

**PORTAKAL ATIKLARINDAN *Aspergillus niger* FİLAMENLİ  
FUNGUSU KULLANILARAK SİTRİK ASİT ÜRETİMİNDE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ECE ÜMMÜ DEVECİ**

**Mersin Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Çevre Mühendisliği  
Ana Bilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Prof Dr. Mustafa ÖZYURT**

**MERSİN  
Kasım- 2008**

## ÖZ

Bu çalışmada sitrik asit üretimi araştırılmıştır. *Aspergillus niger* ve Akdeniz Bölgesi'nde yoğun üretimi yapılan narenciyelerden portakalın kabukları fermentasyon için kullanılmıştır. İlave substrat olarak şeker pancarı melası kullanıldı. Substratlar için optimum hidroliz ve ön işlem koşulları belirlenmiştir. Çalışmada ilk olarak sitrik asit fermentasyonu için sakkaroz içerikli ortamda kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde optimum inkübasyon süresi, başlangıç pH değişimi, başlangıç substrat derişimi, metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Daha sonra substrat olarak narenciye kabukları ve melas karışımı kullanılarak kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde optimum koşulları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan faydalanarak iki tip fermentörde (kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktör ve kesikli düzende çalışan kule fermentörü) optimizasyon çalışması yapılmıştır. Fermentörlerde substrat olarak portakal hidrolizatı ve melas kullanılmıştır. Kule fermentöründe optimum havalandırma oranı ve mikroorganizma oranı da belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre fermentör türü ve fermentörün çalışma prensibine bağlı olarak sitrik asit üretiminin değiştiği belirlenmiştir.

Sakkarozun substrat olarak kullanıldığı çalışmada maksimum sitrik asit üretimi 21,6 g/L olarak tespit edildi. Portakal kabuğu ve melas karışımının kullanıldığı kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktör çalışmasında ise maksimum sitrik asit 35,6 g/L olarak tespit edildi. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktör sisteminde elde edilen sonuçlar, kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktör çalışmasında belirlenen optimum koşullarla aynı olduğu ve kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktör çalışmasına göre verimliliği daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde optimum koşullarda elde edilen maksimum sitrik asit derişimi 38,7 g/L olarak belirlenmiştir. En yüksek sitrik asit üretimi ve mikrobiyal gelişim yarı sürekli havalandırmalı kule fermentöründe saptanmıştır. Kesikli düzende çalışan kule fermentörü çalışmasında optimum mikroorganizma oranı % 3 ve havalandırma hızı da 1 L/dakika olarak belirlenmiştir. Ayrıca kesikli düzende çalışan kule fermentöründe optimum koşullarda sitrik asit derişiminin 52,33 g/L olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre substrat olarak narenciye hidrolizatlarının verimli bir şekilde kullanılabileceği, ancak ortamda yeterli toplam şeker derişiminin

sağlanması için melasla zenginleştirilmesi gerekliliği, fermentör tipine bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliğinin değiştiği ve kesikli düzende çalışan kule fermentörünün çok verimli çalıştığı ve sitrik asit üretimi açısından uygun olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler.** Sitrik asit, *Aspergillus niger*, hidroliz, portakal hidrolizatı, melas, yarı sürekli havalandırılmal kule fermentörü, yarı sürekli havalandırılmal biyoreaktör.

## ABSTRACT

In this study citric acid production was investigated. *Aspergillus niger* and orange peels of citrus fruit that is grown in the Mediterranean region were used for fermentation. Sugar beet molasses were also used as an additional substrate. Optimum hydrolyzing and pre-treatment conditions were determined for substrate. For determining optimum citric acid production conditions, first saccharose used as a substrate in batch aerated shaker . Optimum incubation period, the effects of initial pH, effect of initial substrate concentration and the effect of methanol concentration onto the production yield of citric acid were investigated. After this study, orange peels of citrus fruit and molasses used as substrates and optimum conditions were investigated again. With utilizing these results optimization studies were done in two types of fermenter was used. (Batch Aerated Bioreactor, Batch Aerated Tower Fermenter). Orange hydrolysate as substrate is used for the fermenter studies. At the Batch Tower Fermenter, optimum aeration ratio and concentration of microorganisms were determined. According o the experimental results, it was determined that citric acid production changes with depending on fermentor type and working principle of fermentor.

At the first optimization study including saccharose as a substrate, maximum citric acid production was determined as 21,6 g/L. At the second optimization study with flask in shaker we used orange peels of citrus fruit and molasses as substrates, maximum citric acid determined as 35,6 g/L. The fermenter optimization studies were verified with batch shaker bioreactor but also it was determined that yield was higher than the one in batch shaker bioreactor studies. During the optimum conditions of Batch Aerated Bioreactor maximum citric acid was established as 38,7 g/L. The maximum citric acid production and microbial growth were determined at batch aerated tower fermenter. At the Batch Aerated Tower Fermenter, optimum microbial concentration and aeration rate were determined as 3 %, 1 L/min, respectively. Citric acid concentration was established as 52,33 g/L at the optimum production conditions of Batch Aerated Tower Fermenter. Obtained results show that citrus hydrolysate can be used as substrate but it has to be enriched with molasses to provide sufficient total sugar

during the fermentation period. Citric acid production provided a distinct difference in batch aerated tower fermenter compared with other fermenters.

**Key Words.** Citric acid, *Aspergillus niger*, hydrolyze, orange hydrolysate, molasses, tower fermenter, aerated bioreactor.

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca sağladığı bilimsel katkı, titizlik, sabır ve anlayışın yanı sıra verdiği manevi destek için danışmanım Sayın Prof Dr. Mustafa ÖZYURT'a teşekkür ederim. Tez çalışmamı izleyip sağladıkları katkı için Tez İzleme Komitesi üyelerim; Sayın Prof Dr. Ayla ÖZER ve Sayın Prof Dr. Halil KUMBUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının ilerlemesinde büyük payı olan, kendi laboratuvar olanaklarından sonuna kadar yararlandıran Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne, Sayın Doç Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU'na ve Sayın Prof Dr. Ömer Faruk ALGUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteğini, katkısını hiç eksik etmeyen, her anımda yanımda olan Dr. Mutlu YALVAÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda yardımcı olan ve katkı sağlayan Çevre Müh. Sevinç DEMİREL'e, Çevre Yük. Müh. Hilal DEMİRAY ve Erdoğan TÜRKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazılması sırasında destek ve yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Arş. Gör. Aydeniz DEMİR ve Arş Gör Olcay ÖZER'e, sekreterimiz Tuğba KESKİN'e ve kuzenim Zeynep TÜRKMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Stresli ve yoğun geçen bu dönem içinde göstermiş oldukları anlayış, sevgi ve hiç esirgemedikleri sabırları için; sevgili eşim Çevre Yük Müh. Tayfun DEVECİ ve canım oğlum Tarık DEVECİ'ye yürekten teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle ile her zaman yanımda olan, en umutsuz anımda bile azimli ve umut dolu olmam için kuvvet veren sevgili annem Ayşe DOĞAN'a, sevgili babam Mahmut Ali DOĞAN'a, canım kardeşlerim Dr. Durmuş DOĞAN ve Dr. Cezmi DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarımdaki destek ve yardımları için Çevre Mühendisliği Bölümü Öğrencilerine teşekkür ederim.

Bu alışma Mersin Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.  
(Proje No. BAP-FBE M(EUD) 2005-3DR)

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZ</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xvi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	xxv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	4
2.1. NARENCİYE.....	4
2.1.1. Narenciye Meyvelerinin Yapısı ve Bileşimi .....	9
2.1.1.1. Kabuk .....	10
2.1.1.2. Meyve eti .....	11
2.1.2.3. Meyve bileşimi.....	11
2.1.2. Önemli Narenciye Çeşitleri.....	12
2.1.3. Portakal Çeşitleri .....	13
2.1.3.1. Valencia .....	13
2.1.3.2. Navel.....	13
2.1.3.3. Shamouti.....	13
2.1.3.4. Hamlin .....	13
2.1.3.5. Kan portakalları.....	14
2.1.3.6. Yerli çeşitleri.....	14
2.1.4. Narenciye Dış Ticareti .....	14
2.1.4.1. Türkiye'nin narenciye ihracatı.....	14
2.1.4.2. Türkiye'nin narenciye ithalatı.....	16
2.2. MELAS BİLEŞİMİ .....	16
2.2.1. Organik Maddeler.....	17



2.2.2. İnorganik Maddeler.....	17
2.3. SİTRİK ASİT .....	19
2.3.1. Sitrik Asitin Özellikleri.....	19
2.3.1.1.Fiziksel özellikleri .....	19
2.3.1.2. Kimyasal özellikleri.....	20
2.3.2. Sitrik Asit Üretimi ve Tarihsel Gelişimi .....	21
2.3.2.1. Daldırılmış (sıvı faz) fermentasyon.....	23
2.3.2.2. Yüzey Fermentasyonu .....	25
2.3.2.3. Katı hal fermentasyonu.....	26
2.3.3. Sitrik Asit Üretim Koşullarına Etki Eden Faktörler .....	27
2.3.3.1. Makro bileşenler.....	27
<b>Şeker:</b> .....	29
<b>Azot kaynağı.</b> .....	29
<b>Fosfat</b> .....	30
<b>Magnezyum</b> .....	30
2.3.3.2. Eser elementler.....	30
2.3.3.3. Aşılama .....	31
2.3.3.4. Lipitler .....	31
2.3.3.5. Düşük alkoller .....	32
2.3.3.6. Sıcaklık .....	32
2.3.3.7. Fermentasyon pH'sı .....	32
2.3.3.8. Havalandırma-karıştırma .....	33
2.3.3.9. Fermentasyon süresi .....	34
2.3.3.10. Diğerleri.....	34
2.3.4. Sitrik asitin geri kazanılması .....	35
2.3.4.1. Kalsiyum hidroksit – sülfürik asit metodu.....	35
2.3.4.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu .....	36
2.3.5. Sitrik Asidin Depolanması .....	36
2.3.6. Sitrik asitin sağlık, güvenlik ve çevre şartları .....	36

2.3.7. Sitrik asitin kullanım alanları .....	37
2.3.8. Sitrik asit Biyokimyası.....	41
2.3.9. Sitrik Asit Oluşum Kinetiği.....	43
2.3.9.1. Kinetik modellerin bazı tipleri .....	46
2.3.9.2. Monod eşitliği .....	46
2.3.9.3. Diğer büyüme modellerinin eşitlikleri.....	47
2.3.9.4. <i>Aspergillus</i> temelli modeller.....	48
2.3.9.5. <i>Aspergillus niger</i> ile sitrik asit üretimi ve mikroorganizma gelişimi için geliştirilen basit modeller .....	48
2.3.9.6. Karışık biokütle çeşitlerinde matematiksel ifade .....	49
2.3.10. Sitrik Asit Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar .....	50
2.3.11. Sitrik Asit Üretiminde Kullanılan Bazı Biyoreaktörler .....	51
2.4. TARIMSAL ATIKLARIN HİDROLİZİ .....	52
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>56</b>
3.1. MATERYAL .....	56
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma .....	56
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Substratlar .....	57
3.1.2.1. Portakal posası .....	58
3.1.2.2. Melas .....	58
3.1.2.3. Cihazlar.....	59
3.2. METOT.....	60
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Substratlara Uygulanan Önlemler.....	60
3.2.1.1. Portakala uygulanan önlemler .....	60
3.2.1.2. Melasa uygulanan önlemler.....	61
3.2.2. Besiyeri bileşimi .....	62
3.2.3. Mikroorganizmaların Fermentasyon Ortamına Ekimi .....	63
3.2.3.1. Spor süspansiyonunun hazırlanması .....	63
3.2.3.2. Spor Sayımı.....	64
3.2.4. Ön inkübasyon aşaması.....	64
3.2.5. İnkübasyon Aşaması .....	65

3.2.6. Substrat Olarak Sakkaroz, Narenciye Hidrolizatı ve Melas Kullanılan Besiyerleri ile Farklı Fermentörlerde Sitrik Asit Üretimi İçin Optimum Ortam Koşullarının Belirlenmesi.....	65
3.2.6.1. İnkübasyon süresinin belirlenmesi .....	66
3.2.6.2. Havalandırma hızının etkisi .....	66
3.2.6.3. Mikroorganizma oranının etkisi.....	66
3.2.6.4. Başlangıç pH'sının etkisi.....	67
3.2.6.5. Başlangıç toplam şeker derişiminin etkisi .....	67
3.2.6.6. Metanol oranının etkisi.....	67
3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ: .....	68
3.3.1. pH .....	68
3.3.2. Kuru Misel Kütleli .....	68
3.3.3. Sitrik Asit Tayini .....	68
3.3.4. Toplam Şeker Miktarı Tayini .....	69
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>70</b>
4.1. SAKKAROZ İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA <i>Aspergillus niger</i> İLE KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN ÇALKALAMALI BİYOREAKTÖRDE OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ.....	70
4.1.1. Başlangıç pH'sının Etkisi.....	70
4.1.2. Başlangıç Toplam Şeker Derişiminin Etkisi .....	77
4.1.3. Metanol oranının Sitrik Asit Üretimi Üzerine Etkisi.....	85
4.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN PORTAKAL POSASI İLE İLGİLİ HİDROLİZ ÇALIŞMASI .....	93
4.2.1. Portakal Posa Tanecik Büyüklüğü ve Posa Derişiminin Toplam Şeker İçeriğine Etkisi.....	95
4.3. PORTAKAL HİDROLİZATI VE MELAS İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA <i>Aspergillus niger</i> İLE KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN ÇALKALAMALI BİYOREAKTÖR OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ .....	96
4.3.1. Portakal Hidrolizatı Ve Melas İçerikli Besiyeri Ortamında Sitrik Asit Üretimine Başlangıç pH'sının Etkisi .....	101
4.3.2. Portakal Hidrolizatı Ve Melas İçerikli Besiyeri Ortamında Sitrik Asit Üretimine Başlangıç Toplam Şeker Derişiminin Etkisi.....	108

4.3.3. Portakal Hidrolizati Ve Melas İçerikli Besiyeri Ortamında Sitrik Asit Üretimine Metanol oranının Etkisi .....	117
4.4. KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN HAVALANDIRMALI BİYOREAKTÖRDE <i>Aspergillus niger</i> İLE PORTAKAL HİDROLİZATI VE MELAS İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ .....	127
4.4.1. Başlangıç pH'sının etkisi .....	129
4.4.2. Başlangıç toplam şeker derişiminin etkisi .....	139
4.4.3. Metanol oranının etkisi .....	146
4.5. KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN HAVALANDIRMALI KULE FERMENTÖRÜNDE <i>Aspergillus niger</i> İLE PORTAKAL HİDROLİZATI VE MELAS İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ.....	153
4.5.1. Havalandırma hızının etkisi .....	153
4.5.2. Mikroorganizma oranının etkisi .....	163
4.5.3. Başlangıç pH değerinin etkisi .....	170
4.5.4. Başlangıç toplam şeker derişiminin etkisi .....	177
4.5.5. Metanol oranının etkisi .....	185
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>193</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>201</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>215</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1:Akdeniz Bölgesinde 2004 ve 2005 yılı narenciye üretimi ile ilgili veriler	4
Çizelge 2.2. 1997-2001 tarihleri arasında sanayide kullanılan portakal miktarları	8
Çizelge 2.3. Ülkeler İtibari ile Dünya Narenciye Üretimi (bin ton)	9
Çizelge 2.4. Narenciye meyvelerinin kabuk rengine göre sınıflandırılması	12
Çizelge 2.5. Ülkemizde üretilen portakal çeşitlerinin nitelikleri	14
Çizelge 2.6. 2004 ve 2005 yıllarında Türkiye’de portakal ihracat durumu	15
Çizelge 2.7. Şeker Pancarı Melas Bileşimi	17
Çizelge 2.8. Ülkemizin son beş yıla ait melas ve kamış melasına ait ithalat ve ihracat değerleri	18
Çizelge 2.9. Ülkemizde 1997-2001 yılları arasındaki melas üretim ve kullanım rakamları	18
Çizelge 2.10. Sitrik asitin fiziksel özellikleri	19
Çizelge 2.11. Sitrik asit üretimi için hammaddelerin işlenmesi	28
Çizelge2.12. Sitrik asidin ve tuzların kullanım alanları, amaçları ve kullanılması gereken yaklaşık miktarları	38
Çizelge 2.13. Son beş yıla ait Türkiye’de sitrik asit ihracat durumu	39
Çizelge 2.14:Son beş yıla ait Türkiye’de sitrik asit ithalat durumu	40
Çizelge 2.15. Sitrik asit biriktirme yeteneğine sahip bazı mikroorganizmalar	50
Çizelge 3.1. <i>A.niger</i> ’in filogenetik taksonomisi	57
Çizelge 3.2. Portakal posasına uygulanan ön işlemler	61
Çizelge 3.3:Ön inkübasyonda kullanılan besiyeri içeriği	63
Çizelge 3.3. İnkübasyonda kullanılan besiyeri içeriği	64
Çizelge 4.1. Sakkaroz içekli ortamda başlangıç pH’sına bağlı olarak elde edilen deney sonuçlarıyla hesaplanan in kinetik parametreler (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, % 4 metanol)	75
Çizelge 4.2. Substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, % 4 metanol)	82
Çizelge 4.3. Substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda farklı metanol oranlarında zamana bağlı olarak kinetik parametreler (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi)	90

- Çizelge 4.4. Portakal posa hidrolizinde kullanılan yöntemler ve mikrobiyal üreme durumu .....94
- Çizelge 4.5. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda zamana bağlı olarak kinetik parametrelerdeki değişim (30°C’de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı % 1, % 2 mısırözü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L, ve başlangıç pH’sı 6, % 4 metanol) ..... 100
- Çizelge 4.6. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH’sının kinetik parametreler üzerine etkisi (30°C’de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı % 1, % 2 mısırözü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L, % 4 metanol)..... 106
- Çizelge 4.7. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH’sı 6,0, metanol oranı % 4, ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı % 1, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L)..... 116
- Çizelge 4.8. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının kinetik parametreler üzerine etkisi (ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı % 1, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L, başlangıç pH’sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L) ..... 124
- Çizelge 4.9. Optimum başlangıç pH’sının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı % 4, ortam sıcaklığı 30oC,havalandırma hızı L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı % 1, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L)..... 135
- Çizelge 4.10. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı % 4, ortam sıcaklığı 30oC,havalandırma hızı L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı % 1, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L) ..... 145
- Çizelge 4.11. Optimum metanol oranının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler(Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30oC,havalandırma hızı L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı % 1, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L)..... 151
- Çizelge 4.12. Optimum havalandırma hızının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler(Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, % 4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı % 2, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L)..... 160

- Çizelge 4.13. Optimum mikroorganizma oranının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (1/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı % 4, ortam sıcaklığı 30oC, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).....168
- Çizelge 4.14. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörünün kullanılan optimum başlangıç pH değerinin belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (1/L/dakika havalandırma hızı, % 3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı % 4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).....175
- Çizelge 4.15. Başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (1/L/dakika havalandırma hızı, % 3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı % 4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L). .....183
- Çizelge 4.16. Optimum metanol oranının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (1/L/dakika havalandırma hızı, % 3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı % 2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).....190

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bir narenciye meyvesinin kesiti.....	10
Şekil 2.2. Daldırılmış Kültür İle Sitrik Asit Üretimi .....	24
Şekil 2.3. Yüzeysel Kültürü ile Sitrik Asit Üretimi .....	26
Şekil 2.4. Sitrik asit çevrimi (TCA).....	42
Şekil 3.1. <i>Aspergillus</i> genusuna ait türlerin eşeysiz üreme evlerinin genel şematik gösterimi(A) ve bu yapıların şematik görünümü (B).....	57
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan kurutulmuş (1) ve öğütülmüş portakal kabukları (2) ..	58
Şekil 3.3. Hidrolize edilmiş portakal posası(1), ön işlemden geçirilmemiş melas(2) ve ön işlemden geçirilmiş melas(3).....	59
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan fermentörler (A:Havalandırılmalı Biyoreaktör B. Kule fermentörü).....	60
Şekil 4.1. Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç pH'sına bağlı olarak ortam pH'sının zamanla değişimi (A) ve sitrik asit üretimi ile ortam pH arasındaki ilişki(B) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol) .....	71
Şekil 4.2. Sakkaroz içerikli besiyeri ortamında başlangıç pH'sının sitrik asit üretimine etkisi. (A:Sitrik asit derişiminin zamana bağlı değişimi, B. kuru misel ağırlığının zamana bağlı değişimi, C. Toplam şeker derişiminin zamana bağlı değişimi, D. tüm parametrelerin toplu değerlendirilmesi) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol).....	73
Şekil 4.3. Substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda inkübasyonun 8. gününde, başlangıç pH'sına bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliği (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol) .....	74
Şekil 4.4. Sakkaroz içerikli ortamda inkübasyonun 8. gününde, başlangıç pH'sının kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol) .....	76
Şekil 4.5. Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç pH'sının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol).....	77
Şekil 4.6. Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin ortam pH'sı üzerine etkisi (A:ortam pH'sının zamana bağlı değişimi, B. kuru misel ağırlığının zamana bağlı değişimi, C. Toplam şeker derişiminin zamana bağlı değişimi, D. Sitrik asit derişiminin zamana bağlı değişimi) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol) .....	80



- Şekil 4.7. Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin inkübasyonun 6. gününde deneysel parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol) .....81
- Şekil 4.8. Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin inkübasyonun 8.gününde kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol) .....83
- Şekil 4.9. Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin inkübasyonun 8.gününde sitrik asit üretim verimliliği üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol).....84
- Şekil 4.10. Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker içeriğinin özgül büyüme hızı üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol) .....84
- Şekil 4.11. Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisi (A:,ortam pH'sının zamana bağlı değışimi, B. kuru misel ağılığının zamana bağlı değışimi, C. Toplam şeker derişiminin zamana bağlı değışimi, D. Sitrik asit derişiminin zamana bağlı değışimi) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi) ....88
- Şekil 4.12.Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının inkübasyonun 8.gününde deneysel parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi) .....89
- Şekil 4.13. Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının inkübasyonun 8.gününde kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi) .....91
- Şekil 4.14. Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının inkübasyonun 8. gününde sitrik asit üretim verimliliği üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi).....91
- Şekil 4.15. Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi) .....92
- Şekil 4.16:Portakal posasına uygulanan hidroliz işlemleri sonucunda elde edilen süzüntüde toplam şeker içeriklerindeki değışimi .....94
- Şekil 4.17. Portakal posasının hidrolizinde posa derişimi ve tanecik büyüklüğünün toplam şeker derişimine etkisi .....95
- Şekil 4.18. Portakal posasının hidrolizinde posa derişiminin toplam şeker içeriğine etkisi .....96

- Şekil 4.19 Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda sitrik asit üretimi için optimum sürenin belirlenmesi (A:sitrik asit üretimi ile ortam pH'sının değişimi, B. Sitrik asit üretimi ile toplam şeker derişiminin değişimi, C:sitrik asit üretimi ile MLSS değişimi) (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L, ve başlangıç pH'sı 6, %4 metanol) .....99
- Şekil 4.20 Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sının sitrik asit üretimi üzerine etkisi. (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200mg/L, %4 metanol) ..... 104
- Şekil 4.21. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sının deneysel parametreler üzerine etkisi (İnkübasyon sıcaklığı 30°C'de, çalkalama hızı 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200mg/L, %4 metanol)..... 105
- Şekil 4.22. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sına bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliği (İnkübasyon sıcaklığı 30°C'de, çalkalama hızı 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200mg/L, %4 metanol)..... 105
- Şekil 4.23. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda inkübasyonun 6. gününde, başlangıç pH'sının kinetik parametreler üzerine etkisi (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200mg/L, %4 metanol)..... 108
- Şekil 4.24. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200mg/L, %4 metanol) ..... 109
- Şekil 4.25. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç substrat derişiminin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (Başlangıç pH'sı 6,0, %4 metanol oranı, 30°C ortam sıcaklığı, 150 rpm çalkalama hızı, 100 mL çalışma hacmi, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırozü yağı, 200mg/L K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi) ..... 112
- Şekil 4.26. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişime bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliği (Başlangıç pH'sı 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200mg/L) ..... 113

- Şekil 4.27. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin deneysel parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH'sı 6,0, %4 metanol oranı, 150 rpm çalkalama hızı, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırözü yağı, 200mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi)..... 117
- Şekil 4.28. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH'sı 6,0, metanol oranı %4, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L)..... 117
- Şekil 4.29. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker içeriğinin özgül büyüme hızı üzerine etkisi (Başlangıç pH'sı 6,0, metanol oranı %4, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L)..... 118
- Şekil 4.30. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının ortam sitrik asit üretimine etkisi. (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). (150 rpm çalkalama hızı, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırözü yağı, 200mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi, başlangıç pH'sı 6,0, 140g/L başlangıç toplam şeker derişimi) ..... 121
- Şekil 4.31. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının deneysel parametreler üzerine etkisi (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L) ..... 122
- Şekil 4.32. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol derişime bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliği (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L) ..... 123
- Şekil 4.33. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının kinetik parametreler üzerine etkisi (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L) ..... 125
- Şekil 4.34. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L) ..... 126

- Şekil 4.35. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktör kullanılan çalışmada optimum sürenin belirlenmesi (Başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C,havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)..... 128
- Şekil 4.36. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde başlangıç pH'sının Sitrik asit üretimi üzerine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C,havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L) ..... 132
- Şekil 4.37. Farklı başlangıç pH değerlerinin sitrik asit üretim verimliliği üzerine etkisi (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C,havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L) ..... 133
- Şekil 4.38. Optimum başlangıç pH değerinin belirlenmesi (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C,havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)..... 133
- Şekil 4.39. Optimum başlangıç pH'sının belirlenmesi çalışmasında inkübasyonun 6.gününde kinetik parametrelerdeki değişimi. (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)..... 137
- Şekil 4.40. Farklı başlangıç pH değerlerinde özgül büyüme hızı (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C,havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)..... 138
- Şekil 4.41. Başlangıç toplam şeker derişimini sitrik asit üretimi üzerine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)..... 141
- Şekil 4.42. Başlangıç toplam şeker derişimine bağlı sitrik asit üretim verimliliği (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L) ..... 142

- Şekil 4.43. Optimum başlangıç toplam şeker değerlerinin belirlenmesi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 143
- Şekil 4.44. İnkübasyonun 6. gününde farklı başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 144
- Şekil 4.45. Farklı başlangıç toplam şeker derişimlerinde özgül büyüme hızına etkisi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 146
- Şekil 4.46. Metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisi. (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). ((Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 148
- Şekil 4.47. İnkübasyonun 6. gününde metanol oranına bağlı sitrik asit üretim verimliliği. (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 149
- Şekil 4.48. Optimum metanol oranın belirlenmesi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 150
- Şekil 4.49. İnkübasyonun 6. gününde metanol oranına bağlı kinetik parametrelerdeki değişim (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 152
- Şekil 4.50. Farklı metanol oranlarınınözgül büyüme hızına etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 153
- Şekil 4.51. Portakal Hidrolizatı ve ön işlemden geçirilmiş melasın substrat olarak kullanıldığı ortamda sitrik asit üretimi (Kesikli düzende çalışan kule fermentöründe optimum koşullarda gelişen peletler) ..... 154

- Şekil 4.52. Farklı havalandırma hızlarının sitrik asit üretimine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 157
- Şekil 4.53. Farklı havalandırma hızlarında kullanılan substrat başına hesaplanan sitrik asit verimliliği (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 158
- Şekil 4.54. Farklı havalandırma hızlarının sitrik asit üretimi üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 159
- Şekil 4.55. Farklı havalandırma hızlarının inkübasyonun 6. gününde kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 162
- Şekil 4.56. Farklı havalandırma hızlarının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 163
- Şekil 4.57. Farklı mikroorganizma oranlarının zamana bağlı ortam pH'sındaki değişim (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30oC, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 165
- Şekil 4.58. Farklı mikroorganizma derişimlerinde kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit üretim verimliliği (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 166
- Şekil 4.59. Farklı mikroorganizma oranlarının sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 167
- Şekil 4.60. Farklı mikroorganizma oranlarının kinetik parametreler üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30oC, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 169

- Şekil 4.61. Farklı mikroorganizma oranlarının özgül büyüme hızına etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 170
- Şekil 4.62. Farklı başlangıç pH değerlerinin zamana bağı ortam pH'sındaki değişim (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 172
- Şekil 4.63. Farklı başlangıç pH değerlerinde kullanılan toplam şeker derişimi başma üretilen sitrik asit verimliliği (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 173
- Şekil 4.64. Farklı başlangıç pH değerlerinin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 174
- Şekil 4.65. Farklı başlangıç pH değerlerinin kinetik parametreler üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 176
- Şekil 4.66. Farklı başlangıç pH değerlerinin özgül büyüme hızına etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 177
- Şekil 4.67. Farklı başlangıç şeker derişimlerinde gelişen *A. niger* peletleri ..... 178
- Şekil 4.68. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin zamana bağı ortam pH'sındaki değişim (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 180
- Şekil 4.69. Farklı başlangıç toplam şeker derişimine bağı sitrik asit üretim verimliliği (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 181
- Şekil 4.70. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 182

- Şekil 4.71. İnkübasyonun 6. gününde farklı başlangıç toplam şeker derişimine bağlı kinetik parametrelerin karşılaştırılması (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 184
- Şekil 4.72. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin zamana bağlı özgül büyüme hızındaki değişim (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)..... 185
- Şekil 4.73. Farklı metanol oranlarının zamana bağlı ortam pH değerindeki değişim. (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)..... 187
- Şekil 4.74. Farklı metanol oranlarında kullanılan toplam şeker başına sitrik asit üretim verimliliği (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)..... 188
- Şekil 4.75. Farklı metanol oranlarının sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)..... 189
- Şekil 4.76. İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametrelerin farklı metanol derişimlerine bağlı olarak karşılaştırılması (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L) ..... 191
- Şekil 4.77. Farklı metanol oranlarının özgül büyüme hızı( $\mu$ ) üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)..... 192



## KISALTMALAR

D	:Seyrelme Oranı
KMA	:Kuru Misel Ağırlığı (g/L)
$\mu_{max}$	:Maksimum büyüme hızı
Ks	:Doygunluk katsayısı
Bx	:Hifsel büyüme fazı
Cx	:Pelet gelişim fazı
Dx	:Kısıtlanmış büyüme fazı
Ex	:Trofaz ve idiofaz arasındaki geçiş periyodu
Fx	:İdiofaz
$\mu$	:Özgül Büyüme Hızı (1/gün)
ADP	:Adenin Di fosfat
ATP	:Adenin Tri Fosfat
PEP	:Fosfoenolpirüvat
$y_{p/s}$	:Üretilen sitrik asit (g/L) / Kullanılan substrat (g/L)
$y_{p/x}$	:Üretilen sitrik asit (g/L) / KMA (g/L)
$y_{x/s}$	:KMA (g/L) / Kullanılan substrat (g/L)
Qp (özgül üretim hızı).	g üretilen sitrik asit/L/h
Qs	:g kullanılan substrat/ L/h
qp	:g üretilen sitrik asit/g hücre/h
qs	:g kullanılan substrat/g hücre/h

$$\% \text{ sitrik asit ( kullanılan toplam şeker temelinde): } \frac{\text{Üretilen sitrik asit (g/L)}}{\text{Kullanılan toplam şeker (g/L)}} * 100$$

## 1. GİRİŞ

Türkiye narenciye üretimi ve ihracatı açısından önemli bir yere sahip olup dünyadaki talebin %2'sini karşılamaktadır. Akdeniz Bölgesi narenciye üretiminde Türkiye'de ilk sırayı almakta ve üretimin büyük bir kısmını portakal oluşturmaktadır. Narenciyenin çoğu taze olarak tüketilmekte, kalan kısmı ise meyve suyu, şekerleme, reçel v.b amaçlar için kullanılmaktadır.

Akdeniz Bölgesinde yetiştirilen ve işlenen narenciyeden arta kalanların ekonomik değere sahip bir ürüne dönüştürülerek atık sınıfından çıkarılması çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır.

Türkiye'de narenciye meyvelerinin işlenmesi daha çok meyve suyu üretimi ve meyvelerin dilimlenmesi şeklinde olmaktadır. Meyve suyu üretimi sonucunda yaş meyvenin %40-65'lik kısmı atık olarak çıkmaktadır. Türkiye'de narenciye meyvelerinin doğrudan doğruya kendisini kullanarak meyve suyu üreten toplam 4 fabrika bulunmaktadır. Bu fabrikalar; ETAP Tarım A.Ş., MERKO KONFRUT Gıda San Tic. A.Ş., ERSU A.Ş. ve MEYKON Meyve ve Kaynak Su Tic. A.Ş.'dir. Genellikle meyve suyu üretimi için yurt dışından ithal edilmiş aromalar ve konsantreler kullanılmaktadır. PEPSİ firması hem yurt dışından ithal ettiği aroma ve konsantrelerini hem de meyvenin kendisini kullanarak meyve suyu üretmektedirler. Ancak üretimi ile ilgili dışarıya bilgi verilmemektedir. TADİM Meyve-Sebze İşletmeleri San. A.Ş. (Adana) adlı ihracat firması, Mersin ve Adana başta olmak üzere çevre şehirlerden temin ettiği meyveleri kendi işletmelerinde soyup dilimlemektedir. Dilimlenmiş meyveleri paketleyerek yurt dışına ihraç etmektedir. Dilimlemede kullanılan meyveler; tanelenmiş üzüm, elma, greyfurt, kavun, karpuz, mandalina, portakal, limon, ananas gibi meyvelerdir. Şu anda bu firma, narenciye kabuklarını problem olarak gördüğünden bu atıkları değerlendirme yollarını araştırmaktadır. Bu işletmede narenciye yılın sekiz ayı boyunca işlenmektedir. Günde yaklaşık olarak 40 ton dilimlenmiş meyve ihracatı yapılmaktadır. 3,3 kg meyveden 1 kg dilimlenmiş meyve üretilmektedir. Yaklaşık 40 ton dilimlenmiş meyve için ise 130 ton meyve kullanılmata ve bunun 90 tonu günlük atık olarak çıkmaktadır. Bu atıklar doğrudan doğruya çöp deponi alanına gönderilmektedir.

Narenciye posası, protein içeriği düşük, karbonhidrat içeriği yüksek olduğu için hayvan yemi olarak uygun bir atıktır [1,2,3]. Ancak %80 – 92 oranında fazla su içermesinden dolayı dönüşüm sırasında birçok probleme neden olur. Depolama sorunu nedeniyle bu materyal çok sınırlı bir şekilde kullanılmakta ve genellikle atık olarak göz önünde tutulmaktadır [4]. Ülkemizde özellikle narenciye işleyen gıda işletmelerine yakın olan bölgelerde bu posalar çoğunlukla silolarda depolanarak değerlendirilmektedir [2].

Meyve suyu üretim sonucunda çıkan posalar; kabuk, pulp ve meyvenin çekirdeklerini içermekte olup, kimyasal yapısı narenciye çeşidine, yetiştirme koşullarına, iklime ve meyvenin hasat zamanına göre değişiklik göstermektedir [5,6].

Günümüzde narenciye kabukları yaygın olarak hayvan yemi [3, 7] ve pektin üretiminde [8, 9, 10] kullanılmaktadır. Bununla birlikte, narenciye kabukları sitrik asit üretimi açısından da uygun bir substrat olduğu bu çalışma ile belirlenmiştir. Sitrik asit endüstride geniş kullanım alanına sahip ve yoğun talep gören değerli bir sanayi ham maddesidir. Günümüzde sitrik asit; gıda sanayi, eczacılık, kozmetik, metal işleri, tekstil, deri, baskı, mürekkep, fotoğrafçılık vb gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitrik asit, turuncgiller, ananas, armut, şeftali, incir ve diğer meyvelerin yapraklarında bulunur, bu meyvelerden elde edilir ve buna sitrik asit fermentasyonunun aksine doğal sitrik asit denir. Limon ve ananas başlıca doğal sitrik asit kaynaklarıdır [11]. Sitrik asit meyvelerde %5, meyve sularında ise %9 civarında bulunur [12]. Bu oran fermentasyon işlemleri ile daha yüksek derişimlerde elde edilebilmektedir.

Bu çalışmada mikroorganizma olarak *Aspergillus niger* kullanılmıştır. Substrat olarak ise narenciye posasından elde edilen hidrolizat ve önışlemden geçirilmiş melas kullanılmıştır. Çalışmada melasın kullanılma amacı, besiyeri ortamının toplam şeker içeriğinin desteklenmesi için sukroz yerine kullanılmıştır. Ucuz ve kolay elde edilmesi nedeniyle melastan yararlanılmıştır. Melas şeker endüstrisinin bir yan ürünüdür. Kristal şekerin şeker pancarından ayrılmasından sonra kalan, yaklaşık %50 şeker içeren ve şekeri kristalleşmeyen kısımdır.

Çalışma 5 kısımdan oluşmuştur. Birinci aşamada substrat kaynağı olarak sukroz ile kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde optimizasyon çalışması,

ikinci aşamasında narenciye posası hidroliz çalışması, üçüncü aşamada substrat kaynağı olarak narenciye posası ve melas ile kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde optimizasyon çalışması, dördüncü aşamada kesikli düzende çalışan havalandırılmalı biyoreaktörde optimizasyon çalışması ve son olarak kesikli sistemde çalışan havalandırılmalı kule fermentöründe optimizasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda portakal posası ile ilgili çalışılmış tek bir makaleye ulaşılmıştır. Aranyantinos ve ark. [13] 1992’de “Sitrik Asit Üretimi için Portakal İşleme Atıklarının Fermentasyonunda Optimizasyon Çalışması” yapmışlardır. Bu çalışmada substrat olarak portakal meyve suyu üretiminde posa yıkama suları kullanılmıştır. Literatürde portakal posalarının hidrolizatı ve kule fermentörlerinin sitrik asit üretimi ile ilgili çalışması mevcut değildir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. NARENCİYE

Narenciye; turunç, portakal, mandalina, greylift, bergamot ve limon gibi ekonomik değeri yüksek olan *Citrus* cinsi meyve ağacı türlerini içine alan bir bitki topluluğudur. Bu bitkilerin meyvelerinden gıda olarak faydalandığı gibi meyve kabuklarından, yapraklarından veya çiçeklerinden parfümeride koku vermekte kullanılan uçucu yağlar da elde edilmektedir. Yurdumuz, dünya narenciye üretim alanının en kuzey sınırında yer almaktadır. Tüm dünyada toplam narenciye üretimi yaklaşık 100 milyon ton olup, 20 milyon ton ile Brezilya başı çekmektedir. Akdeniz ülkelerinin toplam üretim rakamı ise 17 milyon ton civarındadır ve en büyük üretici İspanya'dır. Türkiye yıllık 2 601 138 ton (2005) üretim ile dünyada ilk on üretici arasında yer almaktadır [14]. Ülkemizde yaklaşık 90.000 hektar alanda narenciye üretimi yapılmaktadır. Akdeniz Bölgesinde 2005 yılında narenciye üretim alanlarına ait bilgiler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Akdeniz Bölgesinde 2004 ve 2005 yılı narenciye üretimi ile ilgili veriler [18]

İl adı	Narenciye Türü	Kapladığı alan (hektar)	Meyve veren yaşta ağaç sayısı	Meyve vermeyen yaşta ağaç sayısı	Üretim (ton)
Akdeniz	Toplam (2004)	88364	21783852	2220306	2366562
Akdeniz	Toplam (2005)	88253	22137909	2258521	2601138
Adana	Turunç	30	35203	12142	1795
Adana	Altıntop	3226	657142	7000	95758
Adana	Portakal (washington)	7030	1644660	68600	259304
Adana	Portakal (yafa)	665	159000	1250	19324
Adana	Portakal (diğer)	5310	1205364	25150	148089
Adana	Mandalina (satsuma)	1131	261420	60040	35181
Adana	Mandalina (clemen.)	1354	363912	29017	33342
Adana	Mandalina (diğer)	5424	1554365	101100	159084

Çizelge 2.1 (devam)

İl adı	Narenciye Türü	Kapladığı alan (hektar)	Meyve veren yaşta ağaç sayısı	Meyve vermeyen yaşta ağaç sayısı	Üretim (ton)
Antalya	Limon	1928	525570	84355	58111
Antalya	Turunç	30	200	8060	12
Antalya	Altıntop	167	36550	2950	4598
Antalya	Portakal (washington)	9163	2553692	122913	313590
Antalya	Portakal (yafa)	484	96200	13600	11091
Antalya	Portakal (diğer)	2256	443490	128930	41567
Antalya	Mandalina (satsuma)	450	136930	10456	12983
Antalya	Mandalina (clemen.)	267	99479	13496	8837
Antalya	Mandalina (diğer)	82	20990	3560	2080
Hatay	Limon	1376	207710	94458	21368
Hatay	Turunç	10	2190	9000	61
Hatay	Altıntop	687	150065	5800	24877
Hatay	Portakal (washington)	6086	1592399	200550	233409
Hatay	Portakal (yafa)	136	34000	0	4080
Hatay	Portakal (diğer)	1222	289470	53080	27118
Hatay	Mandalina (satsuma)	6382	1533500	574420	172524
Hatay	Mandalina (clemen.)	135	38700	100	3619
Hatay	Mandalina (diğer)	840	217400	32000	17225
Mersin	Limon	13554	3628420	300162	363804
Mersin	Turunç	30	1800	1200	121
Mersin	Altıntop	596	127703	12726	23408
Mersin	Portakal (washington)	6362	1767820	63456	203073
Mersin	Portakal (yafa)	1138	338724	6058	31320
Mersin	Portakal (diğer)	610	181598	4311	17939
Mersin	Mandalina (satsuma)	2560	702571	31064	68538
Mersin	Mandalina (clemen.)	161	48988	1884	4272
Mersin	Mandalina (king)	179	46120	6850	4156
Mersin	Mandalina (diğer)	588	176529	13927	17287
K.maraş	Limon	7	1500	150	150
K.maraş	Turunç	17	0	5000	0
K.maraş	Portakal (diğer)	14	3500	680	525
K.maraş	Mandalina (diğer)	23	5000	750	750

Çizelge 2.1 (devam)

İl adı	Narenciye Türü	Kapladığı alan (hektar)	Meyve veren yaşta ağaç sayısı	Meyve vermeyen yaşta ağaç sayısı	Üretim (ton)
Osmaniye	Limon	74	14750	6120	983
Osmaniye	Turunç	15	3300	0	297
Osmaniye	Portakal (washington)	402	84050	6800	12329
Osmaniye	Portakal (yafa)	160	40000	1000	8000
Osmaniye	Portakal (diğer)	475	115550	3910	16221
Osmaniye	Mandalina (satsuma)	194	23700	32166	1846
Osmaniye	Mandalina (clemen.)	27	1870	5090	168
Osmaniye	Mandalina (king)	10	2230	640	201
Osmaniye	Mandalina (diğer)	172	35900	1700	3545
Antalya	Mandalina (diğer)	82	20990	3560	2080
Hatay	Limon	1376	207710	94458	21368
Hatay	Turunç	10	2190	9000	61
Hatay	Altıntop	687	150065	5800	24877
Hatay	Portakal (washington)	6086	1592399	200550	233409
Hatay	Portakal (yafa)	136	34000	0	4080
Hatay	Portakal (diğer)	1222	289470	53080	27118
Hatay	Mandalina (satsuma)	6382	1533500	574420	172524
Hatay	Mandalina (clemen.)	135	38700	100	3619
Hatay	Mandalina (diğer)	840	217400	32000	17225

Türkiye’de oldukça eski bir geçmişe sahip olan narenciye yetiştiriciliği, Cumhuriyetten sonra hızla gelişmeye başlamış ve 1930 yılından itibaren üretimde önemli artışlar olmuştur [15]. Türkiye narenciye yetiştiriciliği bakımından ekolojik koşullar açısından son derece uygundur. Narenciye alanları Ege Bölgesinde marjinal üretim sınırına ulaşmış olmakla beraber, Akdeniz Bölgesinde narenciye yetiştirilebilecek alanlar turizme açılmıştır. Bunun sonucunda da üreticiler tarla bitkileri yetiştiriciliği yaptıkları alanlarda narenciye yetiştirmeye başlamışlardır [16]. İlk hasat Mersin’de eylül ayında Enterdonat limon ile başlayıp, batıya İzmir’e kadar kıyı boyunca devam etmektedir [17].

Ülkemizde narenciye üretim potansiyeli çok yüksek olmasına rağmen yeterli üretim ve ihracat rakamlarına henüz ulaşamamıştır. Halen üretimin büyük kısmı

yurt içinde tüketilmekte ve %30'luk kısmı ise ihraç edilmektedir. Ülkemizde kişi başına yıllık 30 kg olan tüketimin alternatif kullanım şekilleriyle birlikte gelişmiş ülkelerde olduğu gibi 40 kg'a çıkartılması mümkündür [14].

Narenciyeler ülkemizde en fazla Akdeniz, Ege ve kısmen de Doğu Karadeniz bölgelerinde yetiştirilmektedir. Çukurova bölgesinde Türkiye'deki toplam narenciyenin %70'i üretilmektedir. Gene, greylort ve limonun %90'ı, portakal ve mandalinaların %60'ı bu bölgede üretilir. Mersin limon üretiminde ilk sırada iken Adana ve Hatay'da portakal en fazla üretilen üründür. Adana, greylort ve mandalina üretiminde ülkemizde birinci sırada yer almaktadır. Antalya, Türkiye narenciye üretimindeki %20'lik payı ile ikinci büyük narenciye üretim bölgesidir. Antalya'da en çok portakal üretilmekte olup, ülkemiz portakal üretimindeki payı %30'dur. Ege bölgesinde narenciye üretiminde İzmir öne çıkmakta olup, toplam narenciye üretiminin %5'i bu bölgeden karşılanmaktadır. İzmir yöresinde en fazla yetiştirilen narenciye ürünü mandalinalardır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en çok portakal yetiştirilmektedir [14].

2001 yılı verilerine göre yaklaşık 460 milyon ton olan dünya yaş meyve üretiminin 11 milyon tonu Türkiye tarafından karşılanmıştır. Bu üretimin de 2,5 milyon tonu narenciye üretiminden sağlanmıştır [3]. 2002 yılında 92 bin hektar olan narenciye dikim alanının %46'sı portakal, %28'i mandalina, %22'si limon ve %4'ü de greylorttan oluşmaktadır. Türkiye'de 2002 yılındaki toplam narenciye üretiminin %65'i taze olarak tüketilirken %25'i ihraç edilmekte, %10'u ise işlendikten sonra kullanılmaktadır. Ancak özellikle eski Sovyetler Birliği ve Avrupa Birliği ülkelerinden gelen narenciye sularına olan taleple beraber işlenmeye ayrılan kısmın artması beklenmektedir. İşlenerek kullanılan narenciye potansiyeli Çizelge 2.2'de verilmiştir. Çizelge 2.2'de 1997 yılında devlet sektörünün tamamı ile özel sektörde 10 ve daha fazla kişi çalışan işyerlerinden tüketim değerlerinin %80'ini oluşturan işyerleri kapsama alınmıştır. 1997-2001 yılları arasında özel sektörde 10 ve daha fazla kişi çalışan işyerleri ile devlet sektörünün tamamı kapsama alınmıştır [18].



Çizelge 2.2: 1997-2001 tarihleri arasında sanayide kullanılan portakal miktarları [18]

Yıl	Tüketim Miktarı (kg)	Tüketim değeri (milyon TL)	İşyeri Sayısı
1997	31.327.177	545.001	14
1998	50.546.557	2.873.706	16
1999	241.417.242	10.717.480	14
2000	86.445.392	10.381.880	16
2001	115.198.573	36.004.715	23

Narenciyeler su oranları yüksek ürünler olduğu için uzun süreli depolamaya dayanıklı değildir. Bu nedenle de ekonomik anlamda stok yapılamamaktadır. Yalnızca toptancılar arzı daha uzun bir döneme yayabilmek ve fiyatlardaki düşüşü önlemek amacıyla özellikle limon ve az miktarda da portakal ve greyfurdu Orta Anadolu'daki doğal mağaralarda ve Kapadokya yöresindeki peri bacalarında belli bir süre muhafaza edebilmektedirler. Buna karşılık konsantre meyve sularında sınırlı oranda stok yapılabilmektedir. Türkiye'de yaş meyve ve sebze ihracatı 2001/2002 sezonunda rekor seviyelere ulaşmış, tüm ürünlerin ihracatında büyük artışlar yaşanmış, narenciye de bu artıştan payını almıştır. İhracattaki bu artışın nedeni, Türkiye'de yaşanan ekonomik kriz sonucunda Türk lirasının değerinin düşmesi ve Türk ihracat ürünlerinin dış pazarda rekabet gücünün artmasıdır. 2002 yılında 1.616 bin ton olan yaş meyve ve sebze ihracatının %51'i narenciye ihracatından sağlanmıştır. Narenciye içinde en fazla ihracatı yapılan ürün ise mandalina olmuştur. Toplam narenciye ihracatı 2002 yılında 253 milyon dolar olarak gerçekleşmiş ve ihracatta %33 ile en fazla payı mandalina almıştır [17].

