kullanılmasının fermantasyon üzerine etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Başlangıç pH' ısı, karıştırma hızı ve başlangıç spor konsantrasyonunun etkisi glikoz içeren sentetik bir ortamda incelenmiştir. Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı çalışmalarda, oluşan en yüksek laktik asit miktarları 59.95, 20.07, 49.28, 36.86 ve 23.47 g/L konsantrasyonlarında olup, bu değerler sırasıyla 150 g/L glikoz, 50 g/L sakkaroz,

400 g/L melas, % 10 (w/w) ekstrakte edilmiş keçiyoynuzu ve 50 g/L buğday kepeği + 50 g/l glikoz içeren besi ortamları için elde edilmiştir.

Erlenlerde mikroorganizmanın poliüretan destek maddesine tutuklanarak kullanıldığı deneylerde, iki farklı karbon kaynağı (glikoz ve melas) seçilmiştir. Başlangıç pH'sı, karıştırma hızı ve spor konsantrasyonunun etkisi, serbest mikroorganizma çalışmalarında olduğu gibi glikoz içeren besi ortamında yapılmıştır. *Rhizopus oryzae*'nin immobilize halde kullanıldığı deneylerde üretilen maksimum laktik asit 88.75 g/L olup, bu değer 150 g/L glikoz içeren besi ortamında elde edilmiştir.

Erlenlerde tutuklanmış haldeki *Rhizopus oryzae*'nin tekrar kullanılabilirliği incelemek amacıyla, kullanılmış besiyeri, aynı şartlardaki taze besi yeri ile 2, 3, 4 ve 5 günlük aralıklarla değiştirilmiştir. En iyi sonuçlar değiştirme işleminin 2 günlük aralıklarla yapılmasında elde edilmiş ve 51.7 g/L konsantrasyonuna ulaşan maksimum laktik asit daha sonraki tekrarlamalarda hemen hemen aynı seviyelerde kalmıştır.

Deneylerin bir diğer aşamasında laktik asit fermentasyonu, karıştırmalı reaktörde gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak 150 g/L konsantrasyonunda glikozun kullanıldığı bu deneyde *R.oryzae*'nin gelişiminin ve laktik asit fermentasyonunun, havalandırmalı şartlardaki değişimi incelenmiştir. En yüksek laktik asit miktarı, 216. saatte 102.78 g/L konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu miktar, yapılan tüm deneylerde elde edilen en yüksek laktik asit konsantrasyonu olup, bu da *Rhizopus oryzae*'den laktik asit üretiminde ölçek büyütmenin (scale-up) avantajlı olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Laktik asit, *Rhizopus oryzae*, katı-hal fermentasyonu, proses şartları, immobilizasyon.

SUMMARY

Master Thesis

LACTIC ACID PRODUCTION BY USING *RHIZOPUS ORYZAE***Şule BULUT**

University of Firat

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Chemical Engineering

2001, Page 106

In this study, process parameters for lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae* were investigated in both shake-flasks and in a bioreactor. The effects of some fermentation conditions such as carbon source, initial pH, agitation rate and inoculum size on lactic acid fermentation were performed in shaken culture. The microorganism was used in two different forms, i.e. freely suspended and immobilised culture. In freely suspended cell system, five different carbon sources, namely glucose, sucrose, molasses, carob pod and wheat bran were used. Moreover, in some experiments, some of the carbon sources used were pre-treated with some methods like extraction, boiling, supplements etc. The effects of both type of carbon sources on lactic acid production were then compared. The effects of initial pH, agitation rate and spore inoculum size on fermentation were also studied in defined medium. In the experiments where different carbon sources were used, the values of maximum lactic acid concentrations were 59.95, 20.07, 49.28,

36.86 and 23.47 g/L for 150 g/L glucose, 50 g/L sucrose, 400 g/L molasses, 10 % (w/w) extracted carob pod and 50 g/L wheat bran + 50 g/L glucose, respectively.

In immobilised cell system in which the microorganism was immobilised in polyurethane foam matrices, two different carbon sources, that is, glucose and molasses were selected. As in freely suspended cell system, the effects of initial pH, agitation rate and inoculum size on fermentation were conducted in defined medium with glucose. The highest concentration of lactic acid was obtained in the medium with 150 g/L glucose which was 88.75 g/L.

Repeated-batch experiments were also performed in shake-flasks using immobilised *R. oryzae*. In these experiments, the spent medium was replaced with sterile fresh medium on various time period, i.e. 2nd, 3rd, 4th and 5th day of fermentation. The comparison of the results revealed that the best result was obtained for 2nd day replacement in which lactic acid concentration reached 51.7 g/L and levelled off almost at that value for a long period of time.

In another stage of the study, lactic acid fermentation was investigated in a 1-L bench-top bioreactor using 150 g/L glucose concentration. The maximum lactic acid concentration was obtained on 216th hour of fermentation which was 103 g/L. This value was the highest lactic acid concentration obtained throughout the study which obviously indicated the scale-up was favourable for this particular fermentation.

Key Words : Lactic acid, *Rhizopus oryzae*, solid-state fermentation, process conditions, immobilization.

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, planlanmasında ve sonuçların değerlendirilmesinde büyük yardımlarını gördüğüm değerli hocam Doç. Dr. Murat ELİBOL' a, çalışmalarım sırasında her türlü konuda destek sağlayan sayın Prof. Dr. Dursun ÖZER' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında analizlerde değerli yardımlarını gördüğüm Kimya Yük. Müh. Faruk GÜR' e, çalışmalarımın yürütülmesi için maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Araştırma Fonuna ve her türlü imkanı sağlayan Fırat Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne teşekkür ederim.

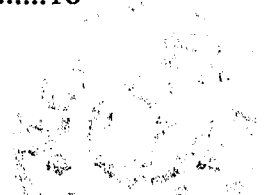
Tezimin her aşamasında maddi ve manevi desteğini gördüğüm aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	I
SUMMARY	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER	IX
TABLolar	XIII
1. GİRİŞ	1
2. MİKROORGANİZMALAR	3
2.1. Genel	3
2.2. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar	5
2.2.1. Küf Mantarları	5
2.2.1.1. <i>Rhizopus</i>	6
3. FERMANTASYON	7
3.1. Fermantasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler	8
3.1.1. Substratın Seçimi ve Hazırlanması	8
3.1.2. Substratın Sterilizasyonu	9
3.1.3. Aşılama Kültürünün Hazırlanması	10
3.1.4. Fermantasyon	10
3.1.5. Fermantasyon Sıvısından Biyokütlenin Ayrılması	10
3.1.6. Ürünün Kazanılması	11
3.2. Fermantasyon Metotları	12
3.2.1. Yüzey yöntemi	12
3.2.2. Daldırma Yöntemi	12
3.3. Köpük Kırma	14
3.4. Katı Hal Fermantasyonu	14
4. İMMOBİLİZE MİKROORGANİZMALAR	17
4.1. Genel	17
4.2. İmmobilize Mikroorganizmaların Serbest Mikroorganizmalara Göre Avantajları ..	17
4.3. Mikroorganizmaların İmmobilize Yöntemleri	18



4.3.1. Yüzeye Tutunma (Adsorbsiyon)	19
4.3.2. Kovalent Bağlama	19
4.3.3. Tutuklama	20
4.3.4. Mikrokapsülleme	20
4.4.İmmobilize Mikroorganizmaların Uygulama Alanları	21
5. LAKTİK ASİT	22
5.1.Yapısal ve Fiziksel Özellikleri.....	23
5.2. Kimyasal Özellikleri	26
5.3. Laktik Asidin Elde Edilmesi.....	28
5.3.1. Laktik Asidin Fermantasyon ile Elde Edilmesi	28
5.3.1.1. Besin ve Gıda Alanında Kullanılan Laktik Asidin Elde Edilmesi	29
5.3.1.2. Eczacılık Alanında Kullanılan Laktik Asidin Elde Edilmesi.....	30
5.3.2. Laktik Asidin Kimyasal Sentez Yoluyla Elde Edilmesi	31
5.4. Laktik Asidin Kullanım Alanları	31
5.5. Laktik Asidin Depolama Malzemeleri	32
5.6. Laktik Asidin Toksik Etkisi.....	33
5.7. Laktik Asidin Türevleri.....	33
5.7.1. Tuzları.....	33
5.7.2. Esterleri.....	34
5.8.Fermantasyon Yoluyla Laktik Asit Üretimi Alanında Yapılan Bazı Çalışmalar	36
6. MATERYAL VE METOTLAR.....	39
6.1.Mikroorganizma	39
6.2. <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin İnkübasyonu	39
6.3. Fermantasyon Ortamı.....	40
6.3.1. Glikoz İçeren Fermantasyon Ortamı.....	40
6.3.2. Sakkaroz İçeren Fermantasyon Ortamı	40
6.3.3. Melas İçeren Fermantasyon Ortamı.....	40
6.3.4. Keçiyoynuzu İçeren Fermantasyon Ortamı.....	41
6.3.5. Buğday Kepeği İçeren Fermantasyon Ortamı	42
6.4. İmmobilize Mikroorganizmalarla Yapılan Denemeler	42
6.4.1. Süreklilik Çalışmaları.....	43
6.5. Biyoreaktörde Serbest Mikroorganizma Çalışmaları.....	43



6.6. Laktik Asidin Belirlenmesi.....	45
7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
7.1. Erlenlerde Serbest Haldeki Mikroorganizmalarla Yapılan Deneyler	47
7.1.1. Substrat Olarak Glikozun Kullanıldığı Besi Ortamı.....	47
7.1.1.1. Glikoz Konsantrasyonunun Etkisi	47
7.1.1.2. Başlangıç pH'sının Etkisi.....	50
7.1.1.3. Başlangıç Spor Konsantrasyonunun Etkisi	52
7.1.1.4. Karıştırma Hızının Etkisi	53
7.1.2. Substrat Olarak Sakkarozun Kullanıldığı Besi Ortamı	55
7.1.3. Substrat Olarak Melasın Kullanıldığı Besi Ortamı.....	56
7.1.4. Substrat Olarak Keçiyoynuzunun Kullanıldığı Besi Ortamı	62
7.1.5. Substrat Olarak Buğday Kepeğinin Kullanıldığı Besi Ortamı	69
7.2. Erlenlerde Tutuklanmış Haldeki Mikroorganizmalarla Yapılan Deneyler	70
7.2.1. Glikoz İçeren Besi Ortamında Yapılan Deneyler	70
7.2.1.1. Glikoz Konsantrasyonunun Etkisi	70
7.2.1.2. Başlangıç pH'sının Etkisi.....	72
7.2.1.3. Başlangıç Spor Konsantrasyonunun Etkisi	74
7.2.1.4. Karıştırma Hızının Etkisi	75
7.2.2. Melas İçeren Besi Ortamında Yapılan Deneyler	77
7.3. İmmobilize Haldeki <i>R.oryzae</i> ' nin Tekrar Kullanılabilirliği (Repeated-Batch).....	78
7.4. Biyoreaktörde Serbest Haldeki Mikroorganizma ile Yapılan Deneyler.....	81
7.5. Genel Sonuçlar.....	83
8. KAYNAKLAR	86
9. EKLER	89



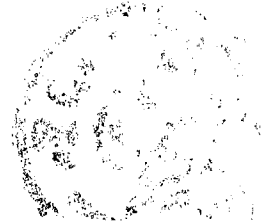
ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması	5
Şekil 3.1. Fermantasyon akış şeması.....	8
Şekil 3.2. Katı maddelerin kültür karışımından ayrılması.....	11
Şekil 5.1. Cori Çevri Çevrimi	22
Şekil 5.2. Laktik asit-su sistemlerinin bileşimi	25
Şekil 6.1. Biyoreaktör Düzenegi	44
Şekil 7.1. Farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi	47
Şekil 7.2. Farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi	48
Şekil 7.3. Farklı glikoz konsantrasyonlarında elde edilen maksimum laktik asit miktarları.....	48
Şekil 7.4. Farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	49
Şekil 7.5. Farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	50
Şekil 7.6. Farklı başlangıç pH değerlerinde laktik asit miktarının zamanla değişimi	51
Şekil 7.7. Farklı başlangıç pH değerlerinde ortam pH'sının zamanla değişimi	51
Şekil 7.8. Farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi.....	52
Şekil 7.9. Farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	53
Şekil 7.10. Farklı karıştırma hızlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi	54
Şekil 7.11. Farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	54
Şekil 7.12. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi.....	55
Şekil 7.13. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	56
Şekil 7.14. Farklı melas konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi	57
Şekil 7.15. Farklı melas konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.....	57



Şekil 7.16. Kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi	58
Şekil 7.17. Kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında ortam pH'sının asit miktarının zamanla değişimi	59
Şekil 7.18. Yeast ekstrakt içeren kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi	60
Şekil 7.19. Yeast ekstrakt içeren kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	60
Şekil 7. 20. Melasın farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında laktik asit miktarının zamanla değişimi	61
Şekil 7.21. Melasın farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında pH'nın zamanla değişimi.....	61
Şekil 7.22. Farklı keçiyoynuzu konsantrasyonlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi	62
Şekil 7.23. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi.....	63
Şekil 7.24. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ve 50 g/L glikoz katkısı içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi.	64
Şekil 7.25. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ve tuz çözeltisi içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi.	65
Şekil 7.26. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ile 50 g/L glikoz ve tuz çözeltisi içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'ının (b) değişimi	66
Şekil 7.27. Keçiyoynuzu ekstraktlarının farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi.	66
Şekil 7.28. Keçiyoynuzu ekstraktlarının farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi.....	67
Şekil 7.29. Keçiyoynuzu ekstraktlarının seyreltilerek kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi.....	68
Şekil 7.30. Keçiyoynuzu ekstraktlarının seyreltilerek kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi.....	68



Şekil 7.31. Buğday kepeğinin kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi.	69
Şekil 7.32. Buğday kepeğinin kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi.	70
Şekil 7.33. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi.	71
Şekil 7.34. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.	72
Şekil 7.35. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı başlangıç pH'sında laktik asit miktarının zamanla değişimi.	73
Şekil 7.36. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı başlangıç pH'sında ortam pH'sının zamanla değişimi.	73
Şekil 7.37. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı spor konsantrasyonlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi.	74
Şekil 7.38. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı spor konsantrasyonlarında zamanla ortam pH'sının değişimi.	75
Şekil 7.39. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı karıştırma hızlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi.	76
Şekil 7.40. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı karıştırma hızlarında zamanla ortam pH'sının değişimi.	76
Şekil 7.41. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı melas içeren besi ortamında laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) zamanla değişimi.	77
Şekil 7.42. İmmobilize <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin tekrar kullanılabilirliği. (2 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.)	78
Şekil 7.43. İmmobilize <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin tekrar kullanılabilirliği. (3 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.)	79
Şekil 7.44. İmmobilize <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin tekrar kullanılabilirliği. (4 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.)	80
Şekil 7.45. İmmobilize <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin tekrar kullanılabilirliği. (5 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.)	80
Şekil 7.46. İmmobilize <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin tekrar kullanılabilirliği.	81



Şekil 7.47. Biyoreaktörde serbest mikroorganizma ile yapılan deneyde

fermantasyon ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi..... 82

Şekil 7.48. Biyoreaktörde serbest mikroorganizma ile yapılan deneyde

fermantasyon ortamında zamanla pH'nın değişimi..... 83



TABLolar

Sayfa No

Tablo 5.1. Laktik asit izomerlerinin özellikleri.....	24
Tablo 5.2. 25 °C’de laktik asit çözeltilerinin viskozite ve yoğunluları.....	25
Tablo 6.1. <i>Rhizopus oryzae</i> için agarlı besi yeri bileşimi	39



1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar çok uzun zamandan beri gerek insan beslenmesi ve gerekse insan sağlığı ile ilgili birçok maddenin çıkış noktası olmuştur ve halen olmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar sadece insan beslenmesi ve sağlığı ile sınırlı kalmayıp, hayvancılık ve ziraat alanlarında da mikrobiyal kaynaklı birçok maddenin kullanımını sağlamıştır. Günümüzde endüstriyel ve ticari önem taşıyan birçok mikrobiyal proses insanlığa hizmet vermekte ve gelişen teknoloji ile sürekli olarak kendini yenilemektedir. Özellikle rekombinant-DNA teknolojisi ile geliştirilen mikroorganizmalar, üretimi çok zor şartlarda yapılan birçok pahalı prosesi daha ekonomik bir şekilde ve bol miktarda ürün eldesi ile gerçekleştirmektedir.

Mikrobiyal kaynaklı proseslerin hemen hemen tamamı fermantasyon temeline dayalıdır. Tarihi açıdan fermantasyon, çok eskilere dayanan ancak günümüzde hala kullanılan biyolojik bir prosestir. Literatürde ekmek mayalanmasının, alkolik mayalanma ve sirke yapımının M.Ö. 3000 yıllarına, şarap üretiminin M.Ö. 2000 yıllarına kadar uzandığı belirtilmektedir (Telefoncu, 1995). Örnekleri çoğaltılabilecek olan bu tarihi prosesler bugünkü teknolojik birçok mikrobiyal prosesin temelini oluşturmaktadır. Günümüzde endüstriyel önem taşıyan mikrobiyal proseslerde kullanılan mikroorganizmalar, teknolojinin ilerlemesi ile gerek mevcut proseslerde daha etkili ve gerekse yeni ürünlerin eldesinde en büyük kaynağı teşkil etmektedir. Mikroorganizmalar aracılığıyla yapılan dönüşümlerden besin, kimya, tıp ve benzeri endüstri kollarından geniş ölçüde faydalanılmaktadır.(Kirk-Othmer,1971; Brodelius, 1978).

Günümüzde biyoteknolojinin sürekli yeni arayışlar ve mevcut prosesleri geliştirme çabası içerisinde olması nedeniyle fermantasyon yoluyla ürünlerin üretimi de bir hız kazanmıştır. Endüstriyel ürün üretiminde, fermantasyonda seçilecek besi yeri ve bileşenleri üretimi önemli ölçüde etkileyecektir. Özellikle, katı hal fermantasyonu (KHF) ile ticari önemi pek fazla olmayan ancak besin değeri yüksek olan maddelerin besi ortamında kullanılması ile üretimin artırılacağı gözlenmiştir (Aidoo,1982). Katı hal fermantasyonu katı yada yarı katı substrat veya inert bir destek maddesi kullanılarak geliştirilen ve gelecek vaat eden yeni bir fermantasyon türüdür. Melas, pirinç kabuğu,



buğday kepeği, sebze ve meyve artıkları gibi ekonomik değeri düşük ancak mikroorganizmalar için karbon kaynağı bakımından zengin olan maddeler kullanılır. Yeni olan bu tekniğin modifiye edilmesi ile üretim maliyeti önemli ölçüde düşürülebilir (Hang,1989). Bunun yanında karbon kaynağı olarak kullanılan birçok ham ve atık madde mikroorganizmaların yaşamaları için gerekli enerji ve besini sağlarken, çeşitli kentsel, tarımsal ve endüstriyel atıkların bu amaçla kullanılması ile bir yandan da çevre kirliliği önlenmiş olur.

Biyoteknolojinin gelişimine paralel olarak, fermantasyon ile organik ve biyokimyasal maddelerin üretimi çağımız teknolojisinin en güncel konuları arasında yer almaktadır. Çeşitli sanayi dallarında geniş kullanım alanları bulunan organik çözücüler, antibiyotikler, enzimler gibi pekçok kimyasal madde, mikroorganizmaların kullanıldığı fermantasyon işlemleriyle üretilirler. Sitrik asit, laktik asit, fumarik asit, malik asit ve salisilik asit gibi besin, ilaç, kimya, tekstil, plastik, kozmetik ve kağıt endüstrilerinde kullanılan birçok organik asit de fermantasyon yolu ile üretilmektedir.

Laktik asit, ilk kez 1780 yılında İsveçli kimyacı Scheele tarafından ekşi sütten izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Blondeau 1847' de laktik asidin bir fermantasyon ürünü olduğunu kanıtlamıştır. Daha sonraları Delbrück, laktik asit bakterileri için en uygun sıcaklığın saptanması üzerine bir dizi çalışmalar yapmıştır. Laktik asidin endüstriyel olarak üretimi ilk kez 1881 yılında Avery tarafından yapılmıştır. Laktik asit üretimi ilk önceleri kimyasal sentez yolu ile gerçekleştirilmiş, ancak fermantasyon alanındaki gelişmelerle fermantasyon yolu ile üretimine geçilmiştir. Kimyasal sentez yöntemine göre maliyetin daha düşük olması ve daha basit bir sistem gerektirmesinden dolayı, fermantasyon yoluyla üretim daha önemli bir yer tutmaktadır. Ülkemizde de pek çok sanayi dalında geniş çapta kullanılan laktik asidin tümü dışalım ile karşılanmakta olup, laktik asit üretimi ülkemiz ekonomisi açısından önem kazanmaktadır.



2. MİKROORGANİZMALAR

2.1. Genel

Biyolojik yöntemlerin büyük çoğunluğu substratın mikroorganizma hücreleri tarafından ürüne dönüştürülmesi şeklinde gerçekleştirilir. İşlem için en uygun mutantların seçilmesi, yetiştirilmesi, geliştirilmesi, fonksiyonlarının aydınlatılması gerekir.

Çok eskilerde canlılar; bitkisel ve hayvansal olmak üzere iki kısım altında toplanırdı. Ancak, 1866 yılında ünlü Alman biyologu Ernst Hackel, mikroskop altında gözlenebilen ve bitki ya da hayvansal özellikte oldukları kestirilemeyen üçüncü tür canlıların varlığından söz etmiş ve bunlara "protista" adını vermiştir. Hücresel yapıların daha iyi anlaşılmasından sonra bazı organizmalarda hücresel farklılıklar (çekirdek zarının bulunmayışı gibi) gözlenmiş ve bunlarda "monera" grubu altında toplanmıştır. Buna göre canlılar alemi genel olarak dört grupta incelenebilir:

1. Monera

- a) Bakteriler, virüsler, bakteriyofajlar
- b) Mavi-yeşil algler

2. Protista

- a) Su yosunları (algler)
- b) Mantarlar (fungi ya da funguslar)
- c) Küfler
- d) Tek hücreli hayvanlar

Mayalar ve aktinomisetler de bu gruba girmektedir.

3. Bitkiler

Protistaların dışında kalan tüm bitkisel canlılar bu gruba girer.

4. Hayvanlar

Protistaların dışında kalan tüm hayvansal canlılar bu gruba girer.

Biyokimya mühendisliğinde birinci ve ikinci gruba giren küçük canlılar önem taşımaktadır. Bunlar için genel olarak "mikroorganizma" adı verilmektedir.



Mikroorganizmalar ancak mikroskopla görülebilirler ve genellikle tek hücrelidirler. Aynı ayrı ya da koloniler halinde yaşarlar. Doğada yaygın olarak hemen her yerde; toprakta, suda, havada, çeşitli gıda maddelerinde, insan ve hayvanların cilt, deri ve bağırsaklarında bulunurlar.

Yapılarında, virüsler hariç, bütün mikroorganizmalar % 80 su içerirler. Bakteri, maya ve tek hücreli alglerin kuru ağırlıklarının % 50'si proteindir. Mantarlar gibi daha karmaşık mikroorganizmaların hücre duvarını oluşturan inert polisakkarit bileşikler kuru ağırlığın büyük bir oranını oluştururlar. Bazı virüsler hariç bütün mikroorganizmaların diğer bir önemli bileşeni de lipitlerdir.

Mikroorganizmalar da başka canlılar gibi çevrelerinin etkisindedirler ve uygun koşullarda büyürler, çoğalırlar. Uygun olmayan koşullarda ise üreyemezler, ya ölürler ya da bu koşullara dayanabilecek şekiller oluştururlar. Sıcaklık, basınç, ortam pH'ı, nemlilik, oksijen ve çeşitli kimyasalların mikroorganizmaların üreme ve çalışmaları üzerine çok ve çeşitli etkileri bulunmaktadır.(Pekin, 1980)

Kullandıkları besin yönünden organizmalar 2 gruba ayrılırlar:

1. Ototroflar (Autotrophs)

Bu canlılar inorganik hammadde kullanarak organik maddeleri oluştururlar. Örneğin, alg ve yeşil bitkilerde olduğu gibi fotosentez yolu ile CO_2 ve H_2O 'dan yararlanma.

2. Heterotroflar (Heterotrophs)

Hayvanlar, bir çok bakteriler, mantarlar, protozoalar gibi, daha önce oluşmuş organik maddelere (örneğin; karbonhidratlar) gereksinme duyan canlılar bu sınıfa girerler.

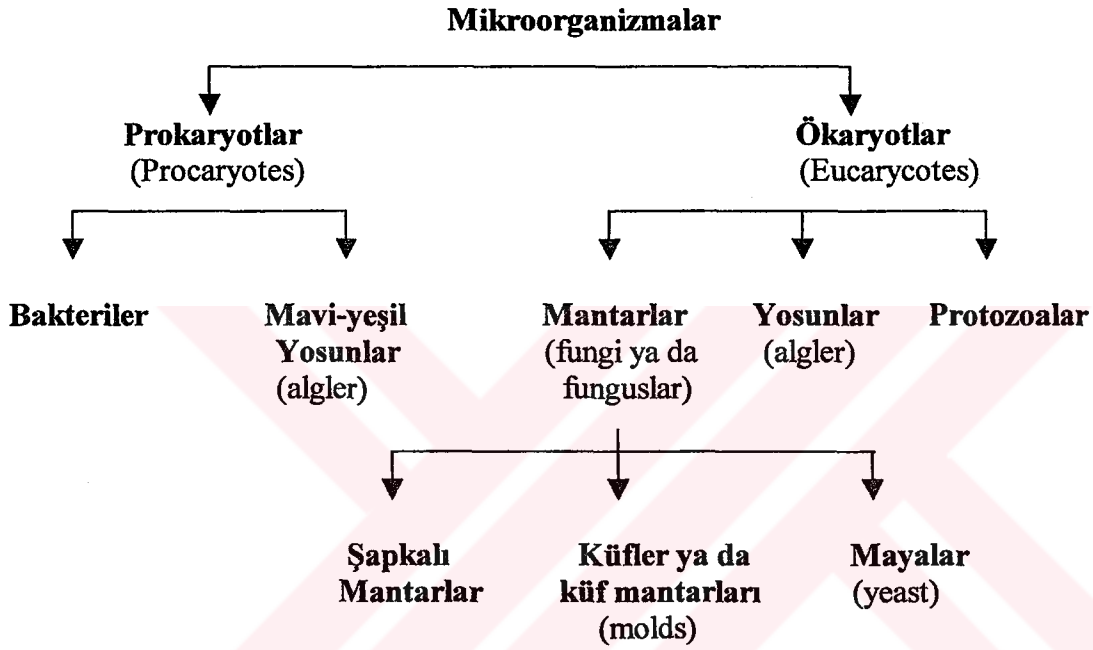
Hayati fonksiyonların devamı için organizmanın enerjiye ihtiyacı vardır. Bu enerji gereksiniminin sağlandığı kaynağa göre organizmalar iki gruba ayrılır: Işık enerjisinden yararlanan organizmalara fototrof, kimyasal enerjiden (organik ve



inorganik maddelerin oksidasyonu) yararlanan organizmalara kemotrof organizmalar adı verilir.

2.2. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermentasyon ve atık suların arıtılmasında rol oynayan mikroorganizmalar aşağıdaki şemaya göre sınıflandırılabilir.



Şekil.2.1. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması.

2.2.1. Küf Mantarları

Besin maddeleri üzerinde beyaz ya da renkli görünüşleri ile dikkati çekerler, hareketsizdirler. Saprofit, parazit veya simbiyotik olarak yaşarlar. Tek ya da çok hücreli sporlar aracılığı ile çoğalırlar. Küf mantarları heterotrofturlar. Yani kendileri sentez yapamadıkları için daha önce oluşmuş organik maddelere gereksinim duyarlar. Karbon kaynağı olarak birçok organik bileşiği kullanabilirler. Karbon kaynağı kullanımları seçimlidir. Örneğin besin ortamında glikoz ve asetik asit bulunuyorsa önce asetik asidi sonra glikozu harcarlar. Laktozu kullananlara çok az rastlanır. Genellikle glikoz,

sakkaroz ve maltozu tercih ederler. Hidrolitik enzim içerenler nişasta, dekstrin gibi maddeleri de besin olarak kullanabilirler. En çok amonyum azotunu bazı ender türleri ise nitrat ve nitrit azotlarını kullanabilirler. Protein, pepton, aminoasitler ve üre gibi azot kaynaklarından türlerinin tümü yararlanabilir. Bunlar dışında çeşitli mineral maddelere ve vitamin gibi gelişme faktörlerine gereksinim duyarlar. Türlerine göre optimum gelişme sıcaklıkları değişmektedir. Küf mantarları aerob olduklarından yüzeylerde gelişirler. Bazı türlerin miselleri substrat içlerinde de gelişebilmektedir. Bu türlerden Rokfor türü peynirlerin üretilmesinde yararlanılmaktadır. Optimum pH'ları da türlere göre değişik değerler almaktadır. Küf mantarlarının fermentasyon teknolojisinde çok önemli yerleri vardır. Örneğin, *Rhizopus nigricans*, fumarik asit üretiminde; *Aspergillus niger* sitrik, glukonik ve oksalik asit üretiminde; ayrıca pek çoğu da değişik enzimleri elde etmek amacı ile kullanılmaktadır.(Pekin, 1980; Pamir, 1978; Bailey and Ollis, 1977; Köşker, 1980)

Küf mantarları, ince ve bölmeli borucuklardan (hyphe) oluşurlar. Hifler, bölmeli (septa) veya birleşik olabilir. Hiflerin dallanma ve topluluklarıyla misel (mycellium) denen oluşumlar meydana gelir. Hifler yalnız fungusun temel ünitesi değil, aynı zamanda besin sağlama yerleridir. Organizma ve dokular içine girerek, salgıladıkları enzimlerle büyük organik molekülleri parçalayıp sindirirler (Aktan, 1981).

2.2.2. *Rhizopus*

Rhizopus türleri hızlıca gelişirler ve beyaz pamuk yığını halinde bir görünüm alırlar. Hifleri septumsuzdur. Sporangioforların çıkmış olduğu bölgede, besiyeri içine giren ve “rizoid” denilen kökçükler bulunur. Rizoidler arasında kalan hif kısmına “stolon” adı verilir. Sporangioforların ucunda columella ve bunu çevreleyen sporangiumlar vardır. Sporangiumlar büyük ve genellikle siyahtır.

Bu tür, meyve, sebze ve diğer bir çok gıdalarda bozunmalara yol açar. *Rhizopus* türleri, glikoz, sakkaroz, dekstrin ve nişasta gibi karbonhidratlardan laktik asit üretmeye elverişlidir.

3. FERMANTASYON

Fermantasyon organik maddelerin enzim katalizli dönüşümlerini gerçekleştirmek için mikroorganizmaların kullanılarak belirli ürünlerin oluşturulma prosesidir. Büyük molekül ağırlıklı organik maddelerin, havalı yada havasız şartlarda daha küçük molekül ağırlıklı organik maddelere mikroorganizmalar tarafından parçalanması olayıdır. Kısaca; biyolojik bir dönüşümdür.

Fermantasyon prosesi için genel eşitlik şu şekilde ifade edilir:

Mikroorganizma + Substrat → Daha fazla mikroorganizma + Metabolik ürünler

Fermantasyon ürünlerini dört ana grupta toplayabiliriz:

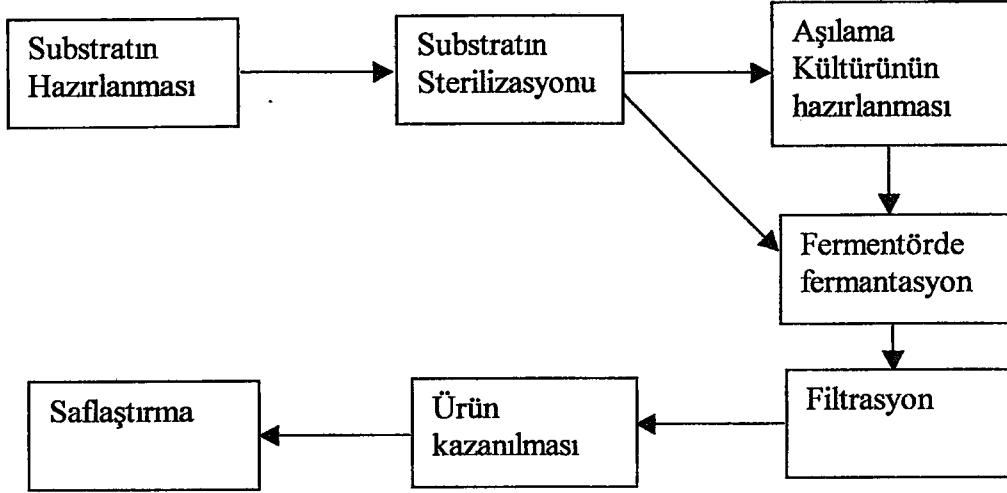
1. Mikrobiyal hücreler
2. Enzim ve polisakkarit gibi büyük moleküller
3. Primer metabolitler
4. Sekonder metabolitler

1. grupta; tek hücre proteini, maya gibi ürünler. 2. grupta biyolojik katalizör görevi yapan enzimler ve polisakkarit gibi büyük moleküller elde edilir. Primer metabolit ürünler mikroorganizmaların üremesine paralel olarak oluşan, düşük molekül ağırlıklı ürünlerdir. Mikroorganizmaların üremeleri durduğu zaman bu tür metabolitlerin biyosentezi de durur ve zamanla bozunmaya başlar. Laktik asit ve bütirik asit gibi organik asitler bu gruptadır.

Bazı mikroorganizmalar genellikle gelişme evrelerinin sonunda gelişme ve üreme için gerekli olmayan maddeleri sentezler. Genellikle kimyasal yapı bakımından birbirine benzer moleküllerin karışımı şeklindeki bu maddeler sekonder metabolitlerdir. Antibiyotikler, mikotoksinler ve pigmentler bu gruptadır (Pekin, 1983).

3.1. Fermantasyon İçin Uygulanan Teknik İşlemler

Fermantasyon için uygulanan teknik işlemler aşağıdaki şemada gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Fermantasyon akış şeması.

