

**MELASTAN FERMENTASYONLA  
LAKTİK ASİT ÜRETİMİNİN  
OPTİMİZASYONU**

Serkan OBAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temmuz- 2008

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Serkan OBAN'ın “**Melastan Fermentasyonla Laktik Asit Üretiminin Optimizasyonu**” başlıklı Kimya Mühendisliği Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 17.06.2008 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Yard. Doç. Dr. BERRİN BOZAN	.....
Üye	:Prof. Dr. Ö. METE KOÇKAR	.....
Üye	:Yard. Doç. Dr. MÜFİDE BANAR	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **MELASTAN FERMENTASYONLA LAKTİK ASİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

**Serkan OBAN**

**Anadolu Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**DANIŞMAN: Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN**

**2008, 74 sayfa**

Bu çalışmada *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 ile melas kullanılarak laktik asit üretiminin optimizasyonu ve büyüme kinetiği araştırılmıştır. Laktik asit üretimi üzerine ortam pH'ının (5-7) ve maya özütü konsantrasyonunun (25-75g/L) etkilerini incelemek ve bu fermentasyon parametrelerinin optimum seviyelerini belirlemek amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology) kullanılmıştır. Yapılan varyans analizinde, pH ve maya özütü konsantrasyonunu laktik asit üretimi üzerine önemli derecede etkin olduğu görülmüştür. Yapılan deneyler sonucu optimum laktik asit konsantrasyonunun (41,52 g/L); pH, 6 ve 47 g/L maya özütü konsantrasyonunda elde edilebileceği belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum*un büyüme kinetiğini ve sakkaroz kullanımı Monod modeline uygunluğunu incelenmiştir. Altı farklı başlangıç substrat (sakkaroz) konsantrasyonlarıyla (28,16-203,27 g/L) gerçekleştiren kesikli fermentasyonlarda, büyüme kinetiği en düşük (28,16g/L) ve yüksek substrat konsantrasyonları ( $C_s > 80,33$  g/L) haricinde Monod denkliğine uygunluk gösterdiği görülmüştür ( $R^2 > 0,95$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Melas, *Lactobacillus plantarum*, Laktik asit, Fermentasyon

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

### OPTIMIZATION OF LACTIC ACID PRODUCTION FROM BEET MOLASSES

Serkan OBAN

Anadolu University  
Graduate School of Sciences  
Chemical Engineering Program

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berrin BOZAN

2008, 74 pages

This study was performed to determine optimal conditions of pH and concentration of yeast extract for obtaining maximum lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. The response surface methodology was employed to determine the maximum lactic acid concentration at optimum value for the process variables. Lactic acid production was significantly affected by pH and concentration of yeast extract. Lactic acid concentration (41.52 g/L) was obtained at pH and concentration of yeast extract of 6 and 47 g/L. It obtained that acceptability of growth kinetic of *Lactobacillus plantarum* to Monod kinetic model. The biomass growth, sucrose utilisation kinetics of lactic acid production from molasses by *Lactobacillus plantarum* was studied. Batch fermentation experiments were performed at with six different initial molasses sucrose concentrations (28.16-203.27 g dm<sup>-3</sup>). The substrate concentrations are suitable to Monod kinetics model except the lowest substrate concentration and high substrat concentrations ( $C_s > 80.33$  g/L) in which are studied ( $R^2 > 0.95$ ).

**Keywords:** Molasses, *Lactobacillus plantarum*, Lactic acid, Fermentation

## TEŞEKKÜR

Tezimin gerçekleşmesi için gerekli çalışma ortamını sağlayan, çalışmalarım boyunca beni yönlendiren danışmanım değerli hocam Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN'a,

Mikroorganizmanın deneylerimde kullanır hale gelmesinde katkıları bulunan Prof. Dr. Merih KIVANÇ ve Yard. Doç. Dr. Semra MALKOÇ'a,

Bu tezin oluşumunda büyük katkıları olan arkadaşlarım Göksel TOSUN ve Derya ÖZCAN'a,

Analizlerin yapılmasında emeği geçen Ebru TUNA'ya,

Hayatımın her aşamasında sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, maddi ve manevi açıdan yanımda olduklarını her zaman hissettiren sevgili aileme ve Ümran VAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Serkan OBAN

Temmuz-2008

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LAKTİK ASİT</b> .....	<b>3</b>
2.1. Laktik Asitin Kullanım Alanları .....	5
2.2. Laktik Asit Üretim Prosesleri.....	8
2.2.1. Kimyasal yöntemlerle laktik asit üretimi .....	8
2.2.2. Mikrobiyal yöntemle laktik asit üretimi.....	9
2.2.3.Laktik asit üreten mikroorganizmaların reaksiyon mekanizmaları..	10
2.2.4. Laktik asit üretiminde kullanılan besin maddeleri .....	15
2.2.4.1 Karbon kaynakları.....	16
2.2.4.2 Azot kaynakları.....	19
2.2.5. Laktik asit fermentasyonunda uygun çevresel şartların sağlanması .....	21
2.2.5.1 pH.....	21
2.2.5.2 Ozmotik basınç .....	21
2.2.5.3 Sıcaklık .....	22
2.2.5.4 Mikroorganizmayla substratın teması.....	23
2.2.6. Fermentasyon prosesi .....	24
2.2.7. Laktik asitin alt akım prosesleri .....	26
2.2.7.1 Kuvvetli asitle katyon tuzunun çöktürülmesi .....	27

2.2.7.2 Güçlü bazla eş zamanlı laktat tuzu oluşumuyla sıvı-sıvı ekstraksiyonu.....	29
2.2.7.3 Suyla geri ekstraksiyonun izlediği eş zamanlı asitleştirme ve alkolle esterleşme .....	29
2.2.7.4 İleri ayırma yöntemleriyle fermentasyon ortamından geri kazanımı.....	30
<b>3. HÜCRE ÇOĞALMA KİNETİĞİ.....</b>	<b>30</b>
3.1. Hücre Çoğalması.....	30
3.2. Hücre Çoğalma Evreleri.....	32
3.3. Spesifik Büyüme Hızına Etki Eden Faktörler .....	36
3.3.1. Substrat konsantrasyonu.....	36
3.3.2. Ürün konsantrasyonu.....	37
3.3.3. Diğer şartlar .....	37
3.4. Kesikli Fermentasyon.....	37
3.4.1. Monod kinetik parametrelerinin bulunması .....	38
<b>4. OPTİMİZASYON VE CEVAP YÜZEY YÖNTEMİ.....</b>	<b>40</b>
4.1. Süreç Optimizasyonuna Cevap Yüzey Yöntemi Yaklaşımı .....	40
<b>5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>44</b>
5.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar .....	44
5.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	44
5.3. Sterilizasyon .....	45
5.4. Mikroorganizma ve Kültür Şartları.....	46
5.5. Melasa uygulanan Ön İşlemler.....	46
5.6. İnokulum Hazırlama.....	46
5.7. Fermentasyon Şartları .....	47
5.8. Analizler .....	47
5.8.1 Mikroorganizma kuru ağırlık tayini .....	47
5.8.2 Laktik asit konsantrasyon tayini.....	47
5.8.3 Şeker konsantrasyon tayini.....	48
5.9. Deney tasarımı .....	50

<b>6. DENEYSEL BULGULAR .....</b>	<b>51</b>
6.1. pH'ın Laktik Asit Verimi ve Mikroorganizma Konsantrasyonu Üzerine Etkisi.....	51
6.2. Maya Özüğü Konsantrasyonunun Laktik Asit Verimi ve Mikroorganizma Konsantrasyonu Üzerine Etkisi .....	52
6.3. Cevap Yüzey Yöntemi ile Deneysel Tasarım .....	54
6.4. Başlangıç Substrat Konsantrasyonun Etkisi.....	59
6.5. Büyüme Kinetiğinin Monod Kinetik Modeline Uygunluğunun İncelenmesi .....	61
<b>7. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER .....</b>	<b>70</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Laktik asitin D(-) ve L(+) şekilleri.....	4
2.2. Laktik asit üretim prosesleri.....	8
2.3. Fermentasyon prosesinin şematik gösterimi .....	11
2.4. LA bakterisinde katabolik yolu.....	13
2.5. Endüstriyel laktik asit üretim şeması .....	28
3.1. Mikroorganizmaların büyüme eğrisi.....	33
3.2. Karıştırmalı kesikli fermentör.....	37
3.3. Monod bağıntısına göre limitleyen hammaddeye karşın spesifik büyümesi .....	39
5.1. Deneylein gerçekleştirildiği sistem.....	46
5.2. Kesikli fermentasyon sisteminin şematik gösterimi .....	46
5.3. Mikroorganizma kuru ağırlığı kalibrasyon doğrusu .....	47
5.4. Melas çözeltisinde laktik asitin 210 nm de YBSK kromatogramı.....	48
5.5. Laktik asit kalibrasyon doğrusu .....	48
5.6. Melas çözeltisinde sakkarozun RID da YBSK kromatogramı.....	49
5.7. Sakkaroz kalibrasyon doğrusu .....	49
6.1. pH'ın zamanla kuru ağırlık değişimi üzerine etkisi.....	51
6.2. pH'ın zamanla laktik asit konsantrasyonu değişimi üzerine etkisi .....	52
6.3. Maya özütünün zamanla kuru ağırlık değişimi üzerine etkisi .....	52
6.4. Maya özütünün zamanla laktik asit konsantrasyonu değişimi .....	53
6.5. Deneysel değerlere karşın model değerleri arasındaki doğrusal ilişki.....	57
6.6. Farklı pH ve maya özütü konsantrasyonlarındaki laktik asit üretime ait yüzey grafiği.....	57
6.7. Farklı pH ve maya özütü konsantrasyonlarındaki laktik asit üretime ait kontur grafiği.....	58
6.8. Farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarında mikroorganizmanın zamanla kuru ağırlık değişimi.....	59
6.9. Fermentasyon süresince artakalan şeker miktarı .....	60
6.10. Fermentasyon süresince laktik asit konsantrasyonunun değişimi.....	60

6.11. Başlangıç sakkaroz konsantrasyonun laktik asit konsantrasyonu ve hücre yoğunluğuna etkisi .....	60
6.12. $C_{so}=113,37$ g/L için eksponansiyel evresi .....	61
6.13. Monod bağıntısına göre limitleyen substrata karşın spesifik büyüme hızı .....	62
6.14. $C_{so}=28,16$ g/L için hücre büyümesi .....	64
6.15. $C_{so}=48,52$ g/L için hücre büyümesi .....	64
6.16. $C_{so}=72,03$ g/L için hücre büyümesi .....	64
6.17. $C_{so}=80,33$ g/L için hücre büyümesi .....	65
6.18. $C_{so}=113,36$ g/L için hücre büyümesi .....	65
6.19. $C_{so}=203,27$ g/L için hücre büyümesi .....	65
6.20. $C_{so}=28,16$ g/L için sakkaroz tüketimi .....	66
6.21. $C_{so}=48,52$ g/L de sakkaroz tüketimi .....	66
6.22. $C_{so}=72,03$ g/L için sakkaroz tüketimi .....	66
6.23. $C_{so}=80,33$ g/L için sakkaroz tüketimi .....	67
6.24. $C_{so}=113,36$ g/L için sakkaroz tüketimi .....	67
6.25. $C_{so}=203,27$ g/L için sakkaroz tüketimi .....	67
6.26. Hücre büyümesinde deneysel değerlere karşı modelin önerdiği değerler arasındaki doğrusal ilişki .....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Ticari laktik asit çeşitleri ve kullanım alanları .....	7
2.2. Laktik asit isomerleri üreten bazı <i>Lactobacillus</i> türleri .....	12
2.3. Melasın kompozisyonu ve besin içeriği .....	17
2.4. Melastan rapor edilen kesikli laktik asit fermentasyonları .....	17
2.5. Bazı mikroorganizmaların kullandıkları hammaddeler ve laktik asit verimleri .....	18
2.6. Laktik asit üretimine pH etkisi .....	22
2.7. Bazı mikroorganizmaların sıcaklık değişiminin Laktik asit verimi üzerine etkisi .....	23
2.8. Farklı fermentasyon uygulamaları için biyoteknolojik Laktik asit üretiminde literatürde rapor edilen son araştırmalar .....	24
3.1. Hücre kinetiği modelleri .....	30
5.1. İncelenen parametreler ve seviyeleri.....	50
5.2. Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu .....	50
6.1. <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014 ile laktik asit üretiminde elde edilen deneysel değerler.....	54
6.2. İkinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.....	55
6.3. Laktik asit tahmin edilen regresyon katsayıları .....	55
6.4. İkinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.....	55
6.5. Laktik asit (g/L) için tahmin edilen regresyon katsayıları .....	56
6.6. Deneylelerden elde edilen cevapların modelden elde edilen cevaplarla karşılaştırılması .....	56
6.7. Başlangıç substratlarına göre hesaplanan spesifik büyüme hızları ve $Y_x/s$ ... 62	
6.8. Polymath Yazılımı .....	63
6.9. Farklı başlangıç konsantrasyonlarında hücre yoğunlukları için elde edilen deneysel değerlere karşı model değerlerin karşılaştırılması.....	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozin trifosfat
BP	: Bifosfat
CAPD	: Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
C <sub>po</sub>	: Başlangıç ürün konsantrasyonu (g L <sup>-1</sup> )
C <sub>p</sub>	: Ürün konsantrasyonu (g L <sup>-1</sup> )
C <sub>so</sub>	: Başlangıç substrat konsantrasyonu (g L <sup>-1</sup> )
C <sub>s</sub>	: Substrat konsantrasyonu (g L <sup>-1</sup> )
C <sub>xo</sub>	: Başlangıç biyokütle konsantrasyonu (g kuru ağırlık L <sup>-1</sup> )
C <sub>x</sub>	: Biyokütle konsantrasyonu (g kuru ağırlık L <sup>-1</sup> )
CYY	: Cevap yüzey yöntemi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EHF	: Eşanlı hidroliz ve fermentasyon
K <sub>s</sub>	: Sistem katsayısı veya Monod sabiti (g L <sup>-1</sup> )
μ <sub>max</sub>	: Maksimum spesifik büyüme hızı (h <sup>-1</sup> )
μ	: Spesifik büyüme hızı (h <sup>-1</sup> )
LA	: Laktik asit
LAB	: Laktik asit bakterileri
Lb	: Lactobasillus
Lc	: Lactococcus
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MİBK	: Metil İzobütil Keton
MRS	: De Man,Rogosa ve Sharpe
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
PLA	: Polilaktik asit
PDH	: Pirüvat dehidrojenaz
RNA	: Ribonükleik asit
t	: Zaman (saat)
YBSK	: Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
Y <sub>x/s</sub>	: Tüketilen substrat başına biyokütle verimi (g biyokütle g <sup>-1</sup> sakkaroz)

## 1. GİRİŞ

Laktik asit çok amaçlı kullanılan bir kimyasaldır. Başlıca kullanım alanları asitlendirici, tatlandırıcı ve koruyucu madde olarak gıda, tekstil, deri endüstrisinde ve indirgenabilir polilaktik asit polimerizasyonu için hammaddedir. Laktik asitin L(+) ve D(-) iki izomeri vardır.

Dünya genelinde yaklaşık %90'nı fermentasyon yoluyla, diğer kalan kısım laktonitrilin hidroliz yoluyla sentetik olarak üretilir. Fermentasyonla laktik asit üretimiyle tek izomer üretilirken sentetik üretimle her zaman rasemik karışım elde edilmektedir.

Günümüzde laktik asit için başlıca pazarı besinle ilgili endüstrilerdir. Ancak PLA polimeri için görünen pazarlar, laktik asit tüketiminin büyümesinde önemli bir artış olacağı düşünülmektedir. Dünyada; Purac (Hollanda), Galactic (Belçika), Cargill (ABD) ve çeşitli Çin şirketlerini içeren bazı büyük mikrobiyal yöntemle laktik asit üreticileri vardır.

2006 yılı dünya çapındaki laktik asit tüketiminin yılda 130000-150000 ton olduğu belirtmiştir. Besin düzenleyici laktik asidin ticari ücretleri 1.38 \$/kg (%50 saflık için) ve 1.54 \$/kg (%88 saflık için) arasında değişmektedir. Endüstriyel bir skalada laktik asit üretim maliyetinin 0.8\$/kg'ın altında olması ve PLA'nın satış ücreti kabaca bugünkü 2.2 \$/kg ücretinin yarısına indirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir ( Wee ve ark. 2006). Endüstriyel boyutta laktik asit üretiminin çok önceleri yapılmasına rağmen bu talepler sayesinde hala pek çok araştırmanın odağında bulunmaktadır. Bu araştırmalar yüksek performanslı laktik asit üreten mikroorganizmaların geliştirilmesi, fermentasyon proseslerinin maliyetini azaltılması ve daha ucuz hammadde bulunması üzerine yoğunlaşmıştır.

Laktik asit üretimi için; nişastalı ve selülozlu malzemeler, peynir altı suyu ve melas gibi ucuz hammaddeler kullanılmaktadır.

Melas şeker üreten proseslerin bir atık ürünüdür ve genellikle fazla miktarda sakkaroz içerir. Fermentasyon için kullanılan hammaddeler içinde en ucuz sakkaroz kaynağıdır. Hayvan yemi olarak, etanol ve maya üretiminde kullanılır. Önemli bir karbonhidrat kaynağı olması yanında azot, inorganik

bileşikler ve vitaminler açısından da iyi ve ucuz bir besiyeridir (Ertugay ve Certel, 1995).

Türkiye şeker fabrikaları 2007 yılı faaliyet raporunda; alkol üretimi için 21.333 ton melas işlenmiş ayrıca, maya ve yem sanayi dahil her türlü sanayiye (çiftçi ve besiciler dahil) toplam 248.973 ton melas satışı yapılmıştır. 31.12.2007 tarihi itibarıyla satılabilir stok miktarları 126.285 tondur ve Ortalama fiyatı 230 YTL/ton'dur (Anonim, 2007).

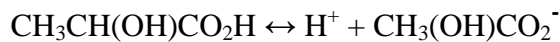
Bu çalışmada şeker üretiminden elde edilen ticari melastan *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 mikroorganizması kullanılarak pH ve maya özütü konsantrasyonunun laktik asit verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca başlangıç substrat (sakkaroz cinsinden) konsantrasyonunu laktik asit verimi ve mikroorganizma büyüme kinetiği üzerine etkisi belirlenmiş ve mikroorganizma büyüme kinetiği Monod kinetik modeline uygulanmıştır.

## 2. LAKTİK ASİT

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

Laktik asit, Amerika Birleşik Devletleri'nde uzun yıllar ticari amaçlarla üretilmiştir. İlk olarak Charles E.Avery, Littleton ve Massachuttes'te 1881 yılında kabartma tozundaki krem tartarın yerine kalsiyum laktat kullanılabilmesi için kalsiyum laktat elde edebilmek amacıyla üretilmiştir. Ancak bu ilk deneme başarısızlıkla sonuçlanmış ve deri, tekstil, gıda ve çözücü maddelerin üretimi gibi endüstriyel uygulamaların başlaması oldukça sonralara kalmıştır. Laktik asit üretimi Avrupa'da gelişmiş ve ABD laktik asidi uzun süre Almanya'dan ithal etmiştir. Ancak ham asidin saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar II.Dünya Savaşı'ndan önce bu ithalatı durdurmuştur (Undercofler ve Hickey, 1954).

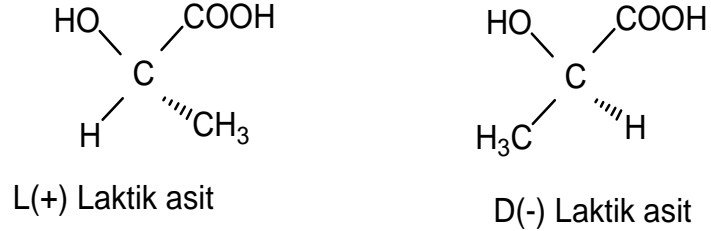
Laktik asit veya  $\infty$ -hidroksi propiyonik asit, doğada sıklıkla rastlanan zayıf bir asittir ve suda çözüldüğünde laktat ve  $H^+$  iyonları verir. Bu bir tersinir reaksiyondur ve bu denge aşağıda gösterilmiştir.



Laktik asit renksiz, çok az sarıya çalan şurupsu bir sıvıdır. Özgül ağırlığı 25 °C'de 1,294'tür. Su, alkol ve eterde tamamen çözünürken, kloroformda

çözünmez. Yüksek konsantrasyona sahip çözeltilerde higroskopiktir. demirklorürle  $\infty$ -hidroksi asite özgü karakteristik yeşil-sarı rengi verir.

Laktik asit asimetrik bir karbon atomu içerir ve iki formda bulunur ( Şekil 2.1). Bunlar: D(-) ve L(+) formlarıdır.



**Şekil 2.1.** Laktik asitin D(-) ve L(+) şekilleri (Undercofler ve Hickey, 1954)

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

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

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



kolaylıkla çözünürler. Laktid suyla uzun süre kaynatıldığında veya bir alkaliyle hızlı bir şekilde kaynatıldığında laktik aside hidrolizlenir (Kristiansen ve Radledge, 2001).

## **2.1. Laktik Asitin Kullanım Alanları**

Birçok uygulama alanına sahip bir kimyasal olan laktik asidin endüstride önemli bir yeri vardır. Laktik asidin şu anki kullanımı ve uygulama alanları dört temel sınıfa ayrılır;

- Gıda
- Kozmetik
- İlaç
- Kimyasal uygulamalar

Gıda katkı maddesi olarak laktik asit, tatlandırıcı, pH ayarlayıcı, mikrobiyal niteliği geliştirici ve mineral takviyesi olarak gıda endüstrisinin birçok alanında geniş olarak kullanılır. Ayrıca laktik asit; ürünlerin raf ömrünü uzatmak, tadını fazlalaştırmak ve gıdada açığa çıkan hastalıklara neden olan patojenleri daha iyi kontrol edebilmek için ticari olarak endüstride et proseslerinde kullanılır. Laktik asit hafif tadından dolayı salatalarda ve soslarında, pişmiş gıdalarda, salamura bitkilerde ve meşrubatlarda kullanılır. Gıda endüstrisinde laktik asidin bir diğer kullanım alanı da gıda ürünlerinde mineral takviyesi olarak kullanılmasıdır. Dahası laktik asit ticari olarak, kümes hayvanları eti ve işlenmiş et endüstrilerinde raf ömrü arttırılmış, lezzeti arttırılmış ve besinde oluşan patojenleri daha iyi kontrollü ürünler sağlamak için kullanılmaktadır. Şekerlemecilikte laktik asit sadece tatlandırıcı olarak değil, ayrıca pişirilmiş karışımın pH'sını, düzenlemek ve doğru noktaya getirmek için de kullanılır. Şekerlemecilikte laktik asit kullanımının avantajları; düşük tersine çevirme hızı, kullanım kolaylığı, şeffaf şekerler üretebilme yeteneğini içerir (Wee ve ark., 2006).

Laktik asit kozmetik uygulamalarında doğal katkı maddesi özelliği gösterir. Öncelikli olarak nemlendirici ve pH düzenleyici olmasına rağmen, antimikrobik aktivitelerde, derinin temizlenmesinde ve derinin sulandırılmasında

da kullanılır. Nemlendirici etki doğrudan laktik asidin su tutma kapasitesine bağlıdır ve laktik asidin cilt parlatici etkisi tirozinaz oluşumunu önlemesiyle oluşturulur. İnsan bedeninin doğal bileşenleri olduğundan, laktik asit ve onun tuzu, doğal ve daha güvenli formüllerden yana olan modern eğilimlere kusursuzca uyur ve onları kozmetikte çok faydalı aktif maddeler yapan cilt parlatici ve yeniden gençleştirme gibi etkileri üretir (Wee ve ark., 2006).

Laktik asit, elektrolitleri veya vücut sıvılarını tamamlamada yardımcı olan birçok parenteral/I.V. (damar yolu) çözeltilerinde bir elektrolit olarak kullanılır. Örnek olarak, 'Lactated Ringer'in veya 'Hartmann'in çözeltileri, CAPD (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) çözeltileri ve geleneksel yapay böbrek makineleri için dializ çözeltileri verilebilir. Ek olarak laktik asit; tablet, protez, cerrahi dikiş ve uyuşturucu kontrol eden sistemler gibi birçok alanda mineral hazırlanmasında kullanılır.

Laktik asit ve tuzu, birçok çeşitli kimyasal ürünlerde ve proseslerinde kullanılır. Bu uygulama alanlarında laktik asit; kireç giderme maddesi, pH düzenleyici, nötrleştirici, temizleme maddesi, metal karıştırıcı madde, antimikrobik madde olarak çeşitli fonksiyonlar gösterir. Doğal laktik asit mekanik olarak birçok temizleme alanlarında kullanılır. Çözülebilir özelliği ve çözücü gücü nedeniyle laktik asit, polimeri ve reçineleri uzaklaştırıcı olarak da kullanılır. Ayrıca yaygın organik kireç temizleyicilerinden daha iyi olduğundan banyo, tuvalet ve kahve makineleri temizlenmesinde kullanılır. Etilaktat, polimerik boyalara ve yağlara karşı güçlü bir çözücü olduğundan ayrıca çevreye zarar vermeyip, zehirli de olmadığından birçok akne gideren uygulamalarda da kullanılmaktadır. Laktik asit yüksek çözücülük ve çözünürlüğünden dolayı mükemmel bir polimer ve reçine taşıyıcıdır. %98'den daha büyük bir izomerik saflıkla elde edilebilir ve herbisid ya da ilaç üretiminde uygun bir başlangıç maddesi olmak için uygundur.