Dünyada narenciye üretimi 35° Kuzey ve Güney paraleller arasındaki bölgelerde yapılmaktadır. Kuzey Yarımkürede, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkeleri, Güney Yarımkürede ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya'da ekonomik olarak üretilmektedir. Dünyadaki en büyük narenciye üreticisi ülkeler; Brezilya, ABD ve Çin'dir. 2002 yılı itibari ile toplam 103 milyon ton olan dünya narenciye üretiminin %44'ü bu üç ülke tarafından karşılanmaktadır. Türkiye ise 2.193 bin tonluk üretim miktarı ile 10. sırada yer almakta ve dünya toplam narenciye üretiminin %2'sini karşılamaktadır [18]. Önemli narenciye üreticisi ülkelerin üretim miktarlarındaki değişim incelendiğinde üretim miktarlarında son yıllarda önemli

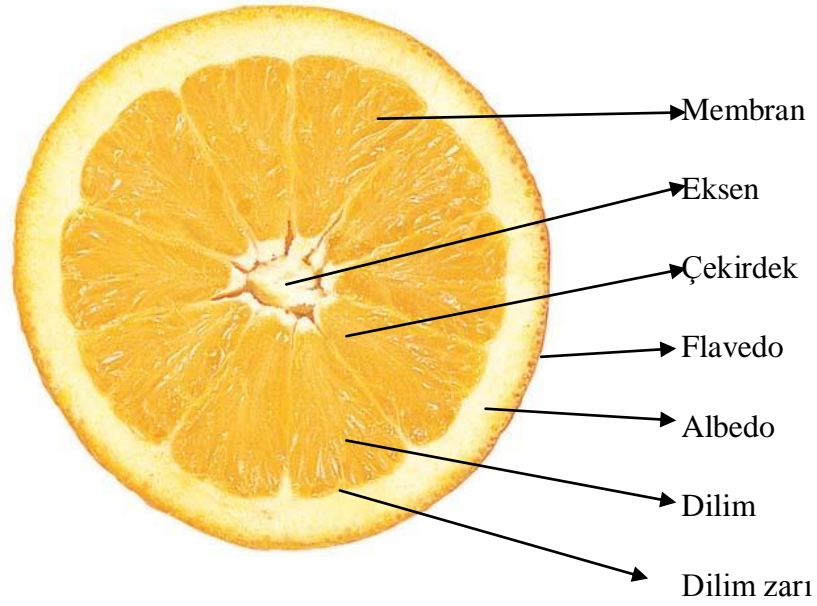
değişiklikler olmadığı sadece en büyük üretici ülke olan Brezilya'nın üretiminde azalma olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3: Ülkeler İtibari ile Dünya Narenciye Üretimi (bin ton) [4]

	1999	2000	2001	2002
Brezilya	24.216	19.489	18.393	20.251
Amerika	12.348	15.648	14.702	14.874
Çin	11.274	9.224	12.017	10.290
Meksika	5.381	6.062	6.325	6.875
İspanya	5.628	5.365	5.547	5.734
Hindistan	4.600	4.870	4.870	4.870
İtalya	2.798	3.103	3.068	3.084
İran	3.759	3.671	3.770	3.770
Nijerya	3.240	3.250	3.250	3.250
<b>Türkiye</b>	<b>2.263</b>	<b>2.222</b>	<b>2.478</b>	<b>2.193</b>
Pakistan	1.943	1.897	1.897	1.897
<b>Dünya</b>	<b>102.825</b>	<b>101.040</b>	<b>102.648</b>	<b>103.290</b>

#### 2.1.1. Narenciye Meyvelerinin Yapısı ve Bileşimi

Botanik açıdan narenciye meyveleri birbirleriyle aynı yapıyı gösterir. Fakat diğer meyvelerden oldukça farklı yapıdadırlar. Bu nedenle narenciye meyvelerinden meyve suyu üretim teknolojisi, diğer meyvelere uygulanandan çok daha farklıdır. Şekil 2.1'de gösterildiği üzere bir narenciye meyvesi, diğer meyvelerde olduğu gibi kabuk ve meyve etinden oluşur. Ancak hem kabuk hem de meyve eti kendine özgü niteliklerdedir [19]. Tüm meyvenin yaklaşık %85'den fazlası sudur. Elde edilen posa da yüksek oranda su içerir. Tüm meyvenin %15lik katı kısmının içeriği ise %10 çözülmüş şeker, %2 lif, %1 organik madde, aminoasit ve protein içeriği %1, yağ içeriği ise %0,3'dür [20]. Çalışmada katı içerik kullanıldığı için bu oran düzeltilecek olursa sitrik asit üretimi ve hidroliz için yeterli seviyede lif ve çözülmüş şeker içerdiği görülür.



Şekil 2.1 Bir narenciye meyvesinin kesiti

#### 2.1.1.1. Kabuk

Narenciye kabukları; flavedo ve albedo denen iki katmandan oluşur. Flavedo, en dıştaki, sarıdan kırmızıya kadar değişen ince tabakadır. Burada karotenoid pigmentleri ve içinde yeteri kadar yağ üreten guddelerin bulunduğu yağ hücreleri bulunmaktadır. Üretilen yağ damlacıkları, gergin hücrelerin arasında adeta basınç altında bulunur. Bu nedenle eğer kabuk sıkıştırılır, bir darbe etkisinde kalır veya yüzeye iğne gibi ince bir cisim sokulursa, hücrelerin basınç altında tuttuğu yağ damlacıkları dışarı adeta fışkırarak çıkar. Kabuk yağı denen bu madde, narenciye suları üretiminde önemli sorunlar oluşturmakta ve teknolojiyi zorlamaktadır. Flavedo katmanının en dışında yani meyvenin yüzeyinde, ince bir mum filmi bulunur ki bu epidermisi; yağmura, su kaybına ve mantar enfeksiyonlarına karşı koruyan doğal bir bariyerdir. Flavedonun hemen altında; adeta devamı olarak, beyaz renkte, kalınca keçe benzeri bir katman olan albedo ise daha iri hücrelerden oluşmaktadır. Burada besin maddeleri ve suyu taşıyan damarlar yer almaktadır. Albedo pektince zengin olduğundan narenciye kabukları, pektin üretiminde ham madde olarak kullanılmaktadır [19].

#### 2.1.1.2. Meyve eti

Meyve eti yani andokarp radyal olarak yerleşmiş dilimlerden oluşur. Dilimler, paransim hücrelerinin birçoğunun yan yana gelmesiyle, içinde meyve suyu bulunan keseciklerden oluşan bir yapı gösterir. Dilim içindeki üst üste yığılı bu meyve suyu keseciklerini, yüksek moleküllü materyalden oluşmuş bir dilim zarı sarar. Dilimlerin etrafında dizildiği eksenin ortasına gelen bölgede, dilimler içinde çekirdekler veya çeşidine göre çekirdek izleri bulunur. Meyve olgunlaştıkça yine çeşide bağlı olarak meyve eti ile kabuğun sıkı bağlantısı pektolitik enzimlerin etkisiyle gevşer [19].

Narenciye meyvelerinin tür ve çeşitlerine göre, kabuk ve meyve eti oranı çok değişmektedir. Bir genelleme yapılırsa; kabuk oranı %25–50, meyve eti oranı %50–75 civarında bulunmaktadır. Portakallarda ise kabuk meyve oranının genellikle %50 civarında olduğu kabul edilmektedir. Kabuğun yaklaşık %30'unu flavedo %70'ini albedo oluşturmaktadır[19].

#### 2.1.2.3. Meyve bileşimi

Kuşkusuz çeşitli narenciyelerden üretilmiş meyve sularının bileşimi oldukça farklıdır. Narenciye sularının bileşiminin en ilginç yönü, kendine özgü aromaları, kabuktan geçen yağ ve bazılarında bulunan acılık bileşikleridir. Portakalların tipik aromasını, asitler, alkoller, aldehitler, esterler, hidrokarbonlar ve ketonlar oluşturmaktadır. Bunlardan esterler ve aldehitler, taze portakal suyu aromasının oluşmasında birincil rol oynayan bileşiklerdir. Aldehitlerden en önemlileri, asetaldehit, hekzanal, oktanal ve dekanal'dır. Esterlerden ise başlıcaları; etli asetat, metil butirat ve etil butirat'tır. Etil butirat portakal aromasının oluşmasında en önemli rol oynayan esterdir. Alkollerden aromada rol alanlar, metil alkol, etil alkol, hekzanol, cis-3-hekzanol, trans-2-hekzanol, linalool ve  $\alpha$ -terpineol gibi bileşiklerdir. Etil alkol en fazla bulunan alkol olup taze portakal suyunda bile 400 mg/L civarındadır. Linalool ise kabuktan gelen bir alkoldür [19].

Aromada rol alan hidrokarbonların önemli bir kısmı kabuk yağından kaynaklanır. Bunlardan  $\alpha$ -pinen, aroma üzerinde olumlu rol oynamaktadır. Meyve suyunda kabuk yağı arttıkça bunun miktarı da artmaktadır. Kabuk yağı kökenli diğer bir hidrokarbon  $\gamma$ -terpinen'dir. Ayrıca sabinen ve valensen gibi hidrokarbonlar da

bulunur. Fakat portakal sularında etanolden sonra en fazla bulunan uçucu bileşik limonendir [21].

Diğer taraftan narenciyelerde bulunan birçok bileşiğin antikanser aktiviteye sahip oldukları belirtilmektedir. Narenciye meyveleri ve bunların suları belki de hiçbir meyvenin içermediği kadar farklı tipte antikanser bileşikler (anticancer phytochemicals) içermektedir [22, 23, 24, 25].

Bunun gibi pektinin kan şekeri ve kolesterol seviyesini düşürdüğü ve pektince zengin olan narenciye meyvelerinin bu amaçla tüketilmesi ve fakat meyve suyundan ziyade meyve olarak tüketilmesi önerilmektedir [26].

### 2.1.2. Önemli Narenciye Çeşitleri

Narenciyelerin çok çeşitli ürünleri vardır. Bunların bir kısmı ülkemizde yetiştirilmekte, bir kısmı ise yetiştirilmemekte ve hatta tanınmamaktadır. Sistematik bir ayırım olmasa da Çizelge 2.4’de narenciye meyveleri kabuk rengine göre sınıflandırılarak gösterilmiştir.

Çizelge 2.4: Narenciye meyvelerinin kabuk rengine göre sınıflandırılması[19]

1.SARI-RENKLİ TÜRLER	
<i>Citrus medica</i>	: Zetrat – limon
<i>Citrus lemon (L) Burmf</i>	: Limon
<i>Citrus aurantifolia Swing</i>	: Lumie, limitte
<i>Citrus grandis (L) Osbeck</i>	: Pampelmuse
<i>Citrus paradisi Macfadyen</i>	: Gerypfrut
2.ORANJ RENKLİ TÜRLER	
<i>Citrus aurantium (L.)</i>	: Acı portakal
<i>Citrus sinensis (L) Osbeck</i>	: Tatlı portakal
<i>Citrus reticulata Blanco</i>	: Mandalin

Narenciyelerin bir kısmı sofralık, bir kısmı endüstride işlenmeye elverişli olduğu gibi, her iki amaca uygun olanı da vardır. Başlıca narenciye çeşitleri ve meyve suyuna işlenmeleri açısından bazı önemli özelliklerine aşağıda değinilmiştir.

### 2.1.3. Portakal Çeşitleri

#### 2.1.3.1. Valencia

Tatlı portakal sınıfındadır, hem taze tüketime hem de meyve suyuna işlenmeye çok elverişlidir. Verimi yüksek ve hasat süresi uzundur. Ülkemizde hasadı Şubat ortalarından Nisan sonlarına kadar sürmektedir. Meyve irilikleri birbirine çok yakın, kabukları ince ve meyve suyu randımanı yüksektir. Meyve suyunun aromatik, dengeli ve yumuşak bir tadı, çekici, yoğun bir rengi vardır. Meyve suyunda pektin miktarı düşük, C vitamini içeriği yüksektir. Şeker: asit oranı 5,5:1, toplam karotenoid içeriği 12–15 mg/L, limon içeriği ise 1-5 mg/L düzeyindedir [19]. Bütün bunlar bu çeşidin meyve suyuna çok elverişli olduğunu göstermektedir. Zor soyulması, sofralık özelliğinde önemli bir olumsuzluktur. Ayrıca böceklere dirençsiz olması, silkeleme ile toplanamadığı için hasadın önemli bir iş gücü gereksinimi göstermesi gibi olumsuz yönleri de vardır. Valencia, en çok Kaliforniya, Florida ve İsrail’de yetiştirilmektedir. Ülkemizde üretimi çok sınırlıdır [19].

#### 2.1.3.2. Navel

Ülkemizde sofralık olarak en çok yetiştirilen çeşit Washington Navel portakalıdır. Bu çeşidin en önemli özelliği çok sulu olması, kolay soyulması, meyve eti zedelenince hafif bir acılık oluşmasıdır. Bu portakallarda; şeker: asit oranı 5,5:1, toplam karotenoidler 5-8 mg/L düzeyindedir. Portakal suyuna elverişli değildir veya acılığın giderilmesi için adsorbent teknolojilerinden yararlanılması gerekir [19].

#### 2.1.3.3. Shamouti

Diğer adıyla “Jaffa” (Yafa) olarak isimlendirilen bu çeşit, çekirdeksiz, kalın kabuklu, kolay soyulan, tatlı ve çok aromatik, hemen hemen sadece sofralık olarak tüketilen bir çeşittir. Şeker:asit oranı 5:1 düzeyindedir [19].

#### 2.1.3.4. Hamlin

Brezilya ve Florida’da yoğun olarak üretilen, ince kabuklu, asit ve renk bakımından zayıf meyve suyu veren bir çeşittir. Çeşidin en önemli özelliği çok mahsuldar olması, meyve veriminin ağaç başına 1200 kg’a kadar yükselmesidir [19].

#### 2.1.3.5. Kan portakalları

Başlıca kan portakalları Moro ve Tarocco çeşitleridir. Bu portakallar, meyve suyu rengi, aroması ve “Brix: asit” oranı açısından taze sıkmalık olarak kullanılmaya çok uygundur. Kan portakallarının pembe-viole renkleri antosiyaninlerden kaynaklandığı için ısıya çok duyarlıdırlar. Bu nedenle pastörizasyon gibi bir ısıl işlem uygulaması sonucunda ve depolama sırasında meyve suyunun başlangıçtaki çekici rengi, kahve renk tonu kazanır. Bu nedenle meyve suyuna işlenmeye uygun değildir. Dondurulmuş halde saklanınca meyve suyu rengi korunabilmektedir [19].

#### 2.1.3.6. Yerli çeşitleri

Ülkemizde, “Dört Yol Yerlisi”, “Kozan Yerlisi”, “Alanya Yerlisi” gibi bir takım portakal çeşitleri yetiştirilmekte ve meyve suyuna daha çok bunlar işlenmektedir. Ancak genelde ülkemizde meyve suyu endüstrisine uygun nitelik ve miktarda portakal yetiştirilmektedir. Bu nedenle de portakal suyu ve konsantresi üretimi nitelik ve miktar açısından yetersizdir. Bununla birlikte Çizelge 2.5’de ülkemizde üretilen bazı yerli ve yabancı portakalların meyve suyu açısından bazı özellikleri verilmiştir[19].

Çizelge 2.5: Ülkemizde üretilen portakal çeşitlerinin nitelikleri

ÇEŞİTLER					
Nitelikler	Dört Yol yerlisi	Kozan yerlisi	Valencia	Hamlin	Magnum bonum
Meyve ağırlığı, g	103	144	128	140	119
Meyve suyu randımanı, %	42	48	42	45	44
Briks	12,8	13	12	11,5	11,3
Titrasyon asitliği, g/100 mL	1,96	1,66	1,84	1,50	1,41
Briks:asit oranı	6,7	8,0	6,7	7,7	8,1
pH	3,42	3,56	3,48	3,40	3,49
Askorbik asit mg/100 mL	61	69	63	62	55

#### 2.1.4. Narenciye Dış Ticareti

##### 2.1.4.1. Türkiye’nin narenciye ihracatı

Ülkemizin yenilen meyve ihracatı 2005 yılında bir önceki yıla göre %29,8 oranında artarak 2.469.892.000 \$ olarak gerçekleşmiştir. Miktar açısından

baktığımızda yaklaşık 2 milyon ton olan yaş meyve ve sebze ihracatımızın yarısını narenciye ürünlerinin oluşturduğunu söylemek mümkündür [14].

**2004 – 2005 Yılları Türkiye Narenciye İhracatı:** Ülkemizin 2005 yılı toplam taze meyve ve sebze ihracatının miktar bazında %49'u, değer (ABD \$) bazında %42'si narenciye ürünlerinden oluşmaktadır. Değer bazında baktığımızda 2005 yılında ülkemizin narenciye ihracatının bir önceki yıla göre %36 oranında arttığı gözlemlenmektedir [14].

2004 ve 2005 yılları itibariyle Türkiye'nin portakal ihracatında ilk beş ülkenin ve ürün bazında ülkelere yapılan ihracatın miktar ve değer yönünden değerlendirilmesi Çizelge 2.6'de verilmiştir.

Çizelge 2.6: 2004 ve 2005 yıllarında Türkiye'de portakal ihracat durumu

ÜLKELER	2004		2005	
	Miktar (kg)	Değer (\$)	Miktar (kg)	Değer (\$)
Rusya Federasyonu	46.321.491	17.276.453	70.060.338	27.943.679
Ukrayna	21.208.676	8.449.914	31.848.960	13.237.161
Romanya	15.996.881	6.115.711	21.819.659	8.504.780
Almanya	2.229.423	1.657.889	5.096.210	3.410.240
Mersin Serbest Bölge	7.686.570	3.025.798	6.449.362	2.954.777

**Ürün Bazında Türkiye Narenciye İhracatı:** Değer (\$) bazında baktığımızda Türkiye'nin 2005 yılı narenciye ihracatında %42 ile en yüksek pay limonundur. Türkiye'nin toplam narenciye ihracatında mandalınanın payı %27, portakalın payı %18, greyfurtun payı ise %13'dür. Narenciye ihracatımızda en önemli ülkeler; Rusya Federasyonu, Ukrayna, Suudi Arabistan, Romanya, Almanya, Polonya, Yunanistan, Hollanda, Birleşik Krallık (İngiltere), Makedonya, Macaristan, Bulgaristan ve Çek Cumhuriyeti olarak sayılabilir. 2004 ve 2005 yılları itibariyle Türkiye'nin Portakal ihracatında ilk beş ülkenin ve ürün bazında ülkelere yapılan ihracatın miktar ve değer yönünden görünümü aşağıdaki Çizelge 2.6'da gösterilmektedir [14]

2005 yılında Polonya ve Rusya Federasyonu'na gerçekleştirilen narenciye ihracatımız bir önceki yıla nazaran sırasıyla %183 ve %128 oranlarında artış göstermiştir.



#### 2.1.4.2. Türkiye'nin narenciye ithalatı

Türkiye'nin narenciye ithalatı yok denecek kadar az olup, 2005 yılı itibariyle 15.137.145 ABD \$'dır. En fazla ithal edilen ürün taze portakaldır ve 2005 yılı itibariyle ithalatın hemen hemen tamamının Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nden yapıldığı söylenebilir. Greyfurt ve Pomelo ithalatı 2005 yılı itibariyle 2.945.992 ABD \$'dır. İthalatın yaklaşık %94'lük kısmı gene Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nden gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş portakal ile taze/kurutulmuş limon ithalatına baktığımızda 2005 yılında yaklaşık 1.1 milyon ABD \$'lık ithalat yapıldığı görülmektedir [14].

#### 2.2. MELAS BİLEŞİMİ

Melas, şeker endüstrisinin bir yan ürünüdür. Sakkarozun temizlenmiş ve buharlaştırılmış şeker pancarı özünden kristalize ve santrifüj edilmesinden sonra elde edilir. Şeker fabrikasyonu teknolojisinde var olan teknik olanaklar ile içinden şeker elde edilemeyen bir kısımdır. Buharlaştırma ve kristalizasyon işlemi genellikle üç defa tekrarlanır. Bu tekrarlama ham şeker, şeker olmayan organik maddeler ve melasın yüksek viskozitesinin sakkarozun daha ileri düzeyde kristallenmeye izi vermemesine kadar yapılır [27].

Şeker fabrikalarında şeker pancarından ve şeker kamışından sakkaroz elde edilirken, hasat şekli, depolanma koşulu ve kullanılan yöntemle bağlı olarak üzere kristallenmeyen kısmın yaklaşık %4'ü melas olarak çıkar [28]

Melasın bileşimindeki maddeler makro ve mikro maddeler olarak ayrılabilir. Makro maddeleri su, şeker ve şekersiz maddeler; mikro elementleri ise iz elementler, vitaminler ve gelişme faktörleri oluşturur. Melas fermente olabilen sakkaroz, fruktoz, glikoz ve rafinozun yanı sıra fermente olmayan indirgeme maddelerini de içerir. Melasın fermente olmayan indirgeyici içeriği %17'ye kadar çıkabilir ve %5'e kadar düşebilir. Şeker fabrikalarında özünün işlenmesinde kullanılan yüksek ısı ve melasın sıcak güneş altında depolanması fermente olmayan maddelerin miktarını arttırmaktadır [27].

Melasın yaklaşık olarak %15'i su, %50'si sakkaroz ve %35'i de sakkaroz dışı maddelerden oluşmaktadır. Melasın bileşimi Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7: Şeker Pancarı Melas Bileşimi [27]

Şeker %	Şeker Dışı Maddeler					
	İnorg. Mad.		Org. Mad.		Vitaminler	
		%		%		µg/kg
Sakkaroz 48-50	Kül	10,09	Toplam N	2,2	İnozit	5000-8000
Rafinoz 0,8-1,2	Sülfat	11,73	Glutamik Asit	0,53	Biotin	0,04-0,15
Kestoz 0,5-0,8	Potasyum	4,68	Asparagin	0,23	Pantotenik Asit	50-110
Galaktoz 0,3	Sodyum	0,73	Lösin	0,41	Vitamin B1	1,3
İnd. şeker 0,3	Kalsiyum	0,35	Glikokol	0,27	Vitamin B2	0,41
	Magnezyum	0,08	Alanin	0,22	Vitamin B3	5,4
	Demir	0,04	Valin	0,22	Folik Asit	0,29
	Alüminyum	0,12	Aminobütrikasit	0,26	Niyosin	51
	Klor	1,03	Betain	5,5		
	Sülfit	0,03	Aminoasit	0,6		
	Fosfor	0,06	Laktik asit	1,88		
	Nitrat	0,29	Asetik asit	0,81		
	Nitrat(µg/kg)	50-400	Stearik Asit	0,29		
	SO <sub>2</sub> (µg/kg)	10-2	Formik Asit	0,23		
			Bütirik asit	0,18		
			Propiyonik asit	0,11		
			Okzalik asit	0,068		

Melastaki sakkaroz dışı maddeler organik ve inorganik maddeler olmak üzere ikiye ayrılabilir.

#### 2.2.1. Organik Maddeler

Organik maddeler içinde en önemlisi azotlu maddelerdir. Bunların %20'si aminoasit azotu oluşturur. Melastaki asitler arasında en fazla glutamik asit bulunur. Protein yaklaşık %0,6'lık kısmını oluşturur. Bu da toplam azotun %1,6'sını geçmez.

Melasta bulunan azotsuz organik maddeler ise pektin, dikarboksilik asitleri (okzalik, malonik, süksinik, glutarik, adipinik asitler) ve oksikarboksilik asitleri (glikolik, laktik, malik, tartarik asitler) sayılabilir. Uçucu asitlerden (formik, bütirik, propiyonik asitler) de melasta az miktarda bulunur [27].

#### 2.2.2. İnorganik Maddeler

Bu maddelerin miktarı ve bileşimi toprak ve meteoroloji koşullarına ve pancar çeşidine bağlıdır. Sodyum, potasyum, kalsiyum miktarları mikroorganizma gelişimi için yeterli olmakla beraber magnezyum ve fosfor miktarı yetersizdir [27].

Melasın %3,1'i çiftçilere, %54,6'sı sanayiye, %37,6'sı Türkiye Şeker Fabrikalarına ait 4 alkol fabrikasında işlenmekte ve %4,7'si melaslı kuru küspe imali için küspe kurutma tesislerine verilmektedir. Melasla ilgili olarak ihracat ve ithalat bilgileri Çizelge 2.8'de ve 1997-2001 yılları arasındaki melas üretim ve kullanımı ile ilgili bilgiler ise Çizelge 2.9'de verilmiştir. Bu çizelgeye göre Türkiye'de melas çok çeşitli kullanım alanına sahip bir yan üründür [29].

Çizelge 2.8: Ülkemizin son beş yıla ait melas ve kamış melasına ait ithalat ve ihracat değerleri [29]

	Yıl	Maddenin Adı	Dolar (\$)	Miktar(kg)
İHRACAT	2003	Diğer melaslar	1848	8 720
	2004	Diğer melaslar	6537	6 796
	2005	Diğer melaslar	1554	960
	2007	Diğer melaslar	3986	2 097
İTHALAT	2003	Kamış melasları	6058601	79 790 326
		Diğer melaslar	2694657	31 758 140
	2004	Kamış melasları	4862768	56 080 494
		Diğer melaslar	11801560	110 914 387
	2005	Kamış melasları	9317752	76 734 588
		Diğer melaslar	13402435	108 458 295
	2007	Kamış melasları	6768001	62 823 090
		Diğer melaslar	22482843	178 735 709
	2008	Kamış melasları	9135781	59 429 614
		Diğer melaslar	10372424	67 319 927

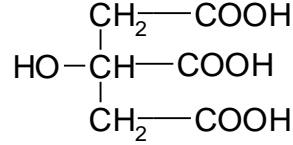
Çizelge 2.9: Ülkemizde 1997-2001 yılları arasındaki melas üretim ve kullanım rakamları [29]

		1997	1998	1999	2000	2001
Üretim	İşyeri Sayısı	27	29	28	28	33
	Miktar (kg)	678.094.129	894.145.442	891.818.669	853.558.631	724.607.486
	Değer (milyonTL)	9.390.094	12.704.553	16.793.706	19.383.258	58.412.151
Tüketim	İşyeri Sayısı	70	132	93	89	96
	Miktar (kg)	451.798.518	639.120.843	436.415.304	529.212.495	641.497.998
	Değer (milyonTL)	8.619.595	13.646.617	8.245.278	29.719.833	60.543.786

## 2.3. SİTRİK ASİT

### 2.3.1. Sitrik Asitin Özellikleri

Sitrik asit (2–hidroksi–1,2,3, propanatri karboksilik asit,) bitki ve hayvanların bilinen metabolitleri olan doğal bir bileşiktir. Aşağıda açık formülü verilen sitrik asit; gıda, içecek ve ilaç sanayisinde geniş olarak kullanılan çok yönlü bir bileşiktir.



İlk olarak 1784 yılında, Scheele limon suyundan sitrik asit izole edilmiştir. 1893 yılında Wehmer, fungusların şeker çözeltilisinde çoğaldıktan sonra sitrik asit ürettiklerini göstermiştir. Günümüzde, mikrobiyal fermentasyonla ticari olarak sitrik asit üretimi üzerine çalışmalar geliştirilmektedir [30].

#### 2.3.1.1.Fiziksel özellikleri

Sitrik asit, susuz, sıcak çözeltilisinden elde edilen kristalleri yarı şeffaf, renksiz ve beyaz kristal tozları halindedir. Sitrik asit nemli havada eriyebilir. Bazı fiziksel özellikleri Çizelge 2.10'de verilmiştir.

Sitrik asitin sulu çözeltileri değerli tampon çözeltilerdir. Çünkü sitrik asit zayıf asit olması ve üç karboksilik grubun olmasından dolayı 3 pK'ya sahiptir. Bunlar; 20°C'de pK<sub>1</sub>=3,14, pK<sub>2</sub>=4,77, pK<sub>3</sub>=6,39. Sitrat çözeltilisinin tampon aralığı 2.5 ile 6.5 arasındadır. Tampon çözeltilisi olarak sitrik asit ve sodyum kullanılır [31].

Çizelge 2.10: Sitrik asitin fiziksel özellikleri

Özellik	Değer
Molekül formülü	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>
Molekül ağırlığı	192,13
Gram eşdeğer ağırlığı	64,04
Erime noktası, °C	153
Isıl bozulma sıcaklığı, °C	175
Yoğunluğu, g/mL	1,665

### 2.3.1.2. Kimyasal özellikleri

Sitrik asit 175°C'nin üzerinde ısıtılırsa akonitik asit, sitrakonik asit, aseton dikarboksilik asit, karbon dioksit ve suya parçalanır.

Sitrik asit, peroksitler, hipokralit, persülfat, permanganat, periyot, hipobromit, kromat, mangan dioksit ve nitrik asit gibi okside edici farklı maddelerin varlığında kolaylıkla okside olabilir. Sitrik asit hidrojenasyona uğradığında 1,2,3–propanetri karbonsilik asit oluşur.

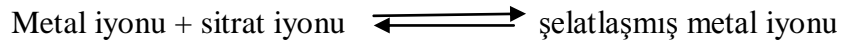
Sitrik asit, alkaliler, amonyak ve aminler gibi katyonlarla mono, di ve tribazik tuzları oluşturur. Uygun bir baz kullanarak sitrik asitin sudaki çözeltisiyle doğrudan nötralleşme tepkimesiyle aşağıdaki denkleme göre tuzları elde edilebilir [30, 31].

Trisodyum sitrat, sitrik asitin diğer tuzlarına göre, geniş olarak kullanılan tuzudur. Nötralleşme reaksiyonu oldukça yüksek ekzotermik bir reaksiyondur (1109 J/g sitrik asit).

Sitrik asit, çok değerlikli metal iyonları ile şelatları oluşturacak pek çok kompleksler verirler. Bu önemli özelliğinden dolayı, sitrik asit veya sitratlar metal bulaşmasının kontrolünde kullanılır.

Metal iyonu normalde renkli olup; sitrat varlığında ise renksiz veya çok az renklidir. Farklı pH koşullarında metal hidroksitler çökebilir; sitrat kompleksi çözünebilir. Metal iyonları varlığında, organik moleküller katalitik olarak bozunabilir; sitrik asit ile metal iyonları oluşturarak kararlı kalabilir.

Şelat bir denge reaksiyonudur. Daima, şelat iyonlarıyla birlikte serbest halde metal iyonları da bulunabilir.



Sitrik asitin sulu çözeltisi karbon çeliklerine orta derecede korozif etki gösterir. Genellikle cam, fiberglas, polietilen, poliprolen, polivinil klorür ve çapraz bağlı vinil klorür gibi plastikler sitrik asitle tepkimeye girmezler.

Sitrik asit, bitki ve hayvan dokularında geniş olarak bulunur. Sitrik asit, bütün organizmalarda, Krebs çevrimiyle oluşur. Trikarbosilik asit çevrimi veya

proteinlerin suya dönüşümünü içerir. Bu çevrim, organizmanın büyümesi hareket etmesi, kemosentezi ve yenilenebilmesi için gerekli enerjiyi sağlar. Aynı zamanda bu çevrim hücre sentezindeki aminoasit ve yağlar gibi karbon içeren maddelerin sentezinde sağlar. Birçok maya, mantar ve bakteri türü sitrik asit çevrimini içerir. Sitrik asit üretim prosesinde bunlardan maksimum ürün verecek türleri seçilir. Bu temele dayanarak, günümüzde sitrik asit üretmek için, ticari fermentasyon prosesleri geliştirilmektedir [30,31].

### 2.3.2. Sitrik Asit Üretimi ve Tarihsel Gelişimi

Tarihte ilk kez, simyager Vincentius Bellovacensis limon suyunun bir asit içerdiğini belirtmiştir. 1784'te Scheele limon suyundan ilk sitrik asit kristallerini izole etmiştir. 1834'de Liebig sitrik asidin üç hidroksil gruplu tribazik bir asit olduğunu belirtmiştir. 1893'de Wehmer *Penicilium glaucum* kültürü ile fermentasyon yoluyla üretilmiş kalsiyum okzalat ile birlikte sitrik asit üretildiğini gözlemiş ve sonraki çalışmalarında da mantar türlerinin incelenmesine öncülük etmiştir.

Wehmer fermentasyon ile sitrik asit üretiminin yüksek ticari potansiyele sahip olduğu anlaşılmıştır. Fakat uygun olmayan fermentasyon ortamı ve kirlenme problemleri endüstriyel üretime geçişi önlemiştir. Bu dönemde, haftalarca üretimden sonra fermentasyon yolu ile üretilen sitrik asit verimi sadece %40'dı. Wehmer kirlenmeyi ortadan kaldırmak için, kirlenmenin olmayacağı bir pH'nın saptanması gerektiğini belirtti.

Bu yüzyılın başında, sitrik asit üretimi %7 – 9 sitrik asit içeren turunçgillerin preslenip kalsiyum tuzu ile çöktürülmesi ile yapılmaktaydı. Bu presle 1 ton sitrik asit üretmek için 30–40 ton limon preslemek gerekiyordu. Bu dönemde, turunçgilleri bol olan İtalya sitrik asit üretimini tekelinde bulunduruyordu.

1913'de Zahorsky *Aspergillus niger* ile birlikte *Sterigmatocystus* türü ile çalışarak sitrik asit üretimi ile ilgili bir patent almıştır. 1917'de Currie *Aspergillus niger* ile sitrik asit üretimini gerçekleştirerek endüstriyel üretime katkıda bulunmuştur. En önemli bulgu, pH 2,5 – 3,5 çevresinde *A. niger* büyütüldüğünde elde edilmiş ve pH=2'nin altında sitrik asit üretiminin arttığı gözlenmiştir.

Wehmer'in de gayreti ile steril koşullar sağlanmış ve 1–2 hafta kadar az bir sürede %60 verimle sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Currie fermentasyon ortamının optimizasyonuna öncülük etmiştir. Optimum sitrik asit üretimi, yüksek şeker derişimleri içeren fermentasyon ortamında misel gelişimi düşük olduğunda elde edilmiştir.

Endüstriyel ölçekte ilk sitrik asit üreten firma, 1919'da Belçika'da kurulan Societe des Produits Organiques de Tirlemont'dur. Bunu Currie'nin katkılarıyla New York (1923) ve England J. ve E Sturge Ferbach'ın patentleri takip etmiştir. 1928'de Çekoslovakya'da Plazen yakınlarında inşa edilen bir fabrikada sitrik asit üretimi için ucuz karbon kaynağı olarak pancar melası kullanılmıştır. Fakat, melas içindeki eser elementler üretiminde problem oluşturmaktaydı. Melas içindeki eser metaller, hekzosiyano ferrat (HCF) ile çöktürülerek uzaklaştırılmasına rağmen bu bulgu 1938'e kadar gizli tutulmuştur. 1933'de Perquin (1938) tarafından aktarılan bilgilere göre, dünyada üretilen sitrik asit 10 400 tondu. Bunun 1800 tonu İtalya'da limondan elde edilirken, geri kalanı fermentasyonla üretilmekteydi.

Mikrobiyal ve biyolojik özelliklerin açıklanması ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Karbonhidratların genel bozunma metabolik yol izleri ve sitrik asidin (piruvattan oluşan CoA ve okzala-asetatin kondensasyon anahtar reaksiyonuyla) birincil bir metobolit olduğu anlaşılmıştır.

Klasik sitrik asit fermentasyonu yüzey kültürü ile yapılmaktaydı. Daldırılış fermentasyon prosesi ile de sitrik asit üretimi gerçekleştiriyordu, fakat endüstriyel ölçekte uygulaması elli yıl önce gerçekleştirilmiştir. Szücs (1944), ortamda asimile olabilen bir karbon kaynağı bulunursa daldırılmış fermentasyonun kullanılabileceğini önermiştir.

1960'larda amino asitler, vitaminler ve koenzim ve organik asitler gibi çeşitli ürünler karbon kaynağı olarak n–alkanlardan faydalanmak için geniş çalışmalar başlatıldı. Ayrıca, 1966/67 Japon çalışmacılar *Corynebacterium*, *Arthorebakterium* ve *Brevibacterium* gibi bakteri ve bakteri mutantları ile n–parafinler (C<sub>9</sub> – C<sub>30</sub>) ve benzer substratlardan sitrik asit üretimi üzerinde çalıştılar. Ticari bir açıklaması olmayan bu bulgular patentlendi. Son on yıl ise belirli mayalar üzerinde durulmaktadır. Özellikle *Candida* mayası, karbon kaynağı olarak n–parafinlerden

faydalanarak izositrik asit oluşumu üzerinde çalışılmaktadır. Ancak, bugün mevcut endüstride, *Aspergillus niger* mantarı kullanılmakta ve daldırılmış fermentasyon yöntemiyle üretim yapılmaktadır.

Son yıllarda sitrik asit üretim çalışmaları yeni atık arayışları içindedir. Ayrıca metabolik yol hakkında da çalışmalar yapılmaktadır. Jhongh ve Nielsen (2008)'nin yaptıkları çalışmada sitrik asit üretiminin mitokondride gerçekleştiği ve üretimden sorumlu genlerin bulunduğu bildirilmiştir [32]. Özellikle katı faz fermentasyonunda yaşanan zorluklar göz önüne alınarak lignoselülotik atıkların sıvılaştırılması veya hidrolizi ile yeni substratlar oluşturulmaktadır.

Sitrik asit üretiminin daha verimli üretimi için yapılan diğer bir çalışma da mutasyon çalışmasıdır. *A. niger* filamentli fungusları UV veya kimyasal yöntemlerle mutasyona uğratarak çeşitli mutantlar elde edilmektedir. Bu mutantlar üzerine yapılan çalışmalarda orijinal türe göre daha yüksek sitrik asit ürettikleri ancak oldukça dayanıksız oldukları belirlenmiştir. Lotfy ve ark. (2007)'de yaptıkları çalışmada UV radyasyonu ile ethyl methane sulfonate ve acridine orange kimyasal işleme mutantlar elde edilmiştir. Elde edilen mutantın sitrik asit üretim verimliliğinin %60 olduğu ve özgül üreme hızı ve özgül üretim hızının sırasıyla 4,5 ve 7,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca büyüme ortamında melas varlığında azot ve karbon kaynaklarını verimli kullandığı belirlenmiştir [33].

Pakistan'da bulunan bir biyoteknoloji grubu sitrik asit üretim verimliliğinin artırılması üzerine birçok çalışma yapmıştır. Yaptıkları çalışmalar  $Mn^{+2}$  iyonlarının etkisi [34], mutasyonun etkisi [35, 36, 37, 38, 39], sitrik asit üretimi en yüksek *A. niger* suşlarının topraktan izolasyonu [40], sıcaklığın etkisi [41], vermiculite [42] ve  $CaCl_2$  [43] gibi ilave kimyasalların etkisi, alkol sınırlamalarının etkisi [43, 44], fosfat sınırlamalarının etkisi [37], çalkalama hızının etkisi [36] üzerinedir. Ayrıca fermentasyonları erlen veya biyoreaktörlerde yürütmüşler ve substrat olarak sakkaroz, glikoz veya melas kullanmışlardır.

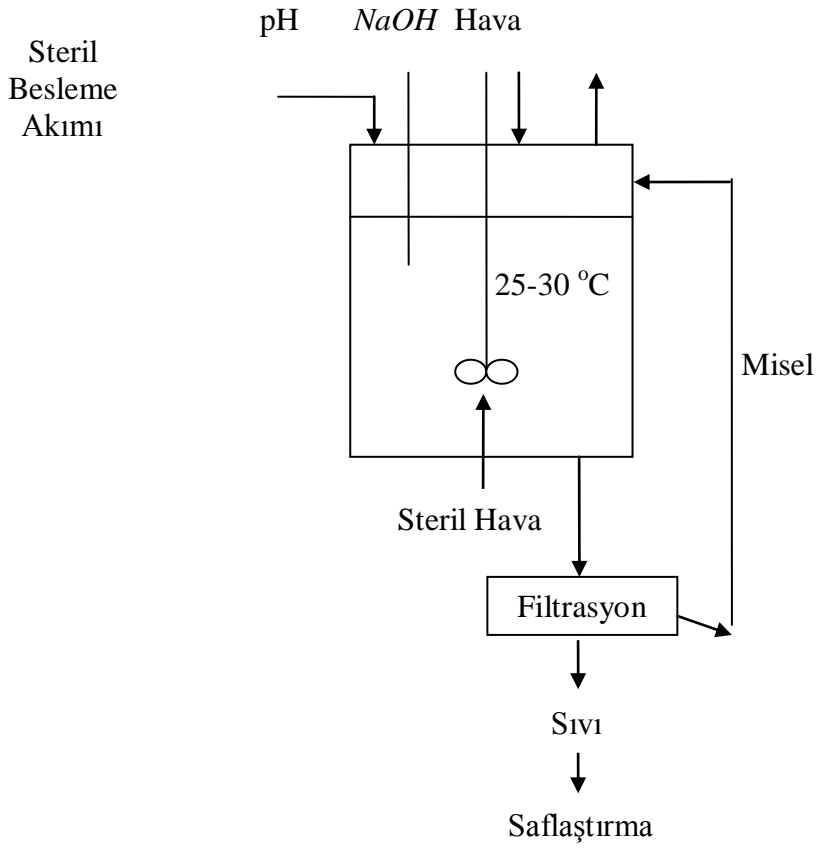
#### 2.3.2.1. Daldırılmış (sıvı faz) fermentasyon

Dünyanın ihtiyacı olan sitrik asidin %80'den çoğu daldırılmış fermentasyon prosesi ile üretilmektedir. Daldırılmış fermentasyonda yüzey prosesinden daha



yüksek verimde sitrik asit üretilir ve işletme masrafları düşüktür [45]. Bu yöntemde önemli olan temel faktörler: misel morfolojisi, ortam bileşimi, pH, havalandırma ve fermentör inşasıdır (Şekil 2.2).

Yüksek sitrik asit üretimi için, misel morfolojisinin gelişmesine izin verilmelidir. Hammaddelerdeki  $Fe^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  gibi ağır metallerin düşük düzeylerde olması peleti etkileyebilir [46, 47]. Sitrik asit fermentasyonlarının ilk 2-3 günü misel büyümesi ve pelet oluşumu için kritik periyottur.



Şekil 2.2: Daldırılmış kültür ile sitrik asit üretimi [48]

Fermentasyon için aşılama çok önemlidir. Çünkü üretimin niceliğini büyük bir şekilde etkileyebilir. Onun için aşılama etkin olmalıdır. Mantar üretimi için gerekli sporlar, agar, silika jel, düşük sıcaklıkta gliserol, laktoz ve liyofileze gibi kaynaklardan saf su ile alınıp katı ortama aktarılır. 7 günlük inkübasyon sonunda steril saf su ile sporlar katı ortamdaki sıvı ortama aktarılır. Sıvı ortamda, sporlar önce

miselleşip sonra sitrik asit üretirler. Fermentasyonun sonunda sıvı, süzülerek miselden ayrılır ve sitrik asit ayırma birikiminde kristallendirilir [49].

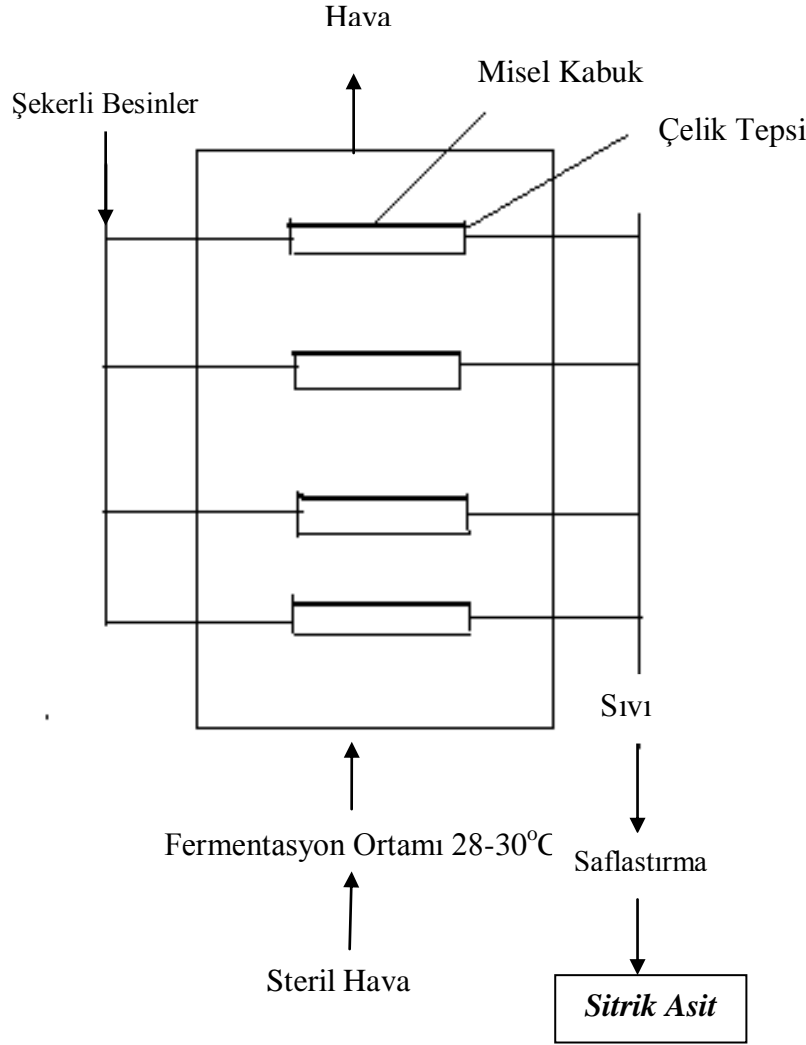
Daldırılmış fermentasyonla birlikte katı hal ve yüzey fermentasyon yöntemleri ile de sitrik asit üretimi yapılmaktadır. Ancak, en yaygın olarak kullanılan yöntem daldırılmış fermentasyondur.

#### 2.3.2.2. Yüzey Fermentasyonu

Şeker içeren steril ortam, çelik veya alüminyum tepsilere dökülerek özel odalara yerleştirilir. Bu odalar, sıcaklık kontrollü, nemli ve hava sirkülasyonludur. Çoğaltılmış *A. niger* sporları ortama aşılanır ve 28-30°C sıcaklık, %40-60 nemde 8-12 gün beklenir (Şekil 2.3). Organizma çoğalır, bütün yüzeyi kaplar ve ortam asidikleşmeye başlar. Fermentasyon sonunda ortam pH'sı ölçülür, sıvı boşaltılır ve sitrik asit kristallendirilir. Miseller taze ortama eklenerek devam edilir [49].

Barington ve Kim (2008) tarafından yapılan çalışmada substrat olarak turba yosunu glikozla zenginleştirilerek kullanılmıştır. Sitrik asit üretimi için yüzey fermentasyonu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 120 saatlik fermentasyon süreci sonunda maksimum sitrik asit üretimi 354,8 g/kg olarak bulunmuştur [50].

Yüzey prosesleri çok eski prosesler olmasına rağmen, hala kullanılmaktadır. Son zamanlarda bunların yerini sıvı üretim prosesleri almaktadır.



Şekil 2.3: Yüzey Kültürü ile Sitrük Asit Üretimi [47]

### 2.3.2.3. Katı hal fermentasyonu

Bu proses ilk olarak 1935 yılında Chan tarafından kullanılmıştır. Japon geleneksel uygulaması olup KOJİ yöntemi olarak da bilinmektedir. Uygulaması güç olduğundan endüstriye uygulanmamıştır. Fermentasyon ortamı, uygun oranda şeker kamışı melası, patates ve et püresi gibi gözenekli katı materyallere tutturulur. Daha sonra spor süspansiyonu aşılanır. Karışım, tepsilere 25-30°C'de 6-7 gün inkübe edildikten sonra su ile ekstrakte edilerek deriştirilir ve sitrik asit ekstrakte edilir [51]. Bu fermentasyonla ilgili son yıllarda çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle şeker pancarı küspesi gibi katı atıklar üzerine birçok çalışma vardır. Maddox ve Brooks (1997) katı faz fermentasyonunda substrat olarak nişasta içeriği yüksek olan kumara

adlı bitkiyi kullanarak dolgulu yatak reaktörde sitrik asit üretimi çalışmışlardır. Çalışma sonucunda tek katlı sistemde 42,7 g/kg, dört katlı sistemde ise 83,5 g/kg sitrik asit üretmişlerdir [52]. Roukas (1997) ise substrat olarak keçiyoynuzu küspesi kullanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre maksimum sitrik asit üretimi 176 g/kg, sitrik asit verimliliği ise %55 olarak belirlenmiştir [53]. Vanderberghe ve ark (2000) yaptıkları çalışmada ise substrat olarak şeker pancarı küspesi, kahve atığı ve kasava bagazı kullanılmıştır. En iyi adaptasyonun kasava bagazında olduğu ve 120 h, 26°C'de başlangıç neminin %62 olduğu koşulda sitrik asitin maksimum derişimde (82 g/kg) olduğu belirlenmiştir [54]. Kumar ve ark(2003) katı faz fermentasyonunda sitrik asit üretiminde substrat olarak şeker pancarı küspesi kullanmışlardır. Çalışmada ortamı nemlendirmek için önişlemeden geçirilmemiş melas kullanılarak sitrik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda sakkarozlu ortamda 20,2 g/kg, önişlemeden geçirilmemiş melaslı ortamda 17,9 g/kg, ön işlemeden geçirilmiş melaslı ortamda ise 19,8 g/kg maksimum sitrik asit saptanmıştır[55]. Shojaosadati ve Babaeipour (2002) tarafından yapılan çalışmada substrat olarak elma posası ve reaktör olarak çok tabakalı dolgulu yatak sistemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre maksimum sitrik asit derişimi 124 g/kg'dır [56]. Darani ve Zaoghi (2008) tarafından yapılan çalışmada şeker pancarı melasından sitrk asit üretim çalışması yapılmış ve çalışma sonucunda 137,6 g/kg sitrik asit üretilirken substrat tüketiminin %96 olduğu belirlenmiştir [57].

Yarı kesikli, sürekli ve çok basamaklı prosesler patentlidir ve tüm detayı bilinmez.

### 2.3.3. Sitrik Asit Üretim Koşullarına Etki Eden Faktörler

#### 2.3.3.1. Makro bileşenler

Kültür şartları mikroorganizmanın türünden türüne değişir. Bu yüzden, belli türe göre en iyi substratı belirlemek çok önemlidir. En iyi sitrik asit üretimi basit sentetik ortamda olur. Kompleks ortamdaki verim, metaller ve diğer bileşiklerin etkisinden dolayı genellikle düşüktür. Karbon kaynağı olarak glukoz, sakkaroz, melas, şeker kamışı suyu, nişasta, şeker kamışı, şeker pancarı küspesi kullanılır. Seçilen substrata göre uygulanan fermentasyon tipi de değişmektedir.

*A.niger*'den sitrik asit ve diğer organik asitlerin üretiminde başlangıç şeker derişimi verimi çok etkiler. Genellikle *A.niger*, yüksek başlangıç şeker derişimi (%15–18) ister. Düşük derişimlerde okzalik asit oluşur ve sitrik asit verimi düşer. Yüksek derişimlerde ise, artık şeker derişimi de yüksek olur ve proses daha az ekonomik olur.