3.1.1. Substratın Seçimi ve Hazırlanması

Bu konuda dikkat edilmesi gereken en önemli nokta mikroorganizmaların kullanabileceği ucuz substratların seçimidir. Mikroorganizmaların gelişmesi için suyun varlığı ön planda gelir. Besiyerinin su aktivitesi mikroorganizmaların türüne özgü bir değerde olmalıdır. Su aktivitesi (a_w), besiyerindeki su buharı basıncının saf suyunkine oranıdır. Bir çok mikroorganizma gelişmesi için gerekli karbonlu bileşikleri organik karbon kaynaklarından kullanır ve biyosentezi bu yoldan yapar. Azot kaynağı olarak organik azotlu maddeler (üre gibi) ya da amonyum ve nitrat tuzlarından yararlanılır. Mikroorganizmaların temel karbon ve azot kaynaklarının dışında O, H, P, S, K, Ca, Mg, Fe gibi elementlere de gereksinimleri vardır. Ayrıca bazı mikroorganizmalar biotin, tiamin, nikotinik asit, pridoksamin, P-aminobenzoik asit, pantotenik asit ve siyanokobalamin gibi bazı vitamin ve büyüme faktörleri için heterotrofturlar.

Mikroorganizmaların optimum gelişme pH ları da önemlidir. Bu ürün oluşum hızına ve verimine de etki etmektedir. Örneğin, *Aspergillus niger*, uygun besiyerinde pH 2-3.5 'da hemen hemen tamamen sitrik asit üretirken, zayıf asit ortamında glukonik asit, nötral pH 'da da daha çok okzal asidi üretimine yönelir.

Mikroorganizmaların üremesi ve ürün oluşturmalarında sıcaklık ile çözünmüş oksijen (aerobik mikroorganizmalar için) miktarı da önemli faktörlerdir. Bunlar için de optimum değerler saptanarak o koşullarda üretim sürdürülmelidir.

Fermantasyon teknolojisinde besiyerine katılan temel substratlar arasında; melas, mısır ıslatma şurubu, kağıt fabrikası artıklarının sülfat şurubu, nişasta v.b. sayılabilir.

3.1.2. Substratın Sterilizasyonu

Hazırlanan substrat, mikroorganizmanın gelişmesini engelleyecek herhangi bir madde ihtiva etmemelidir. Bu nedenle fermantasyon işleminde kullanılan besiyerinin, aletlerin ve eğer fermantasyonda havalandırma yapılıyorsa kullanılan havanın sterilize edilmesi zorunludur.

Besiyerinin sterilizasyonunda ısısal (termal) yöntemler kullanılır ve genellikle "yüksek sıcaklık kısa süre" tekniği kullanılır. Besiyerinde, vitamin ısıya az dirençli bileşiklerin ısısal bozunma aktivasyon enerjilerinin bilinmesi ve sterilizasyonun mikroorganizmaları öldürecek, ancak besiyerindeki yararlı bileşikleri en az oranda bozacak koşullarda yapılması gerekmektedir.

Sterilizasyon için uygulanan yöntemler şu şekilde sıralanabilir:

- Su buharı ile doğrudan sterilizasyon
- Su buharı ile basınç altında sterilizasyon
- Kuru hava ile sterilizasyon
- Kimyasal maddelerle sterilizasyon
- Işınlamayla sterilizasyon
- Filtrasyon ile sterilizasyon



3.1.3. Aşılama Kültürünün Hazırlanması

Laboratuarda petri kutusu, çalkalayıcı erlenmeyer ve laboratuvar fermentöründe üretilen aşı kültürü(starter) oradan fermentasyonun yapıldığı ürün oluşum fermentörüne aktarılır. Aşı kültürünün(starter kültürün) çoğaltılmasında genellikle üretim fermentöründe kullanılan substrat ve besiyeri seçilir. Böylece fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmalar o substrata ve besiyerine alıştırmış olur. Aşı kültürünün çoğaltılmasında genellikle kültür, kendisinin yaklaşık 10 katı hacmindeki besiyerine aşılır.

3.1.4. Fermantasyon

Fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmalar istenilen oranda çoğaltıldıktan sonra üretim fermentöründe esas fermantasyona geçilir. Üretim fermentöründeki substrat, aşılara belirlenen şartlarda fermantasyon sürdürülür. Laboratuarda üretim için genellikle çalkalama sistemli Erlenmayerlerden yararlanılır. Bunlar inkübasyon odalarında kullanıldığı gibi sıcaklık kontrollü olanları da vardır.

3.1.5. Fermantasyon Sıvısından Biyokütlenin Ayrılması

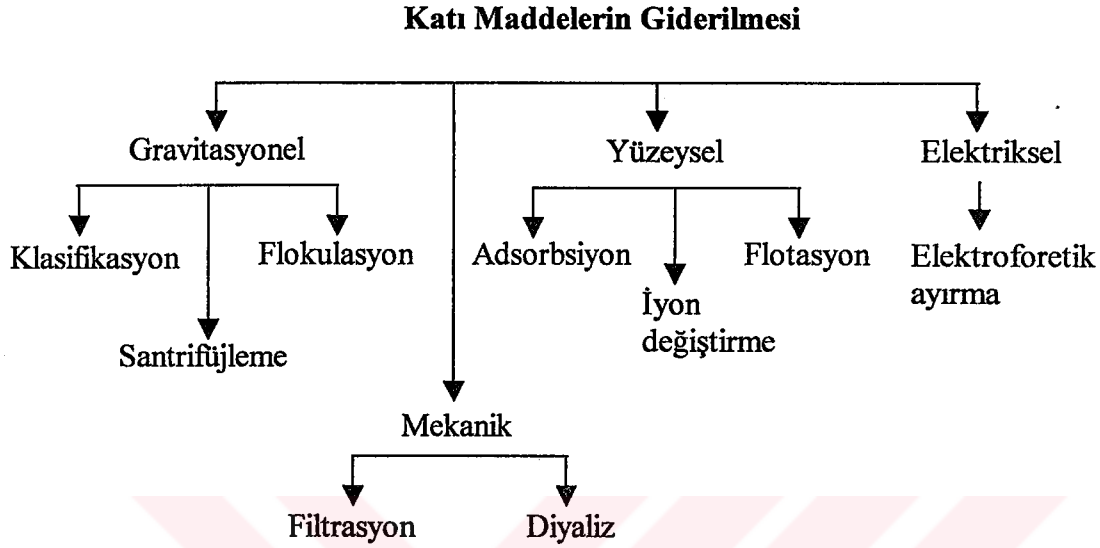
Fermantasyon sıvısında ürün yanında mikroorganizmalar, besiyerini oluşturan harcanmamış substratlar ve oluşan yan ürünler de bulunabilir. Ürünün saflaştırılmasına geçilmeden önce fermantasyon sıvısından, hücrelerin, miselyum ve öteki katı maddelerin ayrılması gerekir. Katı taneciklerin fermantasyon sıvılarından ayrılması yöntemleri Şekil 3.2' de özetlenmektedir.

Fermantasyon endüstrisinde en çok gravitasyonel ve mekanik yöntemlerden yararlanmaktadır. Bunlar arasında santrifüjleme ve filtrasyon ilk sıraları alır.

Fermantasyon işleminde kimi durumlarda ürün, hücre içerisinde bulunan herhangi bir enzim ya da nükleik asit gibi biyokimyasal maddeler veya maya ve aşı örneğinde olduğu gibi mikroorganizmanın bizzat kendisi olabilir. Ürün olarak mikroorganizma veya bunların içindeki enzim yada öteki biyokimyasal bileşiklerden yararlanılacaksa,



saflaştırmaya yönelik temel işlemler fermantasyon sıvısından ayrılan katı taneciklere uygulanır. Eğer ürün, fermantasyon sıvısında ise, saflaştırma işlemi taneciklerden ayrılan bu sıvı üzerinde yapılır.



Şekil 3.2. Katı maddelerin kültür karışımından ayrılması

3.1.6. Ürünün kazanılması

Fermantasyon sıvısında oluşan ürünler, mikroorganizmalar tarafından dışarıya salgılanan hücre dışı enzimler ya da hücrelerin parçalanması sonucu ortama yayılan enzim, protein, RNA, DNA v.b. tür biyokimyasal maddeler istenilen saflık derecesine göre aşağıdaki yöntemlerden yararlanılarak ayrılır ve yabancı maddelerden arındırılırlar. En fazla kullanılan yöntemler adsorpsiyon, çöktürme ve ekstraksiyondur.

Adsorpsiyon yöntemi için başlangıçta aktif kömür kullanılırdı. Aktif kömüre adsorplanan ürün, aktif kömürün asitle muamele edilmesi ile geri kazanılırdı. Günümüzde ise adsorpsiyon yöntemi için daha çok iyon değiştirici reçineler kullanılır.

Çöktürme yöntemi filtre edilmiş sıvıda veya fermantasyon sırasında mikroorganizma substrat içinde iken uygulanır. Fermantasyon sırasında yapılan çöktürmeye tipik bir örnek laktik asidin Ca-laktat olarak çöktürülmesi verilebilir.

Çöktürme işleminde en çok kullanılan bir yöntem biçimi de tuzla ayırmadır (salting-out). Bu amaç için en çok kullanılan tuz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ' tır. Bu amaç için izoelektrik noktadan da istifade edilir. Alkol, aseton v.b. maddeler de yerine göre çöktürme maddesi olarak kullanılabilir.

Ekstraksiyon yöntemi, fermentasyon sonucunda oluşan ürünün, su ile karışmayan bir çözücü ilavesi ile çözücüye çekilip daha sonra çözücünden ayrılması işlemini kapsar. Ürünün tamamen kazanılması için birkaç defa uygulanır.

Bu yöntemlerin herhangi biriyle kazanılan ürün, kullanacağı alana göre saflaştırılır. Saflaştırılan ürün, antibiyotiklerde olduğu gibi sterilize edilerek (filtrelerden geçirilerek) paketlenir ve satışa sunulur.

3.2. Fermentasyon Metotları

3.2.1. Yüzey Yöntemi

Bu yöntemde mikroorganizma sıvı, yarı katı veya katı substratın yüzeyinde gelişir. Bu sırada genellikle besiyeri üzerinde bir zar yada misel örtüsü oluşmaktadır. Mikroorganizmalar besiyerinin üzerindeki bu zar üzerinde gelişirler. Metabolizma ürünü hücre içinde kalır, ortama salgılanır ya da her iki halde de bulunur. Bu yöntemde geniş ve yayvan biçiminde çeşitli tür kaplar kullanılır. Yüzey büyüdükçe yüzeydeki misel örtüsünün havalandırılması o kadar kolay olur. Kapların hacimleri genellikle 2-4 lt olup içlerine 0.5-2 lt besiyeri konulur. Sterilize edildikten sonra, püskürtme yolu ile spor süspansiyonları ile aşı yapılır ve inkübasyon odalarında fermentasyona terk edilir.

Bu metot basit olması nedeni ile laboratuvar çalışmalarında, sitrik asit ve bazı enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır.

3.2.2. Daldırma Yöntemi

Bu yöntemde mikroorganizma substratın içerisinde geliştirilir. Gerekli hava substratın yüzeyi üstünde bulunur veya havalandırma düzeni yardımıyla substrat içerisine verilir.

En basit daldırma metodu, aşılınmış sıvı kültürünün çalkalanmasıdır. Bunun için dairesel veya yatay hareketler yapan çalkalama makinelerine yerleştirilen erlenler, istenilen hız, süre ve sıcaklıkta çalkalanır. Fakat daha büyük hacimde çalışmalar için daldırma fermentörleri kullanılır. Fermentörler, fermantasyon teknolojisinde kullanılan özel tepkime kaplarıdır. Aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Kesikli fermentörler
2. Sürekli akış karıştırılmalı tank fermentörler
3. Tıpa akış borulu fermentörler
4. Akışkan yataklı fermentörler

Kullanılan sistemlere göre fermantasyon; kesikli, yarı kesikli ve sürekli fermantasyon olarak üç gruba ayrılır.

Kesikli fermantasyonda, besiyeri başlangıçta fermentöre konarak sterilize edilir. Sonra mikroorganizma ile aşılınarak karıştırılır ve gerekli dönüşüm sağlanıncaya kadar belirli bir süre beklenir. Bir kesikli fermantasyon için gerekli zaman, sağlanacak çalışma koşullarına göre birkaç saatten birkaç haftaya kadar değişebilir. Bu süre boyunca mikrobiyal kirlenmeden sakınılmalı ve kaptaki bileşenler karıştırılıp, sıcaklık denetlenmelidir.

Yarı kesikli fermantasyonda, fermantasyon maksimuma eriştiği zaman fermentördeki maddenin tamamı boşaltılmaz. Bir kısmı aşılama kültürü olarak fermentörde bırakılır ve bunun üzeri yeni substrat ile doldurulur.

Sürekli fermantasyonda, fermentöre ilave edilen yeni substrat miktarı kadar fermentörden fermente olmuş besin çözeltisi alınır. Bu sistemde yeni substrat mikroorganizmanın eksponensiyel gelişme fazının sona erdiği anda fermentöre verilir ve aynı miktar ürün alınır. Böylece mikroorganizma eksponensiyel gelişme fazında tutulmuş olur. Bu metot eksponensiyel fazda sağlanan maddelerin elde edilmesinde büyük fayda sağlar.



3.3. Köpük kırma

Fermantasyonlarda havalandırma, karıştırma ve yüzey etkin madde özellikleri içeren metabolitlerin meydana gelişi nedeniyle köpük oluşur. Köpük oluşumu; fermantasyon sırasında kaptaki sıvı hacminin önemli derecede azalmasına, çıkış hava filtresinin ıslanıp mikrobiyal enfeksiyon tehlikesine ve oksijen aktarım hızında önemli azalmaya neden olur. Oluşan köpüğün kırılması kimyasal ve mekanik olmak üzere 2 yolla yapılır.

a) Kimyasal Yolla Köpük Kırma

Kimyasal köpük kırıcılar, az dozlarda etkili olmalıdır. Mikroorganizmaya ve meydana gelmesi istenilen metabolizma ürününün biyosentezine zararlı olmamalıdır. Fermantasyondan sonra kolay ayrılabilmelidir. Pratikte sıvı yağlar, parafinler, bazı polioksietilen veya polioksipropilen bileşikleri, yüksek alkoller (özellikle oktodekanol) v.b. maddeler köpük kırıcı olarak kullanılır.

b) Mekanik Yolla Köpük Kırma

Mekanik yolla köpük kırma daha çok uygulanmaktadır. Mekanik köpük kırıcı, fermenter tankının üst kısmına monte edilmiş içi boş bir boru ve borunun tanka giren kısmına konik bir şekildeki zarfların bağlanmasıyla hazırlanan bir sistemdir. Sistem motor ile döndürülür ve bu sırada zarfların aralıklarından içeri giren köpük-gaz boru vasıtasıyla dışarı atılır. (Özçelik, 1992)

3.4. Katı Hal Fermantasyonu

Katı hal fermantasyonu (KHF), katı ya da yarı katı substrat kullanılarak gerçekleştirilen yeni bir fermantasyon türüdür. Fermantasyon, su içermeyen veya sınırlı oranda serbest su ihtiva eden katı substrat üzerinden yürütülür. Ortamın minimum nem içeriği % 12 'nin altına düştüğünde mikrobiyal aktivite durur. Nem içeriği % 30-80 arasında tutulabilir. Bu nedenle katı hal fermantasyonunda kullanılan mikroorganizmalar genellikle çok düşük su aktivitesinde (a_w) bile büyüeyebilen



mikroorganizmalardır. Mikroorganizmalar su aktivitesine karşı farklı davranırlar. Her mikroorganizmanın belli koşullar altında kendine özgü a_w değeri vardır. Örneğin, $a_w=0.95$ den daha küçük değerlerde bakterilerin büyümesi inhibe edilir. Buna karşılık fungi (küf mantarları) ve mayalar yaklaşık $a_w=0.7$ civarında yaşayabilirler. Katı hal fermantasyonu doğal kültür mikroorganizmalarla yapılabildiği gibi (örneğin, şapkaklı mantar üretimi), izole edilmiş saf kültürlerle de yapılabilir (örneğin, *Rhizopus arrhizus*'dan enzim üretimi).

Katı hal fermantasyonu biyokimya ve mikrobiyoloji prensipleri tam olarak anlaşılmadan yüzyıllarca ürün eldesi için kullanılmıştır. Katı hal fermantasyonuyla üretim "koji" prosesine dayanır. Japonların geleneksel koji prosesi, 25-30 °C' de havalandırılmalı bir ortamda tabakalarca istiflenmiş sepetlerde yüksek nemlilikte aşılınmış substratın fermantasyonuyla meydana gelmektedir. Substrat olarak genellikle pirinç, buğday veya soya fasulyesi gibi nemli maddeler kullanılırdı. Bu substratlar üzerinde *Aspergillus oryzae* gibi filamentli mantarların gelişmesiyle enzim karışımı üretilir ve besinlerin tadı değiştirilirdi. Bu tür endüstriyel proseslerin kontrolü çok güçtür. Bu proseslerde hedeflenen modifikasyonlar sıcaklık, pH ve nemlilik gibi çevresel koşulların kontrolünü kolaylaştırmak ve bu kontrolleri fermantasyon yığının tümünü etkileyecek şekilde geliştirmektir.

Sıklıkla çalışılan ortamlar, nemli buğday kepeği, mısır, pirinç v.b. bazı karbonhidrat kaynakları veya bunlarla birlikte bazı tuzları içeren ortamlardır. Ortamlar genelde çok basit ve ekonomiktir, besin gereksinimlerinin çoğu hububatlardan sağlanır. Katı hal fermantasyon ortamının sterilizasyonu düşük pH' larda buharla, kimyasal yöntemlerle veya her ikisinin kombinasyonu ile yapılır. Sterilizasyon sonrası soğutulan nemli kütle üzerine seçilen mikroorganizma spor süspansiyonu aşılanır. 25-40 °C arasında tutulan sıcaklıkta genellikle 1-10 gün süresince büyümesi sağlanır. Metabolik ısı ve kültürden yüksek su kaybından dolayı fermantasyon ortamının sıcaklığının ve nem içeriğinin kontrolü güçtür. Katı hal fermantasyonu, ortamın homojen olmamasından dolayı fermantasyonun gelişimini takip etmek zordur.



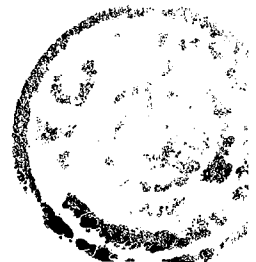
Endüstriyel katı hal fermantasyonunun pek çoğu aerobik ortamda gerçekleştirildiğinden fermantasyon şartları oksijen transferinin ve CO_2 ' yi ortamdan uzaklaştıracak şekilde ayarlanmalıdır. Ayrıca substrat olarak kullanılan partiküllerin büyüklüğü de katı hal fermantasyonunda oldukça önemlidir. Çünkü iyi bir gaz ve ısı transferi için partiküller arasındaki boşluğun optimize edilmesi gerekir. Isının uzaklaştırılması, sistemin hava akış hızının artırılmasıyla nispeten kolaylaştırılabilir.

Katı hal fermantasyonunun avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- a) Daha düşük maliyet; kullanılan substratlar, genellikle kolay elde edilebilir ve ekonomik olan buğday kepeği, tahıl tanesi, baklagiller v.b.maddelerdir.
- b) Daha basit bir teknik ve daha az enerjiye ihtiyaç vardır. Kullanılan ekipmanlar düşük güç harcarlar.
- c) Düşük nemli ortamlarda çalışıldığı için kontaminasyona sebep olacak bakteri türlerinin üremesi inhibe edilmiş olur.
- d) Sistemi terkeden atık suyun daha az olması .
- e) Köpük oluşumunun olmaması.
- f) Daha fazla prodaktivite.

Bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır. Bunları da şöyle sıralanabilir.

- a) Düşük nem konsantrasyonunda gelişebilen mikroorganizmalar ile sınırlı olması.
- b) Proses parametrelerinin ölçümü kültürün homojen olmamasından dolayı güçtür. Sıcaklık, oksijen transferi, pH gibi parametrelerin kontrolü zordur.
- c) Biyokütle miktarının kolaylıkla ölçülememesi.
- d) Substrat için nem oranının tam olarak kontrol edilememesi.



4. İMMOBİLİZE MİKROORGANİZMALAR

4.1. Genel

Pratikte ve endüstriyel uygulamalarda çeşitli üstünlükler göstermesi nedeni ile mikroorganizmaların ya belirli tutucularda tutularak ya da taşıyıcıların kafes yapıları içerisinde tutuklanarak veya çevreleri yarı geçirgen film tabakası ile çevrilerek kullanılmaları düşünülmüş ve bununla ilgili olarak son yıllarda yeni teknikler geliştirilmiştir.

Biyokimyasal dönüşümlerde ilk aşamada serbest mikroorganizmalar kullanılmıştır. Mikroorganizma sistemleri ve dönüşüm proseslerinin mekanizmalarının incelenmesiyle, mikroorganizmaların bu dönüşümleri içerdikleri enzimler aracılığıyla gerçekleştirdikleri bulunmuştur. Bu bulgu, mikroorganizmalardan enzim elde etme ve bu işlemleri çeşitli proseslerde kullanma konusundaki çalışmaları yoğunlaştırmıştır. Fakat enzim elde etme ve arıtma işlemlerinin çok pahalı ve güç olması daha değişik yolların aranmasına neden olmuştur. Bu şekilde enzim tutuklaması gündeme gelmiş ve bu konuda araştırmalar yapılmıştır. Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanımı mümkün olmasına rağmen, bu işlemin de pek ekonomik olmadığı görülmüştür. Bazı mikroorganizmaların çeşitli yüzeylerde üremeye yatkınlığının gözlenmesi, mikroorganizmaların da tutuklanarak kullanılabileceği düşüncesinin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

4.2. İmmobilize Mikroorganizmaların Serbest Mikroorganizmalara Göre Avantajları

Mikroorganizmalar aracılığıyla yapılan dönüşümlerden besin, kimya, tıp ve benzeri endüstri kollarından geniş ölçüde faydalanılmaktadır. Ancak klasik (serbest) enzim ve mikroorganizma sistemlerine göre, immobilize mikroorganizmaların kullanılmasının büyük avantajlar sağladığı gözlenmiştir. Bu avantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Tutuklanmış mikroorganizmalarda enzimler kendi doğal ortamlarında korundukları için daha kararlıdır.

2. Tutuklanmış mikroorganizma sistemlerinde kontaminasyon görülmez. Bu da dönüşümün artmasını sağlar ve ortamda başka ürünlerin oluşmasını önler.

3. Mikroorganizmalar tek bir süzme işlemi ile geri kazanılarak ve rejenere edilerek tekrar kullanılabilir.

4. Sürekli sistemlerde çalışma olanağı sağlar. Sürekli üretim serbest mikroorganizma sistemlerine göre daha verimli bir şekilde gerçekleştirilebilir.

5. Enzimleri mikroorganizmalardan izole etme ve saflaştırma işlemlerine gerek yoktur. Enzim aktivitesindeki kayıplar da önlenmiş olur.

6. Reaksiyonları daha yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, normal basınç v.b.) hızlandırır.

İmmobilize mikroorganizmaların bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır; serbest mikroorganizma kullanılan sistemlere göre difüzyon ve kütle aktarımı sorunları daha fazladır. Ayrıca hücrede bulunan çeşitli enzimler istenmeyen tepkimeleri katalizleyebilir.

4.3. Mikroorganizmaların İmmobilize Yöntemleri

Mikroorganizmaların immobilizasyon yöntemlerinin seçiminde aşağıdaki kriterler göz önüne alınır:

1. Yöntemin kolay olması
2. İmmobilizasyon sonunda mikroorganizma aktivitesindeki azalmanın az olması.
3. İmmobilize mikroorganizmaların yarılanma ömürlerinin uzun olması
4. Endüstriyel işlem karakteristiklerinin uygunluğu. Örneğin, difüzyon sınırlaması, kinetik parametreler, şişme özelliği, sabit yataklı reaktörde kullanıldığı zaman basınç düşmesi v.b. gibi
5. Yan reaksiyonlarının olmaması yada minimum düzeyde olması
6. Çevresel faktörlere karşı duyarlılığının az oluşu
7. İşletme masraflarının düşük olması

Yukarıda belirtilen bu özellikler araştırılarak mikroorganizmanın ve prosesin türüne göre en uygun immobilizasyon yöntemi seçilir.

Tutuklama yöntemleri dört gruba ayrılabilir. (Jack ve Zajic, 1977)

1. Yüzeye tutunma (Adsorbsiyon)
2. Kovalent bağlama
3. Tutuklama
4. Mikrokapsülleme

4.3.1. Yüzeye Tutunma (Adsorbsiyon)

Bu yöntem hücreleri iyonik yada hidrojen bağları aracılığı ile taşıyıcı yüzeylerde tutma (adsorbe etme) ilkesine dayanmaktadır. Adsorbsiyon derecesi hücre zarlarındaki biyokimyasal moleküllerde bulunan karboksil ve amino gruplarından gelen elektrostatik yüklere bağlıdır. Genellikle adsorbsiyon yöntemi ile mikroorganizmaların yüzeyde tutulma kuvvetleri zayıftır. Bu nedenle mikroorganizmalar taşıyıcı yüzeyinden kolayca kopabilmektedirler. Özellikle fermantasyon sırasında ortamın pH ve iyon şiddetinde değişimler oluyorsa bu sorun çok daha önem taşımaktadır. Ayrıca, reaksiyon ortamındaki toplam süspansiyon konsantrasyonuna göre adsorbe olmuş mikroorganizmaların oranı azdır. Ancak bu yöntemin kolay oluşu, adsorpsiyon sırasında hücrelere zarar vermemesi ve gözenekli olmayan tutucularda difüzyon sorunu yaratmaması nedenlerinden ötürü üstünlükleri olduğu için bazı durumlarda öteki yöntemlere tercih edilmektedir.(Pekin, 1982)

4.3.2. Kovalent Bağlama

Bu yöntem mikroorganizmaları aktive edilmiş taşıyıcılara yada birbirlerine kimyasal yollardan doğrudan doğruya bağlama ilkesine dayanmaktadır. Bu amaçla aminosilan, izosiyanit, karbodiimit, glutaraldehit gibi bileşikler aracılığı ile kimyasal yollardan taşıyıcıların yüzeyine spesifik gruplar bağlanır. Bu gruplar, hücre yüzeyinde bulunan amino, karboksil, sülfidril, hidroksil, imidazol yada fenol grupları ile reaksiyona girerek immobilizasyonu gerçekleştirirler.

Bu yöntemde mikroorganizmalar taşıyıcılara üniform olarak dağıtılabilmekte ve kararlılık çok uzun olmaktadır. Difüzyon sınırlaması tutucuların yapısına göre değişmekle beraber tutuklanmış sistemlere göre bu etki çok düşüktür. Taşıyıcı olarak en

çok karboksimetil selüloz, metal hidroksitler, glisidril metakrilat, lesitin ve agaroz boncukları kullanılmaktadır.

4.3.3. Tutuklama

Mikroorganizmalar, akrilamid polimerizasyonunda olduğu gibi kovalent bağlama ile üç boyutlu matriks kafesler içerisinde yada agar, aljinat, pektat, karregen (carreegenan) v.b. gibi hidrojellerde iyonik kuvvetler yardımı ile tutuklanırlar. Tutuklamadan sonra mikroorganizmalar matriks içerisinde çıkamamalı fakat substrat ve ürünler kolayca difüze olabilmelidirler. Bunun için kafes büyüklüklerinin oluşumunda özel tekniklere gereksinim vardır.

Polimerizasyon 25 °C de 15 dakikada tamamlanmakla beraber kullanılan kimyasal bileşikler mikroorganizmalara toksik etki yaptığı için hücresel aktivitelerde çok önemli oranda tahribat gözlenmiştir. Bu olumsuz etkiyi azaltabilmek amacı ile kullanılan kimyasal bileşiklerin konsantrasyonları azaltılarak her bir mikroorganizma için optimum koşullar saptanmıştır. Ayrıca oluşan jelin gözenek büyüklüklerinde akrilamid bismetilenakrilamid oranının çok önemli olduğu ve bismetilenakrilamid monomerinin %20 den fazla kullanılması durumunda oluşan jelin kırılma özelliği gösterdiği saptanmıştır. Serbest radikal sonucu meydana gelen polimerizasyon reaksiyonu ekzotermik bir olay olduğu için işlem sırasında ısı açığa çıkmaktadır. Tutuklama yapılırken mikroorganizmaların ısısal deaktivasyona uğramamaları için (işlem yapılırken) sıcaklığın dikkatle kontrol altında tutulmasında zorunluluk vardır.

4.3.4. Mikrokapsülleme

Bu yöntemde hücreler yarı geçirgen bir zarla oluşan mikrokapsüller içine tutuklanır. Sistemin temeli zarın seçiciliğine dayanır. Zarın gözenek çapından büyük olan hücre molekülleri zar dışına yayınamazlar. Bu yöntem ancak küçük molekül ağırlıklı ürün eldeğinde kullanılabilir. Mikrokapsüller genellikle küreseldir.

4.4. İmmobilize Mikroorganizmaların Uygulama Alanları

Endüstriyel amaçlarla kullanılan çalışmalar çok yeni olup birkaçı dışında pek çok mikroorganizmanın immobilizasyon koşullarındaki davranışları, biyokimyası, fizyolojisi, morfolojisi ve genetiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak bugüne kadar ki araştırmalar, immobilize mikroorganizmaların endüstriyel uygulamalarda büyük oranda ekonomik yararlar sağlayacağını, çeşitli üstünlükleri olduğu sonucunu ortaya koymuştur. İmmobilize mikroorganizmaların endüstriyel boyutlarda uygulandığı alanları şöyle özetleyebiliriz:

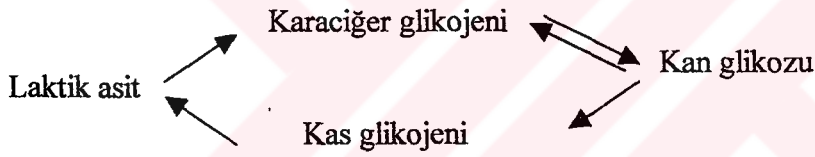
- 1) L- Amino asit üretimi
- 2) Antibiyotik modifikasyonu
- 3) Biyolojik yakıt pilleri
- 4) Koenzim üretimi
- 5) Karbonhidrat dönüşümü
- 6) Steroid dönüşümü
- 7) Etanol üretimi
- 8) Bira endüstrisi
- 9) Rafinoz hidrolizi
- 10) Metanol üretimi
- 11) Atık suları arıtma ve toksik maddelerin parçalanması

Tutuklanmış mikroorganizmalar biyokatalitik tepkimelerde, teknik ve klinik analizlerde, tıp ve hücre biyolojisinde kullanılır. Fruktoz, L-aspartik asit, L-malik asit, asetik asit, sakkaroz, H_2 üretiminde uygulanabilir.

5. LAKTİK ASİT

Laktik asit, 2-hidroksipropionik asit, ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$), kas dokularında ekşimiş sütte ve kanın doğal bir bileşeni olarak doğada yaygın olarak bulunur. İlk defa ekşimiş sütte bulunması nedeniyle süt asidi adı verilmiştir (Özeriş, 1993). Bir tane asimetrik karbon atomu bulunduran en basit hidroksi asittir. Optikçe aktif iki şekilde yada rasemik karışım olarak bulunur. Oda sıcaklığında su ile karışabilen, renksiz, viskoz sıvı olarak veya düşük erime noktasına sahip katı olarak mevcuttur.

Laktik asit, biokimyada çok önemli bir rol oynar kasların hareketi için gerekli enerjinin, glikojenin komplike seri reaksiyonlar esnasında laktik aside dönüşerek sağlandığı görülür. Glikojenin kaslardaki yıkımı sonucu oluşan laktik asit karaciğere taşınarak, orada tekrar glikojene çevrilir (Gözükara, 1997). Karaciğer glikojeninden kan glikozuna, kas glikojenine, laktik aside ve buradan tekrar karaciğer glikojenine kadar olan dönüşümlere 'Cori çevrimi' adı verilir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Cori çevrimi

İnsan metabolizmasında laktik asidin fonksiyonları konusunda yayınlanan tezlerde; zatürre, verem ve kalp yetmezliği hastalarının kanında anormal derecede yüksek laktik aside rastlandığı belirtilmiştir.

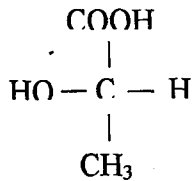
Laktik asit, karbonhidratların fermentasyonu ile ya da kimyasal sentez yoluyla üretilir. Eczacılık, kimya, plastik ve besin endüstrisinde kullanılan doğal bir organik asittir. Besin endüstrisinde tat artırıcı ya da koruyucu bir katkı maddesi olarak kullanılır. Biodegradable (bakterilerle parçalanabilen) plastik olarak kullanılan bir polimer olan polilaktik asit kaynağıdır. Ayrıca derilerin saklanması, yapıştırıcı maddelerin yapımında ve tekstil alanında boyama işleminde kullanılır.

Laktik asit, 1780 yılında ekşimiş sütte Scheele tarafından keşfedildi. Liebig, Berzelius, Wurtz, Kekulé, Strecker ve Wislicenus gibi bir çok ünlü kimyacı laktik asit hakkındaki bilgilerin gelişmesini sağlamışlardır. Çalışmaları sırasında karbon kimyasında üçüncü boyutun anlaşılmasında büyük gelişmeler kaydetmişlerdir. Fizyolojik olaylarda sürekli olarak laktik asidin meydana gelmesiyle ilgilenmişlerdir. Çalışmalar sonunda, laktik asidin optikçe aktif şekilleri ve bir çok türevleri saf olarak elde edilmiştir. Laktik asidin, su ve suda karışabilen organik çözücülerde çözünmediği, fakat diğer bir çok organik çözücülerde çözünmediği, düşük bir erime noktasına sahip olduğu ve higroskopik olduğu görülmüştür. Bu araştırmalar, üç boyutlu kimyanın temel teorileri kadar laktik asit kimyasının gelişmesinde de önemlidir.