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

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

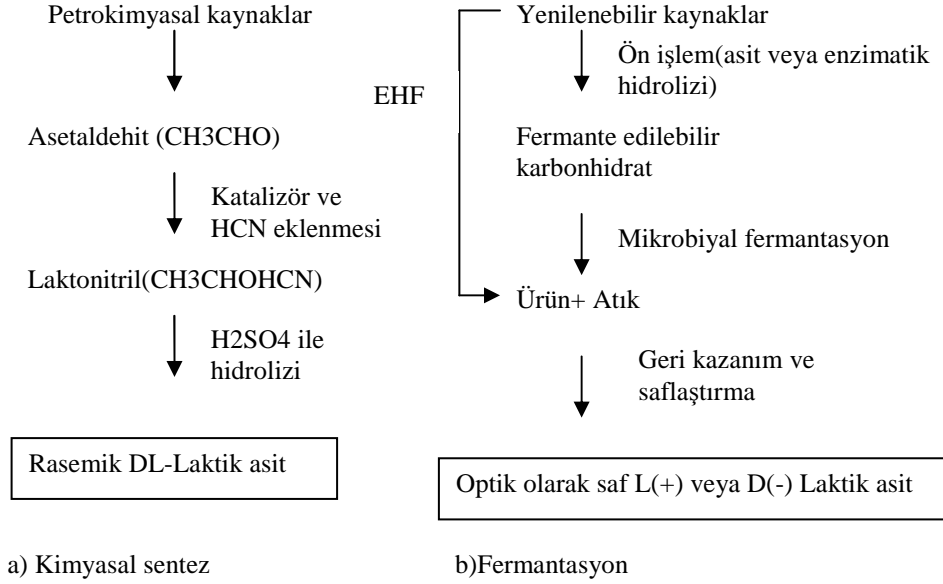
Ticari laktik asit çeşitleri ve kullanım alanları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Ticari laktik asit çeşitleri ve kullanım alanları (Kristiansen ve Radledge, 2001)

Sınıf	Özellik	Uygulama
Teknik	Açık kahverengi Demir yok %20–80 laktik asit	Kireç giderimi Tekstil endüstrisi Ester üretimi
Gıda	Renksiz Kokusuz >% 80 laktik asit	Gıda katkı maddesi hamur üretimi Asitlendirici
Tıp	Renksiz, kokusuz >%90 laktik asit <%0,1 kül	Ameliyat iplikleri Hijyenik preparatlar Metal iyonu laktatlar
Plastik	Renksiz <%0,01 kül	İndirgenabilir polimer Vernik

## 2.2. Laktik Asit Üretim Prosesleri

Laktik asit sentetik ve mikrobiyal olmak üzere iki şekilde üretilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Laktik asitin üretim prosesleri (Wee ve ark., 2006)

### 2.2.1. Kimyasal yöntemlerle laktik asit üretimi

Yapılan araştırmalar sonucunda, laktik asidin kimyasal reaksiyonlarla elde edilebileceği görülmüştür. Fakat bunlardan çok azı endüstriye uygulanabilmiştir. Bu reaksiyonlar altı kategoride sınıflandırılabilir ;

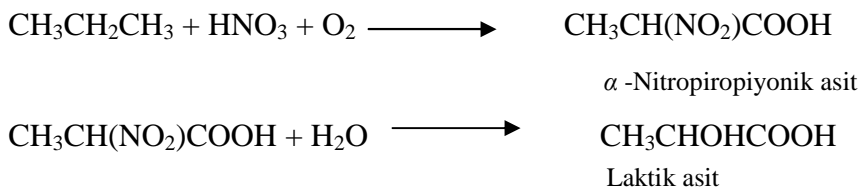
- Laktik asit türevlerinin hidrolizi (örneğin; esterler ve nitriller)
- Propiyonik asitin hidrolizi
- 2-metilmalonik asit türevlerinin dekarboksilasyonu
- İndirgeme
- Oksitlenme
- Tekrar düzenleme ve disproporsiyon

Uygun işleme laktik asit çoğu türevinden ayrılabilir; fakat laktik asit bu türevler için ham madde olduğundan, pratik avantajı yoktur. Laktonitril ve laktik asit nitrat, laktik asitten üretilmediği için önemli istisnalardır. Laktonitril;

akrilonitril üretiminde bir ara bileşik olarak asetaldehit ve hidrojen siyanürden üretilir.

Reaksiyona girmemiş veya atık laktonitril, bir ham madde olarak kullanılabilir. Monsanto Kimya Şirketi 1963'te, Amerika'da teknik boyutta laktik asit (%55-85 w/w) üreten ilk ticari tesisi kurmuştur (Vaidya ve ark., 2005).

Başka bir yolla propen; oksijen varlığında nitrik asitle  $\alpha$ -nitropropiyonik aside dönüştürülür.  $\alpha$ -Nitropropiyonik asit, laktik aside hidrolize edilir. İlgili reaksiyonlar şöyle gösterilebilir:



### 2.2.2. Mikrobiyal yöntemle laktik asit üretimi

Fermentasyon; bir maddenin dönüştürülmesi ve yeni maddelerin oluşturulmasında, mikroorganizmaların biyokimyasal reaksiyonlarından faydalanma tekniğidir. Fermentasyon prosesinin akım şeması aşağıda Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

Yaygın anlamda fermentasyon; oksijensiz ortamda yüksek moleküllü organik bileşiklerin (özellikle karbonhidratların) mikroorganizmalar tarafından daha küçük molekül yapısına sahip bileşiklere parçalanması işlemi olarak da bilinmektedir (Ertugay ve Certel, 1995).

Genel olarak, aşağıdaki kriterlerin sağlanabilmesi için fermentasyon ortamına besleyici kaynaklar sağlanmalıdır.

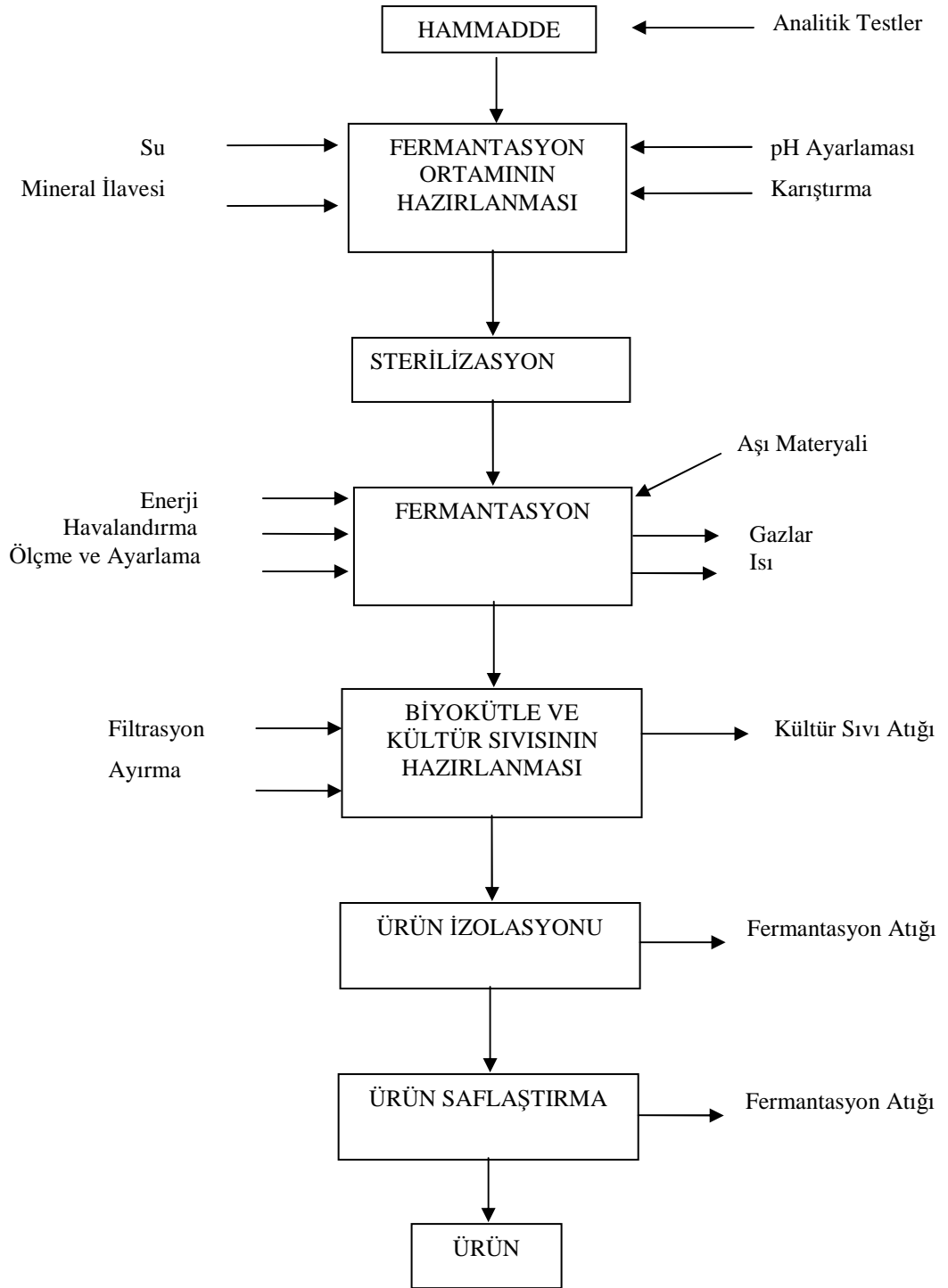
- 1- Kullanılan her gram substrat başına maksimum konsantrasyonun sağlanması,
- 2- Ürün veya biyokütle olarak maksimum konsantrasyonun sağlanması,
- 3- Maksimum ürün fermentasyonunun gerçekleştirilmesi,
- 4- İstenmeyen ürünlerden minimum düzeyde oluşması,
- 5- Belli bir kalitesinin olması ve yıl içinde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

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

### **2.2.3. Laktik asit üreten mikroorganizmalar ve reaksiyon mekanizmaları**

Laktik asit üreten mikroorganizmalar bakteri ve mantar olmak üzere iki gruptur.

Laktik asitin mikrobiyal yolla üretimi laktik asit bakterileriyle yapılmış olmasına rağmen, son yıllarda *Rhizopus* gibi ipliksi mantarlar da laktik asit üretmek için kullanılmaktadır. *R.oryzae* ve *R.arrhius* gibi *Rhizopus* türleri, nişastayı doğrudan L(+) laktik aside dönüştürmesini sağlayan amilolitik enzim aktivitesine sahiptir. Mantar fermentasyonunun; *R.oryzae*' nin sadece basit bir besi ortamı istemesinden ve L(+) laktik asit üretmesinden dolayı bazı avantajları vardır, bunun yanında *R. oryzae* kuvvetli havalandırmaya ihtiyaç duyar; çünkü zorunlu bir aerobtur. Mantar fermentasyonundan elde edilen daha düşük ürün verimi, kısmen fumarik asit ve etanol gibi yan ürünlerin oluşumuyla ilgilidir. Mantar fermentasyonunda daha yüksek hücre yoğunluğu, laktik asit kazancı ve verimlilik elde etmek için bazı denemeler yapılmıştır. Glikoz ve nişastadan laktik asit üretmek için *R. oryzae* hücrelerini ipliksi bir zeminde hereketsizleştirmişlerdir. Mantar fermentasyonu ile laktik asit üretmek için çalışmalar sürmesine rağmen, mantar fermentasyonunun daha bazı dezavantajlarından dolayı laktik asit üretimi için yaygın olarak LAB kullanılmaktadır (Wee ve ark., 2006).



Şekil 2.3. Fermentasyon prosesinin şematik gösterimi (Telefoncu, 1996)

Laktik asit bakterileri (LAB); şekilleri, gram boyaya verdikleri tepkileri, oksijen ihtiyaçları ve sakkaritleri kullanabilme kabiliyetlerine göre gruplara ayrılmıştır. Bu gruplar; *Carnobacterium*, *Enterococius(Ent)*, *Lactobicullus(Lb)*,

*Lactococcus(Lc)*, *Leuconostoc(Leu)*, *Oenococcus*, *Pediococcus(Ped)*, *Streptococcus(Str)*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır (Carr ve ark, 2002). Laktik asit izomerleri üreten bazı *Lactobacillus* türleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

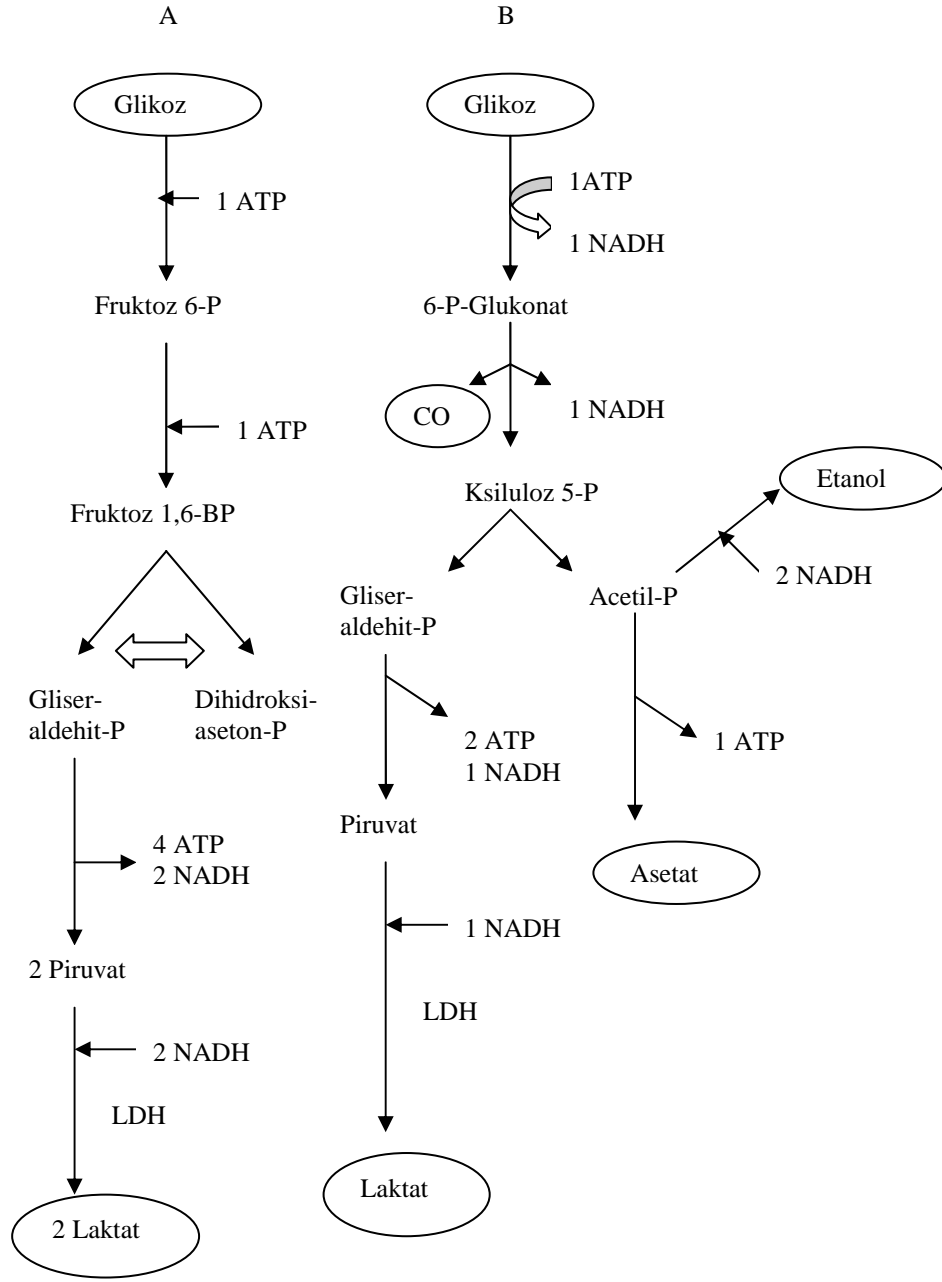
LAB karbonhidrat fermentasyonunda izlediği farklı metabolik yollar Şekil 2.4' deki gibidir. Bu izlenen yollara bağlı olarak homo- ve heterofermentasyonlar gerçekleşmektedir. Homofermentasyon; glukoz fermentasyonunda Embden-Meyerhof-Parnas yolu izlenerek son ürün olarak sadece laktik asit oluşur. Heterofermentasyon fosfoketolaz yolu izlenerek LA, etanol, karbondioksit ve asetat oluşmaktadır (Hofvendahl ve Hagerdal. 2000)

**Çizelge 2.2.** Laktik asit izomerlerini üreten bazı *Lactobacillus* türleri (Aljundi, 2001)

L (+) laktik asit üretenler	D(-) laktik asit üretenler
<i>Lb.rhamnosus</i>	<i>Lb. coryniformis</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. bulgaris</i>
<i>Lb. bavaricus</i>	<i>Lb. jenseii</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. lactis</i>
<i>Lb. maltaromicus</i>	

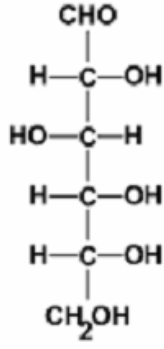
Homofermentatif veya gerçek laktik asit bakterileri olarak adlandırılan bakteriler laktik asit üretimini oldukça mükemmel bir şekilde gerçekleştirirler. Bu yüzden de bu organizmalar tarafından gerçekleştirilen laktik asit üretimi için kimyasal reaksiyon denklemi oldukça basit bir şekilde verilebilir.





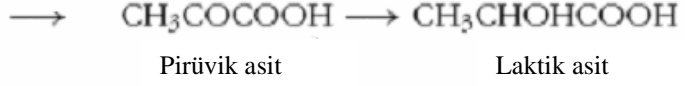
**Şekil 2.4.** LA bakterisinde katabolik yol (A)homofermentasyon, (B)heterofermentasyon, P= fosfat BP=bifosfat LDH=laktat dehidrojenaz PDH=piruvat dehidrojenaz (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000)

Fermentatif laktik asit üretimi hakkındaki literatürün incelenmesi; başlangıç malzemesi ne olursa olsun dekstrozdaki pruvik asit yoluyla sonuçta laktik asit üretildiğini göstermektedir. Dekstrozdaki laktik asitin mikrobiyal reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir;



Dekstroz

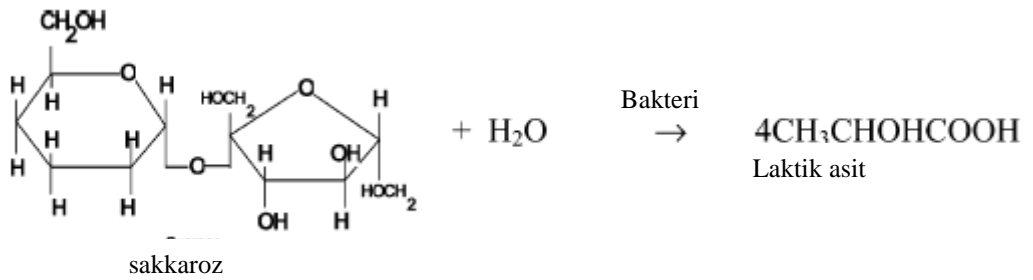
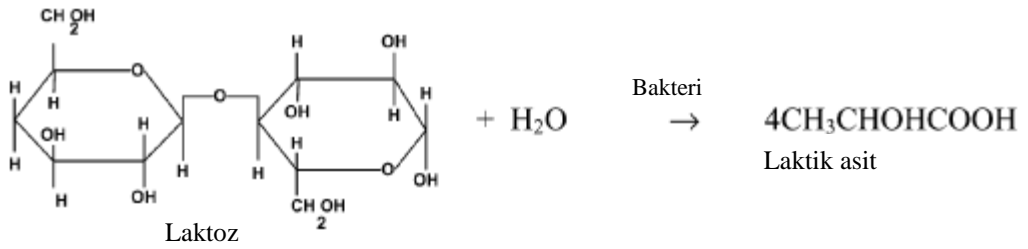
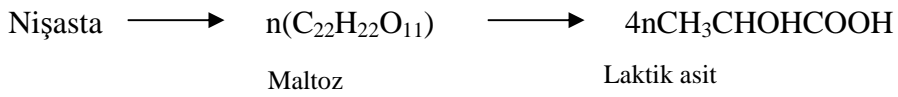
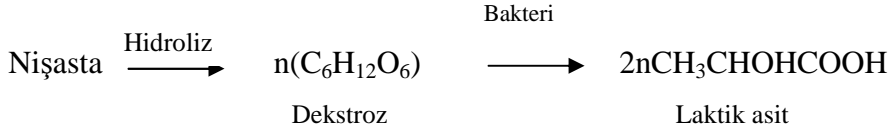
Bakteri



Pirüvik asit

Laktik asit

Laktik asit üretimi için çeşitli fermentasyon reaksiyonları aşağıdaki gibi özetlenebilir:



Günümüzde nişastanın fermentasyonundan laktik asit üretimi ticari amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. Günlük atıklar laktoz ve şeker içerir ve içecek endüstrisinin atıkları sakkaroz içerir. Bu nedenle, eğer fermentasyon prosesleri sakkaroz ya da laktozdan laktik asit üretmek için geliştirilirse, bu

bileşikleri içeren atıkların bir hammadde kaynağı olarak kullanılması gerçekleştirilebilir (Vaidya ve ark., 2005).

#### **2.2.4. Laktik asit üretiminde kullanılan besin maddeleri**

Laktik asidin biyoteknolojik üretiminin uygulanabilir olması için ucuz hammaddeler gereklidir; çünkü polimer üreticileri ve diğer endüstriyel kullanıcılar genellikle oldukça düşük maliyetli ve büyük miktarlarda laktik asit isterler. Üretim için rafine edilmiş maddeler kullanıldığında ürün saflaştırma maliyetleri önemli ölçüde azalır. Fakat bu hala ekonomik olarak elverişsizdir; çünkü rafine edilmiş karbonhidratlar o kadar pahalıdır ki sonuçta daha yüksek üretim maliyetiyle sonuçlanırlar. Bu nedenle laktik asidin ekonomik üretimi için ucuz hammadde ortaya koymak amacıyla birçok girişimde bulunulmuştur (Wee ve ark., 2006).

Besiyeri seçiminde dikkat edilmesi gerekenler:

- Düşük maliyet
- Düşük seviyeli kontaminasyon
- Yüksek fermentasyon hızı
- Yan ürün oluşmaması
- Fermente edilebilir olması (ön işlem olmaması veya çok az zahmetsiz ve maliyeti düşük olması)
- Yenilenebilir olması (Aljundi, 2001)

Bir besiyeri seçilmesinde incelenen parametreler:

- Karbon kaynakları
- Azot kaynakları
- İnorganik bileşikler
- Vitaminler
- Diğer katkı maddeleri

Bu maddelerden inorganik madde, vitamin ve diğer katkı maddeeri çok az miktarlarda ilave edildiğinden besiyeri seçimi özellikle karbon kaynağına göre belirlenir (Brown ve ark., 1987).

#### 2.2.4.1 Karbon kaynakları

Glikoz, galaktoz, maltoz, laktoz, fruktoz, sakkaroz, rafinoz, ksiloz vb. gibi sakkaritlerdir.

Laktik asit bakterilerinden laktik asidin fermentatif yolla üretiminde birkaç farklı hammadde vardır. Saf şeker fermente edildiğinde en saf ürün en az saflaştırma maliyetiyle elde edilir. Fakat saf şeker pahalı ve laktik asit ucuz bir ürün olduğundan, ekonomik değildir. Bunun yerine tarım artıkları ve ormancılık ürünleri kullanılır (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000).

**Peynir altı suyu :** Peynir altı suyu fermentatif laktik asit üretiminde çok kullanılan bir substrattır. Bu hammadde süt ve süt ürünleri endüstrisinin temel yan ürünüdür ve laktoz, protein, yağ ve mineral tuzlar içerir. Peynir altı suyu laktozunun tam kullanımı için onu ek bir azot kaynağı ile tamamlamak gereklidir (Wee ve ark., 2006).

Hidroliz edildiğinde glukoz ve galaktoz oluşur. Peynir altı suyundan laktik asit üretiminde en çok kullanılan tür *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgarius*'tur ama pek çok çalışmada *Lactobacillus helveticus* veya *Lactobacillus casei* de kullanılmıştır (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000).

**Melas :** Melas şeker üreten proseslerin bir atık ürünüdür ve genellikle fazla miktarda sakkaroz içerir (Wee ve ark., 2006).