Melas %50–60 sakkaroz içerir. Siyah şurup ve rafineri gibi farklı tipte melaslar vardır. Melas kullanımının dezavantajı yüksek kül (ash) içeriğine sahip olmasıdır. Bu sitrik asit üretimini inhibe etmektedir. Melas %15-20 oranında seyreltilir ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilavesiyle pH 5,5-6,5'e ayarlanır. Diğer temel besinler eklenir ve ortam 30 dk. steril edilir. Metallerden ayırmak için, genellikle iyon değiştirici reçinelerden geçirilerek ön işleme tabi tutulur. Diğer uygulanan işlemler ise Çizelge 2.11'de verilmiştir.

Çizelge 2.11: Sitrik asit üretimi için hammaddelerin işlenmesi [58]

<b>Hammadde</b>	<b>Saflaştırma prosesi</b>
Saf sakkaroz	Katyon değiştirici
Saf nişasta	Katyon değiştirici
Saf glikoz	Katyon değiştirici
Ham şeker	Ferrosiyanat ile temizleme
Melas	Ferrosiyanat ile temizleyici
Yüksek test melası	Kimyasal işlem
Ham nişasta	Kimyasal işlem
Mısır özü	Kimyasal işlem

*A.niger* ile sitrik asit üretimi, çoğalma ve üretim basamaklarını içerir. Özellikle ortamda bulunan azot, fosfat, kükürt ve farklı eser elementler sitrik asit üretim verimliliğini etkiler. İnorganik azot kaynağı olarak, genellikle, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> ve üre kullanılır. Fakat azot kaynağının türü ve derişimi çok önemlidir. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çoğalmayı uzatırken, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> bu çoğalma periyodunu kısaltır. Ancak, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> %0,25'den daha yüksek olduğunda okzalik asit oluşumu gerçekleşir. Genellikle yüksek azot kaynağı derişimi çoğalma periyodunu uzatır ve uzatım başlangıcını geciktirir. *A.niger* ile sitrik asit üretiminde, KNO<sub>3</sub> ve NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>' den çok daha etkilidir.

Ortamdaki fosfat derişimi de sitrik asit oluşum miktarını etkiler. Yüksek derişimleri çoğalmayı arttırırken asit üretimini düşürür. Genellikle fosfat derişimi

%0,1–0,2 arasında kullanılır. Fosfat kısıtlamasının sitrik asit üretimini uyardığı belirtilmektedir [59]. Makro bileşenleri ayrı ayrı ele alacak olursak;

**Şeker:** Fungusun karbon kaynağını kolaylıkla asimilasyonunu ve yüksek sitrik asit birikimi sağlayabilmesi için ortamda karbon kaynağı olarak glikoz, fruktoz ve sakkaroz kullanılmaktadır [60,61]. *A. niger* B60 türleri için maltoz ve sakkaroz gibi disakkarit türleri glikoz ve früktoz gibi monosakkaritlere göre sitrik asit birikimi için en iyi karbon kaynağıdır. Genellikle sitrik asit üretiminde sakkaroz ve ticari olarak en ucuz kaynak olan melas kullanılmaktadır. Ayrıca bazı ham karbonhidrat kaynakları da sitrik asit üretimi için kullanılmaktadır. Hurma şurubu, pamuk atığı, peynir altı suyu, bira fabrikası atıkları, şeker pancar ve kamışı melası, işlenmemiş sakkaroz, kamış suyu, %2 metanol ilave edilmiş filtrelenmiş peynir altı suyu ve muz ekstraktı kullanılan temel substratlara örnek olarak verilebilir. Sitrik asit fermentasyonunda karbon kaynağının tipinin yanında kullanılan miktar da oldukça önemlidir. Maksimum sitrik asit üretimi için ortamda %14-22 arasında şeker bulunması gerektiği bugüne kadar yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [60,62,63].

**Azot kaynağı:** Genellikle amonyum sülfat veya amonyum nitrat azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Fiziksel olarak ortam pH'nın 2'nin altına çekilmesinde tercih edilmektedir. Farklı azot kaynaklarının kullanılması sitrik asit üretim verimliliğini değiştirmektedir. Amonyum sülfatın optimum 5 kg/m<sup>3</sup> derişiminde kullanılması halinde 32 kg/m<sup>3</sup> sitrik asit üretilbildiği gösterilmiştir. Ancak Yiğitoğlu ve ark., en iyi başlangıç amonyum sülfat derişiminin 3 kg/m<sup>3</sup> olması gerektiğini bir seri fermentasyonla göstermişlerdir. 10 m<sup>3</sup>'lük bir ortamda yapılan seri fermentasyonda amonyum sülfat derişimi 0,5-4 kg/m<sup>3</sup> arasında kullanılmıştır [63]. Hücre dışı amonyum iyonu derişimi 2-3 mmol/g hücre arasında olduğunda sitrik asit üretim hızı en yüksek olmaktadır. Ancak hücre dışı amonyum iyonu derişimi 1 mmol/g hücreye düştüğünde sitrik asit üretimi durmaktadır [62, 63].

**Fosfat:** Fosfatın sitrik asit üretimi üzerine etkisi olmadığı düşünülse de mangan, çinko ve fosfat arasındaki denge çok kritiktir. Fosfatın sınırlandırılması sitrik asit üretim verimliliği üzerinde yararlı bir etkiye sahiptir. Fungal büyüme için fosfatın %0,1-0,2 arasında olması gerekmektedir. Ancak ortamda bakırın varlığı optimum fosfat değerini düşürebilmektedir. Fosfat daha çok ikincil metabolitlerin

üretiminde anahtar fonksiyona sahiptir. Ortamda fosfatın varlığı fermentasyon zamanını da önemli seviyede düşürmektedir [63]. Vassileva ve ark. (1998)'nın yaptıkları çalışmada besiyeri ortamı kaya fosfatsız, 3 g/L ve 7 g/L kaya fosfatlı olarak kullanılmıştır. Maksimum sitrik asit verimliliği kaya fosfatsız olan koşulda 0,15 g/L/h olarak bulunmuştur [65].

**Magnezyum:** Hücre içinde enzim reaksiyonlarında bir kofaktör olarak rol aldığı için sitrik asit üretimi ve hücre büyümesi için gereklidir. Maksimum sitrik asit üretimi için magnezyum sülfatın optimum derişimi %0,02-0,025 arasında belirlenmiştir [62,64].

#### 2.3.3.2. Eser elementler

Fermentasyon ortamında eser element derişimi sitrik asit fermentasyon verimliliğini (gram şeker başına gram sitrik asit) etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Özellikle, mangan, demir, bakır ve çinko miktarları çok kritiktir. Eğer bu iz elementlerin seviyeleri doğru tespit edilmişse, diğer faktörlerin etkisi daha az olur. Eğer ortamda yüksek sitrik asit tespit edilemiyorsa mutlak olarak iz element derişiminin kontrol edilmesi gerekmektedir [66,67,68].

*A.niger* çoğalması ve sitrik asit üretimi için bazı anyon ve katyonlara ihtiyacı vardır ( $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$ ). Bu metal iyonlarının derişimleri belki de sitrik asit verimini etkileyen tek önemli faktördür.  $Mg^{+2}$  kinazlar gibi, hem çoğalmayı hem de sitrik asit üretimini uyaran enzim reaksiyonları için gereklidir. Maksimum sitrik asit üretimi için, optimum derişimi %0,02-0,025'dir.  $Fe^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  fermentasyon verimliliğini belirlemede önemli rol oynar. Optimum derişim türden türe değişir. Fakat genellikle, çoğalmayı uyarmak için derişimi küçük tutulmalıdır. Melas içeren sıvı ortamda *A.niger* ile sitrik asit üretiminde başlangıç  $Fe^{+2}$  derişimi 0,2 ppm'den düşük olmalıdır. Fakat, 0,5–500 ppm  $Cu^{+2}$  iyonlarının aşılama sırasında veya fermentasyonunun ilk 50 saatinde eklenmesi  $Fe^{+2}$ 'nin inhibitör etkisini kaldırdığı bulunmuştur.  $Zn^{+2}$  derişimi 1–2 ppm olduğunda çoğalma fazı uyarılır. Buna karşın, 1 ppm'den daha az olduğunda sitrik asit üretimi uyarılır. Üretim fazı sırasında  $Zn^{+2}$  eklenmesi çoğalmayı etkilemez ve sitrik asit üretimini inhibe eder. Bu yüzden  $Zn^{+2}$ 'nin çoğalma ve üretimin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmiştir.  $Zn^{+2}$ 'nin tükenmesi, çoğalma fazından üretim fazına geçtiğinin sinyallerini verir.

Zn<sup>+2</sup> ilavesi üretimi geciktirmektedir. Ba<sup>+3</sup>, Al<sup>+3</sup> vb. gibi diğer eser elementler de üretimde önemli rol oynamaktadır. Fakat onların etkilerinin neler olduğu anlaşılmamıştır [49].

Besiyeri ortamında Mn<sup>+2</sup> derişimi *A. niger*'in yüksek oranda sitrik asit biriktirmesinde anahtar bir rolü vardır [34, 66, 69, 70]. Fermentör ortamındaki Mn<sup>+2</sup> derişimi, 0,002 mM altına düşürülürse biyokütle çoğalmamasına rağmen, büyük miktarlarda sitrik asit üretilir [72]. Clark ve ark., pancar melasıyla sitrik asit üretim çalışmalarında ortama 2 ppb ile 100 ppb arasında manganez eklenmesinin sitrik asit verimliliğini %10 ile %25 arasında azalttığını göstermişlerdir [73]. Manganez aynı zamanda protein sentezini inhibe etmektedir, bu nedenle sitrik asit birikimi için ortamda Fe iyonlarının olması gerektiği de önce yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [62]. Bakır iyonları ise sitrik asit üretiminde demir ve mangan iyonlarının etkisini gidermektedir. Bu nedenle sitrik asit üretimi için ortamda bulunması gereken optimum bakır derişimi 40 ppm olarak belirlenmiştir [63].

#### 2.3.3.3. Aşılama

Fermentasyon ortamına aşılama, ya sporla ya da miselle yapılabilir. Eğer spor kullanılacaksa, %0,1 Tween 80 ile sporlanmış kültürden taze spor çözeltileri alınır ve başlangıç derişimi 10<sup>5</sup>–10<sup>8</sup> spor/mL olacak şekilde fermentöre verilir. Eğer misel peletleri fermentöre aşılama kullanılacaksa, sporlar önce taze ortamda 2–3 gün çoğaltılır ve daha büyük fermentöre aşılanır. Spor yaşı önemlidir. 7–8 Günden daha yaşlıların çoğalması zayıf olur ve sitrik asit verimini düşüktür [49].

#### 2.3.3.4. Lipitler

Kumar ve ark (1976) bitkisel yağlar ve yağ asitlerinin mikroorganizmaların enzim aktivitelerini etkilediklerini rapor etmişlerdir. Asetil-CoA aktivitesini de arttırmaktadır [68]. Kılıç (2001) tarafından yapılan yüksek lisans tezinde melastan sitrik asit üretimi sırasında mısır özü yağı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, %2 (v/v) mısır özü yağı derişimine kadar sitrik asit derişimi artmakta daha sonra azaldığı bulunmuştur. Kontrol grubuna göre üretimin 2,5 kat arttığı görülmüştür [74]. K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> varlığında mısır özü yağının sitrik asit üretimini daha çok arttıracığı düşünülmüştür. Sadece mısır özü yağı kullanıldığında sitrik asit



derişiminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Mısırozü yağı derişimi %5 (v/v)'e çıktığında hücre membran yapısı kalınlaşmış olduğundan sitrik asitin hücre dışına çıkması engellenir ve ürün inhibisyonu etkisini gösterir [74, 75]. Yapılan bu çalışmada melas köpürmesini engellemek için % 2 oranında mısır özü yağı kullanılmıştır.

#### 2.3.3.5. Düşük alkoller

Alkol olarak metanol ve etanol kullanılmaktadır. Hamissa ve Hang [76,77], metanol ve etanolün %1-3 olduğu ortamlarda sitrik asit üretiminin en yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu alkoller metanol, etanol, izopropil alkol gibi alkoller olup fermentasyon ortamındaki eser elementlerin negatif etkisini ortadan kaldırarak sitrik asit üretimini hızlandırmaktadırlar. Alkol derişimi karbon kaynaklarına göre değişmektedir. Manonmani ve ark (1988) alkollerin mikroorganizma aktivitesini hızlandırdığını ve sitrik asit üretimini %75 arttırdığını rapor etmişlerdir [78, 79].

#### 2.3.3.6. Sıcaklık

Kullanılan mikroorganizma türüne göre çeşitlilik göstermekte olup inkübasyon sıcaklığı 28 ile 32°C arasında değişmektedir [60,62]. Kubicek (1980), en yüksek sitrik asit üretiminin 30-32°C sıcaklıkta gerçekleştiğini; sıcaklığın 35°C'ye yükseldiğinde verimin %15 ve 25°C'ye düştüğünde ise verimin %22 azaldığını rapor etmiştir [80].

#### 2.3.3.7. Fermentasyon pH'sı

Karbon kaynaklarına göre ortam pH'sı değişmektedir. Kahlon (1982) melasla yapılan çalışmalarda en yüksek sitrik asit verimliliğinin 6,0-6,5'da gerçekleştiğini rapor etmiştir [81]. Shadufzu ve ark (1980) düşük pH'larda kontaminasyonun ve okzalik asit oluşumun engellendiğini rapor etmişlerdir[82]. Srivastava ve ark. [83] ve Bizukoje ve Ledakowicz [84] düşük pH'larda çalışırken Ikram-Ul Hak ve ark [34, 35, 36, 37, 59, 65] ise pH 6,0 da çalışmışlardır. Sitrik asit üretiminde başlangıç pH'sı oldukça önemlidir. Sitrik asit üretimi için ortam pH'sının 1,95 ile 3,10 arasında olması gerekmektedir. Sitrik asit üretimi pH değerinin artmasıyla artmaktadır. *A.niger*'in çoğalması için pH 5 civarında olması gerekir. Üretim fazı esnasında pH'm 2'nin altına düşmesi kritiktir. Bu düşük pH, glukonik asit ve okzalik

asit üretiminde muhtemel gen regülasyonu ve enzim inhibisyonunu bilinmeyen mekanizmasıyla engellenmektedir. Yiğitoğlu ve ark. (1998) ortam pH değerinin son ürün derişimi için 2,5 olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı rapora göre kültür ortamının pH'sının 1,8 ile 2,5 arasında kontrol edilmesi gerektiği rapor edilmiştir. [63,68, 85]

Ortamın pH değerine göre üretilen ürünler değişiklik göstermektedir. *A. niger* ile fermentasyon koşullarında pH 3,0-3,5 aralığında sitrik asit, pH 6,0-7,0 aralığında okzalik asit üretilmektedir [86,87]. Okzalik asit üretiminden sorumlu enzim olan okzaloasetat hidrolaz enzimi  $pH \geq 4$ 'de çalışmaktadır [8]. pH 6,0 değerinde başlayan bir fermentasyonda öncelikle okzalik asit oluşmakta ve daha sonra üretilen diğer yan ürünlerle, ortamda  $H^+$  iyonu derişiminin artmasıyla fermentasyon sitrik asit üretimine dönmektedir. Eğer besiyeri ortamının pH'sı 6,0'a ayarlandıktan sonra tüm fermentasyon süreci boyunca pH sabitlenirse oksalik asit birikimi sağlanmış olur [87]. Fermentasyon koşulları değiştirilecek olursa glukonik asit birikimi sağlanmış olur [88]. Bu durum *A. niger*'in ortam pH'sına ve besiyeri içeriğine göre birçok ürünü sentezleyebildiğini göstermektedir. Melas ortamında *A.niger* ile sitrik asit üretim çalışmasında başlangıç pH değerinin düşük olduğu çalışmada sitrik asit üretiminin azaldığı tespit edilmiştir [35].

#### 2.3.3.8. Havalandırma-karıştırma

Fermentasyon aerobik koşullarda gerçekleşmektedir. Kubicek ve ark [80] 20 dakika oksijenin kesilmesinde verimin %9-19 arasında düştüğü, Hanissa [76] en yüksek sitrik asit üretiminin gerçekleşmesi için ortamdaki çözülmüş oksijenin %12-13 olması gerektiğini rapor etmişlerdir. Bizukoje ve Ledakowicz (2004) yaptıkları çalışmada karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanmışlar ve ürün oluşumu ve substrat kullanım kinetiğini oluşturmuşlardır. Yaptıkları çalışmada sitrik asit üretiminin maksimum olabilmesi için ortamın oksijenle doygun olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bunun için havalandırılmalı biyoreaktörde havalandırma oranını 1 L/dakika'dan 20 L/dakika'ya çıkarmışlardır [84].

Yüksek hava akış hızı ya da saf oksijen ile havalandırma sitrik asit üretimini arttırmaktadır [45]. Fermentasyonda saf oksijen kullanımı prosesi maliyeti arttırır.

Ancak, proseste kullanılan gaz kullanıldıktan sonra CO<sub>2</sub>'i ayrılıp tekrar sisteme verilebilir.

Kishore ve ark [89, 90] fermentasyon işlemi sırasında fermentör ortamında çözünmüş oksijen doygunluğunun (DO<sub>2</sub>) %80'e çıkarıldığında, çözünmüş oksijen doygunluğunun %20, %40, %60 olduğu şartlara göre maksimum sitrik asit derişimlerinde yaklaşık %50'lere varan artışlar gözleendiğini rapor etmişlerdir.

Daldırılmış kültürle sitrik asit üretim proseslerinde havalandırma kritik bir değere sahiptir. Bu nedenle havalandırma değeri 0,6 vvm (dakikada litre ortam başına litre hava değeri) olarak önerilmiştir. Ancak bazı çalışmalarda 30,3 ile 48,7 kg/m<sup>3</sup>'lük sitrik asit üretimi için 0,9 ile 1,3 vvm arasında havalandırma oranı kullanılarak elde edildiği gösterilmiştir [62, 68, 85].

Çalkalama hızı özellikle çalkalamalı fermentörlerde önemli bir kriterdir. Çalkalamanın hızı arttıkça peletlerin büyüklüğü artmakta ve sonuç olarak sitrik asit üretimi de artış göstermektedir. Maksimum üretim için çalkalama hızı kullanılan organizmaya göre çeşitlilik göstermektedir [62,85].

#### 2.3.3.9. Fermentasyon süresi

Sitrik asit fermentasyonunun 8 günde tamamlandığı rapor edilmiştir [82]. Fermentasyon süresini arttırmak sitrik asit üretim verimliliğini arttırmamaktadır. Ancak fermentasyon süresi kullanılan fermentasyon çeşidine (sıvı, derin kültür ve katı faz) ve kullanılan mikroorganizma türüne göre çeşitlilik göstermektedir [62, 68, 85].

#### 2.3.3.10. Diğerleri

Manomani ve Sreekantiah [79], potasyum ferrisiyanid, sodyum mono fluoraasetat, sodyum florid'in mikroorganizma gelişimini arttırdığı yaptıkları çalışmalarda rapor etmişlerdir. Bu şekilde mikroorganizma enzim aktivitesini artırarak daha fazla asit üretimi sağlanmaktadır [79, 91].

Tokatman (2001) tarafından yapılan yüksek lisans çalışmasında sitrik asit üretiminde verim üzerine bazı poliollerin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla mannitol, xylitol ve sorbitol içeren fermentasyon ortamları oluşturulmuştur. Mannitol ve

sorbitolün sitrik asit üretim verimliliğini arttırdığı, xylitolün ise değiştirmediği bulunmuştur [92].

#### 2.3.4. Sitrik asitin geri kazanılması

Sitrik asit fermentasyon çözeltisi biyokütleden, santrifüj veya filtrasyon ile ayrılır. Sitrik asit ise, genellikle, ya kalsiyum hidroksit (kireç)-sülfürik asit metodu veya sıvı ekstraksiyon metoduyla ayrılır[51].

##### 2.3.4.1. Kalsiyum hidroksit – sülfürik asit metodu

Kimyasal sistemlerde olduğu gibi bu metot da, mühendislik temelleri ayırma teknikleri ve temel işlemleri içeren, kompleks ticari bir sistemdir. Bu metot da, çözünmeyen biyokütleden ayrılan fermentasyon çözeltisi kalsiyum hidroksit ile muamele edilir ve kalsiyum sitrat halinde çöktürülür. Belli bir süreden sonra, kalsiyum sitrat keki tekrar sıvı ortama alınır ve sülfürik asit ile asitlendirilerek sitrik aside dönüştürülür ve kalsiyum sülfat çöker. Hem kalsiyum sitrat, hem de kalsiyum sülfat reaksiyonları karıştırmalı reaktörlerde gerçekleştirilir.

Sitrik asit çözeltisi, eser miktardaki kalsiyum, demir ve katyonik safsızlıklardan arındırmak için, deiyonize edilir ve kristallendirilir. Sulu sitrik asit çözeltisi, bir seri kristalizasyon basamaklarıyla kalan safsızlıklardan, fiziksel yöntemle ayrılır.

Son olarak, sitrik asit kurutulur ve sınıflandırılır. Çünkü susuz sitrik asit çok hidroskopiktir; bu nedenle, yüksek sıcaklık ve yüksek nem alanlarında korumak için, depolaması ve paketlenmesi önem arz eder [51].

##### 2.3.4.2. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu

Bu geri kazanma prosesi 1970'li yıllarda gerçekleştirilmiştir. Sitrik asit fermentasyon ortamından trilaurilamin, n-oktanal ve C<sub>10</sub> veya C<sub>11</sub> hidrokarbonların karışımıyla ekstrakte edilir. Bunu, çözücü fazdan su fazına sitrik asidin tekrar ekstraksiyon basamağı takip eder. Sitrik asit, çözücü faza tamamen alındıktan sonra,

çok basamaklı zıt akımlı sistem kullanılarak tekrar ekstraksiyon işlemiyle suya alınır. Bu iki basamak da farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir.

Prosesin son basamağında, sulu sitrik asit çözeltisi hidrokarbon çözeltisiyle yıkanır ve aktif karbon kolundan geçirilir. Karbon kolundan çıkan akım, buharlaştırıcı, kristalizasyon, kurutma ve paketleme basamaklarından geçirilerek proses tamamlanır[51].

#### 2.3.5. Sitrik Asidin Depolanması

Sitrik asit kristalleri yüksek nem ve sıcaklıktan korunacak şekilde kuru halde depolanmalıdır. Nemli hava ile teması kesmek için, içinde bulunduğu kapların çok sıkı şekilde kapatılması gerekir. Büyük taneciklerin kek oluşturma eğilimleri daha zor olduğu için, sitrik asidin granüler hali ticari olarak daha uygundur.

Sıvı sitrik asit, ticari olarak farklı derişimlerde bulunmakta olup; en çok bulunan %50 w/w'dir. Sınıflandırılması, görünüşüne, saflığına ve rengine göre yapılır. Kristallenmeyi önlemek için, sıvı sitrik asit, 0°C'nin üzerinde tutulur.

Sitrik asit çözeltisi normal betona, karbon çeliğine, bakıra, bakır alaşımlarına karşı korozitiftir. Ayrıca, polikarbonatlar, poliamidler veya akrilikler de kullanılmamalıdır.

Borular, tanklar ve pompalar için önerilen materyaller 316 (stainles steel) çelik fiberglas ile zenginleştirilmiş poliester, polietilen ve polivinil klorürdür. Yüksek sıcaklıkta 304 (stainles steel) önerilmez [51].

#### 2.3.6. Sitrik asitin sağlık, güvenlik ve çevre şartları

Birleşmiş Milletler FAO/WHO tarafından, sitrik asidin gıdalarda kullanılması onaylanmıştır.

Sitrik asit ve Na, K tuzları, ABD gıda ve ilaç yönetimi (U.S. Food and Drug Administration) tarafından çok amaçlı gıda maddeleri olarak kabul edilmiştir.

Testler sitrik asidin deriye karşı korozyon etkisinin olmadığını göstermiştir. Fakat deriyi ve gözü tahriş edicidir. Bu sebeplerden dolayı, direkt sitrik asit çözeltisi

ve tozları kullanılacaksa, elleri, deriyi, gözleri, burunu ve ağzı korumak gerekmektedir.

Sitrik asit, doğal çevrede, organizma tarafından, aerobik ve anaerobik atık su işlemleri sırasında biyolojik olarak parçalanabilir[51].

### 2.3.7. Sitrik asitin kullanım alanları

Gıda endüstrisindeki tüketim amacı, asitlendirme ajanı olarak, pH tamponu olarak, diğer bileşiklerle bileşik oluşturması amacıyla ve koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca diğer kullanım alanları içecek, süt ürünleri, şekerleme ve sucuk, salam gibi birçok gıda endüstrisinde gıda katkı maddesi (asidik, antioksidan madde) olarak kullanılmaktadır. Ayrıca koruyucu madde olarak çeşitli yemek ürünlerinde kullanılır[51]

Sitrik asit yaygın olarak kullanılan organik asitlerden biridir. 1986 verilerine göre tahmini olarak dünyada yılda 350.000 ton sitrik asit üretilmektedir. Dünya çapında yılda 500.000 ton ila 750.000 ton arasında üretim yapılmaktadır [53, 54, 59, 61, 62, 67]. En son yapılan araştırmalarla sitrik asit talebinin dünya çapında 1,6 milyon tonu bulunduğu tespit edilmiştir [93]. Sitrik asidin ve tuzlarının kullanım alanları, amaçları ve takribi miktarları Çizelge 2.12.'de verilmektedir.

Çizelge 2.12: Sitrik asidin ve tuzların kullanım alanları, amaçları ve kullanılması gereken yaklaşık miktarları

Kullanım Alanı	Sitrik asit ve tuzların Kullanım amaçları	Kullanılması gereken miktarlar
Meşrubat	Hoş ve ekşimsi bir tat verir. Sodyum sitrat-zararlı ve ağır metal iyonları bağlar. Karbondioksiti kararlı hale getirir.	2,5 – 4 g/L
Meyve ve sebze konserveleri	Sterilizasyon sıcaklığının düşük tutulabilmesi sağlar. Düşük sıcaklıktan dolayı tat ve görüntünün tabii kalmasını sağlar, yumuşamasını önler.	%0,1
Marmelat ve reçeller	Sitrik asit/sodyum sitrat- Optimal Jel oluşumu için pH ayarlanmasını sağlar, şekerin kristalize olmasını önler. Jel oluşumunu kolaylaştırır.	%3- 4
Jöleli Pastalar	Sitrik asit/sodyum sitrat–Optimal Jöle koyuluğu için pH ayarlamak amacı ile kullanılır.	%3- 4
Yağ sanayi	Koku giderici, oksidatif bozulmayı önleyici, mikrobiyolojik bozulmayı önleyici, eser miktardaki ağır metalleri bağlayıcı olarak, margarinlerde tat düzenleyici.	0,1- 0,5 g/kg
Eritme peynirleri	Sodyum sitrat–emülsiyon halindeki yağın stabile sağlar. Kalsiyum iyonlarını kompleks halinde bağlar. Mikrobiyolojik kararlılık sağlar.	%3 – 4
Şeker ve şekerlemeler	Meyvelerin aromasını kuvvetlendirir. Şekerin inversiyonunu kolaylaştırır.	%0,5
Turşuculuk	Tatların iyileştirilmesini sağlar.	%1 – 5
Yeşil zeytin	Tatların iyileştirilmesinde, rengin korunmasında ve yumuşamanın önlenmesinde kullanılır.	
İlaç sanayi	Kan plazmalarının hazırlanmasında, böbrek tedavi maddelerinde, kemik bozukluklarını giderici maddelerin hazırlanmasında, tedavi tesirli katyonların daha iyi çözülebilmesi ve vücut tarafından kolayca erimesini sağlamak amacıyla kullanılır.	
Kozmetik ve Şampuan Sanayi	Hafif bağlayıcı ve renk açıcı özelliği dolayısıyla kremlerin taze tutulması, istenen şekilde hazırlanması ne pH ayarlaması için kullanılır.	
Deterjan Sanayi	Sodyum sitrat–Çevreyi kirleten fosfatların yerini almış Sitrik asit – pH ayarlamak amacıyla kullanılır.	
Şarap	Tannik asidi, demir veya fosfat–demir komplekslerinin sebep olduğu bulanıklığı giderir.	%0,05 – 0,4
Balık İşletme	Soğuk depolanan taze balıkları, renkli, lezzetli ve kokulu olarak saklayabilmek için kullanılır.	Temizlenmiş balıklar %2'lik çözeltiye batırılır.

Çizelge 2.12 (devam)

Kümes Hayvanları Kesimi	Yapışkanlığını önlemek için. Daha az besin kaybı firesi için kullanılır.	
Beton, Havuz ve Alçı Sanayi	Sertleşme zamanını uzaktan olarak kullanılmaktadır.	
Galvaniz Tekniği	Bilhassa bakır alaşımları için çeşitli galvaniz banyolarına ilave edilir.	
Kuyu İnşası ve Petrol Sondajı	Demir çökeleğinin çözülebilmesi amacıyla kullanılır.	
Metal Temizleme	Kazan sıcak su sistemlerindeki kireç taşı ve pas tabaklarının temizlenmesinde, alüminyum, bakır ve diğer renkli metallerin kimyasal olarak parlatılması ve asitlenmesinde kullanılır.	

Sitrik asit kullanım kapasitesi hakkında bilgi edinmek için ithalat ve ihracat durumuna bakılabilir. Türkiye’de sitrik asitin ithalat ve ihracat durumu Çizelge 2.13 ve Çizelge 2.14’de verilmiştir.

Çizelge 2.13: Son beş yıla ait Türkiye’de sitrik asit ihracat durumu [29]

	Yıl	Madde adı	Dolar (\$)	Miktar (kg)
İHRACAT	2003	Sitrik asit	563 359	480 889
		Magnezyum sitrat	250	1 000
		Sodyum sitrat	34 139	12 650
		Sitrik asitin diğer tuzları	6 108	3 445
		Sitrik asitin diğer esterleri	8 842	6 459
	2004	Sitrik asit	566 229	467 225
		Sodyum sitrat	40 505	10 950
		Sitrik asitin diğer tuzları	25 511	15 895
		Sitrik asitin diğer esterleri	13 250	5 751
	2005	Sitrik asit	397 640	300 862
		Sodyum sitrat	58 411	36 095
		Potasyum sitrat	430	220
		Sitrik asitin diğer tuzları	4 218	2 493
		Sitrik asitin diğer esterleri	16 927	3 032
	2006	Sitrik asit	493 284	417 201
		Sodyum sitrat	36 531	11 727
		Sitrik asitin diğer tuzları	6 668	3 646
	2007	Sitrik asit	799 230	677 609
		Sodyum sitrat	60 178	36 023
		Sitrik asitin diğer tuzları	14 208	7 991
	Sitrik asitin diğer esterleri	13 816	3 530	
2008	Sitrik asit	474 266	339 001	
	Sodyum sitrat	28 556	20 500	
	Sitrik asitin diğer tuzları	41 726	27 340	
	Sitrik asitin diğer esterleri	17 500	5 956	



Çizelge 2.14: Son beş yıla ait Türkiye’de sitrik asit ithalat durumu [29]

Yıl	Madde Adı	Dolar (\$)	Miktar(kg)	İTHALAT
2003	Sitrik asit	14 951 638	19 494 574	
	Demir sitrat	545	50	
	Sodyum sitrat	744 892	570 643	
	Potasyum sitrat	3434	500	
	Sitrik asitin diğer tuzları	151 805	46 427	
	Trietil sitrat	37 880	2 878	
	Tributil sitrat	654	220	
	Sitrik asitin diğer esterleri	105 489	22 659	
2004	Sitrik asit	18 904 984	21 483 706	
	Magnezyum sitrat	4 479	182	
	Sodyum sitrat	1 019 432	779 944	
	Potasyum sitrat	39 312	20 220	
	Sitrik asitin diğer tuzları	670 834	256 058	
	Trietil sitrat	52 360	4 376	
	Sitrik asitin diğer esterleri	98 332	15 294	
2005	Sitrik asit	19 933 914	22 875 877	
	Magnezyum sitrat	149	5	
	Sodyum sitrat	1 305 231	1 034 714	
	Potasyum sitrat	8 761	2 304	
	Sitrik asitin diğer tuzları	394 265	134 583	
	Trietil sitrat	35 602	2 782	
	Sitrik asitin diğer esterleri	60 328	9 713	
2006	Sitrik asit	17 176 183	21 048 478	
	Sodyum sitrat	1 203 965	1 012 714	
	Potasyum sitrat	52 141	23 948	
	Sitrik asitin diğer tuzları	576 364	123 002	
	Trietil sitrat	66 020	5 984	
	Sitrik asitin diğer esterleri	102 432	19 224	
2007	Sitrik asit	29 313 986	31 454 688	
	Sodyum sitrat	1 398 527	1 100 215	
	Potasyum sitrat	75215	32529	
	Sitrik asitin diğer tuzları	363 551	105 782	
	Trietil sitrat	53 077	4 692	
	Sitrik asitin diğer esterleri	158 084	31 161	
2008	Sitrik asit	18 856 236	16 647 826	
	Sodyum sitrat	700 829	356 999	
	Potasyum sitrat	9 448	807	
	Sitrik asitin diğer tuzları	253 334	42 969	
	Trietil sitrat	33 601	2 533	
	Sitrik asitin diğer esterleri	58 443	7 664	

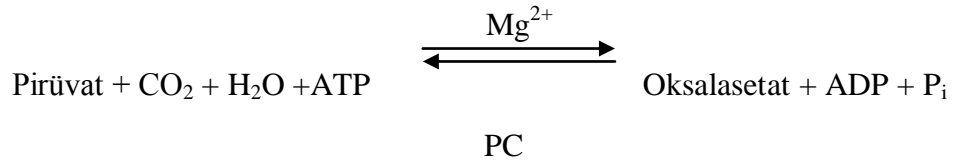
### 2.3.8. Sitrik Asit Biyokimyası

Biyokimyasal yollarla *A. niger* ile sakkaroz, sitrik asit çevrimi Şekil 2.4'te verilmiştir. Bu yöntem üç yönetime ayrılabilir [59]:

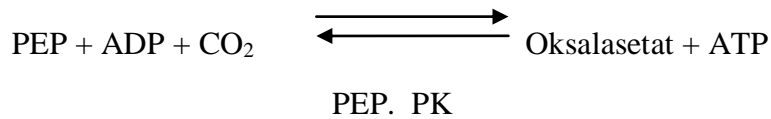
1. Heksozların glikoz yolu ile asetil-CoA'ya ve piruvata parçalanması.
2. Oksaloasetat oluşumu.
3. Oksaloasetat ile asetil-CoA'nın kondenzasyon reaksiyonu oluşur.

Oksaloasetat ile asetil ünitelerinin reaksiyonu, sitrik asit sentezini oluşturur. Sürekli sitrik asit üretimi için ortamda sürekli oksaloasetatın oluşması gerekir. Aşağıda verilen reaksiyon mekanizmalarının dördü de Oksaloasetatın yeniden oluşumunu içerir [45].

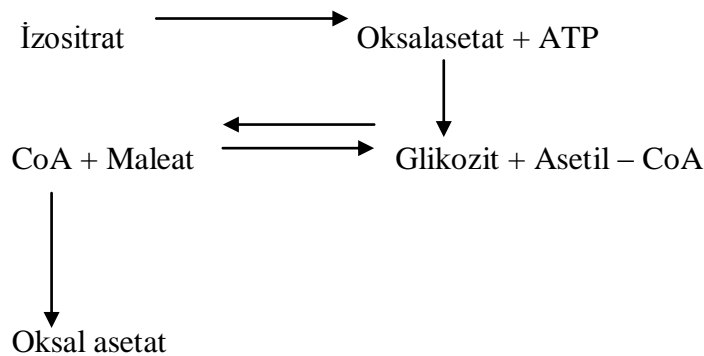
1. Malik enzim vasıtasıyla maleatın doğrudan katalizlenmesi ile maleat hızlıca yükseltgenir.
2. Pirüvatın karboksilasyonunu Pirüvat karboksilaz katalizler.

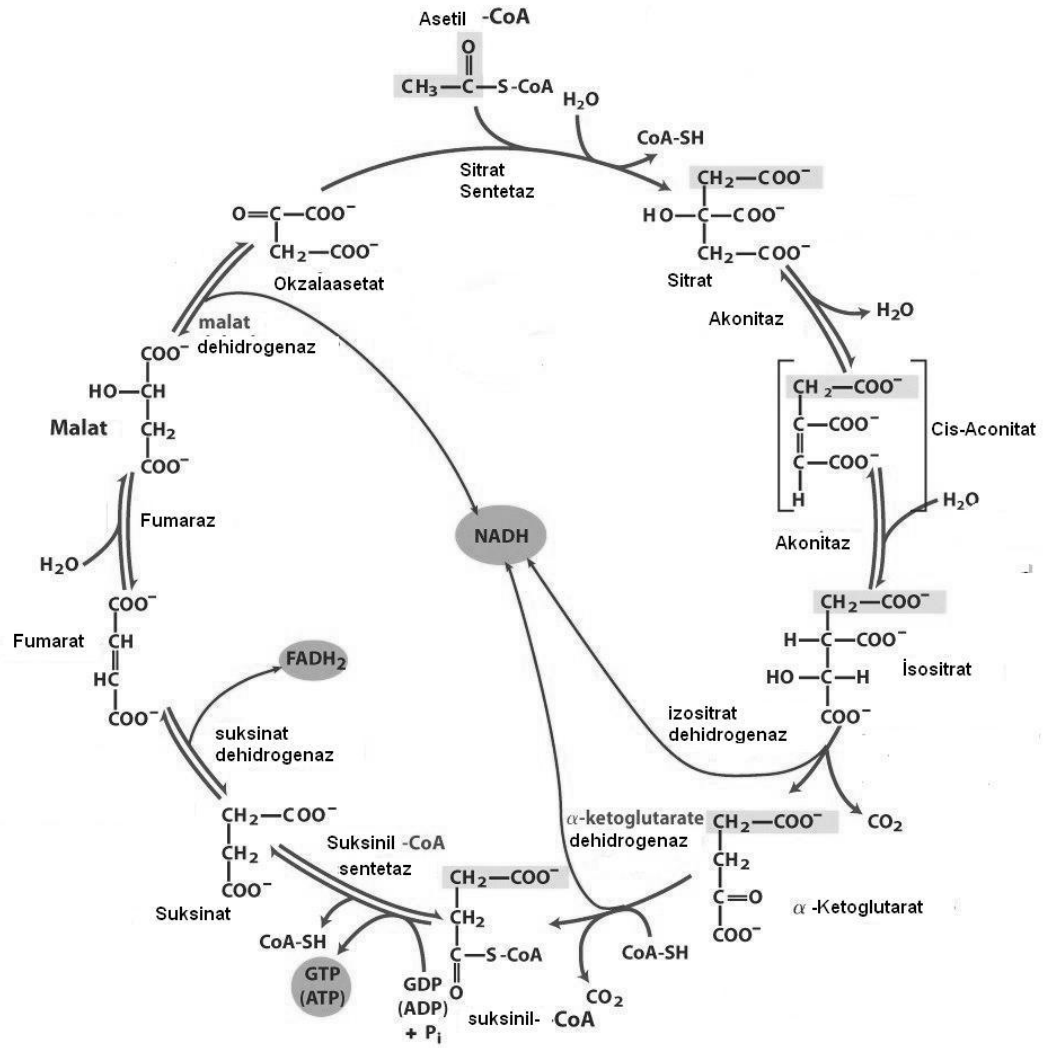


- 3 – Fosfoenolpirüvat karboksilaz ile katalizlenmiş Fosfoenolpirüvat'ın (PEP) karboksilasyonu.



- 4 – Glioksilat çevrimi izositrat liyaz ve sentez gibi anahtar enzimleri içerir.





Şekil 2.4.:Sitrik asit çevrimi (TCA)

Pirüvatkarboksilaz, sitrik asit üretimi için önemli enzimdir. Pirüvat karboksilaz sadece 2-oksaglutarat ile zayıfça inhibe edilir, Asetil-CoA tarafından da etkilenir [31]. *Aspergillus niger* ile sitrik asit üretimi, derişimin yükselmesi ile inhibe olur. Ancak amonyum iyonları, inorganik fosfatlar, ADP ve AMP tarafından aktive edilir. Sitrik asit üretimi esnasında amonyum iyonları ATP ve sitrat vasıtasıyla PFK'nın inhibisyonunu durdurur. Sitrik asit fermentasyonunda anahtar enzimler olan asetonitaz ve izositratdehidrogenaz çok önemli enzimlerdir. Çevrim süresince sitrat sentezinin aktifliğinin artması, çevrimin veriminin azalmasına sebep olur. Üretim basamaklarında seviyenin çok düşmesi, enzim aktifliğinin azalmasındandır [59].

Sitrik asit fermentasyonunda akonitaz ve izositrat dehidrogenaz önemli iki anahtar enzimdir. Bu enzimlerin aktivitelerinin azalması üretim esnasında sitrat sentetaz enziminin aktivitesinde artmaya neden olur. Akonitaz bu iki anahtar enzimden biridir ve  $Fe^{+2}$ 'nin yüksek derişimleri bu enzimin aktivitesini sınırlar. Bu da sitrik asit fermentasyonuna olumlu yönde etki eder. İzositrat dehidrogenaz enziminin aktivitesi de potasyum ferrosiyandır ve tiamin gibi maddelerle azaltılarak sitrik asit üretiminin verimi artırılır [94,95].

Sitrik asit çevrimi mitokondride meydana gelen bir seri reaksiyondur ve asetil CoA'nın metabolizması sonucu enerji elde edilir. Sitrik asit çevriminin temel fonksiyonu, karbonhidrat, lipit ve protein oksidasyonunun son ortak yolu olarak davranmasıdır [94].

### 2.3.9. Sitrik Asit Oluşum Kinetiği

Sitrik asit üretim sistemlerinde genellikle kesikli sistemler kullanılmaktadır. Üretim ortam pH'sına göre zamana bağlı olarak değiştiği için sürekli sistemler verimli değildir. Kesikli sistemlerde kültür ortamının kompozisyonu, biyokütle kompozisyonu ve metabolit derişimi sürekli olarak değişir. Steril besiyeri ortamına aşılama yapıldıktan sonra fizyolojik şartlar altında mikroorganizmaların çoğalma ve gelişmesinde başlıca 4 evre görülmektedir. Bu evreler; gelişme evresi (lag fazı), logaritmik çoğalma evresi (log fazı), sabit evre (durağan faz) ve ölüm evresidir.

Gelişme evresi; ortama aşılanan bir mikroorganizma hücresinin yeni ortama adapte olup, çoğalmaya başlamasına kadar geçen süredir. Bu süre zarfında, hücre sayısında herhangi bir artış olmaz ancak ağırlığı değişebilir. Bu sürenin endüstriyel fermentasyonlarda oldukça kısa olması istenir. Bunun için aşı mikroorganizmalar, fermentördeki fermentasyon şartlarına uygun hazırlanmalı ve mümkünse bu evreyi laboratuvar kültürlerinde geçirmesi sağlanmalıdır.

Ekim sırasında mikroorganizma yeni bir ortama transfer edildiğinde, inokulum hücre için bazı parametreler değişikliğe uğramaktadır (pH değerinde değişme, besin sağlamada artış, büyüme inhibitörlerinde azalma). Bu evrede besin maddeleri için yeni taşıma sistemleri harekete geçirilmeli ve primer metabolizma enzimleri yeni şartlara ayarlanmalıdır. Bu evrede inokulumun fizyolojik şartları evrenin uzunluğu

açısından önemlidir. Şayet inokulum olarak kullanılacak kültür logaritmik fazda ise gelişme evresi meydana gelmeyebilir ve derhal çoğalmaya başlar.

Gelişme evresinin sonlarında hücre, fermentasyon ortamındaki yeni şartlara artık adapte olmuş durumdadır. Logaritmik evre, mikroorganizmanın süratle çoğaldığı bir devredir. Bu evrede mikroorganizma canlı ve gençtir.

Hücre kütlesinin gelişmesi kantitatif olarak birim zamanda hücre sayısının ikiye katlanması olarak tanımlanır. Ortamdaki substratları kullanmalarından ve ortama metabolik ürünleri salgılamalarından dolayı ortamı değiştirirlerse de logaritmik faz sırasında hücrelerin çoğalma hızları sabittir. Hücrelerin çoğalma hızı ortamda aşırı miktarda substrat mevcut olduğu müddetçe substrat derişiminden bağımsızdır.

Logaritmik fazda mikroorganizma biyokütlesindeki artış hızı, mikroorganizmanın özgül büyüme hızı ( $\mu$ ) ve biyokütle derişimi ( $x=g/L$ ) ile korelasyon halindedir.

$$\text{Mikroorganizma biyokütle artış hızı} \rightarrow dX/dt = \mu X \quad (2.1)$$

Birinci derece reaksiyon denklemini ifade eden bu denklem, sınır şartlarına bağlı olarak ( $t=0$  için  $X=X_0$  ve  $t=t$  için  $X=X$ ) integre edilirse ve gerekli düzenlemeler yapılırsa

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte  $X$ ,  $t$  anındaki mikroorganizma derişimi ( $g/L$ ),  $X_0$ ,  $t=0$  anındaki mikroorganizma derişimi ( $g/L$ ),  $\mu$  özgül büyüme hızı ( $\text{zaman}^{-1}$ )'dir. Özgül büyüme hızı ( $1/\text{gün}$ ) genel olarak 3 parametrenin fonksiyonudur;

—sınırlayıcı substrat derişimi ( $S$ )

—maksimum büyüme hızı ( $\mu_m$ )

—özgül substrat derişimi ( $K_s$ )

Bu parametreler arasındaki bağlantı aşağıdaki gibidir ve buna Monod eşitliği denir.

$$\text{Özgöl büyüme hızı} \longrightarrow \mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (2.3)$$

$K_s$ , maksimum özgöl büyüme hızının yarısına ulaşmak için harcanan substrat derişimi ( $\mu=0,5\mu_m$ ) substrat derişimidir. Şayet ortamda aşırı substrat var ise  $K_s$  ihmal edilir ve  $\mu=\mu_m$ 'dir. Yani özgöl büyüme hızı, maksimum büyüme hızına eşittir. Bu durumda kültür ortamı logaritmik fazdadır. Özgöl büyüme hızı, endüstride büyük öneme sahip olup mikroorganizmaya ve ortam şartlarına bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Genel olarak ticari fermentasyonlarda, fermentasyon işlemine mikrobiyal üremenin logaritmik evresinin bitiminde son verilmektedir. Bu şekilde optimum maliyet ve zamanda maksimum ürün sentezi sağlanmış olur. Bu durum sadece primer metabolitlerin üretimi için geçerlidir.

Sabit evrede, fermentasyon ortamındaki substrat, metabolize edilir edilmez veya ortamda toksik maddeler oluşur oluşmaz mikroorganizma gelişmesi gitgide yavaşlar ve sonunda tamamen durur. Biyokütle derişimi ya çok az artar ya da tamamen durur. Mikroorganizma hücrelerinin kompozisyonu değişmez. Bir mikroorganizma hücresinde, ortam şartlarına bağlı olarak, hidrolitik ve lipolitik enzimlerin meydana getirdiği parçalanmaya lizis denilmektedir. Lizis olayı mikroorganizmanın hücre dışına salgıladıkları enzimlerle gerçekleştirmekte ve bu olay sonucunda mikroorganizma hücresi parçalanmaya uğramaktadır. Lizis olayı nedeniyle, ortamda yeni substratlar meydana gelir ve bu substratlar ortamda canlı kalabilen mikroorganizmaların gelişebilmesi için yeni enerji kaynaklarını oluşturmaktadır.

Fermentasyon prosesinde kinetik modelleme, ürün derişimi ve reaksiyon maddelerinin derişimleri ve oluşum hızları arasındaki ilişkinin matematiksel olarak açıklanmasıdır. Kütle denkliğini açıklayabilmek için substratın kullanımını ve oluşacak başlangıç ürünlerinin verimliliğinin önceden tahmin edilmesi gereklidir [94,96].

### 2.3.9.1. Kinetik modellerin bazı tipleri

Kinetik modeller biçimlendirilmemiş ve biçimlendirilmiş modeller olmak üzere iki kısımda incelenir. Yatışkın durgun koşullarda biyokütle miktarını tanımlamak için biçimlendirilmemiş modeller kullanılır. Bu modeller farklı işletim koşullarında çalışıldığında oluşabilecek sonuçlar için bir fikir verir.

Biçimlendirilmiş modeller ise daha deterministiktir. Ancak bu modeller biçimlendirilmemiş modeller üzerinden geliştirilmiştir. Bu modeller farklı üretim ve gelişim fazlarını göstermek için eşitliklerin kullanılmasından daha fazla kullanım alanına sahiptir. Bu modellerde fermentasyonda mikroorganizmanın fiziksel koşullarını tanımlamak için biyokütle değeri de model içinde kullanılır.

Bu mekanistik modellerde, bir reaksiyon serisi içindeki tüm enzimlerle bu enzimlerin tüm özellikleri ve bilinen metabolitlerin derişimleri aracılığıyla uygulanmada substratın hangi ürünlere dönüşeceği bilinir. Bu model için seçilmiş mikroorganizmalarla ilgili ön araştırmaların belli bir kısmının açıklanmış olması ve bazı enzimatik basamakların bir kısmının reaksiyon adımlarıyla açığa kavuşturulmuş olması gereklidir. Bu tarz modeller, başlangıç enzim aktivitelerinin reaksiyon hızı üzerine etkilerinin bağlı olduğu metabolik kontrol analizlerinin modellerine oldukça yakındır.