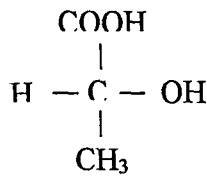
Laktik asit kimyasının keşfinden sonra bu maddenin hazır kullanımına ve ticari olarak üretimine gidilmiştir. Laktik asidin kullanım alanı ve üretimi A.B.D kimyacıları tarafından geliştirilmiştir ve diğer ülkelerde üretimine girilmeden önce A.B.D. de endüstriye iyice yerleştirilmiştir. İlk laktik asit fabrikası 1881'de Charles Avery tarafından kurulmuştur. Bunu A.B.D.'nin bir çok yerine kurulan fabrikalar takip etmiştir ve daha sonra İngiltere, Hollanda ve Almanya da buna katılmıştır.

5.1. Yapısal ve Fiziksel Özellikleri

Laktik asidin her iki optik izomeri doğada bulunur. Fakat ticari olarak genellikle optikçe inaktif şekildedir. Optikçe aktif asit, kontrollü şartlar altında direkt fermentasyonla ya da rasemik karışımın çözülmesiyle elde edilir. Laktik asidin izomer yapıları aşağıda gösterilmiştir.



L(+)-Laktik asit



D(-)-Laktik asit

L(+)- Asidin tuzları polarize ışığı sola çevirici

D(-)- Asidin tuzları polarize ışığı sağa çevirici özellik gösterir.

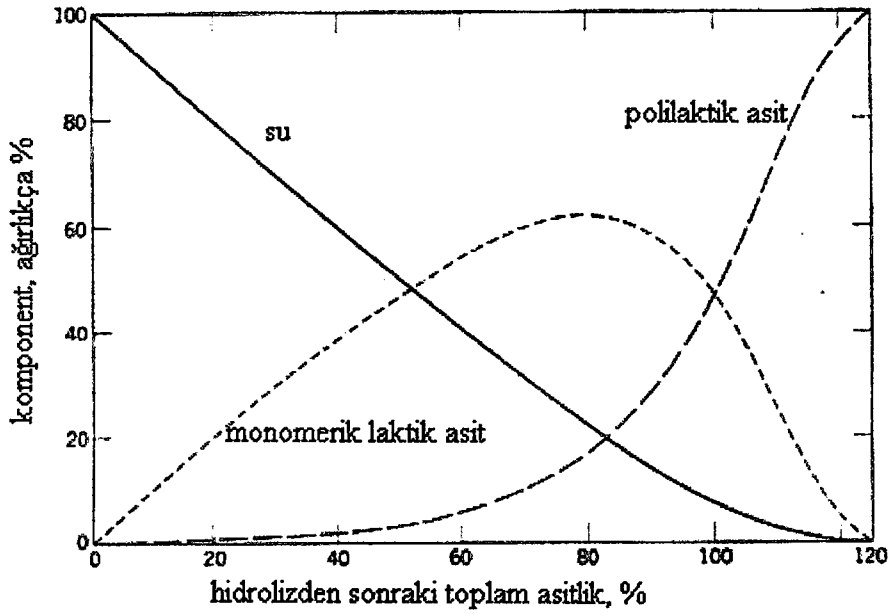
Laktik asit, rasemik karışım ve optik izomerleri higroskopik olduğundan dolayı bir sıvı şeklinde bulunur. Ayrıca, düşük basınç altında destile edilerek fraksiyonlu kristalizasyon ile saf kristal halinde bulunur. Tablo 5.1.'de optik izomerlerin bazı özellikleri görünmektedir.

Tablo 5.1. Laktik asit izomerlerinin özellikleri.

Optik şekli	Erime noktası (°C)	Çevirme açısı $[\alpha]_{5461}^{21-22}$
D(-)	52,8	-2,6
L(+)	52,8	+2,6
Rasemik	16,8	İnaktif

Laktik asit ısıtıldığı zaman kendiliğinden esterifikasyona uğraması kolay olduğundan düşük basınç altında kaynama noktasını belirlemek zordur. Kinney metodu ile yapılan hesaplamalarla atmosfer basıncı altında laktik asidin kaynama noktası 190 °C olarak bulunmuştur.

Laktik asidin çözeltileriyle daha çok karşılaşıldığından, çözeltilerinin özellikleri daha önemlidir. Laktik çözeltisinin denge bileşimi Şekil 5.2'de görüldüğü gibi konsantrasyona bağlıdır. %20'den daha az laktik asit içeren seyreltik çözeltilerin bileşimi, monomerik laktik asit ve suya karşılık gelir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise, çeşitli uzunluktaki polilaktik asitlere de rastlanır. Polilaktik asidin kendiliğinden esterifikasyonu kolay olduğundan, daha yüksek konsantrasyonlardaki çözeltiler daha komplekstir.



Şekil 5.2. Laktik asit-su sistemlerinin bileşimi.

Laktik asidin çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltilerinin, 25 °C'deki viskozite ve yoğunluk değerleri Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.2. 25 °C'de laktik asit çözeltilerinin viskozite ve yoğunluğu.

Laktik asit konsantrasyonu, %	Viskozite, cp	Yoğunluk, gr/ml
9,16	1,15	1,0181
24,35	1,67	1,0545
45,48	3,09	1,1054
64,89	6,96	1,1518
75,33	13,03	1,1748
85,32	28,50	1,1948

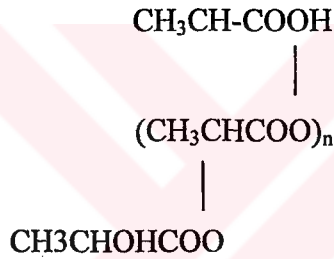
Laktik asidin yanma ısısı 3615 cal/gr spesifik gravitesi 1.2060_4^{25} 'dir. Laktik asit, su ve su ile karışabilen alkol ve aseton gibi organik çözücülerde kolayca çözülür.

5.2. Kimyasal Özellikleri

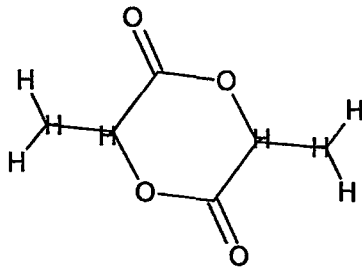
Laktik asit, hidroksil fonksiyonel gruplarının her ikisini de bulundurduğundan dolayı buharlaştırılarak konsantrasyonu artırıldığı zaman, lineer poli ester şeklinde kendiliğinden esterifikasyona uğrar. Böylece, seyreltik laktik asit konsantre edildiğinde, suyun uzaklaştırılması ve esterifikasyon bir arada olur. İlk esterifikasyon ürünü, dimer laktillaktik asittir.



Ancak konsantre işlemini daha ilerlettikçe, daha uzun esterler yani trimerik, tetramerik ve polimerik laktik asitler oluşur. Aşağıdaki formül, poliasitlerin genel yapısını gösterir.



Çizgisel polimerler daha yaygın olarak oluşur. Bunun yanında halkalı yapılar da oluşur. Özellikle laktit (3,6-dimetil-p-dioksan-2,5-dione) halkalı dimer yapısı fazla oluşur.

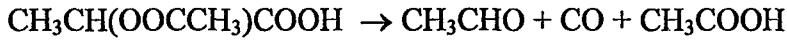


laktit

Laktit, 1932 Carothers tarafından elde edilmiştir. Laktik asidin yüksek vakum altında dehidratasyonu sırasında buhar fazında oluşur. Daha sonra yüksek sıcaklıkta ve

düşük basınçta destilenir. Laktik asit piroliz edildiğinde CH_3COH , CO ve H_2O 'ya ayrışır.

Mineral asitlerin varlığında ısıtıldığında aynı reaksiyonların daha düşük sıcaklıklarda meydana geldiği görülür. Mineral asitlerin katalitik miktardaki varlığı ile polilaktik asit oluşurken, mineral asitlerin daha büyük miktarlardaki varlığı CH_3COH , CO , CH_3COOH ve H_2O 'a ayrışır. Laktik asidin alkil türevleri ve esterlerinin pirolizi de CH_3COH ve CO ile sonuçlanır.



Daha ılımlı şartlar altında, mineral asit katalizliğinin varlığında, laktik esterleri polilaktik esterlerini üretmek için alkolasyona uğrar.



Ancak laktik asidin diesterleri piroliz edildiğinde tamamen farklı bir durum gösterir. Asetil ile muamele edilmiş laktik esterlerinden, akrilik esterler ve asetik asit oluşur.



Akrilik esterinin verimi, alkolün radikalının (R) yapısına bağlıdır. R, kendiliğinden bir olefin oluşumunu sağlayamayan kararlı bir grup olursa, akrilik ester verimi yüksektir.

Laktik asit verimi organik asitlerin tipik reaksiyonlarını gösterir. Laktik asidin bir çok tuzu bulunmaktadır. Bu tuzlar genellikle suda çözünürler. Laktik asit, bir çok alkol ile kolayca esterifikasyona uğrar. Bir çok laktik esteri, asit katalizliğinde esterifikasyon ile elde edilmiştir. Esterifikasyon genellikle susuz şartlar altında yapılır. Fakat polilaktik asidin esterleri de aynı anda oluştuğundan komplike bir durum ortaya çıkar. Bu durumu gidermek için aşırı miktarda alkol kullanılır.

Laktik esterleri, asetik gibi yağ asitlerinin esterlerinden daha kolay hidroliz olur. Ancak glikolik asidin esterlerine göre daha zor hidroliz olur. Ayrıca, sekonder alkollerin esterleri hidrolize karşı, primer alkollerin esterlerinden daha çok dirençlidir. Laktik esterleri ve laktit, çeşitli alkoller ile kolayca alkoliz olabilir. Eser miktardaki katalizin varlığında, laktitin alkoliziyle laktillaktik asidin esterleri üretilir. Buna karşın daha büyük miktardaki kataliz varlığı ile monomerik laktik esterleri üretilir.

5.3. Laktik Asidin Elde Edilmesi

Laktik asit ya fermentasyon ile ya da sentez yoluyla üretilir. Günümüzde her iki proses de laktik asidin ticari olarak elde edilmesinde kullanılır. Saf bir substratın maliyeti ile saf olmayan bir substratın kullanılıp sonradan asidin saflaştırma maliyeti de düşünülerek, substrat seçimi tüm prosesin maliyetinde temel alınır. Fermentasyon işleminde, düşük maliyetli bir karbonhidrat tercih edilir. Sentez prosesinde ise petrol orijinli yada kömürden elde edilebilen bir kimyasal kullanılır.

Laktik asidin destilasyonu ve kristalizasyonu zor olduğundan dolayı en saf halde üretilmeye çalışılır

5.3.1. Laktik Asidin Fermentasyon ile Elde Edilmesi

Laktik asit 90 yıldan beri ticari bir şekilde elde edilmektedir. 1963'ten önce laktik asit tamamen fermentasyon ile elde edilirdi. Bir çok karbon hidrat özel şartlar altında ve özel bakteriyel organizmalar kullanılarak laktik asit üretilir. Başlangıç maddesi olarak kolay elde edilebilir ve ucuz maddeler seçilir. Fermentasyon için en yaygın kullanılan hammaddeler; melas, kesilmiş süt suyu (peynir altı suyu) dur (Harsa, 1986; Bayraktar, 1989). Bir çok bakteri şekerden laktik asit üretir ancak bunun yanında diğer organik asitleri de üretir. *Lactobacillus delbruckii* gibi laktik asit bakterisi sadece laktik asit üretir ve ticari proseslerde kullanılır. Fermentasyon, pH'yı kontrol etmek için fazla CaCO_3 varlığında gerçekleştirilir. *Lactobacillus*' un en etkili olduğu pH 5.5 dir. pH'nın daha fazla düşerek fermentasyonu inhibe etmesini önlemek için laktik asidin nötralize edilmesi gerekir. Fermentasyondan sonra, tüm asitten Ca-laktat dönüşümünü sağlamak

için $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eklenir son karışım buharlaştırılarak konsantre edilir ve yüksek saflıktaki laktik asit kullanım için kristallendirilir, tuz kurutulur.

Yüksek saflıktaki laktik asit elde etmek için tuza H_2SO_4 ve çöken CaSO_4 ayrılır. Vakum buharlaştırıcı ile uygun asit konsantrasyonuna ayarlanır. Ca-laktatın kristalizasyonundan sonra kalan ana çözelti ise teknik kalitesindeki laktik asidin üretimi için konsantre edilir. Bu ham asitler, çözücü olarak izo-propil eter kullanılarak asidin ekstraksiyonu ya da metanol ile esterifikasyonu gibi metotlar kullanılarak saflaştırılabilir.

Laktik asidin teorik verimi , aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi fermente olabilen heksoz substratının ağırlığının %100'dür.



Pratikte bu verime ulaşılmaz. Karbonhidratın bir kısmının organizmanın kendi metabolizmasında kullanıldığı kabul edilir. Yaklaşık %85'lik bir verim gözlenir.

Fermantasyon çözeltisinden laktik asidin kazanılması işlemi laktik asidin kullanılacağı alandaki kalitesine göre değişir. Bazı kalitedeki laktik asidin kazanılma işlemleri aşağıda sınıflandırılmıştır.

5.3.1.1. Besin ve Gıda Alanında Kullanılan Laktik Asidin Elde Edilmesi

Besin ve gıda alanında kullanılan laktik asit iki yöntemle elde edilir. Birinci metotta substrat olarak saflaştırılmış bir karbonhidrat kullanılır. Böylece fermantasyon ürünü daha az bir saflaştırma işlemi gerektirir. İkinci metotta ise saflaştırılmış bir karbonhidrat kullanılmadığından dolayı ürün pahalı bir saflaştırma işlemi gerektirir.

Birinci metoda yüksek saflıkta bir karbonhidrat kullanılır. Saf CaCO_3 ilave edilir. Sülfürik asit ile asitlik ayarlanır ve oluşan CaSO_4 süzülür. Fermantasyon sonucunda oluşan parlak renkteki laktik asidin konsantrasyonu artırılır. Aktif karbon ya da iyon tutucu bir reçine ile muamele edilerek saflaştırılır. Gerekirse demir ve bakır bu noktada stokiyometrik oranda sodyum veya kalsiyum ferro siyanür eklenerek ferrisiyanit olarak



çöktürülerek uzaklaştırılır. Karbon ve ağır metal ferro siyanitleri süzülür. Laktik asit istenilen değerlere seyreltilir.

İkinci metotta, melas, konserve fabrikası artıkları, peynir altı suyu vb. ucuz karbonhidratlar fermente edilir. Fermantasyon sonucunda oluşan Ca-laktat bulunduran çözelti yüksek sıcaklıkta buharlaştırılarak % 25 katı içeriğine konsantre edilir ve süzülerek uzaklaştırılır. Daha sonra bu çözelti kalan Ca-laktatı kristallendirmek için soğutur. Kristal ürünler santrifüjlenerek ya da süzülerek ayrılır. Tekrar su içinde çözülerek sülfürik asit ilave edilir. Oluşan CaSO_4 süzülür ve sonuçta laktik asit buharlaştırılarak istenen değere konsantre edilir.

Elde edilen laktik asidin alternatif bir saflaştırma işlemi Jenemann tarafından uygulanmıştır. Fermantasyon sonucunda oluşan laktik asit fermantasyon ortamından izopropil eter ile ekstrakte edilir. Bunu su ile izopropil eterden laktik asidin geri ekstrakte edilmesi izler. Bu proste, bir sıvı-sıvı ekstraksiyon kulesi kullanılır. Kulenin üstünden sürekli olarak ham laktik asit çözeltisi verilirken izopropil eter de kulenin altından verilir. Laktik asit içeren izopropil eter çözeltisi kulenin üstünden alınır ve ikinci bir ekstraksiyon kulesine pompalanır. İkinci kulede izopropil eter içindeki laktik asidi uzaklaştırmak için zıt yönde su geçirilir. Laktik asidin sulu çözeltisi ise bu kulenin altından alınırken, izopropil eter kulenin üstünden alınarak ham laktik asit çözeltisinde laktik aside ekstrakte etmek için birinci kulenin altına pompalanır. Bu proses ile biraz daha saf bir laktik asit elde edildiğinde besin alınımında tercih edilir.

5.3.1.2. Eczacılık Alanında Kullanılan Laktik Asidin Elde Edilmesi

Laktik asidin eczacılık alanındaki kullanımı çok önemlidir. Bu alanda kullanılacak laktik asidin saflaştırılması daha çok itina ister ve saflaştırılma işlemleri zordur. Bu alandaki laktik asit genellikle şu üç prosesle saflaştırılır: sıvı ekstraksiyonu, yüksek vakum altında buhar destilasyonu ve metil laktat gibi uçucu bir esterin destilasyonudur. En pratik metot, metil esterin destilasyonudur. Laktik asit metanol ile esterleşen asit çözeltisinden konsantre edilir. Esterifikasyon yaklaşık 100 °C'de laktik asit içinden metanol buharı geçirilerek yapılır. Reaksiyon sonucunda oluşan metil laktatın buharlaştırılarak uzaklaştırılması daha yüksek bir verim sağlar. Daha sonra elde edilen

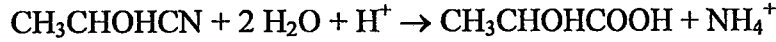


metil laktat fazla su varlığında kaynatılarak hidroliz edilir ve metanol tekrar kullanılabilir. Bu işlemler sonucunda laktik asit istenilen konsantrasyona getirilerek eczacılık alanında kullanılır.

5.3.2. Laktik Asidin Kimyasal Sentez Yoluyla Elde Edilmesi

A.B.D.'de 1963'e kadar laktik asit üretimi sadece fermantasyon ile elde edilirdi. O yıllarda sentez yoluyla üretimi 10 milyon lb/yıl kapasitesiyle Monsanto firması tarafından başlatılmıştır.

Sentez prosesinin temel reaksiyonu laktonitrilin laktik aside dönüşümüdür.



Laktonitril ham laktik asidin sulu çözeltisine dönüşür. Daha sonra saflaştırılır ve % 50 ya da % 80'lik asit çözeltisi halinde ayarlanır. Sonuçta oluşan ürün renksiz bir sıvıdır ve iyi bir sıcaklık stabilitesine sahiptir.

Laktik asidin kimyasal sentez ile elde edildiği diğer prosesleri kireç ya da sodyum hidroksit gibi alkaliler ile şekerin indirgenmesi, yüksek sıcaklık ve basınçta karbon monoksit ve asetaldehitin reaksiyonu ve α -kloropropiyonik asidin hidrolizi şeklinde özetlenebilir.

5.4. Laktik Asidin Kullanım Alanları

Laktik asit, besin endüstrisi dışında bir çok alanda kullanılmasına rağmen en önemli kullanımı besin endüstrisindedir. Laktik asit uçucu değildir ve renksizdir, bu gibi özellikleri kullanımını artırır. Besin ve içeceklerde aromatik maddeler ile birlikte kullanıldığı zaman hoş bir lezzet vericidir. Laktik asit turşu, salamura, zeytin ve benzer şekilde asitle muhafaza edilen besinlerde iyi bir koruyucudur. Ticari olarak sıvı şekilde sunulduğundan dolayı kolay kullanılır. Bu özellikler laktik asidin hayvan besinlerinde, un mamullerinde, bira, yağ, şekerleme, peynir, tatlandırıcı ekstratlar, sıvı pektin, alkolsüz içecekler, hazır çorbalar ve toz içecekler gibi besin maddelerinde kullanımını artırmıştır.



Laktik asidin, hava ile taşınabilen bakterileri yok edici bir etkisi olduğu bulunmuştur. n-dodesil amin laktat içeren mikrop öldürücü madde; antiseptik, küflenmeyi önleyici, mantar öldürücü ve dezenfekte amaçlarda kullanılır.

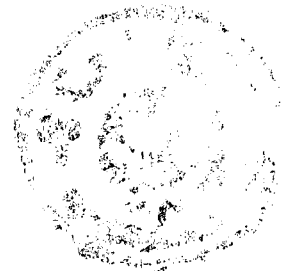
Ham laktik asit, derilerin ve postların saklanması, sebzelerin ıslahında uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Ayrıca, çözücü olarak kullanılan metil, etil ve n-bütil laktatlar gibi hazırlanmış esterlerin ham maddesidir. Ham laktik asit, tekstil endüstrisinde yün boyamasında kullanılır. Ayrıca yapışkan, temizleyici ve cilalama maddelerinde, elektro kaplama ve elektro cilamada, böcek ve mantarların yok edilmesinde, plastik ve reçinelerde, özel mürekkeplerde de laktik asit kullanılır.

Fenol formaldehit reçinelerin üretiminde reçinenin kalitesini ve berraklığını bozmadığından dolayı, laktik asit alkali katalizin nötralizasyonu için tercih edilir. Bu uygulamada, özellikle demiri uzaklaştırılmış yüksek saflıktaki laktik asit kullanılır.

İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra laktik asit ve türevlerinin yeni uygulama alanları bulunmuştur. Alüminyum, krom, kobalt, bakır, demir, kurşun, mangan, titanyum, çinko, toryum ve kalay gibi metallerin tuzlarının küçük miktarları (% 1-6) ile yada kuruyan yağlar ile polilaktik asidin reaksiyonu tarafından yüzey kaplamaları yapılabilmektedir. Laktik aside disoklopentadien eklenmesi ile oluşan eter-esterin özellikle kurutucuların varlığında havadan oksijeni absorplama özelliği yüksektir. Bu eter ester, peroksitler ile ısıtılarak polimerleştirilebilir.

Yüksek kaynama noktasına sahip laktik esterlerinin bir çoğu reçinelerin plastikleştirilmesi için kullanılır.

Laktik asit ayrıca, kalsiyum tedavileri için kalsiyum laktat olarak da eczacılık alanında kullanılır. Higroskopik olan sodyum ve potasyum laktat gibi diğer tuzların gliserolün devamı olarak kullanıldığı bulunmuştur. Laktik asidin en yeni ve en önemli kullanımı polimerlerin üretimidir. Özel bir ürün olan kalsiyum stearly-2 laktilat, un mamullerinin mayalanmasını hızlandırmak için kullanılır. Diğer laktatlar çeşitli mayalanmayan unlu ürünler ve hazır karışımlarda kullanılır.



5.5. Laktik Asidin Depolama Malzemeleri

Korozyon laktik asidin üretiminde, yüklenmesinde ve depolanmasında görülen en önemli problemlerden biridir. Demir, çelik, krom-çelik, bakır ve bakır alaşımları laktik asit çözeltilerine karşı düşük bir direnç gösterir. Korozyona karşı direnç gösteren metaller nikel ve yüksek miktarda nikel-krom içeren düşük demir alaşımları içerir. Gümüş, laktik asit korozyonu için dirençlidir ancak pahalıdır. Seramik maddeler, özellikle cam korozyona karşı dirençlidir. Fakat yüksek sıcaklığa dayanıklı olmadıklarından, düşük bir ısı iletim katsayısına sahip olduklarından ve kolay kırıldıklarından dolayı tercih edilmezler. En uygun depolama malzemesi plastiktir. Laktik asit plastik şişelerde yada plastik ceketli tanklarda bulundurulur ve satışa sunulur.

5.6. Laktik Asidin Toksik Etkisi

Laktik asit biyolojik sistemlerde normal bir üründür. Gıda ve eczacılık alanında kullanılır. Doğal olarak düşük konsantrasyonlarda meydana gelir. Konsantre edilmiş çözeltileri içten ve dıştan vücuda zararlıdır. Deri teması üçüncü derecede termal yanıklara benzer yanıklara yol açabilir. Konsantre edilmiş çözeltileri yutulduğu zaman ağızda ve boğazda yanıklara sebep olur. Laktik asit göz tahriş edicidir ve fazla teması görme kayıpları ile sonuçlanabilir. Deri veya göz temasında etkilenmiş bölge bol miktarda su ile yıkanmalıdır.

5.7. Laktik Asidin Türevleri

5.7.1. Tuzları

Ticari alanda kullanılan laktik asit tuzları aşağıdaki gibi listelenebilir:

- Alüminyum Laktat
- Alüminyum Sodyum Klorohidroksi Laktat
- Alüminyum Sodyum Laktat
- Kalsiyum Laktat
- Sodyum Laktat

Bu tuzlardan en çok kullanılanları sodyum ve kalsiyum laktattır. Fermantasyon yoluyla veya metal karbonatların ya da hidroksitlerin serbest asitler ile reaksiyonları ile elde edilebilir.

Kalsiyum Laktat

$(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Ca} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pentahidrat kristalleridir. 100-120 °C 'de suyunu kaybeder. 100 gr suda, 30°C'de 7,9 gr, 15°C'de 5,4 gr, 0°C'de 3,1 gr'lık bir çözünürlüğe sahiptir. Kalsiyum laktat, kalsiyum tedavilerinde yaygın olarak kullanılır. Hemoraji(kanama) tedavilerinde kanı pıhtılaştırmak için kullanılır. Şeker çözeltileri kalsiyum laktat ilavesiyle jelleşebilir. Kalsiyum laktat ayrıca elmaların dayanıklılığını artıran bir maddedir.

Sodyum Laktat

$\text{CH}_3\text{CHOHCOONa}$, çok nem kapar. Teknik ve besin alanlarda kullanımı için % 50-60'lık çözeltiler halinde bulunur. Kristal tuzların elde edilmesi çok zordur. Çünkü çok kolay nem kapar, su ve alkolde çok kolay çözünür.

Diğer tuzlar

Alüminyum laktat $(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_3\text{Al}$, taneli bir katıdır. Suda çözünebilir ve antiperspirant (terlemeyi önleyici) olarak kullanılır. Antimon laktat $(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_3\text{Sb}$ tekstilde boyamada kullanılır. Bakır laktat $(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Cu} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, suda çözünebilir ve teknelerin elektro kaplanmasında tercih edilir. Demir laktat $(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Fe} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, suda çözünebilir, bebek mamalarında, kuvvet verici maddelerin içeriğinde, anemi (kansızlık) tedavisinde kullanılır. Titanyum laktat, üretim sırasında aşınmayı önlemek amacıyla sistemin cam cidarlarında kullanılır. Zirkonyum laktat, kozmetik alanında terlemeyi önlemek amacıyla tercih edilir.

5.7.2. Esterleri

Uygun esterleşme prosesleri, metil, etil ve n-bütil laktatların yüksek verimle elde edilmesi için kullanılır. Başlangıç maddesi genellikle laktik asittir. Ancak laktik Asidin



tuzları da kullanılabilir. Metil laktat oluşumunda, polilaktik asidin kullanımı laktik asidin kullanımından daha iyi sonuç verir. Ester, kısmen esterleşme ile kısmen de alkoliz reaksiyonları ile oluşur. Polilaktik asidin polimerleşmesi yüksek olduğundan, polilaktik asidin kullanımı metil laktatın sudan ayrılma problemini ortadan kaldırmıştır.

Literatürde laktik asidin birçok esteri bulunur. Bunların bir kısmı, vinil reçineler ve selüloz plastikleri için plastikleştirici işlevi gören ve yüksek bir kaynama noktasına sahip olan sıvılardır.

Laktik asidin esterlerinin hidroliz çalışmaları pahalıdır. Genellikle organik asitlerin esterlerinin hidroliz hızı, organik asidin kuvvetiyle orantılıdır. n-alkil laktat esterlerinin alkalik hidroliz hızı, alkil gruplar artırılırsa düşer. Sekonder alkollerin laktik esterleri, uygun primer alkollerin esterlerinden daha zor hidroliz olur.

Metil, etil ve bütil laktatlar, asetik anhidrit ile kolayca reaksiyon vererek asetil türevlerini meydana getirirler. Asetil türevleri, laktik esterlerinden daha yüksek kaynama noktasına sahiptir ve suda daha kolay çözünürler.

Metil laktat

$\text{CH}_3\text{CHOHCOOCH}_3$, erime noktası -66°C , kaynama noktası b_{760} 145°C , b_{10} 42°C , yoğunluğu d_4^{20} 1,0939 , kırılma indisi n_D^{20} 1,4139 , viskozite 2,94 cp (20°de)'dir. Su ile çözülebilir laktik asidin en önemli türevlerinden biridir.

Laktik asidin % 44, 85 konsantrasyonları ile metanol arasında esterleşme reaksiyonu kullanılarak elde edilir. Bu reaksiyonda sıcaklık, mineral asit katalizinin konsantrasyonu ve reaktan miktarı etkilidir.

Etil Laktat

$\text{CH}_3\text{CHOHCOOCH}_2\text{CH}_3$, erime noktası -25°C , kaynama noktası b_{760} 154°C , b_{10} 51°C , yoğunluğu d_4^{20} 1,0348 , kırılma indisi n_D^{20} 1,4132 , viskozite 2,61 cp (20°de)'dir. Suda çözünebilir etil laktat uçucu bir ester olduğundan dolayı, laktik asidin saflaştırılması işleminde kolaylık sağlar. Etil laktat verniklerde çözücü olarak ve tablet halindeki ilaçlar kayganlaştırıcı olarak kullanılır.



n-bütıl Laktat

$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, erime noktası -43°C , kaynama noktası b_{760} 187°C , b_{10} 75°C , yoğunluğu d_4^{20} 0,9837 , kırılma indisi n_D^{20} 1,4217 , viskozite 3,58 cp (20°C 'de), buhar basıncı 20°C 'de 0.4 mmHg , yüzey gerilimi 30,6 dyn/cm'dir. Bütıl laktat yüksek bir kaynama noktasına sahip olduğundan dolayı vernikleyici maddeler için uygun bir çözücüdür.

Laktit

Laktik asidin halkalı dimer esteridir. Su içinde hidroliz hızı düşük olduğu için, sulu sistemlerde asitliği normal bir seviyede tutmak için kullanılabilir. Susuz ortamlarda laktit nötraldır ve reaksiyon vermez.

5.7. Fermantasyon Yoluyla Laktik Asit Üretimi Alanında Yapılan Bazı Çalışmalar

Laktik asidin fermantasyon yolu ile üretiminde, bilim adamları çeşitli mikroorganizmalar ve besi yerleri kullanarak değişik yöntemler denemişlerdir. Literatürde bu konu ile yapılan çalışmaların bir kısmı şu şekildedir:

Berry vd. (1999), substrat olarak glikozu ve belirli bir ortamda *Lactobacillus rhamnosus* mikroorganizmasını kullanarak kesikli bir kültürleme ile laktik asit elde etmişlerdir. % 84'lük bir verim sağlamışlardır.

Yumoto vd. (1995), nişastanın L(+)-laktik aside direkt fermantasyonu için *Lactobacillus amylophilus* 'u kullanmışlardır. 50 g nişastadan yaklaşık olarak 30 g L(+)-laktik asit elde etmişlerdir.

Abe vd. (1990), selülozun laktik aside fermantasyonunu incelemişlerdir. Selüloz kaynağı olarak saf selüloz ve gazete kağıtlarını kullanmışlardır. *Lactobacillus delbrueckii* mikroorganizmasını tercih etmişler ve % 58'lik bir verim sağlamışlardır.

Hamamcı ve Ryu (1994), fermantasyon sırasında büyük ve yumuşak misel kümelerinin oluşmasıyla fermantasyon suyunun viskozitesinin artmasından dolayı, fermantasyon veriminin düşmesi ve oksijen miktarının azalması gibi zorluklarla



karşılaştığını gözlemişlerdir. Bu nedenle laktik asit üretiminde immobilizasyon tekniklerini kullanmışlardır.

Tamada vd. (1992), *Rhizopus oryzae* 'nin immobilizasyonu amacıyla polimer bir destek kullanmışlar ve L(+)-Laktik asit üretimini incelemişlerdir. Mikroorganizmanın immobilize halde kullanılmasıyla oluşan laktik asit miktarının 1.8 kat arttığını gözlemişlerdir.

Dong vd. (1996), poliüretan köpük küplerini, *Rhizopus oryzae* 'i immobilize etmek amacıyla kullanarak L(+)- laktik asit üretimini incelemişlerdir. L(+)-laktik asit üretim hızının, immobilize *Rhizopus oryzae* kullanılarak üç katına çıkarılabileceğini bulmuşlardır.

Kosakai vd. (1996), glikoz ve *Rhizopus oryzae* kullanarak L(+)-laktik asit üretiminde, oluşan kek yapısının mineral destek ve polietilen oksidin ilavesiyle pamuk yapısına dönüştürülerek verimin arttığını gözlemişlerdir. % 86'lık bir verime ulaşmışlardır.

Sun vd. (1998), biyoreaktörde poliüretan köpüklerde tutuklanmış *Rhizopus oryzae* ile L(+)-laktik asidin sürekli üretimini incelemişlerdir. Laktik asit veriminin, beslenen glikoz konsantrasyonunun artırılması ile arttığını gözlemişlerdir.

Chartterje vd. (1997), α -amilaz üreten *Lactobacillus cellobiosus* ile çürük patates lapasının direkt fermantasyonu ile laktik asit üretmişler, ortamın nötralizasyonu için % 3 (w/v) CaCO_3 kullanmışlar ve 48 saat içinde nişastaya göre % 50' lik bir dönüşüm elde etmişlerdir.

Soccol vd. (1993), *Rhizopus* ' un 9 farklı suşunda, substrat olarak ham cassava (hububat cinsinden bir bitki) kullanarak katı hal fermantasyonunu uygulamışlar. Fermantasyonda amilaz üretim kabiliyetini, fumarik asit, laktik asit, etanol oluşumunu incelemişlerdir.

Hang vd. (1989), mikroorganizma olarak *Rhizopus oryzae* NRRL 395 kullanarak mısırın direkt fermantasyonu ile L(+)-Laktik asit üretimini incelemişler ve toplam karbonhidratın % 44 ' ünün ürüne dönüştüğünü bulmuşlardır. Fermantasyon ortamının nötralizasyonunu CaCO_3 ile sağlamışlardır.

Xiadong vd. (1997), karbon kaynağı olarak mısır, cassava, buğday, pirinç ve patates nişastası kullanarak, *Lactobacillus amylovorus* ile laktik asit oluşumunu incelemişlerdir. Cassava bünyesindeki nişastaya göre % 43' lük bir dönüşüm sağlandığını ancak N kaynağı ilavesiyle (% 1 pepton) bu dönüşümün % 70' e yükseltilebileceğini bulmuşlardır.

Yu vd. (1989), mikroorganizma olarak *Rhizopus oryzae* NRRL 395 kullanarak arpa, cassava, pirinç ve mısırın direkt fermantasyonu ile laktik asit üretimini incelemişlerdir. Karbonhidrat tüketim ve L(+)-Laktik asit üretim hızına, substrat cinsinin, substrat konsantrasyonunun, fermantasyon ortamının sıcaklığının etkisi araştırmışlardır. Buna göre en iyi fermantasyon verimini % 5 (w/w) pirinç içeren ortamda elde etmişlerdir. Fermantasyon için optimum sıcaklığı 30 °C olarak bulmuşlardır.