Hayvan yemi olarak, etanol ve maya üretiminde kullanılır. Önemli bir karbonhidrat kaynağı olması yanında azot, inorganik bileşikler ve vitaminler açısından da iyi ve ucuz bir besiyeridir (Ertugay ve Certel, 1995).

Tüm melas tipleri yüksek oranlarda toplam şeker ve ya karbohidratlar içerirler ve bu bileşikler melasın besleme değerinin önemli bölümünü oluştururlar. Şeker fabrikaları ekstre edilen sakkaroz miktarını kontrol edebilirler ve bu yüzden, farklı ülkelerde üretilen melasların şeker içeriği kullanılan teknolojiye bağlı olarak değişmektedir. Şeker pancarı ve şeker kamışından elde edilen melas kompozisyonuna ait bir örnek Çizelge 2.3' de verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Melasın kompozisyonu ve besin içeriği (Curtin, 1983)

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

Son yıllarda melasla yapılan kesikli fermentasyon çalışmalarını Çizelge 2.4’de derlemiştir (Wee ve ark., 2006).

**Çizelge 2.4.** Melasdan rapor edilen kesikli laktik asit fermentasyonları (Wee ve ark., 2006).

Kullanılan mikorganizma	Laktik asit (g/L)	Laktik asit verimi (%)	Üretkenlik (g/L’sa)	Referans
<i>Lb.delbrueckii</i> IFO 3202	60,3	95,4	3,4	Göksungur ve Güvenç, 1997
<i>Lb.delbrueckii</i> NCIMB 8130	90	97,9	3,8	Kotzamanidis ve ark., 2002
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	65,1	98	4,3	Wee ve ark., 2004
<i>Lb.delbrueckii</i> CECT 286	45,1	87,8	2,7	Monteagudo ve ark., 1994
<i>Lb.delbrueckii</i> NRLL B445	16,6	83	0,08	Aksu ve Kutsal, 1986

**Nişasta** : Bir başka substrat ise nişastadır. Nişasta glikoz ve maltozda hidrolize edilir. Buğday, mısır, patates, pirinç, çavdar, sorgum ve arpadan laktik asit üretiminde nişasta kullanılır. Nişasta büyük sakkarit olduğu için fermentasyon öncesi hidroliz edilmesi gerekir. Ama amilaz enzimine sahip olan organizmalarla, örneğin; *Lb. fermentum* *Lb. amylovorus* veya *Lb. amylophilus* ile direk fermente edilir. Nişastadan laktik asit üreten bakteriler *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus helveticus*'tur (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000).

**Selülozik maddeler** : Selülozik maddeler de laktik asit üretiminde nişastayla aynı yöntemlerle kullanılır. Heksoz, glikoz, galaktoz, mannoz ile pentoz, ksiloz ve arabinoz içerir ve kullanılmadan önce monomerlerine hidroliz edilmelidir. Selülozun hammaddeleri kağıt, bitki materyalleri ve odundur. Ayrıca literatürde kaba yonca lifi, buğday kepeği, mısır sapı ve buğday samanı gibi tarımsal atıklardan laktik asit üretiminde kullanıldığı görölmüştür (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000).

Son yıllarda nişasta ve selülozik maddelerle yapılan kesikli fermentasyon çalışmalarını Çizelge 2.5'de derlemiştir (Wee ve ark., 2004).

**Çizelge 2.5.** Bazı mikroorganizmaların kullandıkları hammaddeler ve laktikasit verimleri (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000)

Substrat	Organizma	Laktik asit (g/L)
Çavdar	<i>Lactobacillus paracasei</i> No.8	84,5
Tatlı sorgum	<i>Lactobacillus paracasei</i> No.8	81,5
Buğday	<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 19435	106
	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	102
Mısır	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	63,5
	<i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33620	10,1
Manyok	<i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33620	4,8
Kağıt atıkları	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL B-445	49,1

#### 2.2.4.2 Azot kaynakları

Laktik asit bakterileri protein biyosentez kapasiteleri sınırlı olduğundan kompleks azot kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Azot kaynakları; aminoasitler, pürinler, primidinler ve üredir. Ortam kompozisyonu, çeşitli konsantrasyonlarda eklenen besin gibi, birçok açıdan incelenebilir. Besin eklenmesi ya da yüksek konsantrasyonu genellikle laktik asit üretimine pozitif etki yapar. Maya, pepton ve et içeren MRS ortamı, maya için uygundur. Maya tek başına, peptonla beraber az miktarda kullanıldığından daha yüksek laktik asit üretir, ama bu maya konsantrasyonu sabit tutulup pepton sürekli eklendiğinde geçerli değildir (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000).

Endüstride kullanılan azot kaynakları;

- Çeşitli tohumların küspe, ırmık ve unları, pamuk çekirdeği, yer fıstığı, bezelye, nohut ve benzeri baklagiller, soya fasulyesi, keten tohumu ve haşhaş tohumu
- Mısır şurubu ve kurutulmuş tozu
- Mısır gluteni
- Maya ekstratı
- Protein ekstrat ve hidrolizatları (kazein, laktalbumin, laktoglobulin, baklagiller, et proteinleri) (Ertugay ve Certel, 1995).

Hızlı laktik asit üretimi için besi ortamını yeterli besinlerle takviye etmek gereklidir. Laktik asit üretimi için en yaygın besin maya özütüdür, ama bu üretim maliyetinde önemli bir artışa neden olabilir. Maya özütünün bir alternatifi olarak; mısır maserasyon sıvısı, laktik asit üretimi için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sıvının azot içeriği kullanılan maserasyon prosesine bağlıdır. Mısırdan elde edildiği için toplam azot içeriğinin %85'i proteinler, peptitler ve amino asitlerden oluşur (Wee ve ark., 2006).

Endüstriyel fermentasyon besiyeri hazırlanmasında ise, tek bir fermentasyon türü ele alındığında detaylı araştırmalar yapmak gerekmektedir. Fakat herhangi bir fermentasyon türü için bile karşılanması gereken temel ihtiyaçlar vardır. Bütün mikroorganizmaların suya, enerji kaynaklarına, karbon,

azot, mineral maddelere ihtiyacı vardır. Eğer oksijenle solunum söz konusuysa oksijene de ihtiyacı vardır.

Genel olarak, aşağıdaki kriterlerin sağlanabilmesi için fermentasyon ortamına besleyici kaynaklar sağlanmalıdır.

- Kullanılan her gram substrat başına maksimum konsantrasyonun sağlanması,
- Ürün veya biyokütle olarak maksimum konsantrasyonun sağlanması,
- Maksimum ürün fermentasyonunun gerçekleştirilmesi,
- İstenmeyen ürünlerden minimum düzeyde oluşması,
- Belli bir kalitesinin olması ve yıl içinde istenildiği gibi elde edilebilmesi,
- Ortam hazırlanırken ve sterilizasyon sırasında minimum düzeyde problem yaratması,
- Üretim potansiyeliyle ilgili havalandırma, ekstraksiyon, saflaştırma ve atıkların bertaraf edilmesi gibi konularda da minimum düzeyde sorun meydana gelmesi (Stanbury ve ark., 1995).

Karbon kaynağı olarak melas, tahıl taneleri, nişasta, glikoz, sakkaroz ve laktozun; azot kaynağı olarak amonyum tuzları, üre, nitratlar, mısır şurubu, mezbaha atıkları ve fermentasyon artıklarının kullanılması ucuz substratlar olduklarından dolayı üretim ortamı için yukarıda belirtilen kriterlerin çoğunu sağlamaktadır. Ancak, tüm proses ele alındığında daha basit teknikler kullanılarak maliyetin düşürülmesi söz konusuysa daha pahalı substratlar tercih edilebilir.

Ayrıca bir prosesin laboratuvar ölçeğinden, pilot ölçeğe ve sonrasında endüstriyel aşamaya kadar nasıl taşınabileceği düşünülmelidir. Düşük gaz-transfer modeli ile laboratuvar ortamı büyük bir fermentör için uygun olmayabilir. Etkili bir karıştırmanın sağlanabilmesi için yüksek viskoziteye sahip ortamlara daha büyük güç girdilerinin sağlanması gerekmektedir. Ürün oluşturma ve büyüme ile ilgili ihtiyaçları karşılamanın yanı sıra, ortam şartları, pH değişimi, köpürme, indirgenme yükseltgenme potansiyeli ve organizmanın morfolojik formu üzerinde de etkili olmaktadır.

Ayrıca ortama öncü bazı maddelerin veya inhibitörlerin konulması gerekebilir. Ortam şartları ayrıca, ürünün geri kazanılmasında ve atıkların



muamelesinde oldukça etkilidir. Saf substratların verimi ve geri kazanılması ile ilgili tahminleri yapmak ve saflaştırma, atık muameleleri daha basittir, bu yüzden de daha ucuzdur. Ayrıca saf substratlar kullanıldığında prosesteki gelişmeleri takip etmek daha kolaydır (Stanbury ve ark., 1995).

### **2.2.5.Laktik asit fermentasyonunda uygun çevresel şartların sağlanması**

#### **2.2.5.1 pH**

Mikroorganizmanın gelişmesi ve biyolojik dönüşüm faaliyetlerini sürdürebilmesi açısından ortamın pH'ı oldukça önemlidir. Genel olarak; küf mantarları, mayalar ve laktik asit bakterileri zayıf asit veya asit ortamında, diğer birçok bakteri türü nötr ortamda gelişirse de, ortamın pH'ı; elde edilen ürünün tipine, çeşidine, mikroorganizma türüne göre değişir.

Fermentasyonun pH'ı başlangıçta ayarlanabilir ve daha sonra asit üretimiyle düştüğünde, baz , ekstraksiyon, adsorpsiyon ve laktik asidin elektrolizi ile kontrol edilebilir. PH'ın etkisi farklı pH değerlerinde çalışılarak belirlenebilir. Sabit pH için titrasyon yapılması, hiç kontrol yapılmadığı zamanla karşılaştırıldığında aynı ya da daha yüksek laktik asit konsantrasyonu ve verimi vermiştir. Bunun yanında titrasyon da iyi sonuçlar vermektedir.

Laktik asit üretimi için optimum pH değerleri bulmak için yapılan çalışmalar Çizelge 2.6'da gösterilmiştir.

#### **2.2.5.2 Osmotik Basınç**

Ortamda bulunan sakkarit, tuz gibi maddelerin konsantrasyonlarına bağlı olarak fermentasyon ortamında osmotik basınç oluşmaktadır. Osmotik basınç, ortamdaki mikroorganizma faaliyetini önemli derecede etkiler. Ortamdaki yüksek çözünür madde (şeker, tuz vb.) konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan yüksek osmotik basınç mikroorganizma faaliyetini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle fermentasyon ortamında osmotik basıncın kontrol altında tutulması, mikrobiyal aktivite ve dönüşüm açısından son derece önemlidir .

**Çizelge 2.6.** Laktik asit üretimine pH etkisi

Mikroorganizma	Hammadde	pH	laktik asit(g/L)	Referans
<i>Lb.delbrueckii</i> IFO3534	glikoz	5	81	Hofvendahl ve Hagerdal, 2000
		5,5	92	
		6	81	
		6,5	54	
		7	49	
	selüloz	4,2	15	
		5	26	
		5,9	18	
		<i>Lb. delbrueckii sp. bulgaricus</i> NRRL B548	laktoz	
5	45			
5,6	45			
<i>Lb. delbrueckii sp. bulgaricus</i> NRRL B548	selüloz	4,2	27	Hofvendahl ve Hagerdal, 2000
		5	52	
		5,8	33	
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	melas	5	23,4	Wee ve ark., 2004
		6	96,1	
		7	95,7	
		8	95,1	
		9	94,2	

### 2.2.5.3 Sıcaklık

Laktik asit üretiminde sıcaklığın mikroorganizmanın çoğalması üzerine etkisi önemlidir. Mikroorganizmanın yaşaması için uygun sıcaklığın bilinmesi gereklidir. Örneğin ; *Lactobacillus amylophilus* 15°C’de büyür ve 45°C’de ölür; yaşamsal faaliyetler için optimum sıcaklık ise 25- 35°C’dir. *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus paracasei* için bu sıcaklık 37- 44°C arasındadır. Optimum sıcaklık aralıkları *Lactococcus lactis* için 33- 35°C, *Lactobacillus rhamnosus* için 41- 45°C’dir Laktik asit üretimi için optimum sıcaklık değerleri bulmak için yapılan çalışmalar Çizelge 2.7’de gösterilmiştir (Hofvendahl ve Hagerdal, 2000).

**Çizelge 2.7.** Bazı mikroorganizmaların sıcaklık değişiminin laktik asit verimi üzerine etkisi  
(Hofvendahl ve Hagerdal, 2000)

Organizma	Madde	T(°C)	LA (g/L)
<i>Lb. amylophilus</i> ATCC 49845	nişasta	25	26
		28	29
		35	30
<i>Lb. casei</i> NRRL B-441	glikoz	30	80
		37	80
		41	82
		45	42
<i>Lb. casei</i> NRRL B-441	hidroliz edilmiş arpa nişastası	37	140
		41	117
<i>Lc. lactis sp. lactis</i> ATCC 19435	glikoz	30	60
		34	65
		37	60
		40	50

#### 2.2.5.4 Mikroorganizma ile substratın teması

İyi bir fermentasyon gerçekleştirebilmek için, mikroorganizmaların substratla tam temas etmeleri sağlanmalıdır. Genellikle yüzey kültür fermentasyonlarında mikroorganizmaların besi yeri üzerinde geniş bir yüzey oluşturması ve substratla iyi temas etmesi sağlanmalıdır. Daldırma veya derin kültür fermentasyonlarında ise, mikroorganizmaların substratla iyi temas etmesi karıştırma sistemleriyle sağlanmalıdır (Telefoncu, 1995).

#### 2.2.6. Fermentasyon prosesi

Laktik asit üretimi için kullanılan prosesler; kesikli, tekrarlı kesikli, beslemeli kesikli ve sürekli proseslerdir.

Kesikli ve sürekli fermentasyonlar laktik asit üretimi için en sık kullanılan yöntemlerdir. Kesikli ve yarı sürekli kültürlerin içinde elde edilen laktik asit konsantrasyonları sürekli kültürlerin içinde elde edilenlere oranla daha yüksektir ama sürekli proses ise yüksek hacimsel verimlilik, çalışma ve enerji giderlerinde tutumluluk, aynı ürün kalitesi daha iyi otomasyon ve proses kontrolü sağlanmaktadır. Farklı fermentasyon yaklaşımlarıyla laktik asidin biyoteknolojik üretimi üzerine son zamanlardaki çalışmaların literatüründeki bildirimler Çizelge 2.8 'da listelenmiştir.

**Çizelge 2.8.** Farklı fermentasyon uygulamaları için biyoteknolojik laktik asit üretiminde literatürde rapor edilen son araştırmalar (Wee ve ark., 2006)

Mikroorganizma	Fermentasyon	Laktik asit (g/L)	Verimlilik (g/L.h)
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Kesikli Tekrarlı-kesikli, hücre-geri döngülü, membran yoluyla	95.7 93.2	4.0 6.4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 10863	Kesikli Sürekli, hücre-geri döngülü, membran yoluyla	120 92	2.1 5.7
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> ATCC 11443	Sürekli, hücre-geri döngülü, immobilizasyon yoluyla	22.4	9.0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRRL B445	Beslemeli kesikli, çözücü ekstraksiyonu yoluyla	23.1	0.2
<i>Lactobacillus lactis</i> IO-1 JCM 7638	Kesikli, elektrodializ yoluyla	39.0	0.9
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IFO 3863	Kesikli Sürekli, elektrodializ yoluyla	98.0 20.0	1.9 8.2
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 303	Sürekli, hücre-geri döngülü, membran yoluyla	55.0	7.1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CECT 286	Sürekli, iyon-değiştirme reçinesi yoluyla	26.1	10.4

Kesikli ve sürekli proseslerle birlikte hücre geri dönüşümü sistemi, proseste yüksek bir hücre konsantrasyonu ve ürün verimliliği elde etmeyi olası kılar.

Biyoreaktörde yüksek hücre tutulmasının araçlarından biri de hücre hareketsizleştirmesidir (tutuklama=immobilizasyon).

Hücreleri hareketsiz hale getirme, bioreaktör içinde fazla hücre bulundurulması için bir araçtır. Tutuklama (immobilizasyon) sonucunda biyokatalizler yani enzim veya hücreler suda çözünmeyen bir taşıyıcıda değişik yöntemlerle tutuklanarak hareketleri engellenir, buna karşılık oluşturulan sistem

substrat ve ürünün hareketine olanak verir. Tutuklanmış hücrelerin serbest hücrelere göre avantajları şunlardır;

- tutuklanmış hücreler istenilen biyodönüşüm sonucunda ortamdaki kolayca ayrılabilirler ve tekrar tekrar kullanılabilirler,
- işlem sonrası ayrıldıktan sonra ortamı kirletmezler ve alt akım işlemleri kolaylaşır,
- sürekli sistemde çalışmaya uygundur,
- kontaminasyona daha az duyarlıdır.

Ca-alginate jelleri, poly(ethyleneimine) ve plastik bileşik destekleyicileri gibi birçok madde laktik asit üretimi için LAB'ın hareketsiz hale getirilmesinde kullanılır.

Laktik asit üretim proseslerinde son ürün oluşumunun prosesi inhibe ettiği bilinmektedir. Sonuçta; fermentasyon boyunca laktik asidin inhibasyon etkisini azaltmak için, fermentasyon ortamından yerinde seçici olarak uzaklaştırılmalıdır. Yerinde ürün ayrılması; ekstraktif-fermentasyon, diyaliz fermentasyon ve adsorban veya iyon değiştirici destekli fermentasyon uygulanarak gerçekleştirilmektedir (Wee ve ark., 2006).

### **2.2.7. Laktik asitin alt akım prosesleri**

Ürünün fermentasyon ortamından ayrılması için, istenilen saflıkta ürün elde etmek için bazı ayırma teknikleri kullanılmalıdır. Bu tekniklere genel olarak, 'Alt Akım Prosesleri' denir. Alt akım proseslerinin seçimini fermentasyon tipi, ürünün fiziksel ve kimyasal özellikleri, istenmeyen yan ürünlerin türü, ürün konsantrasyonu, üretim ölçeği, ürün stabilitesi, ürünün piyasa değeri, işlemin maliyeti gibi bir çok parametre etkilemektedir (Cabral ve ark., 1994).

Laktik asit fermentasyon ortamının alt akım prosesi oldukça karmaşıktır ve bir dizi aşama içerir. Literatür ve patentlerde laktik asit saflaştırması için çeşitli tekniklere değinilmiştir. Bu literatürün incelenmesi tek bir tekniğin standart bir teknik olarak adlandırılmayacağı gerçeğini açıkça göstermektedir. Ancak laktik asitin ayırma ve saflaştırması genel olarak aşağıdaki basamaklara ayrılabilir. Her

bir basamağın çoklu alternatifi olabilir ve bu nedenle de kombinasyonları olabilir. Genel olarak alt akım prosesi aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

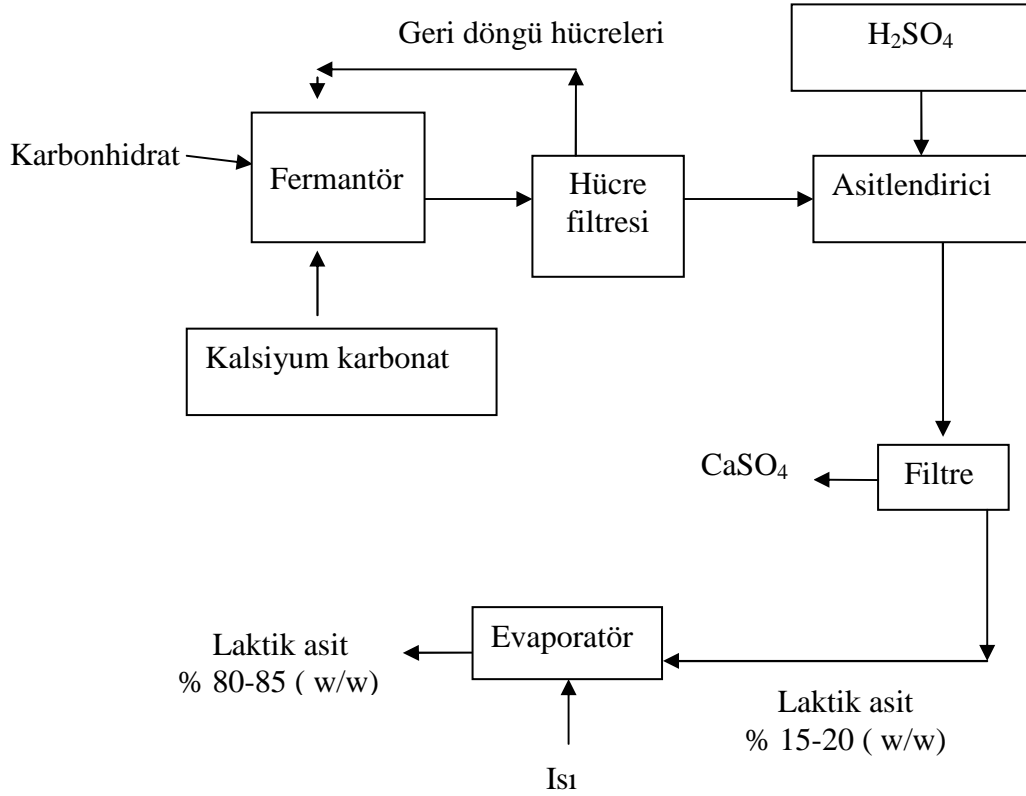
- Biyokütle ve diğer katıların fermentasyon ortamından ayrılması
- Laktik asidi serbest hale getirmek için fermentasyon ortamının kuvvetli asitlerle asidifikasyonu
- Laktik asit solüsyonundan tuzun uzaklaştırılması ya da laktik asidin fermentasyon ortamından ayrılması veya laktat tuzunun ayrılması.
- Katyon tuzunun güçlü asitle çöktürülmesi
- Kuvvetli bazik ortamda eş zamanlı laktat tuzu oluşumuyla sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve laktik asidin suyla geri ekstraksiyonu
- Suyla geri ekstaksiyonu takiben eş zamanlı asidifikasyon ve alkolle esterifikasyon
- Adsorpsiyon, membran ayırmaları ve iyon değişimi gibi ileri ayırma teknikleriyle laktik asidin fermentasyon ortamından direkt ayırımı
- Laktik asit konsantre hale getirilmesi

Biyokütle ve diğer katıların ayırımı için filtrasyon veya santrifüj gibi yöntemler kullanılabilir. Laktatı, laktik asit ve katyona parçalamak için fermentasyon ortamın asitlendirilmesi gereklidir. Laktik asidin pKa değeri 3,86 olduğu için ve pH 3,86 değerinin üzerinde laktat neredeyse tuz olarak bulunduğu için asitlendirme bu pH değerinin altında gerçekleşmektedir. Fermentasyon boyunca pH koruyucu katyon olarak kalsiyum kullanılırsa sülfirik asitle asitlendirme kalsiyum sülfat çökmesiyle sonuçlanır. Aynı şekilde katyonları uzaklaştırmak için de bir dizi proses kullanılabilir. Örneğin, eğer fermentasyonda katyon olarak sodyum kullanılırsa daha sonra iyon değişimi ile uzaklaştırılabilir. Ayrıca laktik asidin uzaklaştırılması laktik asidin alkollerle esterlenmesinden, sıvı-sıvı ekstraksiyonundan ya da adsorpsiyondan etkilenebilir. Membran prosesleri, distilasyon, buharlaştırma, kristalleştirme ve benzerleri, ayrılmış laktik asidin konsantrasyonunu sağlayabilir. Ayırma ve saflaştırma ayrıca kromatografi ve iyon değişimi ile de gerçekleştirilebilir (Vaidya ve ark., 2005) .

### 2.2.7.1 Kuvvetli asitle katyon tuzunun çöktürülmesi

Laktik asit üretimi uygulamalarında genel eğilim pH'ı kontrol etmek için toprak alkali metallerini kullanmaktır ve bu durumlarda metal katyonunun kuvvetli mineral asidiyle çöktürülmesi en yaygın alt akım prosesi seçeneğidir. Bu prosese göre, fermentasyon sıvısı tüm kalsiyum laktatı çözmek için ısıtılır ve sülfürik asidin stokiyometrik miktarlarıyla muamele edilir. Sonuçta oluşan kalsiyum sülfat filtre kekinin yıkanmasıyla filtrasyonla ayrılır. Fermentasyon ortamında bulunan renkli maddeler aktif karbon üzerine adsorblanarak ayrılabilir. İleri saflaştırma işlemlerinde, konsantre laktik asit çözeltisi iyon değiştirme kolonlarından geçirilir ve hidrojen peroksit ya da potasyum permanganatla muamele edilir. Bu prosesle %80 saflıkta laktik asit üretilebilir.