### 2.3.9.2. Monod eşitliği

1942 yılında tanımlanan monod eşitliğine göre, yeterli substrat varlığında biyokütlenin oluşum hızı sınırlı substratlardan birinin derişimine bağlıdır.  $\mu$ , S ile orantılıdır. S'nin artışına bağlı olarak kademe kademe artan  $\mu$ 'nün bir  $\mu_{\max}$  değeri vardır. Maksimum büyüme hızı ( $\mu_{\max}$ ) ve doyumluk katsayısı (Ks) deneysel olarak saptanmalıdır. Bu model birçok farklı mikroorganizmaya ait fermentasyon verilerine bağlı olarak gösterilmiştir. Ancak en iyi tek hücreli karışık kültürler için belirlenmiştir [96]

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (2.3)$$

### 2.3.9.3. Diğer büyüme modellerinin eşitlikleri

Trinci, 1970 yılında *Aspergillus nidulans*'a ait büyümeyi; koloni, pelet yarıçapı ve kuru ağırlığına bağlı olarak hesaplamıştır [97]. Bu çalışmada, pelet gelişimi exponansiyel fazda gelişim gösterir. Daha sonra küpkök fazına geçer ve en son lineer fazla sonlanmaktadır [97].

$$\text{Zamana bağlı logaritmik gelişim} \quad \ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (2.4)$$

$$\text{Zamana bağlı küp kök safhası} \quad X_t^{1/3} = X_0^{1/3} + k_c t \quad (2.5)$$

$$\text{Zamana bağlı lineer gelişim} \quad X_t = X_0 + k_t t \quad (2.6)$$

Bu model hem peletlerin gelişimi ile hem de mikroorganizmanın diğer gelişimleriyle yakından ilgilidir. Çünkü mikroorganizma nütrienti tükettiği zamanlarda eksponansiyel olarak gelişim gösterir. Bu eşitlikler mikroorganizmanın hifsel büyüme ve pelet formulasyonu gösterdiği zamanlarda oldukça kullanışlıdır.

Oluşum hızı ve fermentasyon içindeki tüketim, verimlilik katsayısıyla biyokütlenin oluşumuna bağlıdır. Bu durum matematiksel olarak aşağıdaki gibi tanımlanır.

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2.7)$$

$$r_s = \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{y_{x/s}} r_x \quad (2.8)$$

$$r_N = \frac{dN}{dt} = -\frac{1}{y_{x/N}} r_x \quad (2.9)$$

Buradaki  $r_x$ ,  $r_s$ ,  $r_N$  sırasıyla biyokütle birikim hızı, karbon kaynağı tüketim hızı ve azot kaynağı tüketim hızıdır.

Leudeking-Piret (1959) eşitliği hem biyokütle derişimi ve hem de biyokütle oluşum hızına ve ürün oluşum hızına bağlı olan bir eşitlik kullanılmıştır [98].

$$r_p = (\alpha r_x) + (\beta x) \quad (2.10)$$



$\alpha$  ve  $\beta$  katsayıları özgül büyüme ve özgül olmayan ürün oluşumuna bağlı olarak verilir.

#### 2.3.9.4. *Aspergillus* temelli modeller

Flamentli mikroorganizmalar tek hücreli mikroorganizmalardan daha farklı bir büyüme kinetiğine sahiplerdir. Miselyum içindeki tüm hücrelerin gelişimi iç koşulları korumaya yöneliktir. Ancak bu mikroorganizmalar hifsel gelişim gösterirler. *A. niger*'in sitrat salgılamasını apikal hücreler sınırlarlar. Flamentli fungusların modellenmesi basamak basamak oluşturulur. Büyüme basamakları arasında farklı gelişim gösterdiği ikincil metabolitlerin oluşturulduğu basamaklar da vardır. Ancak henüz sitrik asit modellenmesi ile ilgili ileri bir basamak geliştirilmemiştir [97].

#### 2.3.9.5. *Aspergillus niger* ile sitrik asit üretimi ve mikroorganizma gelişimi için geliştirilen basit modeller

Sitrik asit üretimi koşullarında *A. niger*'in tipik gelişim eğrisi Kubicek ve Rohr (1989) tarafından gösterilmiştir [99]. Bu eğride yavaş gelişim fazını hızlı gelişim fazının izlediği görülür. Büyüme hızındaki bu değişim, normal gelişim formundan sitrat salgılama formuna geçen misellerin fiziksel gelişimi ile ilgilidir. Sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı bir ortamda *A. niger*'in sitrik asit üretim kinetiğinin hesaplanması bir pilot tesiste başarıyla gösterilmiştir. Hücre gelişimi ve ürün oluşumu, çeşitli basamaklarla birbirinden ayrılır ve her bir basamak basit deterministik bir modelle tanımlanır. Büyüme fazı, hifsel büyüme fazı (Bx), pelet gelişim fazı (Cx), kısıtlanmış büyüme fazı (Dx), trofaz ve idiofaz arasındaki geçiş periyodu (Ex) ve idiofaz (Fx) olarak tanımlanır.

Her fazdaki büyüme logaritmik, küp kök ve lineer eşitlikler tarafından tanımlanır ve en uygun eşitlik; maksimum %5 sapma limiti içinde lineerliğin derecesinin değerlendirilmesi olarak tanımlanır.

Ürün oluşumu modifiye Leudeking-Piret eşitliğine göre üreme hızına bağlıdır. Ancak benzer eşitlikler hem büyüme hem de asit oluşumuna uygulanabilir. Asit oluşum kinetikleri lag fazında gösterildiği gibi büyüme kinetiğinden farklılık gösterir. Lag zamanı olgunlaşma zamanı olarak bilinir. Kültür ortamındaki tüm

amonyum iyonlarını kullansa bile sitrik asit üretimi açısından yeterli değildir. Ürün oluşum hızı fiziksel basamağın girişindeki hücrenin oluşum hızıyla belli bir katsayı ile bağlantılıdır [98].

$$r_{pt}=k r_x (t-t_m) \quad (2.11)$$

Bu eşitlikteki k değeriyle ilgili sorunlar ortaya çıkmıştır. Çünkü fermentasyon periyodu boyunca sabit bir k değeri saptanamamıştır. k Değerindeki bu değişim farklı ürünler üreten miselyumun hücresel yapısındaki değişim olarak tahmin edilmektedir. Bu nedenle Luedking-Piret eşitliği yeniden düzenlenmiştir [98].

$$r_{pt}=k_1 r_x (t-t_m) + k_2 (X)_{t-t_m} \quad (2.12)$$

Bu formüldeki  $k_1$ , büyümeye bağlı olan bir sabit olup  $k_2$  ise büyümeye bağlı olmayan bir sabittir.

#### 2.3.9.6. Karışık biyokütle çeşitlerinde matematiksel ifade

Yukarıdaki modelde fermentasyondaki hücrelerin durumu ayrı tutulmamıştı, hücre büyüme hızı her durumdaki hücrenin tanımı için uygulanabilir. Böyle bir biyoprosesin modellenmesinde ortam içerisinde en az iki tip hücrenin aktif olduğu bilindiğinden değişik durumlar için ayrı ayrı hücre büyüme hızı ifade etmek daha pratik olacaktır.

Tek basamaklı ideal CSTR sisteminde fermentasyonda bulunan değişik türdeki hücreler için farklı büyüme tanımlamaları Krisitansen ve Sinclair tarafından 1979 da tespit edildi [100].

$$r_{Xb}=\mu_b X_b - k_t X_b - D X_b \quad (2.13)$$

$$r_{Xc}=\mu_c X_c + k_t X_b - k_d X_c + D X_c \quad (2.14)$$

$$r_{Xd}= k_d X_c - D X_b \quad (2.15)$$

D seyreltme oranı; b, c ve d temel sitrik asit üretme (karbon deposu) aktivitesini kaybetmiş hücreler. Kesikli fermentasyon yapılıyor ise seyreltme oranı (D) bu formülde genel büyüme hızı yerine ( $\mu$ ) kullanılabilir

Bu durumda matematiksel ifadeler şu şekli alır;

$$\mu_b = \mu_{mb} \frac{N}{kN + N} \quad (2.16)$$

$$\mu_c = \mu_{mc} \frac{S}{k_s X_c + S} \quad (2.17)$$

$$k_t = k_{tm} \frac{k_i}{k_i + N} \quad (2.18)$$

İlk hız sabiti  $\mu_b$  sınırlı substratta büyümede Monod ifadesidir, ikinci sabit  $\mu_c$  sitrat üreten pelet hücrelerin kütlesi ve  $k_t$  temel hücreden depo hücresine transformasyon hızını ifade eder.

### 2.3.10. Sitrik Asit Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermentasyonda kullanılabilen mikroorganizmalar mayalar, bakteriler ve küfler olmak üzere 3'e ayrılır. Bu mikroorganizmalara örnek olarak şunlar sayılabilir (Çizelge 2.15).

Çizelge 2.15: Sitrik asit biriktirme yeteneğine sahip bazı mikroorganizmalar

Küfler	Maya	Bakteri
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Carbonarius sp.</i>	<i>S. cereviae</i>	<i>Arthobacter paraffines</i>
<i>A. aculeatus</i>	<i>S. carlsburgeneses</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>A. awamori</i>	<i>Sekizosaccharomyes pompe</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Mucor spp</i>	<i>C. oleophila</i>	
<i>Phizopus spp</i>	<i>C. Guilliermondii</i>	
	<i>C. Citroformans</i>	
	<i>Hansenula anamola</i>	
	<i>Toralopsis cvemoris</i>	
	<i>Comolida tropicaslis</i>	

*Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium lüteum*, *Penicillium citrinun*, *Paecilomyces divaricatum*, *Mucor piriformis*, *Ustilina vulgaris* ve başka *Mucor* türleri laboratuarlarda veya ticari alanda sitrik asit üretiminde kullanılmaktadır. Sadece *Aspergillus niger* türleri endüstriyel alanda kullanım için önemli ve gereklidir [51].

Aerobik prosteşte şeker çözeltisinden sitrik asit üretim çalışmalarında ilk olarak *Penicillium* kullanılmıştır. Daha sonra *Penicillium* türlerinin daha düşük sitrik asit üretim verimliliği olduğu için *A. niger*'in kullanıldığı bir proses geliştirilmiştir [61].

Her ne kadar *A. niger* sitrik asit üretim proseslerinde kullanılıyor olsa da *Aspergillus* (*A. wentii* gibi) cinsine bağlı birçok tür ve çeşitli maya (*Yarrowia lipolytica*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Endomyces lipolytica*) ve bazı bakteri türlerinin de sitrik asit biriktirebildiği tespit edilmiştir [67,102]. Levinson ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada substrat olarak gliserol kullanmışlar ve 40 g/L gliserolden 21,6 g/L (%54 verimlilikle) sitrik asit üretmişlerdir [104].

### 2.3.11. Sitrik Asit Üretiminde Kullanılan Bazı Biyoreaktörler

Biyoreaktörde fermentasyon, mikroorganizmaların akışkan ortamda üremesini sağlamak veya katı bir ortama tutuklanmasını sağlamakla yapılabilir. Akışkan yataklı reaktör veya kesikli reaktör gibi askıda gelişim süreçlerinde organik madde havalandırma ile sirküle edilmekte ve organik madde mikroorganizmalar tarafından aerobik koşullarda parçalanmakta ve karbondioksit, su ve biyokütle oluşmaktadır. Biyokütle, durultucuda çöktürülmekte ve ihtiyaca bağlı olarak havalandırma tankına verilebilmekte veya çamur olarak ortamdan alınabilmektedir. Yukarı akışlı sabitlenmiş film reaktörler, dönen biyolojik kondaktörler ve damlatmalı filtreler gibi tutuklanmış gelişim sistemlerinde, mikroorganizmalar katı destek ünitesinde biyofilm şeklinde çoğalmaktadır ve biyofilm üzerine difüze olan kontaminantlar parçalanmaktadır. Katı destek ortamları bakteriyel tutulma için geniş yüzey alanları ihtiva etmektedir [104].

Döner Biyolojik Kondaktör reaktörler, evsel ve endüstriyel atıksuların arıtımı için son on yıldan beri kullanılan popüler bir metottur. Bu sistemde petrol rafinerisi atık sularının başarılı bir şekilde arıtılabildiği gösterilmiştir [105]. Aynı zamanda fumarik asit üretiminde de başarıyla kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kondaktör, 2L kapasiteli, 1L çalışma hacmine sahip, 120 cm<sup>2</sup>'lik plastik 5 adet diskten oluşmaktadır. Çalışma sonunda 86 g/L'lik sitrik asit üretildiği tespit edilmiştir [106].

Diğer bir biyoreaktör türüne örnek olarak Magnetik Drum Kondaktör'ü verebiliriz. Saha ve ark (1999)'nın bu tip bir reaktörde yaptıkları çalışmada yine canlı olarak *A. niger* dolgu yataklı reaktör sisteminde sitrik asit üretim çalışmaları yürütülmüştür [107]. Dolgu yataklı reaktörler hem akış hızlarının hem de sıcaklığın kontrol altında tutulabiliyor olması nedeniyle diğer reaktörlerden daha avantajlıdır.

Bu reaktörde hava akış hızının verimli çalışabilmesi için partikül büyüklüğü ve dolgu yatağının yüksekliği çok önemlidir [108].

Bayraktar (1998) tarafından yapılan doktora tezi çalışmasında birinci kısımda *A. niger* mikroorganizma ile sitrik asit üretimi üzerinde çalışılmıştır [51]. Serbest mikroorganizma ile sitrik asit ortamı modifiye edilmiş, pH etkisi araştırılmıştır. Ön aktivasyon süreci incelenmiş ve bu sürenin 2 gün olduğu ortamdaki azot derişiminin ise 0,05 g/L olması gerektiği tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında dolgulu kolon biyoreaktörde çalışma yapılmıştır. Elde edilen deney sonuçlarına göre tutuklanmış mikroorganizma ve dolgulu kolon biyoreaktörlerinde elde edilen sitrik asit üretimi ve optimum başlangıç sakkaroz derişimleri farklı belirlenmiştir [51].

Çalışmada kullanılan kule fermentörü ile ilgili herhangi bir sitrik asit üretim çalışmasına rastlanmamıştır. Kule fermentörlerinin çalışma prensibi Airlift biyoreaktörlere benzemektedir. Endüstriyel ölçekte, tipik olarak 0,91 m çapında ve 6,4 m yüksekliğinde dikey, silindirik bir kule olarak tanımlanmaktadır. Alt kısmı konik olup sıvı ortamın tam olarak dağılmasını sağlayan perfore bir plaka içermektedir. Bu tip fermentörler genellikle cam, ısıya dayanıklı polipropilen bir maddeden imal edilirler. Yapısının basitliği ve mekanik karıştırıcısının olmaması ile kule sistemleri sermaye ve işletme masraflarını indirme bakımından diğer istemlerle karşılaştırıldığında avantajlı olabilir [109]. Bu tip biyoreaktörler, bira ve sirke üretiminde kullanılmaktadır [110, 111]. Havalandırılmalı Kule fermentörü ile yapılan bir çalışmada, zeytin karasuyunda maya ve funguslar geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sistemin çalışması ve mikroorganizmaların gelişimi bu tip fermentasyon için verimli bulunmuştur [112].

#### 2.4. TARIMSAL ATIKLARIN HİDROLİZİ

Lignoselülozik yapı, asit veya enzimatik olarak parçalanarak hidroliz edilirler. Enzimatik reaksiyonlarda selüloz ve ligninin hidrolizi, sorumlu enzimler tarafından gerçekleştirilir. Bu tür çalışmalarda kullanılan selülaz enziminin endüstriyel ölçekte üretimi için *Aspergillus niger* ve *Trichoderma viride* gibi fungus türleri kullanılmaktadır. Lignoselülozik yapıda bulunan lignin biyodegradasyonundan sorumlu enzimler daha çok beyaz çürükçül funguslarda rastlanmıştır [113]. Beyaz çürükçül fungusların sekonder metabolizma olgusuna dayanan ve oksidatif

enzimlerinin senteziyle lignin parçalandığı bulunmuştur. Ham selüloz hamurunun elde edilmesinde kullanılan ligninaz enzimi de kısmi hidroliz çalışmalarında kullanılmaktadır. Enzim hidroliz çalışmaları asit hidroliz çalışmalarına göre mikrobiyal aktivite için daha zararsız işlemlerdir. Asit hidroliz çalışmalarında oluşan son ürünler mikrobiyal olarak inhibisyona neden olacağından hidroliz sonrası detoksifikasyon işlemleri uygulanır [113].

Lignoselülozik yapının bozunması sırasında hidrolizat, sadece fermente edilebilir şekerleri içermez, bu arada geniş bir aralıkta mikroorganizmayı inhibe edici bileşik de oluşur. Bu bileşikler seyreltik asitler, furfural, hidroksimetilfurfural ve fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikleri ortamdan uzaklaştırmak için, nötrleştirme, CaO ile muamele (over-liming), iyon değişimi, çözücü ekstraksiyonu, aktif karbonla muamele, mikroorganizmanın hidrolizata adaptasyonu, CaO ile muamele + sodyum sülfid ilavesi gibi çeşitli zehir giderme metotları geliştirilmiştir [114].

Buğday sapı gibi ürün atıklarında bulunan hemiselüloz pektinik şeker içeriği nedeniyle, fermentasyonda selülozdan daha ilgi çekici bir bileşiktir. Hemiselüloz ise propionik asit üretimi için çok uygun bir substrattır. Propiyonik asit, selüloz plastik, herbisit, parfüm, gıda ve yem koruyucu maddesi olarak kullanılan fermentatif bir üründür. Ramsay ve ark. (1998) tarafından propiyonik asit, enzimatik olarak hidrolize edilmiş hemiselülozun kesikli kültürde *Propionibacterium acidipropionici* bakterisi tarafından üretilmiştir. Bu çalışmada *Populus tremuloides*'dan elde edilen sulu hemiselüloz fraksiyonu kullanılmıştır. Sulu karışım enzimatik olarak %10'luk ksilenaz 431 ile 50°C'de 1 saat pH 4,4'de sürekli karıştırılarak hidrolize edilmiştir. Numuneler 30 dakika dinlendikten sonra katı içerik 4000 rpm 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hidrolizat 29,6 g/L ksiloz eşdeğerinde indirgenmiş şeker içermektedir. Çalışma sonucunda maksimum özgül büyüme hızı ve maksimum özgül propiyonik asit üretim hızı 0,1 h<sup>-1</sup> ve 0,23 g/g/h olarak bulunmuştur[115].

Martin ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile etanolik fermentasyon için tütün sapsularından hidrolizat hazırlanmıştır. Bu çalışmada enzimatik hidrolizden önce 5-10 dakika ön işleminden geçirilmiştir. Hidrolizatın 15,4-17,1 g/L glikoz ve 4,5-5,0 g/L ksiloz olmak üzere monosakkarit içerdiği bulunmuştur. Ön işlemin süresinin uzamasıyla hidrolizatın şeker içeriğinin

arttığı bulunmuştur. Uygulanan önişlem, 2,2 ve 10 mm aralığında parçacık büyüklüğüne sahip tütün sapları 205°C'de 5 dakika ve 10 dakika geri soğutuculu bir sistemde kaynatılmıştır. Ön işlemden geçirilmiş tütün sapları Celluclast 2L ve  $\beta$ -glycosidase ile karıştırılarak hazırlanan selüloz ile hidrolize edilmiştir. Tütün sapları su ile sulandırılmış, pH 4,8'e ayarlanmış 2,3 g Celluclast ve 0,5 g Novozym ile karıştırılmıştır. En son olarak %5 kuru madde içerecek şekilde su ilave edilmiştir. En son olarak hidrolizat 40°C'de 96 saat bekletilmiştir [116].

Rudolf ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada ön işlemden geçirilmiş ladinin fermentasyonu ve sakkarifikasyonu arasında (kesikli ve yarı-kesikli sitemlerde) karşılaştırma yapılmıştır. Ladin kımıkları 2-10 mm büyüklüğünde parçalanmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında SO<sub>2</sub> (w/w, nemli) odun kıymıkları ile doldurulmuştur. Plastik poşetler içine konulan odun parçaları verilerek performansı arttırılmıştır. Daha sonra bu poşetlerden 10 litrelik reaktöre alınarak 215°C'de basınç altında 5 dakika tutulmuştur. Ortaya çıkan çamur, suda çözünmeyen glukoz ve lignin içermektedir. Sulu kısmı ise hidrolizat olup parçalanabilir şeker ürünleri ve asetik asit içerir [117].

Moagheghi ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, fermentasyon için hazırlanan hemiselüloz hidrolizatlarının içerikleri belirlenmiştir. Etanol üretiminin yapıldığı çalışmada uygulanan hidroliz işlemi; mısır koçanlarının 190°C'de %25 (w/w) katı içeriği olacak şekilde sulu sülfürik asit içinde akış hızı 1 ton/gün olan sürekli reaktörde bekletilmiştir. Önişlemden çıkan likör 8500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hidrolizatın içeriği, sellobiose 2,03 g/L, glikoz 14,3 g/L, ksiloz 67,27 g/L, arabinoz 11,78 g/L, galaktoz 7,33 g/L, mannoz 5,58 g/L olarak belirlenmiştir. Toplam şeker içeriği 106 g/L'dir [118].

Villarreal ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada *Candida guilliermondii* tarafından ksilitol üretimi için hazırlanan okalıptüs hemiselüloz hidrolizatının detoksifikasyon prosedürleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan okalıptüs %40,2 selüloz, %15,7 hemiselüloz, %26,9 lignin, %1,23 diğer ürünler ve %1,4 kül içermektedir. Çalışmada uygulanan hidroliz, işlemi ise 50 L'lik biyoreaktör içerisinde katı oranı 1:8,6 olacak şekilde %0,65'lik sülfürik asitle 157°C'de 20 dakika kaynatılmıştır. Filtrasyonla katı sıvı faz ayrılmıştır. Sıvı faz hidrolizat olarak

kullanılmıştır. Detoksifikasyon işlemi olarak aktif karbon adsorpsiyonu ve iyon değiştirme reçineleri kullanılmıştır. Aktif karbon işlemine girmeden önce hidrolizat CaO ile pH 7'ye kadar önişlemeden geçirilmiş filtre edilmiş ve daha sonra pH 5,5 oluncaya kadar sülfürik asitle asitlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre şeker kaybı olmaksızın inhibitör bileşiklerinin uzaklaştırılması; iyon değiştirme reçinelerinde aktif karbona göre daha yüksek olduğu bulunmuştur [119].

Larsson ve ark (2001) tarafından yapılan çalışma ise aerobik ve oksijence sınırlandırılmış koşullarda fenilakrilik asitlerin ve lignoselülozik hidrolizatların *Saccharomyces cerevisiae* üzerine etkisi ile ilgilidir. Çalışmada uygulanan hidroliz işlemi iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta materyal parçalara ayrıldıktan sonra %0,5 (w/v) sülfürik asitle 250 L'lik kesikli reaktöre doldurulmuştur. 12 bar basınçta 190°C'de 10 dakika tutulmuştur. Sıvı ve katı fraksiyon filtrasyonla ayrılmış ve katı fraksiyon tekrar ilk basamakta olduğu gibi sülfürik asitle doldurulduktan sonra 21 bar basınçta 215°C'de 10 dakika tutulmuştur. Yine katı fraksiyon ayrılmış ve elde edilen sıvı hidrolizatlar bir araya toplanmıştır. Hidrolizat içeriği 1,4 g/L arabiyoz, 2,9 g/L galaktoz, 20,5 g/L glikoz, 14,9 g/L mannoz, 7,0 g/L ksiloz, 2,8 g/L asetik asit, 1,1 g/L levulinik asit, 0,7 g/L formik asit, 1,4 g/L furfural ve 2,3 g/L 5-HMF(furalaldehitler)içermektedir [120].

Kurbanoglu ve Kurbanoglu (2003) tarafından yapılan çalışmada koçboynuzu kullanılmıştır [121]. Koçboynuzu lifli protein yapısında olan ve dünya çapında geniş bir üretimde sahip bir atıktır. Türkiye'de mezbahanelerden çıkan yıllık koçboynuzu miktarı 600 tonu bulmaktadır [122,123]. Bu atık ürünler biyokütleye, mikroorganizmalar aracılığıyla protein veya aminoasit konsantrelerine dönüştürülebilmektedir. Koboynuzları yüksek oranda sistein ve  $\alpha$ -kretain içerir. Üretilen hidroliz ile tek hücre protein üretimi [124] ve sitrik asit üretiminde kullanılmıştır. Çalışma sonucunda koçboynuzu hidrolizatlarının mikroorganizmalar için çok uygun bir pepton kaynağı olduğu ve verimliliğin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. MATERYAL

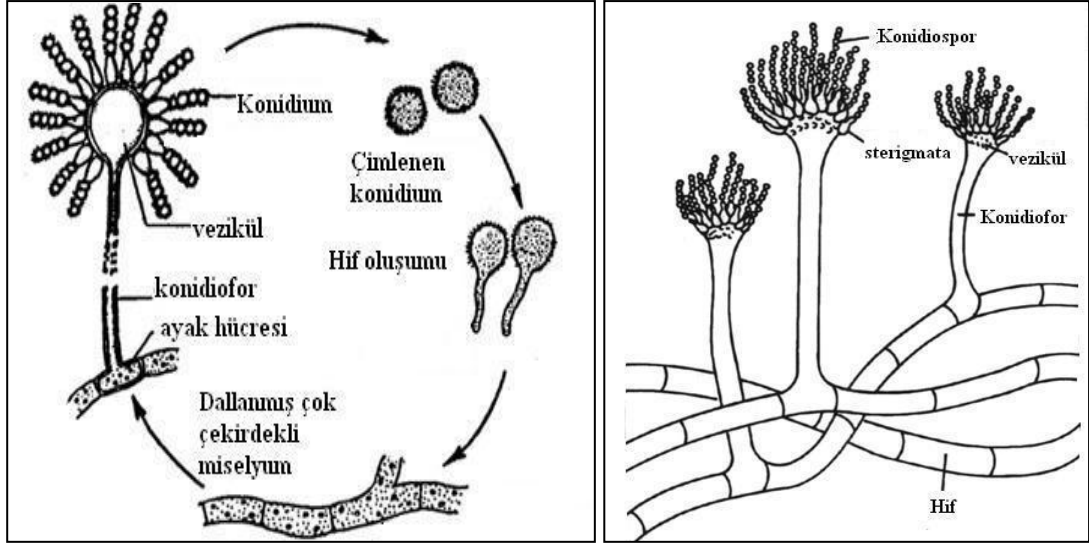
##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada kullanılacak olan *Aspergillus niger* 22910 saf kültürleri TÜBİTAK MAM Kültür Koleksiyonundan sağlanmıştır. Sabouraud Potatodextroxe-agar (SPA) besiyerlerine ekim yapıp inkübatörde (Elektro-mag M7040R), 30°C’de 5 gün inkübe edilerek kültürler hazırlanmıştır. Kültürlerin devamlılığı, SPA besiyerlerine periyodik pasajlarla sağlanmaktadır.

*Aspergillus* türleri dünyada çok geniş bir yayılım sahasına sahiptir. Sporları havada ve toprakta bol miktarda bulunmaktadır. *Aspergillus*’un hem eşeyli hem de eşeysiz üreme yapısına sahip türleri vardır. Eşeyli üreme yapısı saptanan türleri Ascomycota filumunda *Eurotium* genusu altında incelenmektedir Eşeyli üreme yapısı saptanamayan türler ise Deuteromycota filumunda *Aspergillus* form genusu altında incelenmektedir. Ancak *Aspergillus* adı çok yaygın olduğundan Ascomycota filumunda incelenen örnekler için de aynı ad kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, soya sosu, sake ve miso gibi fermentasyon ürünlerinin üretiminde “koji küfü” olarak bilinmektedir. *Aspergillus niger*’ın filogenetik taksonomisi Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. *A.niger*’in filogenetik taksonomisi

Alem	Fungi
Filum	Ascomycota
Alt filum	Pezizomycotina
Sınıf	Eurotiomycetes
Takım	Eurotiales
Familya	Trichocomacea
Cins	<i>Aspergillus</i>
Tür	<i>niger</i>



Şekil 3.1: *Aspergillus* genusuna ait türlerin eşeysiz üreme evlerinin genel şematik gösterimi (A) ve bu yapıların şematik görünümü (B)

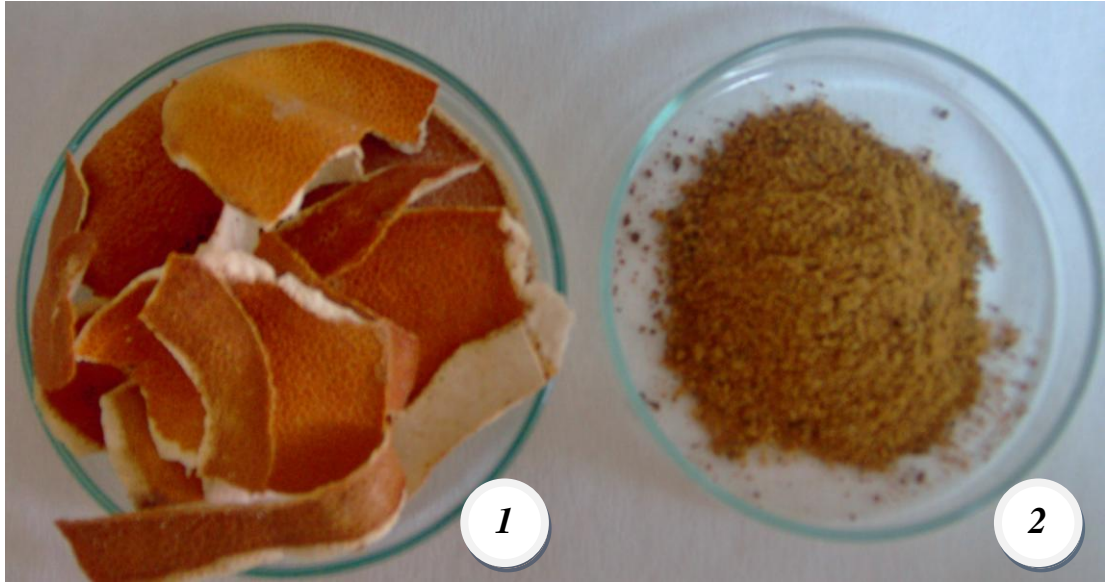
*Aspergillus* türleri ışık mikroskopunda incelendiğinde iplik şeklinde yapılardan oluştuğu görülür. Birkaç hücreden oluşan küçük iplikçiklerden her birine hif (hyphae) adı verilmektedir. Bir türe ait bir yerde bulunan hiflerin tümüne birden misel (mycelium) adı verilmektedir. Hücreler septum adı verilen bölmelerle birbirinden ayrılırlar (Şekil 3.1.). Spor, fungus büyümesinin başlangıcı ve sonu olarak tanımlanmaktadır. Fungal sporun, uygun çevre koşullarında çimlendiği belirtilmektedir. Çimlenen hücre büyüyerek ipliksi yapıdaki hifi meydana getirmektedir. Hifler belirli büyüklüğe ulaştıktan sonra genellikle dallanmaktadır. Katı ortamda miselyum belirli olgunluğa ulaştığı zaman miselyum üzerinde konidioforlar meydana gelerek konidiosporları üretmektedir (Şekil 3.1.). Sıvı ortamda, fungal büyüme, filamentli büyüme ya da pellet oluşumu şeklinde gözlenmektedir. Hücre büyümesi ve şekli, ortam bileşenleri ve ortam pH'sı ile değişiklik göstermektedir. Sitrik asit üretiminde optimum üretim için pellet oluşumunun gözlenmesi gerekmektedir. Verimli üretim pellet genişliği ile yakından ilgilidir.

### 3.1.2 Çalışmada Kullanılan Substratlar

Çalışmada substrat olarak; sakkaroz (Merck), ön işlemden geçirilmiş melas ve hidrolize edilmiş portakal posa suyu (narenciye hidrolizati) kullanılmıştır.

### 3.1.2.1. Portakal posası

Çalışmada kullanılan portakal posası günlük tüketim sırasında çıkan kabuklardan elde edilmiştir. Portakal kabukları direk güneş ışığı almayan bir yerde açık havada küflenmemesine dikkat edilerek kurutulmuştur. Daha sonra el öğütücüsünde öğütülmüştür. Öğütülen numuneler 60°C’de Nuve FN500 marka etüvde kurutulmuştur. Bosch marka kahve öğütücüsüyle öğütülmüştür. 10 g numune üzerine 100 mL hazırlanan %5’lik HCl asit çözeltisi ilave edilerek 1 saat geri soğutucu altında kaynatılarak soğutulmuştur.

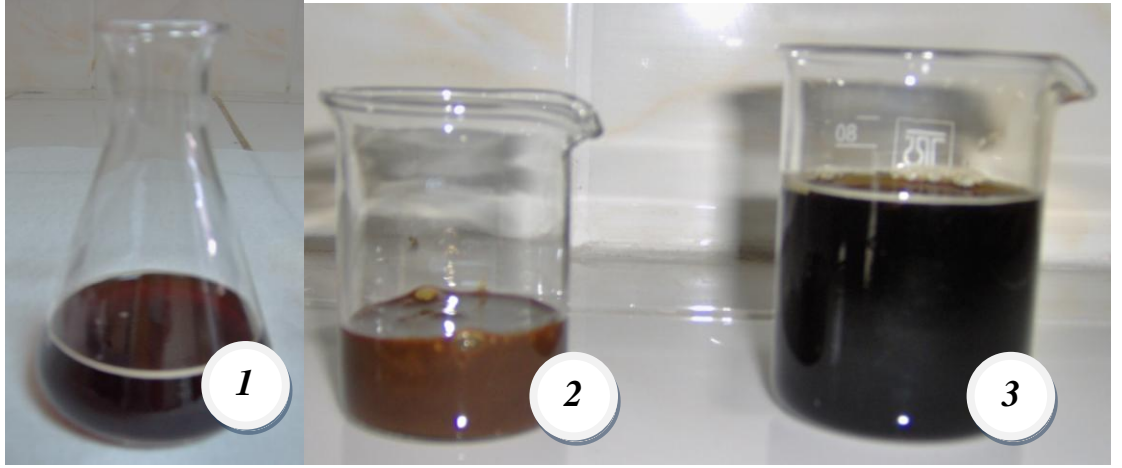


Şekil 3.2.Çalışmada kullanılan kurutulmuş (1) ve öğütülmüş portakal kabukları (2)

Şekil 3.2’de çalışmada kullanılan kurutulmuş ve öğütülmüş portakal kabukları verilmiştir. Ön işlemden geçirilmemiş ve geçirilmiş melas ve hidrolize edilmiş portakal posa suyu (narenciye hidrolizatı) ise Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Besiyeri ortamında kullanılan tüm kimyasallar Merck’tir.

### 3.1.2.2. Melas

Çalışmada kullanılan 2004 ve 2005 ürünü olan melas Konya Şeker ve Ticaret A.Ş. fabrikasından temin edilmiştir. Temin edilen şeker yaklaşık %50 şeker içermektedir.

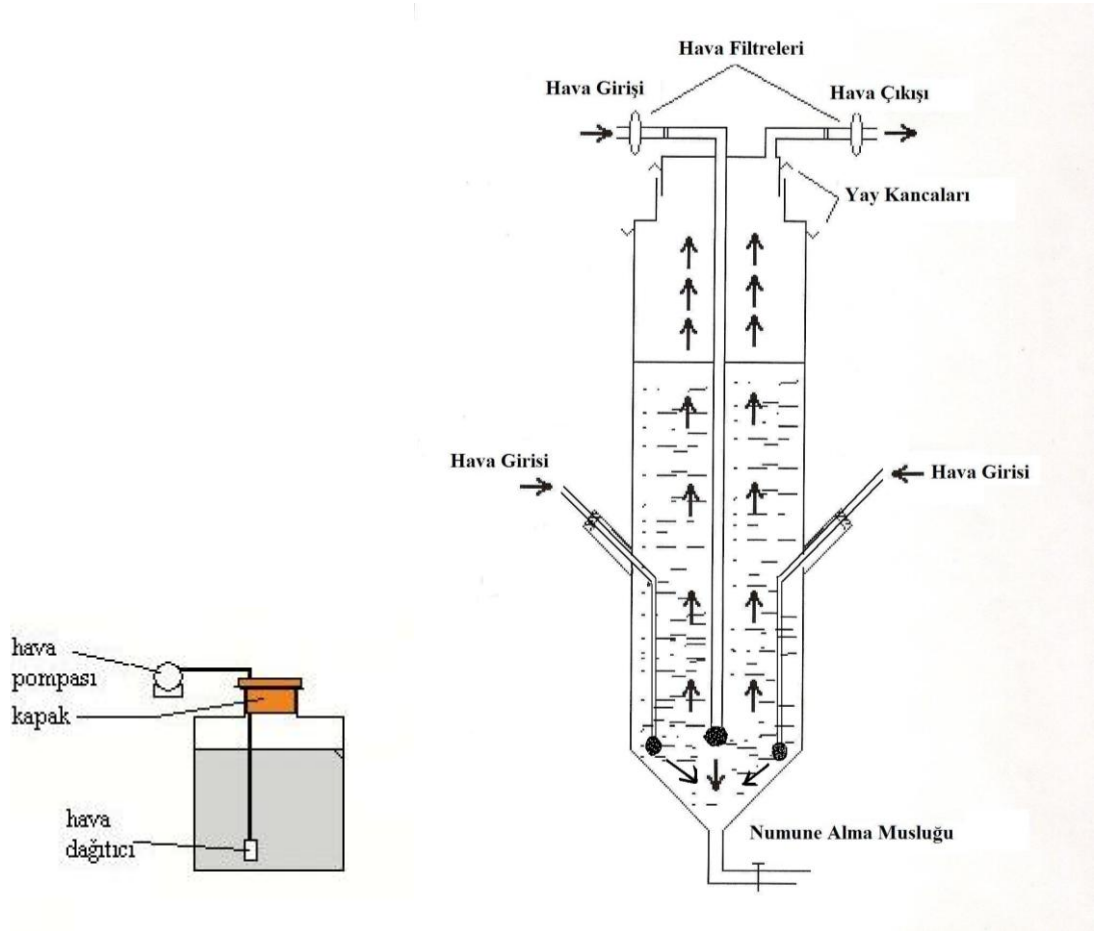


Şekil 3.3. Hidrolize edilmiş portakal posası (1), ön işlemden geçirilmemiş melas (2) ve ön işlemden geçirilmiş melas (3)

### 3.1.3. Cihazlar

Çalışmada çalkalamalı inkübatör olarak iki ayrı cihaz kullanılmıştır. Kullanılan cihazlardan ilki, Çevre mühendisliği Bölümü Çevre Mikrobiyolojisi Laboratuvarında bulunan 9 erlen kapasiteli ahşap el yapımı çalkalamalı inkübatör, termostatlı (soğutma sistemi yok) ve sabit hız ayarına (170 rpm) sahiptir. Kullanılan diğer çalkalamalı inkübatör ise, Çevresel Biyoteknoloji Laboratuvarında bulunan çalkalamalı inkübatör, 24 erlen kapasiteli, el yapımı, termostatlı (soğutma sistemi var) ve hız ayarı mevcuttur. Mikroorganizmaların devamlılığı için yapılan inkübasyonlar için Elektro-mag M7040R marka inkübatör kullanıldı. Ortam sıcaklığı 30°C’de sabitlenmiş ve ortamın nem içeriği sabit tutulmuştur. Havalandırma amacıyla dakikada 3,2 L/dakika (1 adet, Hailea ACO 9601, 2W, 220-240 V/50 Hz, 0.012 MPa) ve 0,099 L/dakika (2 adet, Champion CX-0098, kule fermentörünün yan girişlerinden karışımın sağlanması amacıyla) hava oranı ayarlanabilen 3 adet akvaryum pompası kullanıldı. Besiyeri ortamında havanın homojen dağılımı amacıyla hava difüzörleri kullanıldı. Ortamın oksijen içeriği için WTW multiparameter 340i; pH ölçümü için Hanna 8521 marka pH metre, sitrik asit tayini ve toplam şeker tayininde SHIMADZU UV-160A UV visible marka spektrofotometre, Elektromag Marka su banyosu ve Yellowline marka vorteks kullanıldı. Kuru misel kütlesi tayininde süzüntülerin sabit tartıma gelmesi için NÜVE FN 500 marka etüv kullanıldı. Çalışma erlenlerde, kesikli düzende çalışan havalandırma biyoreaktörde ve kesikli düzende çalışan kule fermentöründe

yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan biyoreaktörlerin şekilleri Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan fermentörler (A: Havalandırmalı Biyoreaktör B: Kule fermentörü)

### 3.2. METOT

#### 3.2.1. Çalışmada Kullanılan Substratlara Uygulanan Önışlemler

##### 3.2.1.1. Portakala uygulanan önışlem

60°C’de kurutulan Portakal posaları Bosch marka kahve öğütücüsünde öğütüldükten sonra elek analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda -212  $\mu\text{m}$  (70 mesh altı), -300  $\mu\text{m}$  +212  $\mu\text{m}$  (70 mesh üstü), -600  $\mu\text{m}$  +300  $\mu\text{m}$  (50 mesh üstü) kalan numunelerde hidroliz çalışması yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda optimum tane büyüklüğü belirlenmiştir.

Portakal posasına toplam 9 hidroliz işlemi uygulanmıştır (Çizelge 3.2.). Öğütülmüş portakal posasınının 10 g'ı üzerine 100 mL hazırlanan asit çözeltisi ilave edilerek 1 saat geri soğutucu altında kaynatıldı ve soğutuldu. Nötralizasyon için baz ilavesi yapıldı.

Çizelge 3.2. Portakal posasına uygulanan ön işlemler

	Hidroliz için kullanılan asit	Nötralizasyon için kullanılan Baz
1. İşlem	4M HCl	3N KOH
2. İşlem	4M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	derişik NH <sub>4</sub> OH
3. İşlem	2M HCl	derişik NH <sub>4</sub> OH
4. İşlem	8,75M CH <sub>3</sub> COOH	derişik NH <sub>4</sub> OH
5. İşlem	3M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	derişik NH <sub>4</sub> OH
6. İşlem	derişik CH <sub>3</sub> COOH	derişik NH <sub>4</sub> OH
7. İşlem	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3N KOH
8. İşlem	%5 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3N KOH
9. İşlem	%5 HCl	3N KOH

Hazırlanan hidroliz çözeltileri bir gece steril koşullarda bekletildikten sonra siyah bant filtre kağıdından süzülerek inkübasyonda kullanılmıştır. Hazırlanan hidrolizat bir gece bekletilerek parçalanma sonucunda oluşan uçucu asit ve furfural yapının uzaklaştırılması amaçlanmıştır. 8. ve 9. hidroliz işlemleri selülozun parçalanarak saptanması deneyinde kullanılan yöntemdir [126]. Oda sıcaklığında kurutularak öğütülen numuneler kullanılmadığı sürede -40°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

### 3.2.1. 2 Melasa uygulanan ön işlem

Literatür taraması sonucu elde edilen ön işlemlerin birçoğu çalışmada ön işlem olarak kullanılabilmesi için denenmiştir. En verimli olabilecek ön işlem modifiye edilerek kullanılmıştır. Çalışmada melasa uygulanan ön işlem şu şekildedir: Melas 35 mL/L olacak şekilde 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi ve 100°C'de 1 saat su banyosunda kaynatılmıştır. Numune soğutulularak derişik kireçli suyla ortam nötralize edilerek, 1 gece bekletilmiş ve üst sıvı siyah bant filtre kâğıdından süzümüştür. Melas çözeltisinde alt sıvı ortamdan uzaklaştırılmıştır. Derişik Ca(OH)<sub>2</sub> çözeltisi (6N) ile nötralizasyon, manyetik karıştırıcı da karıştırılarak yapılmıştır. Nötralizasyon sırasında renkte açılma gözlenmiştir. Elde edilen süzüntü içerisine %0,1 kütle/hacim K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ilave edilerek otoklavda 15 dakika pH 4,5'te kaynatılmıştır. Elde edilen

substratın tabanında oluşan çökelti ortamdan uzaklaştırılarak substrat olarak kullanılmıştır [35, 36, 38].

Yapılan çalışmalarda melasın doğal yapısında bulunan bazı ağır metallerin mikroorganizma gelişimini ve sitrik asit üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir [35]. Melasa ön işlem uygulanmasının asıl amacı, ağır metallerin uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla potasyum ferrosiyanür ve diğer kompleksler kullanılır. Potasyum ferrosiyanür, birçok ağır metalle reaksiyona girer ve reaksiyon ortamında çökeltme gözlenir. Melasın doğal yapısında tespit edilen 21 mikroelementin 19'u ile reaksiyona girdiği saptanmıştır [35]. Bu reaksiyon sırasında mikroorganizma için gerekli elementler de uzaklaştırılabilir [35]. Melas tipine bağlı olarak ferrosiyanürün optimum miktarı 200 ile 1000 mg/L arasında değişmektedir [35]. Reaksiyon sırasında ortama ilave edilen potasyum ferrosiyanürün %80-85 metal iyonları ile kompleks oluşturmakta, %7-14 reaksiyona girerek oluşturulan kompleks ortamda çözülmüş halde bulunmakta, %7-10 reaksiyon oluşturmadan kalmaktadır. Bu yüzden potasyum ferrosiyanürün ortama ilave edilme zamanı ve miktarı çok önemlidir [35]. Normalde potasyum ferrosiyanür sterilizasyondan önce ilave edilmektedir. Ancak son zamanlarda sterilizasyondan sonra ve iki aşamalı olarak sterilizasyondan önce ve sonra ilave edilebilmektedir [35].

Çalışmada yapılan tüm fermentasyonlarda; melasa  $K_4Fe(CN)_6$  ile ön işlem uygulaması da yapıldığı için besiyeri ortamına sterilizasyondan sonra 200 mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  ilave edildi. Reaktör aşamasında hazırlanan besiyeri ekim ortamına alınmadan önce bir gece bekletildi ve tabanda biriken çökelek inkübasyon ortamına alınmadı.

### 3.2.2. Besiyeri bileşimi

Ön inkübasyon ve diğer inkübasyonlarda mikroorganizmaların gelişmesi ve ürünün en verimli şekilde üretilmesini sağlamak amacıyla besiyeri hazırlanmıştır. Ön inkübasyon için kullanılan besiyeri içeriği Çizelge 3.3'de, inkübasyon için kullanılan besiyeri içeriği Çizelge 3.4'de verilmiştir. Erlen aşamasında karbon kaynağı olarak öncelikle sakkaroz daha sonra portakal hidrolizat-melas karışımı kullanılmıştır. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreatörde ve kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü çalışmasında karbon kaynağı olarak portakal

hidrolizatı-melas karışımı kullanılmıştır. Ön inkübasyon aşamasında toplam şeker içeriği 2 g/L iken diğer inkübasyonlarda çalışmaya göre değişiklik göstermiştir. pH ayarı sterilizasyondan önce besiyeri içeriği karışımının hazırlanmasından sonra yapılmıştır. Sterilizasyon sonrası pH değişimi kontrol grupları ile kontrol edilmiştir. Başlangıç pH ayarı için 3N KOH ve 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ile kullanılmıştır.

Çizelge 3.3.Ön inkübasyonda kullanılan besiyeri içeriği

Maddenin Adı	Miktarı
NH <sub>4</sub> Cl	4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25 g/L
pepton	0,1 g/L
maya özütü	0,2 g/L
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,3 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,4 mg/L
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,4 mg/L
MnSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,15 mg/L

Çizelge 3.3. İnkübasyonda kullanılan besiyeri içeriği

Maddenin Adı	Miktarı
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
pepton	1 g/L
maya özütü	2 g/L
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25 g/L
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,3 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,4 mg/L
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,4 mg/L
MnSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,15 mg/L

### 3.2.3. Mikroorganizmanın Fermentasyon Ortamına Ekimi

#### 3.2.3.1. Spor süspansiyonunun hazırlanması

50 mL %0,9'luk NaCl (Fizyolojik tuz çözeltisi) çözeltisi ve %1'lik Tween 80 çözeltisi (1 mL tween 80 + 99 mL distile su) hazırlanıp ayrı ayrı steril edildi. Fizyolojik tuz çözeltisi (50 mL) üzerine %1'lik Tween 80 çözeltisi (1 mL) ilave edildi. 5 günlük yatık agar *A. niger* 200910 kültürü üzerine 6 mL fizyolojik tuz çözeltisi-Tween 80 karışımı ilave edilip karıştırıldıktan sonra steril cam pamuğundan süzülerek miseller uzaklaştırılarak stok spor süspansiyonu hazırlanmıştır [127]. Stok spor süspansiyonu sitrik asit üretim çalışmalarında kullanılmıştır.



### 3.2.3.2. Spor Sayımı

Spor süspansiyonunun homojen olup olmadığını saptamak ve mL'deki spor sayısını belirlemek için hazırlanan farklı seyreltmelerdeki spor süspansiyonlarında Thoma lamı ile spor sayım yapılarak seyreltme oranına bağlı olarak spor sayısı  $8,8 \times 10^6$  spor/mL olarak tespit edilmiştir.

### 3.2.4. Ön inkübasyon aşaması

Deney tüplerinde yatık agarda 5 günlük inkübasyonla hazırlanmış olan mikroorganizmalar %0,9'luk steril NaCl çözeltisi ile fermentasyon ortamına aktarıldı. Kültürlerin 5 günlük inkübasyonlarını yeni tamamlamış olması sitrik asit üretiminde önemli etkenlerden biridir. Buzdolabında bekletilen kültürlerin sitrik asit üretim kapasitelerinin yeni hazırlanan kültürlerle göre daha düşük olduğu yapılan denemeler sırasında tespit edilmiştir.

Erlen ve fermentördeki sitrik asit üretim çalışmasında mikroorganizmaların ortama alışması amacıyla 48 saatlik ön inkübasyon uygulanmıştır. Ön inkübasyon 100 mL'lik erlenlerde 20 mL sıvı besiyeri olacak şekilde 2 g/L'lik toplam şeker içeriğine sahip (şeker olarak kullanılan fermentasyon koşullarına bağlı olarak sakkaroz veya portakal hidrolizatı ile ön işlemden geçirilmiş melas) besiyeri içerikli ortam hazırlanmış ve pH 6'ya 1N HCl ile ayarlanmıştır. Ön inkübasyon ortamı; 121°C'de 1,2 atm basınçta 15 dakika steril edilerek, stok spor çözeltisinden %0,9 NaCl çözeltisiyle  $8,1 \times 10^8$  adet *A. niger* 200910 fungal spor aşılmıştır. İnoküle edilen besiyeri ortamı, çalkalamalı inkübatörde 170 rpm çalkalama hızı ve 30°C inkübasyon sıcaklığında 2 gün inkübe edilmiştir. Oluşan pellet genişlikleri ortamda şeker içeriğinin düşük olması ve stres ortamının olmaması dolayısıyla inkübasyon ortamında oluşan pelletlere göre daha geniştir. Fermentör ortamına sadece pelet formunda gelişen mikroorganizma süspansiyonları eklenmiştir.