Richter vd. (1994), *Lactobacillus paracasei* ile daldırma ve katı hal fermantasyonunu uygulayarak şeker kamışından L(+)-Laktik asit üretimini incelemişlerdir. Katı hal fermantasyonunda, fermantasyon sürecinin daha uzun olduğunu gözlemlemişlerdir.

Samuel vd. (1980), şeker pancarı kamışının ekstraksiyonu ile oluşturulan fermantasyon ortamında *Lactobacillus plantarum* ile laktik asit üretimini gerçekleştirmişler ve 60-80 saat sonunda % 85' lik bir verim elde etmişlerdir.

6. MATERYAL VE METOTLAR

6.1. Mikroorganizma

Çalışmalarda, ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilen *Rhizopus oryzae* NRRL 395 kullanılmıştır.

6.2. *Rhizopus oryzae*'nin İnkubasyonu

Rhizopus oryzae 'nin üretimi için kullanılan besiyerinin bileşimi Tablo 6.1. ' de verilmiştir.

Hazırlanan besiyeri bir erlene konulmuş ve pH 6 ya ayarlanmıştır. Erlenin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyeri 121 °C de ve 1.2 bar basınçta 20 dakika süre ile otoklavda sterillemiştir. Sterillenen besiyeri yaklaşık 40 °C ye kadar soğutulmuştur. Bu sıcaklıktaki 40 ml besiyeri, yine sterillemiş petri kaplarına, aseptik koşullarda konulmuş ve katılaşmaya bırakılmıştır. Mevcut saf mikroorganizma içeren petri kabına (stok mikroorganizma), 15 ml steril saf su ilave edilerek, bir öze yardımıyla spor çözeltilisi elde edilmiştir. Bu spor çözeltilisinden (1×10^8 spor/ml) 700 µl alınarak agar yüzeyine aşılama yapılmıştır. Ekimi yapılan petri kapları 30 °C de, 5 gün süre ile inkübasyona tutulmuş ve *R.oryzae* nin gelişmesi sağlanmıştır.

Tablo.6.1. *R. oryzae* için agarlı besiyeri bileşimi.

Madde	Konsantrasyon(g/L)
Glikoz	5
KH ₂ PO ₄	0.65
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.05
Agar	20

6.3. Fermantasyon Ortamı

6.3.1. Glikoz İçeren Fermantasyon Ortamı

Çeşitli konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 g/L) glikoz, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.65 g/L KH_2PO_4 ve 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bileşimindeki besiyerinden 250 ml'lik erlenlere 50'er ml konulmuştur. Besiyeri içeren bu erlenler 120 °C 'de 20 dakika otoklavlanmıştır. 30 °C' ye kadar soğutulan erlenlerin her birine, yukarıda anlatıldığı gibi, 1×10^8 spor/ml konsantrasyonunda 700 µl spor aşılantısıdır. Ekimi yapılmış erlenlerde, 150 rpm çalkalama hızı ve 30 °C sıcaklıkta çalışan döner çalkalayıcıda 8 gün süreyle üretim yapılmıştır. Ortamın pH'ını ayarlamak için Hang vd. nin çalışmasında olduğu gibi her bir erlene daha önceden sterillenmiş, 50 g/L CaCO_3 eklenmiştir (Hang vd., 1989).

6.3.2. Sakkaroz İçeren Fermantasyon Ortamı

Değişik konsantrasyonlarda (5, 30, 50 ve 100 g/L) sakkaroz, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.65 g/L KH_2PO_4 ve 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bileşiminde hazırlanan besiyerine glikozlu ortamda yapılan işlemler uygulanmış, sterillenmiş her bir erlene spor aşılması yapılmış ve döner çalkalayıcıda 8 gün süren fermantasyon boyunca oluşan laktik asit miktarı tayin edilmiştir.

6.3.3. Melas İçeren Fermantasyon Ortamı

Fermantasyon ortamında kullanılan melas, Elazığ şeker fabrikasından temin edilmiştir. Melasın bileşimi Ek. 1' de verilmektedir.

Deneylerde kullanılan melas bazı ön işlemlerden geçirilmiştir. Belirli konsantrasyonlarda hazırlanan (75, 150, 300, 400 g/L) melas çözeltileri 5 dk kaynatılmış ve bir süzme işlemi yapılmıştır. Bu işlemle melasta bulunan tortu maddeleri ve fermantasyon üzerinde olumsuz etkileri olabilecek toksik maddelerin bir kısmı ayrılmış ve melas pastörize edilmiştir. Süzülen bu çözeltinin pH'ı 6' ya ayarlanıp, 250

ml'lik erlenlere 50' şer ml. konulmuştur. Her bir erlenin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa ile kapatılmıştır. Bunun üzerine alüminyum folyo geçirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besi yerleri 121°C'de ve 1.2 bar 'da 20 dk otoklavlanmıştır. 30 °C 'ye soğutulan bu erlenlere, 700 µl spor çözeltisi ile aşılama yapılmıştır. 8 gün süreyle döner çalkalayıcıda 150 rpm' de fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Ekimden 24 saat sonra pH yı kontrol etmek amacıyla steril 50 g/L CaCO₃ ilave edilmiştir.

Aynı işlemler yine 75, 150, 300, 400 g/L konsantrasyonlarında hazırlanıp, 5 dk kaynatılıp, süzülen melas çözeltilerine 10 g/L yeast ekstrakt eklenerek tekrarlanmıştır.

Üçüncü aşamada ise 75, 150, 300, 400 g/L konsantrasyonlarda hazırlanan melas çözeltileri, hiçbir katkı maddesi katılmadan ve kaynatma işlemi yapılmadan, direkt besiyeri olarak kullanılmıştır. Aynı işlemler uygulanarak 8 gün süreyle fermentasyon sürdürülmüştür.

6.3.4. Keçiboynuzu İçeren Fermentasyon Ortamı

Bileşimi Ek. 2' de verilen ve Mersin yöresinden temin edilen keçiboynuzu, kurutma ve öğütme gibi ön işlemlerden geçirilmiştir. Toz haline getirilmiş keçiboynuzundan, ağırlıkça % 40, % 20, % 10 keçiboynuzu içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Otoklavlanan besiyerlerine 1x10⁸ spor/ml konsantrasyonunda 700 µl spor ekimi yapılmıştır. 150 rpm ve 30°C sıcaklıkta çalışan döner çalkalayıcıda, serbest halde 7 gün süreyle mikroorganizma geliştirilmiştir.

Diğer denemelerde; ilk olarak % 10 keçiboynuzu içeren besiyerine 50 g/L glikoz, ikinci olarak % 10 keçiboynuzu içeren besiyerine 2 g/L (NH₄)₂SO₄ , 0.65 g/L KH₂PO₄ ve 0.25 g/L MgSO₄.7H₂O ve üçüncü olarak % 10 keçiboynuzu içeren ortama 50 g/L glikoz + 2 g/L (NH₄)₂SO₄ , 0.65 g/L KH₂PO₄ ve 0.25 g/L MgSO₄.7H₂O katkı maddeleri eklenmiştir. Otoklavlanan besiyerlerine 1x10⁸ spor/ml konsantrasyonunda 700 µl spor ekimi yapılmıştır. Çalkalama hızı 150 rpm ve sıcaklığı 30°C 'ye ayarlanmış çalkalayıcıda 7 gün süreyle fermentasyon sürdürülmüştür.



Deneylerin bir diğ er aşamasında, besiyeri olarak, % 10 ke iboyunuzu içeren ortamdan elde edilen ke iboyunuzu ekstraktları kullanılmıştır. % 10 konsantrasyonundaki besiyeri, 121 C sıcaklıkta ve 20 dakika ekstrakte edilerek, birinci durumda ekstraktlar s z lm şt r, ikinci durumda ekstraktlar s z ld kten sonra 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.65 g/L KH₂PO₄ ve 0.25 g/L MgSO₄.7H₂O miktarlarında katkı maddeleri ilave edilmiştir,     nc  durumda ise ekstrakte edilmiş ortamdan ke iboyunuzu taneleri süzme işlemi ile ayrılmayıp, lapa halinde bir besiyeri kullanılmıştır. Her üç durumdaki besiyerinin pH'ı 6 'ya ayarlanıp, 250 ml'lik erlenlere 50 'şer ml konulmuştur. Otoklavlanan besiyerine, herbir erlen için 700  l, 1x10⁸ spor/ml konsantrasyonunda aşılama yapılmıştır. 150 rpm çalkalama hızı ve 30 C 'de 8 gün süreyle fermentasyon sürdürülmüştür.

6.3.5. Buğday Kepeği İçeren Fermentasyon Ortamı

Karbon kaynağı olarak buğday kepeğinin kullanıldığı çalışmalarda, grubumuzca daha önce optimize edilen 0.3 mm. boyutunda buğday kepeği tercih edilmiştir. Buğday kepeğinin muhtemel kimyasal bileşimi Ek.3 'de verilmiştir. İlk denemelerde, 0.3 mm. boyutundaki buğday kepeğinden 50 g/L konsantrasyonunda su ile hazırlanan buğday kepeğine 50 g/L glikoz katkısının olduğu besiyerleri kullanılmıştır. Her bir besiyerinin pH 'ı 6 'ya ayarlanmış, 250 ml 'lik erlenlere 50 'şer ml konulmuştur. Otoklavlanan besiyerleri, 40 C 'ye kadar soğutulup, 1x10⁸ spor/ml konsantrasyonunda, 700  l spor ekimi yapılmıştır. 150 rpm ve 30 C 'deki çalkalayıcıda 8 gün süreyle üretim yapılmıştır. pH 'ı kontrol etmek için fermentasyon başlangıcından 24 saat sonra 50 g/L konsantrasyonunda steril CaCO₃ eklenmiştir.

6.4. Tutuklanmış Mikroorganizmalarla Yapılan Denemeler

Tutuklama malzemesi olarak 15 ppi gözenekli poliüretan köpükler kullanılmıştır. 0.8x20x55 mm boyutlarında kesilen poliüretan köpükler saf su içerisine konarak, her defasında suyu değiştirilmek üzere üç defa otoklavlanmıştır. Bu tutuklama malzemelerine, paslanmaz çelikten yapılmış bir tel ge irilmış ve bu tel " L " biçiminde kıvrılarak bir ucu erlenin ağzından çıkarılmıştır.

Besiyeri olarak çeşitli konsantrasyonlardaki (100, 150, 200, 250 g/L) glikoz, 2 g/L (NH_4) $_2\text{SO}_4$, 0.65 g/L KH_2PO_4 ve 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren ortam ve yine 300 g/L melas içeren ortam kullanılmıştır. pH 6 'ya ayarlanıp, herbir erlene 50 'şer ml konulmuştur. Ağzıları pamuk tıpa ile bunun üzerine alüminyum folyo ile kapatılan erlenler, daha sonra otoklavlanmıştır. 700 μl (1×10^8 spor/ml) spor çözeltisi, içerisinde tutuklama malzemesi bulunan erlenlere ilave edilmiş ve bunu takiben erlenler, 150 rpm ve 30°C ' de çalkalayıcıda 8 gün süreyle fermentasyona tabi tutulmuştur. Asitlikten dolayı oluşan pH yı dengelemek için, ekimden 24 saat sonra 50 g/L steril CaCO_3 ilave edilmiştir.

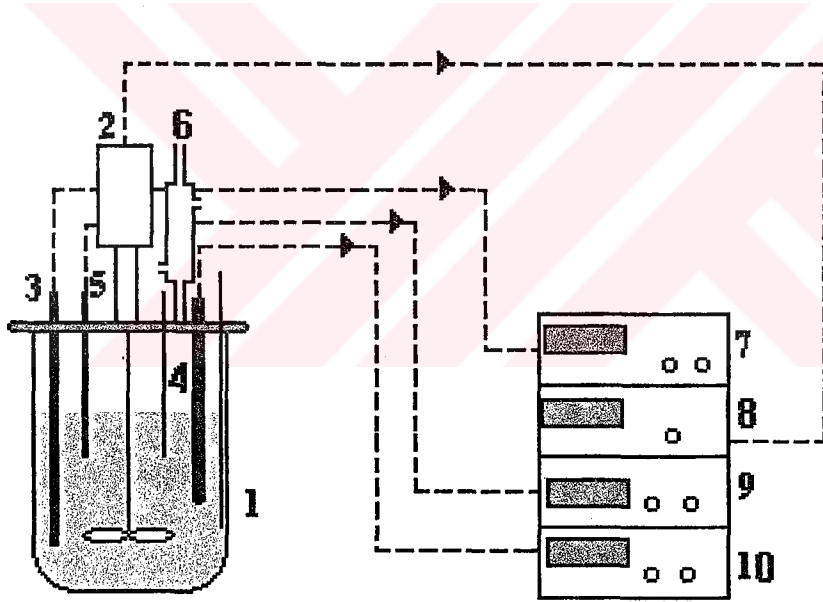
6.4.1. Süreklilik Çalışmaları

Tutuklama malzemesi olarak kullanılan 0.8x20x55 mm boyutlarında gözenekli poliüretan destek maddesi yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Besiyeri olarak 150 g/L glikoz, 2 g/L (NH_4) $_2\text{SO}_4$, 0.65 g/L KH_2PO_4 ve 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren ortam kullanılmıştır. Otoklavlanan besiyerine daha önce bahsedildiği gibi spor çözeltisi eklenmiştir. 150 rpm ve 30°C 'de çalkalayıcıda fermentasyon sürdürülmüştür. Herbir erlendeki fermentasyon ortamının pH 'ını kontrol altında tutabilmek için ekimden 24 saat sonra 50 g/L miktarında CaCO_3 ilave edilmiştir. Erlenlerdeki besiyerleri 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün aralıklarla steril-taze besiyerleriyle değiştirilmiştir. Taze besi ortamı ilave edilmeden önce biyokütle, % 0.9 (w/w) steril NaCl çözeltisi ile yıkanarak, bir önceki procesten kalabilecek olan laktik asit miktarı minimize edilmeye çalışılmıştır. 2, 3, 4, ve 5 günde bir boşaltılan eski besiyerlerinde laktik asit analizi yapılmış ve pH değişimi gözlenmiştir. Her taze besi ilavesinde ortam pH'sını dengede tutabilmek için yeterli miktarda CaCO_3 ilave edilmiştir.

6.5. Biyoreaktörde Serbest Mikroorganizma Çalışmaları

Serbest mikroorganizma ile kesikli sistemde çalışan bir karıştırmalı biyoreaktörde de bazı deneyler yapılmıştır. Biyoreaktör olarak 800 ml çalışma hacminde ısıya dayanıklı pyreks camdan yapılmış, 1-L hacimli silindirik bir fermentör kullanılmıştır.

Paslanmaz çelik malzemeden yapılmış kapak üzerinde pH elektrodu, sıcaklık sensörü, aşı ekleme, ürün çıkışı, hava giriş ve çıkışı, karıştırıcı, asit veya baz ilavesi için uygun bağlantılar vardır. Sistem pH metre ve buna bağlı pH kontrol ünitesi, asit ve baz pompaları, numune alma kabı ve numune alma pompası, karıştırıcı motor, hava pompası, rotametre ve sıcaklık ölçerden oluşmaktadır. Hava geçişinde kullanılan hava 0.2 μ gözenekliliğindeki filtrelerden süzülmemektedir. Çalışmalar steril koşullarda yapıldığından reaktörün tüm bağlantıları önceden yapılmış ve daha sonra da otoklavlanmıştır. Sterilizasyondan sonra besi ortamına, aşı ekleme, ürün analizi için numune alma işlemleri sterilliği bozmayacak şekilde yapılmıştır. Deney düzeneğindeki tüm bağlantılar otoklavlanabilmektedir. Ayrıca sızdırmazlığı tam sağlamak için tüm bağlantı yerleri conta ile kaplanmıştır. Şekil (6.1)



Şekil 6.1. Biyoreaktör Düzeneği

- 1.Reaktör, 2.Karıştırıcı motor, 3.Oksijen probu, 4.pH probu, 5.Sıcaklık sensörü, 6.Kondensör, 7.Oksijen metre, 8.Karıştırma hızı kontrol ünitesi, 9.Sıcaklık kontrol ünitesi. 10.pH metre

6.6. Laktik Asidin Belirlenmesi

Fermantasyon ortamından alınan numunelerde laktik asit miktarını belirlemek için HPLC (High Pressure Liquid Chromotography) cihazı kullanılmıştır. Kullanılan kolon (Bio-Rad Aminex HPX-87C) organik asitleri ve karbonhidratları belirlemeye uygundur. Taşıyıcı çözelti 0.004 M H_2SO_4 olup, kolondan geçiş hızı 0.6 ml/dk 'dır. Kullanılan dedektör IR, dalga boyu 210 nm 'dir.

Ortamdan alınan her bir numune pH ölçümü yapıldıktan sonra, mavi-bant süzgeç kağıdından geçirilmiştir. Süzülen numuneler 15 dk santrifüjlenmiştir. Üst kısımdaki berrak çözeltiden alınan belli hacimdeki numune, belirli oranlarda seyreltilerek, 0.25 μ gözenekli membran filtreden geçirilmiştir. Bu şekilde ön işlemlerden geçirilen numuneler, HPLC cihazına 20 μ l miktarda enjekte edilerek içindeki laktik asit miktarı, daha önceden hazırlanmış çalışma doğrusundan (Bkz. Ek.4) faydalanarak hesaplanmıştır.

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Rhizopus oryzae ' den fermentasyonla laktik asit üretimi hem 250 ml'lik erlenlerde hem de sıcaklığın, pH 'nın, karıştırma ve hava hızının direkt olarak ölçülebildiği ve kontrol edilebildiği 0.8 L çalışma hacmine sahip 1 L'lik biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmanın serbest halde ve poliüretan destek maddesine tutuklanarak kullanılmasının sistem üzerine etkileri ayrı ayrı incelenmiştir.

Erlenlerde serbest haldeki mikroorganizma ile yapılan çalışmalarda mikroorganizmanın beş farklı karbon kaynağında (glikoz, sakkaroz, melas, keçiyoynuzu ve buğday kepeği) laktik asit üretimi incelenmiştir. Karbon kaynağı etkisinin yanında, glikozlu besi ortamında başlangıç pH'sı, spor konsantrasyonu ve karıştırma hızı gibi bazı önemli parametrelerin de üretim üzerine etkileri denenmiştir. Ayrıca karbon kaynağının direkt olarak kullanılmasının veya bazı ön işlemlerden geçirilerek (kaynatma, ekstrakte etme, katkı maddeleri ilave etme v.b.) kullanılmasının fermentasyon üzerine etkisi de incelenmiştir.

Erlenlerde, mikroorganizmanın poliüretan destek maddesine tutuklanarak yapılan deneylerde, karbon kaynağı olarak glikoz ve melas kullanılmıştır. Glikoz kullanılarak hazırlanan besi ortamında serbest mikroorganizma ile yapılan deneylere benzer olarak, başlangıç pH' ı, karıştırma hızı ve spor konsantrasyonunun etkileri incelenmiştir. Erlenlerde, poliüretan matrikse tutuklanmış *Rhizopus oryzae* 'nin tekrar kullanılabilirliğini (repeated-batch) ölçmek amacıyla, glikoz içeren kullanılmış besi ortamı aynı şartlardaki taze besi ortamıyla 2, 3, 4 ve 5 günlük aralıklarla değiştirilmiştir. Bu şekilde, tutuklanmış mikroorganizma ile laktik asit fermentasyonunun sürekli sistemlerde kullanılıp kullanılamayacağı ölçülmeye çalışılmıştır.

Substrat olarak glikozun kullanıldığı besi ortamında *Rhizopus oryzae* ' nin gelişimi ve laktik asit üretimi ayrıca sürekli karıştırmalı biyoreaktörde incelenmiştir.

Bunlara ilaveten, substrat olarak buğday kepeğinin ve direkt olarak keçiyoynuzunun kullanıldığı çalışmalar, *Rhizopus oryzae* ' den katı-hal (solid-state) fermentasyonu (KHF) ile laktik asit üretimine örnek teşkil etmektedir.

7.1. Erlenlerde Serbest Haldeki Mikroorganizmalarla Yapılan Deneyler

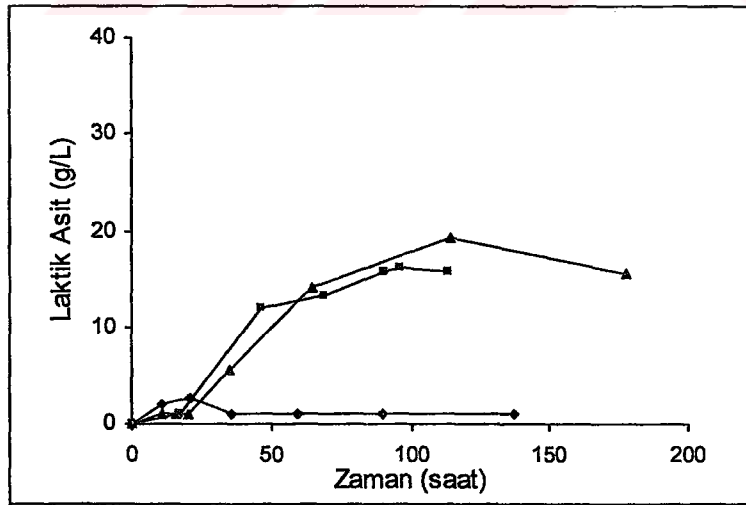
7.1.1. Substrat Olarak Glikozun Kullanıldığı Besi Ortamı

Fermantasyon ile elde edilecek ürünün miktarını etkileyecek en önemli parametrelerden biri de substrat seçimidir. Bunun etkisini inceleyebilmek için substrat olarak glikoz, sakkaroz, melas, keçiyoynuzu ve buğday kepeğinin seçildiği bir dizi deneyler yapılmıştır.

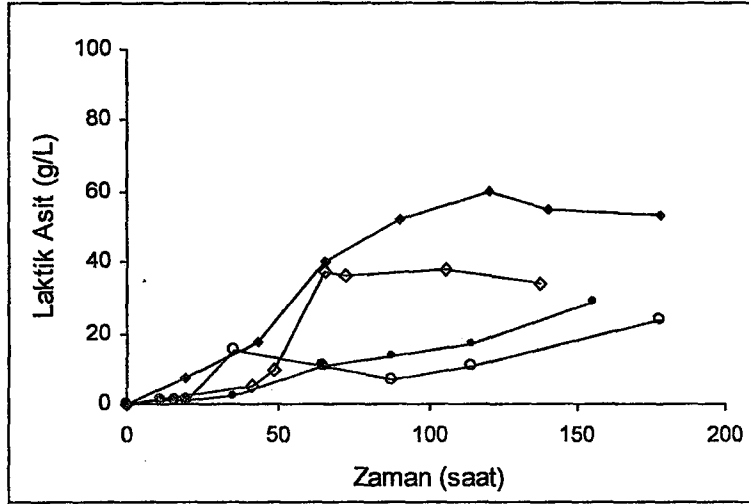
7.1.1.1. Glikoz Konsantrasyonunun Etkisi

Başlangıç glikoz konsantrasyonunun fermantasyon üzerine etkisini görebilmek için 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 g/L gibi 7 farklı konsantrasyon değeri denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 ve 7.5 ' de verilmektedir.

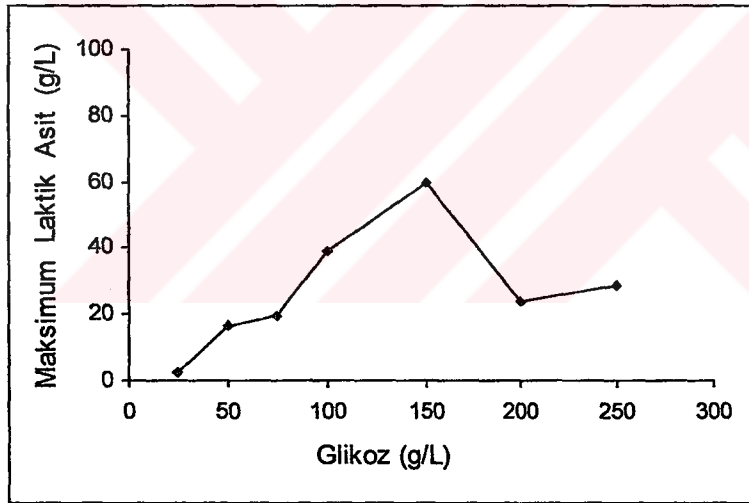
Şekil 7.1 ve 7.2' de görüldüğü gibi glikoz konsantrasyonu arttıkça fermantasyon ile oluşan laktik asit miktarı da artmaktadır. Ancak bu artış 150 g/L glikoz konsantrasyonuna kadar olup, bu konsantrasyondan daha yüksek glikoz



Şekil 7.1. Farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi.
(K.H(Karıştırma Hızı): 150 rpm, T(Sıcaklık): 30 °C, başlangıç pH'sı: 6, glikoz g/L:
◆:25, ■:50, ▲: 75)



Şekil 7.2. Farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, glikoz g/L : ◇:100, ◆:150, ○: 200, ● : 250)



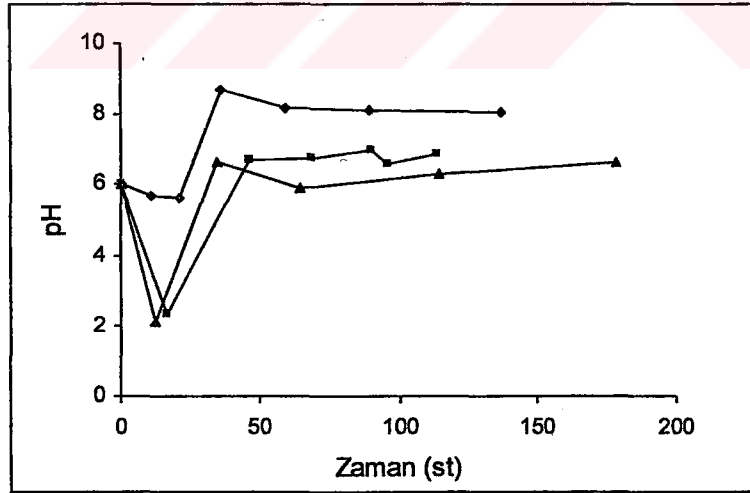
Şekil 7.3. Farklı glikoz konsantrasyonlarında elde edilen maksimum laktik asit miktarları.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6)

konsantrasyonlarında (200, 250 g/L) ürün miktarında azalma görülmüştür. Bu durum, yüksek glikoz konsantrasyonunun bastırıcı (represör) etki yaptığını göstermektedir. Glikozun represyon etkisi bir çok fermentasyon prosesinde gözlenmektedir (Gürsoy, 1991 ; Ünsaçar, 1998). Bu da, yüksek glikoz konsantrasyonlarında açığa çıkan

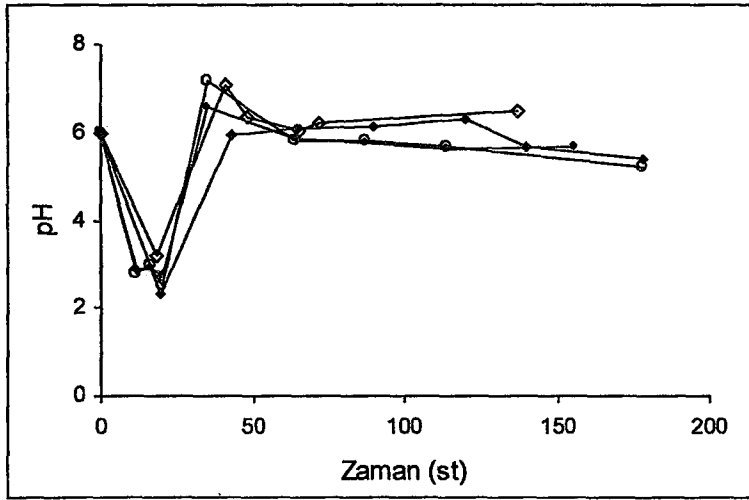
metabolik asitlerin artmasından kaynaklanmaktadır. Deneylerde en yüksek laktik asit miktarı, 150 g/L glikoz konsantrasyonunda gözlenmiştir.

Şekil 7.3 'de farklı başlangıç glikoz konsantrasyonları ile oluşan laktik arasındaki ilişki verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi glikoz konsantrasyonu arttıkça laktik asit miktarı artmış, 150 g/L glikoz konsantrasyonunda maksimuma ulaşmış ve daha yüksek glikoz konsantrasyonlarında da azalma görülmüştür.

Substrat olarak glikozun kullanıldığı fermantasyon ortamında zamanla pH'nın değişimi Şekil 7.4 ve 7.5 'de verilmektedir. Fermantasyon ortamında, tampon vazifesi görmesi amacıyla 50 g/L konsantrasyonunda CaCO_3 kullanılmıştır. Şekilde görüldüğü gibi 24 saat içinde ortamın pH' ısı düşmekte, asitlik artmaktadır. CaCO_3 ilavesiyle pH yükselmekte ve fermantasyon sonuna kadar hemen hemen aynı seviyede kalmaktadır. Glikoz konsantrasyonu arttıkça ortam pH'sındaki düşüş de artmaktadır. Bu durum, yüksek glikoz konsantrasyonlarında, mikroorganizmanın substratı hızlı bir şekilde kullanması ve ortamda metabolik asitlerin artmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 7.4. Farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı: 6, glikoz g/L: ◆:25, ■:50, ▲: 75)



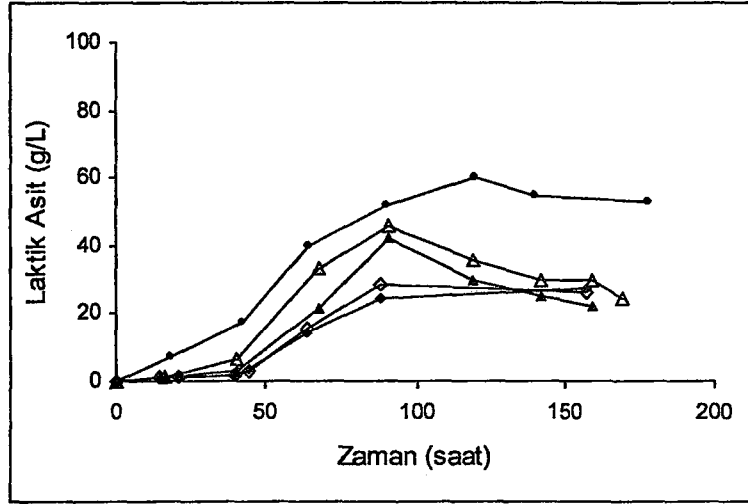
Şekil 7.5. Farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, glikoz g/L : ◇:100, ◆:150, ○: 200, ● : 250)

7.1.1.2. Başlangıç pH'sının Etkisi

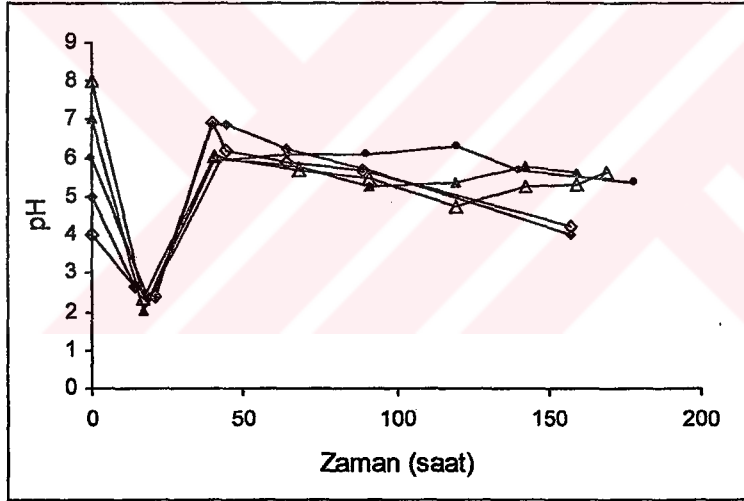
Bütün fermentasyon sistemlerinde olduğu gibi kullanılan mikroorganizma, besi ortamının başlangıç şartlarından (karbon kaynağının cinsi ve miktarı, ortam pH'sı, karıştırma hızı v.b.) ve çevre şartlarından etkilenecektir. Başlangıç pH'sı bir çok fermentasyon prosesinde hem mikroorganizma gelişimini hem de elde edilecek ürün miktarını değiştirecek bir parametredir. pH 'nın fermentasyon verimi üzerine etkisini görebilmek için yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 7.6 ve 7.7 'de sunulmuştur.

Şekil 7.6 'da görüldüğü gibi pH 4, 5, 6, 7 ve 8 gibi beş farklı başlangıç pH'sında yapılan deneylerde düşük pH değerlerinde (4 ve 5) elde edilen ürün miktarı az iken, pH 6 ve daha yüksek değerlerde ürün miktarı fazladır. En yüksek laktik asit miktarı pH'nın 6 değerinde gözlenmiştir. Buradan, laktik asit üretim mekanizmasının ortamın asidik olmasından olumsuz yönde etkilendiği, nötre yakın ortam şartlarının üretim için daha uygun olduğu söylenebilir.

5 farklı başlangıç pH'sında yapılan deneylerde zamanla ortamın pH'sının değişimi Şekil 7.7 'de verilmektedir. Bütün ortamlarda pH 24 saat içinde hızlı bir



Şekil 7.6. Farklı başlangıç pH değerlerinde laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH' sı : ◇:4, ◆:5, ●: 6, ▲:7, △: 8)



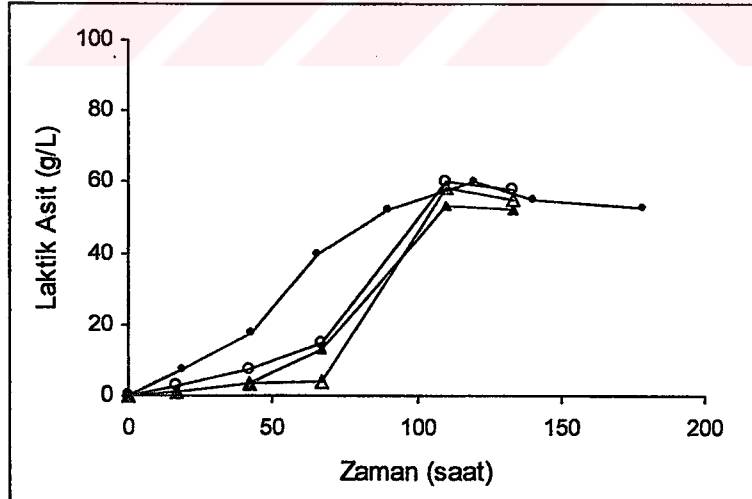
Şekil 7.7. Farklı başlangıç pH değerlerinde ortam pH'sının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı: ◇:4, ◆:5, ●: 6, ▲:7, △: 8)

şekilde düşmekte, ortamın asitliği fermantasyonu olumsuz yönde etkileyeceği için 24 saat sonra CaCO_3 ilavesiyle pH arttırılmaktadır. pH 6, 7 ve 8 başlangıç değerleri için bu sabitlik korunurken, pH 4 ve 5 için korunamamış, CaCO_3 ilavesinden sonra bile pH 'da düşüş gözlenmiştir.