Laktik asit önceleri kalsiyum tuzu olarak üretilmiştir. Günümüzde kullanılan bir çok yöntem 1950'lerde geliştirilenlerin biraz modifikasyona uğramış şekilleridir. Bu prosese ait akım şeması Şekil 2.6'da gösterilmektedir.. Bu fermentasyonlar 100 m<sup>3</sup> 'e kadar hacme sahip reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynağı olarak, 120 ve 180 g/L aralığında, uygun miktarlarda azot ve fosfat ihtiva eden tuzlar ve mikro gıdalar kullanılmıştır. Laktik asit bakterisi karmaşık bir besin ihtiyacı gösterir. Bunlar: B vitaminleri, bazı amino asitler, uygun ek gıdalar(ham sebzeler, malt filizi gibi)'dir ve ortama eklenmelidirler. Fermentasyon 45°C üzerinde hassas bir karıştırma ile gerçekleştirilir. Laktik asit bakterileri anaerobiktir ve bundan dolayı da sisteme O<sub>2</sub> girişinden kaçınılmalıdır. Sisteme steril kalsiyum karbonat ilavesiyle pH 5,5-6,0 aralığında tutulmaktadır. Kalsiyum karbonatla nötralize etmeye alternatif olarak, amonyak kullanılabilir. Amonyak aynı zamanda laktik asidin esterifikasyonla eldesine de yardımcı olmaktadır, ancak bu prosesin maliyeti daha yüksektir. Laktik asidin korozyif etkilerine bağlı olarak geçmişte fermentör yapımında tahta veya beton kullanılmıştır. Günümüzde genellikle paslanmaz çelik kullanılmaktadır. Teorik olarak maksimum %85-95 gibi verimler genellikle 4-6 gün sonunda elde edilmektedir (Vaidya ve ark., 2005).



Şekil 2.5. Endüstriyel laktik asit üretim şeması (Vaidya ve ark., 2005)

### 2.2.7.2 Güçlü bazla eş zamanlı laktat tuzu oluşumuyla sıvı-sıvı ekstraksiyonu

Laktik asidin sıvı-sıvı ekstraksiyonu seyreltik asit çözeltisine uygun çözücünün eklenmesini içerir ve bu da laktik asidin çözücü fazında ve sıvı fazda dağılımıyla sonuçlanır. İyi bir çözücünün temel şartı; yüksek ayırma katsayısıdır. Ayrıca çözücünün viskozitesi, su ile karışma oranının düşük olması, çözücü ve çözelti faz arasında yoğunluk farkı, termal stabilite ve fermentasyon ortamındaki mikroorganizmalara karşı toksisitesi, çözücü seçiminde diğer önemli parametrelerdir. Laktik asitin sıvı/sıvı ekstraksiyonu için kullanılan başlıca çözücüler:

1. Oktan ve metil izobütil keton ( MİBK )gibi geleneksel oksijen taşıyan hidrokarbonlar.
2. Tribütil fosfat gibi fosfor bağlı oksijen taşıyan çözücüler.
3. Dodesil amin gibi yüksek molekül ağırlıklı alifatik aminler (Vaidya ve ark., 2005).



### **2.2.7.3 Suyula geri ekstraksiyonun izlediği eş zamanli asitleştirme ve alkolle esterleşme**

Saf ürünler elde etmek için en etkili yöntem olarak bir başka laktik asit saflaştırma yöntemi de alkolle esterleşme ve uçucu esterin distilasyonudur. Alkolle laktik asit esteri oluşturma, esteri distilasyon ya da ekstraksiyonla saflaştırma ve sonra esteri laktik aside geri çevirme yüksek saflıkta laktik asit üretebilir. Laktik asidin  $pK_a$ 'sı, nötre yakın fermentasyon pH'nın çok altında olan 3,86 olduğu için fermentasyon ortamında çoğunlukla laktat tuzları bulunur. Bu nedenle laktik asidin geri kazanımı ve saflaştırması işleminde önce, laktik asidi alkolle reaksiyona girmesi önce kuvvetli bir asit ile asidik ile muamele edilir. Bu yöntemin optimum saflıkta laktik asit için uygun olduğu bildirilmiştir (Vaidya ve ark., 2005).

### **2.2.7.4 İleri ayırma yöntemleriyle fermentasyon ortamından geri kazanımı**

Laktik asitin fermentasyon ortamından iyon değişimi prosesi ile geri kazanılmasında, genellikle kuvvetli asidik katyon değiştiriciler kullanılır ve saf laktik asit tercihen  $H^+$  formunda elde edilir . Genellikle; Reillex 425, Reillex HP, Dowex MWA-1, Dowex66, Duolite A561, AmberliteIRA-67, AmberliteIRA-120, AmberliteIRA-400 gibi ticari olarak temin edilebilir iyon değiştirici reçineleri kullanılır .

Son zamanlarda laktik asidin saflaştırılması için elektrodializ önerilmiştir. şu anda bu prosesin iki dezavantajı vardır; yüksek maliyet ve orta saflıkta bir ürün olmasıdır.

Laktik asidin geri kazanım ve saflaştırması için kullanılan diğer yöntemler membran prosesleridir. Membran prosesleri mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon ya da ters osmoz ya da bunların kombinasyonunu içerir (Vaidya ve ark., 2005).

### 3. HÜCRE ÇOĞALMA KİNETİĞİ

Mikrobiyal, hayvan veya bitki hücrelerinin büyüme kinetiğinin bilinmesi, fermentasyon sistemlerinin tasarımı ve uygulanması açısından oldukça önemlidir. Hücre çoğalma kinetiği kimyasal ve fiziksel koşulların hücre büyüme (çoğalma) hızına etkisini inceler. Hücre çoğalma kinetiği çok bileşenli ve çok fazlı sistemleri içerdiği, taşınım olayları ve biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonların birlikte değerlendirilmesi gerektiğinden enzim kinetiğine göre daha karışıktır. Çünkü burada genç ve yaşlı hücrelerin oluşturduğu hetorejen ortamda, hücreler sürekli değişecekler ve fermentasyon ortamına adapte olurken aynı zamanda bu ortamın fiziksel ve kimyasal şartlarını da değiştireceklerdir.

#### 3.1. Hücre Çoğalması

Hücre bileşenlerinin ve popülasyonu dikkate alınarak çeşitli varsayımlar ışığı altında çeşitli modeller geliştirilmiştir Çizelge 3.1’de bu modeller ve açıklamaları gösterilmiştir (Lee, 2001)

**Çizelge 3.1.** Hücre kinetiği modelleri (Lee, 2001)

	<b>Hücre bileşenleri</b>	
Populasyon	Düzensiz	Düzenli
Dağılmış	Hücreler kültür ortamı içinde homojen olarak dağılmış tek bir bileşenle temsil edilirler	Her biri birbirleri ile etkileşimde bulunan çok hücre bileşenleri homojen dağılmıştır
Ayrılmış	Hücreler tek bir bileşen olarak temsil edilirler, fakat heterojen karışımlar oluştururlar.	Hücreler çok bileşenle temsil edilirler ve heterojen bir karışım oluştururlar.

En basit model düzensiz ve dağılmış modeldir. Bu model için kullanılan kabuller:

1. Hücre konsantrasyonu, hücre kütlesi, hücre sayısı veya protein, DNA veya RNA konsantrasyonu gibi tek bir bileşen cinsinden ifade edilir.
2. Hücre kitlesi tüm kültürde homojen olarak dağılmıştır. Hücrelerin heterojen yapıları ihmal edilir. Hücre konsantrasyonu birim hacmin kuru ağırlığı üzerinden hesaplanabilir.

Hücreler için kullanılan bu kabullerin haricinde, fermentasyon ortamı sadece bir bileşen limitleyen reaksiyon hızını belirleyecek şekilde formüle edilir. Diğer bileşenler çok yüksek konsantrasyonda varsayılır, böylece bunların konsantrasyonlarındaki çok küçük değişikliklerin reaksiyon hızı üzerindeki etkisi ihmal edilebilir. Fermentör, pH, sıcaklık ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu sabit olacak şekilde kontrol edilmelidir (Lee, 2001).

Düzensiz ve dağılmış model için geliştirilen varsayımlar temelinde hücre çoğalma kinetiği incelenecek olursa, hücre konsantrasyonu birkaç şekilde ifade edilebilir:

$C_x$  : Hücre konsantrasyonu, birim hacimdeki kuru hücre ağırlığı

$C_N$  : Hücre sayısı, birim hacimdeki hücre sayısı

$\rho$  : Hücre yoğunluğu, birim hacim hücre kütlesinin nemli hücre ağırlığı

Bu konsantrasyonlara göre de büyüme hızı farklı şekillerde ifade edilebilir:

$dC_x/dt$  : Zamanla kuru hücre konsantrasyonunda değişme

$r_x$  : Kuru hücre ağırlığı temelinde hücre büyüme hızı

$dC_N/dt$  : Zamanla hücre sayısındaki değişme.

$\delta$  : Hücre bölünme hızı,  $d \log_2 C_N / dt$

Hücre çoğalma hızında  $dC_x/dt$  ve  $r_x$ , kesikli işlemler için aynıdır. Ancak sürekli sistemler için,  $dC_x/dt$  fermentördeki konsantrasyondaki değişmedir. Dolayısıyla reaktöre giriş çıkış akış hızları, geri döngü ve fermentörün diğer koşullarından etkilenebilir.  $r_x$  ise hücrenin var olan gerçek (reaktörden bağımsız) büyüme hızıdır.

Hücre sayısına göre büyüme hızı ve hücre ağırlığına göre büyüme hızı her zaman aynı değildir. Hücrelerin ortalama büyüklükleri değişebilir.

Bir hücrenin kütlesi bölünmeden arttığında hücre ağırlığı bazında büyüme hızı artar, hücre sayısı ise sabit kalacaktır. Ancak kinetik açıdan incelenecek olan eksponansiyel büyüme periyodudur. Burada ise hücre sayısı ve hücre ağırlığı birbirine orantılıdır.

Bazen büyüme hızı hücre bölünme hızı ile karıştırılır.  $t=0$  anında  $C_N=C_{N0}$  konsantrasyonunda bulunan reaktördeki hücrelerin  $t$  zamanına kadar bir kez bölündüğü düşünülüğünde konsantrasyonu  $C_{N0} * 2$  olacaktır. Eğer hücre  $n$  kez bölünürse toplam hücre sayısı;

$$C_N=C_{N0} \times 2^N \quad (3.1)$$

Her iki tarafın logaritması alınıp “N” çekildiğinde (3.2) elde edilir.

$$N=\log_2 C_N - \log_2 C_{N0} \quad (3.2)$$

Ortalama bölünme hızı ise;

$$\delta_{ort}=N/t \quad (3.3)$$

$t$  zamanında bölünme hızı ise;

$$\delta = d\log_2 C_N/dt \quad (3.4)$$

şeklinde ifade edilir.

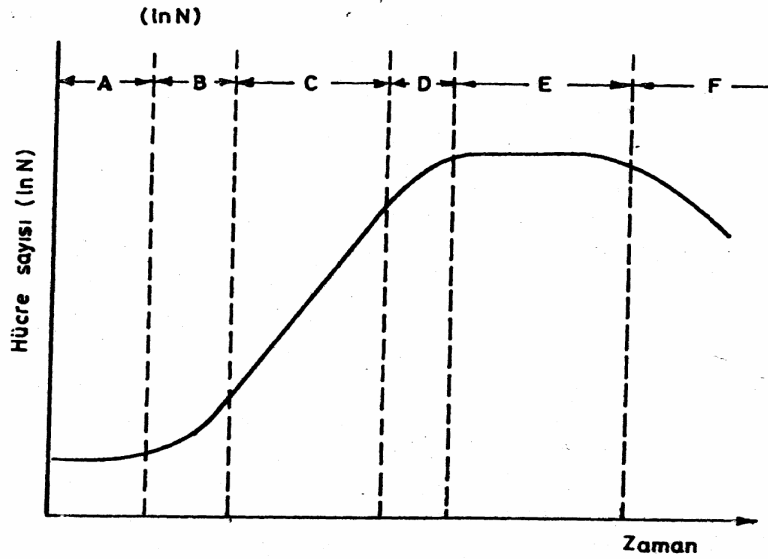
$dC_N/dt$  : Zamanla hücre sayısındaki değişme

Hücre sayısının çoğalma hızı  $t-C_N$  doğrusunun eğimi iken

Hücrenin bölünme hızı  $t-\log_2 C_N$  doğrusunun eğimidir. Yani hücre sayısının çoğalma hızı ile bölünme hızı birbirinden farklıdır (Lee, 2001).

### 3.2. Hücre Çoğalma Evreleri

Mikroorganizmaların büyümesi belirli kurallara uyar. Bu nedenle bazı koşullar altında inkubasyon sonunda, beklenen hücre sayısı ve biyokütle miktarı hakkında önceden tahminde bulunulabilir. Bakteriler, mayalar ve mantarların birçoğunun büyümesinde aşağıda ayrı ayrı inceleyeceğimiz değişik fazlar vardır. Tek hücreli bir mikroorganizma uygun sterilize fermentasyon ortamına konduğunda ve zamanla hücre sayısının yoğunluğu ölçülüp zamana karşı grafiğe geçirildiğinde büyümenin altı evreden oluştuğu görülür (Şekil3.2).



Şekil 3.1. Mikroorganizmaların büyüme eğrisi (Brown ve ark., 1987)

**Lag evresi (A) :** İnkubasyon fazında hiç hücre bölünmesi olmaz ve bu faz ilk hücre bölünmesi gerçekleşinceye kadar devam eder. Aşılana hücre sayısında hiçbir değişiklik olmaz. Besi ortamından su ve substratlar alınıp RNA, ribozom ve protein biyosentezinde (özellikle enzim sentezinde) değerlendirilir ki bu nedenle hücre çoğalması olmadığı halde biyokütle artar. Bu fazın süresi aşı kültürü miktarına, aşı materyalinin yaşına, substratın uygunluğuna bağlıdır (Brown ve ark., 1987).

Lag evresi çoğalma başlayıncaya kadar hücrelerin yeni ortamlarına adaptasyon süresi olduğundan genellikle her zaman vardır. Mikroorganizmalar

düşük besleyici değeri olan ortamdan yüksek besleyici ortama aktarıldıklarında lag evresi genellikle uzundur. Çünkü hücreler önce metabolizasyon için gerekli enzimleri üretirler. Mikroorganizmalar yüksek besleyici değeri olan ortamdan düşük besleyici ortama aktarıldıklarında (inoküle edildiklerinde) lag evresi yoktur veya çok kısadır. Aşılama miktarı fazla ise lag evresi uzundur. Büyük ölçekli işlemlerde lag evresinin küçük olması istenir. Bu nedenle büyük fermentörlere aşılama için, gittikçe büyüyen tanklarda bir seri ön aşılama yapılır .Lag fazının sonunda çoğalma başlar ve bölünme hızı da artmaya başlar ve bir noktada maksimuma ulaşır. Geçiş bölgesi olarak da düşünülür ve lag evresi ile birlikte değerlendirilir (Ha ve ark., 2003).

**Uyum ve hızlanma evresi (B) :** Bu fazda hücre çoğalması başlar ama yavaş yürür, artış eksponansiyel değildir. DNA miktarı artar, enzim sentezi devam eder. Hücrelerdeki RNA miktarında önemli artış olur. Bazı bakımlardan benzerlik gösterdiklerinden, çoğu kez A ve B fazları birlikte değerlendirilir (Lee, 2001).

**Eksponansiyel evre (C) :** Büyüme hızı pratikte sabittir ve maksimuma ulaşmıştır. RNA'ya kıyasla DNA sentezi daha fazladır. Hücreler diğer fazlara göre daha küçük olup kuru kütlelerin hücre sayısına oranı diğer fazlardan daha düşüktür. DNA/RNA miktarlarının oranı açısından kıyaslandığında protein miktarı diğer fazlardan daha azdır .

Tek hücreli organizmalarda hücre sayısındaki sürekli ikinin katları şeklindeki artış, hücre büyüme hızını da sürekli olarak artıracaktır. Bakteriyal hücreler, dengeli çoğalma eğiliminde olup, çoğalma hızları birinci mertebe oto katalitik kimyasal reaksiyon denklem (3.5) ile ifade edilir.

$$r_N = dC_N/dt = \mu C_N \quad (3.5)$$

Spesifik çoğalma hızı, çoğalma hızı ile karıştırılmamalıdır. Farklı anlam ve birimleri vardır. Hücre çoğalma hızı hücre sayısı yoğunluğunun zamanla değişimi iken, spesifik çoğalma hızı hücre sayısı yoğunluğunun logaritmasının zamanla değişimidir ve denklem (3.6)'daki gibidir.

$$\mu = (1/C_N) * (dC_N/dt) = d \ln C_N / dt = \ln 2 * (d \log_2 C_N / dt) = \delta \ln 2 \quad (3.6)$$

Spesifik çoğalma hızı bölünme hızının ln2 katına eşittir.

Ekspansiyel evrede spesifik çoğalma hızı ( $\mu$ ) sabit ise, çoğalma hızının sınır şartları kullanıldığında denklem (3.7), integral alındığında (3.8) elde edilir.

$$\int_{C_{N0}}^{C_N} \frac{dC_N}{C_N} = \int_{t_0}^t \mu dt \quad (3.7)$$

$$C_N = C_{N0} * \exp[\mu(t-t_0)] \quad (3.8)$$

$C_{N0}$ :  $t=0$  anında hücre sayısı konsantrasyonu

Hücre sayısını ikiye katlamak için gereken süre ( $t_d$ ) olarak ifade edilir ve

$C_N = 2 C_{N0}$  olarak belirtilir ve denklem (3.10) elde edilir.

$$t_d = \ln 2 / \mu = 1 / \delta \quad (3.10)$$

İkiye katlanma süresi, spesifik büyüme hızıyla ters orantılıdır ve bölünme hızının eksi birinci kuvvetiyle orantılıdır (Lee, 2001).

**Azalan büyüme evresi (D)** : Bu fazda hücre çoğalma hızı sürekli azalır. Fakat toplam olarak düşünüldüğünde hücre sayısı ve biyokütle artışı devam eder. Logaritmik fazdan üreme hızının düşük olduğu geçiş fazına geçmenin başlıca sebeplerini şöyle sıralanabilir:

- Toksik metabolik ürünlerin oluşması,
- Substratın tükenmesi,
- Viskozite artışı nedeniyle  $O_2$  temininin zorlaşması

Bu fazda çok değişik yaşlarda hücreler bulunabilir: Logaritmik olarak çoğalan küçük hücreler yanında, çok yavaş veya hiç üremeyen düşük DNA ve yüksek protein içerikli büyük hücreler ve ölü hücreler de bulunur (Telefoncu, 1995).

**Durağan evre (E)** : Mikrobiyal çoğalma hızı, ortamdaki besleyici tükendiğinde veya metabolizma tarafından üretilen toksik bileşenlerin varlığı nedeniyle yavaşlar ve sonunda da hız değişmez. Ekspansiyel evre ve durağan evre

arasında hücreler dengesiz bir büyüme gösterirler ve hücre bileşenleri de değişir, dolayısıyla hücrenin kimyasal bileşimleri durağan faz ve eksponensiyal faz arasında farklıdır.

Bu fazda yeni oluşan hücre sayısı ile ölen hücre sayısı dengelenmiştir. Toplam hücre sayısı sabit kalır. Metabolizma katabolizmadan anabolizmaya dönmüştür. Biyosentezler de daha çok sekonder metabolit üretimine yöneliktir. Hücrelerin durumu geçiş fazına benzer. Sekonder metabolit üretimi amaçlanıyorsa bu fazın mümkün olduğu kadar uzun sürmesinde yarar vardır (Telefoncu, 1995).

**Ölüm evresi (F) :** Durağan fazı ölüm evresi izler. Burada yeterli besleyiciyi bulamayan ve üretilen toksik maddelerden dolayı mikroorganizmalar ölmeye başlar. Çoğalma gibi ölüm oranı miktarı da eksponensiyal olarak azalır

### 3.3. Spesifik Büyüme Hızına Etki Eden Faktörler

#### 3.3.1. Substrat konsantrasyonu

Spesifik büyüme hızı ( $\mu$ ) na substrat konsantrasyonunun etkisi için, enzim kinetiğindeki reaksiyon hız eşitliğine benzer şekilde geliştirilmiş olan, Monod eşitliği kullanılır ve denklem (3.11)'deki gibidir.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_s}{K_s + C_s} \quad (3.11)$$

Spesifik çoğalma hızı maksimum ( $\mu_{\max}$ ) değerinin yarısı olduğunda,  $K_s$  limitleyen bileşen substrat konsantrasyonudur.

Monod eşitliği kompleks hücre çoğalma mekanizmasını açıklamada fazla basitleştirilmiş bir model olmasına rağmen, düşük konsantrasyonlarda fermentasyon kinetiğini doğru bir şekilde tanımlamaktadır. Bu eşitliğe göre yüksek konsantrasyonlarda spesifik çoğalma hızı değişmez ( $\mu=\mu_{\max}$ ). Ancak gerçekte spesifik çoğalma hızı düşmektedir.



Yüksek substrat konsantrasyonunun inhibasyon etkisinin Monod kinetiğine ilavesiyle Haldane eşitliği oluşmuştur ve bu denklem (3.13)'deki gibidir (Dunn ve ark., 2003).

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{(C_s^2 / K_i) + C_s + K_s} \quad (3.12)$$

### 3.3.2. Ürün konsantrasyonu

Hücre çoğaldıkça ortamda metabolik yan ürünler oluşacaktır. Bu yan ürünler de genellikle mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe ederler. Bu etki Monod eşitliğine ilavesi denklem (3.13) ve (3.14)'de gösterilmiştir (Lee, 2001).

$$\mu = \mu_{\max} * [C_s / (K_s + C_s)] * [(K_p / K_p + C_p)] \quad (3.13)$$

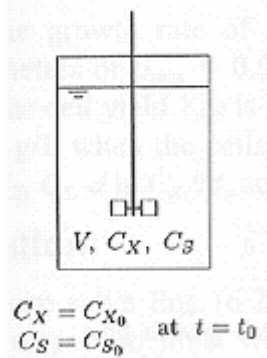
$$\mu = \mu_{\max} * [C_s / (K_s + C_s)] * [(1 - C_p / C_s)]^n \quad (3.14)$$

### 3.3.3. Diğer şartlar

Mikroorganizmaların spesifik büyüme hızları ayrıca besiyerinin pH, sıcaklık, ve oksijen miktarından etkilenir. Optimum pH ve sıcaklık mikroorganizmadan mikroorganizmaya değişiklik göstermektedir (Lee, 2001).

## 3.4. Kesikli Fermentasyon

İdeal bir kesikli fermentör tam karıştırmalı olmalıdır. Yani fermentörün her noktasındaki kompozisyon aynı olmalıdır.



Şekil 3.2. Karıştırmalı kesikli fermentör (Lee, 2001)

Fermentörde hücre çoğalma kinetiği incelenirken, hücrenin büyüme evresi olan ekspanensiyel evre ele alınır.

Ekspanensiyel evrede Monod eşitliği kullanıldığında;

$$r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (3.15)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_s}{K_s + C_s} \quad (3.16)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_{\max} C_s C_x}{K_s + C_s} \quad (3.17)$$

Sınır şartları ve spesifik büyüme hızına ait (3.11) kullanıldığında (3.18) elde edilir.

$$\int_{C_{x0}}^{C_x} \frac{(K_s + C_s) dC_x}{\mu_{\max} C_s C_x} = \int_{t0}^t dt \quad (3.18)$$

Cs ve Cx arasındaki bağıntı çoğalma verimi (Yx/s) denklem (3.19) ile verilmektedir.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta C_x}{-\Delta C_s} = \frac{C_x - C_{x0}}{-(C_s - C_{s0})} \quad (3.19)$$

Y<sub>x/s</sub> eşitliği; denklem(3.18)'de kullanılıp, çoğalma hızı denkleminin integrasyonu alındığında denklem (3.20) elde edilir.

$$(t - t_0) \mu_{\max} = \left( \frac{K_s Y_{x/s}}{C_{x0} + C_{s0}} + 1 \right) \ln \frac{C_x}{C_{x0}} + \frac{K_s Y_{x/s}}{C_{x0} + C_{s0} Y_{x/s}} \ln \frac{C_{s0}}{C_s} \quad (3.20)$$

### 3.4.1. Monod kinetik parametrelerinin bulunması

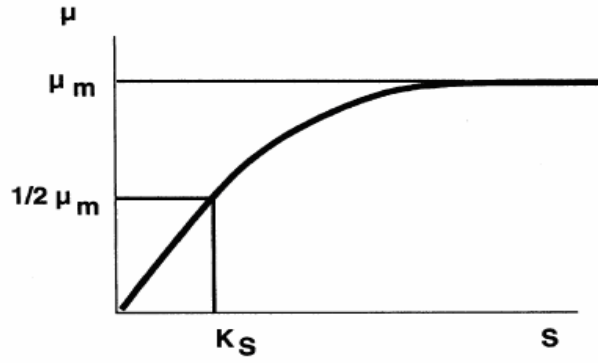
Monod kinetik parametrelerinin bulunması için

- Farklı substrat konsantrasyonlarında bir seri deney yapılır.
- Reaksiyon hızları hesaplanır.
- Sonuçlar grafiğe geçirilir ve sonuçların kullanılan modele uygunluğu

kontrol edilir. Uygun ise farklı konsantrasyon ve farklı şartlar kullanılarak tüm konsantrasyonlar bulunabilir.