### 3.2.5. İnkübasyon Aşaması

Kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktör çalışması 500 mL'lik erlenlerde çalışma hacmi 100 mL olacak şekilde çalışılmıştır. 1500 mL toplam hacme sahip kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde çalışma hacmi olarak 1000 mL, 1000 mL toplam hacimdeki kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentöründe çalışma hacmi 750 mL olarak belirlenmiştir. Besiyeri ortamı 121°C'de 1,2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Havalandırmalı kule fermentörü ve besiyeri ayrı ayrı steril edilmiş ve steril koşullarda aktarım yapılmıştır.

Fermentasyon sırasında melastan kaynaklı bir köpürme gözlemlendi. Köpürmeye engel olabilmek için steril edilmiş mısırözü yağı kullanılmıştır. Mısır özü yağı ortama %6 oranında ilave edilmiştir. Mısır özü yağı aynı zamanda sitrik asit üretimi üzerinde olumlu etkilere sahip bir yağdır [49].

### 3.2.6. Substrat Olarak Sakkaroz, Narenciye Hidrolizatı ve Melas Kullanılan Besiyerleri ile Farklı Fermentörlerde Sitrik Asit Üretimi İçin Optimum Ortam Koşullarının Belirlenmesi

Çalışmaya uygun olarak hazırlanan besiyerleri steril edildikten sonra yine çalışmaya uygun olarak ön inkübasyondan çıkmış pelletler steril koşullarda aktarılmıştır. Erlenler sabit sıcaklık ve çalkalama hızında çalışılabilen çalkalayıcıda çalkalanmıştır. İnkübasyonun 12. saatinden sonra belli aralıklarla örnek alınarak mavi bant filtre kâğıdından süzölmüştür. Ayrılan katı kısımda kuru misel ağırlığı analizi yapılarak mikroorganizma gelişimi takip edilmiştir. Sıvı kısımda ise ortam pH değişimi, sitrik asit analiziyle üretim durumu, toplam şeker tayini ile substratın verimli kullanımı takip edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında havalandırma hızının etkisi, mikroorganizma oranının etkisi, başlangıç pH'sının etkisi, başlangıç substrat derişiminin etkisi ve metanol oranının etkisi çalışılmıştır. Ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm ve eser element derişimi sabit tutulmuştur. Çalışmada spor aşılması yapılmayan ortam kontrol grubu olarak kullanılmıştır

### 3.2.6.1. İnkübasyon süresinin belirlenmesi

İnkübasyon süresi, deneysel çalışma sırasında belirlenmiştir. Farklı inkübasyon ortamlarında üretimin, substrat kullanımının ve pH azalışının sabitlendiği zaman inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. Erlen aşamasının sonunda inkübasyon süresi 8 gün olarak belirlenmiştir. Bu süreyi belirlemek için ilk çalışmalarda inkübasyon süresi 15 gün olarak seçilmiştir.

### 3.2.6.2. Havalandırma hızının etkisi

Havalandırma daldırılmış sitrik asit fermantasyonunda kritik bir etkiye sahiptir. Yüksek hava akış hızı ya da saf oksijen ile havalandırma sitrik asit üretimini arttırmaktadır [45]. Fermantasyonda saf oksijen kullanımı prosesi pahalı yapar. Ancak, prosede kullanılan gaz kullanıldıktan sonra CO<sub>2</sub>'i ayrılıp tekrar sisteme verilebilir [49].

Havalandırma hızının sitrik asit üretimi üzerine etkisi, kesikli düzende çalışan havalandırma biyoreaktör ve kesikli düzende çalışan havalandırma kule fermentöründe belirlenmiştir. Havalandırma hızı, hız ayarı ayarlanabilen akvaryum pompaları ile yapılmıştır. Besiyeri ortamında oksijen içeriği WTW multiparameter 340i ile ölçülerek kontrol altında tutulmuştur. Havalandırma hızı olarak 0,5 L/L/dk, 1L/L/dk, 1,5 L/L/dk olarak ayarlanan ortamda, inkübasyon sıcaklığı 30°C, başlangıç substrat derişimi 140 g/L, başlangıç pH değeri 6,0, metanol oranı %4, mikroorganizma oranı %3 olarak sabit tutulmuştur.

### 3.2.6.3. Mikroorganizma oranının etkisi

Ön inkübasyon sonucunda üretilen mikroorganizmaların kesikli düzende çalışan havalandırma biyoreaktör ve kule fermentörüne aktarılma oranı ile ilgilidir. Ön inkübasyonda spor aşılması sabit tutulmuştur. Kesikli düzende çalışan havalandırma biyoreaktörde çalışma hacmi 1000 mL'dir. Ön inkübasyonda gelişen mikroorganizmaların fermentöre steril koşullarda aktarılması %2 (20 mL), %3 (30 mL), %4 (40 mL) olacak şekilde yapılmıştır. Kesikli düzende çalışan havalandırma kule fermentörünün çalışma hacmi 750 mL'dir. Ön inkübasyonda gelişen mikroorganizmaların fermentöre steril koşullarda aktarılması %2 (15 mL), %3 (22,5 mL) ve %4 (30 mL) olacak şekilde yapılmıştır. Ekim derişimi sitrik asit üretimini

arttırmaktadır. Ancak aşırı mikroorganizma oranı ideal değildir [128, 129]. Çalışma koşulları; l/L/dk havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4 olarak sabit tutulmuştur.

#### 3.2.6.4. Başlangıç pH'sının etkisi

Başlangıç pH'ları 5,0, 5,5, 6,0, 6,5'e ayarlanan besiyeri ortamlarına (kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktör, kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktör ve kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü) ön inkübasyonda gelişen mikroorganizmalar ilave edilmiştir. Ön inkübasyon koşullarında gelişen mikroorganizmaların başlangıç pH'ları inkübasyon ortamında hazırlanan besiyerlerinin pH'ları ile aynıdır. Bu şekilde mikroorganizmaların ortama alışma evreleri kısaltılmaya çalışılmıştır. Başlangıç pH'ları ayarlanan besiyerlerinde, inkübasyon sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dk, başlangıç substrat derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, mikroorganizma oranı %3 olarak sabit tutulmuştur.

#### 3.2.6.5. Başlangıç substrat derişiminin etkisi

Ön inkübasyonda gelişen mikroorganizmalar, 100g/L, 140 g/L ve 180 g/L toplam şeker içeriğine sahip besiyerlerine aktarılmıştır. Erlen çalışmasının birinci kısmında substrat olarak sakkaroz kullanılmıştır. Diğer çalışmalarda ise portakal hidrolizatının toplam şeker içeriği belirlenmiş ve istenilen toplam şeker içeriğine tamamlayabilmek için önişlemeden geçirilmiş melas kullanılmıştır. Toplam şeker içeriği ayarlanan besiyerlerinde sabit tutulan diğer parametreler şunlardır: Başlangıç pH'sı 6,0, inkübasyon sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dk, metanol oranı %4, mikroorganizma oranı %3'dür.

#### 3.2.6.6. Metanol oranının etkisi

Besiyerinin başlangıç pH'sı 6,0, inkübasyon sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dk, başlangıç substrat derişimi 140 g/L, mikroorganizma oranı %3 olan ortamlar hazırlanmış ve ön inkübasyondan gelişen pelletler steril koşullarda hazırlanan bu ortamlara aktarılmıştır. İnkübasyonun 24. saatinde metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla %3, %4, %5 metanol ilavesi yapılmıştır. Metanol oranı, %3, %4, %5 olan ortamlarda sitrik asit üretimi,

mikroorganizma gelişimi ve substrat kullanımı takip edilmiştir. Bu çalışma tüm biyoreaktörlerde yapılmıştır.

### 3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ:

#### 3.3.1. pH

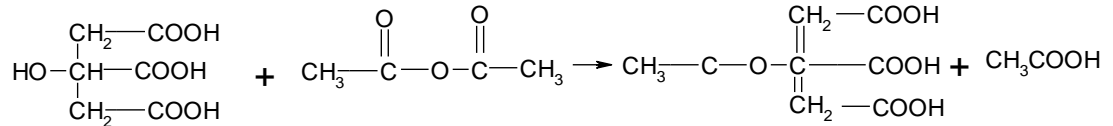
Filtrasyon sonunda kalan süzüntüde Hanna 8521 marka pH metre kullanılarak pH ölçümü yapıldı.

#### 3.3.2. Kuru Misel Kütlesi

Belli zaman aralıklarında inkübasyon ortamından alınan numune ve kontrol grubu filtre kâğıdından süzülerek ayrılan miseller Nuve FN500 marka etüvde sabit tartıma gelinceye kadar 50°C’de kurutulup tartıldı [130].

#### 3.3.3. Sitrik Asit Tayini

İnkübasyon boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örnekler siyah bant filtre kağıdından süzülen süzüntüde sitrik asit tayini Marrier&Boulet Yöntemi ile belirlendi [131]. Bu yöntemde göre, piridin ortamda su tutucu ve ortamı bazik yapıcı olarak görev almaktadır. Sitrik asit ve asetanhidrit denklemi aşağıdaki gibidir



Kolorimetrik olarak yapılan bu yöntemde göre 0,5 mL süzüntü üzerine 0,65 mL piridin ilave edilerek vortekslendikten sonra 2,85 mL asit-anhidrit ilave edilerek tekrar karıştırıldı. Tüm işlemler tüplerin kapakları kapalı ve buz banyosunda yapılmıştır. 32°C’deki su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra numuneler saf suyla hazırlanan tanık çözeltiye karşı 425 nm’de okunup kalibrasyon grafiğinden sitrik asit miktarı belirlendi. Analizlerin 30 dakika içinde yapılması gerekmektedir.

#### 3.3.4. Toplam Şeker Miktarı Tayini

İnkübasyon ortamındaki substratın mikrobiyolojik olarak kullanıldığının belirlenmesi için süzülen süzüntüde fenol sülfürik asit yöntemiyle toplam şeker tayini yapıldı [132]. Fenol sülfürik asit metodu ile 1 mL örnek alınıp üzerine 0,5 mL

%5'lik fenol çözeltilisinden yavaş yavaş eklenerek vortekslendi ve daha sonra hızlı bir şekilde 2,5 mL derişik %98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'den ilave edilerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra 488 nm dalga boyunda absorbansı okundu.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. SAKKAROZ İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA *Aspergillus niger* İLE KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN ÇALKALAMALI BİYOREAKTÖRDE OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

Sitrik asit üretiminde substrat yapısı, substrat içeriğindeki iz elementler üretim verimliliğini olumlu ya da olumsuz yönde etkiler. Bunun için seçilen *A. niger* suşu için etkileri bilinen bir ortam kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen optimum koşullar, portakal hidrolizatı ve melasın substrat olarak kullanıldığı optimizasyon çalışmasında baz olarak alınmıştır. Çalışma sonucunda optimum başlangıç pH, başlangıç toplam şeker ve metanol oranı belirlenmiştir. Çalkalama hızı (150 rpm), çalışma hacmi 100 mL ve inkübasyon sıcaklığı (30°C) yapılan literatür çalışmaları ve laboratuvar imkanları doğrultusunda sabit tutulmuştur. Haq ve ark (2002) tarafından yapılan çalışmada inkübasyon sıcaklığını 25-40°C aralığında değiştirmişlerdir. Optimum sıcaklık olarak 30°C bulmuşlardır. 30°C'den düşük sıcaklıklarda sitrik asit derişiminin azalmasını enzim aktivitesinin azalmasına, yüksek sıcaklıklardaki azalma da enzimlerin denatürasyonuna veya okzalik asit gibi diğer ürünlerin birikimine bağlamışlardır [36]. Ali ve ark [133] ve Pazouki ark [134] tarafından yapılan çalışmalarda da aynı şekilde *A. niger* için en uygun inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu belirlenmiştir. Çalkalama hızı ile ilgili yapılan optimizasyonlarda Pazouki ve ark [134] 160 rpm, Haq ve ark [36] ve Rehman ve ark [40] ise 200 rpm olarak belirlenmiştir. Laboratuvarında temin edilen cihazların kapasitesine bağlı kalınarak çalışmada çalkalama hızı 150 rpm olarak kullanılmıştır. Bu şekilde optimum çalkalama hızına yakın çalışma yapılabilmektedir.

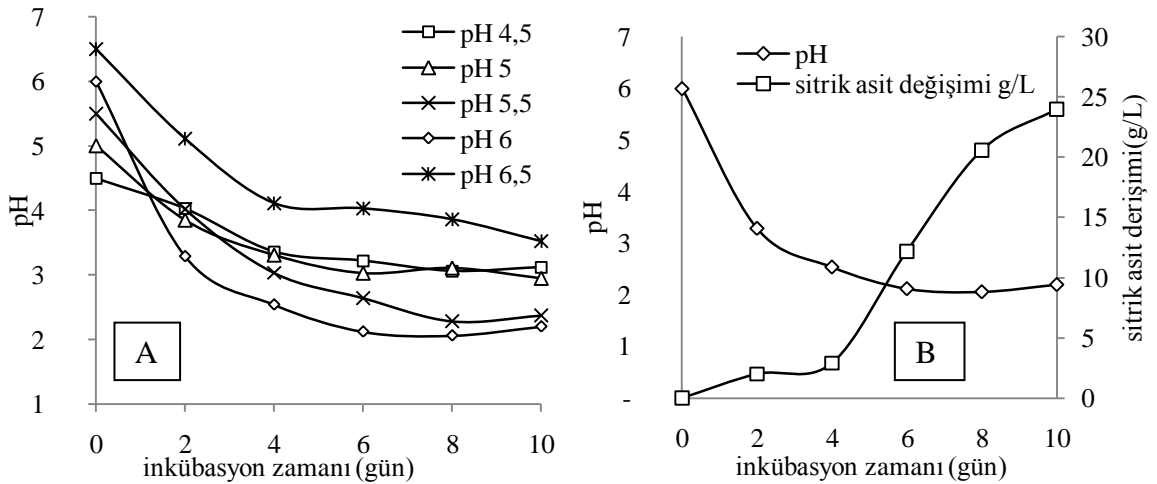
#### 4.1.1. Başlangıç pH'sının Etkisi

Optimum sitrik asit üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla yapılan ilk çalışmada sakkaroz içerikli ortamda başlangıç pH'sı belirlenmiştir. Besiyeri ortamında sakkaroz derişimi 140 g/L, %4 metanol, inkübasyon sıcaklığı 30°C ve çalkalama hızı 150 rpm olarak ayarlanmıştır.

Sitrik asit üretiminde en önemli parametre başlangıç pH'sıdır. pH ayarı yapılmayan koşullarda sitrik asit üretiminin düşük olduğu yapılan ilk denemelerde

belirlenmiştir. Hazırlanan ortamın doğal pH'sı 4,5 ile 4,75 arasında değiştiğinden ilk aşamada başlangıç pH'sı belirlenmiştir. Optimum başlangıç pH'sının belirlenmesi amacıyla pH 4,5 ile pH 6,5 arasında beş farklı başlangıç pH'sı (pH 4,5;5,0;5,5;6,0;6,5) kullanılmıştır. Başlangıç pH'sı kullanılan *A. niger* suşuna bağlı olarak değiştiği ve genel olarak sitrik asit üretimi için başlangıç pH'sının türe bağlı olarak pH 3,5 ile pH 6,5 aralığında olduğu literatürde belirlenmiştir [53].

Farklı pH'larda yapılan çalışmalardan görüleceği gibi en iyi pH azalışı pH 6,0'da olmuştur. Uygulanan tüm başlangıç pH koşullarında inkübasyon periyodu boyunca pH değerinde bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuç tüm inkübasyon periyotlarında belirli değerlerde sitrik asit üretildiğini göstermektedir. Başlangıç pH'sı 4,5 ve 5,0'de pH azalışının birbirine çok yakın olup, pH 6,5'da pH azalışının en az olduğu ve pH 6,0 ve pH 5,5'da pH azalışının birbirine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.1A). Başlangıç pH'sı 6,0'da pH azalışı ve sitrik asit derişiminin zamana bağlı değişimi birlikte değerlendirilecek olursa pH'nın 3'ün altına düştüğü evrede sitrik asit üretiminin maksimuma ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.1B). pH, 3'ün altına düştüğü anda sitrik asit üretimindeki hızlı artış üretilen ürünün sitrik asit olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç pH'sına bağlı olarak ortam pH'sının zamanla değişimi (A) ve sitrik asit üretimi ile ortam pH arasındaki ilişki(B) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol)

Sitrik asit üretiminde toplam şeker içeriğindeki azalma ve sitrik asit derişimi arasında bir ilişki vardır. Primer metabolitlerin üretimi sırasında mikroorganizmanın gelişimi için hiçbir stres ortamı mevcut değildir. Bu nedenle mikroorganizma ortama



alıştıktan sonra kütlesini artırırken primer metaboliti de salgılamaktadır. Sitrik asit üretimi sırasında ise sitrik asit üretiminden sorumlu enzimlerin gelişimi ve ara ürünlerin oluşması için mikroorganizma yüksek substrat derişimine ve bazı iz elementlere ihtiyaç duyar. Bu durum bir bakıma stres ortamı gibi görölse de biyokütle artışına bağılı olarak sitrik asit üretilmesi ürünün primer metabolit olduğu göstermektedir. Üretilen hücre sayısının fazla oluşu kullanılan substratın ve üretilen sitrik asitin fazla olmasını gerektirmektedir.

Sitrik asit üretimi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde pH, Kreps çevrimi üzerine doğrudan etki etmemektedir. pH muhtemelen enzim aktivitesi veya hücre zarından şekerin ve sitrik asitin geçirgenliğine etki etmektedir[100].

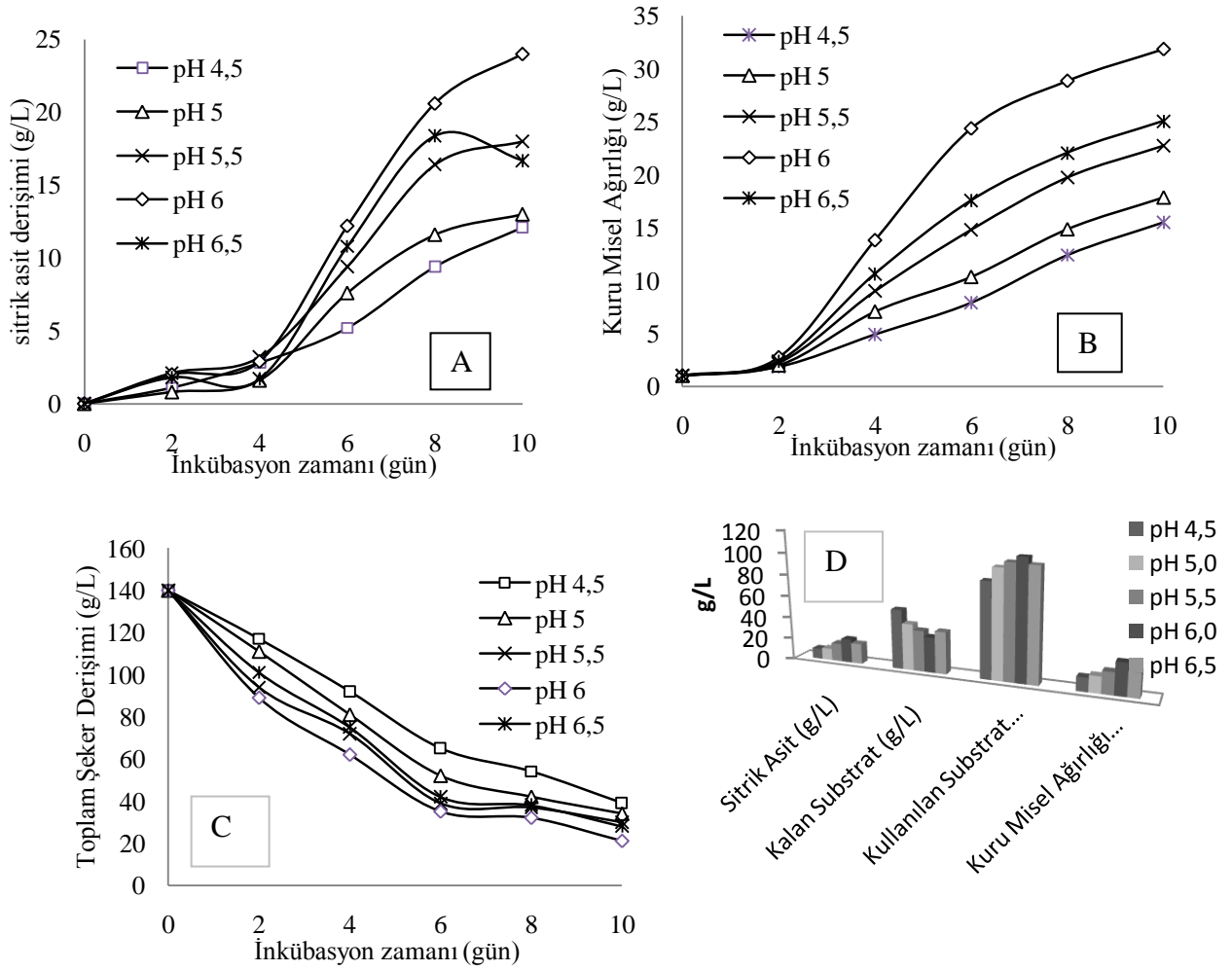
Sitrik asit derişimlerinin zamana bağılı olarak değışimleri incelendiğinde ilk 4 gün boyunca sitrik asit üretiminin çok düşük olduğu, ancak 4. günden sonra sitrik asit üretiminde hızlı bir artış gösterdiğı görölmüştür (Şekil 4.2A). Bu durum ise ortam pH'sının üretilen oksalik asit, glukonik asit gibi diğer ürünlerle düştüğü ve sitrik asit üretimi için en uygun koşulun pH 6 olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada *A.niger*'in ortama alışması için ön inkübasyon uygulanmamıştır. Bu durum da mikroorganizmanın ortama alışmasını geciktirmiştir.

Şekil 4.2B'de göröldüğü gibi *A. niger*'in ortama alışma süreci 2 gündür. 2. Günden sonra kuru misel ağırlığında artış görölmüştür. Bu durum *A.niger*'in sitrik asit üretimine 2. günden sonra başladığını göstermektedir. Zamana bağılı olarak üretilen kuru misel ağırlığı karşılaştırılacak olursa pH 6,0<6,5<5,5<5,0<4,5 olduğu belirlenmiştir. Başlangıç pH'sına bağılı olarak Kuru misel ağırlığındaki bu değışim *A. niger* için ortam koşullarının uygunluğu ile yakından ilgilidir.

Başlangıç pH değeri substrat kullanımını da değıştirmektedir. Mikrobiyal üremenin en iyi olduğu koşulda substrat kullanımı da en yüksektir. Substrat kullanımı açısından değerlendirildiğinde pH 6,0<5,5<6,5<5,0<4,5 olduğu Şekil 4.6'de görölmektedir. Bu durum kuru misel ağırlığı ile yakınlık göstermektedir.

Sitrik asit üretimi ve kuru misel ağırlığı açısından değerlendirildiğinde aynı sıralamanın substrat kullanımı açısından da geçerli olduğu görölmektedir (Şekil 4.2 B ve C) Substrat kullanımı, sitrik asit üretimi ve biyokütle gelişiminin inkübasyonun

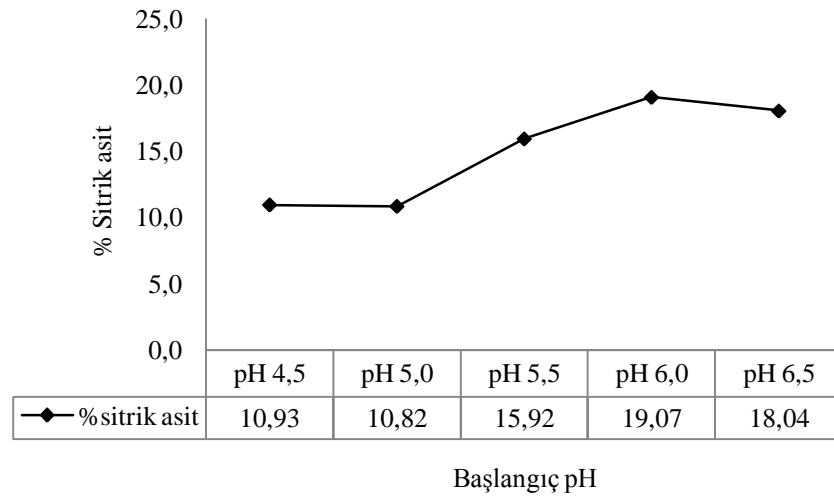
8. gününde paralel olması üretilen ürünün primer bir metabolit olduğunu göstermektedir. İnkübasyonun 8. gününde elde edilen deneysel veriler değerlendirildiğinde başlangıç pH 6 olan koşulda maksimum üretim ve substrat kullanımının olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2D)



Şekil 4.2 Sakkaroz içerikli besiyeri ortamında başlangıç pH'sının sitrik asit üretimine etkisi (A: Sitrik asit derişiminin zamana bağlı değişimi, B: kuru misel ağırlığının zamana bağlı değişimi, C: Toplam şeker derişiminin zamana bağlı değişimi, D: tüm parametrelerin toplu değerlendirilmesi) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol)

Ürün verimliliğinin belirlenmesi ve sistem tasarımlarında kullanılan kinetik parametreler başlangıç pH'larına göre zamana bağlı olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Kullanılan şeker temelinde hesaplanan sitrik asit üretim verimliliği inkübasyonun 8. gününde pH 4,5'da 10,35, pH 5,0'da 10,82, pH 5,5'da 15,92, pH

6,0'da 19,07, pH 6,5'da 16,32 olarak hesaplanmıştır. Başlangıç pH'sının 5,5'dan düşük olan koşullarda sitrik asit verimliliğinin oldukça düştüğü ve başlangıç pH'sı düştükçe sitrik asit üretim verimliliğinin sabitlendiği görülmektedir (Şekil 4.3). Bu durum başlangıç pH'sının sitrik asit üretimi açısından oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Üretilen biyokütlenin sitrik asit üretim verimliliğini gösteren  $y_{p/x}$  değerleri inkübasyonun 8. gününde pH 4,5'da 0,718, pH 5,0'da 0,714, pH 5,5'da 0,726, pH 6,0'da 0,748, H 6,5'da 0,723 olarak hesaplanmıştır. Değerler arasındaki farklılık *A.niger*'ın gelişim morfolojisi ile yakından ilgili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.3: Substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda inkübasyonun 8. gününde, başlangıç pH'sına bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliği (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol)

Çizelge 4.1: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç pH'sına bağlı olarak elde edilen deney sonuçlarıyla hesaplanan kinetik parametreler (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol)

pH 4,5									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
2	0,598	0,048	0,080	0,023	0,479	0,012	0,038	0,260	4,78
4	0,571	0,058	0,102	0,029	0,500	0,006	0,051	0,102	5,83
6	0,658	0,069	0,105	0,036	0,521	0,005	0,055	0,066	6,93
8	0,718	0,103	0,144	0,046	0,448	0,004	0,065	0,036	10,35
10	0,781	0,120	0,153	0,050	0,421	0,003	0,065	0,027	11,98

pH 5,0									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (g hücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%sitrik asit
2	0,401	0,028	0,069	0,017	0,604	0,008	0,042	0,303	2,76
4	0,226	0,027	0,120	0,017	0,615	0,002	0,074	0,087	2,71
6	0,734	0,086	0,118	0,053	0,611	0,005	0,072	0,059	8,64
8	0,714	0,108	0,152	0,055	0,510	0,004	0,077	0,034	10,82
10	0,728	0,123	0,168	0,054	0,442	0,003	0,074	0,025	12,26

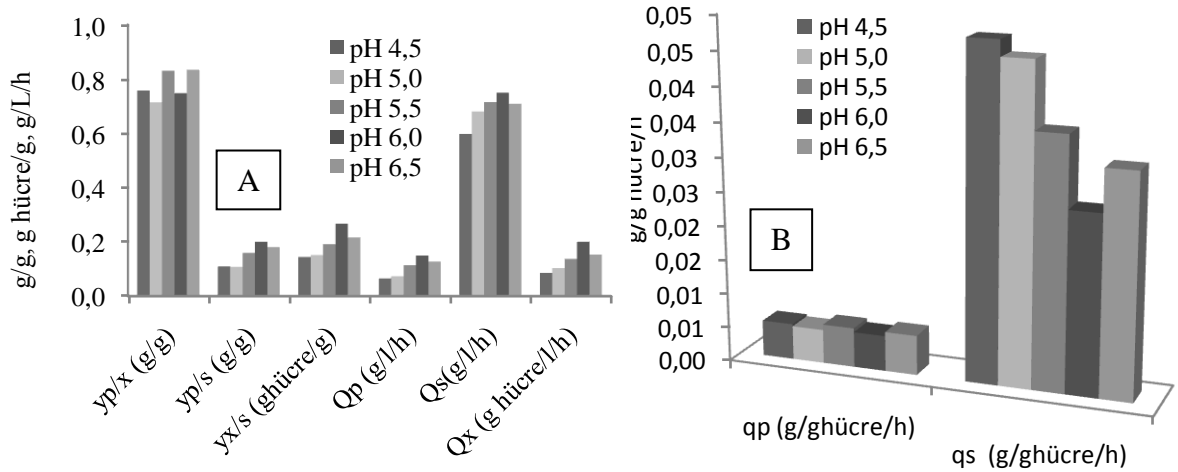
pH 5,5									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (ghücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%sitrik asit
2	0,934	0,046	0,049	0,044	0,958	0,019	0,047	0,426	
4	0,356	0,047	0,132	0,033	0,708	0,004	0,094	0,079	4,71
6	0,635	0,093	0,147	0,065	0,701	0,004	0,103	0,047	9,31
8	0,726	0,159	0,219	0,085	0,536	0,004	0,118	0,024	15,92
10	0,741	0,164	0,221	0,075	0,458	0,003	0,101	0,019	16,36

pH 6,0									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (ghücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%sitrik asit
2	0,728	0,039	0,054	0,042	1,063	0,015	0,057	0,387	3,92
4	0,210	0,037	0,177	0,030	0,813	0,002	0,144	0,059	3,72
6	0,501	0,116	0,232	0,085	0,729	0,003	0,169	0,030	11,62
8	0,748	0,200	0,267	0,113	0,563	0,004	0,150	0,019	20,00
10	0,722	0,193	0,268	0,096	0,496	0,003	0,133	0,016	19,33

pH 6,5									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (ghücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%sitrik asit
2	0,754	0,046	0,061	0,038	0,813	0,016	0,050	0,340	4,62
4	0,160	0,026	0,164	0,018	0,677	0,002	0,111	0,064	2,62
6	0,615	0,110	0,179	0,075	0,681	0,004	0,122	0,039	11,02
8	0,723	0,164	0,226	0,087	0,531	0,004	0,120	0,023	16,37
10	0,726	0,163	0,224	0,076	0,467	0,003	0,104	0,019	16,25

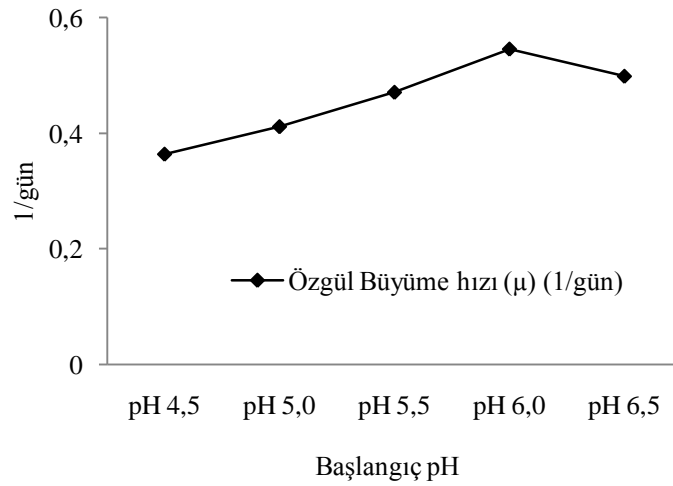
İnkübasyonun 8. gününde hesaplanan kinetik parametreler başlangıç pH'larına göre grafiklendirilmiştir (Şekil 4.4A). Elde edilen grafikte optimum başlangıç pH'sının hem ürün üretimi hem de substrat kullanımı açısından pH 6,00 olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizma başına üretilen sitrik asit miktarı ( $q_s$ ) pH 6,0'da diğer başlangıç pH'larına göre düşük olsa da kullanılan substrat başına en yüksek sitrik asit ( $Q_s$ ) üretimi pH 6,0'da görülmüştür. Düşük pH değerlerinde sitrik asit üretim verimliliği yüksek olsa da üretilen biyokütle miktarı daha düşük olduğu için verimlilik düşmektedir.

Sitrik asit üretiminin birim zamanda hücre başına sitrik asit üretimini gösteren  $q_p$  değerleri birbirine oldukça yakındır (Şekil 4.4B). Hücre başına substrat kullanımı ise düşük pH'larda daha yüksektir. Bu durum *A.niger*'in düşük pH'larda substratın verimli bir şekilde kullanıldığı ancak sitrik asit ve biyokütle üretimi açısından zayıf olduğu görülmektedir. Biyokütle artışının az olması göz önüne alınacak olursa bu koşullarda sekonder metabolitlerin üretildiği düşünülebilir. Fermentasyon süreci sonucunda elde edilen ürünün tanımlanabilmesi için ileri düzeyde araştırma yapılması gereklidir.



Şekil 4.4: Sakkaroz içerikli ortamda inkübasyonun 8. gününde, başlangıç pH'sının kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol)

Mikroorganizmaların gelişim süreçleri içerisinde üreme kinetikleri ortam koşullarına göre değişmektedir. Mikrobiyal büyüme kinetiklerinin oluşturulması sırasında hesaplanan özgül büyüme hızına ortam pH'sı oldukça etkili olmaktadır. Düşük pH'larda özgül büyüme hızının düşük olduğu, pH arttıkça özgül büyüme hızının arttığı belirlenmiştir. Başlangıç pH'sının belirlendiği bu çalışmada, özgül büyüme hızı, pH 6,0'da 0,5459 gün<sup>-1</sup> ile en yüksek, pH 4,5'da 0,3643 gün<sup>-1</sup> ile en düşük değerler hesaplanmıştır (Şekil 4.5). Filamentli fungusların, büyüme ortamında oluşabilecek fiziksel değişimlerden etkilenmektedirler. Gelişimleri sırasında ortama salgıladıkları enzimler ve organik asitlerin birikiminden dolayı strese girdikleri rapor edilmiştir [135]. Bu durum sitrik asit üretimini ve misel gelişimini etkilemektedir.



Şekil 4.5: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç pH'sının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30oC, 140 g/L başlangıç toplam şeker, %4 metanol)

#### 4.1.2. Başlangıç Toplam Şeker Derişiminin Etkisi

Sitrik asit üretim optimizasyon çalışması için belirlenmesi gereken ikinci önemli parametre başlangıç toplam şeker derişimidir. Maksimum özgül büyüme hızı gibi parametrelerin de hesaplanması için bu tarz çalışmaların yapılması gerekmektedir. Sitrik asit üretimi için kullanılan substrat ve mikroorganizma tür ve suşuna bağlı olarak değişen bir substrat derişimi vardır. Literatürde optimum substrat derişiminin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda 50 g/L ile 200 g/L aralığında toplam şeker derişimler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda optimum substrat derişiminin 100 ile 180 g/L aralığında değiştiği görülmektedir. Bu nedenle

çalışmada 100 g/L, 140 g/L ve 180 g/L başlangıç toplam şeker derişimi kullanılmıştır.

Çalışmada başlangıç pH'sı 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C ve çalkalama hızı 150 rpm olarak sabit tutulmuştur. İnkübasyonun 8. gününde başlangıç toplam şeker derişimi 100 g/L'de; pH 3,04, sitrik asit 11,2 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 93,9 g/L ve kuru misel ağırlığı 19,1 g/L; 140 g/L'de pH 2,06, sitrik asit 20,06 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 108 g/L ve kuru misel ağırlığı 28,9 g/L ve 180 g/L'de ise pH 3,72, sitrik asit 9,5 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 128 g/L ve kuru misel ağırlığı 41,1 g/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Başlangıç toplam şeker derişimi sitrik asit üretiminde önemli bir parametredir. Düşük toplam şeker derişimlerinde substratın daha verimli kullanıldığı ancak kuru misel ağırlığı artışı ve sitrik asit üretimi açısından substrat derişiminin verimli olmadığı görülmektedir. İnkübasyonun 8.gününde ortam pH'sındaki değişim incelendiğinde 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimde pH azalışının en yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6A) En çok pH azalış eğiliminin 140 g/L'de olduğu, en az azalış eğiliminin ise 180 g/L'de olduğu saptanmıştır. Yüksek substrat derişimleri sırasında *A. niger*'in okzalik asit gibi farklı ürünler veya bazı poliollerin sentezlemesi gibi nedenler pH azalışının düşük olmasına neden olmuş olabilir.

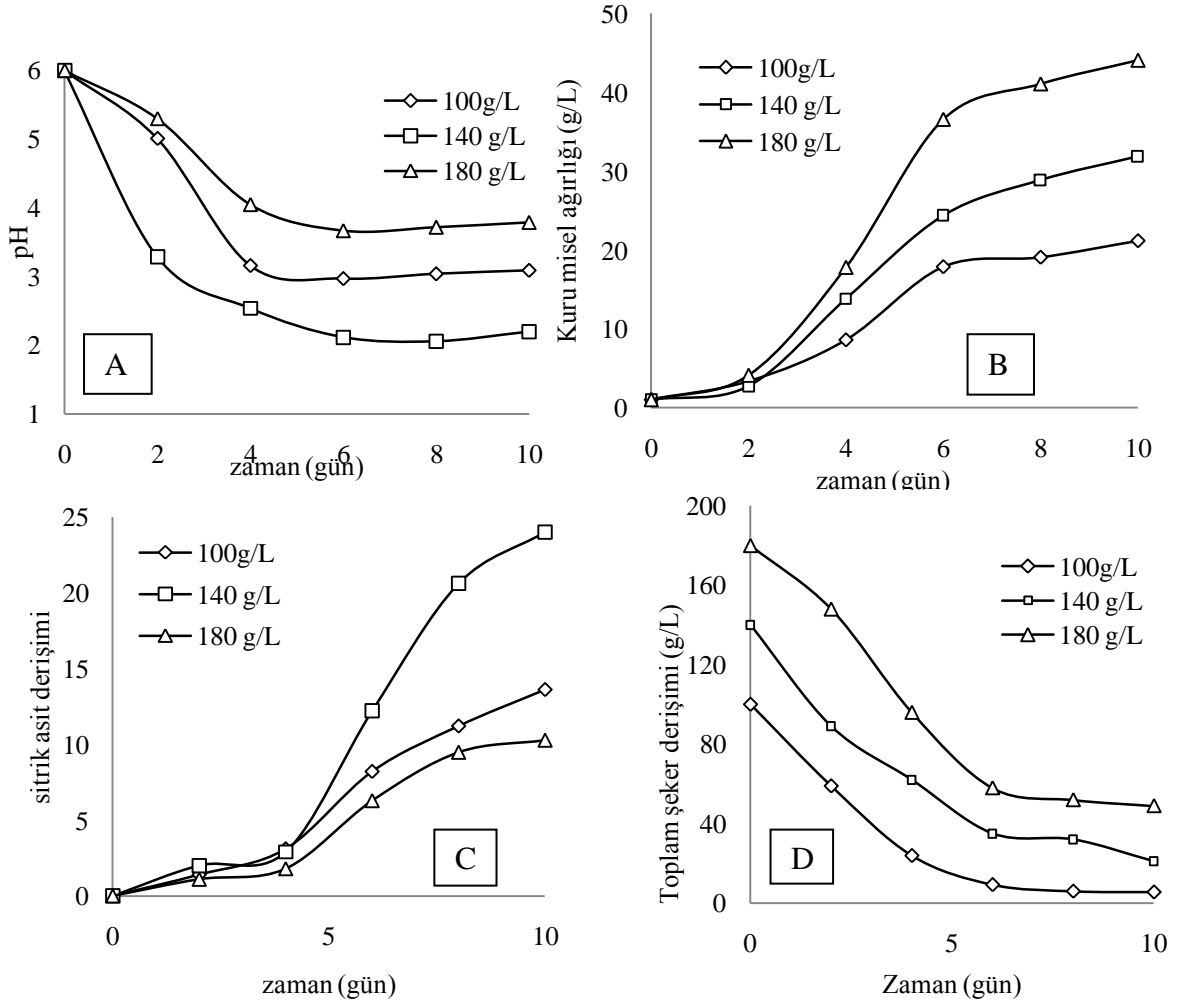
Kuru miselin zamana bağlı olarak değişimi ve inkübasyonun 2. gününden sonra kuru misel ağırlığında bir artış gözlenmesi *A. niger*'in alışma sürecinin iki gün olduğunu göstermektedir. *A. niger* filamentli fungusunun gelişimi ise ortam koşullarına bağlı olarak alışma evresi, gelişim ve durağan evrelerde farklı kinetik modellere bağlı olarak artış gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [96, 97]. Sakkarozun kullanıldığı bu çalışmada inkübasyonun 8. gününden sonra ürün sentezinin ve kuru misel ağırlığının sabitlenmesi nedeniyle inkübasyon periyodu 8 gün olarak belirlenmiştir. Sakkaroz derişimi artıkça kuru misel ağırlığı da artmıştır (Şekil 4.6).

Toplam şeker içeriğinin artışıyla ortamda bulunan tüm substratın tüketilme oranının azaldığı Şekil 4.6C'de görülmektedir. Buna göre *A. niger*'in substrat derişimini tam olarak kullandığı ortam %96 ile 100 g/L başlangıç toplam şeker

içeriğidir. 140 g/L'de %86, 180 g/L'de ise %67 oranında substrat kullanılmıştır. Verimli bir tüketim ve sitrik asit üretimi için en iyi derişiminin 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi olduğu bulunmuştur.

Sitrik asit üretimi için en verimli başlangıç toplam şeker derişimi zamana bağılı sitrik asit üretim garfiğyle belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 4.6D). Bu grafiğe göre 100 g/L başlangıç toplam şeker derişiminin sitrik asit üretimi için yetersiz olduğu, 180 g/L sakkaroz içeriğinin ise sitrik asit üretimi için fazla olduğu ortaya bulunmuştur. 100 g/L sakkaroz ortamında sitrik asit üretiminin 180 g/L sakkaroz ortamına göre yüksek olması ise fazla substrat içeriğinin sitrik asit üretimini baskılayabilir. Sitrik asit üretimi mikroorganizmanın üreme şekli ile yakından ilgilidir. Üretilen ortama bağılı olarak mikroorganizmanın pellet formunda (küçük, orta ve büyük formda), jelatimsi, yapışkan, filamentli yapıda gelişme gösterebilir [42]. Sitrik asit üretiminin yeterli seviyede olduğu durumlarda mikroorganizmanın orta büyüklükte pellet formu gösterdiği saptanmıştır [136]. Deneysel çalışmalarımızda orta büyüklükte pellet formu içeren ortamda sitrik asit üretiminin daha yüksek olduğunu gözlemledik.



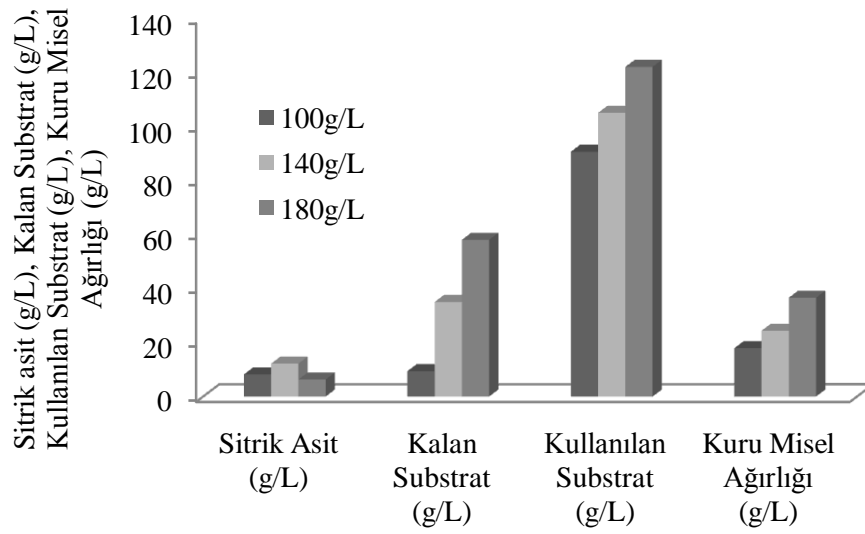


Şekil 4.6: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin ortam pH'sı üzerine etkisi (A: ortam pH'sının zamana bağlı değişimi, B: kuru misel ağırlığının zamana bağlı değişimi, C: Sitrik asit derişiminin zamana bağlı değişimi, D: Toplam şeker derişiminin zamana bağlı değişimi) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol)

İnkübasyonun 6. gününde elde edilen deneysel parametreler grafiklendirildiğinde kuru misel ağırlığı ve substrat kullanımı açısından 180 g/L'nin en iyi koşul olduğu tespit edilmiştir. Ancak sitrik asit üretimi açısından bakıldığında 140 g/L'nin sitrik asit üretimi için en uygun koşul olduğu görülmektedir (Şekil 4.17).

Toplam şeker içeriğinin belirlendiği bu çalışmada elde edilen deneysel veriler aracılığıyla hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre inkübasyonun 8. gününde biyokütle başına sitrik asit üretimini gösteren  $y_{p/x}$  değerleri 100g/L başlangıç toplam şeker içeriği ortamında 0,586, 140g/L'de 0,713, 180 g/L'da 0,231 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit olan  $y_{p/s}$  değerleri 100g/L başlangıç toplam şeker içeriği ortamında 0,119, 140g/L'de

0,191, 180 g/L'da 0,074 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen biyokütleyi veren  $y_{x/s}$  değerleri 100g/L başlangıç toplam şeker içeriği ortamında 0,203, 140g/L'de 0,267, 180 g/L'da 0,321 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit verimliliğini gösteren %sitrik asit değerleri; 100g/L başlangıç toplam şeker içeriği ortamında 11,93, 140g/L'de 19,07, 180 g/L'da 7,42 hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda sitrik asit verimliliğinin hem biyokütle hem de substrat tüketimi açısından başlangıç toplam şeker derişiminin 140 g/L olması gerekliliği bulunmuştur.



Şekil 4.7: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin inkübasyonun 6. gününde deneysel parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol)

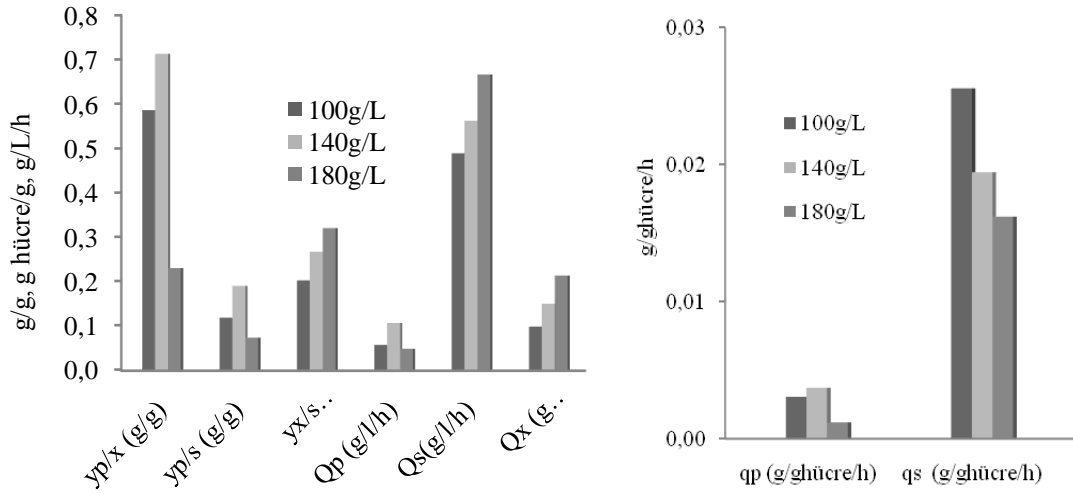
Çizelge 4.2: Substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol)

100 g/L									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (ghücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
2	0,417	0,034	0,082	0,029	0,854	0,009	0,070	0,255	3,41
4	0,360	0,041	0,113	0,032	0,792	0,004	0,090	0,092	4,08
6	0,458	0,091	0,198	0,057	0,629	0,003	0,124	0,035	9,05
8	0,586	0,119	0,203	0,058	0,489	0,003	0,099	0,026	11,93
10	0,642	0,144	0,225	0,057	0,393	0,003	0,088	0,019	14,42

140 g/L									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
2	0,728	0,039	0,054	0,042	1,063	0,015	0,057	0,387	3,92
4	0,210	0,037	0,177	0,030	0,813	0,002	0,144	0,059	3,72
6	0,501	0,116	0,232	0,085	0,729	0,003	0,169	0,030	11,62
8	0,713	0,191	0,267	0,107	0,563	0,004	0,150	0,019	19,07
10	0,753	0,202	0,268	0,100	0,496	0,003	0,133	0,016	20,17

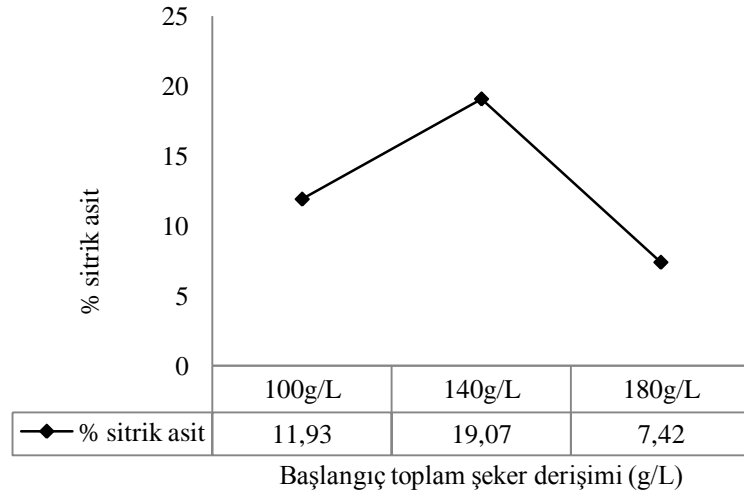
180 g/L									
Zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (ghücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
2	0,180	0,034	0,191	0,023	0,667	0,004	0,127	0,109	3,44
4	0,094	0,021	0,229	0,019	0,875	0,001	0,200	0,045	2,14
6	0,172	0,052	0,300	0,044	0,847	0,001	0,254	0,023	5,16
8	0,231	0,074	0,321	0,049	0,667	0,001	0,214	0,016	7,42
10	0,247	0,083	0,336	0,045	0,546	0,001	0,184	0,012	8,32

İnkübasyonun 8. gününde elde edilen deneysel veriler garfiklendirildiğinde sitrik asit üretimi ile ilgili tüm parametrelerde 140 g/L toplam şeker içeriğinin, misel üretimi ve toplam şeker kullanımı açısından ise 180 g/L toplam şeker içeriğinin uygun olduğu görülmektedir(Şekil 4.18).