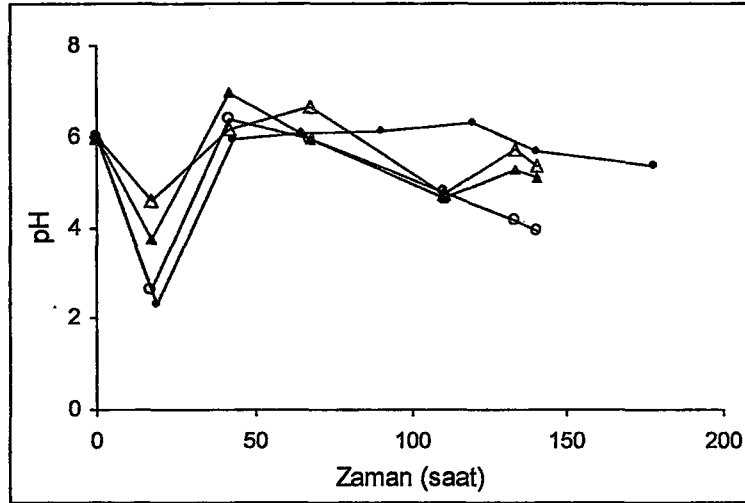
7.1.1.3. Başlangıç Spor Konsantrasyonunun Etkisi

Serbest mikroorganizmalarla yapılan fermentasyon çalışmalarında, şüphesiz ki başlangıç aşısı içerisindeki spor sayısı son derece önemlidir. Bu nedenle dört farklı spor konsantrasyonunun fermentasyon üzerine etkisi incelenmiştir. Başlangıç spor konsantrasyonu 1/1 (1×10^8 spor/ml), 1/10 (1×10^7 spor/ml), 1/100 (1×10^6 spor/ml) ve 1/1000 (1×10^5 spor/ml) oranında seyreltilmiş ve spor konsantrasyonları 'Toma' lamına (hemasitometre) konularak mikroskopta sayılmış ve spor konsantrasyonu spor/ml olarak hesaplanmıştır.

Başlangıç spor konsantrasyonunun laktik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 7.8 'de sunulmuştur. Şekilden de görüldüğü gibi, 1×10^8 ve 1×10^7 spor/ml konsantrasyonlarında laktik asit miktarı nispeten daha fazladır. Ancak 1×10^8 spor/ml konsantrasyonunda laktik asit üretimi diğer konsantrasyonlara göre daha hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. 1×10^5 spor/ml konsantrasyonunda, 70 saatlik bir süre sonunda bile laktik asit miktarı çok düşük olup, daha yüksek konsantrasyonlarda bu miktar, spor sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



Şekil 7.8. Farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı: 6, spor konsantrasyonu (spor/ml) : ●: 1×10^8 , ○: 1×10^7 , ▲: 1×10^6 , △: 1×10^5)



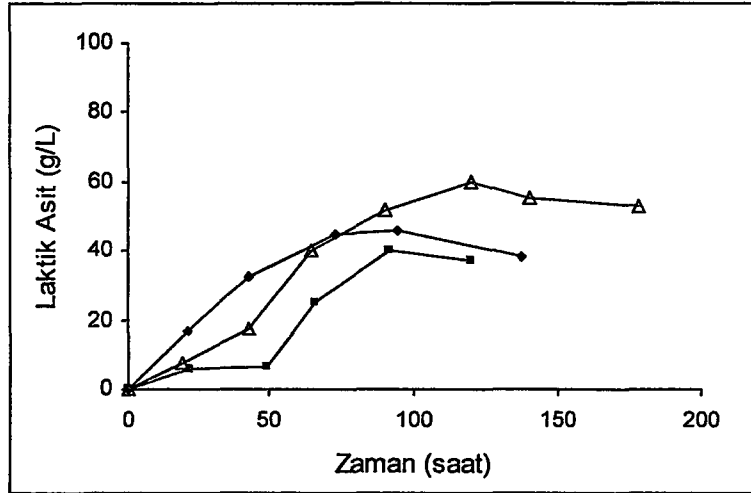
Şekil 7.9. Farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'si: 6, spor konsantrasyonu (spor/ml): ●: 1×10^8 , ○: 1×10^7 , ▲: 1×10^6 , △: 1×10^5)

Şekil 7.9' da başlangıç spor konsantrasyonunun ortam pH' sına etkisi gözlenmektedir. Seyreltme yapılmayan 1×10^8 spor/ml konsantrasyonunda ortam pH'sındaki düşüş çok iken, 1×10^5 spor/ml gibi düşük spor konsantrasyonunda bu düşüş daha azdır. Bu da ortamda spor konsantrasyonu arttıkça mikroorganizmanın metabolik faaliyetlerini daha hızlı yaptığını ve karbon kaynağını daha hızlı tükettiğini açıklamaktadır.

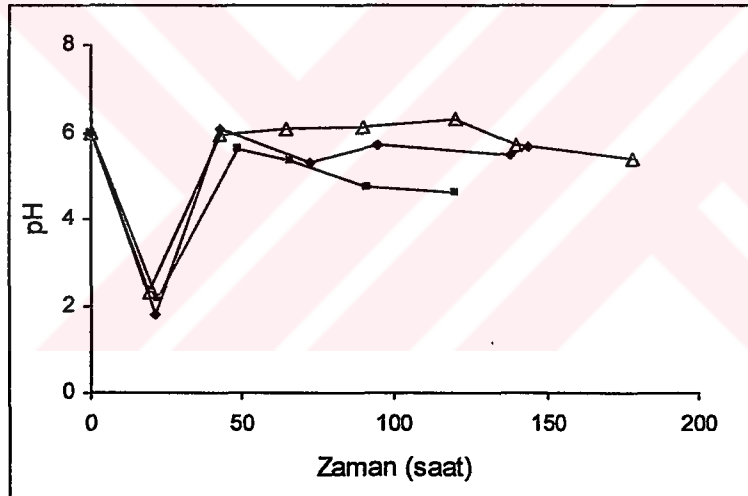
7.1.1.4. Karıştırma Hızının Etkisi

Fermantasyonda mikroorganizmanın metabolik davranışını etkileyecek önemli parametrelerden biri de karıştırma hızıdır. Karıştırma hızının laktik asit üretimi üzerine etkisi Şekil 7.10 'da verilmektedir. 75, 150 ve 250 rpm gibi üç farklı hızda yapılan deneylerde, düşük karıştırma hızında laktik asit üretimi az ve yavaştır. En iyi üretim 150 rpm hızında elde edilmiştir. Düşük karıştırma hızında ürün miktarının az oluşu, aerobik ortamın yeterli oranda olmadığını göstermektedir. Mikroorganizmanın faaliyetlerini sürdürmesi için gerekli olan oksijenin sağlanamadığı söylenebilir. Çok yüksek karıştırma hızı ise, mikroorganizmanın morfolojik yapısını olumsuz





Şekil 7.10. Farklı karıştırma hızlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi.
(Glikoz: 150 g/L, T: 30 °C, başlangıç pH'sı: 6, karıştırma hızı (rpm): ■:75, △: 150, ◆:250)



Şekil 7.11. Farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.
(Glikoz: 150 g/L, T: 30 °C, başlangıç pH'sı: 6, karıştırma hızı (rpm): ■:75, △: 150, ◆:250)

yönde etkilemektedir. Bu durum için mikroorganizmanın yüksek karıştırma hızında gelişimini tam olarak tamamlayamadığı söylenebilir. 150 rpm karıştırma hızında ise, laktik asit üretimi için optimum şartlar sağlanmaktadır.

Karıştırma hızının ortam pH'sına etkisi Şekil 7.11 'de görülmektedir. 24 saat içerisinde her üç karıştırma hızında da ortam pH'ında büyük düşüş gözlenirken,

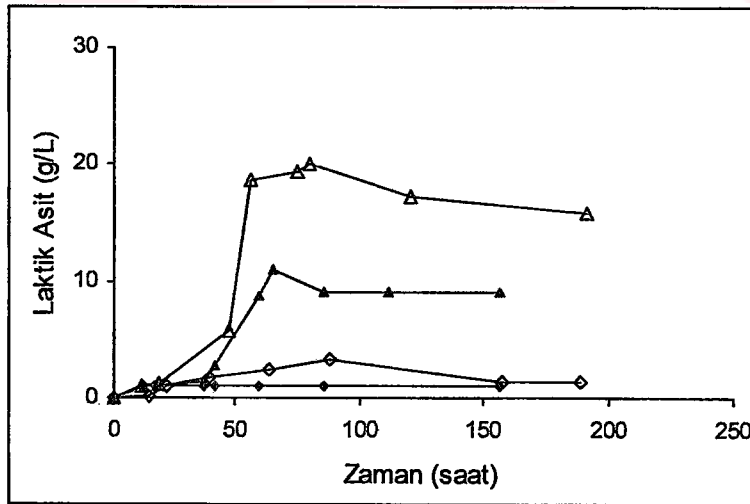


CaCO_3 eklenerek yükselen pH, 150 ve 250 rpm hızı için sabit tutulabilmiş , ancak 75 rpm hızı için pH sabit tutulamamış yine düşüş gözlenmiştir.

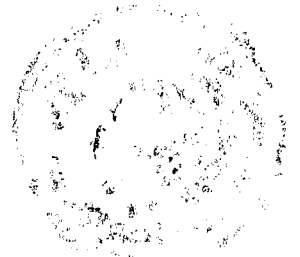
7.1.2. Substrat Olarak Sakkarozun Kullanıldığı Besi Ortamı

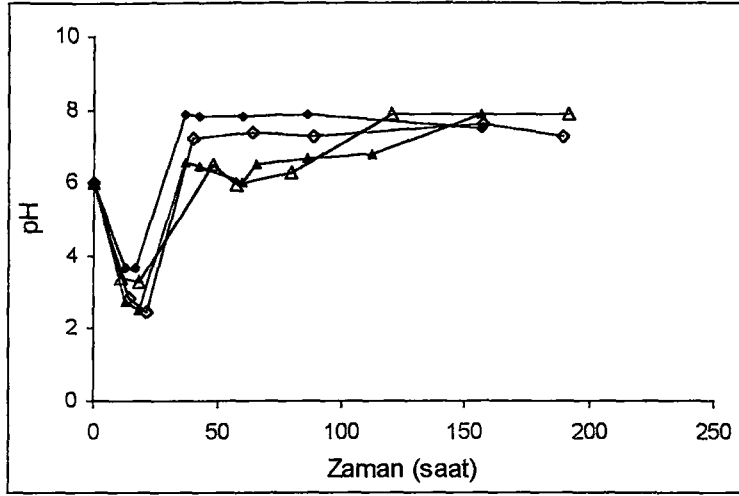
Karbon kaynağı olarak sakkarozun, laktik asit üretimi üzerine etkisini ölçebilmek için 5, 30, 50 ve 100 g/L 'lik sakkaroz konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

Şekil 7.12' de sakkarozun kullanıldığı fermantasyon ortamında zamanla, oluşan laktik asit miktarı arasındaki ilişki verilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi sakkaroz konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit miktarı da artmaktadır. Ancak çok yüksek sakkaroz konsantrasyonunda, sakkarozun inhibisyon etkisi görülmekte ve ortamdaki asit miktarının düşük olduğu gözlenmektedir. Bu durum, yüksek sakkaroz konsantrasyonunun ortam viskozitesini arttırmasına, dolayısıyla kütle transfer olaylarının sınırlanmasına bağlanabilir. En yüksek laktik asit miktarı, 50 g/L sakkaroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bütün konsantrasyonlarda 40-50 saatlik bir sürede ürün oluşumu çok az olup, zamanla ürün miktarı artmakta ve daha sonra sabit bir değerde kalmaktadır. 40-50 saatlik gecikme süresi, mikroorganizmanın fermantasyon ortamına adapte olması için geçen süre olarak açıklanabilir.



Şekil 7.12. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, sakkaroz g/L : ◆: 5, ▲: 30, △: 50, ◇: 100,)





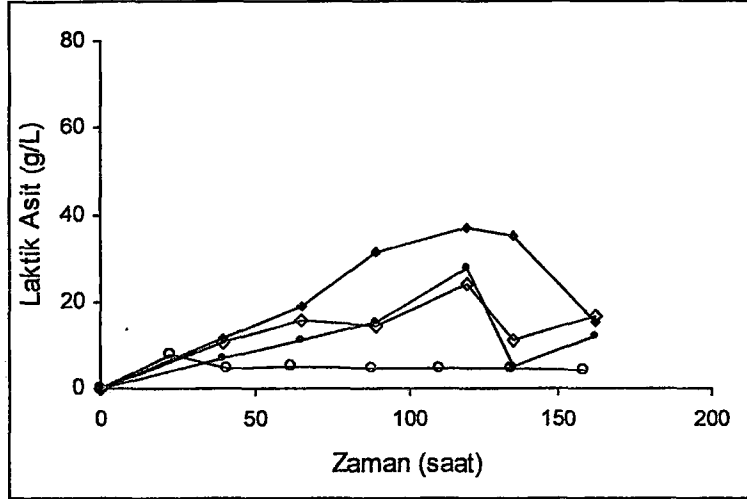
Şekil 7.13. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, sakkaroz g/L : ◆:5, ▲:30, △:50, ◇:100,)

Şekil 7.13'de , sakkarozun kullanıldığı fermantasyon ortamında, zamanla ortamın pH'sındaki değişim verilmektedir. Diğer deneylerde de olduğu gibi, başlangıç pH 'sı 6 olan ortam, fermantasyonun ilerlemesi ile düşmekte, CaCO_3 ilavesiyle pH yükselmekte ve deney sonuna kadar yaklaşık olarak sabit değerlerde kalmaktadır.

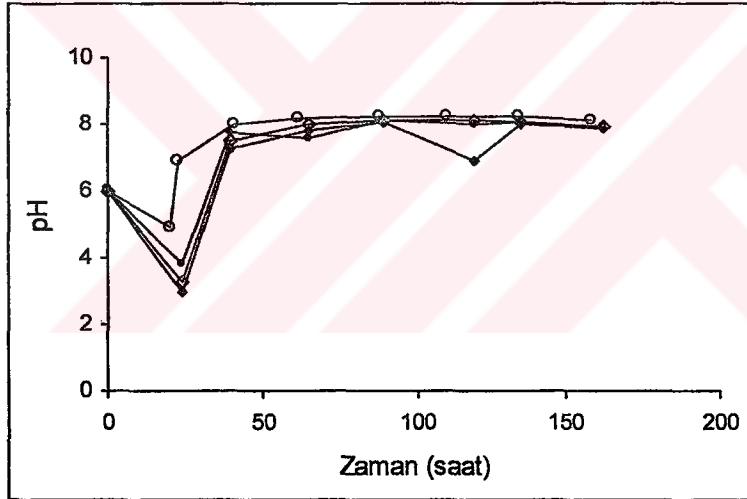
7.1.3. Subsarat Olarak Melasın Kullanıldığı Besi Ortamı

Melas, kolay elde edilebilir, ucuz ve karbon kaynağı bakımından zengin olduğundan dolayı, besiyeri için uygun bir hammaddedir. Fermantasyon ortamında melas, direkt olarak, bazı ön işlemlerden geçirilerek (kaynatarak pastörize etme) ve katkı maddesi (yeast ekstrakt) ilave edilerek kullanılmıştır.

Direkt olarak melasın kullanıldığı, 75, 150, 300 ve 400 g/L konsantrasyonlarında hazırlanan fermantasyon ortamında zamanla, oluşan laktik asit miktarı arasındaki ilişki Şekil 7.14 'de görülmektedir. Melas konsantrasyonu arttıkça, oluşan asit miktarının da arttığı gözlenmiştir. Ancak ürün oluşma hızı düşüktür. Bu da mikroorganizmanın, melas bünyesindeki sakkarozu tüketmede geciktiğini göstermektedir.



Şekil 7.14. Farklı melas konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, melas g/L : ○: 75, ● :150, ◇:300, ◆:400)



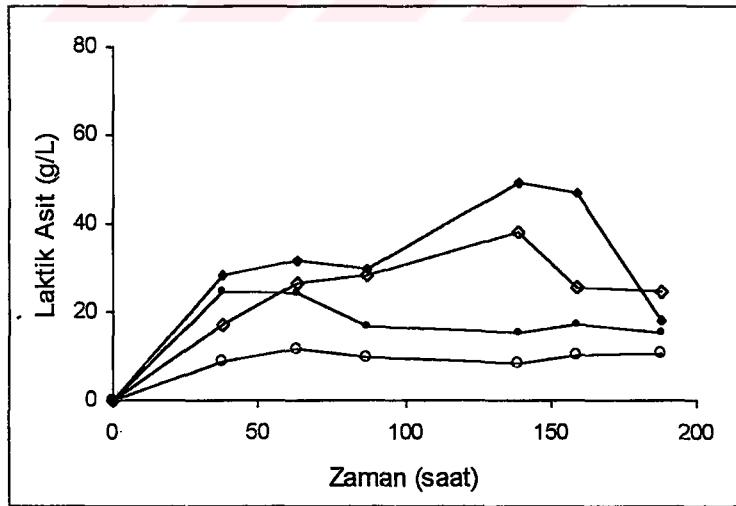
Şekil 7.15. Farklı melas konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, melas g/L : ○: 75, ● :150, ◇:300, ◆:400)

Şekil 7.15' de, 75, 150, 300 ve 400 g/L konsantrasyonlarındaki besi ortamlarında, zamanla ortam pH'sının değişimi verilmektedir. 24 saat sonra pH düşmekte ve CaCO_3 ilavesiyle yükseltilip, mikroorganizma için daha uygun olan hafif bazik bir ortam sağlanmaktadır.

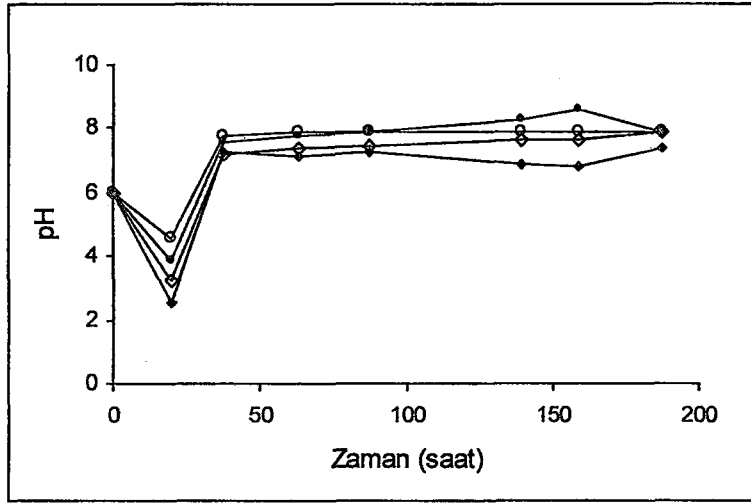


Literatürde melasın kaynatılarak kullanıldığına dair bazı çalışmalar mevcuttur.(Göksungur, 1998). Bu yüzden bu çalışmada da melas kaynatıldıktan sonra fermentasyon ortamına eklenmiştir. Kaynatılmış melasın substrat olarak bulunduğu fermentasyon ortamında (75, 150, 300 ve 400 g/L) melas konsantrasyonu arttıkça oluşan ürün miktarı da artmıştır. Şekil 7.16'da da, laktik asit oluşum hızının yüksek olduğu görülmektedir. Bu da melasın kaynatılarak pastörize edilmesiyle, mikroorganizmanın melas içerisindeki mevcut sakkarozu daha kolay tüketebildiğini ve daha çabuk ürün oluşturduğunu göstermektedir. Mikroorganizma daha kararlı bir davranış sergilemektedir. Ürün miktarında ani değişimler olmamaktadır.

Şekil 7.17'de kaynatılmış melasın kullanıldığı ortamın, zamanla pH değişimi verilmektedir. Yüksek melas konsantrasyonlarındaki pH düşüşü daha fazla olup, bu durum mikroorganizmanın melas bünyesindeki sakkarozu kolay tüketip, faaliyetlerini daha hızlı yaptığını açıklamaktadır. CaCO_3 eklenmesiyle ortam pH'sı artırılmakta ve mikroorganizmanın laktik asit üretimi için daha verimli olduğu hafif bazik bir ortam sağlanmıştır. Mikroorganizma kararlı davranmış ve ortam pH'sında ani değişimler olmamıştır. Ürün oluşumundaki kararlılık, ortam pH'sında da gözlenmiştir.



Şekil 7.16. Kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, melas g/L : ○: 75, ● :150, ◇300, ◆:400)



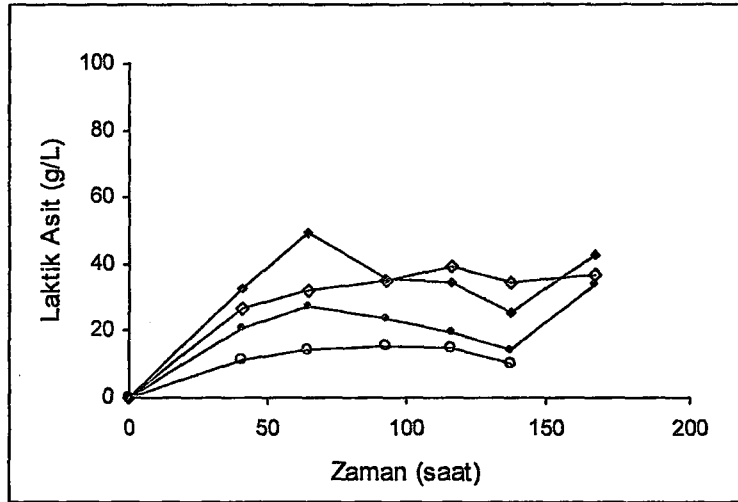
Şekil 7.17. Kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, melas g/L : ○: 75, ● : 150, ◇300, ◆:400)

Kaynatılmış melasa azot kaynağı olarak yeast ekstrakt eklenerek oluşturulan fermentasyon ortamında, zamanla oluşan laktik asit miktarı arasındaki ilişki Şekil 7.18'de görülmektedir. Yüksek melas konsantrasyonlarında, oluşan ürün miktarının da yüksek olduğu, mikroorganizmanın karbon kaynağını daha kolay ve hızlı tüketerek ürün üretiminin hızlı olduğu görülmektedir. Besi ortamında kullanılan yeast ekstraktın, fermentasyon verimini olumlu yönde etkilediği söylenebilir.

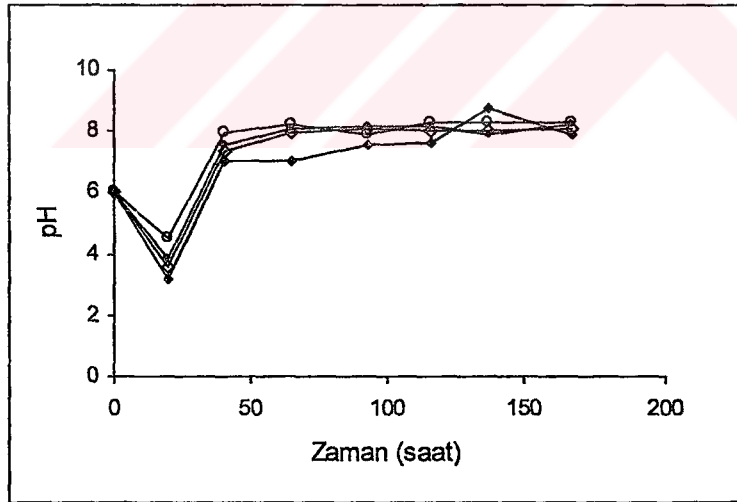
Şekil 7.19'da kaynatılmış melas ve yeast ekstrakt içeren besi ortamında pH'nın değişimi verilmiştir. Ortam pH'sı 24 saat içerisinde hızlı bir şekilde düşmüş, CaCO_3 ile yükseltile pH değerleri daha önceki deneylerdeki duruma benzer bir eğilim göstermiştir.

Şekil 7.20'de karbon kaynağı olarak direkt melasın, kaynatılmış melasın ve yeast ekstrakt ilave edilen kaynatılmış melasın kullanıldığı fermentasyon ortamı, 300 g/L konsantrasyonu için kıyaslanmıştır. Şekilde de görüldüğü gibi melası kaynatarak pastörize etme işlemi daha iyi sonuçlar vermiş ve buna yeast ekstrakt katkısı ürün oluşumunu ve hızını arttırmıştır. Yeast ekstrakt ve kaynatılmış melas içeren besi ortamının karbon kaynağı seçiminde uygun olduğu söylenebilir.





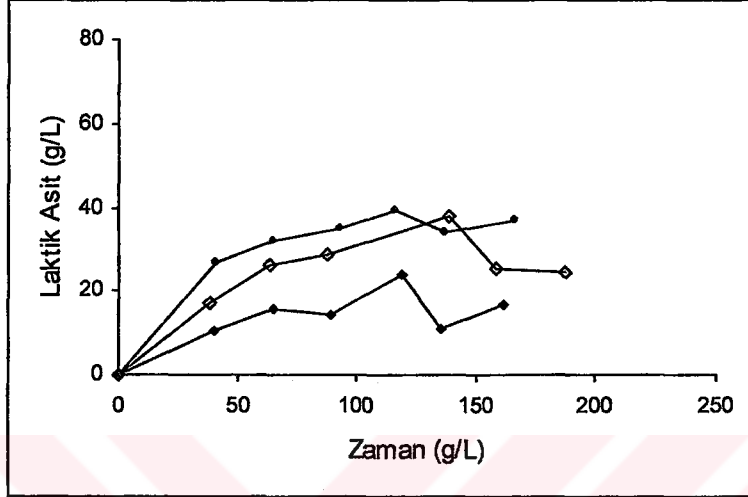
Şekil 7.18. Yeast ekstrakt içeren kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H : 150 rpm, T : 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, Yeast ekstrakt g/L: 10, melas g/L: ○: 75, ●: 150, ◇: 300, ◆: 400)



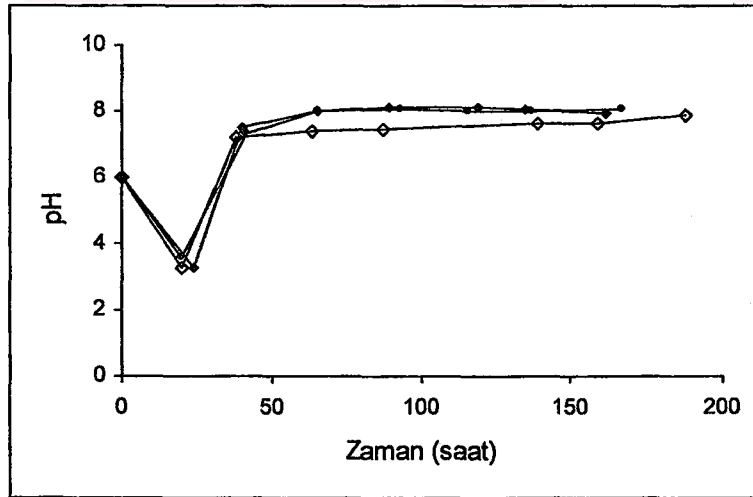
Şekil 7.19. Yeast ekstrakt içeren kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (K.H : 150 rpm, T : 30 °C, başlangıç pH'sı : 6, Yeast ekstrakt g/L: 10, melas g/L ○: 75, ●: 150, ◇: 300, ◆: 400)



Şekil 7.21’de, 300 g/L konsantrasyonunda her üç farklı karbon kaynağı (melas, kaynatılmış melas ve kaynatılmış melas + yeast ekstrakt) için ortam pH’sının değişimi verilmiş ve pH değişiminin aynı eğilimi gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 7.20. Melasın farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H : 150 rpm, T : 30 °C, başlangıç pH’sı : 6, 300 g/L melas : ◆:melas, ◇: kaynatılmış melas, ●:Kaynatılmış melas + 10 g/L yeast ekstrakt)



Şekil 7.21. Melasın farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında pH’nın zamanla değişimi. (K.H : 150 rpm, T : 30 °C, başlangıç pH’sı : 6, 300 g/L melas : ◆:melas, ◇: kaynatılmış melas, ●:Kaynatılmış melas + yeast ekstrakt)

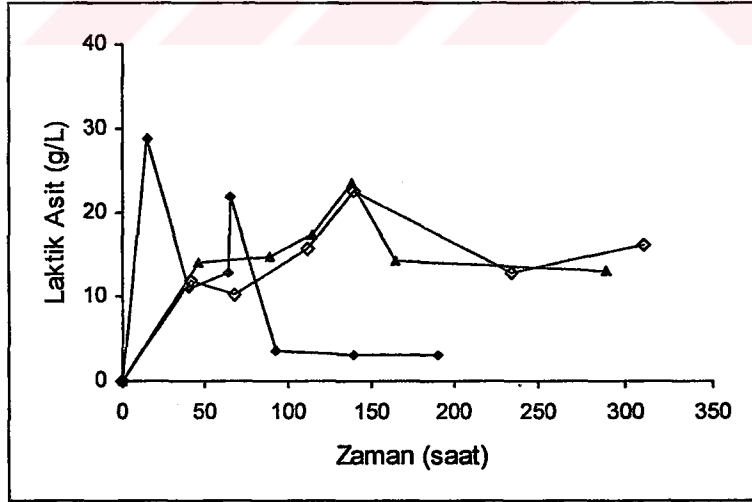


7.1.4. Substrat Olarak Keçiyoynuzunun Kullanıldığı Besi Ortamı

Özellikle Akdeniz ikliminde yaygın olarak bulunan ve karbon kaynağı bakımından zengin olan keçiyoynuzu, fermentasyon ortamındaki besi yeri için ucuz bir hammaddedir. Keçiyoynuzu bünyesindeki karbonhidratların, mikroorganizma tarafından kolay tüketilebilmesi için keçiyoynuzu, substrat olarak farklı stratejilerde besi ortamına ilave edilmiştir.

Keçiyoynuzu önce ticari tip bir blenderda parçalanmış ve daha sonra herhangi bir boyut taraması yapılmaksızın farklı miktarlarda karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmada, % 10, 20 ve 40 (w/w) oranlarında keçiyoynuzu ve sadece su bulunduran erlenlere ekim yapılmış ve fermentasyon başlatılmıştır.

Keçiyoynuzunun direkt olarak kullanıldığı % 10, 20 ve 40 (w/w) konsantrasyonlarındaki ortamlarda, zamanla oluşan laktik asit miktarı arasındaki ilişki Şekil 7.22'de verilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda mikroorganizma kararlı bir davranış göstermeyip, ürün miktarında çok ani yükselmeler ve düşüşler gözlenmiştir. % 20 ve 40 konsantrasyonlarında, ortam şartları katı-hal fermentasyon özelliği

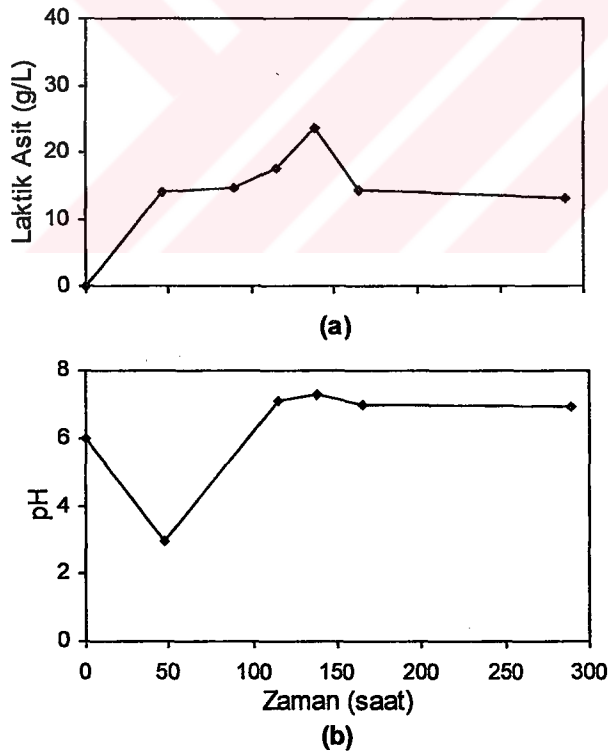


Şekil 7.22. Farklı keçiyoynuzu konsantrasyonlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH: 6, Keçiyoynuzu % ağırlıkça: ▲: % 10, ◇: % 20, ◆: % 40)



göstermektedir. Besi ortamında, mevcut serbest su miktarının çok az olduğu bunun da mikroorganizmanın faaliyetlerini sürdürmesi için yeterli gelmediği görülmektedir. % 10 konsantrasyonunda olduğu gibi, su miktarı arttıkça mikroorganizma daha kararlı bir üretim yapmaktadır. Direkt olarak keçiboynuzu ile oluşturulan besi ortamlarında, mikroorganizmanın karbon kaynağını kolay kullanamadığı söylenebilir. Böyle bir ortamda, serbest su miktarı yeterli olmadığı için ortam pH' sı da kontrol edilememiştir.