Daha kısa yolu ise

- $\mu - C_s$  grafiği çizilir. Eğrinin asimtodundan  $\mu_{\max}$  bulunur.
- $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$  olduğu noktadan  $K_s$  bulunur. Burada  $K_s = C_s$  dir



Şekil 3.3. Monod bağıntısına göre limitleyen hammaddeye karşın spesifik büyüme (Lee, 2001)

## 4. OPTİMİZASYON VE CEVAP YÜZEY YÖNTEMİ

Mühendislikte deney, yeni ürün tasarlamakta, üretim sürecinin geliştirilmesinde ve sürecin iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Çoğu durumda amaç, dış kaynaklı değişkenlerden en az ölçüde etkilenen, sağlam bir süreç geliştirmektir (Montgomery, 2000).

Deneysel çalışmalarda geleneksel yaklaşım tek-zamanda tek-faktörü değiştirmeyi gerektirmektedir. Bu süreçte biri hariç tüm değişkenler sabit tutularak o değişken için optimum düzey belirlenmektedir. Bu optimum kullanılarak ikinci değişkenin optimumu bulunmaktadır. Fakat bu yaklaşım kimyasal süreçlerde olması muhtemel, faktörler arasındaki etkileşimler için veri sağlamamaktadır. Tek değişken tek zamanlı yaklaşımda, iki faktör arasındaki etkileşimlerden dolayı gerçek optimum bulunamamaktadır. Optimum koşulların bulunabilmesi için, tek değişken tek zaman süreci doğru optimum yakaladığına emin olunana kadar her basamakta tekrarlanmalıdır. Bu özellikle optimize edilmesi gereken birçok değişken olduğunda, birçok peş peşe deney, süre tüketimi ve etkin olmayan bir strateji doğurmaktadır (Anderson, 1996)

Alternatif bir yaklaşım olan iki seviyeli faktöriyel tasarım, kritik etkileşimleri açığa çıkartmaktadır. Bu istatistik temelli metot, deneysel faktörlerin sadece iki düzeyde (yüksek ve alçak) aynı anda düzenlemelerini içermektedir. İki dereceli tasarım, tek zaman tek değişkendeki seri yaklaşımdan çok daha verimli olan paralel deneme planı sunmaktadır (Anderson, 1996).

### 4.1. Süreç Optimizasyonuna Cevap Yüzey Yöntemi Yaklaşımı

Cevap yüzey yöntemi (Response Surface Methodology, CYY), ilgilenilen cevabın birkaç parametre tarafından etkilendiği problemlerin modellenmesi ve analizi için kullanılan matematik ve istatistik tekniklerinin birleşimidir ve amacı cevabı optimize etmektir. Örneğin, bir kimya mühendisi sürecin verimini ( $y$ ) maksimize eden sıcaklığın ( $x_1$ ) ve basıncın ( $x_2$ ) seviyesini bulmak istiyor. Süreç verimi, sıcaklık ve basıncın seviyesinin bir fonksiyonudur;

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (4.1)$$

$\varepsilon$ ,  $y$  cevabında gözlenen gürültü veya hatadır. Eğer beklenen cevap  $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$  ile gösterilirse, yüzey  $\eta = f(x_1, x_2)$  olarak ifade edilir ve cevap yüzeyi olarak adlandırılır (Montgomery, 2000).

Çoğu CYY probleminde cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bu sebepten dolayı, CYY' de ilk basamak,  $y$  ve bağımsız değişkenler arasındaki gerçek fonksiyonel ilişki için uygun yaklaşımı bulmaktır. Eğer cevap, bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonu ile iyi modelleniyorsa, yaklaşım fonksiyonu birinci derecedir;

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \quad (4.2)$$

Eğer sistemde bir eğim açısı varsa, yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır, örneğin ikinci derece model;

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4.3)$$

Tüm CYY problemleri, bunlardan birini ya da tümünü kullanır. Elbette polinom modelinin, tüm bağımsız değişkenlerin gerçek fonksiyonel ilişkisine makul bir yaklaşım oluşturması olanaksızdır fakat, oldukça küçük bir bölgede iyi çalışmaktadır (Monthomery, 2000).

Optimum noktalar; durağan noktaların yerleşimi için genel bir matematiksel çözüm ile elde edilebilir. Matris gösteriminde ikinci dereceden model yazılarak,

$$y = \beta_0 + x'b + x'Bx \quad (4.4)$$

elde edilir.

Burada;

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix}, b = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix} \text{ ve } B = \begin{bmatrix} \beta_{11} & \beta_{12}/2 & \cdot & \cdot & \cdot & \beta_{1k}/2 \\ & \beta_{22} & \cdot & \cdot & \cdot & \beta_{2k}/2 \\ & & \cdot & & & \\ & & & \cdot & & \\ & & & & \cdot & \\ \text{sym.} & & & & & \beta_{kk} \end{bmatrix}$$

şeklindedir.

b: birinci dereceden regresyon katsayılarını içeren (k x 1) bir vektör.

B: ana köşegen elemanları saf kuadratik katsayıları olan ( $\beta_{ii}$ ) ve köşegen dışı elemanları karışık kuadratik katsayıların yarısı olan ( $\beta_{ij}$ ,  $i \neq j$ ) (kxk) tipinde simetrik bir matristir.

X vektörünün elemanlarına göre 'y' türevi sıfıra eşittir.

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x} = b + 2Bx = 0 \quad (4.5)$$

Durağan nokta yukarıdaki denklemin çözümü yada

$$x = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (4.6)$$

şeklindedir.

Polinom yaklaşımlarında parametrelerin tahmini için en küçük kareler yöntemi kullanılmaktadır. Daha sonra, oluşturulmuş yüzey kullanılarak, yüzey cevap analizi gerçekleştirilmektedir. Eğer oluşturulmuş yüzey, gerçek yüzey fonksiyonuna uygun bir yaklaşımdaysa; oluşturulmuş yüzeyin analizi, asıl sistemin analizine yaklaşık olarak eşit olacaktır. Model parametreler en etkin, veri toplamak için doğru deney tasarımları kullanıldığında tahmin edilebilmektedir. Cevap yüzeylerine uygun tasarımlar yüzey cevap tasarımlarıdır (Monthomery, 2000).

CYY ardışık bir prosedürdür. Çoğunlukla, yüzey cevabında optimumdan uzak bir noktada bulunulduğunda, sistemde küçük bir eğim açısı olur ve birinci derece model daha uygundur. Burada amaç, deney yapanın optimumun çevresine doğru gelişen bir yolda hızlı ve verimli olmasını sağlamaktır. Bir kez optimum

bölgesi bulunduğunda, ikinci derece gibi daha ayrıntılı bir model uygulanabilir ve analizler optimum bölgesinde gerçekleştirilebilir (Monthomery, 2000).

CYY'nin en kapsamlı uygulaması, endüstride özellikle cevap denen performans ölçümü veya kalite karakteristiklerini etkileyebilecek bazı girdiler olduğunda yapılmaktadır. CYY'nin gerçek uygulamalarının çoğu birden fazla cevap içermektedir (Demirekler, 2004).

CYY dört basamaklı bir süreçtir. İlk olarak, ürünü veya süreci için önemli olan kritik faktörler belirlenir. İkinci olarak, örneklerin fiziksel özelliklerini kapsayan faktörlerin seviye aralığı belirlenir. Üçüncü olarak, deney tasarımı ile spesifik test örnekleri belirlenir ve test yapılır. Dördüncü olarak ise, deneylerden elde edilen veriler CYY ile analiz edilir ve yorumlanır (Demirekler, 2004).

CYY etkin kullanmak için beş adet varsayım vardır:

1. Ürün için kritik faktörler bilinmektedir.
2. Ürünü etkileyen faktör düzeylerinin bulunduğu ilgilenilen aralık bilinmektedir.
3. Deney test aralığında faktörler devamlı değişmektedir.
4. Faktörleri, ölçülen cevapla ilişkilendiren bir matematiksel denklem vardır. Bu denklem ile ifade edilen cevap, düzgün bir yüzeydir (Demirekler, 2004).
5. Bu varsayımların yanı sıra, deney yapan kişi CYY kullanırken, beş kısıtlamanın da farkında olmalıdır.

CYY'nin sonuç olarak amacı; sistem için optimum çalışma koşullarını belirlemek veya çalışma gerekliliklerini karşılayan bir faktör bölgesini belirlemektir (Monthomery, 2000).

## 5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada şeker üretiminden elde edilen ticari melastan *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 mikroorganizması kullanılarak farklı pH, maya özütü ve başlangıç substrat (sakkaroz) konsantrasyonlarda kontrollü fermentörde laktik asit fermentasyonu yapılmıştır.

### 5.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar

Kimyasal maddeler: D-(+)-Glukoz (susuz) (Biochemica, Fluka, %98 saflık), sakkaroz (Merck, mikrobiyoloji için), fruktoz (Fluka, %98 saflıkta), laktik asit (Fluka, % 99 saflıkta), maya özütü (Yeast extract, Merck), MRS Broth (Merck) ve kompozisyonu (g/L): 10.0 pepton, 8.0 ekstresi, 4.0 maya özütü, 20.0 D (+) glukoz, 2.0 dipotasyum hidrojen fosfat, 1.0 tween, 2.0 diamonyum hidrojen sitrat, 5.0 sodyum asetat, 0.2 magnezyum sülfat, 0.04 manganez sülfat, MRS agar (Merck): MRS brotha ilave olarak 14.0g/L Agar-agar

Cihazlar: Fermentör (BioFlo110, NewBrunswick Scientific), YBSK sistemi (Agilent 1100 serisi), spektrofotometre UV-VIS (Optima Sp-300), fanlı etüv (Nüve FN 500), otoklav (Alp CL-400), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex), çalkalamalı su Banyosu (Julabo SW23), orbital çalkalamalı İnkibatör (Biolab S14-2), analitik terazi (Ohaus Corp., Adventurer Pro AV 264C), vortex (Heildolph, Reax control, 0-2500 rpm)

### 5.2. Çözeltilerin Hazırlanması

MRS agarı: 34,1 g MRS agar tartılarak 500 ml saf su içerisinde çözülmüş ve 118°C'de 15 dak. süreyle sterilize edilmiştir.

MRS broth: 52.0 g MRS Broth 1 L suda çözülüp 118°C'de 15 dak. süreyle sterilize edilerek hazırlanmıştır.

Maya özütü hazırlanması: Deney tasarımı için yapılan deneylerde belirlenen miktarlar kadar 1 L melas çözeltisinde çözülüp 118°C'de 15 dak. süreyle sterilize edilerek hazırlanmıştır.



### 5.3. Sterilizasyon

Mikrobiyal çalışmalarda kullanılan tüm cam malzemeler ve besi yerleri (MRS broth ve agar) farklı mikroorganizmaların kontaminasyonu engellemek için otoklavda 118<sup>0</sup>C de 15 dk süre ile strelize edilmiştir. MRS broth içeren tüplerin ve MRS agar içeren erlenin ağzı steril pamukla ve aliminyum folyo ile kapatılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 5.4. Mikroorganizma ve Kültür Şartları

Bu çalışmada Refik Saydam Hıfzıssıhha Kültür Merkezin temin edilen *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 kullanılmıştır. Liyofilize haldeki mikroorganizma 10ml MRS besi ortamında 37 <sup>0</sup>C, 24 saat ve 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde canlandırılmıştır. Daha sonra öze yardımıyla MRS agara ekimi yapıp 37 <sup>0</sup>C, 48 saat ve 150 rpm'de olgunlaşmaya bırakılmıştır. Oluşan kültürler, 1ml'lik ependorf tüplerinde % 20 gliserol çözeltilerine (h/h) alınıp -70 <sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

### 5.5. Melasa uygulanan Ön İşlemler

Çalışmada Eskişehir Kazım Taşkent Şeker Fabrikası'ndan temin edilen şeker pancarı melası (78 Brix) kullanılmıştır. Fermentasyon öncesi melas 35 Bx olacak şekilde seyreltilip, aktif karbonla renkli maddeler giderilmiştir. pH 5,5 olacak şekilde 5N HCl ile ayarlanıp 15 dakika kaynatılmıştır. Çözelti sıcak iken 100 ppm EDTA ilave edilerek ağır metaller giderilmiştir. Bir gece bekletildikten sonra santrifüjlenip fermentasyon için kullanılmıştır (Roukas, 1998)

### 5.6. İnokulum Hazırlama

Stok kültür 9ml MRS besi ortamına aktarılıp 37 <sup>0</sup>C, 150 rpm'de bir gece inkübatörde bekletilmiştir. İşlemden sonra bu kültürden 50 µL alınıp, 10ml MRS besi ortamında 37 <sup>0</sup>C, 150 rpm'de 8 saat inkübatörde bekletilmiştir. Bu kültürde ön

kültür ortamını oluşturacak 90 ml'lik melas çözeltisine (15 Bx, 50 g maya özütü, pH=6,5) ilave edilip bir gece bekletilmiştir.

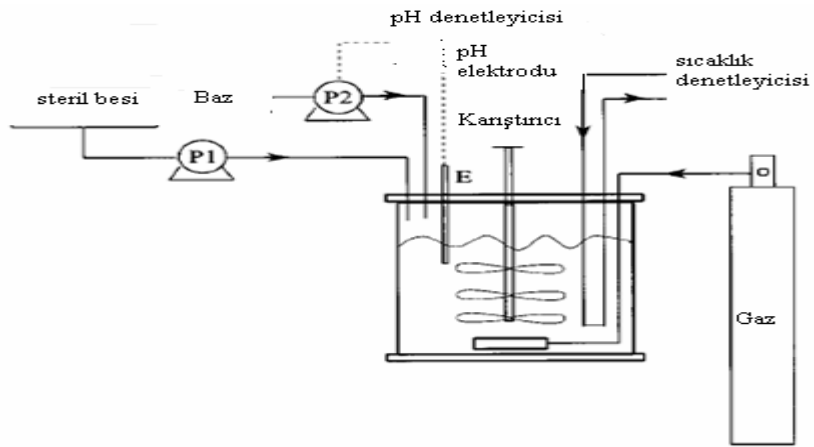
### 5.7. Fermentasyon Şartları

Deneyler 3L'lik fermentörde, 0,8 L fermentasyon ortamı kullanılarak yapılmıştır. Sistemin pH'ı 5M NaOH kullanılarak otomatik olarak istenilen değer ayarlanmıştır. Bütün deneyler için aşılama, sıcaklık ve karıştırma % 10 (h/h), 37<sup>0</sup>C ve 150 rpm olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deney tasarımı için yapılan deneylerde melas çözeltisi başlangıç konsantrasyonu 35Bx, kinetik çalışmaları için; 3, 6, 10, 15, 20 ve 35 Bx olacak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 5.1. Deneylerin gerçekleştirildiği sistem

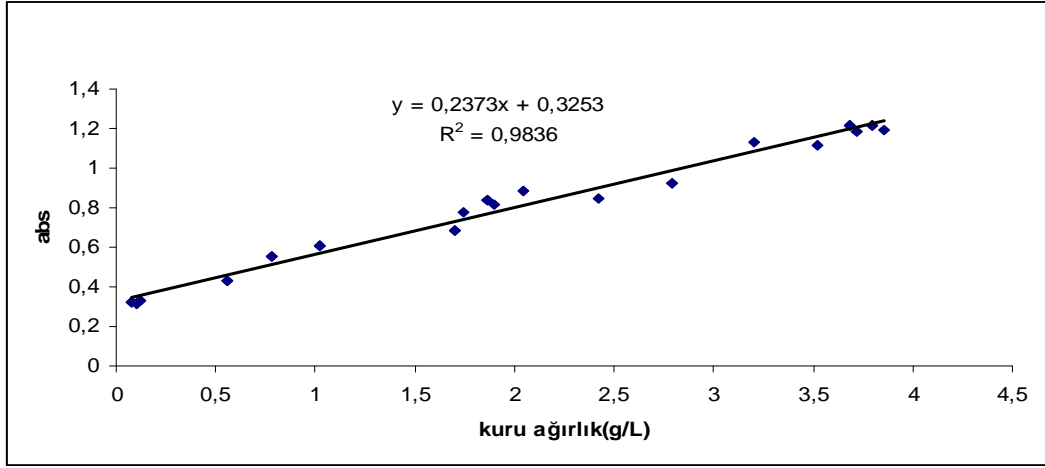


Şekil 5.2. Kesikli fermentasyon sisteminin şematik gösterimi

## 5.8. Analizler

### 5.8.1. Mikroorganizma kuru ağırlık tayini

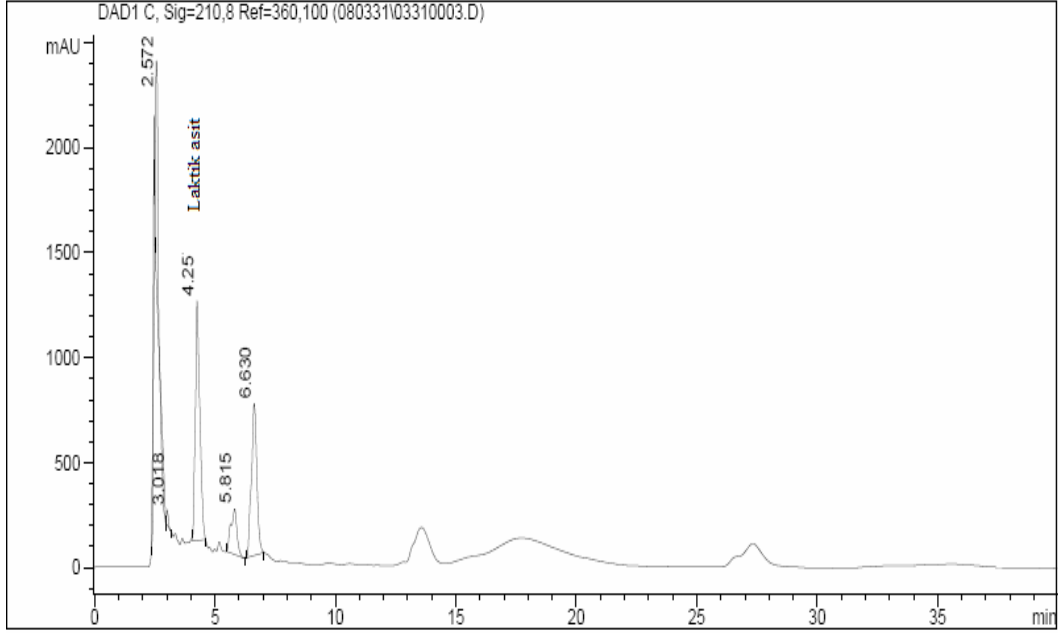
Kuru ağırlık için fermentasyon süresince alınan 5ml'lik numuneler spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda okunması yapıldıktan sonra 5000xg 10 dakika santrifüj işleminden sonra iki yıkama yapılmış ve yine santrifüj edilerek ayrılmıştır. Üst faz ayrılıp şeker ve laktik asit analizleri için kullanılmıştır. Diğer kısım da bir gece 103 °C'de bekletilip daha sonra tartımı alınmıştır. Çalışmalarda kuru mikroorganizma ağırlığı (g/L) kuru hücre ağırlık (g/L)-optik yoğunluk (660 nm) kalibrasyon doğrusu denkleminde yararlanılmıştır (Şekil 5.3)



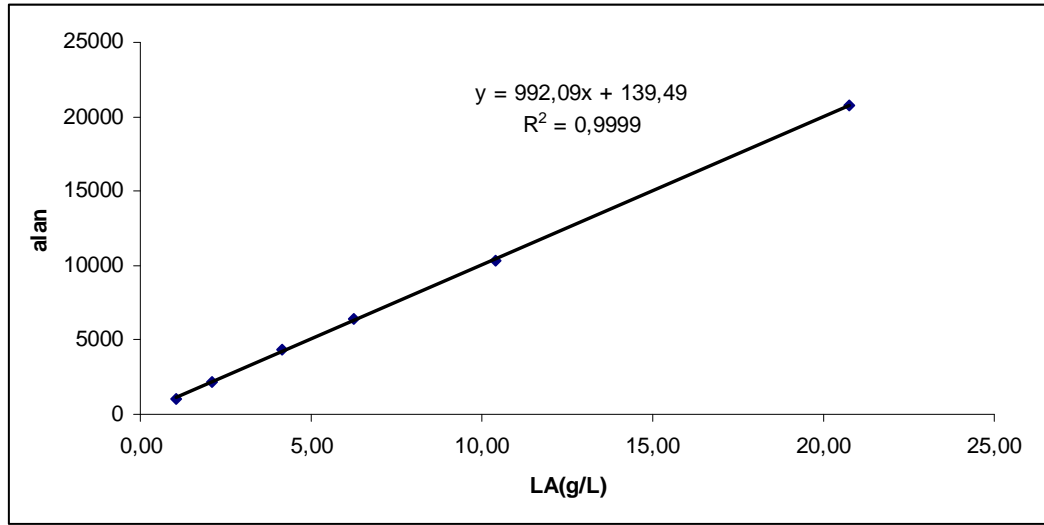
Şekil 5.3. Mikroorganizma kuru ağırlığı (g/L) – absorbans (660 nm) kalibrasyon doğrusu

### 5.8.2. Laktik asit konsantrasyon tayini

Örneklerde laktik asit analizi için Agilent 1100 series marka yüksek basınç sıvı kromatografisi (YBSK) sistemi kullanılmıştır. Ayrımlar C18 (300x4,8mm) kolonuda, diyote array dedektörü (DAD) kullanılarak 210 nm dalga boyunda, 25 °C'de, 1ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiş, mobil faz olarak pH'ı 2,4 olacak şekilde ayarlanmış 5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi kullanılmıştır. Tipik bir kromatogram Şekil 5.4'de gösterilmiştir. Laktik asit standard kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 5.5' de verilmiştir.



Şekil 5.4. Melas çözeltisinde laktik asitin 210 nm de YBSK kromatogramı

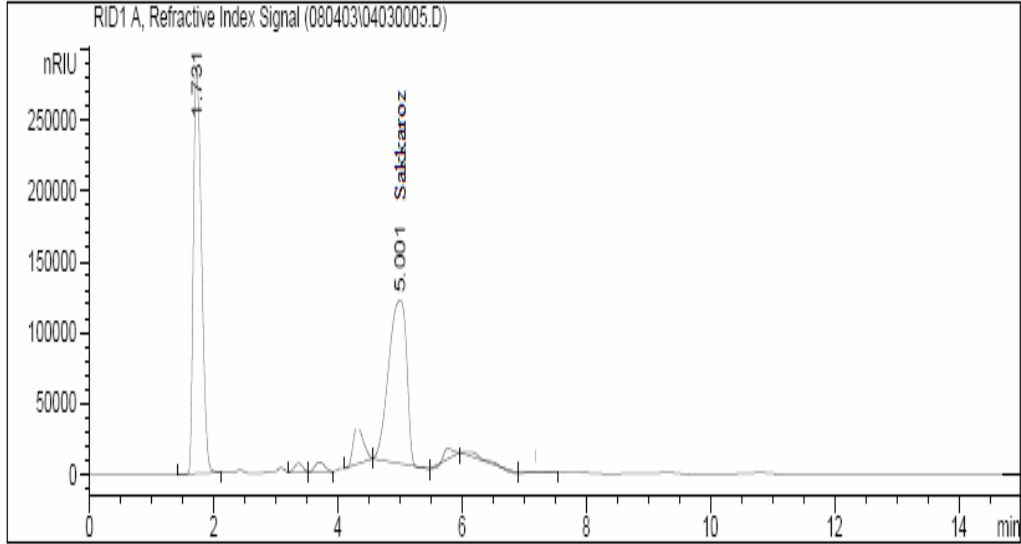


Şekil 5.5. Laktik asit kalibrasyon doğrusu

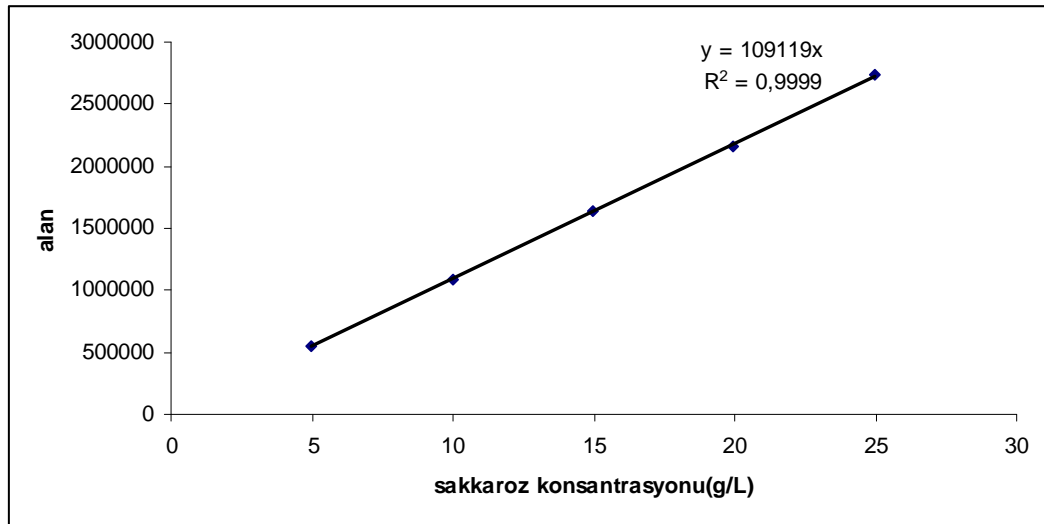
### 5.8.3 Şeker konsantrasyon tayini

Şeker analizi için ayrımlar Supelcosil LC-NH2 (250x4,6mm, 5µm) kolonunda, refraktif indeks dedektörü (RID) kullanılarak 25 °C'de, 2 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiş, mobil faz olarak %75 asetonitrol-su (h/h) çözeltisi kullanılmıştır (Şekil 5.6). Tipik bir kromatogram Şekil 5.7 de gösterilmiştir.