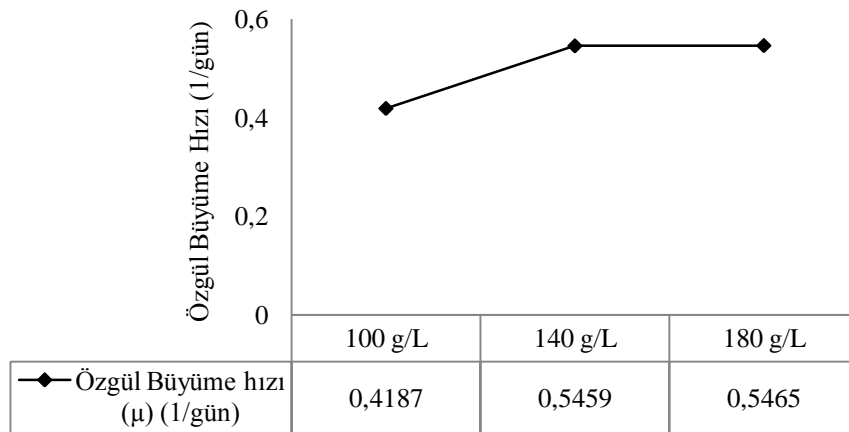
Şekil 4.8: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin inkübasyonun 8.gününde kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol)

Sitrik asit üretim verimliliğinin değerlendirildiği Şekil 4.19'da, 180 g/L toplam şeker içeriğinde sitrik asit verimliliğinin çok düşük olduğu, 140 g/L toplam şeker içeriği içeren ortamda ise en yüksek olduğu görülmüştür. Navaratnam ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada başlangıç toplam şeker derişiminin (50 g/L, 100 g/L, 150 g/L) artışı ile sitrik asit üretiminin arttığı ve buna bağlı olarak kuru misel ağırlığının da arttığı tespit edilmiştir [137]. Substrat derişimi arttıkça hücre içi sitrik asit derişiminin düştüğü, hücre dışı sitrik asit derişiminin arttığı belirlenmiştir. Çalışmada 100 ve 150 g/L sakkaroz ortamında 30 mL/L metanol içeriğinde inkübasyonun 7. gününde maksimum sitrik asit derişimi 12,1 g/L olarak belirlenmiştir [137].



Şekil 4.9: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin inkübasyonun 8.gününde sitrik asit üretim verimliliği üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol)

Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı koşullarda farklı başlangıç sakkaroz derişimlerine göre biyokütle artışına bağlı olarak özgül büyüme hızı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre substrat derişimi arttıkça özgül büyüme hızı da artış göstermiştir (Şekil 4.20). Ancak 140 g/L sakkaroz derişimi ile 180 g/L sakkaroz derişimi arasındaki artış oldukça düşüktür. Mikrobiyal büyüme kinetiklerinin hesabında substrat derişimine bağlı  $\mu$  değerleri hesaplanarak elde edilen sonuçlar substrat derişimine karşı özgül büyüme hızı olacak şekilde grafiklendirilir. Bu grafikten  $\mu_{max}$  değeri hesaplanır.



Şekil 4.10: Sakkaroz içerikli ortamda başlangıç toplam şeker içeriğinin özgül büyüme hızı üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, %4 metanol)

#### 4.1.3. Metanol oranının Sitrik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Sitrik asit hücre içinde sentezlenir ve üretilen sitrik asitin bir kısmı hücre içinde kalmaktadır. Hücre içinde birikmiş halde bulunan sitrik asit bazı alkollerin ilavesi ile hücre zarı geçirgenliği değiştirilerek dışarıya alınır [38, 44, 137, 139]. Ayrıca metanol hücre proteinlerinin aktivitesini baskılayarak enzimin metabolik aktivitesini arttırır. Sonuçta inkübasyonun erken basamaklarında sitrik asit üretimi artış gösterir. Ancak yüksek derişimlerde metanol ilavesi fungal metabolizmayı bozduğundan sitrik asit üretiminin düştüğü tespit edilmiştir [38, 43, 44]. *A. niger*'dan sitrik asit üretiminde metanol glikozun yerine kullanıldığında, metanolün besin kaynağı olarak kullanılmadığı tespit edilmiştir [137]. Bu durum, sitrik asit üretiminde metanolün hücre geçirgenliğini değiştirdiği fikrini desteklemektedir.

Bu çalışmada 100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi besiyeri ortamında sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre %3 metanol kullanılan çalışmada inkübasyonun 8. gününde ortam pH'sı 2,38, sitrik asit derişimi 14,8 g/L, kuru misel ağırlığı 23,31 g/L ve kullanılan toplam şeker derişimi 101 g/L olarak belirlenmiştir. %4 metanol kullanılan çalışmada inkübasyonun 8.gününde ortam pH'sı 2,06, sitrik asit derişimi 20,6 g/L, kuru misel ağırlığı 28,9 g/L ve kullanılan toplam şeker derişimi 108 g/L olarak belirlenmiştir. %5 metanol kullanılan çalışmada inkübasyonun 8. gününde ortam pH'sı 3,97, sitrik asit derişimi 5,7 g/L, kuru misel ağırlığı 15,73 g/L ve kullanılan toplam şeker derişimi 94 g/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).

Farklı metanol derişimlerinde inkübasyon ortamında oluşan pH değişimlerinin zamana bağlı grafiği Şekil 4.11A'da verilmiştir. Buna göre oluşturulan her ortamda mikrobiyal üreme olmuştur. Ancak %5'den fazla metanol derişimlerinde mikrobiyal üremenin olmadığı tespit edilmiştir. İnkübasyonun 8. gününde ortam pH'ları karşılaştırıldığında en az pH azalışı %5 metanol oranında görülmüştür (Şekil 4.11A). %5'den daha az metanol ilavesi yapılan ortamlarda ortam pH'sı 2'ya kadar düşmüştür. Yüksek metanol derişimleri mikroorganizmaların gelişimi üzerine toksik etki gösterebilir. Ayrıca endüstriyel üretim açısından değerlendirildiğinde metanol ilavesinin artışı ekstra maliyet gerektirmektedir.

İnkübasyon ortamına metanolün ilave edilme zamanı da sitrik asit üretimini etkilemektedir. Bununla ilgili yapılan araştırmalar metanolün mikrobiyal gelişimin log safhasına geçmeden ancak ekimle beraber ilave edilmemesi gerektiğini göstermektedir. Metanolün 24. saatten sonra ilave edilmesi  $Fe^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  gibi iz elementlerin mikroorganizma tarafından tolere edilmesini sağlamaktadır [44]. Elde edilen literatür verilerine göre çalışmada metanol, inkübasyonun 24. saatinde ilave edilmiştir.

Metanol oranı misel üretimini de etkilemektedir. Metanol oranının artması ile mikrobiyal üreme düşmektedir. %4 metanol oranında misel üretiminin %3 metanol oranına göre yüksek olması ise mikrobiyal üremede düşük derişimde metanolün olumlu etki gösterdiğini düşündürebilir. Ayrıca %3 metanol oranında misel gelişim grafiğı %4 metanol derişim grafiğine oldukça benzemektedir. Ancak her koşulda mikroorganizmanın geliştiğı ve kuru misel ağırlığının arttığı Şekil 4.11B'de görülmektedir.

Navaratnam ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada *A. niger* ile sitrik asit üretimi sırasında metanol ve glukoz değışiminin etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre düşük glukoz derişimlerinde metanolün kuru misel ağırlığı üzerine ters etki gösterdiğini ancak yüksek glukoz derişimlerinde kuru misel ağırlığının da arttığı bulunmuştur. Ayrıca 50 g/L'lik glukoz derişiminde kuru misel ağırlığı metanol ilave edilmeksizin 15,6 g/L iken 30 mL/L metanol ilavesi sonucunda ise 3,7 g/L olarak bulunmuştur. 150 g/L glukoz derişiminde ise kuru misel ağırlığı metanol ilave edilmeksizin 16,0 g/L iken 30 mL/L metanol ilavesi sonucunda ise 17,4 g/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre aynı zamanda glukoz derişiminin artışı ile misel ağırlığının arttığı da görülmüştür [137].

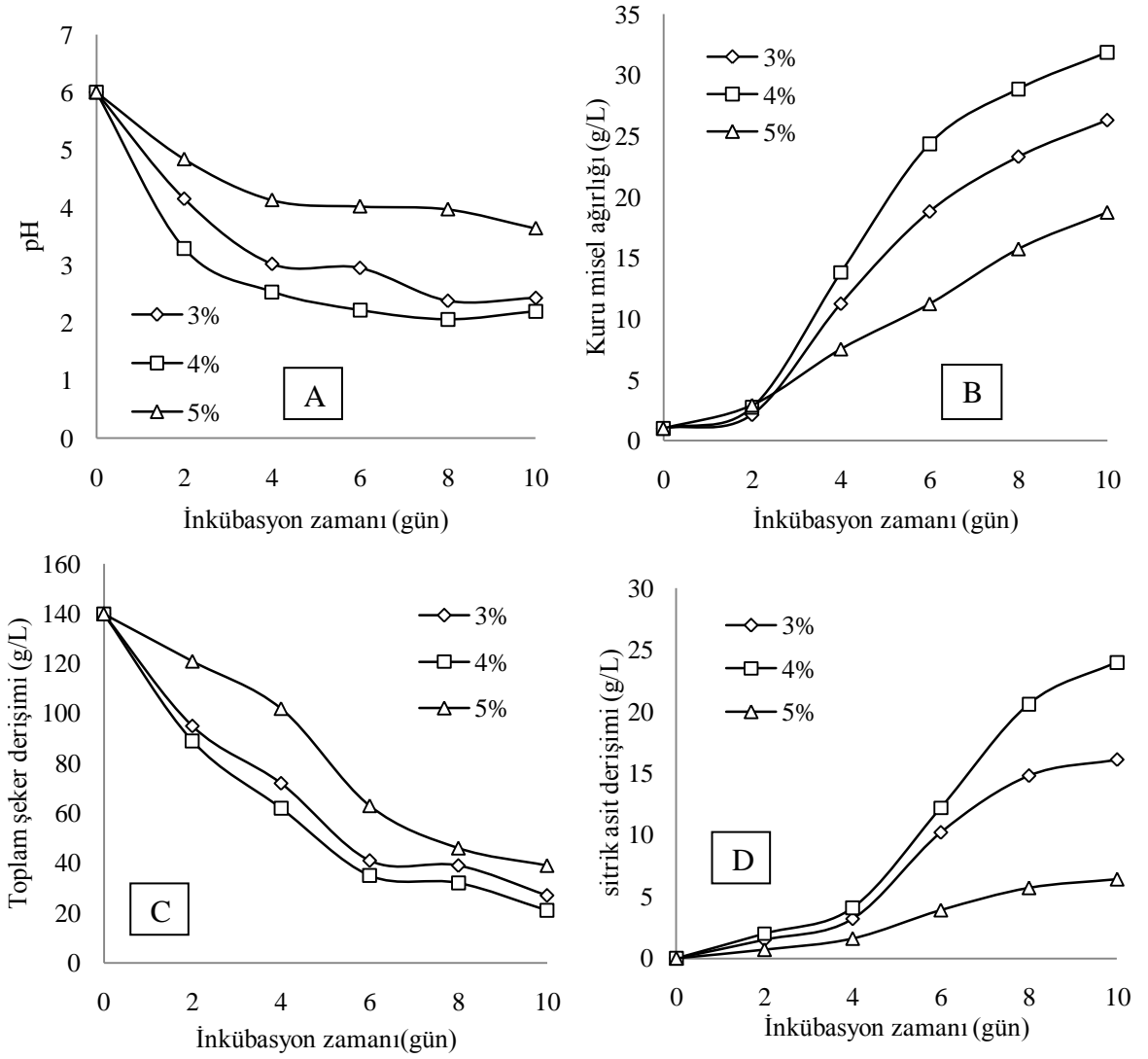
Toplam şeker derişiminin zamana bağılı olarak farklı metanol derişimlerindeki azalışı Şekil 4.11C'de verilmektedir. Buna göre substratın en iyi %4 metanol oranında kullanıldığı görülmektedir. Yüksek metanol derişimlerinde sakkarozun kullanımını azalmaktadır. Bu durum mikrobiyal üremedeki değışimle bağılantılı olduğunu göstermektedir. Pazouki ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada substrat olarak melas ve glukoz kullanılmış ve mikroorganizma olarak *A. niger* ve *Candida lipolytica*'nın sitrik asit üretimi karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara

göre *A. niger*'ın 30 kg/m<sup>3</sup> metanol ilavesi ile glukozun daha verimli kullanıldığı ve bu durumun melasın kullanıldığı koşulda daha net olarak tespit edildiği bildirilmiştir [134].

Sitrik asit derişimi açısından deneysel sonuçlar değerlendirildiğinde %5 metanol oranının sitrik asit üretimi açısından fazla olduğu, %3 metanol oranının de yetersiz olduğu bulunmuştur (Şekil 4.11D). Optimum metanol oranı seçilen mikroorganizma ve *A. niger* suşuna bağlı olarak değişmektedir. Bazı çalışmalarda sitrik asit üretimi açısından optimum metanol oranı 30 mL/L [137] iken bazı çalışmalarda 40 mL/L [138, 139, 140], bazı çalışmalarda ise 10 mL/L [44] olarak belirlenmiştir. Glikoz yokluğunda metanolün *A. niger* üzerine toksik etki gösterdiği belirlenmiştir [137].

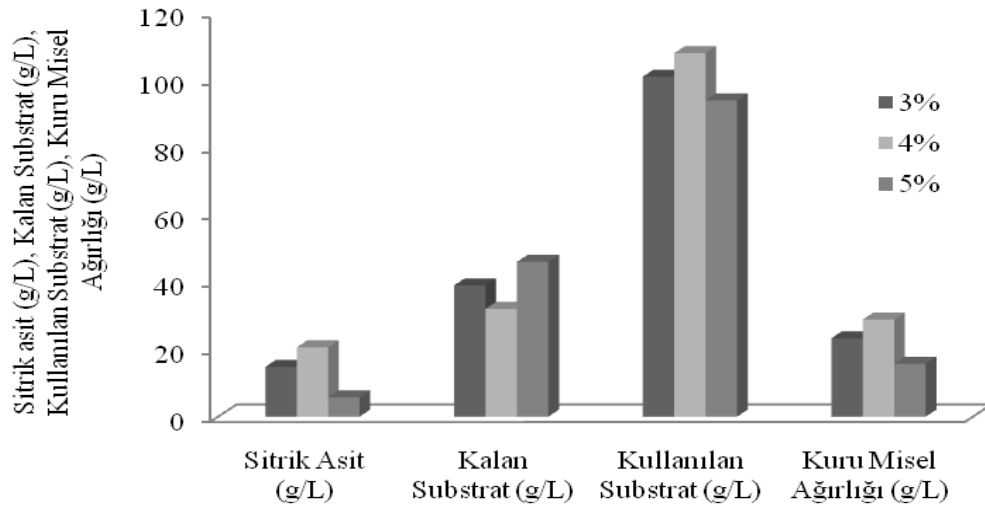
Metanol 2. günde ilave edildiğine göre 4. güne kadar sitrik asit üretiminin düşük olmasının nedeni sitrik asit üretimi için ara ürünlerin 4. güne kadar maksimum değere ulaşmış olmasından kaynaklanabilir.





Şekil 4.11: Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisi (A: ortam pH'sının zamana bağlı değışimi, B: kuru misel ağırlığının zamana bağlı değışimi, C: Toplam şeker derişiminin zamana bağlı değışimi, D: Sitrik asit derişiminin zamana bağlı değışimi) (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi)

İnkübasyonun 8. gününde elde edilen deney sonuçları birlikte değerlendirildiğinde substrat kullanımı, mikrobiyal üreme ve sitrik asit üretimi açısından %4 metanol oranı sakkaroz kaynaklı besiyeri ortamı için en uygundur (Şekil 4.12). Sitrik asit üretimi açısından ve misel üretimi açısından bakıldığında %5 metanol oranının toksik etki gösterdiği açıkça görülmektedir.



Şekil 4.12: Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının inkübasyonun 8.gününde deneysel parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi)

Substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda farklı metanol derişimlerinin zamana bağı olarak hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.3’de verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre inkübasyonun 8. gününde biyokütle başına sitrik asit üretimini gösteren  $y_{p/x}$  değerleri %3 metanol oranında 0,635, %4 metanol oranında 0,715, %5 metanol oranında 0,362 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit olan  $y_{p/s}$  değerleri %3 metanol oranında 0,147, %4 metanol oranında 0,191, %5 metanol oranında 0,061 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen kuru miseli veren  $y_{x/s}$  değerleri %3 metanol oranında 0,231, %4 metanol oranında 0,267, %5 metanol oranında 0,167 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit verimliliğini gösteren %sitrik asit değerleri; %3 metanol oranında 14,65, %4 metanol oranında 19,07, %5 metanol oranında 6,06 hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Bu hesaplamalar sonucunda sitrik asit verimliliğinin hem biyokütle hem de substrat tüketimi açısından metanol oranının %4 olması gerekliliği bulunmuştur.

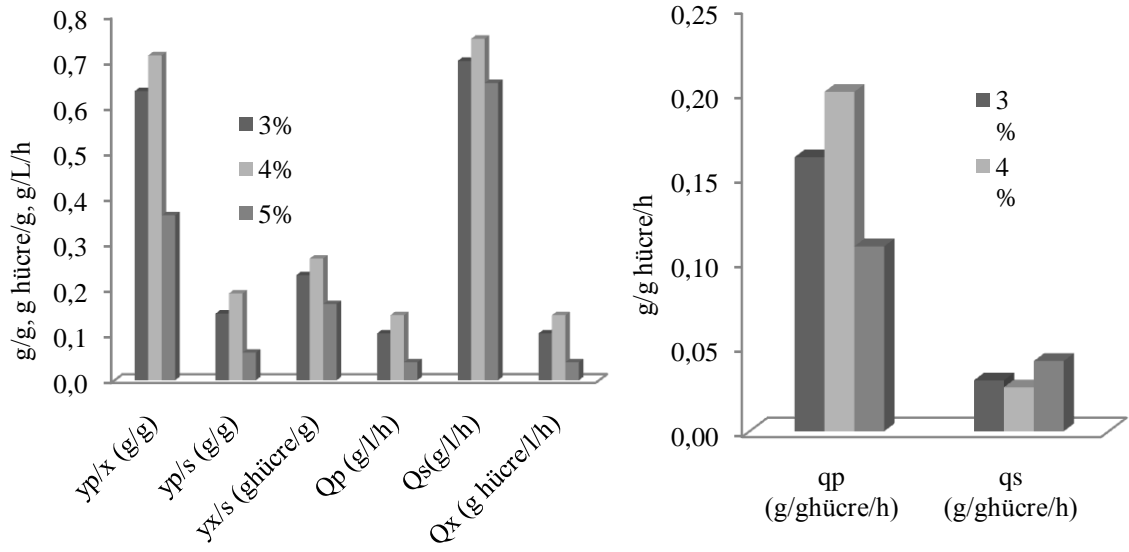
Çizelge 4.3: Substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda farklı metanol derişimlerinde zamana bağı olarak kinetik parametreler (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi)

%3									
zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
2	0,711	0,033	0,047	0,031	0,938	0,015	0,044	0,444	3,33
4	0,285	0,047	0,165	0,033	0,708	0,003	0,117	0,063	4,71
6	0,542	0,103	0,190	0,071	0,688	0,004	0,131	0,037	10,30
8	0,635	0,147	0,231	0,077	0,526	0,003	0,121	0,023	14,65
10	0,612	0,142	0,233	0,067	0,471	0,003	0,110	0,018	14,25

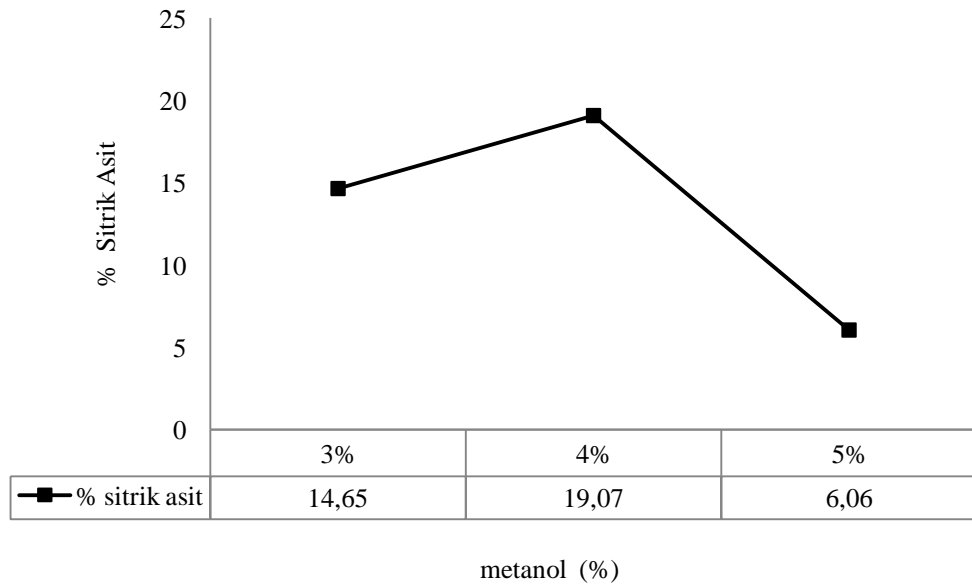
%4									
zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
2	0,421	0,039	0,093	0,042	1,063	0,009	0,099	0,224	3,92
4	0,297	0,053	0,177	0,043	0,813	0,003	0,144	0,059	5,26
6	0,501	0,116	0,232	0,085	0,729	0,003	0,169	0,030	11,62
8	0,713	0,191	0,267	0,107	0,563	0,004	0,150	0,019	19,07
10	0,753	0,202	0,268	0,100	0,496	0,003	0,133	0,016	20,17

%5									
zaman (gün)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
2	0,240	0,037	0,154	0,015	0,396	0,005	0,061	0,136	3,68
4	0,213	0,042	0,198	0,017	0,396	0,002	0,078	0,053	4,21
6	0,347	0,051	0,146	0,027	0,535	0,002	0,078	0,048	5,06
8	0,362	0,061	0,167	0,030	0,490	0,002	0,082	0,031	6,06
10	0,342	0,063	0,185	0,027	0,421	0,001	0,078	0,022	6,34

Hesaplanan kinetik parametreler grafiklendirildiğinde substratın %4 metanol oranında daha verimli kullanıldığı, maksimum sitrik asit üretiminin de %4 metanol oranında üretildiği Şekil 4.13’de görülmektedir. Mikrobiyal aktivite açısından değerlendirildiğinde maksimum substrat kullanımı ve ürün sentezi sıralaması %4>%3>%5 şeklinde olur. Substrat başına sitrik asit üretim verimliliğini gösteren % sitrik asit verisi grafiklendirildiğinde de maksimum sitrik asit üretiminin %4 metanol oranında minimum sitrik asit üretiminin ise %5 metanol oranında olduğu Şekil 4.14’de görülmektedir.

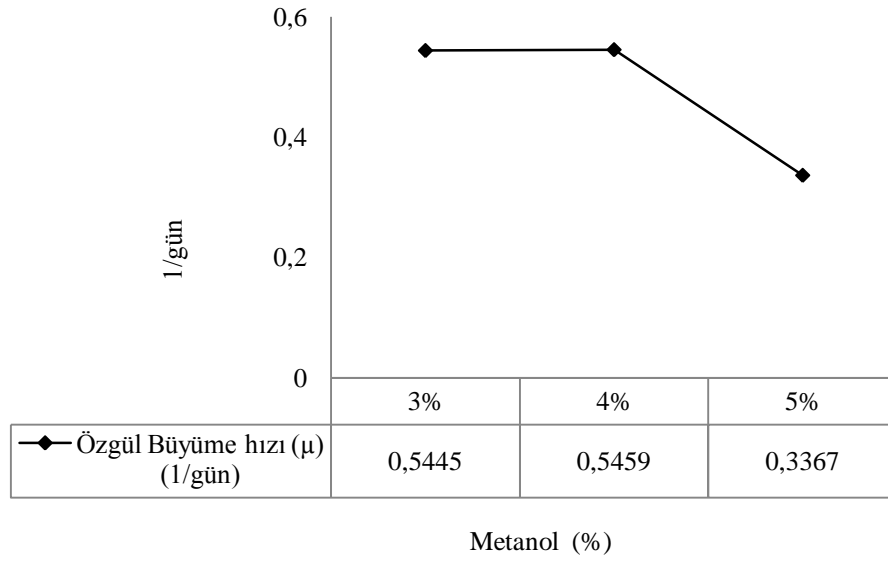


Şekil 4.13 Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının inkübasyonun 8.gününde kinetik parametreler üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi)



Şekil 4.14: Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının inkübasyonun 8. gününde sitrik asit üretim verimliliği üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi)

Metanol oranı özgül üreme hızını da etkilemiştir (Şekil 4.15). Buna göre %4'den yüksek derişimlerde özgül üreme hızı azalmış, daha düşük derişimlerde ise önemli bir etkileme olmadığı görülmüştür. Özgül büyüme hızı mikroorganizma gelişimi ile yakından ilgilidir. Ortaya atılan hipotezlere göre metanol hücresel yapıyı veya enzim sentezini etkilemektedir. Metanolün bu etkisi substrat alımını ve kullanımını etkileyebilir. Bu yüzden metanol oranına bağlı olarak özgül büyüme hızı da artabilir.



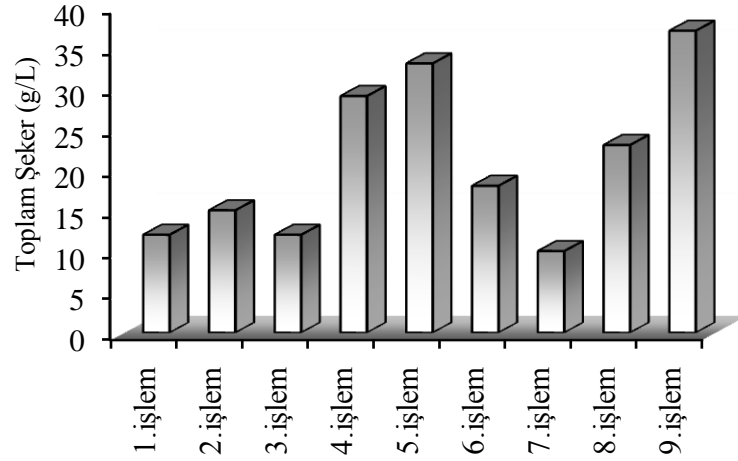
Şekil 4.15: Sakkaroz içerikli ortamda metanol oranının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (100 mL çalışma hacmi, 150 rpm, 30°C, başlangıç pH değeri 6,0, 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimi)

#### 4.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN PORTAKAL POSASI İLE İLGİLİ HİDROLİZ ÇALIŞMASI

Portakal posası kuru madde temelinde %96-97 oranında organik madde içeriğine sahiptir. Doğal yapısı %7,4 ile 10,9 aralığında ham lif (Selüloz), %10,6-19,1 aralığında asit deterjan çözünmeyen lif (hemiselüloz), %1,0-2,1 aralığında asit deterjan çözünmeyen lignin (lignin) içermektedir. Geriye kalan kısmı ise şeker, ham yağ ve diğer organik bileşenleri içermektedir [141,142]. Uygulanan hidroliz işlemleri ile portakal posasında bulunan organik yapının şeker içeriğinin artırılması sağlanmıştır.

Hidroliz çalışmasında öncelikli olarak daha derişik asit çözeltileri kullanıldı. Ancak portakal posasının yapısındaki materyallerin bir kısmının çözünmüş olması veya yapısında bulunan organik yapının bozulması nedeniyle toplam şeker içeriği düşük bulunmuştur. Hidroliz sonrası nötralizasyon aşamasında aşırı baz kullanımı kullanılan asidin derişiminin ayarlanması yoluna gidilmesine neden olmuştur. Çalışmada baz olarak NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH kullanılmıştır. NaOH ile ilgili yapılan nötralizasyon çalışmasında elde edilen hidrolizatlarda mikrobiyal üreme gözlenmemiştir. Bu nedenle bu işlemlerle ilgili sonuçlar verilmemiştir.

Uygulanan işlemlerle portakalın doğal yapısında bulunan çözünebilecek forma sahip doğal materyaller ile hemiselüloz ve selülozun bir kısmı çözünür forma geçirilmiştir. Hidrolizde kullanılan asitler ve bu asitlerin farklı derişimleri, parçalama süresi ve nötralizasyonda kullanılan kuvvetli bazlar hidrolizatın toplam şeker içeriğini değiştirmektedir [142]. Özellikle derişimi yüksek olan asitlerde parçalama işlemi sonucunda elde edilen hidrolizatların çözünmüş madde içeriği %5'lik HCl ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'un kullanıldığı hidrolize göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Portakal posasına uygulanan hidroliz işlemleri sonucunda elde edilen süzültüde toplam şeker içeriklerindeki değişim

Hazırlanan hidrolizatlarda mikrobiyal üremenin olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla fermentasyon ortamı hazırlanmıştır. 8 günlük inkübasyon periyodu boyunca mikrobiyal üremenin olup olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Üreme olan ortamlarda pellet genişliği orta genişlikte olan ve pH düşüşü (pH 6'dan 3'e) en iyi olan hidroliz koşulu bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bunun için posanın parçalanmasında %5'lik HCl çözeltisinin kullanıldığı ve 3N KOH ile nötralizasyon yapılan 9. ortam hidroliz yöntemi olarak belirlenmiştir.

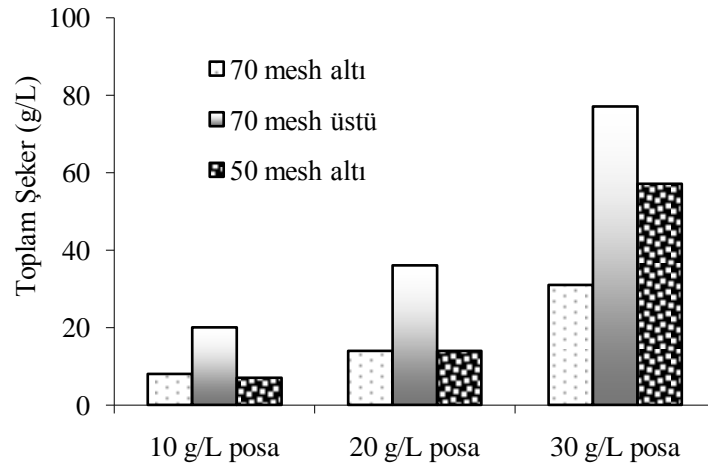
Çizelge 4.4. Portakal posa hidrolizinde kullanılan yöntemler ve mikrobiyal üreme durumu

	Parçalama için Kullanılan Asit	Nötralizasyon için Kullanılan Baz	Mikrobiyal Üreme
1. işlem	4M HCl	3N KOH	-
2. işlem	4M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	derişik NH <sub>4</sub> OH	-
3. işlem	2M HCl	derişik NH <sub>4</sub> OH	+
4. işlem	8,75 M CH <sub>3</sub> COOH	derişik NH <sub>4</sub> OH	+
5. işlem	3 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	derişik NH <sub>4</sub> OH	+
6. işlem	derişik CH <sub>3</sub> COOH	derişik NH <sub>4</sub> OH	-
7. işlem	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3N KOH	+
8. işlem	%5 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çözeltisi	3N KOH	+
9. işlem	%5 HCl çözeltisi	3N KOH	+

#### 4.2.1. Portakal Posa Tanecik Büyüklüğü ve Posa Derişiminin Toplam Şeker İçeriğine Etkisi

Hidroliz ortamında öğütülen portakal posasının tanecik büyüklüğü çözünmüş toplam şeker içeriğini değiştirmektedir. Bu nedenle öğütülen posalara elek analizi uygulanarak fraksiyonlarına ayrılmıştır. Elde edilen fraksiyonlar, 100 mL'lik %5'lik HCl çözeltisi varlığında hidrolize uğratılmıştır. Hidroliz sırasında 3 farklı fraksiyon ve 3 farklı derişim kullanılmıştır. Deney sonuçlarına göre, 30 g/L'lik derişim ve - 300 $\mu$ m +212 $\mu$ m (70 mesh üstü) fraksiyonu optimum tanecik büyüklüğü olarak belirlenmiştir.

Hidroliz ortamında, portakal posa derişimi çözünmüş toplam şeker içeriğini değiştirmektedir (Şekil 4.30). Hidroliz çalışması sırasında 10 g/L, 20 g/L ve 30 g/L posa derişimi ve 70 mesh altı, 70 mesh üstü ve 50 mesh altı tanecik büyüklüğüne sahip posalar kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre posa derişimi arttıkça toplam şeker içeriği artmıştır. 70 mesh altı tanecik büyüklüğünün toplam şeker içeriğinin 50 mesh altına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Optimum tanecik büyüklüğünün 70 mesh üstü olması gerektiği belirlenmiştir.

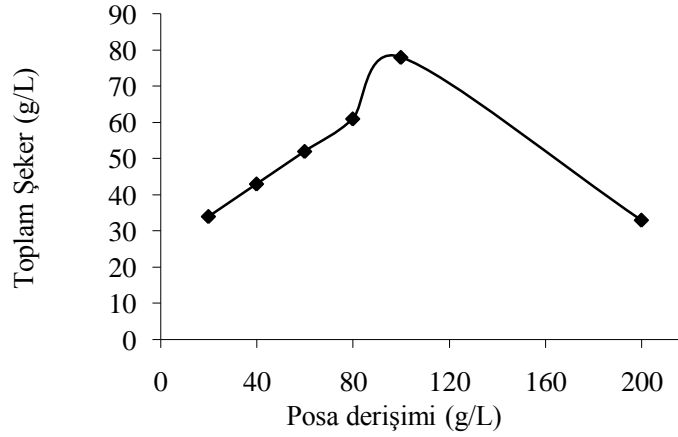


Şekil 4.17. Portakal posasının hidrolizinde posa derişimi ve tanecik büyüklüğünün toplam şeker derişimine etkisi

Optimum posa derişiminin belirlenmesi amacıyla, 100 mL'lik %5'lik HCl (0,6 M) çözeltisine 2, 4, 6, 8, 10 ve 20 g öğütülmüş posa ilavesi yapılmıştır. Elde edilen



verilere göre 100 g posa/L hidroliz ortamında optimum derişim olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Portakal posasının hidrolizinde posa derişiminin toplam şeker içeriğine etkisi

#### 4.3. PORTAKAL HİDROLİZATI VE MELAS İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA *Aspergillus niger* İLE KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN ÇALKALAMALI BİYOREAKTÖRDE OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

Portakal hidrolizati ve melasın substrat olarak kullanıldığı bu çalışmada optimum üretim koşulları belirlenmiştir. İnkübasyon periyodunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada toplam inkübasyon periyodu 8 gün sürdürülmüştür. Besiyeri ortamı 30°C’de, 150 rpm devir hızında, 100 mL çalışma hacminde, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırözü yağı, 140 g/L toplam şeker temelinde substrat miktarı, 200 mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi, ve başlangıç pH’sı 6 olarak ayarlanmıştır. İnkübasyon periyodu boyunca 12 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 günlerde alınan numunelerde pH, kuru misel ağırlığı (KMA) (g/L), toplam şeker derişimi (g/L) ve sitrik asit (g/L) analizi yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre inkübasyon ortamı pH’sı düzenli bir azalış göstermiştir (Şekil 4.19A). İnkübasyon periyodunun 2. gününde pH 4’e düşmüştür. Bu zamandan sonra sitrik üretiminin tetiklendiği görülmüştür. Ortam pH değerinin 3-4 aralığına düşmesiyle sitrik asit üretimindeki artış sitrik asit üretiminin pH’ya

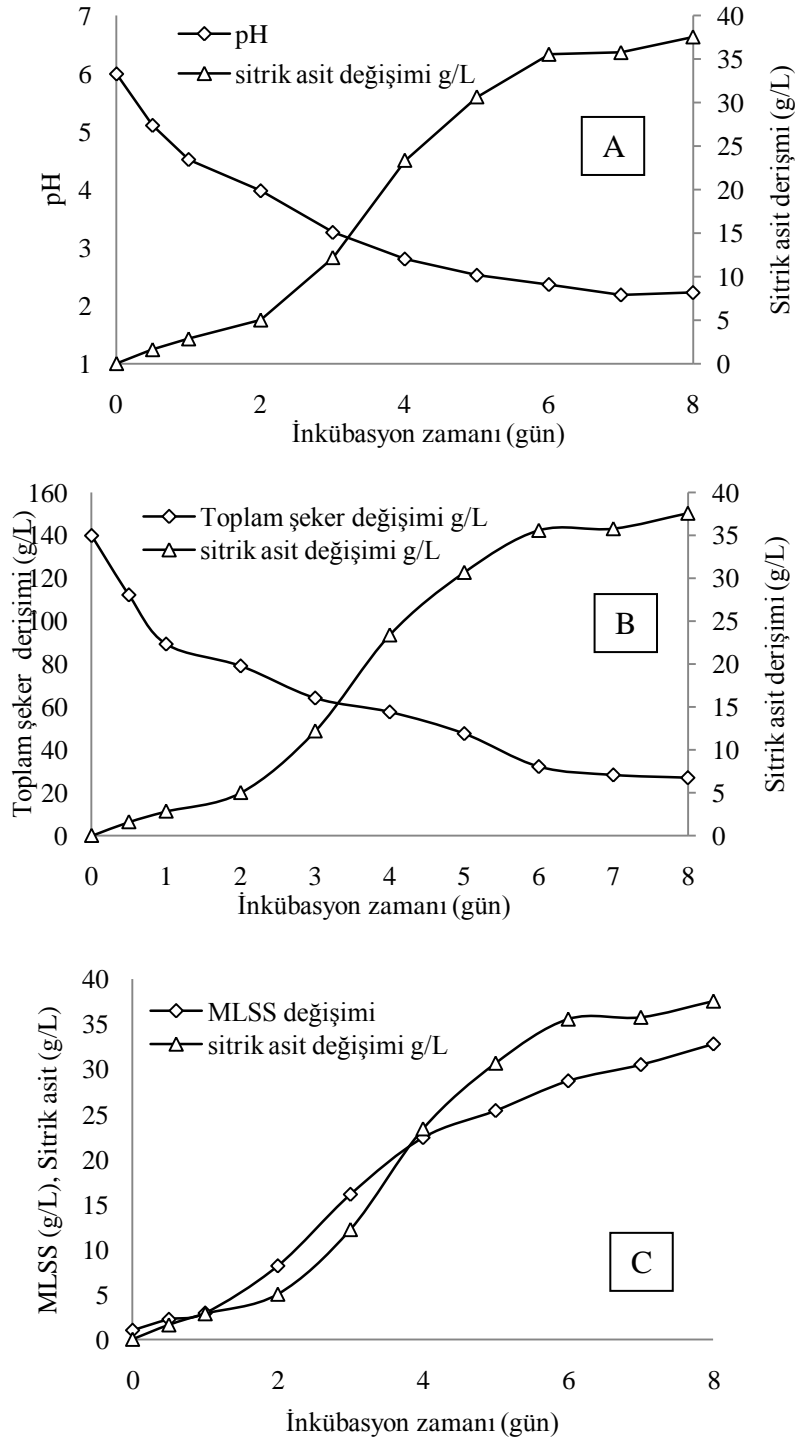
bağlı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.19A). Ortam pH değerindeki azalmanın nedeni üretilen ürünler ve enzimlerdir. Özellikle *A. niger* filamentli fungusu ortam içeriği (iz elementler, substrat derişimi, nutrientler vb.) ve ortamın özelliğine (çalkalama hızı, pH vb) bağlı olarak primer ve sekonder metabolitlerin üretimini yapabilen bir fungustur. Bu tür mikroorganizmalara heterofermentatif mikroorganizma denilmektedir. Fermentasyon ortamında bulunan bir sakkarozdan tek bir ürün sentezi yapan mikroorganizmalara homofermentatif, fermentasyon koşullarına bağlı olarak bir veya daha fazla ürün ya da farklı ürünler üreten mikroorganizmalara heterofermentatif mikroorganizmalar denilmektedir [143]. İnkübasyon periyodu boyunca pH değerindeki değişimiyle sitrik asit üretimi arasındaki ilişki optimum inkübasyon periyodunun 6. gün olması gerektiğini göstermektedir.

Sitrik asit üretiminde inkübasyon ortamındaki toplam şeker içeriğindeki azalma ve sitrik asit derişimi arasında bir ilişki olduğu Şekil 4.19B’de belirlenmiştir. Üretilen hücre sayısının artışı kullanılan substratın ve üretilen sitrik asitin artışı gerektirmektedir. Şekil 4.19C’de görüldüğü üzere inkübasyonun 2. gününden itibaren sitrik asit üretimindeki yükselme kuru misel ağırlığındaki artışla paralellik göstermektedir. Bu ilişki ise sitrik asitin *A. niger*’ın ürettiği primer metabolit olabileceğini göstermektedir. Şekil 4.19C’de inkübasyonun 4. gününden sonra gelişen mikroorganizmanın ürettiği sitrik asitin arttığı gözlenmiştir. Bu durum pelet gelişiminin 4. günde tamamlandığını ve sitrik asit üretiminin 4. günde maksimuma ulaştığını gösteriyor olabilir.

Kuru misel ağırlığındaki değişim incelendiğinde inkübasyon periyodunun 6. gününde mikroorganizmanın durağan faza geçtiği Şekil 4.19C’de görülmektedir. Kullanılan fermentasyon ortamına göre kuru misel ağırlığı değişiyor olsa da her *A. niger* suşu farklı gelişim göstermesi nedeniyle ürettiği kuru misel ağırlığı farklılık gösterebilmektedir. Rahmen ve ark (2003) tarafından yapılan çalışmada topraktan izole ettikleri 25 adet *A. niger* suşu ile 250 mL’lik erlenlerde 50 mL olacak şekilde hazırlanan ortamda sitrik asit üretilmiştir. Çalışma, 30°C’de 148 saatlik inkübasyon periyodunda, 150 g/L başlangıç şeker ve pH 6 (başlangıç pH) değerinde melas içeren

ortamda yürütülmüştür. Fermentasyon sonunda her suşun kuru misel ağırlıkları değişiklik gösterdiğini kaydetmişlerdir [40].

Sitrik asit üretimi mikroorganizmanın üreme şekli ile yakından ilgilidir. Üretilen ortama bağlı olarak mikroorganizma pellet formunda (küçük, orta ve büyük formda), jelatinimsi, yapışkan, filamentli yapıda gelişme gösterebilir [42]. Sitrik asit üretiminin yeterli seviyede olduğu durumlarda mikroorganizmanın orta büyüklükte pellet formu gösterdiği saptanmıştır [136]. Deneysel çalışmalarımızda orta büyüklükte pellet formu içeren ortamda sitrik asit üretiminin daha yüksek olduğu belirlendi.



Şekil 4.19 Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda sitrik asit üretimi için optimum sürenin belirlenmesi (A:sitrik asit üretimi ile ortam pH'sının değişimi, B: Sitrik asit üretimi ile toplam şeker derişiminin değişimi, C:sitrik asit üretimi ile MLSS değişimi) (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, ve başlangıç pH'sı 6, %4 metanol)

İnkübasyon ortamında optimum süre olarak belirlenen 6. günde toplam substrat içeriğinin %60,6'ını, 8. günde ise %66 kullanmışlardır (Çizelge 4.5). İnkübasyon periyodu sonunda ortamda kalan substrat, bu tür bir fermentasyonun kullanıldığı sistemin sürekli olması durumunda kontrol altına alınabilir. Saatte g hücre başına üretilen sitrik asit miktarı (qp) 6. günde 0,009 g/L/h olarak hesaplanmıştır. Toprakten izole edilen *A. niger* suşlarından melas ortamında sitrik asit üretimi üzerine yapılan çalışmada qp değeri 0,036 olarak hesaplanmıştır [133] Bu oran seçilen mikroorganizma suşuna göre farklılık göstermekle birlikte, portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı ortamda hesaplanan oran sitrik asit üretimi için uygundur. Çeşitli mutant türlerde bu oran oldukça yükseltilmiştir. Ancak mutant türlerin kararlılığı yetersiz ve stres durumunda yaşamını devam ettirmesi zordur. Toprak gibi doğal ortamlardan izole edilen türler hem normal şartlarda yaşamını devam ettirmekte hem de ürün sentezi için doğal enzim sistemleri geliştirebilmektedir [144]. Aynı şekilde üretilen g hücre başına kullanılan substrat miktarı (qs), optimum gün olarak belirlenen 6. günde 0,026 g/L/h olarak hesaplanmıştır. Bu değer topraktan izole edilen türlerden elde edilen değere (0,035 g/L/h) göre yakınlık göstermektedir.

Çizelge 4.5. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda zamana bağlı olarak kinetik parametrelerdeki değişim (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L, ve başlangıç pH'sı 6, %4 metanol)

Zaman (gün)	yp/x (g/g)	yp/s (g/g)	yx/s (g/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g/h)	Qx (g l/h)	qs (g/g/h)	% sitrik asit
0,5	0,721	0,058	0,080	0,133	2,308	0,060	0,185	1,040	5,776
1	0,973	0,056	0,058	0,118	2,112	0,041	0,122	0,723	5,604
2	0,614	0,082	0,134	0,104	1,269	0,013	0,170	0,155	8,227
3	0,758	0,161	0,212	0,169	1,054	0,011	0,224	0,065	16,078
4	1,045	0,284	0,272	0,244	0,858	0,011	0,233	0,038	28,398
5	1,209	0,332	0,275	0,256	0,771	0,010	0,212	0,030	33,189
6	1,240	0,330	0,266	0,247	0,749	0,009	0,199	0,026	32,994
7	1,174	0,320	0,273	0,213	0,665	0,007	0,182	0,022	32,021
8	1,146	0,332	0,290	0,196	0,589	0,006	0,171	0,018	33,245

Zamana bağılı olarak üretilen mikroorganizmanın sitrik asit üretim hızının bir göstergesi olan  $yp/x$  değeri optimum süre olarak belirlenen 6. günde 1.240 g/g olarak hesaplanmıştır. Ham nişastanın doğrudan kullanıldığı sitrik asit üretim çalışmasında mutasyonda kullanılan saf kültürün sitrik asit üretim verimliliği  $yp/x$  değeri 1,050 g/g'dan mutasyonla 2,950 g/g'a yükseltilmiştir [136]. İncelenen referanslara göre mikroorganizmanın sitrik asit fermentasyon verimliliği üretim aşamasında kullanılması açısından yeterlidir.

Saatte üretilen sitrik asit derişiminin bir göstergesi olan  $Q_p$  değeri 6. günde optimum değere (0,256 g/L/h) ulaşmıştır. Pancar melasında geliştirilen farklı *A. niger* suşlarının sitrik asit üretim parametrelerinin karşılaştırıldığı çalışmada  $Q_p$  değeri 0,149 (g/L/h) ile 0,290 (g/L/h) arasında farklılık göstermiştir [44]. Bu çalışmada elde ettiğimiz  $Q_p$  değeri bu aralığa düşmektedir. Gram hücrenin saatte kullandığı substrat değerini veren  $q_s$  değeri, mikroorganizmanın sakkarozu 24. saatte kadar maksimum derecede kullandığı ve bundan sonraki sürelerde substrat kullanımının daha minimum seviyede olduğu gözlenmiştir. 2. Günden itibaren sitrik asit üretiminin yükselmesi, mikroorganizmanın substratı öncelikli olarak kendi gelişimi için kullandığı daha sonra ürünü sentezlemede kullandığı söylenebilir

#### 4.3.1. Portakal Hidrolizatı Ve Melas İçerikli Besiyeri Ortamında Sitrik Asit Üretimine Başlangıç pH'sının Etkisi

Sitrik asit üretimi başlangıç pH değeriyle değişebilmektedir. Başlangıç pH değerinin sitrik asit üretimi üzerine etkisi incelendiğinde Kreps çevrimi üzerine doğrudan etki etmemektedir. pH'nın sitrik asit üretimi üzerine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte, enzim aktivitesi üzerine bir etki yapabileceği veya hücre zarının yapısını değiştirerek substrat girişi ve ürünün hücre dışına atışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir [86]. Ayrıca üretimde kullanılan mikroorganizma heterofermentatif bir mikroorganizma olup başlangıç pH değeri ile ürettiği ürün değişebilmektedir. *A. niger*'in düşük pH değerlerinde ürün sentezinin yüksek olmasına rağmen başlangıç pH değerinin 3'ün altına düşürülmesi mikroorganizmanın gelişimini etkilemektedir. Bu nedenle başlangıç pH değeri 4,5, 5, 5,5, 6,0 ve 6,5 seçilmiştir. Daha yüksek başlangıç pH değerlerinde üretilen ürün değişiklik göstermektedir. Başlangıç pH değeri 6,5 ve üzerinde ayarlandığında glukonik asit

veya okzalik asit üretimi yaptığı tespit edilmiştir. Bu pH aralığında sitrik asit analizi yapıldığında sitrik asidin minimum seviyede olduğu tespit edilmiştir [91] Ortamın pH değerine göre üretilen ürünler değişiklik göstermektedir. *A. niger* ile fermentasyon koşullarında pH 3,0-3,5 aralığında sitrik asit, pH 6,0-7,0 aralığında okzalik asit üretilmektedir [53]. Okzalik asit üretiminden sorumlu enzim olan okzaloasetat hidrolaz enzimi  $pH \geq 4,0$ 'da çalışmaktadır [53]. pH 6,0 değerinde başlayan bir fermentasyonda öncelikle okzalik asit oluşmakta ve daha sonra üretilen diğer yan ürünlerle, ortamda  $H^+$  iyonu derişiminin artmasıyla fermentasyon sitrik asit üretimine dönmektedir.