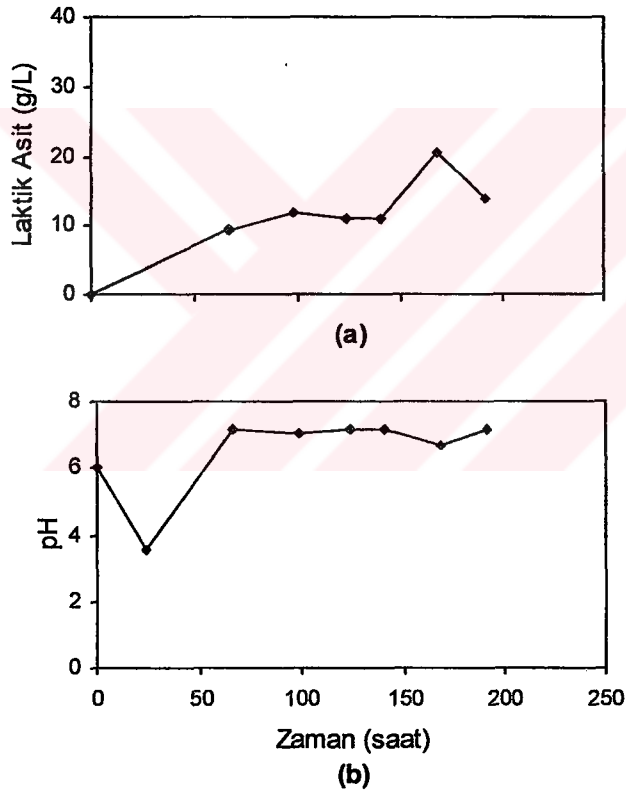
Keçiboynuzunun direkt olarak mikroorganizma tarafından kullanımının zor olduğunun anlaşılmasından dolayı, katkı maddeleri ilavesiyle bu kullanımı kolaylaştırmak yoluna gidilmiştir. Bunun için sadece glikozun, sadece tuz çözeltisinin ve hem glikozun hem de tuz çözeltisinin birlikte kullanıldığı besi ortamlarında çalışılmıştır. Şekil 7.23a, 7.24a, 7.25a ve 7.26a 'da 4 farklı durum için, laktik asit miktarlarının zamanla değişimi verilmiştir. Şekil 7.24a'da keçiboynuzu ile birlikte glikoz katkısının represyon etkisi yaptığı, Şekil 7.25a'da keçiboynuzu ile tuz çözeltisi



Şekil 7.23. Ağırlıkça % 10 keçiboynuzu içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6)

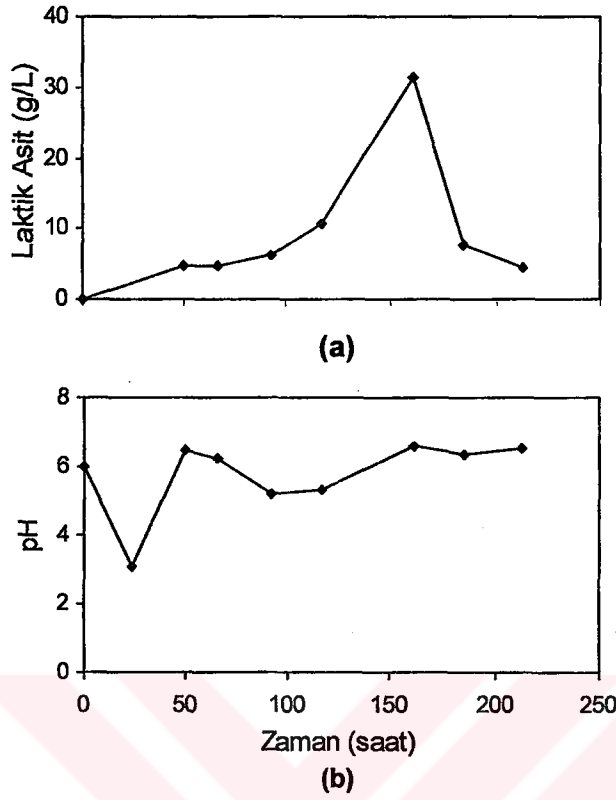
katkısının ürün miktarı bakımından daha iyi olduğunu ancak üretim hızının düşük olduğu, Şekil 7.26a'da ise keçiyoynuzuna glikoz ve tuz çözeltisinin katkısının maksimum laktik asit miktarını çok fazla değiştirmedığı ancak üretim hızında bir artışın olduğu görülmektedir.

Şekil 7.23a, 7.24b, 7.25b ve 7.26b 'de ise ortam pH'sının değişimi, fermentasyon olaylarındaki tipik pH değişimine benzerdir. Ortamların her biri aynı eğilimi göstermektedir.



Şekil 7.24. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ve 50 g/L glikoz katkısı içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6)

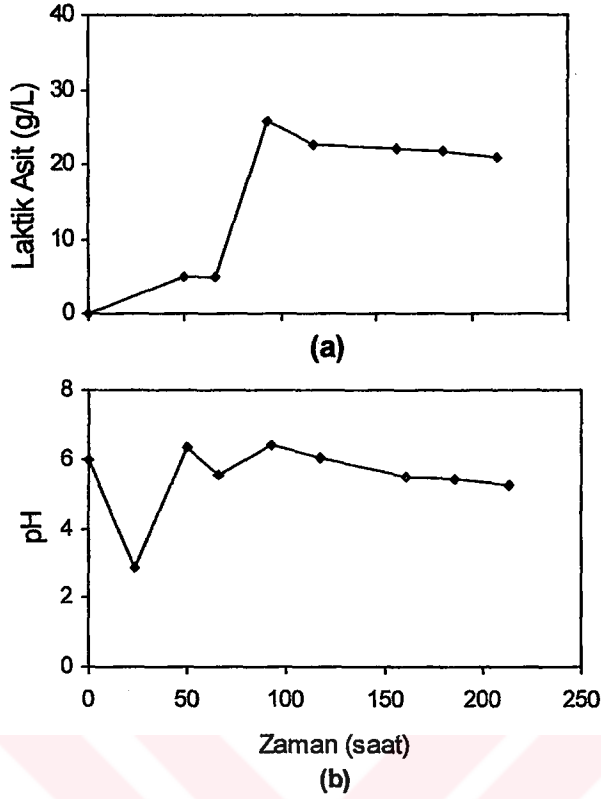




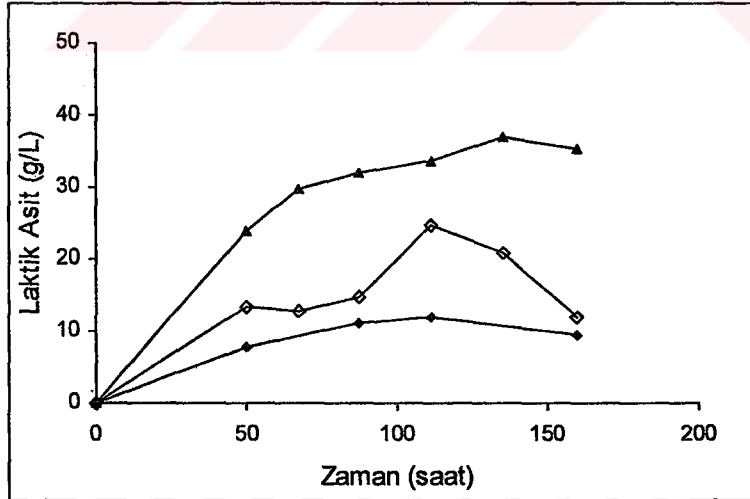
Şekil 7.25. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ve tuz çözeltisi içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH: 6)

Yukarıda yapılan bu deneyler, toplam şeker içeriği % 40-50 oranında olan keçiyoynuzunun mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla metabolize edilemediğini göstermektedir. Bundan dolayı, substrat olarak keçiyoynuzunun ekstrakte edilerek kullanılmasının, mikroorganizma tarafından daha kolay tüketilebileceği düşüncesiyle bir dizi çalışmalar yapılmıştır. Keçiyoynuzunun ekstrakte edilip süzülmesiyle, bu süzüntüye tuz çözeltisinin katkısıyla ve ekstraksiyondan sonra süzülmeyp lapa halinde kullanılmasıyla, laktik asit miktarındaki değişim Şekil 7.27'de verilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, ürün miktarı ve üretim hızı açısından en iyi sonuçlar ekstrakte edilerek süzülen ortamda elde edilmiştir.

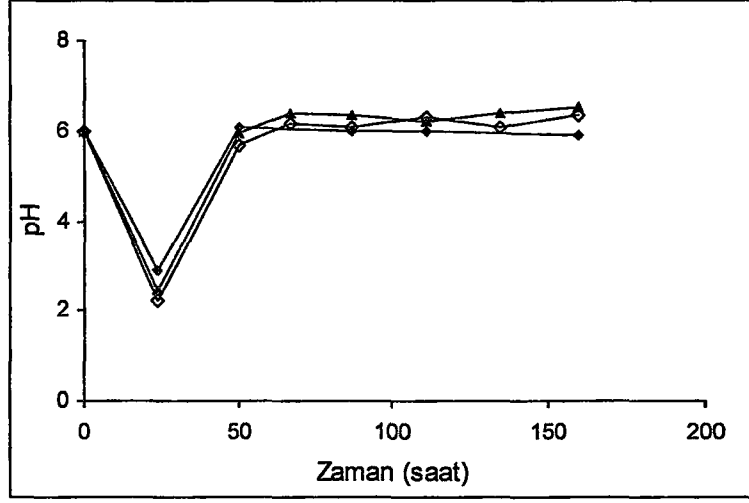
Şekil 7.28'de her üç besi ortamı için, zamanla ortam pH'sındaki değişim görülmektedir. pH'daki değişim diğer ortamlarla benzer bir eğilim göstermektedir.



Şekil 7.26. Ağırlıkça % 10 keçiboynuzu ile 50 g/L glikoz ve tuz çözeltisi (materyal ve metotlar bölümünde verilen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren karışım) içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6)



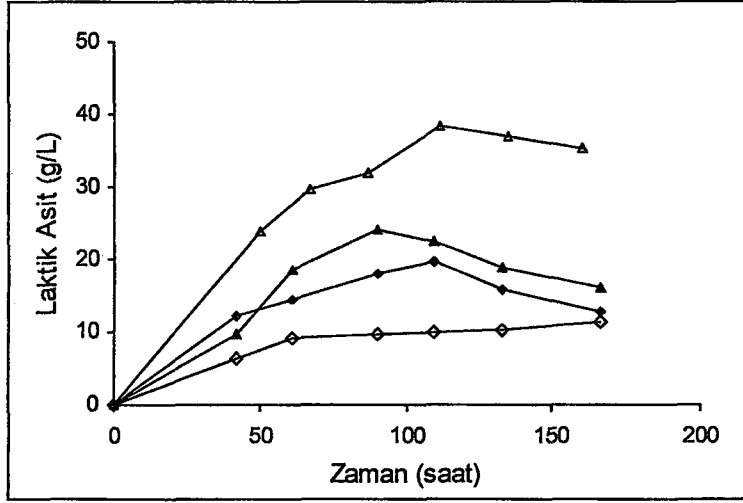
Şekil 7.27. Keçiboynuzu ekstraktlarının farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, ▲: Ekstrakte edilip süzölmüş keçiboynuzu, ◇: Ekstrakte edilip süzölmüş keçiboynuzuna tuz çözeltisi katkısı, ●: Ekstrakte edilmiş lapa halindeki keçiboynuzu)



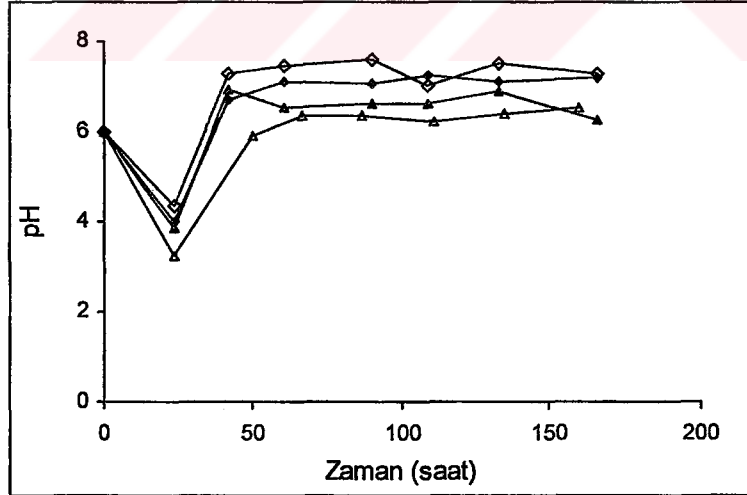
Şekil 7.28. Keçiboynuzu ekstraktlarının farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, ▲: Ekstrakte edilip süzölmüş keçiboynuzu, ◇: Ekstrakte edilip süzölmüş keçiboynuzuna tuz çözeltisi katkısı, ◆: Ekstrakte edilmiş lapa halindeki keçiboynuzu)

Keçiboynuzunun ekstrakte edilip süzölmesiyle oluşturulan besi ortamının, laktik asit üretiminde iyi sonuçlar vermesiyle, başka bir çalışmada bu ekstraktların belirli oranlarda seyreltilerek kullanılmasının etkisi incelenmiştir. Bu deneyler, viskoz olan ekstraktın seyreltik çözeltilerinin kullanılmasıyla mikroorganizma gelişimi, dolayısıyla laktik asit üretiminin etkilenip etkilenmediğini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bunun için de ekstraktlar % 25, % 50 ve % 75 oranında seyreltilmiştir. Şekil 7.29'da görüldüğü gibi seyreltme oranı arttıkça oluşan laktik asit miktarı azalmıştır. Seyreltme oranı arttıkça besi ortamındaki karbon kaynağının konsantrasyonu düştüğünden, laktik asit üretimi için gerekli olan substrat miktarı da azalmaktadır. Bu nedenle elde edilen ekstraktların seyreltilmeden kullanılmasının daha uygun olduğu görülmektedir.

Şekil 7.30'da keçiboynuzu ekstraktlarının seyreltilmesiyle oluşturulan fermentasyon ortamında pH değişimi verilmektedir. pH değişimi diğer ortamlarda da olduğu gibi ilk 24 saatte düşmekte, daha sonra artmaktadır. Belli bir süre sonra ise fermentasyon sonuna kadar pek fazla değişim göstermemektedir.



Şekil 7.29. Keçiboyunu ekstraktlarının seyreltilerek kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH: 6, seyreltme oranları % : Δ: 0: , ▲: 25, ◆: 50, ◇: 75)

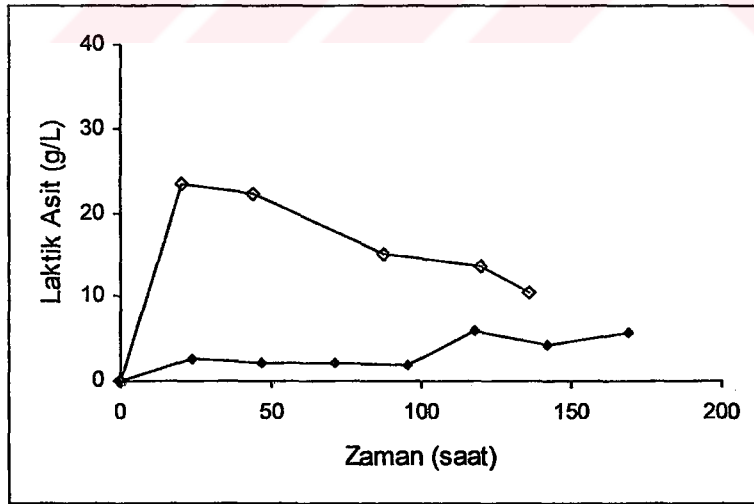


Şekil 7.30. Keçiboyunu ekstraktlarının seyreltilerek kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH: 6, seyreltme oranları %: Δ: 0: , ▲: 25, ◆: 50, ◇: 75)

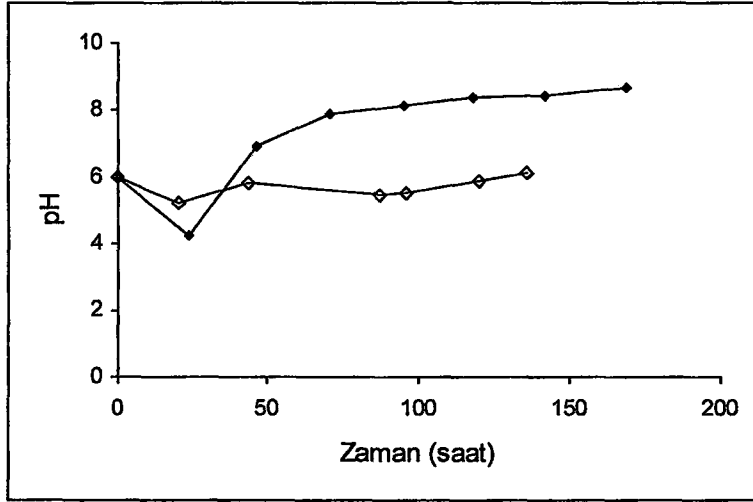
7.1.5. Subsrat Olarak Buğday Kepeğinin Kullanıldığı Besi Ortamı

Çalışmaların bir diğer aşamasında, ticari önem taşımayan fakat besin değeri yüksek olan buğday kepeği karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Bunun için çalışma grubumuzca daha önceden belirlenen optimum kepek boyutu olan 0.3 mm'lik buğday kepeği kullanılmıştır. Deneylerde ortama buğday kepeğinin ve mikroorganizmanın faaliyetlerini hızlandırmak ve ürün miktarını arttırmak düşüncesiyle, buğday kepeği içeren besi ortamına glikoz ilavesinin etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 7.31 'de verilmiştir. Sadece buğday kepeğinin kullanıldığı ortamlarda elde edilen laktik asit miktarı çok düşük değerlerde kalmaktadır. Glikoz katkısıyla ise laktik asit miktarı yaklaşık 5 kat artmaktadır. Mikroorganizma buğday kepeğindeki mevcut karbondhidratı kolaylıkla metabolize edememekte, glikoz katkısıyla ise mikroorganizma için gerekli olan besin bir miktar da olsa karşılanmaktadır.

Şekil 7.32'de görüldüğü gibi her iki besi ortamında da pH düşüşü çok fazla olmamaktadır. Bu durum, mikroorganizmanın metabolik faaliyetlerini yeterli bir biçimde gerçekleştiremediğini göstermektedir.



Şekil 7.31. Buğday kepeğinin kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, buğday kepeği 50 g/L :
◆: buğday kepeği, ◇ : buğday kepeği ve 50 g/L glikoz)



Şekil 7.32. Buğday kepeğinin kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi.
(K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, buğday kepeği 50 g/L :
◆: buğday kepeği , ◇: buğday kepeği ve 50 g/L glikoz)

7.2. Erlenlerde Tutuklanmış Haldeki Mikroorganizmalarla Yapılan Deneyler

Erlenlerde tutuklanmış mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda, karbon kaynağının etkisini inceleyebilmek için, glikoz ve melas içeren besi ortamlarında çalışılmıştır.

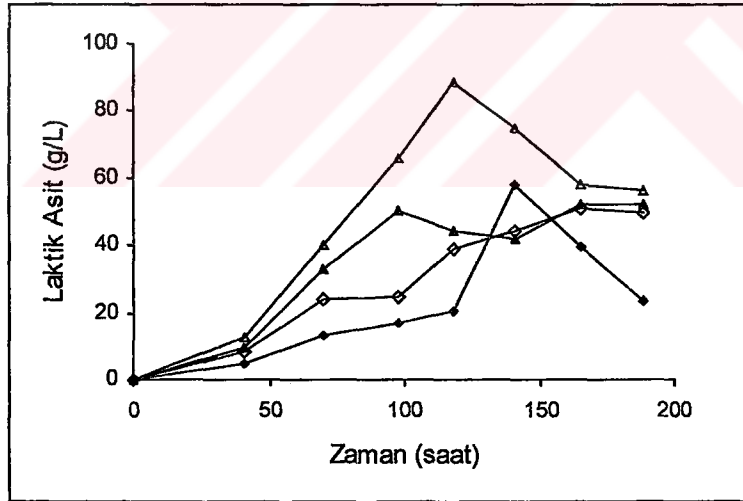
7.2.1. Glikoz İçeren Besi Ortamında Yapılan Deneyler

7.2.1.1. Glikoz Konsantrasyonunun Etkisi

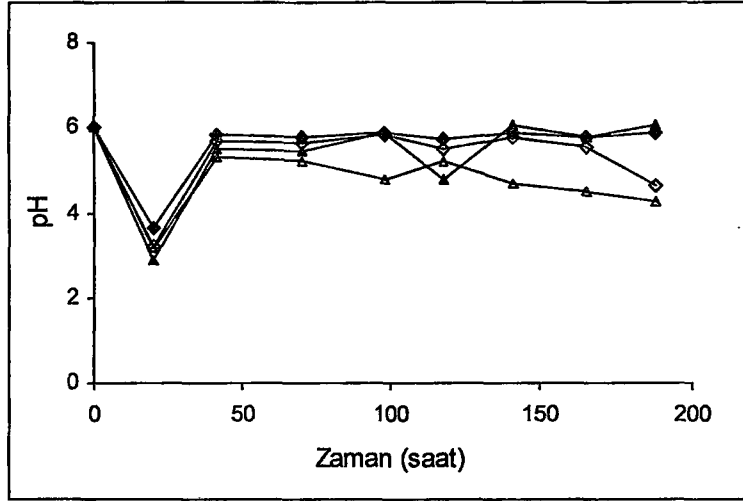
Daha önce serbest haldeki mikroorganizmalarla yapılan deneylerde yüksek glikoz konsantrasyonunun laktik asit üretimi üzerine represyon etkisi yaptığı bulunmuştu. Mikroorganizmalar immobilize haldeyken farklı karakterler gösterebileceklerinden, benzer deneyler fiziksel adsorbsiyonla poliüretan destek maddesine tutuklanmış *Rhizopus oryzae* için de yapılmıştır. Bunun için 100, 150, 200 ve 250 g/L gibi dört farklı, başlangıç glikoz konsantrasyonunda çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.33 ve 7.34' de verilmiştir.

Şekil 7.33’de glikoz konsantrasyonunun laktik asit üretimine etkisi görülmektedir. Serbest mikroorganizma ile yapılan deneylerde olduğu gibi, en yüksek laktik asit üretimi 150 g/L glikoz konsantrasyonunda olmuştur. Artan glikoz konsantrasyonu ile elde edilen laktik asit miktarı azalmıştır. Bu sonuç yüksek glikoz konsantrasyonunun laktik asit üretiminde represyon etkisinde bulunduğu yorumunu desteklemektedir. 150 g/L glikoz konsantrasyonu için elde edilen ürün miktarı ve üretim hızının, yapılan diğer çalışmalara göre çok iyi sonuç verdiği görülmektedir. *Rhizopus oryzae* ‘nin immobilize halde kullanımının laktik asit üretimi için uygun olduğu söylenebilir.

Şekil 7.34’de *Rhizopus oryzae* ‘nin immobilize halde kullanıldığı, glikoz içeren besi ortamındaki pH değişimi verilmektedir. Başlangıç pH’sının 6 olduğu her dört konsantrasyon için ortam pH’sı eşit hızda düşüp, CaCO_3 desteği ile yükselen pH aynı düzeyde tutulabilmektedir.



Şekil 7.33. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, glikoz g/L : ▲:100 , △:150, ◇: 200, ◆: 250)



Şekil 7.34. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, glikoz g/L : ▲:100 , △:150, ◇: 200, ◆: 250)

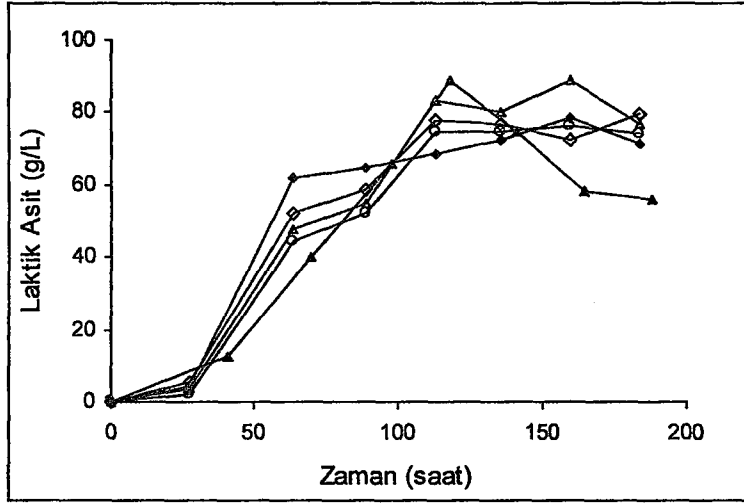
7.2.1.2. Başlangıç pH'sının Etkisi

Tutuklanmış mikroorganizma üzerinde başlangıç pH etkisini gözlemek amacıyla laktik asit üretim prosesi beş farklı başlangıç pH değerinde (4, 5, 6, 7 ve 8) gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 7.35 ve 7.36'da sunulmuştur.

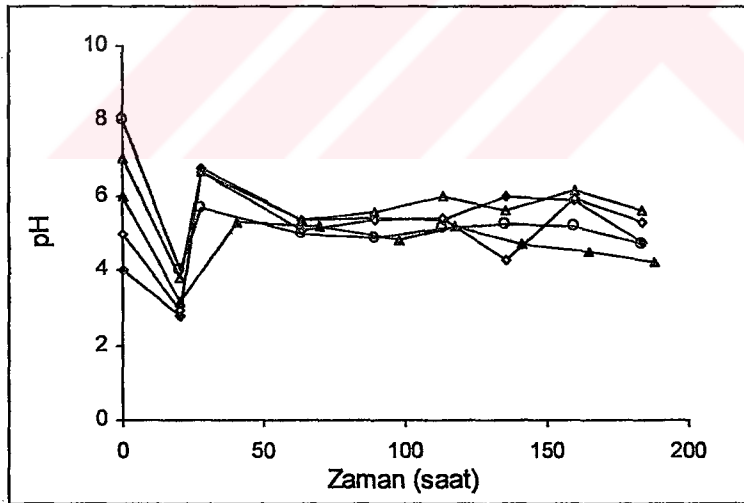
Farklı başlangıç pH değerlerinde üretilen laktik asidin zamanla değişimi Şekil 7.35'de görülmektedir. Başlangıç pH'larının farklı değerlere ayarlanması, laktik asit konsantrasyonunu çok fazla etkilememiştir. Ancak pH 6 başlangıç değerinde daha kararlı bir üretimin olduğu görülmektedir. Bütün başlangıç pH değerlerinde, laktik asit üretimi hemen hemen aynı olmakla beraber, pH 6 ve 7 için elde edilen değerlerin nispeten daha iyi olduğu söylenebilir. Bu da *Rhizopus oryzae* için nötrale yakın ortamların daha uygun olduğunu göstermektedir.

Şekil 7.36'da beş farklı başlangıç pH'sında, ortam pH'sının zamanla değişimi verilmiştir. Bu değişim, diğer çalışmalarda elde edilen pH değişimlerine benzerlik göstermektedir.





Şekil 7.35. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı başlangıç pH'sında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH'sı: ◆: 4 , ◇: 5, ▲: 6, △: 7, ○: 8)

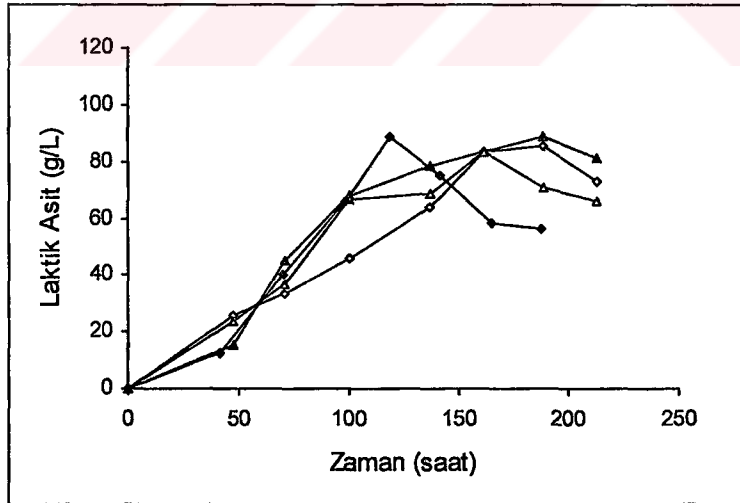


Şekil 7.36. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı başlangıç pH'sında ortam pH'sının zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH'sı: ◆: 4 , ◇: 5, ▲: 6, △: 7, ○: 8)

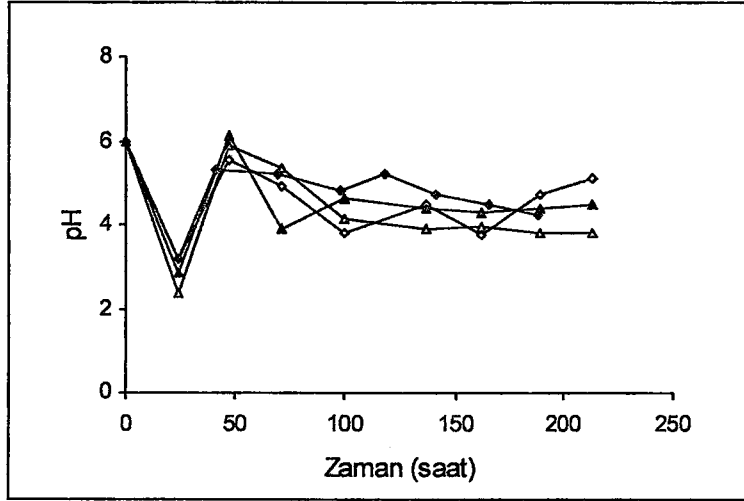
7.2.1.3. Başlangıç Spor Konsantrasyonunun Etkisi

Tutuklama işleminin destek maddesi üzerinde kendiliğinden olduğu (bu çalışmada fiziksel adsorbsiyon) sistemlerde, aşılama kullanılan başlangıç spor konsantrasyonu oldukça önemlidir. Bu durumu incelemek için dört farklı başlangıç spor konsantrasyonunun laktik asit üretimi üzerine etkileri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 7.37’de sunulmuştur. Başlangıç spor konsantrasyonları 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 ve 1×10^5 spor/ml’dir. Aşılama spor miktarı hemasitometrede sayılmıştır. Şekilde görüldüğü gibi farklı başlangıç spor konsantrasyonları, laktik asit üretimine önemli derecede etki etmemiş, ancak en yüksek laktik asit üretimi 1×10^8 spor/ml konsantrasyonunda elde edilmiştir. Çok düşük miktarlarda spor kullanımı, laktik asit üretimini az da olsa geciktirmektedir.

Farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında ortam pH’sındaki değişim şekil 7.38’de verilmektedir. 24 saat içerisinde, her dört konsantrasyon için de pH değişimi birbirine yakın değerler olup, CaCO_3 ilavesiyle pH kontrol edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 7.37. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı spor konsantrasyonlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH’sı:6, spor konsantrasyonu (spor/ml) : ◆: 1×10^8 , ◇: 1×10^7 , ▲: 1×10^6 , △: 1×10^5)

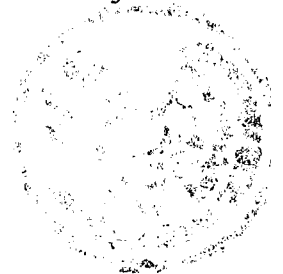


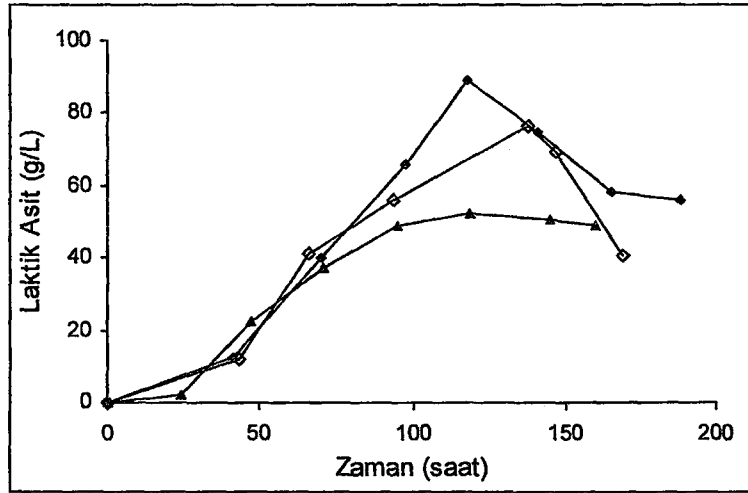
Şekil 7.38. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı spor konsantrasyonlarında zamanla ortam pH'sının değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH'sı:6, spor konsantrasyonu (spor/ml): ◆: 1×10^8 , ◇: 1×10^7 , ▲: 1×10^6 , △: 1×10^5)

7.2.1.4. Karıştırma Hızının Etkisi

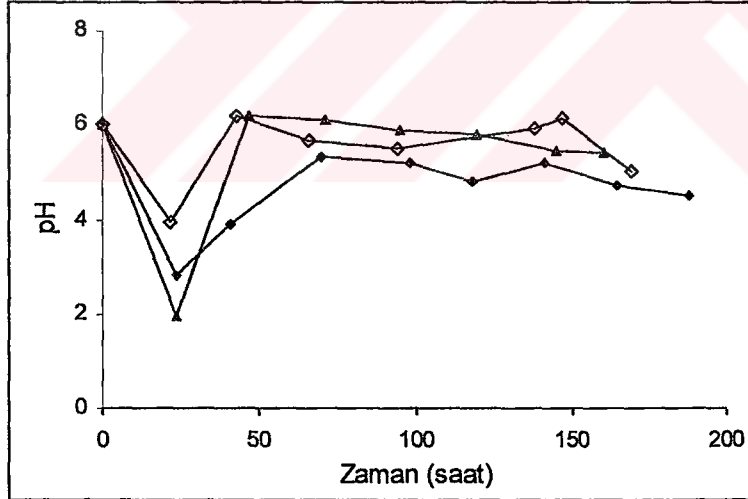
Mikroorganizmanın metabolik faaliyetlerini etkileyebilecek en önemli parametrelerden biri de karıştırma hızıdır. Poliüretan destek maddesine tutuklanmış mikroorganizmanın laktik asit üretimine, karıştırma hızının etkisi 75, 150 ve 250 rpm gibi üç farklı hızda incelenmiştir. Şekil 7.39'da görüldüğü gibi, immobilize haldeki mikroorganizmanın üretimine karıştırma hızının etkisi önemli olup, ürün miktarını çok fazla değiştirmektedir. En yüksek laktik asit 150 rpm hızında elde edilmiştir. Çok yüksek karıştırma hızında (250 rpm) ürün miktarının, 150 ve 75 rpm'e göre daha az olduğu görülmektedir. Bu durum, yüksek karıştırma hızının mikroorganizmanın morfolojik yapısını olumsuz yönde etkilemesinden kaynaklanabilir. Laktik asit için gerekli olan misel oluşumunun yüksek karıştırma hızıyla etkilenmesi de düşük ürün miktarı ile sonuçlanmış olabilir.