Substrat konsantrasyonu (sakkaroz) Şekil 5.6 de verilen kalibrasyon doğrusu kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.6. Melas çözeltisinde sakkarozun kırılma indeks dedektöründe YBSK kromatogramı



Şekil 5.7. Sakkaroz kalibrasyon doğrusu

## 5.9. Deney tasarımı

Verilerin istatistiksel analizinde Minitab 14 istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Çalışmada 13 deneysel noktadan (8 farklı kombinasyona sahip ve merkezde beş tekrarlı) ve iki değişkenle oluşan merkez tümleşik istatistiksel tasarım (Central Composite Rotatable Design) kullanılmıştır. İncelenen parametrelerin seviyeleri ve bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu Çizelge 5.1 ve 5.2 de gösterilmiştir.

**Çizelge 5.1.** İncelenen parametreler ve seviyeleri

Faktör	Bağımsız değişkenler	Değişken Seviyeleri				
		- $\alpha$	-1	0	1	+ $\alpha$
X <sub>1</sub>	pH	4,60	5	6	7	7,40
X <sub>2</sub>	Maya özütü(g/L)	14,64	25	50	75	85,36

**Çizelge 5.2.** Bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu

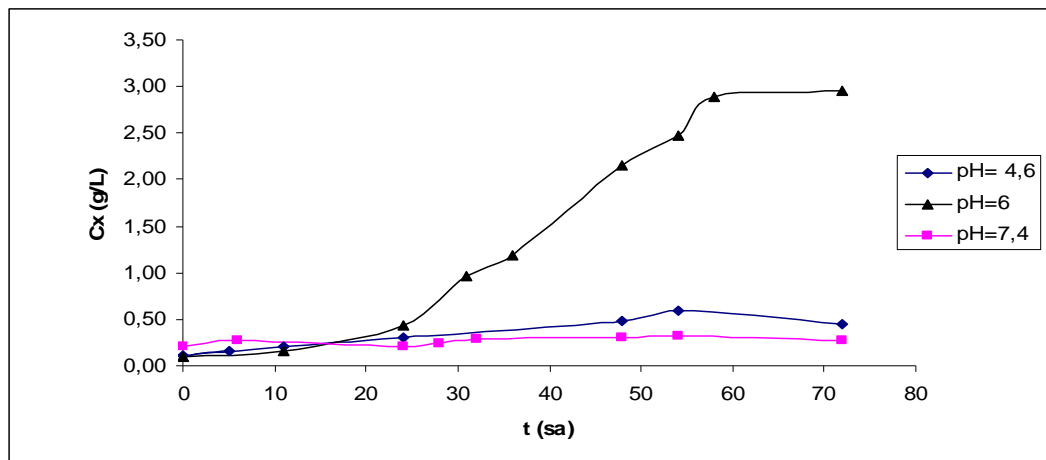
Deney no	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	pH	Maya özütü (g/L)
1	-1	-1	5	25
2	1	-1	7	25
3	-1	1	5	75
4	1	1	7	75
5	-1,41	0	4,6	50
6	1,41	0	7,4	50
7	0	-1,41	6	14,6
8	0	1,41	6	85,4
9	0	0	6	50
10	0	0	6	50
11	0	0	6	50
12	0	0	6	50
13	0	0	6	50

## 6. DENEYSEL BULGULAR

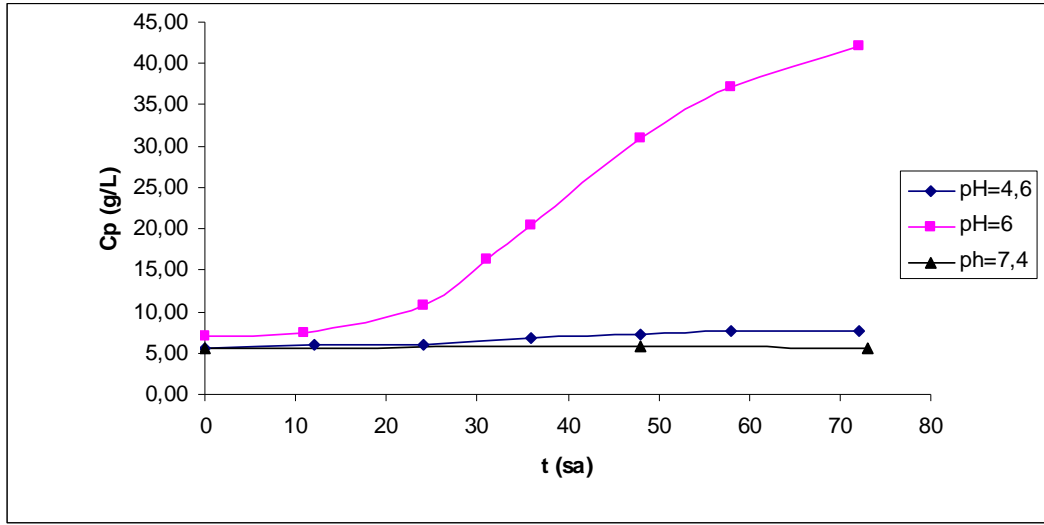
Melastan fermentasyonla *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 ile laktik asitin üretimi üzerine pH ve maya özütü konsantrasyonunun etkisi Cevap Yüzey Yöntemi ile belirlenmiş ve bulunan optimum koşullarda mikroorganizmanın çoğalma kinetiği incelenmiştir.

### 6.1. pH'in Laktik Asit Verimi ve Mikroorganizma Konsantrasyonu Üzerine Etkisi

*Lb. plantarum* ATCC 8014 ile melastan laktik asit üretimine ve hücre büyümesi ilişkin pH'in etkisi, başlangıç sakkaroz (203 g/L) ve maya özütü konsantrasyonları (50 g/L) sabit tutulup üç farklı pH değerinde oluşan laktik asit ve mikroorganizma kuru ağırlıkları tespit edilmiş ve bu verilerle elde edilen grafikler Şekil 6.1 ve 6.2'de gösterilmiştir. pH'in 4,6-6 değerleri arasında *Lb. plantarum*'un yoğunluğunun ve laktik asit konsantrasyonunun da arttığı, pH'in 6'dan büyük değerlerinde ise, hücre yoğunluğu ve laktik asit üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Hofvendahl ve Hagerdal (2000), Wee ve ark. (2004) ve Kotzamanidis ve ark. (2002) yaptığı çalışmalarda *Lactobacillus* türleri için pH 5-7 ve *Enterococcus faecalis* için ise 6-9 arasında çalışma kabiliyetleri olmasına karşın laktik asit konsantrasyonu için optimum pH organizma ve hammaddeye bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir.



Şekil 6.1. pH'in zamanla kuru ağırlık değişimi üzerine etkisi (Cs=203g/L, 50g/L maya özütü)



Şekil 6.2. pH'ın zamanla laktik asit konsantrasyonu değişimi üzerine etkisi ( $C_s=203\text{g/L}$  ve  $50\text{g/L}$  maya özütü)

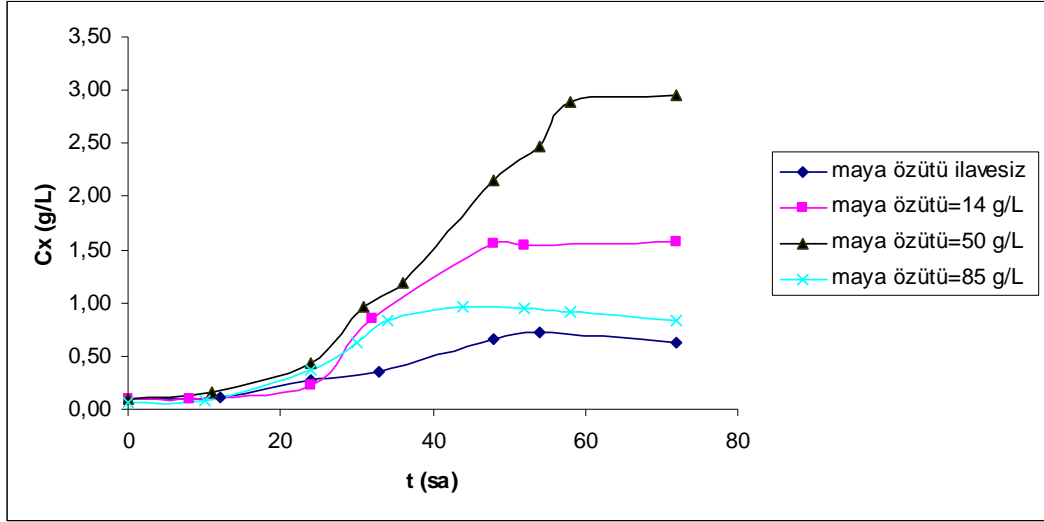
## 6.2. Maya Özütü Konsantrasyonunun Laktik Asit Verimi ve Mikroorganizma Konsantrasyonu Üzerine Etkisi

*Lb. plantarum* ATCC 8014 ile melastan laktik asit üretimine ve hücre büyümesine ilişkin maya özütü konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Başlangıç sakkaroz konsantrasyonu ( $203\text{g/L}$ ) ve pH (6) sabit tutulup maya özütü ilavesinden ve üç farklı maya özütü konsantrasyonunda ( $14$ ,  $50$  ve  $85\text{g/L}$ ); oluşan laktik asit ve mikroorganizma kuru ağırlıkları tespit edilmiştir. Bu verilerle elde edilen grafikler Şekil 6.3 ve 6.4'da gösterilmiştir. Maya özütü konsantrasyonu  $50\text{g/L}$ 'ye kadar artırılmasıyla laktik asit konsantrasyonunun arttığı,  $50\text{g/L}$ 'den daha yüksek ilavesinde ise laktik asit veriminin azaldığı gözlenmiştir.

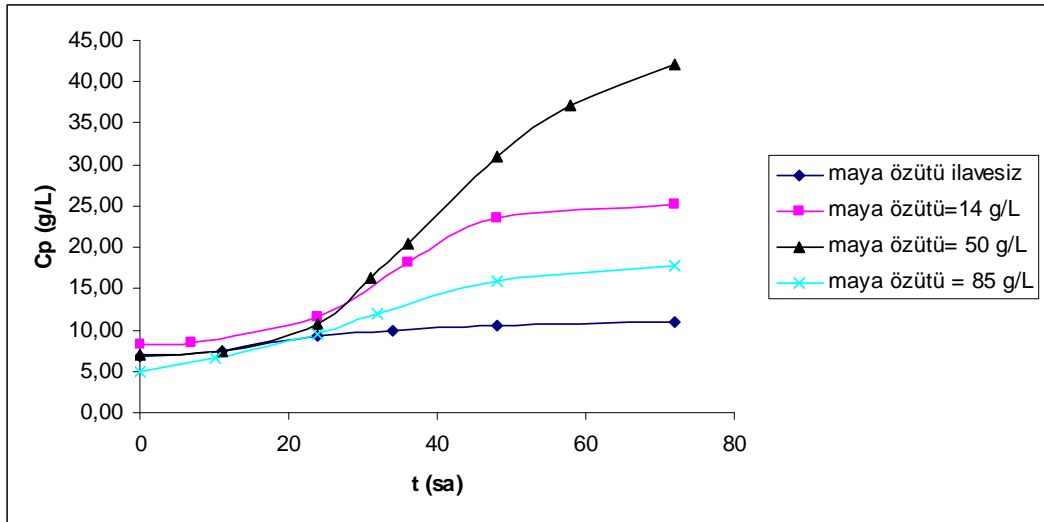
Maya özütünün etkisi; laktik asit üretimini maya özütü konsantrasyonunun %1 den %5 (w/v) artırılmasıyla arttığı, daha yüksek konsantrasyonda ilavesinde muhtemel toksik etki yarattığından laktik asit üretimi azalmıştır. Bu sonuç Kotzamanidis ve ark.(2002) yaptığı “melastan *Lb. delbrueckii* NCIMB 8130 kültür kullanılarak laktik asit optimizasyonu” çalışmaya paralellik gösterirken, Göksungur ve Güvenç (1997) “*Lb.delbrueckii* IFO 3202 kültürüyle maya özütünün melastan laktik üretimi üzerine etkisi” konulu çalışmada maksimum laktik asit üretimine %1 (w/v) maya özütü ilavesiyle ulaşılmıştır.



Kotzamanidis ve ark. (2002) bu farklılıkları; farklı mikroorganizma türleri, melasın kimyasal kompozisyonu ve fermentasyon sisteminden dolayı kaynaklanabileceğini savunmuşlardır.



Şekil 6.3. Maya özütü konsantrasyonunun zamanla kuru ağırlık değişimi üzerine etkisi ( $C_s=203\text{g/L}$  ve  $\text{pH}=6$ )



Şekil 6.4. Maya özütünün zamanla laktik asit konsantrasyonu değişimi üzerine etkisi ( $C_s=203\text{g/L}$ ,  $\text{pH}=6$ )

### 6.3. Cevap Yüzey Yöntemi ile Deneysel Tasarım

Deneysel çalışmaların birinci aşamasında, her defasında tek değiştirme yaklaşımı ile; diğer faktörlerin sabit tutulup tek faktörün değiştirilmesi ile şeker pancarı melasından *Lb. plantarum* ATCC 8014 ile laktik asit üretimine pH ve maya özütü konsantrasyonunun etkileri incelenmiştir. İkinci aşamada ise parametrelerin laktik asit üretimi üzerine etkileri incelemek ve en yüksek verimin elde edildiği koşulları belirlemek için gerekli deney planının oluşturulması amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) uygulanmıştır. Bölüm 5.9. de açıklandığı gibi parametrelerin alt ve üst değerleri, pH için 5-7; maya özütü konsantrasyonu içinde 25-75 g/L seçilmiştir. Bu çalışmada kullanılan deneysel tasarım noktaları ve cevapları Çizelge 6.1’de verilmiştir.

Tasarım matrisi ve herbir terimin uyumu varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 6.2’de verilmiştir. Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları Çizelge 6.3’de gösterilmiştir. Laktik asit üretimi için ikinci derece polinom eşitliği (6.1)’de verilmiştir.

$$\text{Laktik asit (g/L)} = -605,5 + 204,46 \cdot X_1 + 1,61 \cdot X_2 - 17,112 \cdot X_1^2 - 0,015 \cdot X_2^2 - 0,031 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (6.1)$$

**Çizelge 6.1.** Deneysel tasarım noktaları ve laktik asit miktarları (g/L)

pH	Maya özütü (g/L)	Laktik asit (g/L)
5	25	19,13
7	25	17,3
5	75	12,98
7	75	8,08
4,6	50	7,67
7,4	50	5,53
6	14,64	25,12
6	85,36	17,65
6	50	42,11
6	50	41,46
6	50	40,92
6	50	39,23
6	50	40,35

**Çizelge 6.2.** İkinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

	SD	KT	Düz.KT	Düz.KO	F	P
Regresyon	5	2532,09	2532,09	506,42	369,46	<0,001
Lineer	2	95,97	1939,09	969,54	707,34	<0,001
İkinci derece	2	2433,76	2433,76	1216,88	887,78	<0,001
Etkileşim	1	2,36	2,36	2,36	1,72	0,231
Artık hata	7	9,59	9,59	1,37		
Uyum eksikliği	3	4,89	4,89	1,63	1,35	0,377
Saf hata	4	4,7	4,7			
Toplam	12	2541,69				

SD: serbestlik dercesi, KT: kareler toplamı, Düz.KT: düzeltilmiş kareler toplamı,

Düz.KO: düzeltilmiş kareler ortalaması

**Çizelge 6.3.** Laktik asit (g/L) için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH Kat.	T	P
Sabit	-605,50	17,64	-34,53	<0,001
X1	204,46	5,47	37,6	<0,001
X2	1,61	0,16	10,17	<0,001
X1 <sup>2</sup>	-17,112	0,44	-38,55	<0,001
X2 <sup>2</sup>	-0,015	0,0007	-21,89	<0,001
X1*X2	-0,031	0,0234	-1,21	0,231

Yapılan varyans analizi sonucunda pH ve maya özütü konsantrasyonunu laktik asit üretimi üzerine doğrusal, kuadratik etkilerinin F testinin %5 önem derecesinde anlamlı olduğu ( $P < 0,05$ ), her iki parameterenin kesişim etkilerinin anlamsız olduğu ( $P > 0,05$ ) bulunmuş ve bu etkileşim çıkarılıp tekrar analizi yapılmıştır ve sonuçları Çizelge 6.4 ve 6.5’de verilmiştir.

**Çizelge 6.4.** İkinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi

	SD	KT	Düz.KT	Düz.KO	F	P
Regresyon	4	2529,73	2529,73	506,42	423,35	<0,001
Lineer	2	95,97	2302,14	1151,07	707,52	<0,001
İkinci derece	2	2433,76	2433,76	1216,88	887,78	<0,001
Artık hata	8	11,95	9,59	1,49		
Uyum eksikliği	4	7,25	7,25	1,81	1,50	0,352
Saf hata	4	4,7	4,7			
Toplam	12	2541,69				

**Çizelge 6.5.** Laktik asit(g/L) için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH Kat.	T	P
Sabit	-596,3	16,9	-35,51	<0,001
X1	202,93	5,57	36,6	<0,001
X2	1,41	0,076	18,72	<0,001
X1^2	-17,01	0,46	-36,93	<0,001
X2^2	-0,015	0,0007	-20,97	<0,001

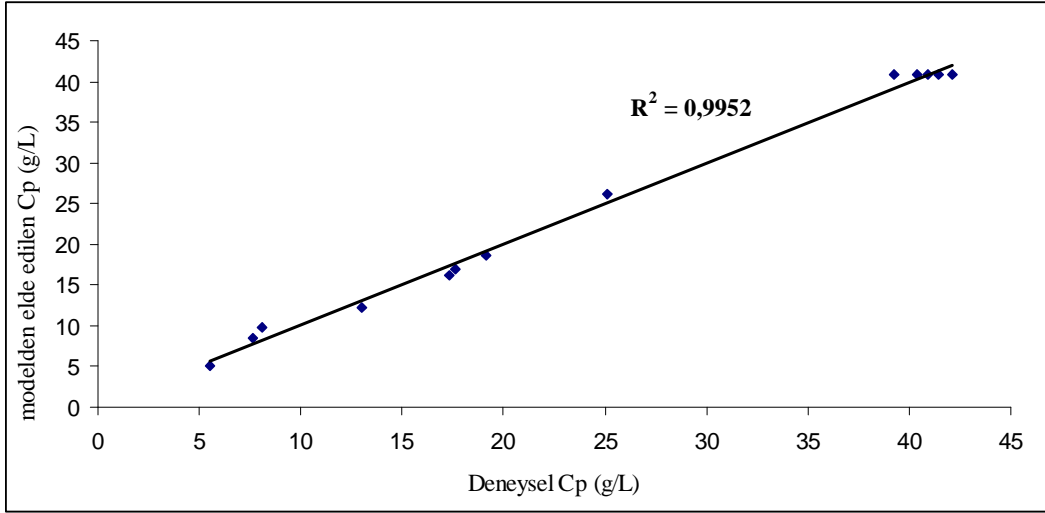
Laktik asit üretimi için ikinci derece polinom eşitliği (6.1)'de verilmiştir.

$$Y = -596,3 + 202,93 \cdot X1 + 1,41 \cdot X2 - 17,01 \cdot X1^2 - 0,015 \cdot X2^2 \quad (6.2)$$

Yapılan deneylerin sonuçları ve denklem (6.2) de öngörülen modelden elde edilen verilerin karşılaştırılması Çizelge 6.6 ve Şekil 6.5'de verilmiştir.

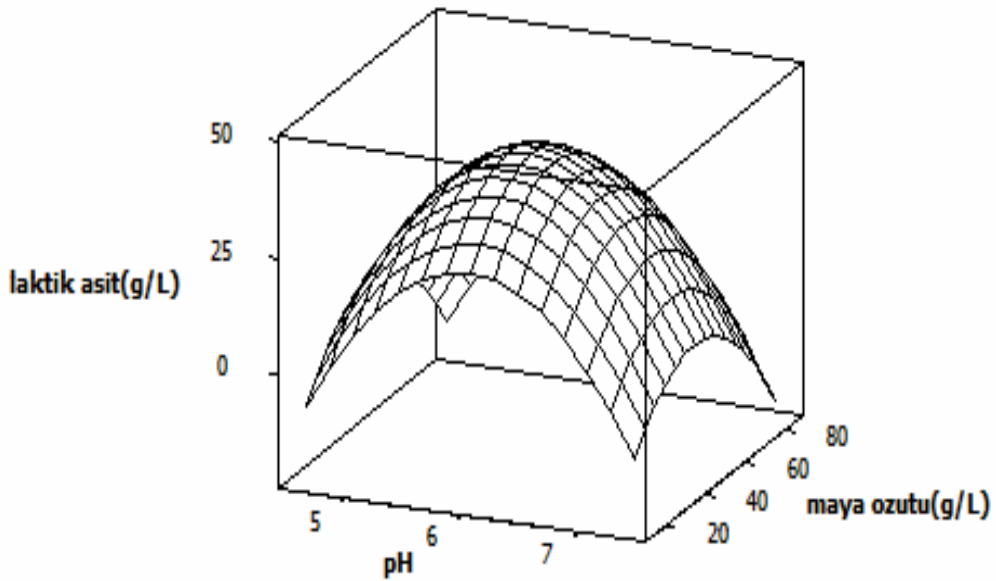
**Çizelge 6.6.** Deneylerden elde edilen cevapların modelden elde edilen cevaplarla karşılaştırılması

DeneySEL LA(g/L)	Modelden elde edilen LA (g/L)	Fark
19,13	18,64	0,49
17,3	16,20	1,10
12,98	12,16	0,82
8,08	9,72	-1,64
7,67	8,51	-0,84
5,53	5,07	0,46
25,12	26,16	-1,04
17,65	16,99	0,66
42,11	40,81	1,30
41,46	40,81	0,65
40,92	40,81	0,11
39,23	40,81	-1,58
40,35	40,81	-0,46



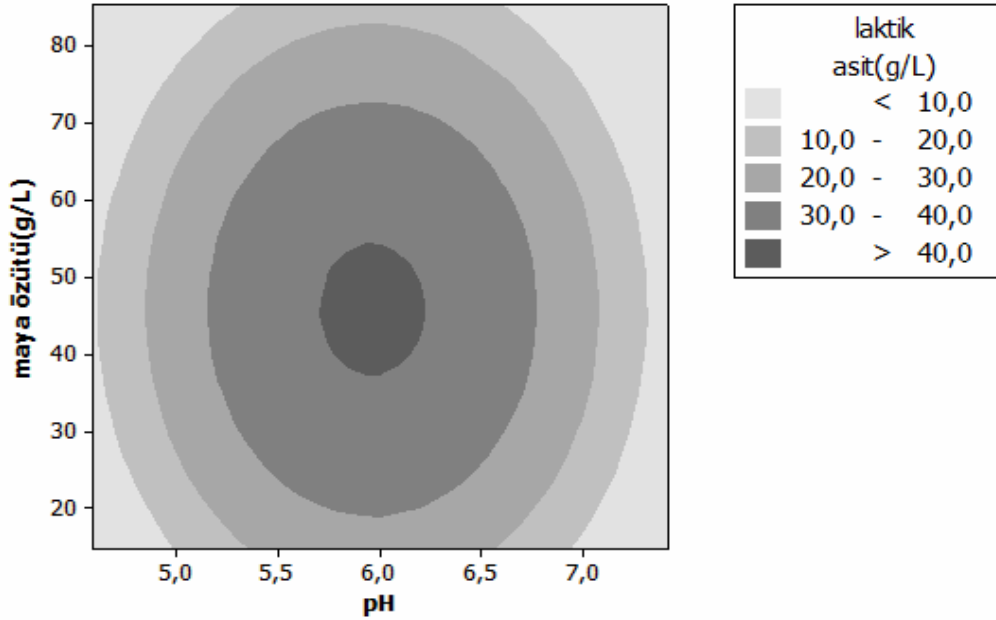
**Şekil 6.5.** Deneysel değerlere karşı modelin önerdiği değerler arasındaki doğrusal ilişki.