Substrat olarak portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı çalışmada başlangıç pH değerinin belirlenmesi ile ilgili bir çalışma seti kurulmuştur. Çalışma 250 mL'lik erlenlerde yürütülmüştür. Besiyeri ortamının sakkaroz içeriği 140 g/L, metanol içeriği %4, ortam sıcaklığı 30°C ve çalkalama hızı 150 rpm'dir..

Hazırlanan her besiyeri ortamında inkübasyon periyodu boyunca ortam pH'sı değişmiştir (Şekil 4.20A). Şekil 4.20A'da görüleceği gibi en iyi pH değişimi başlangıç pH'sı 6,0 olan koşulda gözlenmiştir. Bu durum sitrik asit üretimi açısından kritik pH değerinin 6,0 olduğunu göstermektedir. pH azalışlarını sıralayacak olursak  $pH 6,0 < pH 5,0 < pH 5,5 < pH 4,5 < pH 6,5$  olur. Aynı zamanda pH azalışlarındaki farklılık sitrik asit üretimi ve *A. niger* açısından başlangıç pH'sının önemli bir yeri olduğunu göstermiştir.

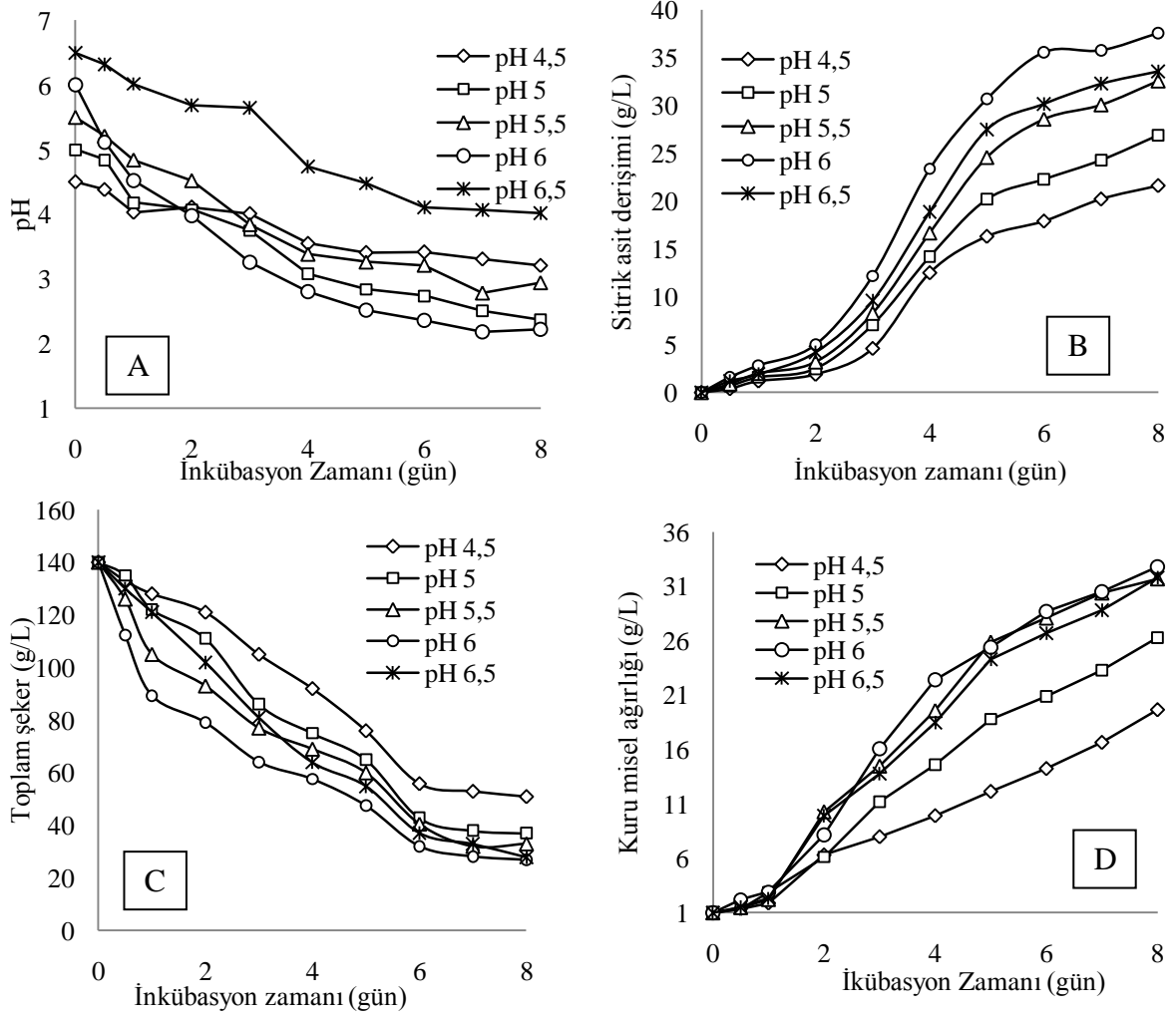
Portakal hidrolizatı ve melasın substrat kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada başlangıç pH'sının belirlenmesi amacıyla kurulan çalışma setinden elde edilen sonuçlar sitrik asit üretimi açısından incelenecek olursa en yüksek sitrik asit üretimi pH 6,0'da belirlenmiştir (Şekil 4.20B). En az sitrik asit üretimi pH 4,5'da gözlenmiştir. Elde edilen sonuçları sitrik asit üretimi açısından sıralayacak olursak sıralama,  $pH 6,0 < pH 6,5 < pH 5,5 < pH 5,0 < pH 4,5$  olduğu görülür. Elde edilen sıralama pH azalışı için elde edilen sıralamadan oldukça farklıdır. Bu durum ortamda  $H^+$  iyonundaki artışın sitrik asit üretimini tetiklediğini göstermektedir. Optimal sitrik asit üretimi pH 6,0'da gözlenmiş olsa da sitrik asitin pH 6,5'da daha az olması kritik pH değerinin pH 6,0 olma ihtimalini arttırmaktadır.

Her farklı başlangıç pH'da mikroorganizmanın misel fizyolojisi ve kuru misel ağılıkları farklılık göstermiştir (Şekil 4.20C). Orta büyüklükte pellet genişliği pH 6'da saptanmıştır. pH 6,5'da pellet genişliği en fazla, pH 4,5'da ise en küçük pellet genişliğine sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca pH 6 ve 6,5'da inkübasyon süresinin son aşamalarında pellet fizyolojisinin dağınık forma dönüştüğü gözlenmiştir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, melas substrat olarak kullanılmış ve topraktan izole edilen saf kültüre mutasyon uygulanmıştır. Elde edilen mutant türlerden sitrik asit üretim kapasitesi yüksek mutant türle yapılan çalışmada başlangıç pH değeri 6 olarak ayarlanmıştır. 6 günlük inkübasyon sonucunda saf kültürün misel fizyolojisinin orta düzeyli pellet genişliğine sahip olduğu, sitrik asit üretimi düşük olan mutant türün fizyolojik yapısının ise yapışkan biyokütle formunda olduğu gözlenmiştir. Yapışkan yapıya sahip olan mutant türün substratı verimli bir şekilde kullandığı ancak kuru misel ağırlığının diğer mutant türler ve saf kültüre göre düşük olduğu belirlenmiştir [60].

Sitrik asit üretimi misel miktarındaki artışla da yakından ilgilidir. Çünkü sitrik asit primer bir metabolittir. Bu nedenle üretilen hücre sayısının artışı sitrik asit üretimini de arttırabilmektedir. Ancak metanol oranı gibi etkenlerin değişmesi durumunda, hücre sayısı arttıkça sitrik asit üretimi artmaz. Bununla ilgili açıklamalar ise metanol oranının etkisi bölümünde ayrıntılı olarak işlenmiştir.

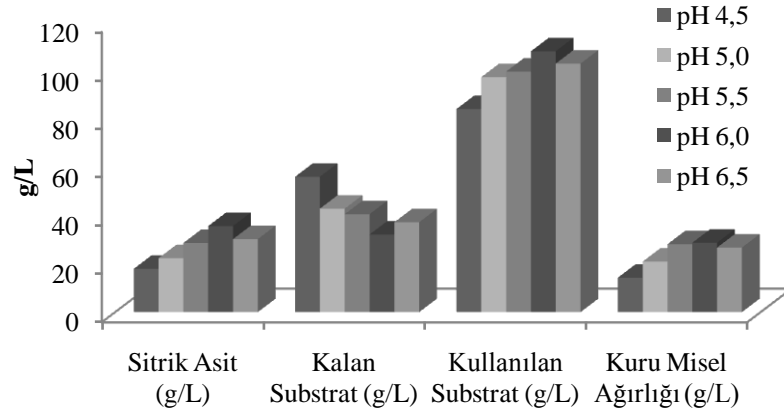
Başlangıç pH'sına bağlı olarak substrat kullanım verimliliği toplam şeker derişimindeki değişimle belirlenebilir. En az substrat kullanımı pH 4,5'da en iyi substrat kullanımı da pH 6,0'da gözlenmiştir. Ancak tüm başlangıç pH koşullarında substratın verimli bir şekilde kullanıldığı söylenebilir (Şekil 4.20D).





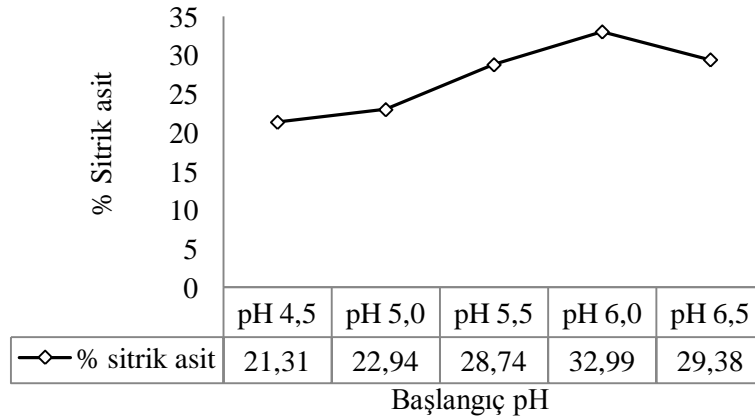
Şekil 4.20 Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sının sitrik asit üretimi üzerine etkisi. (A:İnkübasyon ortamında pH değışimi, B:Sitrik asit derişiminin değışimi, C:Kuru misel ağırlığının değışimi, D:Toplam şeker derişiminin değışimi). (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı % 1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, %4 metanol)

İnkübasyonun 6. gününde elde edilen deney sonuçları toplu halde değerlendirilecek olursa sitrik asit üretimi, substrat kullanımı ve misel üretimi açısından başlangıç pH'sının 6,0 olmasının en optimum koşul olduğu Şekil 4.21'de görülmektedir.



Şekil 4.21. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sının deneysel parametreler üzerine etkisi (İnkübasyon sıcaklığı 30°C'de, çalkalama hızı 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, %4 metanol)

İnkübasyonun 6. gününde elde edilen deney sonuçlarına göre; kullanılan substrat açısından sitrik asit üretim verimliliğine bakıldığında, en düşük %sitrik asit 21,31 ile pH 4,5'da, en yüksek %sitrik asit ise 32,99 ile pH 6,0'da bulunmuştur (Şekil 4.22). Başlangıç pH değeri arttıkça sitrik asit üretim verimliliği artmaktadır. Ancak pH 6,0'dan yüksek başlangıç pH değerlerinde sitrik asit verimliliği düşmektedir.



Şekil 4.22. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sına bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliği (İnkübasyon sıcaklığı 30°C'de, çalkalama hızı 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, %4 metanol)

Başlangıç pH'sının belirlendiği bu çalışmada elde edilen deneysel veriler aracılığıyla hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.6'de verilmiştir. Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmada üretilen biyokütlenin sitrik asit üretim verimliliğini gösteren  $y_{p/x}$  değerleri inkübasyonun 8. gününde pH 4,5'da 0,718, pH 5,0'da 0,714, pH 5,5'da 0,726, pH 6,0'da 0,748, pH 6,5'da 0,723 olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak portakal hidrolizati ve melasın kullanıldığı çalışmada ise  $y_{p/x}$  değerleri inkübasyonun 6. gününde pH 4,5'da 1,018, pH 5,0'da 1,067, pH 5,5'da 1,018, pH 6,0'da 1,240, pH 6,5'da 1,131 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan substrata göre mikroorganizmanın sitrik asit üretim verimliliği değişmektedir. Ayrıca portakal hidrolizati ve melas, sakkarozu göre sitrik asit üretimi açısından daha uygun bir substrattır. Substrat kullanımı başına üretilen sitrik asiti gösteren  $y_{p/s}$  değerleri inkübasyonun 6. gününde pH 4,5'da 0,287, pH 5,0'da 0,229, pH 5,5'da 0,287, pH 6,0'da 0,330, pH 6,5'da 0,294 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen biyokütleyi gösteren  $y_{x/s}$  değerleri inkübasyonun 6. gününde pH 4,5'da 0,276, pH 5,0'da 0,215, pH 5,5'da 0,282, pH 6,0'da 0,266, pH 6,5'da 0,260 olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplanan değerler sakkaroz ortamında elde edilen değerlerden daha yüksektir. Başlangıç pH değişimi üretilen mikroorganizma başına üretilen sitrik asit verimini ve kullanılan substrat başına üretilen ürün değerini etkilemiştir.

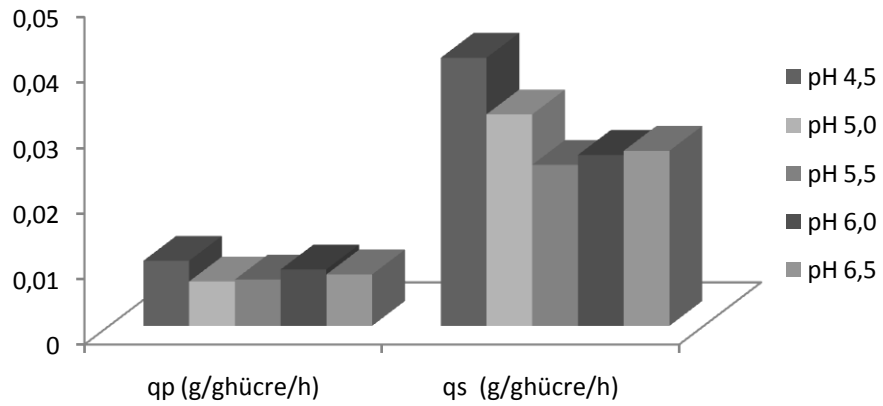
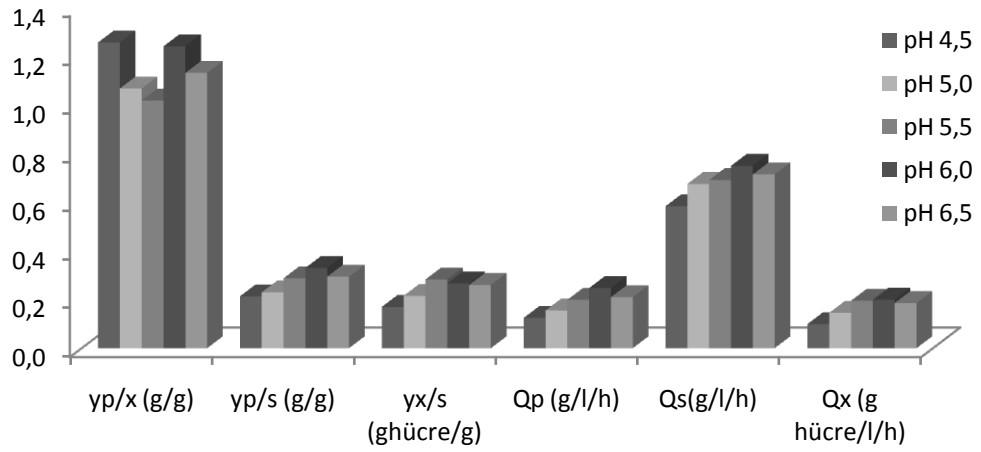
Çizelge 4.6. Portakal hidrolizati ve melas içerikli ortamda başlangıç pH'sının kinetik parametreler üzerine etkisi (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırözü yağı, 140 g/L substrat miktarı toplam şeker temelinde, 200 mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi, %4 metanol)

pH 4,5									
Zaman (Saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
12	0,600	0,064	0,107	0,075	1,167	0,050	0,125	0,778	5,71
24	0,897	0,057	0,064	0,084	1,458	0,037	0,093	0,651	10,00
48	0,311	0,068	0,219	0,067	0,979	0,006	0,215	0,095	10,00
72	0,572	0,132	0,230	0,115	0,875	0,008	0,201	0,060	13,14
96	0,852	0,235	0,276	0,174	0,740	0,009	0,204	0,038	26,04
120	0,950	0,308	0,324	0,205	0,667	0,008	0,216	0,026	25,47
<b>144</b>	<b>1,018</b>	<b>0,287</b>	<b>0,282</b>	<b>0,199</b>	<b>0,691</b>	<b>0,007</b>	<b>0,195</b>	<b>0,025</b>	21,31
168	0,990	0,279	0,281	0,179	0,643	0,006	0,181	0,021	23,22
192	1,028	0,305	0,296	0,170	0,557	0,005	0,165	0,018	24,27

Çizelge 4.6 (devam)

pH 5,0									
Zaman (Saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
12	0,511	0,140	0,274	0,058	0,417	0,043	0,114	0,304	14,00
24	0,557	0,089	0,159	0,067	0,750	0,023	0,120	0,261	8,89
48	0,410	0,086	0,210	0,052	0,604	0,009	0,127	0,099	8,62
72	0,634	0,131	0,207	0,099	0,750	0,009	0,156	0,067	13,15
96	0,973	0,218	0,225	0,148	0,677	0,010	0,152	0,046	21,85
120	1,074	0,269	0,251	0,168	0,625	0,009	0,157	0,033	26,93
<b>144</b>	<b>1,067</b>	<b>0,229</b>	<b>0,215</b>	<b>0,155</b>	<b>0,675</b>	<b>0,007</b>	<b>0,145</b>	<b>0,032</b>	22,94
168	1,043	0,238	0,228	0,145	0,607	0,006	0,139	0,026	23,82
192	1,023	0,261	0,255	0,140	0,536	0,005	0,137	0,020	26,12
pH 5,5									
Zaman (Saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (ghücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre /l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitr ik asit
12	0,600	0,064	0,107	0,075	1,167	0,050	0,125	0,778	6,43
24	0,897	0,057	0,064	0,084	1,458	0,037	0,093	0,651	5,74
48	0,311	0,068	0,219	0,067	0,979	0,006	0,215	0,095	6,81
72	0,572	0,132	0,230	0,115	0,875	0,008	0,201	0,060	13,17
96	0,852	0,235	0,276	0,174	0,740	0,009	0,204	0,038	23,52
120	0,950	0,308	0,324	0,205	0,667	0,008	0,216	0,026	30,75
<b>144</b>	<b>1,018</b>	<b>0,287</b>	<b>0,282</b>	<b>0,199</b>	<b>0,691</b>	<b>0,007</b>	<b>0,195</b>	<b>0,025</b>	28,74
168	0,990	0,279	0,281	0,179	0,643	0,006	0,181	0,021	27,87
192	1,028	0,305	0,296	0,170	0,557	0,005	0,165	0,018	30,47
pH 6,0									
Zaman (Saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (g hücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
12	0,721	0,058	0,080	0,133	2,308	0,060	0,185	1,040	5,78
24	0,973	0,056	0,058	0,118	2,112	0,041	0,122	0,723	5,60
48	0,614	0,082	0,134	0,104	1,269	0,013	0,170	0,155	8,23
72	0,758	0,161	0,212	0,169	1,054	0,011	0,224	0,065	16,08
96	1,045	0,284	0,272	0,244	0,858	0,011	0,233	0,038	28,40
120	1,209	0,332	0,275	0,256	0,771	0,010	0,212	0,030	33,19
<b>144</b>	<b>1,240</b>	<b>0,330</b>	<b>0,266</b>	<b>0,247</b>	<b>0,749</b>	<b>0,009</b>	<b>0,199</b>	<b>0,026</b>	32,99
168	1,174	0,320	0,273	0,213	0,665	0,007	0,182	0,022	32,02
192	1,146	0,332	0,290	0,196	0,589	0,006	0,171	0,018	33,24
pH 6,5									
Zaman (Saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (g hücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g /L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$Q_x$ (g hücre/l/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)	%Sitrik asit
12	0,779	0,120	0,154	0,100	0,833	0,065	0,128	0,541	12,00
24	0,824	0,101	0,123	0,080	0,792	0,034	0,097	0,340	10,11
48	0,423	0,111	0,261	0,088	0,792	0,009	0,207	0,080	11,05
72	0,696	0,163	0,234	0,133	0,819	0,010	0,192	0,059	16,27
96	1,022	0,249	0,243	0,197	0,792	0,011	0,193	0,043	24,87
120	1,132	0,324	0,286	0,229	0,708	0,009	0,203	0,029	32,35
<b>144</b>	<b>1,131</b>	<b>0,294</b>	<b>0,260</b>	<b>0,210</b>	<b>0,714</b>	<b>0,008</b>	<b>0,185</b>	<b>0,027</b>	29,38
168	1,122	0,302	0,269	0,192	0,637	0,007	0,171	0,022	30,19
192	1,057	0,300	0,284	0,175	0,583	0,006	0,166	0,018	30,00

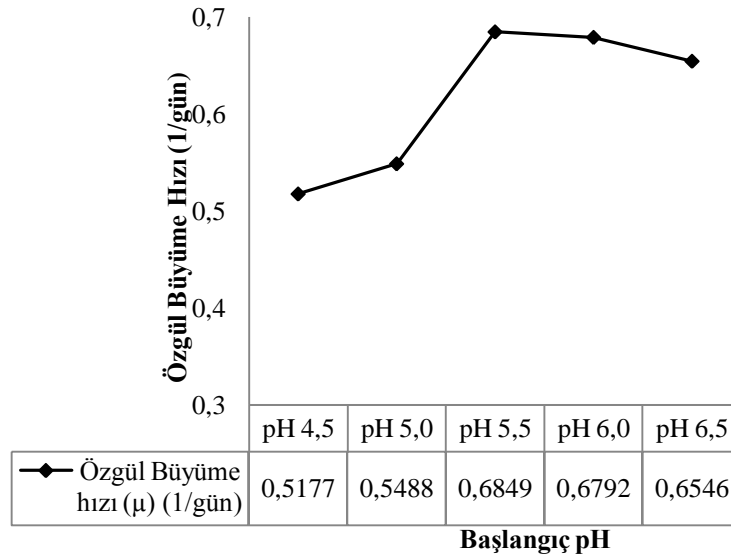
İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametreler başlangıç pH'larına göre grafiklendirilmiştir (Şekil 4.23). Elde edilen grafikte optimum başlangıç pH'sının hem ürün üretimi hem de substrat kullanımı açısından pH 6,00 olduğu belirlenmiştir. Ancak düşük pH değerlerinde mikroorganizma başına sitrik asit üretimi pH 6,0'da elde edilen sonuçlara oldukça yakındır. Mikroorganizma başına üretilen sitrik asit miktarı ( $q_s$ ) pH 6,0'da diğer başlangıç pH'larına göre düşük olsa kullanılan substrat başına en yüksek sitrik asit ( $Q_s$ ) üretimi pH 6,0'da görülmüştür. Düşük pH değerlerinde sitrik asit üretiminin daha verimli görünse de üretilen biyokütle miktarı daha düşük olduğu için verim oldukça düşük olmaktadır.



Şekil 4.23. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda inkübasyonun 6. gününde, başlangıç pH'sının kinetik parametreler üzerine etkisi (30°C'de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırözü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, %4 metanol)

Özgül büyüme hızı, ortam pH değerinden oldukça etkilenmektedir. Bu durum Şekil 4.24’de de görülebilir. Düşük başlangıç pH değerlerinde mikrobiyal üreme oldukça düşüktür. pH değeri arttıkça özgül büyüme hızı artmaktadır. Bu durum hücresel yapının değişmesi olarak açıklanabilir. Çünkü düşük pH değerlerinde ortamda bulunan H<sup>+</sup> iyonu derişiminin artışı hücre zarında değişikliğe neden olur. Sakkaroz ortamında pH 6,0’da özgül büyüme hızı diğer ortamlara göre yüksek olurken, portakal hidrolizatı ve melas ortamında pH 5,5’da en yüksek değere ulaşmıştır. Bunun nedeni ise substrat kaynaklarından ve substrat içeriğinden kaynaklı olabilir. Ayrıca portakal hidrolizat ve melasın her inkübasyon sonucunda ara ürünlerin HPLC-MS ile belirlenmesi gereklidir. Bu çalışmada bu analizler teknik imkânsızlıklardan dolayı yapılamamıştır.

5 Farklı pH değerine ayarlanan fermentasyon ortamlarında optimum inkübasyon süresi olarak belirlenen 6. günde sitrik asit üretiminin optimum seviyesinin, optimum substrat kullanımı ve üretilen optimum kuru misel ağırlığının pH 6’da olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.43). Bundan sonraki çalışmalarda hidrolizatın hazırlanması ve melasın ön işlemleri sırasında ortam pH değerinin nötr hale getirilmesi sırasında, ortam pH’sı 6,0’a ayarlanmıştır.



Şekil 4.24. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç pH’sının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (30°C’de, 150 rpm, 100 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırozü yağı, substrat miktarı toplam şeker temelinde 140 g/L, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L, %4 metanol)

#### 4.3.2. Portakal Hidrolizatı Ve Melas İçerikli Besiyeri Ortamında Sitrik Asit Üretimine Başlangıç Toplam Şeker Derişiminin Etkisi

Çalışmada başlangıç pH'sı 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L olarak sabit tutulmuştur. İnkübasyonun 6. gününde 100g/L toplam şeker derişiminde pH 3,01, sitrik asit 31,8 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 79 g/L ve kuru misel ağırlığı 24,3 g/L olduğu bulunmuştur. 140 g/L toplam şeker derişiminde pH 2,36, sitrik asit 35,6 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 108 g/L ve kuru misel ağırlığı 28,7 g/L olduğu bulunmuştur. 180 g/L toplam şeker derişiminde pH 3,84, sitrik asit 18,8 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 132 g/L ve kuru misel ağırlığı 42,7 g/L olarak bulunmuştur.

Kullanılan mikroorganizma tür ve suşuna ve fermentasyon materyaline göre optimum şeker derişimi değişiklik arz etmektedir. Her araştırmacının kullandığı melas türü ve materyale göre fermentasyon işleminde kullanacağı şeker optimum derişimi değişmektedir. 50 g/L'den düşük şeker derişimlerinde sitrik asit üretilmemektedir [11, 28]. Literatürde optimum şeker derişiminin 100 g/L ve 140 g/L şeker derişimleri arasında yoğunlaşması nedeniyle başlangıç toplam şeker derişimini 100 g/L'den başlayarak deneyler yapılmış ve 180 g/L'de tamamlanmıştır. Yüksek derişimdeki substrat tarafından oluşturulan substrat inhibisyonu gibi metabolik kontrol mekanizmasından ileri geldiği düşünölmektedir [28].

Substrat olarak portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı çalışmada başlangıç substrat derişimi belirlenmesi için hazırlanan erlenlerde pH azalışı Şekil 4.44A'da verilmiştir. Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmada substrat derişimine bağlı olarak pH azalışı 100g/L toplam şeker derişiminde 2,97, 140 g/L toplam şeker derişiminde 2,12 ve 180 g/L toplam şeker derişiminde ise 3,67 olduğu belirlenmişti. Portakal hidrolizatı ve melasın substrat olarak kullanıldığı çalışmada ise pH azalışı 100g/L toplam şeker derişiminde 3,01, 140 g/L toplam şeker derişiminde 2,36 ve 180 g/L toplam şeker derişiminde ise 3,87 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.25A). Genel olarak her iki çalışmada da pH azalışı birbirine yakındır. Ancak sakkarozun substrat olarak kullanıldığı çalışmada pH azalışı daha yüksektir. Bu durum ortamda üretilen

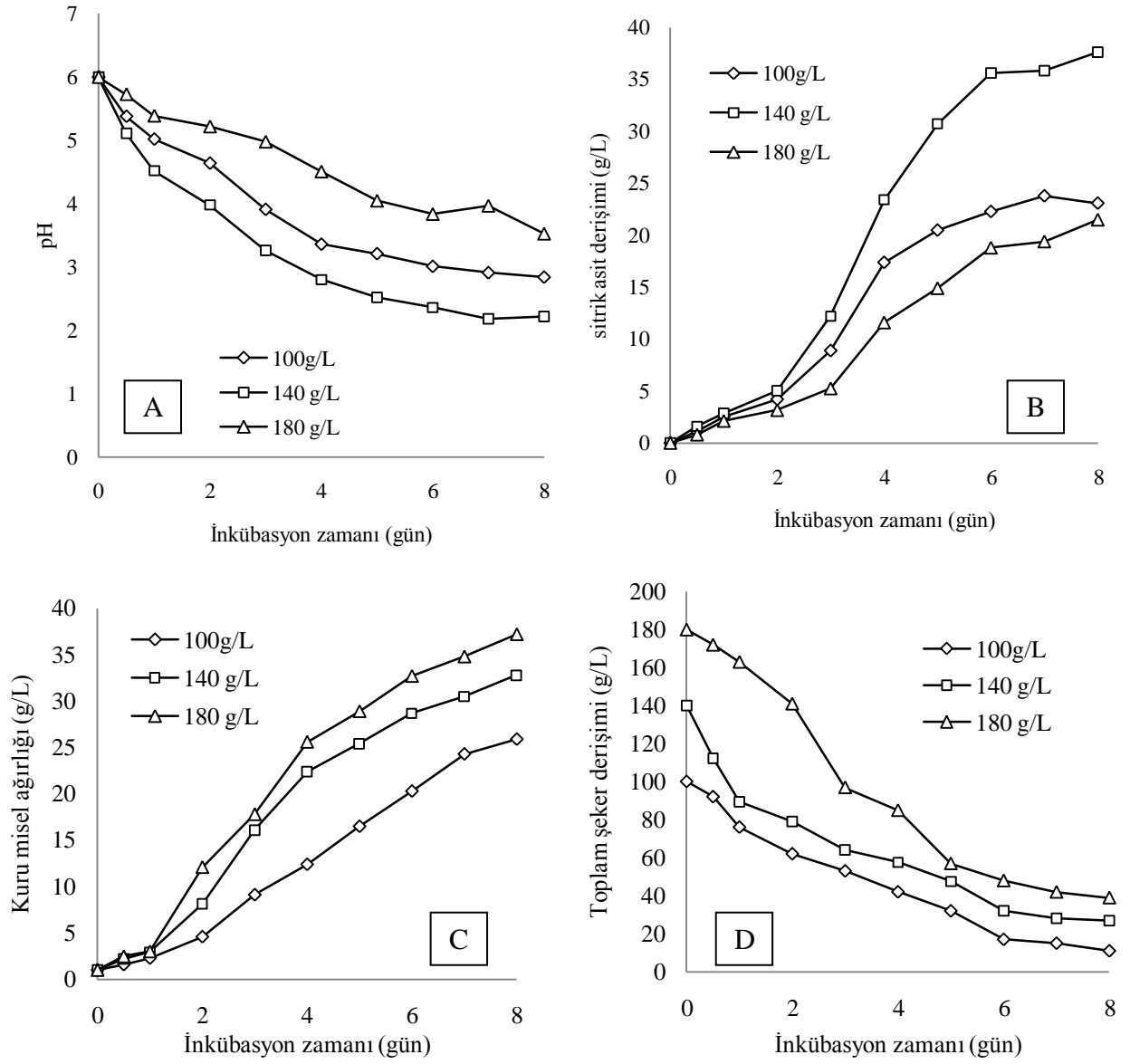
sitrik asit verimliliğinin yüksek olmasını gerektirir. Ancak sitrik asit üretimi açısından da portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı çalışmada sitrik asit üretimi daha yüksektir.

Substrat derişimine bağılı olarak kuru misel ağırlığı da değışim göstermiştir. Şekil 4.25C’de görüldüğü gibi en yüksek kuru misel ağırlığı 180 g/L’de, en düşük kuru misel ağırlığı ise 100 g/L’de gözlenmiştir.

Başlangıç şeker derişimi mikroorganizma misel fizyolojisini de etkilemektedir. Bu nedenle inkübasyon periyodu boyunca oluşan misel morfolojisi gözlenmiştir. Yüksek başlangıç substrat derişimlerinde misel morfolojisinin bozuk pellet yapısında olduğı, düşük başlangıç substrat derişimlerinde ise geniş pellet genişliğine sahip olduğı saptanmıştır [133]. Yüksek substrat derişimlerinde KMA’nın ve kullanılan toplam şeker değerinin diğer ortamlara göre daha yüksek olduğı ancak sitrik asit üretiminin daha düşük olduğı Şekil 4.25’de görülmektedir. Düşük substrat derişimlerinde okzalik asit oluşturması nedeniyle sitrik asit verimi düşer. Yüksek substrat derişimlerinde polioller oluşmakta ve sonuçta sitrik asit üretimi azalmaktadır [12].

Toplam şeker derişiminin zamana bağılı olarak azalışı Şekil 4.25D’de verilmektedir. Buna göre bu çalışmada hazırlanan başlangıç toplam şeker içeriğı farklı üç koşulda da substrat verimli bir şekilde kullanılmıştır. Ancak sitrik asit üretim verimliliğı birbirinden farklılık göstermiş ve bu durumun misel fizyolojisi ile de yakından ilgili olduğı görülmüştür. Bu yüzden 180 g/L başlangıç toplam şeker derişiminde substrat en verimli şekilde kullanılmış olsa da sitrik asit üretimi açısından 140 g/L başlangıç toplam şeker derişiminde sitrik asit üretimi daha yüksektir.

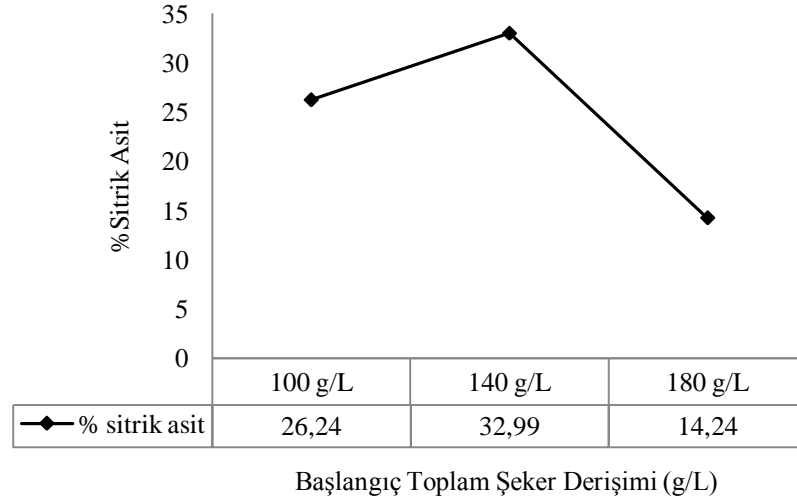




Şekil 4.25. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç substrat derişiminin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (Başlangıç pH'sı 6,0, %4 metanol oranı, 30°C ortam sıcaklığı, 150 rpm çalkalama hızı, 100 mL çalışma hacmi, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırözü yağı, 200 mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi)

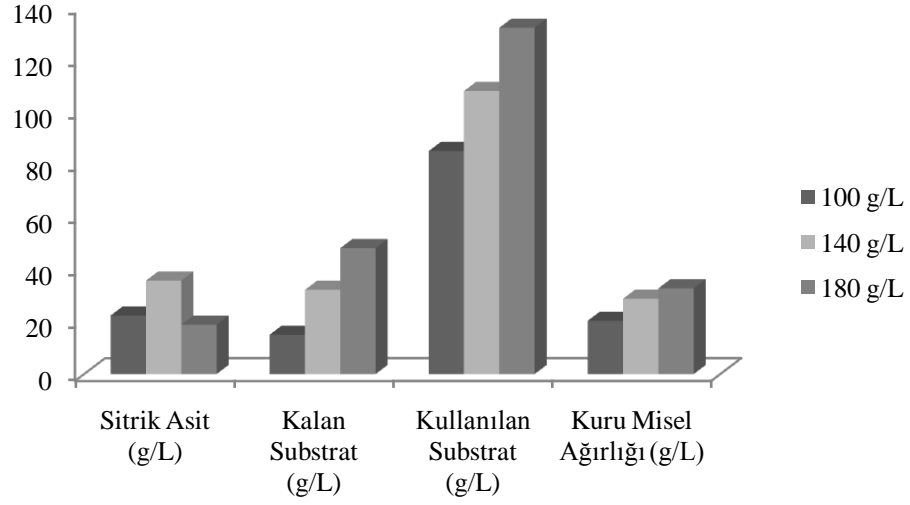
Substrat derişiminin sitrik asit derişimi üzerine etkisi Şekil 4.25D'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek sitrik asit üretimi 140 g/L toplam şeker derişiminde en düşük sitrik asit üretimi ise 180 g/L toplam şeker derişiminde tespit edilmiştir. İnkübasyonun 6. gününde substrat derişimine bağlı olarak kullanılan

substrat temelinde sitrik asit verimliliği Şekil 4.26’de verilmiştir. Her iki şekilde de en uygun başlangıç substrat derişimi 140 g/L toplam şeker derişimi olduğu görölmektedir.



Şekil 4.26. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişime bağlı olarak sitrik asit üretim verimliliği (Başlangıç pH’sı 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Şekil 4.27’de inkübasyonun 6. gününde elde edilen deney sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. Buna göre substrat kullanımı ve misel üretimi en çok 180 g/L başlangıç toplam şeker derişiminde olmuştur. En yüksek sitrik asit üretimi ise 140 g/L toplam şeker derişiminde gözlenmiştir.



Şekil 4.27. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin deneysel parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH'sı 6,0, %4 metanol oranı, 150 rpm çalkalama hızı, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırözü yağı, 200 mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi)

Başlangıç toplam şeker derişiminin belirlendiği bu çalışmada elde edilen deneysel veriler aracılığıyla hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.7'de verilmiştir. Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmada üretilen biyokütlenin sitrik asit üretim verimliliğini gösteren  $y_{p/x}$  değerleri inkübasyonun 8. gününde 100g/L toplam şeker derişiminde 0,586, 140g/L'de 0,713, 180 g/L'da 0,231 hesaplanmıştır. Substrat olarak portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı çalışmada ise  $y_{p/x}$  değerleri inkübasyonun 6. gününde 100g/L toplam şeker derişiminde 1,099, 140g/L'de 1,240, 180 g/L'da 0,557 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, portakal hidrolizatı ve melas sakkarozu göre sitrik asit üretimi için daha uygun bir substrattır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit olan  $y_{p/s}$  değerleri 100 g/L başlangıç toplam şeker içeriği ortamında 0,269, 140 g/L'de 0,330, 180 g/L'da 0,141 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen biyokütleyi veren  $y_{x/s}$  değerleri 100 g/L başlangıç toplam şeker içeriği ortamında 0,245, 140 g/L'de 0,266, 180 g/L'da 0,252 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit verimliliğini gösteren % sitrik asit değerleri; 100 g/L başlangıç toplam şeker içeriği ortamında 26,87, 140 g/L'de 32,99, 180 g/L'da 14,06 hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda sitrik asit verimliliğinin hem biyokütle hem de substrat tüketimi açısından başlangıç substrat derişiminin 140 g/L olması gerekliliği

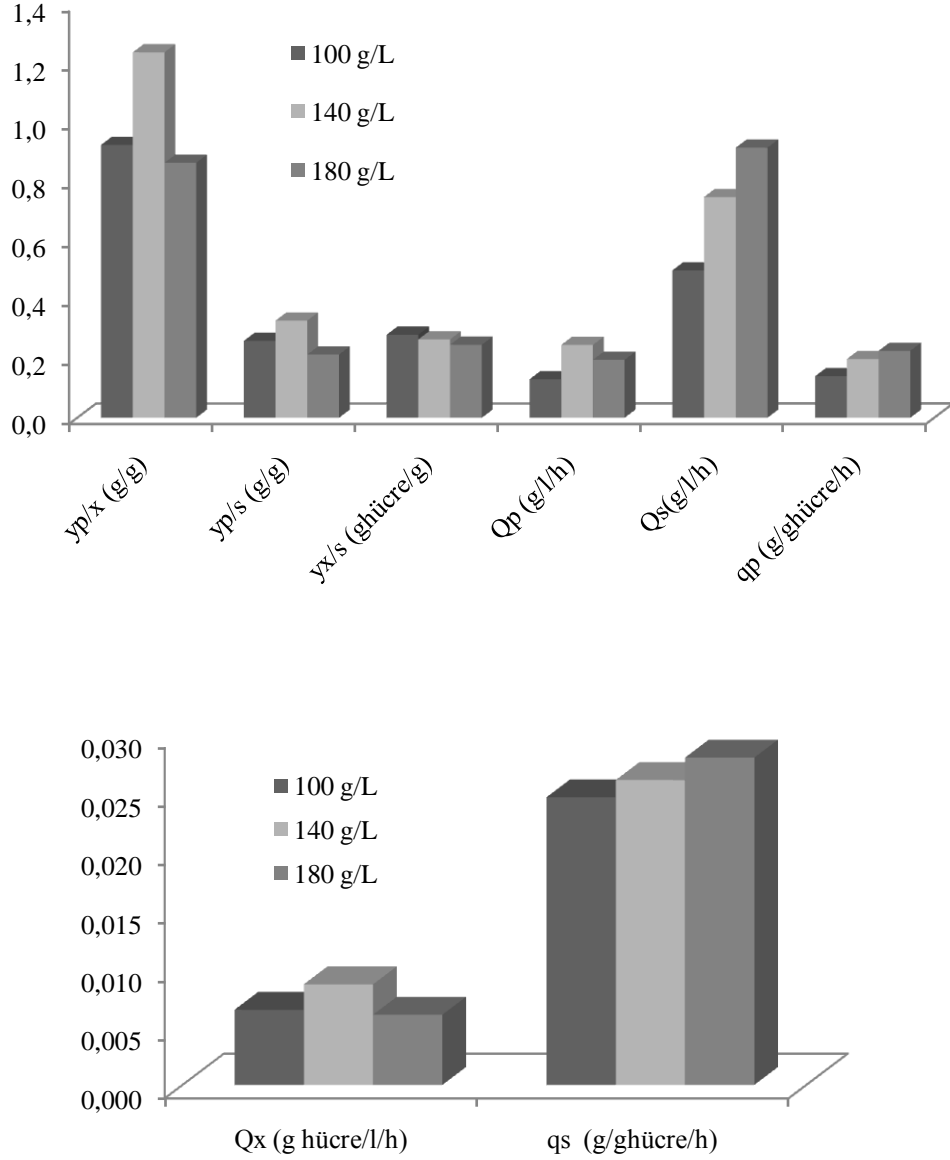
bulunmuştur. Ayrıca portakal hidrolizatı ve melasın substrat olarak kullanıldığı çalışmada elde edilen sonuçlar, sakkarozun substrat olarak kullanıldığı çalışmadan elde edilen sonuçlardan daha yüksektir.

Saatte g hücre başına üretilen sitrik asit miktarı (qp) 140 g/L toplam şeker derişiminde 6. günde 0,0096 g/L/h olarak hesaplanmıştır. Topraktan izole edilen *A. niger* funguslardan melas ortamında sitrik asit üretimi üzerine yapılan çalışmada qp değeri 0,036 olarak hesaplanmıştır [133]. Bu oran mikroorganizma suşuna göre farklılık göstermekle birlikte, portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı bir ortamda hesaplanan oran sitrik asit üretimi için uygundur. Çeşitli mutant türlerde bu oran oldukça yükseltilmiştir. Ancak mutant türlerin kararlılığı yetersiz ve stres durumunda yaşamını devam ettirmesi zordur. Aynı Şekilde üretilen g hücre başına kullanılan substrat miktarı (qs), optimum gün olarak belirlenen 6. günde 0,026 g/L/h olarak hesaplanmıştır. Bu değer topraktan izole edilen türlerden elde edilen değere (0,035 g/L/h) göre yakınlık göstermektedir.

Çizelge 4.7. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH'sı 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

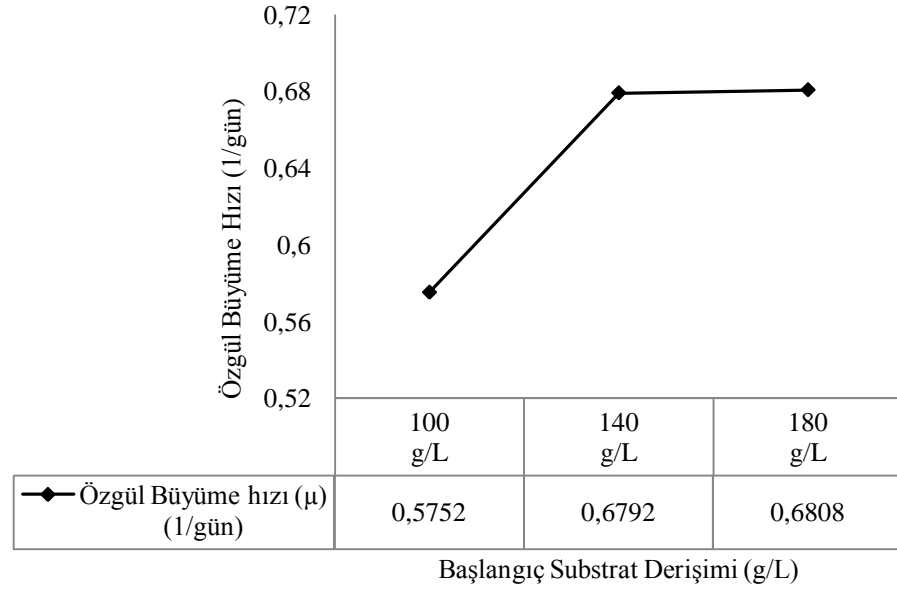
100g/L									
Zaman (Saat)	yp/x (g/g)	yp/s (g/g)	yx/s (g hücre/g)	Qp (g /L/h)	Qs (g /L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
12	0,692	0,138	0,199	0,092	0,667	0,058	0,133	0,419	13,75
24	1,105	0,105	0,095	0,105	1,000	0,046	0,095	0,437	10,54
48	0,915	0,111	0,121	0,088	0,792	0,019	0,096	0,172	11,08
72	0,976	0,189	0,194	0,124	0,653	0,014	0,127	0,072	18,94
96	1,403	0,300	0,214	0,181	0,604	0,015	0,129	0,049	30,00
120	1,242	0,301	0,243	0,171	0,567	0,010	0,138	0,034	30,15
<b>144</b>	<b>1,099</b>	<b>0,269</b>	<b>0,245</b>	<b>0,155</b>	<b>0,576</b>	<b>0,008</b>	<b>0,141</b>	<b>0,028</b>	<b>26,87</b>
168	0,979	0,280	0,286	0,142	0,506	0,006	0,145	0,021	28,00
192	0,892	0,260	0,291	0,120	0,464	0,005	0,135	0,018	25,96
140g/L									
Zaman (Saat)	yp/x (g/g)	yp/s (g/g)	yx/s (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/ghücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
12	0,721	0,058	0,080	0,133	2,308	0,060	0,185	1,040	5,78
24	0,973	0,056	0,058	0,118	2,112	0,041	0,122	0,723	5,60
48	0,614	0,082	0,134	0,104	1,269	0,013	0,170	0,155	8,23
72	0,758	0,161	0,212	0,169	1,054	0,011	0,224	0,065	16,08
96	1,045	0,284	0,272	0,244	0,858	0,011	0,233	0,038	28,40
120	1,209	0,332	0,275	0,256	0,771	0,010	0,212	0,030	33,19
<b>144</b>	<b>1,240</b>	<b>0,330</b>	<b>0,266</b>	<b>0,247</b>	<b>0,749</b>	<b>0,009</b>	<b>0,199</b>	<b>0,026</b>	<b>32,99</b>
168	1,174	0,320	0,273	0,213	0,665	0,007	0,182	0,022	32,02
192	1,146	0,332	0,290	0,196	0,589	0,006	0,171	0,018	33,24
180g/L									
Zaman (Saat)	yp/x (g/g)	yp/s (g/g)	yx/s (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
12	0,323	0,100	0,310	0,067	0,667	0,027	0,207	0,269	10,00
24	0,704	0,125	0,177	0,088	0,708	0,029	0,125	0,235	12,47
48	0,261	0,081	0,310	0,066	0,813	0,005	0,252	0,067	8,10
72	0,295	0,063	0,214	0,073	1,153	0,004	0,247	0,065	6,33
96	0,453	0,122	0,269	0,121	0,990	0,005	0,267	0,039	12,21
120	0,516	0,121	0,235	0,124	1,025	0,004	0,241	0,035	12,11
<b>144</b>	<b>0,575</b>	<b>0,142</b>	<b>0,248</b>	<b>0,131</b>	<b>0,917</b>	<b>0,004</b>	<b>0,227</b>	<b>0,028</b>	<b>14,24</b>
168	0,557	0,141	0,252	0,115	0,821	0,003	0,207	0,024	14,06
192	0,578	0,152	0,264	0,112	0,734	0,003	0,194	0,020	15,25

Substrat kaynağı olarak portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı ortamda inkübasyonun 6. gününde, başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi sütun grafik şeklinde Şekil 4.28’de değerlendirilmiştir.