Karıştırma hızının incelendiği fermentasyon ortamlarında pH değişimi şekil 7.40'da verilmiştir. İlk 24 saat içinde 75 rpm için pH düşüşü az olup, 250 rpm için bu düşüş hızlı olmuştur. Her üç karıştırma hızında 24 saat sonundaki pH düşüşü CaCO_3 ilavesiyle durdurulup, belli bir değerde kontrol edilmeye çalışılmıştır.

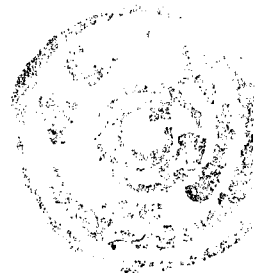




Şekil 7.39. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı karıştırma hızlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH'sı:6, karıştırma hızı (rpm): ◇:75, ◆:150 , ▲:250)



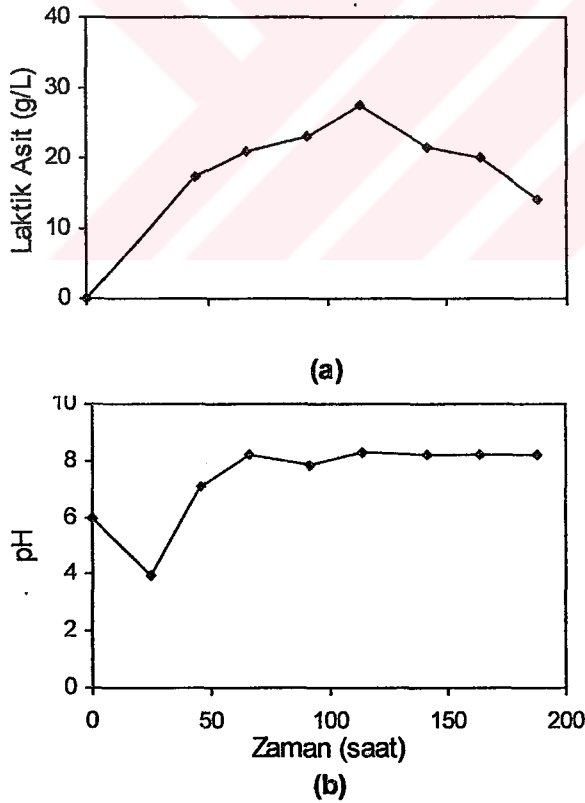
Şekil 7.40. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı karıştırma hızlarında zamanla ortam pH'sının değişimi. (T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH'sı:6, karıştırma hızı (rpm): ◇:75, ◆:150 , ▲:250)



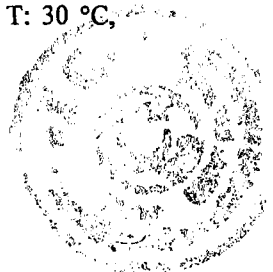
7.2.2. Melas İçeren Besi Ortamında Yapılan Deneyler

Serbest haldeki mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda, karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı besi ortamlarında melas konsantrasyonu arttıkça oluşan ürün miktarının da arttığı bulunmuştu. Ayrıca melasın kaynatılarak pastörizasyon işlemine tabii tutulmasıyla da fermentasyonun olumlu yönde etkilendiği gözlenmişti. Bu nedenle tutuklanmış halde kullanılan mikroorganizmalarla yapılan deneylerde, 300 g/L konsantrasyonunda kaynatılmış melas, substrat olarak seçilmiştir.

Şekil 7.41a 'da zamanla laktik asit miktarı arasındaki ilişki verilmektedir. Tutuklanmış haldeki *Rhizopus oryzae* tarafından karbon kaynağı hızlı bir şekilde tüketilmeye başlanmış ve zamanla oluşan laktik asit miktarı artmış, ancak glikozlu ortamda yapılan çalışmalarda elde edilen yüksek laktik asit miktarlarına ulaşamamıştır.



Şekil 7.41. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı melas içeren besi ortamında laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) zamanla değişimi. (K.H: 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, melas : 300 g/L)

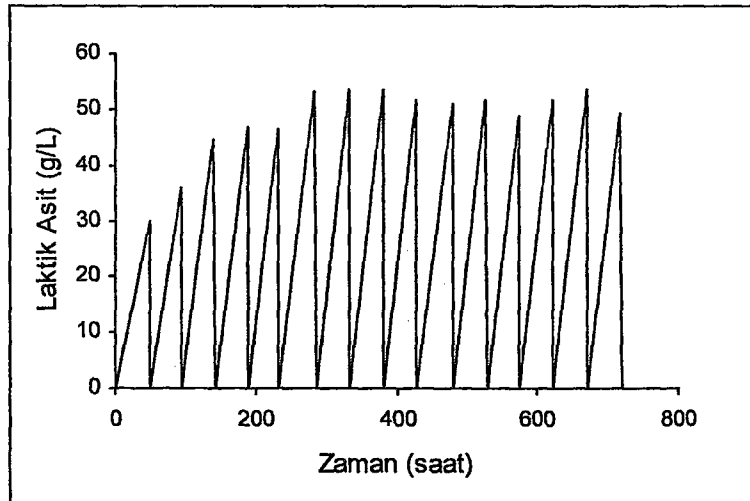


Ortam pH'sının zamanla değişimi Şekil 7.41b 'de görülmektedir. pH' da çok yüksek düşüşler gözlenmeyip, CaCO_3 ilavesiyle kararlı bir pH değeri sergilenmiştir.

7.3. İmmobilize Haldeki *R.oryzae*' nin Tekrar Kullanılabilirliği (Repeated-Batch)

İmmobilize haldeki mikroorganizmanın en büyük avantajlarından biri de tekrar kullanılabilirliğidir. Poliüretan destek maddesine tutuklanmış *R.oryzae* 'nin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla besiyerlerinin belirli aralıklarla değiştirilmesi yoluna gidilmiştir. Daha önceden 150 g/L glikoz konsantrasyonunda hazırlanan besiyeri 250 ml'lik erlenlere 50 şer ml olacak şekilde konulmuş, fermentasyonun gerçekleştiği kullanılmış besiyeri, aynı özellikteki taze besiyeri ile steril koşullarda değiştirilmiştir. Değiştirme işleminin 2, 3, 4 ve 5 günlük aralıklarla yapılmasının son ürün konsantrasyonunu etkileyebileceği düşüncesiyle, dört grup deney yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 7.42, 7.43, 7.44 ve 7.45'de verilmiştir.

Şekil 7.42' de besiyerinin 2 günlük aralıklarla değiştirilmesinin, fermentasyon üzerindeki etkisi görülmektedir. Değiştirme işleminin 6 kez tekrarlandığı fermentasyon ortamında laktik asit zamanla lineer olarak artmış, 6. değiştirmeden sonra elde edilen laktik asit miktarı maksimum seviyede kalmış ve bundan sonraki değiştirmelerde bu miktar hemen hemen aynı değerde korunmuştur.



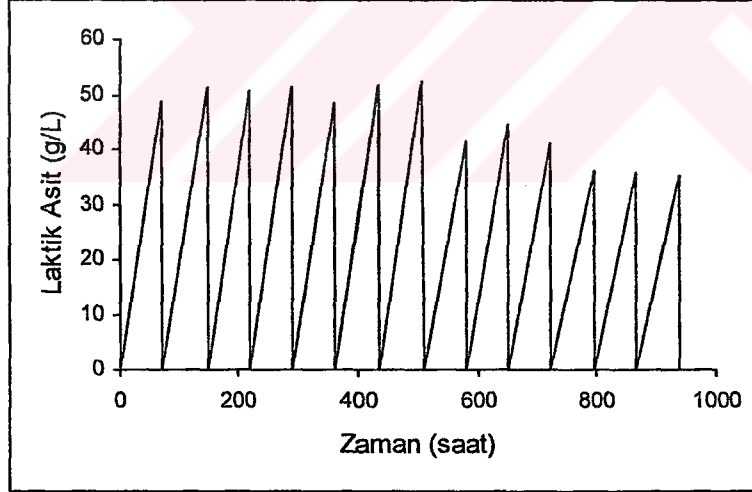
Şekil 7.42. İmmobilize *Rhizopus oryzae*' nin tekrar kullanılabilirliği. (2 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler. K.H. : 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, glikoz: 150 g/L)



Şekil 7.43' de kullanılmış besiyerinin taze besiyeri ile 3 günlük aralıklarla değiştirilmesinin ürün miktarına etkisi verilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, ilk değiştirmelerde laktik asit miktarı maksimuma ulaşmış, 7. değiştirmeden sonra bu miktar korunamamış ve belirgin bir düşüş gözlenmiştir.

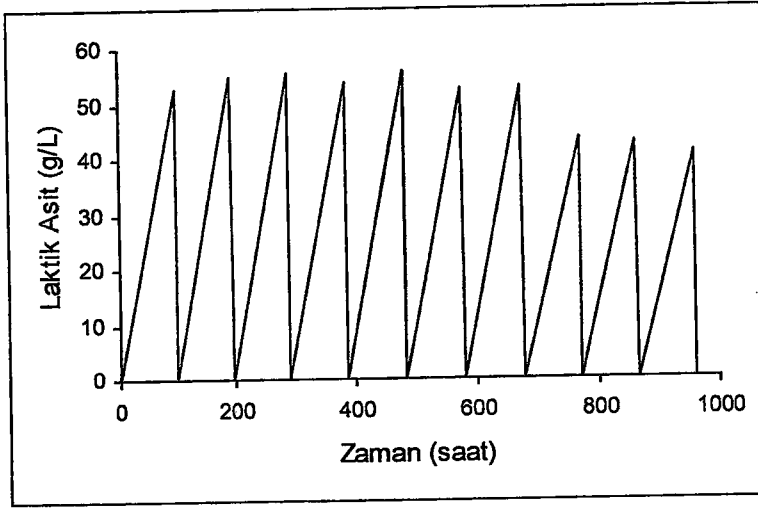
Şekil 7.44' de besiyerinin 4 günlük aralıklarla tazelenmesinin, fermantasyon verimi üzerine etkisi görülmektedir. İlk değiştirmelerde laktik asit miktarı maksimum bir seviyede iken, 7. değiştirmeden sonra ürün miktarında azalma görülmüştür.

Şekil 7.45' de besiyeri ortamının 5 günlük aralıklarla değiştirildiği deneylerin sonuçları verilmektedir. Fermantasyon başlangıcından 5 gün sonra taze besiyerinin eklendiği durumda maksimum ürün oluşmuş, bundan sonraki 5 defalık değiştirmeler ile bu seviyeye yakın bir ürün elde edilmiş ancak son iki değiştirmede ürün miktarı düşmüştür.

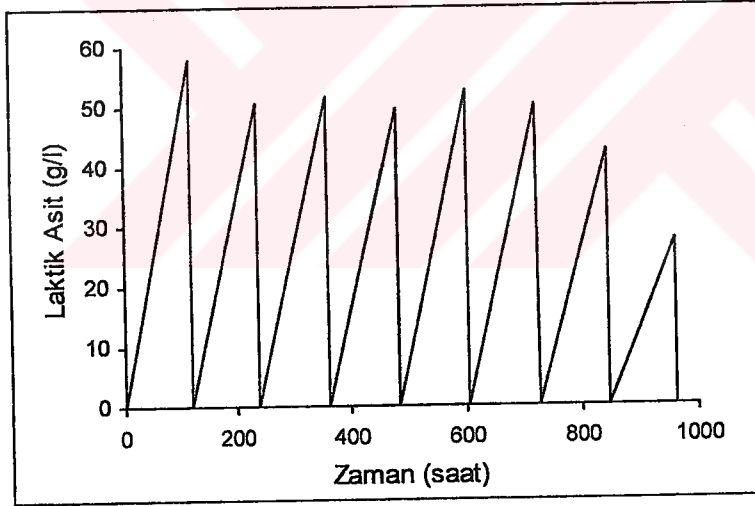


Şekil 7.43. İmmobilize *Rhizopus oryzae*' nin tekrar kullanılabilirliği. (3 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler. K.H. : 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, glikoz: 150 g/L)





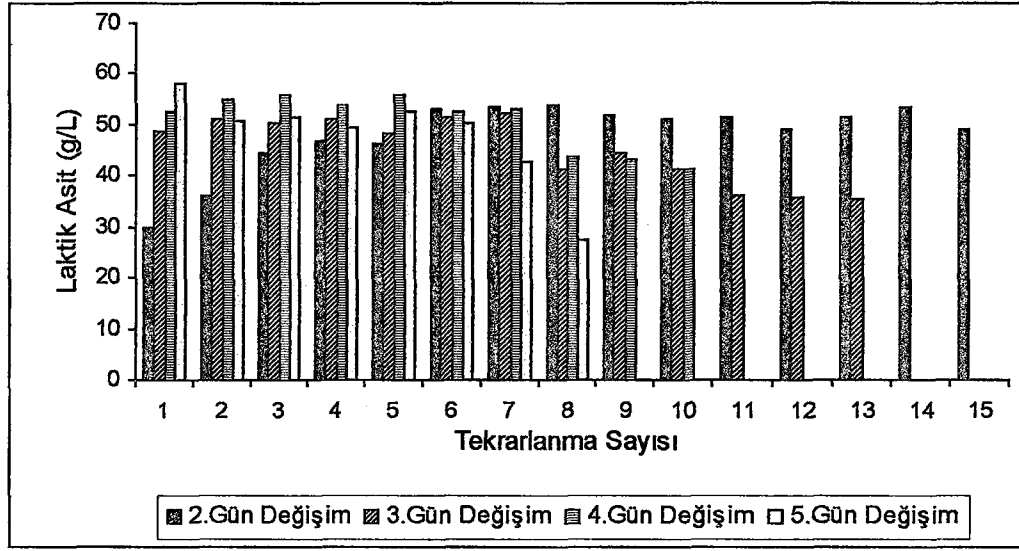
Şekil 7.44. İmmobilize *Rhizopus oryzae*'nin tekrar kullanılabilirliği. (4 günlük aralıklarla yapılan değiş-tirmeler. K.H. : 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, glikoz: 150 g/L)



Şekil 7.45. İmmobilize *Rhizopus oryzae*'nin tekrar kullanılabilirliği. (5 günlük aralıklarla yapılan değiş-tirmeler. K.H. : 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, glikoz: 150 g/L)

Besi yeri değişiminin dört farklı aralıkta yapıldığı bu çalışmaları kıyaslamak amacıyla sonuçlar Şekil 7.46' da toplu olarak verilmektedir. Değiş-tirme işleminin 2, 3, 4 ve 5 günlük aralıklarla olmasının, laktik asit oluşumuna etkisi görülmektedir. Şekilde de gözlendiği gibi en iyi sonuçlar 2 günlük aralıklarda yapılan çalışmalarda elde





Şekil 7.46. İmmobilize *Rhizopus oryzae*'nin tekrar kullanılabilirliği. (K.H. : 150 rpm, T: 30 °C, başlangıç pH : 6, glikoz: 150 g/L).

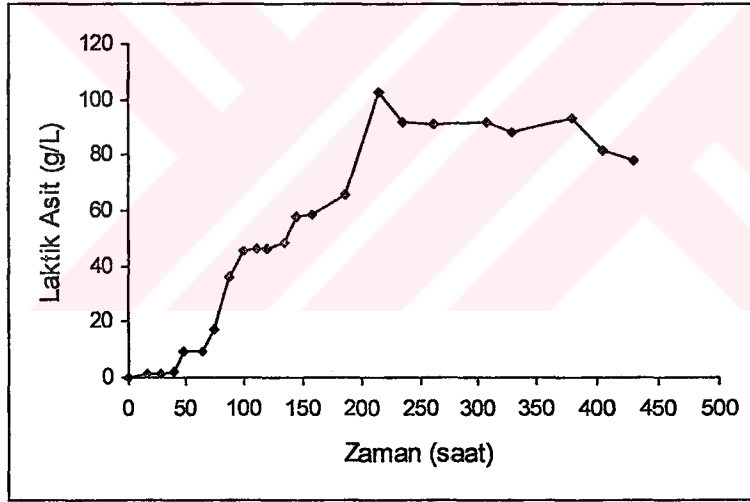
edilmiştir. Ürün miktarı tekrarlanma sayısı ile lineer bir şekilde artmış, 6. tekrarlamada maksimuma ulaşmış ve bundan sonraki tekrarlamalarda bu maksimum ürün seviyesi korunmuştur. Diğer üç grupta yapılan deneylerde, ilk tekrarlanma sayılarında yüksek miktarda ürün elde edilmiş ancak daha sonraki tekrarlanma sayılarında mikroorganizmanın ürün verme yeteneği azalmıştır. Bu durum, immobilize *R.oryzae* ile laktik asit üretiminde maksimum üretim 4. günde gerçekleşirken, böyle bir strateji ile maksimum ürün konsantrasyonunun 2 güne çekilebileceğini açıkça göstermektedir.

7.4. Biyoreaktörde Serbest Haldeki Mikroorganizma ile Yapılan Deneyler

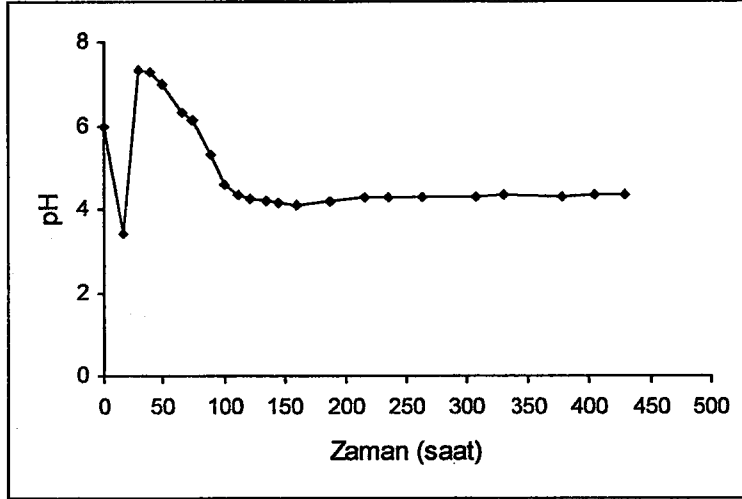
Deneylerde, pH, sıcaklık, hava akış hızı ve karıştırma hızı ölçülebilen ve kontrol edilebilen 800 ml çalışma hacmine sahip 1 L 'lik biyoreaktörde, *R.oryzae*'nin gelişimi ve laktik asit üretimi incelenmiştir. Fermantasyon şartları seçilirken, erlenlerde serbest mikroorganizma ile glikozlu ortamda yapılan deneylerde belirlenen optimum şartlar dikkate alınmıştır. Buna göre, 150 g/L glikoz konsantrasyonunda, 30 °C sıcaklıkta, 6 başlangıç pH'sında, 1×10^8 spor/ml spor konsantrasyonunda ve bu şartlara ek olarak

600 ml/dk hava akış hızı ve 400 rpm karıştırma hızında çalışılmıştır. Ortamın nötralizasyonu için, 24 saat sonra steril şartlarda 30 g/L CaCO_3 ilave edilmiştir.

Şekil 7.47. 'de, karıştırmalı biyoreaktörde 150 g/L glikoz içeren fermantasyon ortamında zamanla oluşan laktik asit miktarı arasındaki ilişki görülmektedir. Zamanla laktik asit değişimi, erlenlerde serbest mikroorganizma ile yapılan deneylerde elde edilen sonuçlara benzer bir eğilim göstermektedir. Şekilden de görüldüğü gibi, zamanla oluşan laktik asit miktarı artmış, 216. saatte maksimuma ulaşmış ve daha sonra hemen hemen sabit bir seviyede kalmıştır. 430 saat sürdürülen fermantasyon sonunda bile laktik asit miktarı yüksek bir seviyede tutulmuştur. Bu da *R.oryzae*' den laktik asit üretiminde, ölçek büyütmenin (scale-up) fermantasyon verimi üzerine olumlu bir etkisinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 7.47. Biyoreaktörde serbest mikroorganizma ile yapılan deneyde fermantasyon ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH'sı: 6, karıştırma hızı (rpm): 400, hava akış hızı(ml/dk): 600)



Şekil 7.48. Biyoreaktörde serbest mikroorganizma ile yapılan deneyde fermantasyon ortamında zamanla pH'nın değişimi. (T: 30 °C, glikoz: 150 g/L, başlangıç pH'sı: 6, karıştırma hızı (rpm): 400, hava akış hızı(ml/dk): 600)

Şekil 7.48' de ise zamanla fermantasyon ortamının pH değişimi verilmektedir. pH' daki değişim yapılan diğer çalışmalara benzer bir eğilim göstermektedir. 24 saat içerisinde ortam pH' sı düşmüş, CaCO_3 ilavesiyle yükseltilen pH fermantasyon boyunca hemen hemen aynı seviyede tutulmuştur.

7.5. Genel Sonuçlar

- Erlenlerde serbest mikroorganizma ile 25-250 g/l arasında değişen 7 farklı glikoz konsantrasyonunda yapılan deneyler sonucunda, en yüksek laktik asit konsantrasyonu 150 g/l glikoz değerinde yaklaşık olarak 60 g/l olarak elde edildi.

- Laktik asit fermentasyonu 4, 5, 6, 7 ve 8 başlangıç pH değerleri için gerçekleştirildiğinde, en yüksek laktik asit konsantrasyonu pH 6 değerinde gözlemlendi.

- 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 ve 1×10^5 spor/ml başlangıç spor konsantrasyonunun laktik asit üretimi üzerine etkisi incelendiği deneylerde, spor konsantrasyonunun maksimum laktik asit konsantrasyonunda pek fazla değişime sebep olmadığı, ancak yüksek spor konsantrasyonlarında üretim hızının daha hızlı bir şekilde gerçekleştiği bulundu.

▪ Laktik asit fermantasyonu 75, 150 ve 250 rpm gibi üç farklı karıştırma hızında gerçekleştirildiğinde en yüksek laktik asit konsantrasyonu 150 rpm değerinde elde edildi.

▪ Karbon kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı deneylerde maksimum laktik asit konsantrasyonu, 50 g/l sakkaroz içeren ortamda 20 g/l olarak belirlendi.

▪ Karbon kaynağı olarak kullanılan melas, besi ortamına farklı stratejilerde ilave edildi. Melasın direkt olarak kullanıldığı deneylerde artan melas konsantrasyonu ile üretilen laktik asit konsantrasyonunun arttığı gözlemlendi. Pastörizasyon sonrası kullanılan melasın laktik asit üretimine pozitif yönde katkısı olduğu ortaya kondu. Yine pastörize edilmiş melasa yeast ekstrakt eklenerek oluşturulan fermantasyon ortamında, laktik asit üretim prosesinin diğer durumlara kıyasla nispeten daha iyi olduğu söylenebilir.

▪ Substrat olarak %10, 20 ve 40 (w/w) oranında keçiyoynuzunun kullanıldığı deneylerde laktik asitin zamanla değişimi kararsızlık göstermektedir.

▪ Keçiyoynuzu içeren ortama “glikoz”, “tuz çözeltisi” ve “glikoz+tuz çözeltisi” ilavelerinin laktik asit fermantasyonu üzerine olumlu etkisi olmamaktadır.

▪ %40-50 oranında şeker içeriğine sahip keçiyoynuzu ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt doğrudan doğruya, tuz çözeltisi ilavesiyle ve süzülmeden lapa halinde, üç farklı şekilde fermantasyon ortamında kullanılması sonucunda, en iyi üretimi ekstraktın süzülerek doğrudan doğruya kullanılması vermektedir.

▪ Buğday kepeği, laktik asit üretiminde uygun bir karbon kaynağı değildir.

▪ İmmobilize mikroorganizma ile farklı glikoz konsantrasyonlarında yapılan deneylerde maksimum laktik asit konsantrasyonu 150 g/l glikoz değerinde, 88.75 g/l olarak elde edildi.

▪ Farklı başlangıç pH değerlerinin üretim üzerinde önemli bir etkisi yoktur.

▪ Serbest ortamda yapılan deneylerde olduğu gibi, immobilize sistemde de başlangıç spor konsantrasyonunun laktik asit üretimi üzerine kayda değer bir etkisi olmamaktadır.

▪ İmmobilize kültür sisteminde en yüksek laktik asit 150 rpm karıştırma hızında elde edilmektedir.

▪ Karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı immobilize sistemde, elde edilen laktik asit miktarı, glikozlu ortama göre oldukça düşük bir değerde kalmaktadır.

▪ İmmobilize *R.oryzae* 'nin tekrar kullanılabilirliğinin ölçüldüğü deneylerde en iyi strateji, kullanılmış besiyerinin 2.günde taze besi yeriyle değişmesi olarak belirlendi. Mikroorganizma, böyle bir strateji ile 30 günlük bir zaman periyodu boyunca kararlı bir şekilde laktik asit üretimini gerçekleştirebilmektedir.

▪ 1-L kapasiteli biyoreaktörde yapılan deneyde maksimum laktik asit üretimi 216.saatte yaklaşık 103 g/l olarak elde edildi.

▪ Yapılan tüm deneylerde zamanla ortam pH sınır değişimi hemen hemen aynı eğilimi göstermektedir. İlk 24 saatte pH 2 ± 0.5 değerine düşmekte, CaCO_3 ilavesi ile pH yükselmektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, S.I. and Takagi, M., 1990, "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Lactic Acid", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 37, 93-96.
- Aidoo, K.E., Hendry, R. And Wood, B.J.B., 1982, "Solid Substrate Fermentations", *Adv. In Microbiol.* 28, 201-237.
- Aktan, F., 1981, "Biyoloji", *Çukurova Ün. Yayınları*, No. 5, 564-584.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1977, "Biocemical Engineering Fundamentals", 371-376, 232-241, 525-545, McGraw Hill Co., London.
- Bayraktar, A., 1989, "Peynir Altı Suyu Tozundan *Lactobacillus bulgaricus* ile Laktik Asit Üretimi", Yüksek Lis. tezi, Hacettepe Ün. Fen Bil. Enst., Ankara.
- Berry, A.R., Franco, M., Zhang, W. and Middelberg, P.J., 1999, "Growth and Lactic Acid Production in Batch Culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a Defined medium", *Biotechnology Letters*, Vol .21, 161-167.
- Brodelius, P., 1978, "Industrial Application of Immobilized Biocatalysts", *Advances in Biochemical Eng.*, 10, 76-129.
- Chatterjee, M., Chakrabarty, S.L., Chattopadhyay, B.D., and Mandal, R. K., 1997, "Production of Lactic Acid by Direct Fermentation of Starchy Wastes by an Amylase-Producing *Lactobacillus*", *Biotechnology Letters*, Vol .19, No. 9, 873-874.
- Dong, X.Y., Bai, S. and Sun, Y., 1996, "Production of L(+)Lactic Acid with *Rhizopus oryzae* Immobilized in Polyurethane Foam Cubes", *Biotechnology Letters*, Vol .18, No. 2, 225-228.
- Göksungur, Y., 1998, "Melastan Laktik Asit Üretiminde Farklı Üretim Tekniklerinin Kullanılabilirliği ve Ortam Şartlarının Optimizasyonu", Doktora tezi, Ege Ün. Fen Bil. Enst., İzmir.
- Gözükara, E., 1997, "Biyokimya", Nobel Tıp Kitapevleri, 812-814.
- Gürsoy, G., 1991, "Lactic Acid Production By Immobilized *Rhizopus oryzae*", Yüksek Lis. tezi, ODTÜ Fen Bil. Enst., Ankara.
- Hamamcı, H. and Ryu, Y. , 1994, "Production of L(+)-Lactic Acid Using Immobilized *Rhizopus oryzae*", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 44, 125-133.
- Hang, Y.D., 1989, "Direct Fermentation of Corn to L(+)-Lactic Acid By *Rhizopus oryzae*", *Biotechnology Letters*, 11, 4, 299-300.
- Harsa, Ş., 1986, "Melastan Laktik Asit Üretimi", Yüksek Lis. tezi, Ege Üniversitesi.
- Jack, T.R. and Zajic, J.E., 1977, "The Immobilization of Whole Cells", *Adv. In Biochem. Eng.*, 5, 126-144.

Kirk-othmer, 1971, Encyclopedia of Chemical Technology, Interscience Publishers, John Wiley, 2nd Ed., Vol 12, 170, New York.

Kosakai, Y., Park and Y., Okabe, M., 1996, "Enhancement of L(+)-Lactic Acid Production Using Mycelial Flocs of *Rhizopus oryzae*", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 55, No. 3, 461-471.

Köşker, Ö., 1980, "Genel Mikrobiyoloji", 214-242, Ankara.

Özçelik, S., 1992, "Biyoteknolojiye Giriş Ders Notları", Fırat Ün. Biyoloji Bölümü, Elazığ

Özeriş, S., 1993, "Temel Organik Kimya", İ.Ü. Yayınları, 153, 194, İstanbul.

Pamir, H., 1978, "Teknik ve Endüstriyel Mikrobiyoloji", Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 19-48, 61-68, Ankara.

Park, Y., Kosakai, Y. and Okabe, M., 1998, "Efficient Production of L(+)-Lactic Acid Using Mycelial Cotton-like Flocs of *Rhizopus oryzae* in an Air-Lift Bioreactor", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 14, 699-704.

Pekin, B., 1980, "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)", E.Ü. Kimya Fak. Yayınları, No. 3, İzmir.

Pekin, B., 1982, "Biyoteknoloji", E.Ü. Kimya Fak. Yayınları, 103, İzmir.

Pekin, B., 1983, "Biyokimya Mühendisliği (Biyoteknoloji)", E.Ü. Kimya Fak. Yayınları, 2. Kitap, 1-20, İzmir.

Richter, K. and Trager, A. , 1994, " L(+)-Lactic Acid from Sweet sorghum by Submerged and Solid-State Fermentations ", Acta Biotechnol. ,14, 4, 367-378.

Samuel , A.W., Lee, Y.Y., and Anthony, W.B. , 1980, "Lactic Acid Fermentation of Crude Sorghum Extract ", Biotechnology and Bioengineering, 22, 757-777.

Snell, D.F. and Ettre, K., 1973, Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis ,vol 19, 124-128, John Wiley and Sons, New York..

Soccol, C.R., Marin, B., Raimbault, M. and Lebeault, J.M., 1993, "Breeding and Growth of *Rhizopus* in Raw Cassava by Solid State Fermentation" , Appl. Microbiol Biotchnol., 41, 330-336.

Sun, Y., Li, Y.L. and Bai, S., 1998, "Modelling of Continuous L(+)-Lactic Acid Production with Immobilized *R.oryzae* in an Air Lift Bioreactor", Biochemical Engineering Journal, Vol. 3, 87-90.

Tamada, M., Begum, A.A. and Sadi, S., 1992, "Production of L(+)-Lactic Acid by Immobilized Cells of *Rhizopus oryzae* with Polymer Supports Prepared by γ Ray Induced Polymerization", Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 74, No. 6, 379-383.

Telefoncu, A., 1995, "Biyoteknoloji", Ege Ün. Fen Fak. Yayınları No:152, 1-5, 26-30, 50-81, İzmir.

Ünsaçarer, M., 1998, "Serbest ve Tutuklanmış *Rhizopus arrhizus*' dan Lipaz Üretimi", Yüksek Lis. tezi, F.Ü. Fen Bil. Enst., Elazığ.

Xiodong, W., Xuan, G. and Rakshit, S.K., 1997, "Direct Fermentative Production of Lactic Acid on Cassava and Other Starch Substrates", Biotechnology Letters, Vol .19, No. 9, 841-843.

Yu, R. and Hang., Y.D., 1989, "Kinetics of Direct Fermentation of Agricultural commodities to L(+)-Lactic Acid By *Rhizopus oryzae*", Biotechnology Letters, 11, 8, 597-600.

Yumoto., I. and Ikeda., K., 1995, "Direct Fermentation of Starch to L(+)-Lactic Acid Using *Lactobacillus amylophilus*", Biotechnology Letters, Vol .17, No. 5, 543-546.



9. EKLER

Ek 1

Şeker Pancarı Melasının Ortalama Bileşimi (Göksungur, 1998).

Kuru madde:	% 75-78
Sakkaroz:	% 46-47
İnvert şeker:	% 0.5-1.1
Rafinoz:	% 1.0
Kül:	% 8-9
Toplam azot:	% 1.8-2.0
Uçucu asitler:	% 1.2
Kükürtdioksit:	% 0.05
Yoğunluk(g/cm ³) :	1.353
Viskozite(p) :	120



Ek 2**Keçiboynuzunun Bileşimi**

Nem	:	% 10-15
Toplam şeker	:	% 40-50 (glükoz, fruktoz, sakkaroz ve maltoz)
Protein	:	% 3-4
Pektin	:	% 1-2
Selüloz	:	% 7
Hemiselüloz	:	% 5
Fenolik bileşikler	:	% 20
Yağ	:	% 0.5-1.0
Kül	:	% 2-3



Ek 3**Buğday Kepeğinin Bileşimi**

Nem:	% 8
Kuru madde:	% 92
Ham protein:	% 15.5
Ham selüloz:	% 11.16
Yağ:	% 5.13
Kül:	% 4.79
Organik maddeler:	% 87.17
Nemsiz ekstrakt maddeleri:	% 55.39

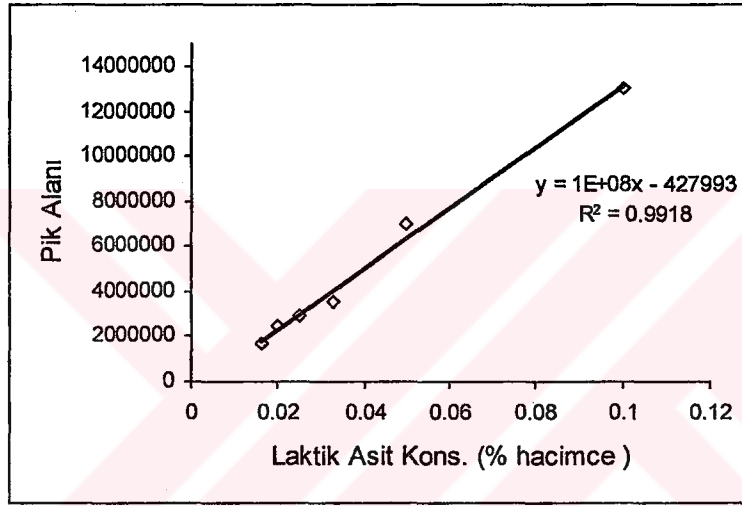
Eser elementler:

Ca :	% 0.17
P :	% 1.2
Mg :	% 0.5
Na :	% 0.07
K :	% 0.8
Cl :	% 0.08



Ek 4

Fermantasyon ortamından belirli aralıklarla alınan numunelerde, laktik asit konsantrasyonunu ölçmek için HPLC (High Pressure Liquid Chromotography) kullanılmıştır. Laktik asidin bilinen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu amaçla hacimce % 1' lik laktik asit çözeltisi, HPLC' nin çalışma aralığına düşmesi için 20, 30, 40, 50 ve 60 kat seyreltilerek standart çözeltiler hazırlanmıştır. Seyreltmeler mikropipet kullanılarak yapılmıştır. Laktik asit için elde edilen kalibrasyon eğrisi aşağıda verilmiştir.