Şekil 6.6'da verilen yüzey grafiğinde her iki parameterinin laktik asit üretimi üzerine olan kuadratik etkileri görülmektedir. Grafik incelendiğinde pH ve maya özütü konsantrasyonunun laktik asit üretimi üzerine olan negatif kuadratik etkilere bağlı olarak orta değerlere kadar laktik asit üretiminin arttığı ve daha yüksek değerlere çıktığında laktik asit üretiminin azaldığı görülmüştür.



**Şekil 6.6.** Farklı pH ve maya özütü konsantrasyonlarındaki laktik asit üretimine ait yüzey grafiği

Şekil 6.7’de verilen kontur grafiğinde ise incelen sınır noktalarına bağlı olarak orta değerlerde en yüksek laktik asit konsantrasyonlarının elde edildiği görülmüştür.



Şekil 6.7. Farklı pH ve maya özütü konsantrasyonlarındaki laktik asit üretimine ait kontur grafiği

*Lb. plantarum* ATCC 8014 ile laktik asit üretiminde optimum parametrelerin hesaplanması amacıyla yüzey merkezli tasarıma ait regresyon katsayıları kullanılarak pH ve maya özütü konsantrasyonu olan ik değişken için matris çözümlenmesi Matlab 7.0 versiyonu kullanılarak yapılmıştır (Montgomery, 2000).

$$Y = -596,3 + 202,93 \cdot X_1 + 1,41 \cdot X_2 - 17,01 \cdot X_1^2 - 0,015 \cdot X_2^2 \quad (6.2)$$

şeklinde bulunan denklemin katsayıları kullanılmıştır.

$$b = \begin{pmatrix} 202,93 \\ 1,41 \end{pmatrix}, \quad B = \begin{pmatrix} -17,01 & 0 \\ 0 & -0,015 \end{pmatrix}$$

$$B^{-1} = \begin{pmatrix} -0,0588 & 0 \\ 0 & -66,667 \end{pmatrix}$$

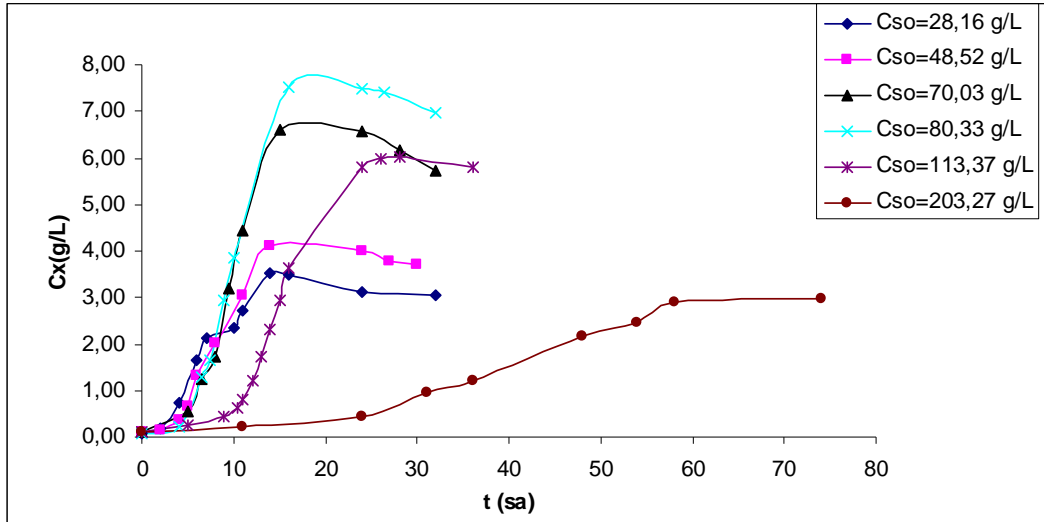
$$X = -1/2 \cdot B^{-1} \cdot b$$

$$X = \begin{pmatrix} 5,97 \\ 47 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \end{pmatrix}$$

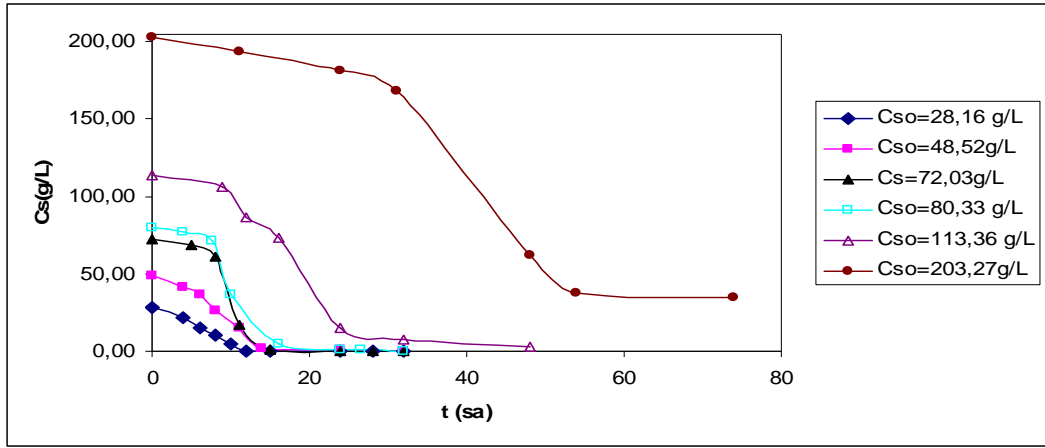
Yapılan çözümlleme sonucu optimum laktik asit üretiminin pH 5,97 ve 47g/L maya özütü konsantrasyonunda elde edileceği belirlenmiş ve bu değerlerin denklemde yerine koyulmasıyla laktik asit konsantrasyonu 42,07 g/L olarak tespit edilmiştir. Optimum noktada tekrarlanan deneme sonucunda 41,52 g/L laktik asit elde edilmiş ve elde edilen değer model tarafından hesaplanan 42,07 g/L değerine yakın olduğu görülmüştür.

#### 6.4. Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

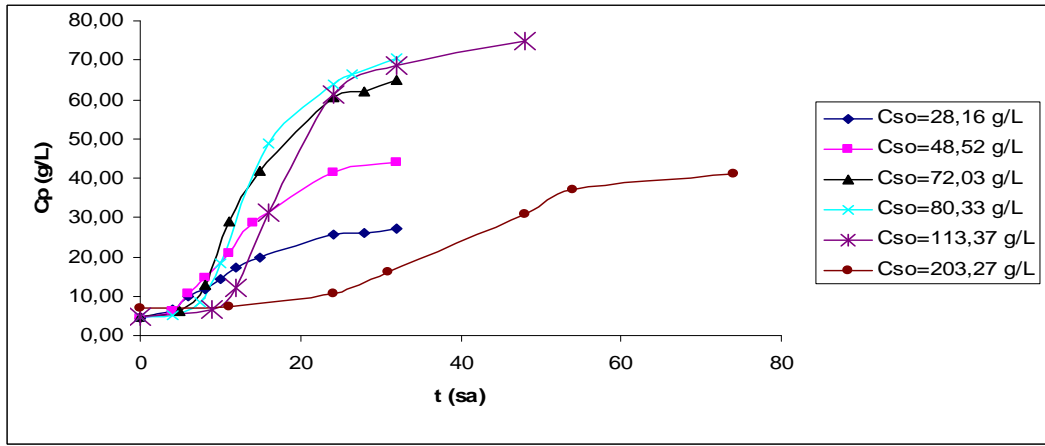
*Lb. plantarum* ATCC 8014 ile melastan laktik asit üretiminde, optimum pH ve maya özütü konsantrasyonu cevap yüzey yöntemiyle belirlendikten sonra (pH=5,97 ve maya özütü=47 g/L) bu değerler sabit tutularak, başlangıç substrat (sakkaroz cinsinden) konsantrasyonlarının (28,16g/L, 48,52g/L, 72,03g/L, 113,36g/L ve 203,27g/L); laktik asit üretimi, *Lb. plantarumun* büyümesi ve fermentasyon süresince sakkaroz konsantrasyonunun değişimi üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 6.8-6.11).



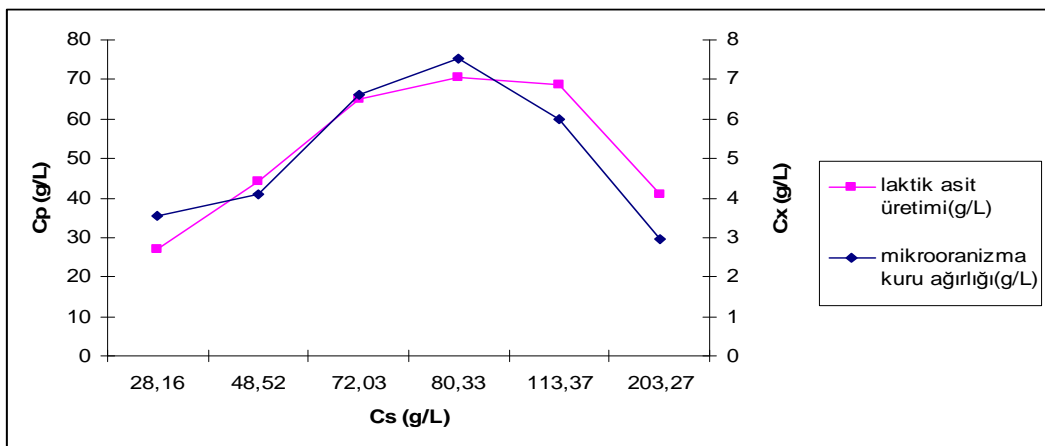
Şekil 6.8. Farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarda mikroorganizmanın zamanla kuru ağırlık değişimi (pH=6 ve maya özütü=47g/L)



Şekil 6.9. Fermentasyon süresince artakalan şeker miktarı (pH=6 ve Cmaya özütü=47g/L)



Şekil 6.10. Fermentasyon süresince laktik asit konsantrasyonunun değişimi (pH=6 ve maya özütü=47g/L)



Şekil 6.11. Başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun laktik asit konsantrasyonu ve hücre yoğunluğuna etkisi (pH=6 ve maya özütü=47g/L)

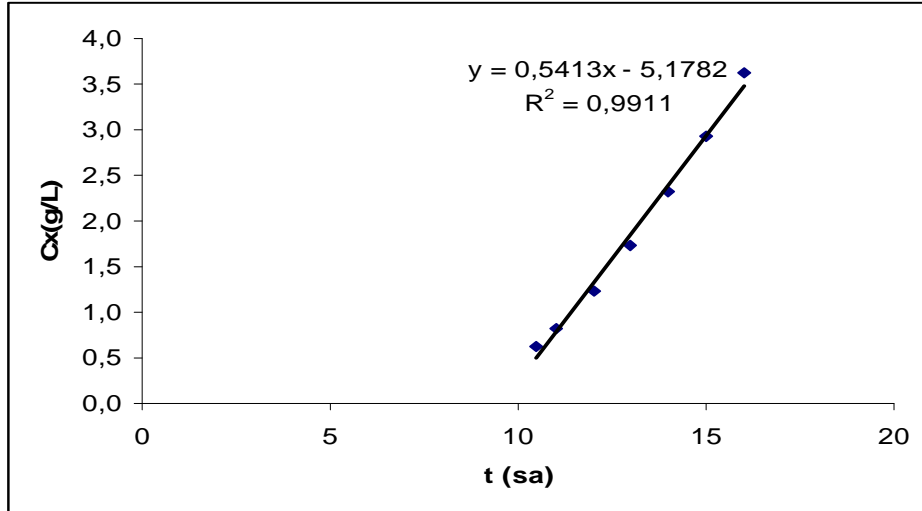


Yapılan deneyler sonucu substrat konsantrasyonunun 80,33 g/L'e kadar artmasıyla *Lb. plantarum* yoğunluğu arttığı ve buna bağlı olarak laktik asit konsantrasyonunun da arttığı, bu değerden sonrada kuru ağırlık ve laktik asit konsantrasyonunun azaldığı görülmüştür.

Fermentasyon süresince substrat miktarının artması adaptasyon süresinin uzamasına neden olmuştur.

### 6.5. Büyüme Kinetiğinin Monod Kinetik Modeline Uygunluğunun İncelenmesi

Fermentörde hücre çoğalma kinetiği incelenirken hücrenin büyüme evresi olan eksponensiyel evre ele alınır. Örneğin  $C_{so}=113,37$  g/L için eksponensiyel evre Şekil 6.12'de gösterilmiştir ve eğimi  $C_{so}=113,37$  g/L için spesifik büyüme hızını ( $\mu$ ) vermektedir. Tüm başlangıç substratları için bu grafikler spesifik büyüme hızları bulunmuştur. Bu değerler Çizelge 6.7'de ve Monod eşitliğine göre limitleyen substrata (sakkaroz) karşın spesifik büyüme hızı grafiği Şekil 6.13'de verilmiştir.



Şekil 6.12.  $C_{so}=113,37$  g/L için eksponansiyel evresi

Eksponansiyel evrede Monod eşitliği

$$r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (3.15)$$

kullanılarak modele uygunluk incelenmiştir.

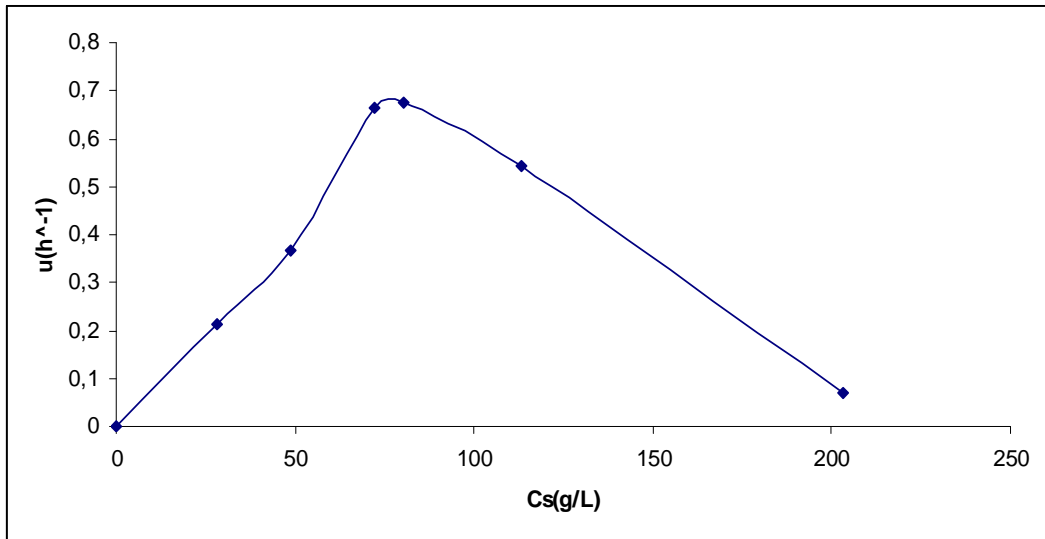
$$\int_{C_{x0}}^{C_x} \frac{(K_s + C_s) dC_x}{\mu_{\max} C_s C_x} = \int_{t_0}^t dt \quad (3.17)$$

Cs ve Cx arasındaki bağıntı çoğalma verimi (Yx/s) ile verilmektedir.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta C_x}{-\Delta C_s} = \frac{C_x - C_{x0}}{-(C_s - C_{s0})} \quad (3.18)$$

**Çizelge 6.7.** Başlangıç substratlarına göre hesaplanan spesifik büyüme hızları ve Yx/s

Cs (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Yx/s
28,16	0,2136	0,123
48,52	0,3678	0,0811
72,03	0,6631	0,0905
80,33	<b>(<math>\mu_{\max}</math>)=0,6766</b>	0,0936
113,36	0,5413	0,0533
203,27	0,0710	0,017



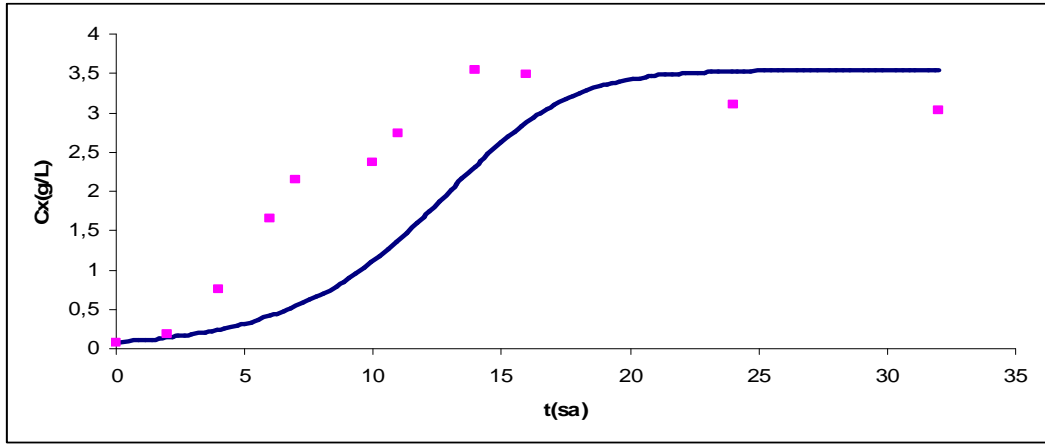
**Şekil 6.13.** Monod bağıntısına göre limitleyen substrata karşın spesifik büyüme hızı

Şekil 6.13’de  $\mu_{\max}=0,6766 \text{ sa}^{-1}$  değerinin yarısı  $\mu=0,3383 \text{ sa}^{-1}$  karşılık gelen Cs değeri ki sistem katsayısı;  $K_s=39,33\text{g/L}$  olarak alınmıştır.

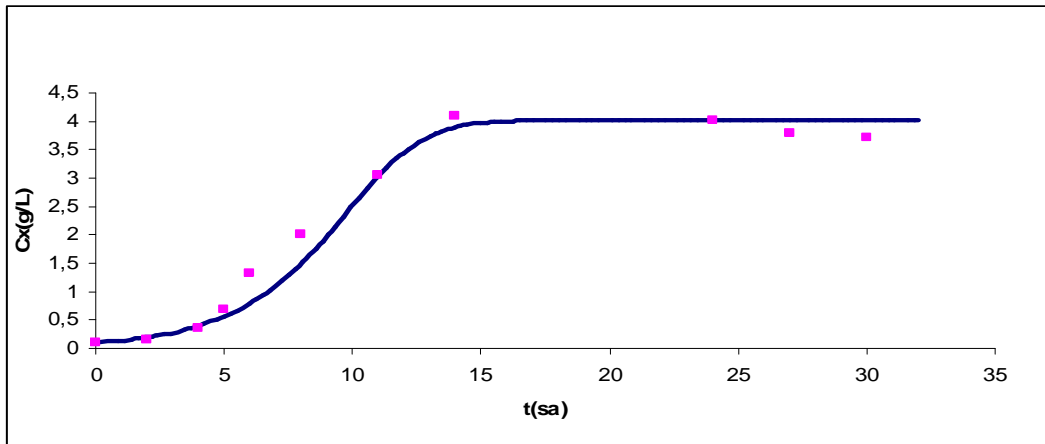
Farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarında (28,16g/L, 48,52g/L, 72,03g/L, 113,36g/L ve 203,27g/L), *Lb. plantarum* kuru ağırlığı ve sakkaroz değişimleri için birinci mertebeden diferansiyel denkleme ( $dC_x/dt=\mu C_x$ ) monod eşitliği uygulanmış ve differensiyel deklemlerin çözümleri Polymath 6.10 (Educational version) programı ile RKF45 (Runge-Kutta-Fehlberg) kullanılarak yapılmıştır. Örnek olarak;  $C_{s0}=80,33 \text{ g/L}$  için diferansiyel denklemin çözümü için kullanılan polymath kodları Çizelge 6.8’de verilmiştir. Uygulanan Monod modelinden elde edilen veriler ile deneysel verilerin karşılaştırılması Şekil 6.14-6.25’de verilmiştir.

**Çizelge 6.8.** Diferansiyel denklemin çözümü için kullanılan polymath yazılımı

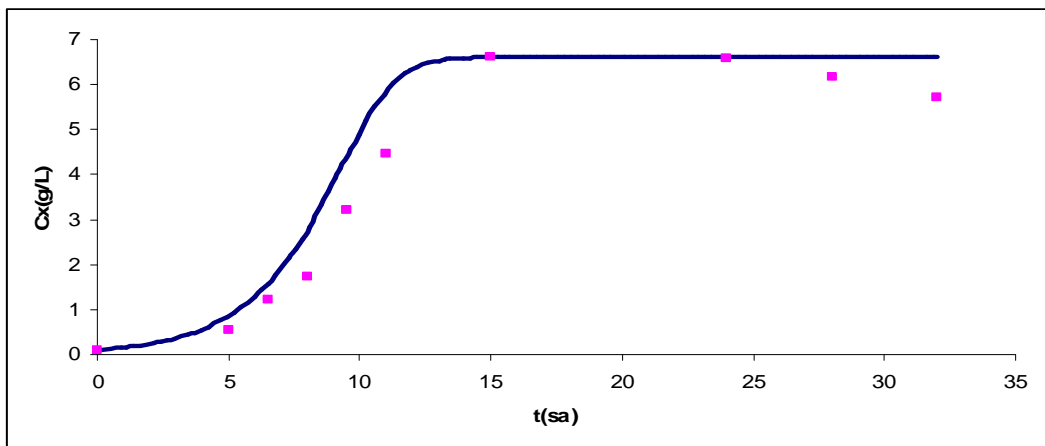
```
d(X) / d(t) = (umax*S*X)/(Ks+S) # büyüme hızı#
X(0) = 0.08 #başlangıç Lb.plantarum kuru ağırlığı#
S=So-(X-X(0))/Yxs
Yxs=0.0936 #S ve X arasında çoğalma verimi#
So= 80.33 #başlangıç substrat konsantrasyonu (g/L)#
umax=0.677 # maksimum spesifik büyüme hızı#
Ks=39.33 # sistem katsayısı#
t(0) = 0
t(f) = 32
```



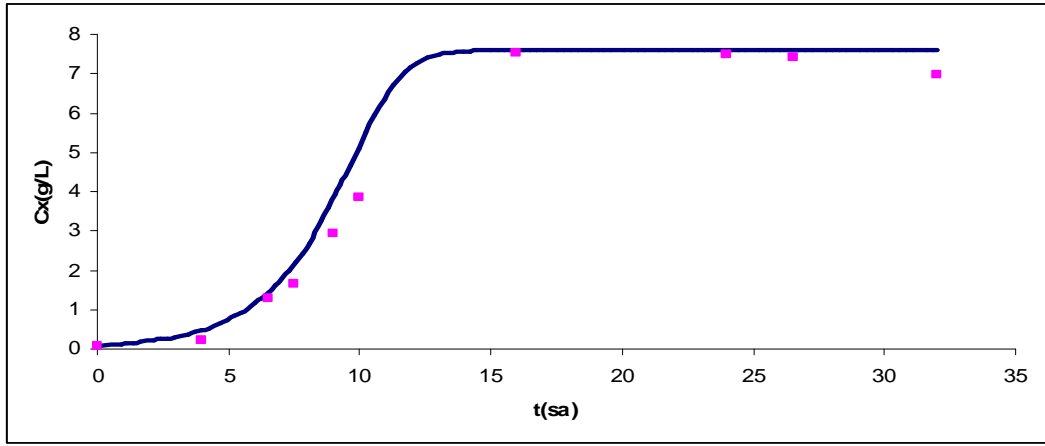
Şekil 6.14.  $C_{so}=28,16\text{g/L}$  için hücre büyümesi (– ; model, ● ; deneysel veri)



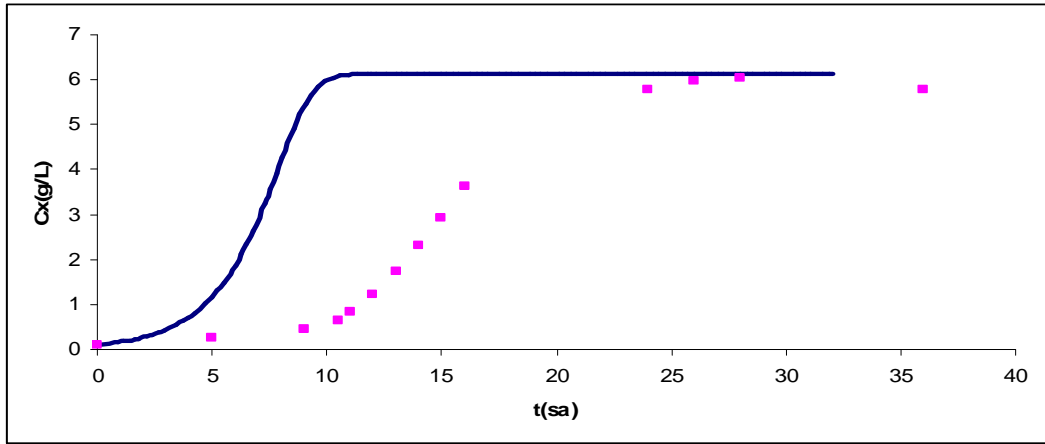
Şekil 6.15.  $C_{so}=48,52\text{g/L}$  için hücre büyümesi (– ; model, ● ; deneysel veri)



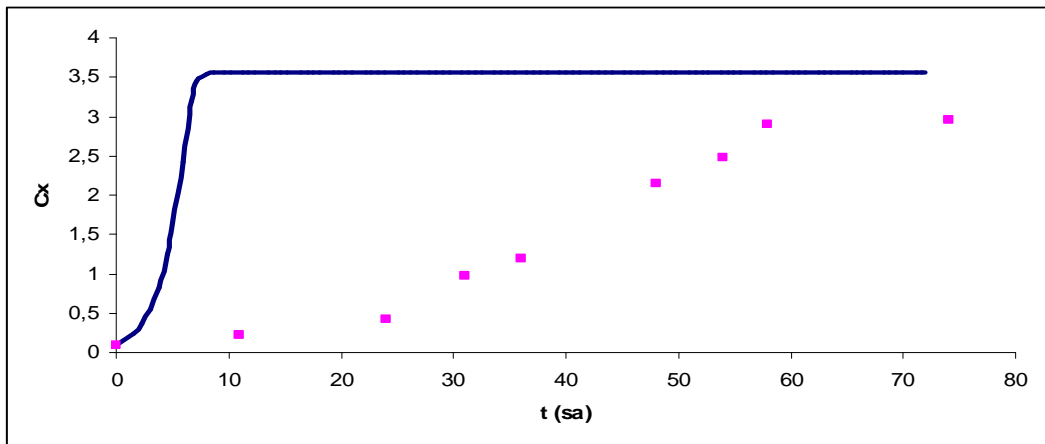
Şekil 6.16.  $C_{so}=72,03\text{ g/L}$  için hücre büyümesi (– ; model, ● ; deneysel veri)



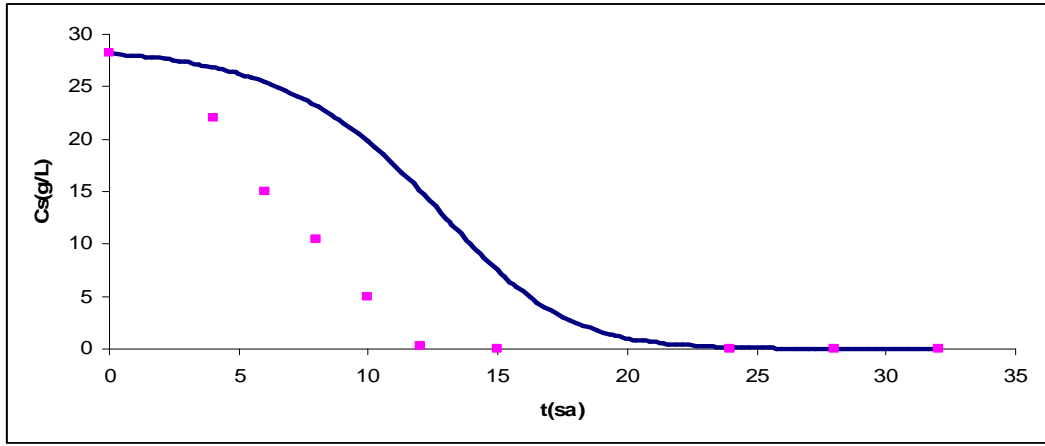
Şekil 6.17.  $C_{so}=80,33$  g/L için hücre büyümesi (– ; model, ● ; deneysel veri)



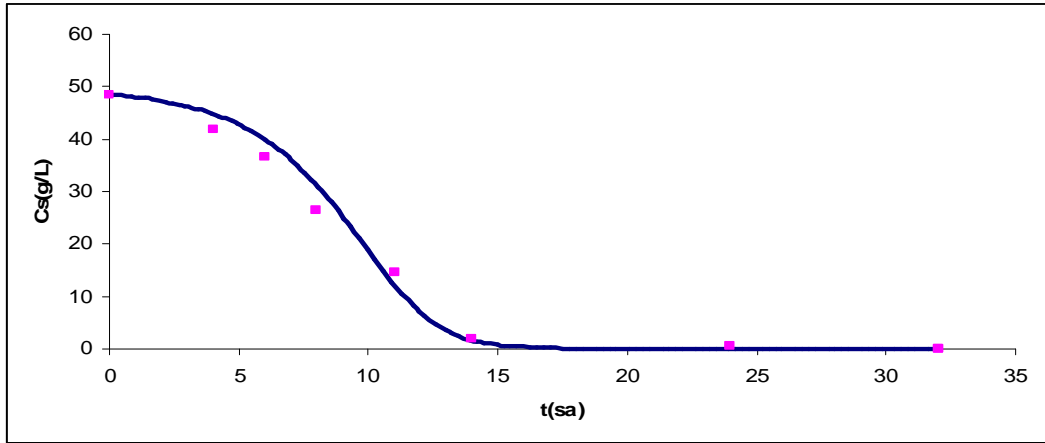
Şekil 6.18.  $C_{so}=113,36$  g/L için hücre büyümesi (– ; model, ● ; deneysel veri)



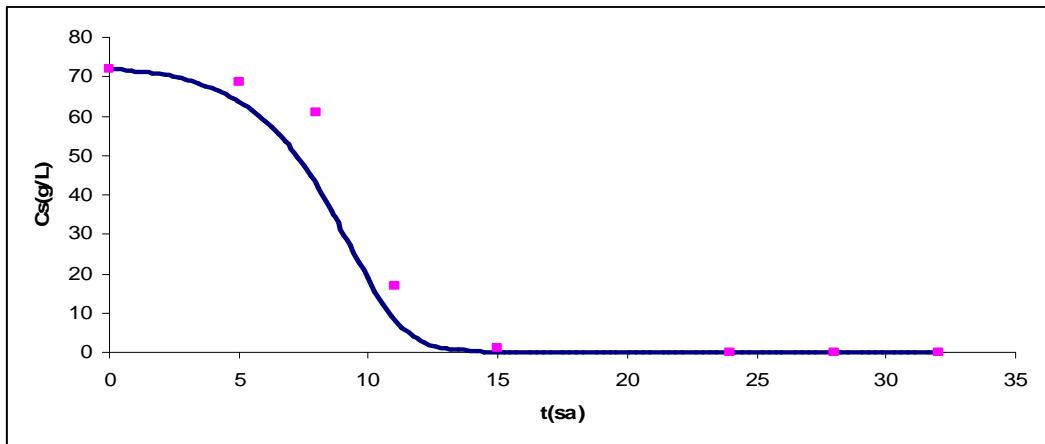
Şekil 6.19.  $C_{so}=203,27$  g/L için hücre büyümesi (– ; model, ● ; deneysel veri)



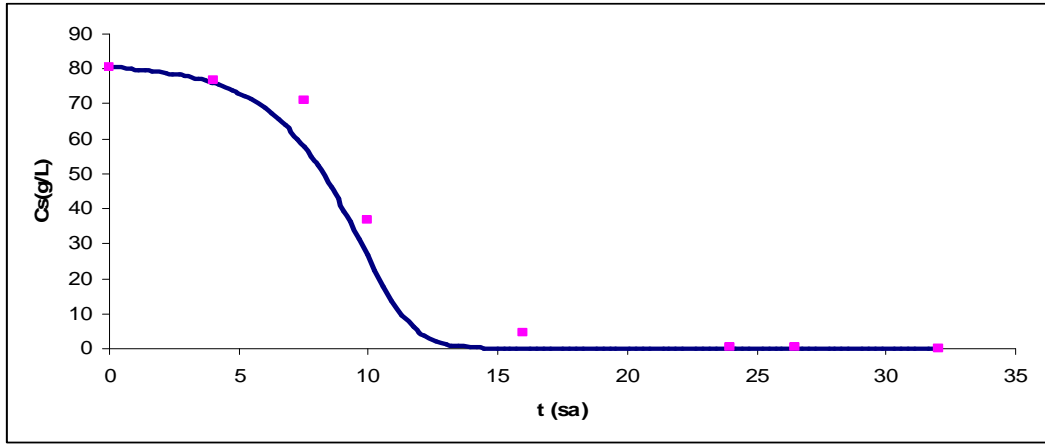
Şekil 6.20.  $C_{s0}=28,16\text{g/L}$  için sakkaroz tüketimi (– ; model, ● ; deneysel veri)



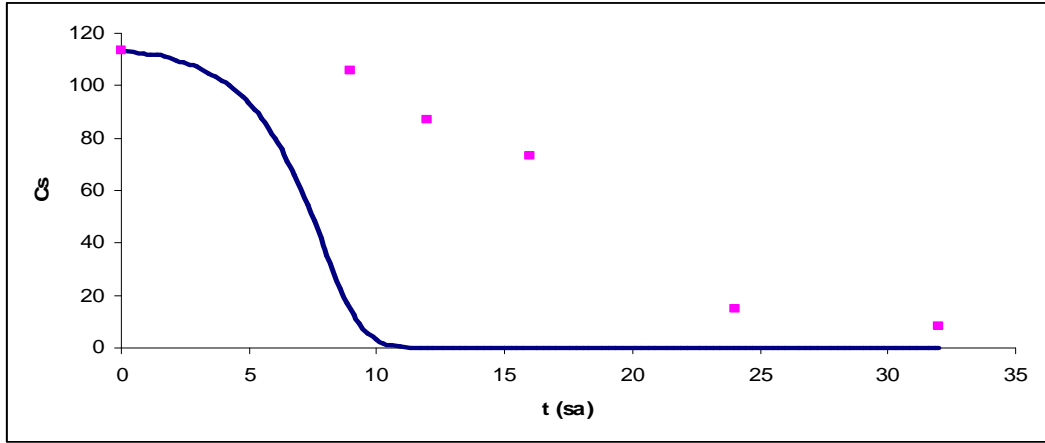
Şekil 6.21.  $C_{s0}=48,52\text{g/L}$  de sakkaroz tüketimi (– ; model, ● ; deneysel veri)



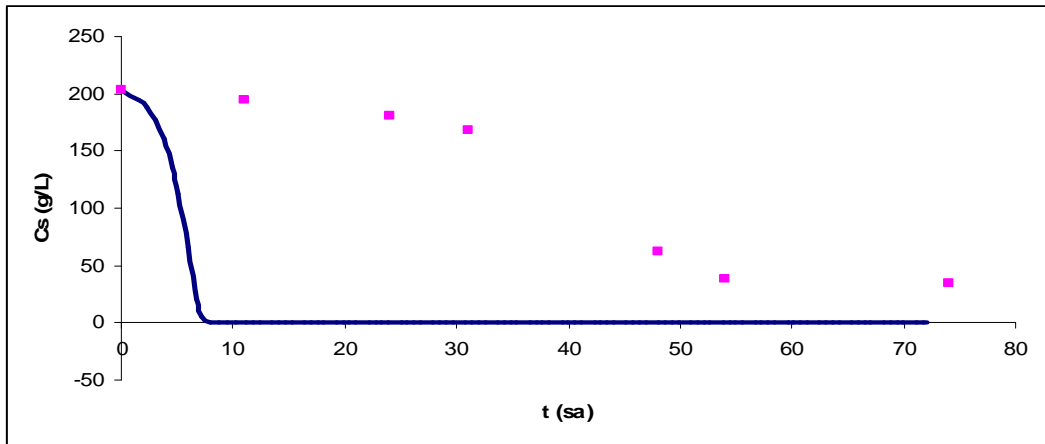
Şekil 6.22.  $C_{s0}=72,03\text{g/L}$  için sakkaroz tüketimi (– ; model, ● ; deneysel veri)



Şekil 6.23.  $C_{so}=80,33$  g/L için sakkaroz tüketimi (– ; model, ● ; deneysel veri)

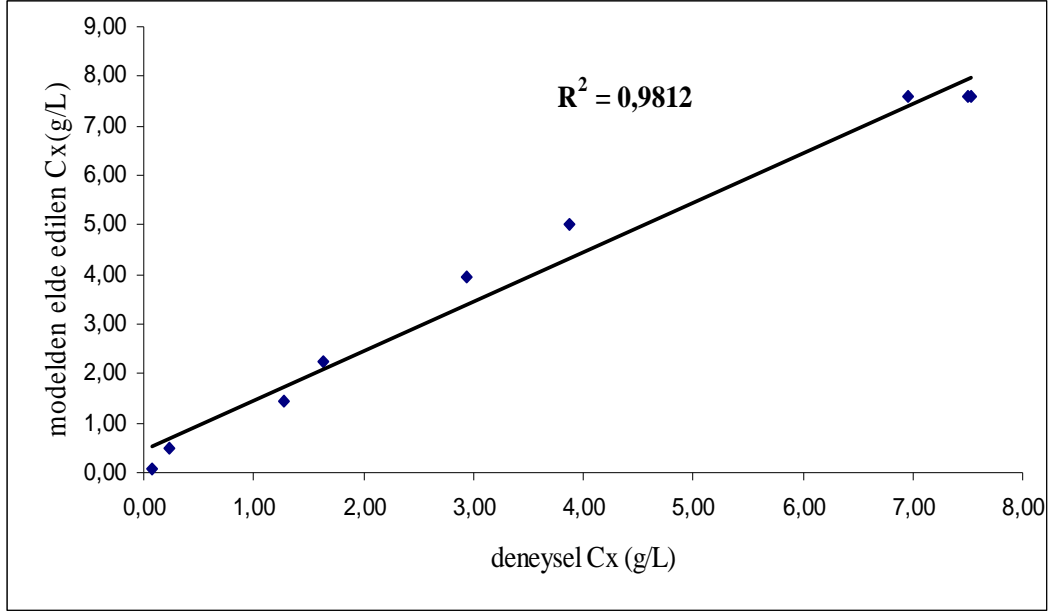


Şekil 6.24.  $C_{so}=113,36$  g/L için sakkaroz tüketimi (– ; model, ● ; deneysel veri)



Şekil 6.25.  $C_{so}=203,27$  g/L için sakkaroz tüketimi (– ; model, ● ; deneysel veri)

Deneysel veriler karşın tahmin edilen veriler grafiği çizilerek bu veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı ( $R^2$ ) tespit edildi. Örnek olarak  $C_{so}=80,33\text{g/L}$  için uyum katsayısı Şekil 6.26 gibidir. Diğer başlangıç konsantrasyonlarına ait veriler ve tespit edilen uyum katsayıları Çizelge 6.9’da gösterilmiştir.



**Şekil 6.26.** Hücre büyümesinde deneysel değerlere karşı model değerleri arasındaki doğrusal ilişki ( $C_{so}= 80,33\text{g/L}$ )



**Çizelge 6.9.** Farklı başlangıç konsantrasyonlarında hücre yoğunlukları (g/L) için elde edilen deneysel değerlere karşı model değerlerin karşılaştırılması

Cso=28,16g/L			Cso=48,52g/L		
t(sa)	deneysel Cx (g/L)	model Cx (g/L)	t(sa)	deneysel Cx (g/L)	model Cx (g/L)
0	0,08	0,08	0	0,09	0,09
2	0,18	0,15	2	0,16	0,20
4	0,75	0,24	4	0,35	0,39
6	1,66	0,42	5	0,67	0,55
7	2,14	0,58	6	1,33	0,79
10	2,36	1,18	8	2,01	1,52
14	3,54	2,31	11	3,06	3,09
16	3,49	2,94	14	4,10	3,86
24	3,11	3,52	24	4,01	4,00
32	3,03	3,52	32	3,70	4,00
R <sup>2</sup> =0,737			R <sup>2</sup> =0,977		
Cso=72,03g/L			Cso=80,33g/L		
t(sa)	deneysel Cx (g/L)	model Cx (g/L)	t(sa)	deneysel Cx (g/L)	model Cx (g/L)
0	0,1	0,10	0	0,08	0,08
5	0,54	0,86	4	0,23	0,48
6,5	1,23	1,61	6,5	1,27	1,46
8	1,73	2,86	7,5	1,64	2,23
9,5	3,21	3,97	9	2,94	3,96
11	4,45	5,97	10	3,87	5,02
15	6,62	6,61	16	7,54	7,60
24	6,58	6,62	24	7,50	7,60
32	5,71	6,62	32	6,96	7,60
R <sup>2</sup> =0,958			R <sup>2</sup> =0,981		
Cso=113,36g/L			Cso=203,27g/L		
t(sa)	deneysel Cx (g/L)	model Cx (g/L)	t(sa)	deneysel Cx (g/L)	model Cx (g/L)
0	0,10	0,1	0	0,10	0,1
5	0,27	1,173028	11	0,22	3,56
9	0,44	5,500053	24	0,43	3,56
12	1,2	6,138786	31	0,97	3,56
16	3,6	6,142087	36	1,19	3,56
24	5,8	6,142088	48	2,15	3,56
26	6,0	6,142088	54	2,47	3,56
32	6,0	6,14	58	2,89	3,56
R <sup>2</sup> =0,443			R <sup>2</sup> =0,205		

## 7. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Yapılan deneyler sonucu; pH'ın 4,6-6 değerleri arasında pH arttıkça *Lb. plantarumun* yoğunluğunun ve laktik asit konsantrasyonunun da arttığı, pH'ın 6'dan büyük değerlerde ise, hücre yoğunluğu ve laktik asit üretiminin azaldığı gözlenmiştir.

Maya özütü konsantrasyonu 50g/L'ye kadar artırılmasıyla laktik asit konsantrasyonunun arttığı, 50 g/L'dan daha yüksek ilavesinde muhtamel toksik etki yarattığından laktik asit verimini azaldığı gözlenmiştir.

Maya özütü konsantrasyonu ve pH parametrelerin laktik asit üretimi üzerine etkileri incelemek ve en yüksek verimin elde edildiği koşulları belirlemek için gerekli deney planının oluşturulması amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) uygulanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda pH ve maya özütü konsantrasyonunu laktik asit üretimi üzerine doğrusal, kuadratik etkilerinin F testinin %5 önem derecesinde anlamlı olduğu ( $P<0,05$ ), her iki parameterenin kesişim etkilerinin anlamsız olduğu ( $P>0,05$ ) bulunmuştur. Tasarım için  $R^2$  değeri 0,995 olarak elde edilmiştir. Bu değer; yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %99,5 doğrulukta açıklanabileceğini ifade etmektedir. Bu sonuç 13 deneysel nokta kullanılarak elde edilen model denkleminin incelenen bağımsız değişken aralığında yüksek doğrulukta kullanılabilirliğini göstermektedir. Elde edilen regresyon denkleminin katsayıları kullanılarak maksimum laktik asit konsantrasyonu (41,52g/L) sağlayacak optimum pH (5,97) ve maya özütü konsantrasyonu (47g/L) tespit edilmiştir.

Fermentasyon ortamının pH'ı, elde edilen ürünün tipine, çeşidine, mikroorganizma türüne göre değişmesine rağmen bu çalışmada bulunan pH değeri (pH=6) farklı *Lactobacillus* türlerinin çalışma aralığına uygunluk göstermiştir (Çizelge 2.2). Uygun maya özütü miktarları da pH değerlerinde olduğu gibi özellikle mikroorganizma ve hammaddeye göre değişiklik göstermesine rağmen %5 (a/h)'in üzerinde yüksek maya özütü miktarlarında laktik asit veriminin düşmesi literatürle uygunluk göstermektedir (Wee ve ark., 2004; Kontzanmanidis ve ark., 2002).

*Lb. plantarum*un büyüme kinetiğinin Monod modeline uygunluğunu incelemesinde ise; farklı başlangıç substrat (sakkaroz) konsantrasyonlarında büyüme kinetiği en düşük (28,16g/L) ve yüksek substrat konsantrasyonları (113,37g/L ve 203,27g/L) haricinde Monod denkleğinin en yalın durumuna uygunluk gösterdiği görülmüştür ( $R^2 > 0,95$ ). Monod modelinin uyumsuzluğın sebepleri; fermentasyon esnasında ürün inhibasyonu nedeniyle büyümenin engellenmesi, büyümeye karşı düşük substrat konsantrasyonu kısıtlaması ve yüksek substrat konsantrasyonun sebebiyet verdiği inhibisyon etkisi olarak düşünülmektedir (Khana ve ark., 2005).

Sonuç olarak, bu çalışmada *Lb. plantarum* ile melastan laktik asit üretilmiştir ve bu üretimde maksimum verimi verecek pH (6) ve maya özütü konsantrasyonu (47g/L) değerleri tespit edilmiştir. Farklı türlerle yapılan melastan laktik asit üretimiyle ilgili çalışmalarla karşılaştırıldığında, *Lb. plantarum* türünün bu amaç için uygun olduğu görülmüştür. Ancak laktik asit maliyetini düşürmek için maya özütüne alternatif bir azot kaynağının da incelenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aksu, Z. ve Kutsal. T. (1986), "Lactic acid production from molasses utilizing *Lb. delbrueckii* and invertase together," *Biotechnol Lett.*, **8**, 157–160.
- Anonim (2007), *Türkiye Şeker Fabrikası Faliyet Raporu*,  
<http://www.turkseker.gov.tr/FaaliyetRaporlari.aspx>
- Aljundi, I.H. (2001), *Fermentation and separation of lactic acid*, Doctor of Philosophy, Cleveland State university, A.B.D..
- Brown, C.M., Campbell, I. and Priest, F.G. (1987), *Introduction to Biotechnology*, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh, Scotland, 49-66.
- Cabral, J.M.S., Baross, L., Best, D ve Tramper, J. (1994), *Applied Biocatalysis*, Harwood Academic Publisher, Switzerland, 193-219.
- Carr, F.J., Chill. D. ve Miada. N. (2002), "The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey," *Critical Reviews in Microbiology*, **28**, 281-370.
- Curtin, V. (1983), *Molasses-General Considerations*, National Feed Ingredients Association West Moines, Iowa, A.B.D..
- Ertugay, Z. ve Certel, M. (1995), *Biyoteknoloji 1*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 13-18.
- Göksungur, Y., Güvenç, U. (1997) , "Batch and Continious Production of Lactic Acid from Beet Molasses by *Lactobacillus Delbrueckii*," *J. Chem. Tech. Biotechnol*, **69**, 399-404.
- Hamzaçelebi C. ve Kutay F. (2003), "Taguchi Metodu: Bir Uygulama," *Teknoloji Dergisi*, **6**, 7-17.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B. (2000) , "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable sources," *Enzyme and Microbal Technology*, **26**, 87-107.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B. (1997), "L(+)-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lctobacilli* and *Lactococci*," *Enzyme and Microbal Technology*," **20**, 301-307.
- Khana, N.S., Mishra, I.M., Singh, R.P., Prasad, B. (2005), "Modeling the growth *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in l-glutamic acid fermentation," *Biochemical Engineering Journal*, **25**, 173–178.

- Kristiansen, B. ve Radledge, C. (2001), *Basic Biotechnology*, Cambridge University Press, 2. baskı, Cambridge, United Kingdom, 201-205.
- Kontzanmanidis, C., Roukas, T. ve Skaracis, G. (2002) , “Optimization of lactic acid production from beet molasses Lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130”, *World J. Microbial. Biotechnol.* **18**, 442-448.
- Lee, J.M., (2001), *Biochemical Engineering*, Prentice-Hall Inc., Washington, A.B.D..
- Monteagudo, J.M., Rodriguez, L., Rincon, J. ve Fuertes, J. (1997), “Kinetics of lactic acid fermentation using by Lactobacillus delbrueckii grown on beet molasses”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **68**, 271-276.
- Montgomery D.C. (2000) , *Design and Analysis of Experiments*, Wiley Publisher, A.B.D..
- Nielsen, J., Villadsen, J. ve Liden, G. (2002), *Bioreaction Engineering Principles*, Pelnum Publisher, 2. baskı, New York, A.B.D..
- Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S. ve Ryu, H.W. (2005), “Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials,” *Bioresour. Technol.*, **96**, 1492-1498.
- Roukas. T. (1998), “Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production,.” *Process Biochemistry.*, **33**, 805–810.
- Schuler, M. L. ve Kargi ,F., *Bioprocess Engineering*, Prentice Hall International Series, 2. baskı , Houston, A.B.D., 520-521.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. ve Hall, S.J. (1995), *Principles of Fermentation technology*, Butterworth Heinemann, U.K, 1-5, 108-110, 155-160.
- Telefoncu A. (1995), *Biyoteknoloji* , Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 56-61, 81-82 , 219-221.
- Undercofler, L.A., Hickey, R.J. (1954), *Industrial Fermentations*, Volume 1, Chemical Publishing Co., New York, A.B.D., 396-409.
- Vaidya, A.N., Pandey, R.A., Mudliar, S., Kumar, M.S., Charakrabarti, T. ve Devotta, S. (2005), “Production and Recovery of Lactic Acid for Polylactide-An Overview,” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **35**, 429-467.

- Vogel, H.C., Todaro, C. L.(1997), *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*, Noyes Publications,A.B.D..
- Wee, Y.J, Kim, J.N, Yun, J.S. ve Ryu H.W. (2004), "Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* ," *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 568-573.
- Wee, Y.J, Kim, J.N, Yun, J.S. ve Ryu H.W. (2006), "Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications," *Food Technology Biotechnology*, **44**, 163-172