Örnek hesaplama:

50 g/L sakkaroz konsantrasyonunda, pH:6' da, 150 rpm karıştırma hızında, serbest mikroorganizma ile yapılan deneyin 120. saatinde alınan numunenin HPLC analizi sonucunda pik alanı 6727133 olarak bulundu. Bulunan bu değerden, kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak ortamdaki laktik asit konsantrasyonu aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\text{Laktik Asit(g/L)} = \left(\frac{\text{Alan} + 427993}{1 \times 10^8} \right) \times \text{Düzeltilme faktörü}$$

$$\text{Düzeltilme faktörü} = \text{Seyreltme oranı} \times \text{birim dönüşümü} \times \text{yoğunluk}$$

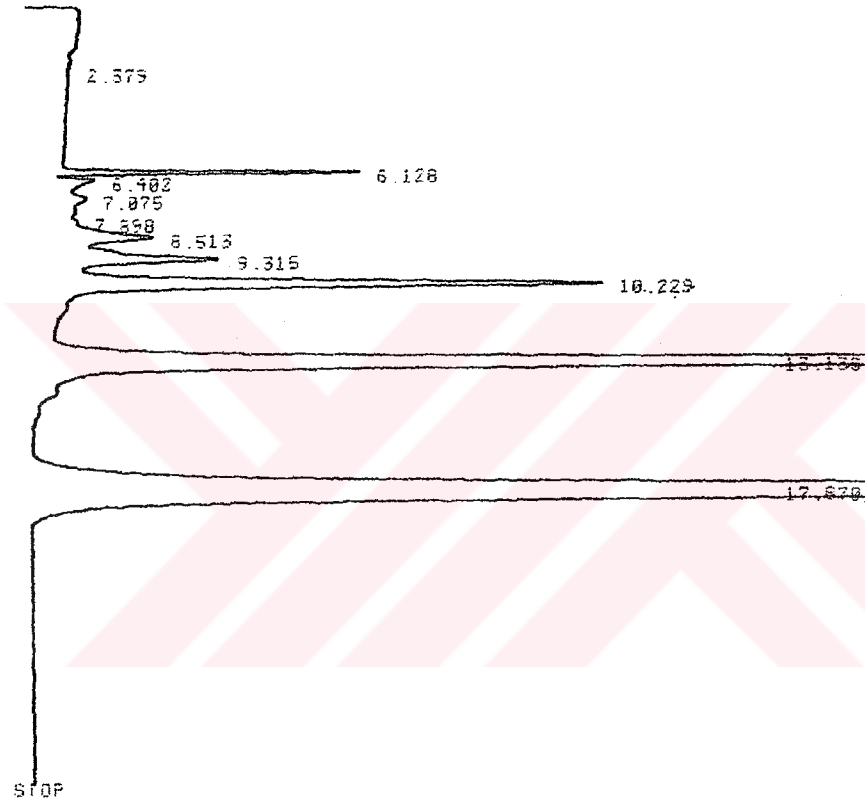
Buna göre:

$$\text{Laktik Asit (g/L)} = \left(\frac{6727133 + 427993}{1 \times 10^8} \right) \times 20 \times 10 \times 1.21$$

$$\text{Laktik Asit (g/L)} = 17.315 \text{ g/L}$$

* LIST: ZERO = 0. 301.548

* RUN # 64 JAN 3, 1981 05:40:52
START



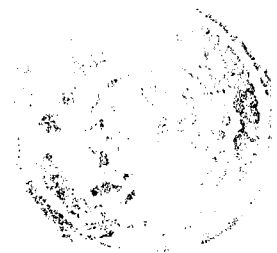
RUN# 64 JAN 3, 1981 05:40:52

AREAS

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
2.375	2038	PU	.071	.00952
6.128	354969	BP	.122	1.61734
6.402	125286	PU	.349	.57084
7.075	102636	UU	.392	.46716
7.398	55885	UU	.236	.16314
8.513	334973	UU	.444	1.79961
9.315	596336	UU	.568	2.69974
10.229	1653089	UB	.515	7.53159
13.138	6727133	PB	.329	30.65076
17.878	11961552	UB	.527	54.50027

TOTAL AREA=2.1348E+07

MUL FACTOR=1.0000E+00



Ek 5

Deneysel veriler:

Tablo E1. Farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.1.)

Zaman(saatt)	25 g/L	Zaman(saatt)	50 g/L	Zaman(saatt)	75 g/L
0	0	0	0	0	0
11	2.0691	17	0.968	11	1.0406
21	2.6136	46.25	12.1	16	1.0285
36	1.0285	68.75	13.31	20	1.0285
59.5	1.0285	90	15.73	35	5.687
89.5	1.0406	95.85	16.2	64.5	14.157
137	1.089	113.33	15.73	114	19.239
				178	15.609

Tablo E2. Farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.2.)

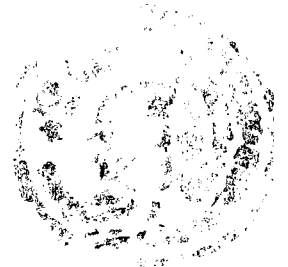
Zaman(saatt)	100 g/L	Zaman(saatt)	150 g/L	Zaman(saatt)	200 g/L	Zaman(saatt)	250 g/L
0	0	0	0	0	0	0	0
41.3	4.84	19	7.3	11	1.1253	11	1.223003
48.5	9.68	43	17.4	16	1.0527	16	1.042742
65.5	37.5	65	40	20	1.0406	20	1.066056
72.25	36	90	52	35	15.004	35	2.277673
105	38	120	59.95	64.5	10.97228	64.5	10.87108
137	34	140	55	87.5	6.5582	87.5	13.7611
		178	53	114	10.4786	114	17.17787
				178	23.595	155.5	28.81808

Tablo E3. Farklı glikoz konsantrasyonlarında elde edilen maksimum laktik asit miktarları. (Şekil 7.3.)

Glikoz (g/L)	Max. Laktik Asit (g/ L)
25	2.61
50	16.2
75	19.24
100	38.72
150	59.95
200	23.6
250	28.8

Tablo E4. Farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi. (Şekil 7.4.)

Zaman(saatt)	25 g/L	Zaman(saatt)	50 g/L	Zaman(saatt)	75 g/L
0	6	0	6	0	6
11	5.67	17	2.33	12	2.1
21	5.65	46.25	6.69	35	6.62
36	8.7	68.75	6.77	64.5	5.9
59.5	8.2	90	6.97	114	6.29
89.5	8.1	95.85	6.59	178	6.62
137	8.06	113.33	6.85		



Tablo E5. Farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'ının zamanla değişimi. (Şekil 7.5.)

Zaman(saat)	100 g/L	Zaman(saat)	150 g/L	Zaman(saat)	200 g/L	Zaman(saat)	250 g/L
0	6	0	6	0	6	0	6
18	3.2	19	2.31	11	2.8	11	2.89
41.3	7.1	43	5.94	16	2.96	16	2.91
48.5	6.36	65	6.09	20	2.5	20	2.76
65.5	6.02	90	6.11	35	7.17	35	6.6
72.25	6.2	120	6.29	64.5	5.81	64.5	5.83
137	6.5	140	5.68	87.5	5.8	87.5	5.77
		178	5.38	114	5.65	114	5.64
				178	5.2	155.5	5.66

Tablo E6. Farklı başlangıç pH değerlerinde laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.6.)

Zaman (saat)	pH 4 için L.A. (g/L)	Zaman (saat)	pH 5 için L.A. (g/L)	Zaman (saat)	pH 6 için L.A. (g/L)	Zaman (saat)	pH 7 için L.A. (g/L)	Zaman (saat)	pH 8 için L.A. (g/L)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.5	1.0285	14.5	1.1374	19	7.3	17	1.245801	17	1.161506
21.1	1.0285	21.1	1.0406	43	17.4	41	3.247923	41	6.318676
40	2.057	40	1.8997	65	40	68.5	21.46338	68.5	33.48752
44.8	2.8072	44.8	3.7752	90	52	91	42.45882	91	45.5361
64.5	15.2944	64.5	14.3022	120	59.95	119	30	119	35.7
88.5	28.4592	88.5	24.5751	140	55	142	25.10162	142	30
157	26.0997	157	27.3097	178	53	159	22	159	29.5012
								169	24.5

Tablo E7. Farklı başlangıç pH değerlerinde ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.7.)

Zaman (saat)	pH 4 için pH değişimi	Zaman (saat)	pH 5 için pH değişimi	Zaman (saat)	pH 6 için pH değişimi	Zaman (saat)	pH 7 için pH değişimi	Zaman (saat)	pH 8 için pH değişimi
0	4	0	5	0	6	0	7	0	8
14.5	2.65	14.5	2.66	19	2.31	17	2.05	17	2.33
21.1	2.4	21.1	2.36	43	5.94	41	5.96	41	6.01
40	6.94	40	6.85	65	6.09	68.5	5.76	68.5	5.66
44.8	6.17	44.8	6.86	90	6.11	91	5.23	91	5.47
64.5	5.88	64.5	6.25	120	6.29	119	5.34	119	4.76
88.5	5.65	88.5	5.72	140	5.68	142	5.75	142	5.28
157	4.19	157	4.03	178	5.38	159	5.6	159	5.31
								169	5.6

Tablo E8. Farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.8.)

Zaman (saat)	1×10^8 için L.A.(g/L)	Zaman (saat)	1×10^7 için L.A.(g/L)	Zaman (saat)	1×10^6 için L.A. (g/L)	Zaman (saat)	1×10^5 için L.A. (g/L)
0	0	0	0	0	0	0	0
19	7.3	17	2.890008	17	1.166254	17	1.091858
43	17.4	42	7.181957	42	3.357126	42	3.184052
65	40	67	14.51229	67	12.79389	67	3.753205
90	52	110.5	60.5	110.5	53.23154	110.5	58.6108
120	59.95	133.5	58	133.5	52	133.5	55
140	55						
178	53						

Tablo E9. Farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.9.)

Zaman (saat)	1×10^8 için pH	Zaman (saat)	1×10^7 için pH	Zaman (saat)	1×10^6 için pH	Zaman (saat)	1×10^5 için pH
0	6	0	6	0	6	0	6
19	2.31	17	2.62	17	3.77	17	4.62
43	5.94	42	6.39	42	6.98	42	6.16
65	6.09	67	5.93	67	5.94	67	6.68
90	6.11	110.5	4.78	110.5	4.65	110.5	4.75
120	6.29	133.5	4.17	133.5	5.27	133.5	5.74
140	5.68	140	3.93	140	5.11	140	5.37
178	5.38						

Tablo E10. Farklı karıştırma hızlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.10.)

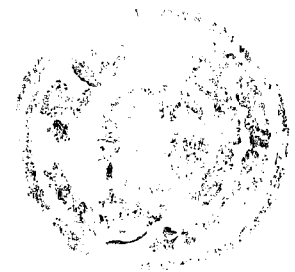
Zaman(saatt)	75 rpm	Zaman(saatt)	150 rpm	Zaman(saatt)	250 rpm
0	0	0	0	0	0
22	5.603629	19	7.3	21	16.77579
49	6.646644	43	17.4	43	32.8
66	25.04504	65	40	73	44.7
91.5	40.06039	90	52	94.5	46.19809
120	37	120	59.95	137.5	38.38405
		140	55		
		178	53		

Tablo E11. Farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.11.)

Zaman(saatt)	75 rpm	Zaman(saatt)	150 rpm	Zaman(saatt)	250 rpm
0	6	0	6	0	6
22	2.18	19	2.31	21	1.78
49	5.62	43	5.94	43	6.09
66	5.32	65	6.09	73	5.28
91.5	4.72	90	6.11	94.5	5.69
120	4.6	120	6.29	137.5	5.45
		140	5.68	143.5	5.66
				178	5.38

Tablo E12. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.12.)

Zaman(saatt)	5 g/L sak.	Zaman(saatt)	30 g/L sak.	Zaman(saatt)	50 g/L sak.	Zaman(saatt)	100 g/L sak.
0	0	0	0	0	0	0	0
12.5	1.1011	12.5	1.0285	11.5	1.0769	14.5	0.1035746
17	1.0285	18	1.0285	18.5	1.1616	21.5	1.0285
37	1.0527	37	1.3915	48	5.7354	40	1.694
42	1.0285	42	2.8072	57	18.5977	64	2.5
59.5	1.0769	60	8.7604	75.1	19.3	88.5	3.3759
86	1.0648	65.2	10.9263	80	20.0739	157	1.3431
156	1.0285	86	9.1	120.5	17.3151	188.5	1.4762
		112	9	191	15.9478		
		156	9.1476				



Tablo E13. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.13.)

Zaman(saat)	5 g/L sak.	Zaman(saat)	30 g/L sak.	Zaman(saat)	50 g/L sak.	Zaman(saat)	100 g/L sak.
0	6	0	6	0	6	0	6
12.5	3.65	12.5	2.72	11.5	3.38	14.5	2.86
17	3.66	18	2.53	18.5	3.3	21.5	2.46
37	7.89	37	6.55	48	6.53	40	7.23
42	7.8	42	6.43	57	5.97	64	7.37
59.5	7.82	60	6.03	80	6.28	88.5	7.29
86	7.85	65.2	6.49	120.5	7.86	157	7.59
156	7.51	86	6.69	191	7.85	188.5	7.28
		112	6.76				
		156	7.88				

Tablo E14. Farklı melas konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.14.)

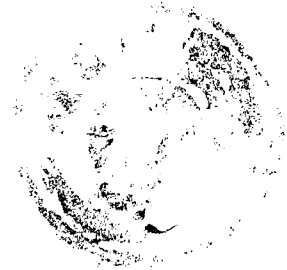
Zaman(saat)	75 g/L	Zaman(saat)	150 g/L	300 g/L	400 g/L
0	0	0	0	0	0
23	7.919927	40	6.78	10.73	11.6
41	4.488528	65	11.31	15.67	18.78
62	4.864948	89	15.2	14.16	31.51
88	4.568827	119	27.68	24	37.20
110	4.640396	135	5.3	10.97	35.11
134	4.811173	162	11.8	16.77	15.17
158	4.118304				

Tablo E15. Farklı melas konsantrasyonlarında ortam pH' sının zamanla değişimi. (Şekil 7.15.)

Zaman(saat)	75 g/L	Zaman(saat)	150 g/L	300 g/L	400 g/L
0	6	0	6	6	6
20	4.89	24	3.25	3.84	2.96
23	6.89	40	7.53	7.76	7.28
41	8.01	65	7.98	7.58	7.81
62	8.16	89	8.13	8.13	8.04
88	8.25	119	8.1	7.98	6.91
110	8.24	135	8.09	8.08	8.01
134	8.26	162	7.93	7.95	7.9
158	8.14				

Tablo E16. Kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.16.)

Zaman(saat)	75 g/L	150 g/L	300 g/L	400 g/L
0	0	0	0	0
38	8.7604	24.6235	17.0126	28.1688
63	11.495	24.2	26.499	31.46
87	9.7647	16.577	28.5681	30
139	8.5426	15.125	38.0061	49.2833
159	10.3576	17.424	25.5552	46.9843
188	10.5875	15.2944	24.5872	18.271



Tablo E17. Kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.(Şekil 7.17.)

Zaman(saat)	75 g/L	150 g/L	300 g/L	400 g/L
0	6	6	6	6
20	4.58	3.86	3.26	2.53
38	7.77	7.58	7.2	7.23
63	7.89	7.77	7.41	7.12
87	7.92	7.87	7.43	7.28
139	7.9	8.26	7.62	6.87
159	7.92	8.61	7.65	6.83
188	7.92	7.91	7.88	7.4

Tablo E18. Yeast ekstrakt içeren kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.18.)

Zaman(saat)	75 g/L	150 g/L	300 g/L	400 g/L
0	0	0	0	0
41	11.5918	20.57	26.8378	32.67
65	14.4474	27.225	32.3191	49.1986
93	15.246	23.8612	35.09	35.453
116	14.9556	19.5778	39.3	34.4487
137	9.8252	14.3022	34.243	25.7972
167		33.6985	37.026	42.955

Tablo E19. Yeast ekstrakt içeren kaynatılmış melasın farklı konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.19.)

Zaman(saat)	75 g/L	150 g/L	300 g/L	400 g/L
0	6	6	6	6
20	4.52	3.86	3.56	3.15
41	7.94	7.55	7.32	7.03
65	8.18	8.07	7.97	7.01
93	7.85	8.16	8.08	7.56
116	8.25	8.13	8.02	7.6
137	8.3	7.91	8.02	8.72
167	8.26	8.18	8.06	7.9

Tablo E20. Melasın farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında laktik asit miktarının zamanla değişimi.(Şekil 7.20.) (*:melas, **: kaynatılmış melas, ***:Kaynatılmış melas + 10 g/L yeast ekstrakt)

Zaman(saat)	*	Zaman(saat)	**	Zaman(saat)	***
0	0	0	0	0	0
40	10.73	38	17.0126	41	26.8378
65	15.67	63	26.499	65	32.3191
89	14.16	87	28.5681	93	35.09
119	24	139	38.0061	116	39.3
135	10.97	159	25.5552	137	34.243
162	16.77	188	24.5872	167	37.026



Tablo E21. Melasın farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında pH'nın zamanla değişimi. (Şekil 7.21.)
(*:melas, **: kaynatılmış melas, ***:Kaynatılmış melas + 10 g/L yeast ekstrakt)

Zaman(saatt)	*	Zaman(saatt)	**	Zaman(saatt)	***
0	6	0	6	0	6
24	3.25	20	3.26	20	3.56
40	7.53	38	7.2	41	7.32
65	7.98	63	7.41	65	7.97
89	8.13	87	7.43	93	8.08
119	8.1	139	7.62	116	8.02
135	8.09	159	7.65	137	8.02
162	7.93	188	7.88	167	8.06

TabloE22. Farklı keçiyoynuzu konsantrasyonlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi.(Şekil 7.22.)

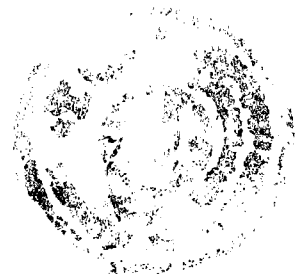
Zaman(saatt)	% 60 k.b.	Zaman(saatt)	% 80 k.b.	Zaman(saatt)	% 90 k.b.
0	0	0	0	0	0
16	28.9	42	11.96	47	14.15
41	10.97	68	10.21	90	14.65
65	12.8	112	15.79	115	13.64
66	22	140	22.68	139	23.54
93	3.61	234	12.79	165	14.4
140	3.16	333	16.25	289	13.2
		355	17.57		

Tablo E23. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının ve ortam pH'sının değişimi. (Şekil 7.23)

Zaman(saatt)	pH	Laktik Asit (g/L)
0	6	0
47	2,96	14,152412
90	6,1	14,654939
114,5	7,1	13,644541
138,5	7,29	23,545709
165	6,99	14,40597
289	6,93	13,20807

Tablo E24. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ve 50 g/L glikoz katkısı içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının ve ortam pH'sının değişimi. (Şekil 7.24)

Zaman (saatt)	pH	Laktik Asit (g/L)
0	6	0
66,5	7,14	9,1722646
98,5	7,02	11,89914
123,5	7,13	11,046409
140	7,15	10,940936
167,5	6,66	20,458273
191	7,14	13,884237



Tablo E25. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ve tuz çözeltisi içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının ve ortam pH'sının değişimi. (Şekil 7.25)

Zaman (saat)	pH	Laktik Asit (g/L)
0	6	0
50	6,48	4,8778004
66	6,27	4,8166712
93	5,22	6,1941546
117	5,34	10,591266
161	6,62	31,459003
185	6,38	7,5815502
213	6,52	4,4707177

Tablo E26. Ağırlıkça % 10 keçiyoynuzu ile 50 g/L glikoz ve tuz çözeltisi içeren besi ortamında zamanla laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) değişimi. (Şekil 7.26.)

Zaman (saat)	pH	Laktik Asit (g/L)
0	6	0
50	6.35	4.85152888
66	5.55	5.06596992
93	6.41	25.7764267
117	6.07	22.5547969
161	5.47	10.1676784
185	5.41	21.860586
213	5.28	26.7222498

Tablo E27. Keçiyoynuzu ekstraktlarının farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (Şekil 7.27.)(*:Ekstrakte edilip süzölmüş keçiyoynuzu, **: Ekstrakte edilip süzölmüş keçiyoynuzuna tuz çözeltisi katkısı, ***: Ekstrakte edilmiş lapa halindeki keçiyoynuzu)

Zaman(saati)	*	Zaman(saati)	**	Zaman(saati)	***
0	0	0	0	0	0
50	23.76865	50	13.22545	50	7.80548
67	29.83643	67	12.9	87	11.02141
87	32.03574	87	14.8	111	12.06447
111	33.6	111	24.85488	160	9.41334
135	36.86881	135	20.81947		
160	35.41584	160	12		

Tablo E28. Keçiyoynuzu ekstraktlarının farklı biçimde kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi. (Şekil 7.28.)(*:Ekstrakte edilip süzölmüş keçiyoynuzu, **: Ekstrakte edilip süzölmüş keçiyoynuzuna tuz çözeltisi katkısı, ***: Ekstrakte edilmiş lapa halindeki keçiyoynuzu)

Zaman(saati)	*	Zaman(saati)	**	Zaman(saati)	***
0	6	0	6	0	6
24	2.48	24	2.25	24	2.89
50	5.93	50	5.68	50	6.08
67	6.37	67	6.18	87	6
87	6.36	87	6.09	111	5.98
111	6.21	111	6.28	160	5.9
135	6.38	135	6.06		
160	6.53	160	6.36		



Tablo E29. Keçiyoynuzu ekstraktlarının seyreltilerek kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (Şekil 7.29.)

Zaman(saat)	0%	Zaman(saat)	25%	Zaman(saat)	50%	Zaman(saat)	75%
0	0	0	0	0	0	0	0
50	23.76865	42	9.635533	42	12.31104	42	6.41692
67	29.83643	61	18.57728	61	14.46617	61	9.094493
87	32.03574	90	24.3	90	18.11594	90	9.760683
111	38.2	109	22.5	109	19.74156	109	10.04607
135	36.86881	133	19	133	15.96	133	10.25589
160	35.41584	166	16	166	12.85	166	11.44164

Tablo E30. Keçiyoynuzu ekstraktlarının seyreltilerek kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi.(Şekil 7.30.)

Zaman(saat)	0%	Zaman(saat)	25%	Zaman(saat)	50%	Zaman(saat)	75%
0	6	0	6	0	6	0	6
24	3.25	24	3.86	24	3.98	24	4.36
50	5.93	42	6.93	42	6.69	42	7.29
67	6.37	61	6.52	61	7.12	61	7.48
87	6.36	90	6.63	90	7.08	90	7.58
111	6.21	109	6.63	109	7.24	109	7.04
135	6.38	133	6.89	133	7.11	133	7.53
160	6.53	166	6.25	166	7.2	166	7.28

Tablo E31. Buğday kepeğinin kullanıldığı besi ortamında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (Şekil 7.31.) (*: 50 g/L buğday kepeği + 50 g/L glikoz, **: 50 g/L buğday kepeği)

Zaman(saat)	*	Zaman(saat)	**
0	0	0	0
21	23.47134	24	2.574832
44	22.36025	47	2.229757
87	15.0072	71	2.265813
120	13.63104	95	2.013917
136	10.44754	118	5.927674
		142	4.339596
		169	5.781094

Tablo E32. Buğday kepeğinin kullanıldığı besi ortamında zamanla ortam pH'sının değişimi. (Şekil 7.31.) (*: 50 g/L buğday kepeği + 50 g/L glikoz, **: 50 g/L buğday kepeği)

Zaman(saat)	*	Zaman(saat)	**
0	6	0	6
21	5.2	24	4.26
44	5.81	47	6.89
87	5.45	71	7.88
96	5.53	95	8.13
120	5.85	118	8.35
136	6.1	142	8.41
		169	8.64



Tablo E33. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı glikoz konsantrasyonlarında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.33.)

Zaman(saat)	100 g/L	150 g/L	200 g/L	250 g/L
0	0	0	0	0
41	9,87	12,44	8,25	4,72
70	32,74	40,1	24,18	13,4
98	50,1	65,9	24,5	16,86
118	44,1	88,75	39,1	20,43
141	41,9	74,87	44,52	57,8
165	52,1	58,15	51	39,5
188	52,31	56	50	23,1

Tablo E34. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı glikoz konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.34.)

Zaman(saat)	100 g/L	150 g/L	200 g/L	250 g/L
0	6	6	6	6
20	2,89	3,18	3,24	3,65
41	5,49	5,3	5,7	5,8
70	5,46	5,21	5,64	5,76
98	5,88	4,8	5,83	5,87
118	4,8	5,2	5,47	5,74
141	6,04	4,7	5,79	5,86
165	5,78	4,5	5,56	5,78
188	6,04	4,24	4,66	5,89

Tablo E35. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı başlangıç pH'sında laktik asit miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.35.)

Zaman(saat)	pH 4	pH 5	pH 7	pH 8	Zaman(saat)	pH 6
0	0	0	0	0	0	0
28	4,64	5,22	3,9	2,44	41	12,44928
64	61,82	52	48	44,43	70	40,06814
89,5	65	58,7	55,2	52	98	65,91815
113,5	68,87	78,14	83,3	74,7	118	88,75
135,5	72,34	76,71	80	74,61	141	74,87261
160	78,42	72,45	88,74	76,33	165	58,15403
184	71,57	79,62	77,1	74,04	188	56

Tablo E36. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı başlangıç pH'sında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.36.)

Zaman(saat)	pH 4	pH 5	pH 7	pH 8	Zaman(saat)	pH 6
0	4	5	7	8	0	6
20	2,8	2,96	3,8	4,01	20	3,18
28	6,75	6,64	6,62	5,68	41	5,3
64	5,34	5,08	5,35	4,98	70	5,21
89,5	5,42	5,33	5,54	4,88	98	4,8
113,5	5,37	5,38	5,98	5,14	118	5,2
135,5	6,01	4,28	5,61	5,24	141	4,7
160	5,9	5,93	6,15	5,21	165	4,5
184	4,74	5,31	5,6	4,68	188	4,24



Tablo E37. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı spor konsantrasyonlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (Şekil 7.37.)

Zaman (saat)	1×10^8 için L.A.(g/L)	Zaman (saat)	1×10^7 için L.A.(g/L)	1×10^6 için L.A.(g/L)	1×10^5 için L.A.(g/L)
0	0	0	0	0	0
41	12,44928	47	25,38	15,2	23,9
70	40,06814	71	33,1	45,01	36,84
98	65,91815	100	45,6	67,96	66,7
118	88,75	137	63,82	78,36	68,9
141	74,87261	161,5	82,9	83	83,1
165	58,15403	189	85	88,67	70,7
188	56,2	213	73,14	81,14	65,97

Tablo E38. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı spor konsantrasyonlarında zamanla ortam pH'sının değişimi. (Şekil 7.38.)

Zaman (saat)	1×10^8 için L.A.(g/L)	Zaman (saat)	1×10^7 için L.A.(g/L)	1×10^6 için L.A.(g/L)	1×10^5 için L.A.(g/L)
0	6	0	6	6	6
24	3,18	24	3,2	2,84	2,35
41	5,3	47	5,54	6,12	5,87
70	5,21	71	4,9	3,89	5,36
98	4,8	100	3,83	4,63	4,13
118	5,2	137	4,49	4,4	3,92
141	4,7	161,5	3,78	4,3	3,96
165	4,5	189	4,71	4,4	3,8
188	4,24	213	5,1	4,47	3,79

Tablo E39. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı karıştırma hızlarında zamanla laktik asit miktarının değişimi. (Şekil 7.39.)

Zaman(saatt)	75 rpm	Zaman(saatt)	150 rpm	Zaman(saatt)	250 rpm
0	0	0	0	0	0
43	12.07084	41	12.44928	24	2.235332
66	41.12657	70	40.06814	47	22.30903
94	56.19441	98	65.91815	71	37.5834
138	76.24961	118	88.75	95	49.08846
147	69.50234	141	74.87261	119	52.28559
169	40.59032	165	58.15403	145	50.77249
		188	56.2	160	49

Tablo E40. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı farklı karıştırma hızlarında zamanla ortam pH'sının değişimi. (Şekil 7.40.)

Zaman(saatt)	75 rpm	Zaman(saatt)	150 rpm	Zaman(saatt)	250 rpm
0	6	0	6	0	6
22	3.93	24	2.8	24	1.95
43	6.18	41	3.89	47	6.2
66	5.68	70	5.3	71	6.1
94	5.5	98	5.21	95	5.9
138	5.92	118	4.8	119	5.8
147	6.16	141	5.2	145	5.43
169	5.01	165	4.7	160	5.4
		188	4.5		



Tablo E41. İmmobilize mikroorganizmanın kullanıldığı melas içeren besi ortamında laktik asit miktarının (a) ve ortam pH'sının (b) zamanla değişimi. (Şekil 7.41.)

Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	Laktik Asit (g/L)
0	6	0	0
24	3.98	45.5	17.212211
45.5	7.09	66.5	21
66.5	8.21	92	23
92	7.81	114	27.495007
114	8.32	142	21.498798
142	8.18	164	19.920997
164	8.18	188	13.982404
188	8.18		

Tablo E42. İmmobilize *Rhizopus oryzae*' nin tekrar kullanılabilirliği. (2 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.) (Şekil 7.42)

Zaman (saat)	Laktik Asit (g/L)	Zaman (saat)	Laktik Asit (g/L)
0	0	Devam....	Devam...
48	29,96	382,5	0
48,5	0	428	51,81
95	36	428,5	0
95,5	0	477,5	51,15
141,5	44,4	478	0
142	0	526	51,6
188,5	46,8	526,5	0
189	0	573	49
233	46,29	573,5	0
233,5	0	622	51,6
285	53	622,5	0
285,5	0	670	53,4
333	53,4	670,5	0
333,5	0	718	49,2
382	53,7	718,5	0

Tablo E43. İmmobilize *Rhizopus oryzae*' nin tekrar kullanılabilirliği. (3 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.) (Şekil 7.43)

Zaman (saat)	Laktik Asit (g/L)	Zaman (saat)	Laktik Asit (g/L)
0	0	Devamı...	Devamı...
72	48,69	579	41,31
72,5	0	579,5	0
147,5	51,26	651	44,26
148	0	651,5	0
219,5	50,46	723	41,16
220	0	723,5	0
291	51,3	795	36
291,5	0	795,5	0
362,5	48,54	867	35,7
363	0	867,5	0
434	51,6	939	35,3
434,5	0	939,5	0
506,5	52,3		
507	0		



Tablo E44. İmmobilize *Rhizopus oryzae*' nin tekrar kullanılabilirliği. (4 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.) (şekil 7.44)

Zaman (saat)	Laktik Asit (g/L)
0	0
52,70589	96
55	193,5
55,8	290
53,7	387
56	481,5
52,73537	577
53	675
43,59697	771
43,06914	863,5
41,10525	959

Tablo E45. İmmobilize *Rhizopus oryzae*' nin tekrar kullanılabilirliği. (5 günlük aralıklarla yapılan değiştirmeler.) (şekil 7.45)

Zaman (saat)	Laktik Asit (g/L)
0	0
58,06981	120
50,80929	238,5
51,6	362
49,55302	483
52,8	601,5
50,46967	723,5
42,67004	843,5
27,57247	960

Tablo E46. İmmobilize *Rhizopus oryzae*' nin tekrar kullanılabilirliği. (şekil 7.46)

Gün	2.gün için Laktik Asit (g/L)	3.gün için Laktik Asit (g/L)	4.gün için Laktik Asit (g/L)	5.gün için Laktik Asit (g/L)
0	0	0	0	0
1	29,96096	48,68768	52,70589	58,06981
2	36	51,26092	55	50,80929
3	44,4	50,46322	55,8	51,6
4	46,8	51,3	53,7	49,55302
5	46,2904	48,53653	56	52,8
6	53	51,60217	52,73537	50,46967
7	53,4	52,3	53	42,67004
8	53,7	41,31367	43,59697	27,57247
9	51,81181	44,25749	43,06914	
10	51,1499	41,16052	41,10525	
11	51,59743	36		
12	49	35,7		
13	51,6	35,3		
14	53,4			
15	49,2			



Tablo E47. Biyoreaktörde serbest mikroorganizma ile yapılan deneylerde fermantasyon ortamında zamanla laktik asit miktarının ve pH'nın değişimi. (Şekil 7.47 ve Şekil 7.48)

Zaman (saat)	pH	Laktik Asit (g/L)
0	6	0
17	3,43	1,62275157
29	7,31	1,67946669
40	7,3	2,44758195
49	7	9,19927305
65	6,33	9,10506729
74,5	6,11	17,3904044
88,5	5,3	36,1097045
100	4,6	45,3617324
112	4,34	46,1337898
121	4,22	46,3594016
135	4,2	48,7703532
145	4,16	57,772441
159	4,1	58,356174
187	4,19	65,4251199
216	4,31	102,786754
235	4,3	92,1138246
263	4,31	90,8185571
307	4,31	91,7929235
330	4,33	88,175162
379	4,31	93,2216969
404	4,33	81,8943791
430	4,32	77,7664265