Şekil 4.28. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH’sı 6,0, metanol oranı %4, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Kuru misel ağırlıklarının zamana bağlı grafiğinden hesaplanan özgül büyüme hızları çizgi grafikte Şekil 4.29'de gösterilmiştir. Substrat derişimi arttıkça özgül büyüme hızı da artmış ancak 140 g/L başlangıç substrat derişiminden sonra özgül büyüme hızında önemli bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.29. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda başlangıç toplam şeker içeriğinin özgül büyüme hızı üzerine etkisi (Başlangıç pH'sı 6,0, metanol oranı %4, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Deney sonuçları incelendiğinde maksimum sitrik asit üretiminin 140g/L toplam şeker temelinde substrat derişiminde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.25B). Daha düşük ve daha yüksek substrat derişimlerinde sitrik asit üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Demirel ve ark (2005) yaptıkları çalışmada substrat olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda *A. niger* ile sitrik asit üretimi üzerine başlangıç şeker derişiminin 140 g/L değerinde maksimum sitrik asit üretimine ulaştığını gözlemişlerdir [65]. Aynı şekilde Ali ve ark.(2001) topraktan izole ettikleri *A. niger* suşları ile melas ortamında sitrik asit üzerine başlangıç şeker derişimini 140 g/L olarak saptamışlardır [133].

#### 4.3.3. Portakal Hidrolizatı Ve Melas İçerikli Besiyeri Ortamında Sitrik Asit Üretimine Metanol oranının Etkisi

Substrat olarak portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı ortamda metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada elde edilen sonuçlar yardımıyla sitrik asit, ortam pH değişimi, toplam şeker derişimi ve kuru misel ağırlıklarının zamanla değişimleri grafiğe geçirilmiştir.

Çalışmada ortam sıcaklığı 30°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L olarak sabit tutulmuştur. İnkübasyonun 6. gününde %3 metanol içeren besiyerinde pH 2,86, sitrik asit 22,5 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 96 g/L ve kuru misel ağırlığı 23,5 g/L olduğu bulunmuştur. %4 metanol içeren besiyerinde pH 2,36, sitrik asit 35,6 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 108 g/L ve kuru misel ağırlığı 28,7 g/L olduğu bulunmuştur. %5 metanol içeren besiyerinde pH 4,02, sitrik asit 11,6 g/L, kullanılan toplam şeker derişimi 89 g/L ve kuru misel ağırlığı 15,6 g/L olarak bulunmuştur.

%4 metanol oranı içeren ortamda elde edilen sitrik asit derişimi (35,6 g/L), %3 metanol oranı (22,5 g/L) ve %5 metanol oranı (11,6 g/L) içeren ortamda elde edilen sitrik asit derişiminden daha yüksektir.

Şekil 4.30A'da, %3, %4, %5 metanol içeriğine sahip besiyerlerinde zamana bağlı ortam pH değerleri verilmiştir. pH azalışı sitrik asit üretimi ile doğru orantılı olduğu için en uygun pH azalışı %4 metanol içeriğine sahip besiyerinde görülmüştür.

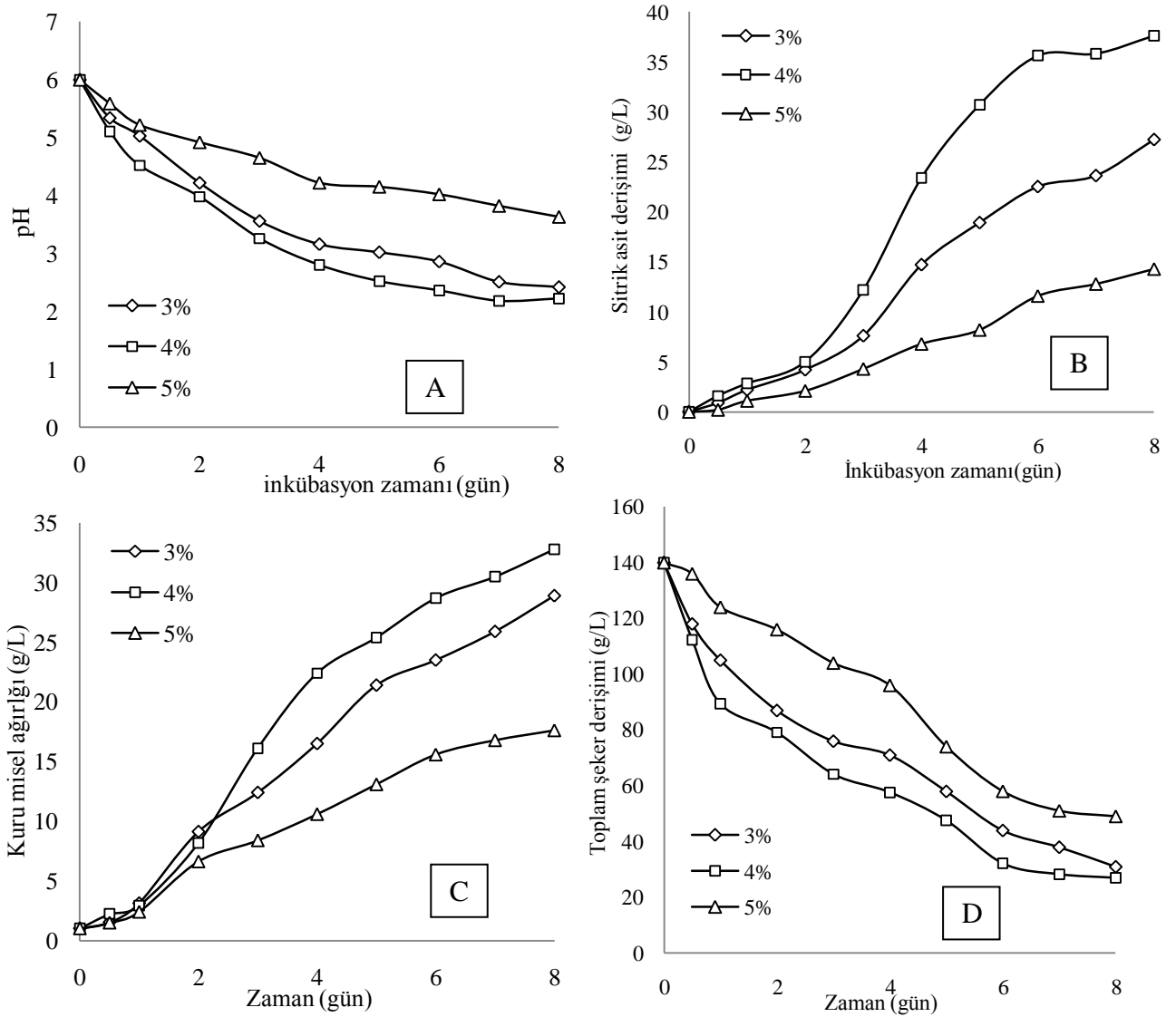
Metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisi besiyerler ortamında deneysel olarak belirlenen sitrik asit derişiminden de görülmektedir. Sakkaroz içerikli substrat ortamında metanol ile ilgili kısımda metanol oranının etkisi ile ilgili gerekli açıklamalar yapılmıştır. Metanol derişimlerine göre sitrik asit derişiminin zamana bağlı garfği Şekil 4.30B'de verilmiştir. Buna göre en yüksek sitrik asit üretimi %4 metanol oranında, en düşük sitrik asit üretimi ise %5 metanol oranı da belirlenmiştir.

Metanol oranı misel gelişimini de etkilemektedir. Metanol oranına göre kuru misel ağırlığının zamana bağlı değişimi Şekil 5.30C'de verilmiştir. Buna göre %4



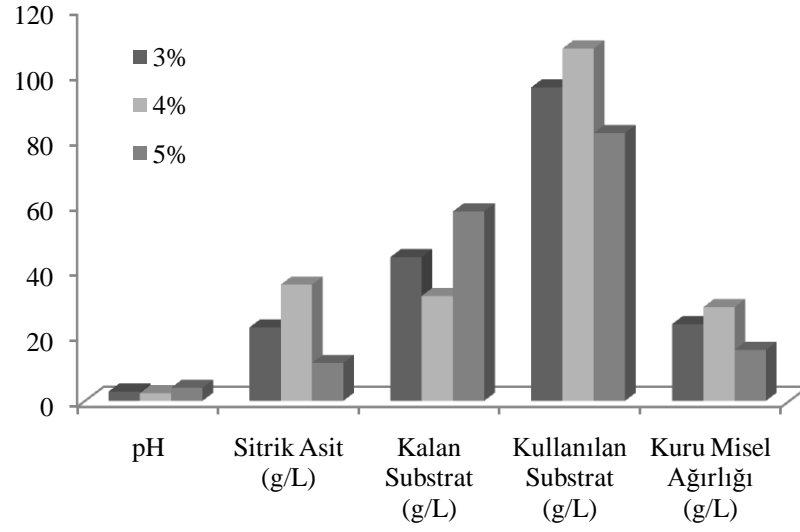
metanol oranı misel gelişimini de tetiklemektedir. Çünkü %4 metanol oranında gelişen kuru misel ağırlığı %3 metanol oranınınkinden daha büyüktür. Ancak %5 metanol oranında kuru misel ağırlığındaki değişim diğer koşullara göre oldukça düşüktür.

Toplam şeker derişiminin zamana bağıli değişimi Şekil 4.30D’de verilmiştir. Buna göre düşük metanol derişimlerinde mikrobiyal gelişime de bağıli olarak substrat kullanımını da değişmektedir. %5 metanol oranı ortamda toksik etki göstermiş olabilir. Bundan dolayı besiyerinin verimli kullanılmamış olması sözkonusu olabilir.



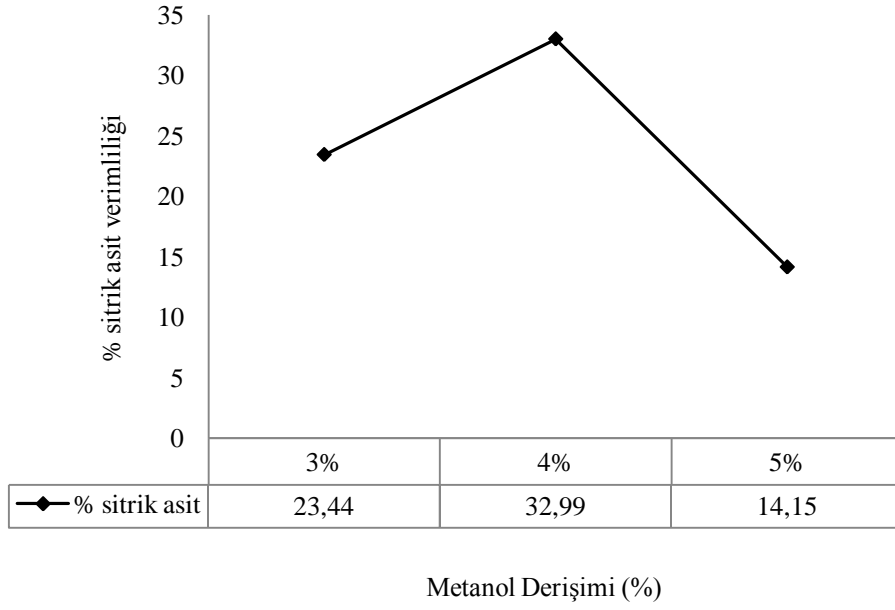
Şekil 4.30. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının ortam sitrik asit üretimine etkisi. (A:İnkübasyon ortamında pH değışimi, B:Sitrik asit derişiminin değışimi, C:Kuru misel ağırlığının değışimi, D:Toplam şeker derişiminin değışimi). (150 rpm çalkalama hızı, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, %1 mikroorganizma oranı, %2 mısırozü yağı, 200 mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi, başlangıç pH'sı 6,0, 140g/L başlangıç toplam şeker derişimi)

Metanol oranına göre inkübasyonun 6. gününde elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilecek olursa %4 metanol oranı sitrik asit üretimi için en uygun koşuldur (Şekil 4.31). Sitrik asit derişimi, kuru misel ağırlığı ve kullanılan substrat derişimi açısından metanol derişimleri sıralanacak olursa %5<%3<%4 şeklinde olduğu Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de de görülebilir.



Şekil 4.31. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının deneysel parametreler üzerine etkisi (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L)

Kullanılan substrat başına sitrik asit üretim verimliliği Şekil 4.32'de gösterilmiştir. Elde edilen grafik diğer koşullarda elde edilen sonuçlara paralellik göstermiştir. Buna göre maksimum sitrik asit verimliliği %4 metanol oranında hesaplanmıştır.



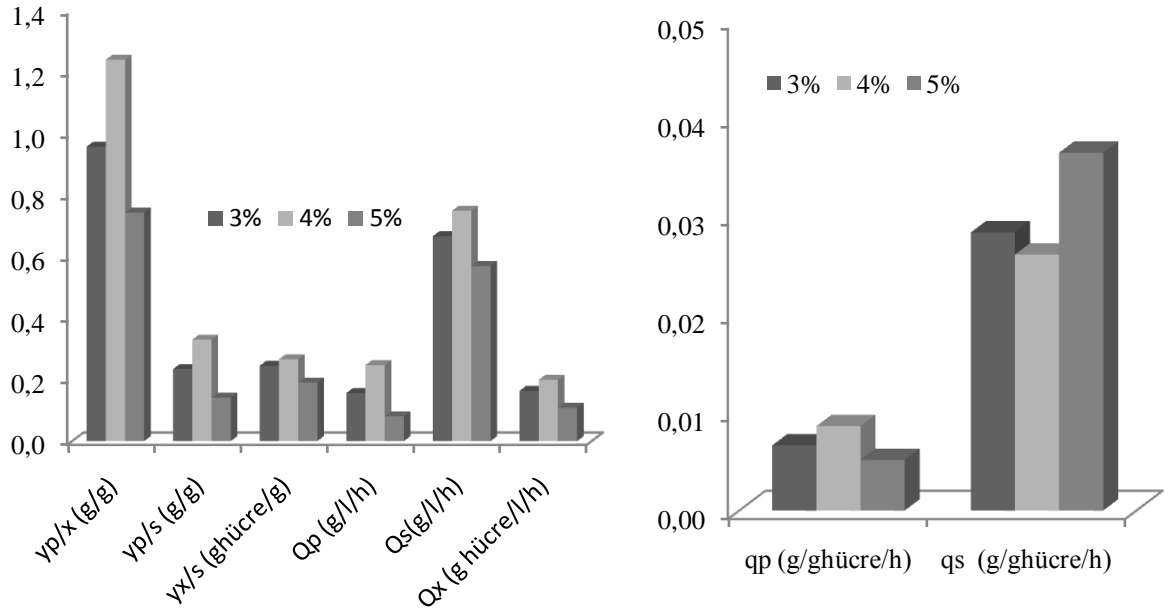
Şekil 4.32. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol derişime bağı olarak sitrik asit üretim verimliliğı (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L)

Metanol oranının belirlendiğı bu çalışmada elde edilen deneysel veriler aracılığıyla hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bu deneysel çalışmada üretilen biyokütlenin sitrik asit üretimini veren  $y_{p/x}$  değerleri inkübasyonun 6. gününde %3 metanol oranında 0,957, %4 metanol oranında 1,240, %5 metanol oranında 0,744 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit olan  $y_{p/s}$  değerleri %3 metanol oranında 0,234, %4 metanol oranında 0,330, %5 metanol oranında 0,141 hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen biyokütleyi veren  $y_{x/s}$  değerleri %3 metanol oranında 0,245, %4 metanol oranında 0,266, %5 metanol oranında 0,189 hesaplanmıştır. Diğer kinetik parametrelerin zamana bağı değışimi Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bu hesaplamalar sonucunda sitrik asit verimliliğinin hem biyokütle hem de substrat tüketimi açısından metanol oranının %4 olması gerekliliğı bulunmuştur.

Çizelge 4.8. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının kinetik parametreler üzerine etkisi (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L)

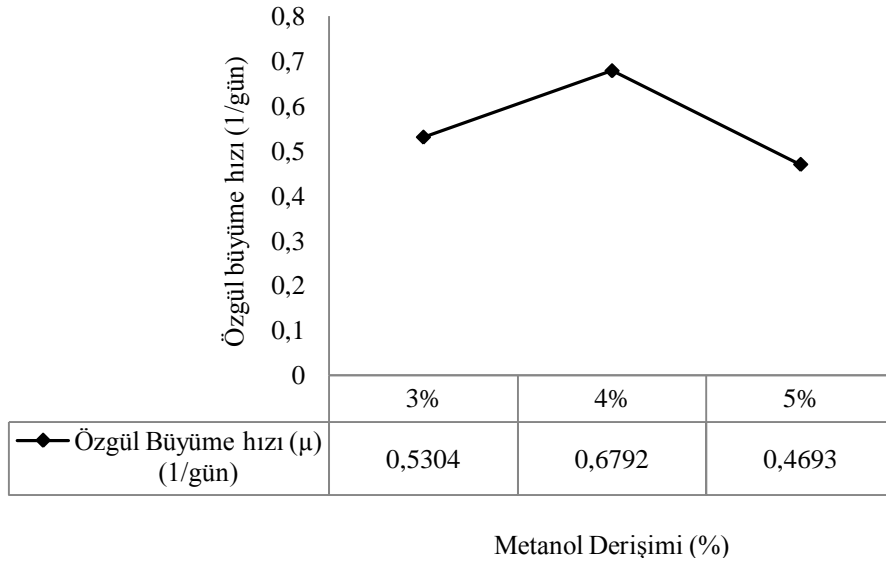
%3									
Zaman (Saat)	yp/x (g/g)	yp/s (g/g)	yx/s (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
12	0,592	0,041	0,069	0,075	1,833	0,049	0,127	1,206	4,09
24	0,705	0,063	0,089	0,092	1,458	0,029	0,130	0,467	6,29
48	0,461	0,079	0,172	0,088	1,104	0,010	0,190	0,121	7,92
72	0,613	0,119	0,194	0,106	0,889	0,009	0,172	0,072	11,88
96	0,891	0,213	0,239	0,153	0,719	0,009	0,172	0,044	21,30
120	0,883	0,230	0,261	0,158	0,683	0,007	0,178	0,032	23,05
<b>144</b>	<b>0,957</b>	<b>0,234</b>	<b>0,245</b>	<b>0,156</b>	<b>0,667</b>	<b>0,007</b>	<b>0,163</b>	<b>0,028</b>	<b>23,44</b>
168	0,911	0,231	0,254	0,140	0,607	0,005	0,154	0,023	23,14
192	0,941	0,250	0,265	0,142	0,568	0,005	0,151	0,020	24,95
%4									
Zaman (Saat)	yp/x (g/g)	yp/s (g/g)	yx/s (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/ghücre/h)	%sitrik asit
12	0,721	0,058	0,080	0,133	2,308	0,060	0,185	1,040	5,78
24	0,973	0,056	0,058	0,118	2,112	0,041	0,122	0,723	5,60
48	0,614	0,082	0,134	0,104	1,269	0,013	0,170	0,155	8,23
72	0,758	0,161	0,212	0,169	1,054	0,011	0,224	0,065	16,08
96	1,045	0,284	0,272	0,244	0,858	0,011	0,233	0,038	28,40
120	1,209	0,332	0,275	0,256	0,771	0,010	0,212	0,030	33,19
<b>144</b>	<b>1,240</b>	<b>0,330</b>	<b>0,266</b>	<b>0,247</b>	<b>0,749</b>	<b>0,009</b>	<b>0,199</b>	<b>0,026</b>	<b>32,99</b>
168	1,174	0,320	0,273	0,213	0,665	0,007	0,182	0,022	32,02
192	1,146	0,332	0,290	0,196	0,589	0,006	0,171	0,018	33,24
%5									
Zaman (Saat)	yp/x (g/g)	yp/s (g/g)	yx/s (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	Qx (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)	%sitrik asit
12	0,134	0,050	0,373	0,017	0,333	0,011	0,124	0,224	5,00
24	0,458	0,069	0,150	0,046	0,667	0,019	0,100	0,278	6,88
48	0,317	0,088	0,276	0,044	0,500	0,007	0,138	0,075	8,75
72	0,512	0,119	0,233	0,060	0,500	0,007	0,117	0,060	11,94
96	0,642	0,155	0,241	0,071	0,458	0,007	0,110	0,043	15,45
120	0,626	0,124	0,198	0,068	0,550	0,005	0,109	0,042	12,42
<b>144</b>	<b>0,744</b>	<b>0,141</b>	<b>0,190</b>	<b>0,081</b>	<b>0,569</b>	<b>0,005</b>	<b>0,108</b>	<b>0,037</b>	<b>14,15</b>
168	0,762	0,144	0,189	0,076	0,530	0,005	0,100	0,032	14,38
192	0,811	0,157	0,194	0,074	0,474	0,004	0,092	0,027	15,71

Deneyisel sonuçlardan hesaplanan kinetik parametrelerin inkübasyonun 6. gününde elde edilen sonuçları Şekil 4.33'de grafiklendirilmiştir. Elde edilen grafikte %4 metanol oranında yp/x, yp/s, yx/s, Qp, Qs, Qx ve qp değerleri maksimum olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.33. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının kinetik parametreler üzerine etkisi (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L)

Kuru misel ağırlıklarının zamana bağıli grafiğinden hesaplanan özgül büyüme hızları çizgi grafikte Şekil 4.34'de gösterilmiştir. Metanol oranı arttıkça özgül büyüme hızı da artmış ancak %4 metanol oranından sonra özgül büyüme hızı oldukça düşmüştür. Bu durum sakkarozun substrat kaynağı olarak kullanılan koşulda Metanolün sitrik asit üretimi üzerine etkisi bölümünde açıklanmıştır. Ayrıca %5 metanol oranında özgül büyüme hızının düşmesi Metanolün toksik etkisinden kaynaklanabilir. %4 metanol oranının olduğu besiyeri ortamında 0,6792 1/gün iken, %3 metanol oranının olduğu besiyerinde özgül büyüme hızı 0,5304 1/gün ve %5 metanol oranında ise olduğu besiyerinde özgül büyüme hızı 0,4693 1/gün olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.34. Portakal hidrolizatı ve melas içerikli ortamda metanol oranının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (Çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 100 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140g/L)

#### 4.4. KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN HAVALANDIRMALI BİYOREAKTÖRDE *Aspergillus niger* İLE PORTAKAL HİDROLİZATI VE MELAS İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

Kültür ortamında mikroorganizmaların gelişerek, üreyebilmeleri için bazı şartların sağlanmış olması gerekmektedir. Bunlar; mikroorganizmanın yaşaması, gelişmesi ve üremesi için gereken besin maddeleri ve enerji kaynağını içeren besiyeri, aşılama (ortama canlı mikroorganizmanın ilave edilmesi) ve gelişmeyi önleyen maddelerin bulunmamasıdır. Optimum pH, substrat derişimi, havalandırma hızı, iyon derişiminin sağlanması gereklidir.

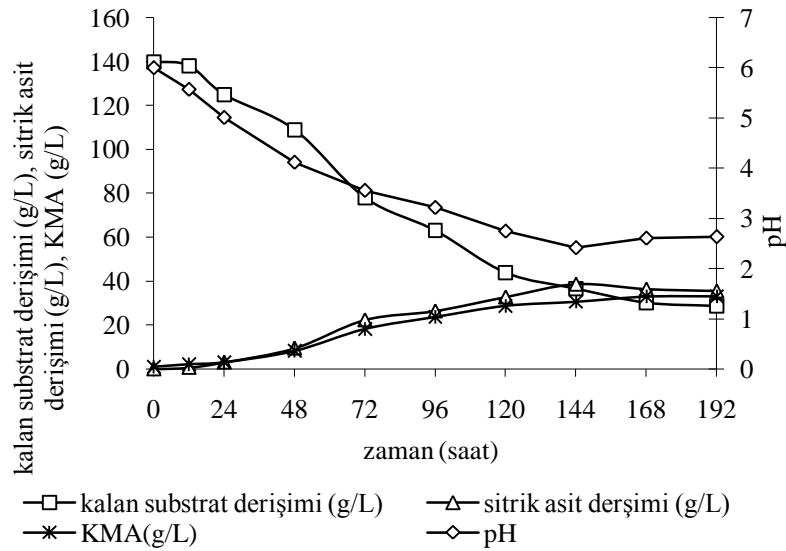
Bu çalışmada substrat olarak portakal hidrolizati ve önişlemeden geçirilmiş melas kullanılmıştır. Fermentasyon sıcaklığı (30°C), havalandırma hızı 1L/L/dakika, 1000 mL çalışma hacmi, mikroorganizma oranı %1, %2 mısırözü yağı ve iyon derişimi literatür verilerine dayalı olarak belirlenmiş olup sabittir. Optimum ürün sentezi için diğer parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Diğer parametreler; başlangıç pH'sı, başlangıç toplam şeker derişimi ve metanolün derişiminin belirlenmesidir. Ayrıca sitrik asit üretiminde substrat olarak melas kullanıldığında (içeriğinde bazı iyonların nicel ve nitel özelliği nedeniyle fermentasyonda inhibitör etkisinin ortadan kaldırılması amacıyla) tüm inkübasyonlar da sterilizasyondan önce ve sonra, toplam 200 mg /L  $K_4Fe(CN)_6$  ilave edilmiştir. Sterilizasyondan sonra ilave edilen  $K_4Fe(CN)_6$  UV ışığı altında steril edilmiştir.

İnkübasyon bir önceki çalışmada belirlendiği üzere 8 gün sürdürülmüştür. Çalkalamalı sistemde erlenlerde elde edilen optimum koşullar iki tip fermentöre uygulanmıştır. Özellikle portakal hidrolizi ve melasdan gelen iz elementlerin sürekli değişkenlik göstermesi çalışmanın sürdürülebilirliğini etkilemiştir. Melas ve portakal hidrolizati içeren ortamlar ön inkübasyonda kullanılmıştır bu durum inoküle edilen mikroorganizmaların ortama alışmasını sağlar. Optimum sürenin yapılan denemeler sonucunda 6 gün olduğu bulunmuştur. Optimum sürenin belirlendiği koşulda başlangıç pH'sı 6, 140 g/L toplam şeker içeriği ve 200 mg/L  $K_4Fe(CN)_6$ 'dır. İnkübasyon periyodu boyunca 12 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 günlerde alınan numunelerde pH, kuru misel ağırlığı (KMA) (g/L), inkübasyon ortamında kalan substrat miktarı



(toplam şeker (g/L) temelinde) ve sitrik asit (g/L) analizi yapılmıştır. Çalışma 2 paralel, analizler ise 3 paralel olarak yürütüldü. Sonuçlar için paralellerin ortalaması alındı. Çalışmalarda kontrol grubu olarak spor süspansiyonu aşılammamış ortamlar kullanıldı.

8 günlük inkübasyon periyodu sonunda optimum sürenin 6. gün olduğu tespit edilmiştir. Bu tespit, substrat olarak portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı çalkalamalı erlen aşamasında elde edilen optimum süre ile aynıdır. İnkübasyon periyodu boyunca ortam pH'sının sürekli olarak düştüğü Şekil 4.35'de görülmektedir. Ortam pH'sının belli bir değerinden sonra sitrik asitin üretimin durduğu ve sonra azaldığı saptanmıştır. Sitrik asit üretiminde sitrik asit üretiminin sabitlendiği veya düşmeye başladığı nokta optimum süre olarak verilmektedir. Optimum süre olarak belirlenen 6. günde KMA'nın sabitlendiği görülmektedir. Genel olarak ticari fermentasyonlarda, fermentasyon işlemine logaritmik evrenin bitiminde son verilmektedir.



Şekil 4.35. Kesikli düzende çalışan havalandırılmalı biyoreaktör kullanılan çalışmada optimum sürenin belirlenmesi (Başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Şekil 4.35’de fermentasyon ortamında kuru misel ağırlığındaki artış ile sitrik asit üretimi birbirine paralellik göstermektedir. Bu durum ise sitrik asit üretiminin primer metabolit olduğunun bir göstergesidir. Çünkü primer metabolitler mikroorganizmanın logaritmik fazı boyunca maksimum seviyede üretilmekte olup, durağan safhada üretim azalmaktadır. Sekonder metabolitler ise logaritmik fazla üretilmeye başlar ve durağan fazda maksimum seviye ulaşır.

Her mikroorganizmanın, her bir türün ve hatta her bir suşun aynı besiyeri ortamında üremesi farklılık göstermektedir. *A. niger* küf mantarının her bir suşu gelişim açısından birbirinden farklıdır [145]. Özellikle belli bir besiyeri ortamında değişik suşların gelişim hızı ve ürettiği ürünler farklı olabilir. Rahmen ve ark (2003)’nın topraktan izole ettikleri 25 adet *A. niger* suşunu 250 mL’lik erlenlerde 50 mL olacak şekilde hazırlanan ortamda 30°C’de 148 h’lik inkübasyon periyodunda, 150 g/L başlangıç şeker ve pH 6 (başlangıç pH) değerinde melas içeren ortamda inkübe etmişlerdir. İzole edilen *A. niger* suşlarının 0,24 ile 16,04 g/L arasında sitrik asit ürettikleri bulunmuştur [40]. Fermentasyon sonunda her suşun kuru misel ağırlıkları ve buna bağlı olarak özgül büyüme hızlarının değişiklik gösterdiğini kaydetmişlerdir [40]. Ali ve ark (2001) tarafından yapılan çalışmada da topraktan *A. niger* suşları izole edilmiştir. Elde edilen suşların 2,63 ile 47,5 g/L arasında sitrik asit üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür [133]. Bu durum *A. niger* suşlarının birbirinden farklı sitrik asit üretme yeteneğine sahip oldukları açıkça görülmektedir. Lotfy ve ark (2007), sitrik asit üretiminde verimliliği arttırmak ve üretilen sitrik asit derişimi maksimuma çıkarmak için izolasyon ve mutasyon çalışması yapmışlardır. Elde ettikleri izole suşlar üzerine uygulanan mutasyon sonucunda üretilen mutant türlerin saf türden 4,5 ile 7,5 kat daha fazla sitrik asit ürettikleri tespit edilmiştir [33]. Bu çalışmada da görülmektedir ki mutasyon çalışmaları sitrik asit üretimi için önemli bir alandır.

#### 4.4.1. Başlangıç pH’sının Etkisi

Sitrik asit fermentasyonunda başlangıç pH’sı mikroorganizmanın seçeceği metabolik yolun belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Ortam pH’sı elde edilecek ürün, çeşidine ve değişimine mikroorganizma tür ve suşuna göre değişir. Ayrıca fermentasyon boyunca, oluşan ara ürünlere ve son ürünlere bağlı olarak

ortamın pH'sı sürekli olarak düşmektedir. *A. niger* sitrik asitin yanında oksalik ve glukonik asit olmak üzere birçok asiti de üretme yeteneğine sahiptir. Bu asitlerin üretim derişimleri ise başlangıç pH'sı ile yakından ilgilidir.

Substrat olarak portakal hidrolizatı ve melasın kullanıldığı çalışmada başlangıç pH değerinin belirlenmesi ile ilgili bir çalışma seti kurulmuştur. Çalışma 1,5 L'lik kavanozlarda 1L çalışma hacminde yürütülmüştür. Besiyeri ortamının sakkaroz içeriği 140 g/L, metanol içeriği %4, ortam sıcaklığı 30°C ve havalandırma oranı 1 L/L/dakika olacak şekilde hava pompası ile sağlanmıştır. Başlangıç pH'sının belirlenmesi amacıyla 4 farklı pH belirlenmiştir. Bunlar pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0 ve pH 6,5'dir.

Başlangıç pH'sı 6,0'nın üzerine çıktığı durumlarda zamana bağlı olarak pH'da meydana gelen azalma diğer pH'lara göre farklılık göstermiştir. Bu durum da üretilen ürünün farklı olmasından kaynaklı olabilir (Şekil 4.36A). Ortamın pH değerine göre üretilen ürünler değişiklik göstermektedir. *A. niger* ile fermentasyon koşullarında pH 3,0-3,5 aralığında sitrik asit, pH 6,0-7,0 aralığında okzalik asit üretilmektedir [146]. Okzalik asit üretiminden sorumlu enzim olan okzaloasetat hidrolaz enzimi  $pH \geq 4$ 'de çalışmaktadır [53]. pH 6,0 değerinde başlayan bir fermentasyonda öncelikle okzalik asit oluşmakta ve daha sonra üretilen diğer yan ürünlerle, ortamda  $H^+$  iyonu derişiminin artmasıyla fermentasyon sitrik asit üretimine dönmektedir. Bu çalışmaların yanında Saad (2006) tarafından ham hurma şurubu üzerine sitrik asit çalışmasında optimum başlangıç pH'sı 6,5 olarak belirlenmiştir [147]. Bu durum sitrik asit çalışmalarında başlangıç pH'sı aynı zamanda suşa ve kullanılan substrata bağlı olarak da değişebildiğini göstermektedir.

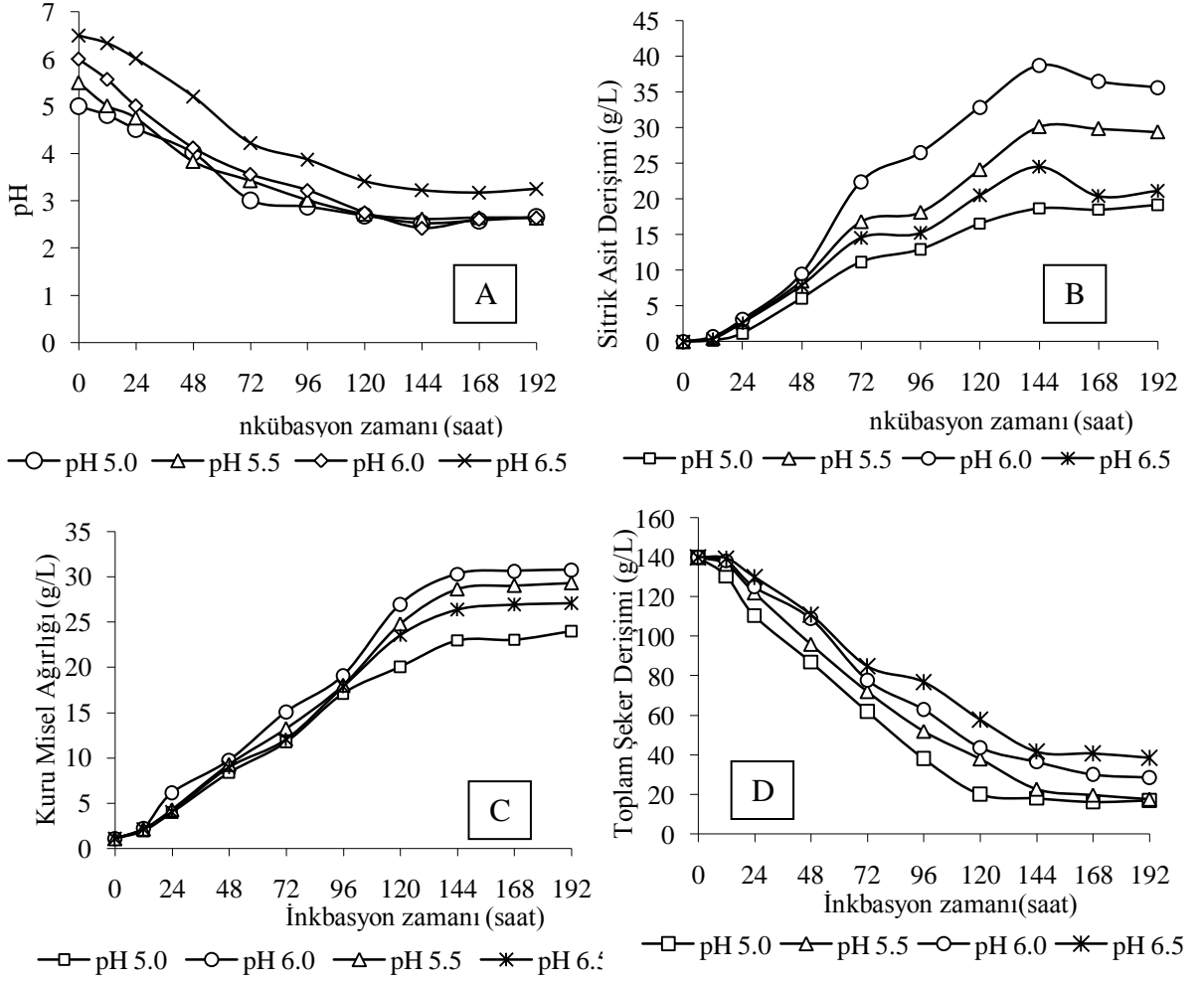
Mikroorganizmanın substrat kullanımına ve ortam pH'sı azalışına bağlı olarak ürün verimliliğinin en yüksek olduğu koşulu belirlemek imkânsızdır. Başlangıç pH'sına bağlı olarak ürün birikimi en iyi pH 6,0 olan fermentasyon ortamında görülmüştür. Çünkü düşük pH'larda mikroorganizma substratı verimli kullansa da üretilmek istenilen son ürün olan sitrik asit için en uygun başlangıç pH'sının 6 olduğu Şekil 4.36B'de görülmektedir. Sitrik asit üretimi en düşük pH 5,0 ve daha sonra pH 6,5 da görülmüştür. Özellikle 48. saate kadar sitrik asit üretimi aynı gibi görünse de fermentasyonun ilerleyen zamanlarında sitrik asit birikimi değişiklik

göstermiştir. Birikimin yüksek olması ise kullanılan mikroorganizmanın karakteristik özelliğinden kaynaklanmaktadır. 48. saatten sonra sitrik asit birikimindeki farklılıklar 48. saatte ortama ilave edilen metanolden de kaynaklanabilir. Metanolün sitrik asit üretimi üzerine tam etkisi henüz tespit edilememiş olsa da ortaya atılan bir hipoteze göre, metanol hücre proteinlerinin aktivitesini baskılayarak enzimin metabolik aktivitesini arttırmakta ve hücre içinde oluşan sitrik asitin hücre dışına salınımını kolaylaştırmaktadır.

Besiyeri ortamında mikroorganizmanın gelişim hızı, ürünün üretim hızıyla doğru orantılıdır. Başlangıç pH 6,0'da en yüksek sitrik asit birikimi ve en yüksek biyokütle oluşumu görülmüştür (Şekil 4.36C). İnkübasyonun başlangıcından 144. saate kadar mikroorganizma gelişiminin grafiksel eğrisinin logaritmik olmasındaki neden ise ön inkübasyon olabilir. Ön inkübasyonda gelişen ve ortam koşullarına (substrat türü, ortam pH'sı, sıcaklık gibi) alışan mikroorganizmalar inkübasyon ortamına alındıklarında hızlı gelişim göstermişlerdir.

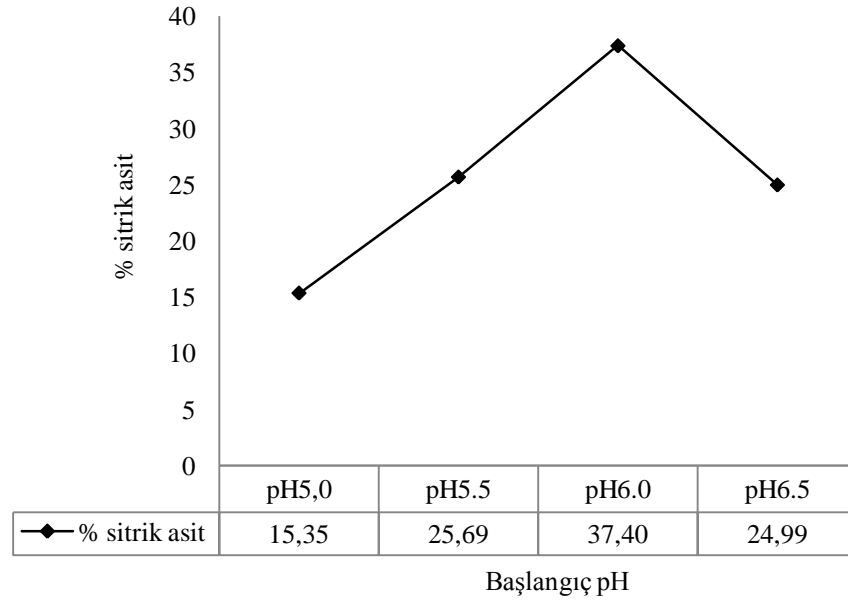
DeneySEL çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde optimum gün olarak belirlenen 6. günde optimum başlangıç pH'sı 6,0 olarak belirlenmiştir. KMA ve sitrik asit birikimi açısından en yüksek değer pH 6,0'da görülmüştür. Substratın en yüksek seviyede pH 5,0'da kullanılmasındaki neden ise kullanılan mikroorganizmanın doğal gelişimi ile ilgili olabilir (Şekil 4.36C).

Başlangıç pH'sına bağlı olarak mikroorganizma gelişimi değişiklik göstermektedir. Küf mantarları genel olarak zayıf asit koşullarında maksimum gelişim gösterirler. En yüksek şeker kullanımının başlangıç pH'sı 5,0'da görülmesinin nedeni bu olabilir. Besiyeri ortamında başlangıç pH'sındaki artış substrat kullanımı ile ters orantılıdır. Yani başlangıç pH'sı yükseldikçe substratın kullanımı düşmektedir (Şekil 4.36D). Substrat olarak melasın kullanıldığı çalışmalarda başlangıç pH'sının düşük olması sitrik asit üretimini azaltmaktadır. Düşük pH değerlerinde ferrosiyanyür iyonları ortamda misel gelişimine toksik etki göstermektedir. pH>6 olduğunda ise glukonik asit birikimi gözlenmiştir [36]



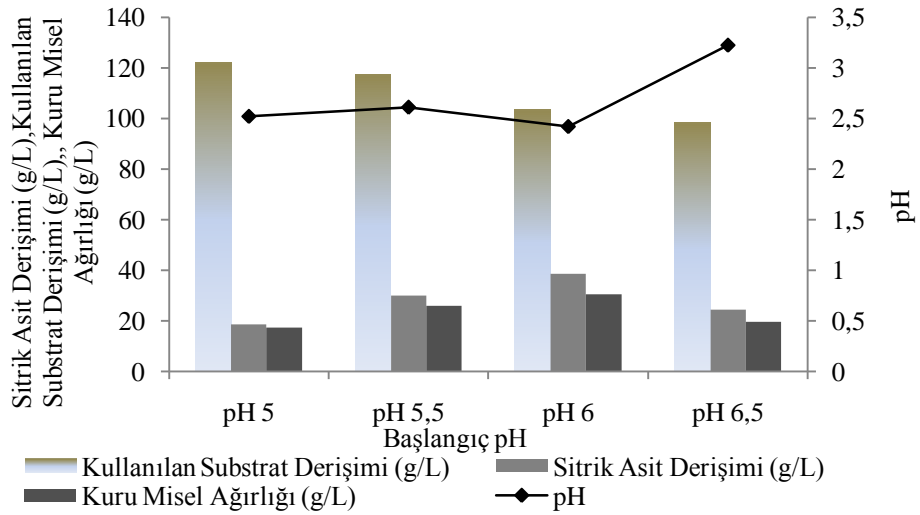
Şekil 4.36. Kesikli düzende çalışan havalandırılmalı biyoreaktörde başlangıç pH'sının Strk asit üretimi üzerine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değışimi, B:Sitrik asit derişiminin değışimi, C:Kuru misel ağırlığının değışimi, D:Toplam şeker derişiminin değışimi). (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C,havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Şekil 4.37'de inkübasyonun 6. gününde başlangıç pH'sına bağlı olarak kullanılan toplam şeker derişimi başına üretilen sitrik asit değerini veren %sitrik asit hesaplanmış ve grafiklendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ortam pH değeri artıkça sitrik asit üretimi artmaktadır. Bu da ortam pH'sının 6.0 olması gerekliliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.37. Farklı başlangıç pH değerlerinin sitrik asit üretim verimliliği üzerine etkisi (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Optimum zamanda elde edilen sonuçları başlangıç pH'sına bağlı olarak grafiklendirildiğinde optimum başlangıç pH'sının 6,0 olduğu görülmektedir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38: Optimum başlangıç pH değerinin belirlenmesi (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Sitrik asit fermentasyonun da spor gelişiminin ve uygun pelet oluşumu için  $pH > 5$  olması gereklidir. Bu nedenle fermentasyon ortamına mikroorganizmaların pelet formunu geçmiş olması istenir. Diğer önemli bir konu ise sitrik asit üretiminde ortam  $pH$ 'sının 2 civarına inmesi gerekliliğidir. Bu durum aynı zamanda kontaminasyonu da engellemektedir. Ancak  $pH$ 'nın 2'nin altına düşmesi mikroorganizmanın gelişimini engellediğinden  $pH$ 'nın 2'nin altına düşmesi istenmemektedir. Ayrıca  $pH$ 'nın 2 civarına düşmesi besiyerinde oluşması istenmeyen glukonik ve okzalik asitlerin sitrik asite dönüşmesini ve bu asitlerin sitrik asite dönüşmesini sağlayan enzimlerin aktivasyonunu sağlamaktadır [148].

Uygulanan inkübasyonla ilgili olarak kinetik parametreler, mikroorganizmanın gelişim kinetiği açısından önemlidir. Substratın mikroorganizma tarafından en iyi şekilde kullanılması ve sitrik asit üretim verimliliğinin tespiti ticari fermentasyonlar için hesaplanması zorunlu parametrelerdir. Özgül besi maddesi kullanım hızı olan  $q_s$  ve özgül ürün oluşum hızı olan  $q_p$ 'nin hesaplanması  $\mu$ 'nün hesaplanması kadar gereklidir. Çizelge 4.9'da birim zamanda kinetik parametreler hesaplanmıştır. 144. saatte bulunan sonuçlar çizelgede belirginleştirilmiştir.

Çizelge 4.9. Optimum başlangıç pH'sının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

pH 5.0

zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Q <sub>s</sub> (g/L/h)	Q <sub>x</sub> (g/L/h)	qp(g/g hücre/h)	qs(g/g hücre/h)
12	0,104	0,021	0,205	0,017	0,783	0,161	0,009	0,406
24	0,305	0,041	0,134	0,050	1,229	0,164	0,013	0,312
48	0,733	0,115	0,157	0,127	1,104	0,174	0,015	0,132
72	0,955	0,144	0,150	0,156	1,083	0,163	0,013	0,092
96	0,758	0,127	0,168	0,135	1,060	0,178	0,008	0,062
120	0,826	0,138	0,167	0,138	0,998	0,167	0,007	0,050
<b>144</b>	<b>0,815</b>	<b>0,153</b>	<b>0,188</b>	<b>0,130</b>	<b>0,847</b>	<b>0,159</b>	<b>0,006</b>	<b>0,037</b>
168	0,805	0,150	0,186	0,110	0,736	0,137	0,005	0,032
192	0,801	0,156	0,195	0,100	0,640	0,125	0,004	0,027

pH 5.5

zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Q <sub>s</sub> (g/L/h)	Q <sub>x</sub> (g/L/h)	qp(g/g hücre/h)	qs(g/g hücre/h)
12	0,237	0,143	0,603	0,042	0,292	0,176	0,020	0,138
24	0,659	0,156	0,236	0,117	0,750	0,177	0,027	0,176
48	0,920	0,193	0,210	0,177	0,917	0,193	0,019	0,099
72	1,274	0,248	0,195	0,234	0,943	0,183	0,018	0,071
96	1,007	0,206	0,205	0,189	0,917	0,188	0,010	0,051
120	0,973	0,236	0,243	0,201	0,850	0,207	0,008	0,034
<b>144</b>	<b>1,052</b>	<b>0,257</b>	<b>0,244</b>	<b>0,209</b>	<b>0,815</b>	<b>0,199</b>	<b>0,007</b>	<b>0,028</b>
168	1,029	0,248	0,241	0,178	0,716	0,173	0,006	0,025
192	1,003	0,240	0,240	0,153	0,638	0,153	0,005	0,022

pH 6.0

zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Q <sub>s</sub> (g/L/h)	Q <sub>x</sub> (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	qs(g/g hücre/h)
12	0,226	0,250	1,105	0,042	0,167	0,019	0,184	0,075
24	1,090	0,219	0,201	0,146	0,667	0,045	0,134	0,208
48	1,247	0,225	0,180	0,211	0,938	0,026	0,169	0,116
72	0,780	0,220	0,283	0,202	0,917	0,011	0,259	0,049
96	0,941	0,240	0,255	0,225	0,938	0,010	0,239	0,041
120	1,203	0,319	0,265	0,274	0,858	0,010	0,228	0,031
<b>144</b>	<b>1,249</b>	<b>0,332</b>	<b>0,266</b>	<b>0,270</b>	<b>0,813</b>	<b>0,009</b>	<b>0,216</b>	<b>0,026</b>
168	1,160	0,309	0,267	0,221	0,714	0,007	0,190	0,022
192	1,176	0,314	0,267	0,198	0,630	0,006	0,168	0,019

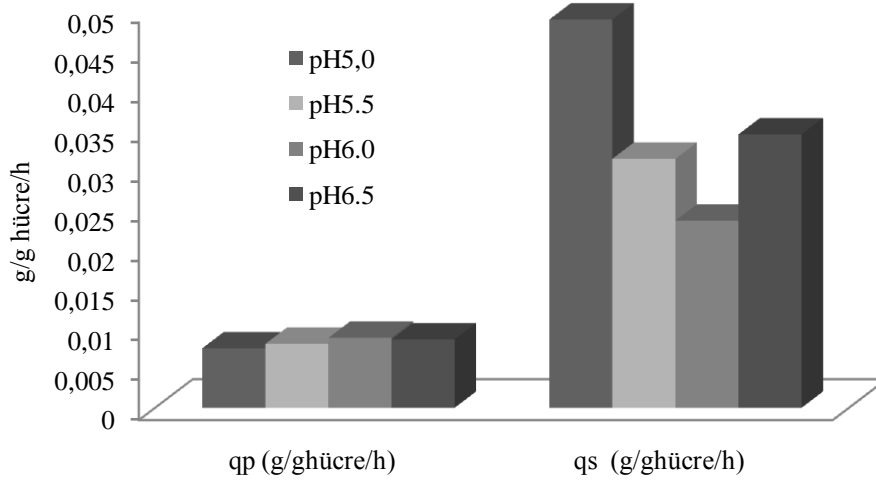
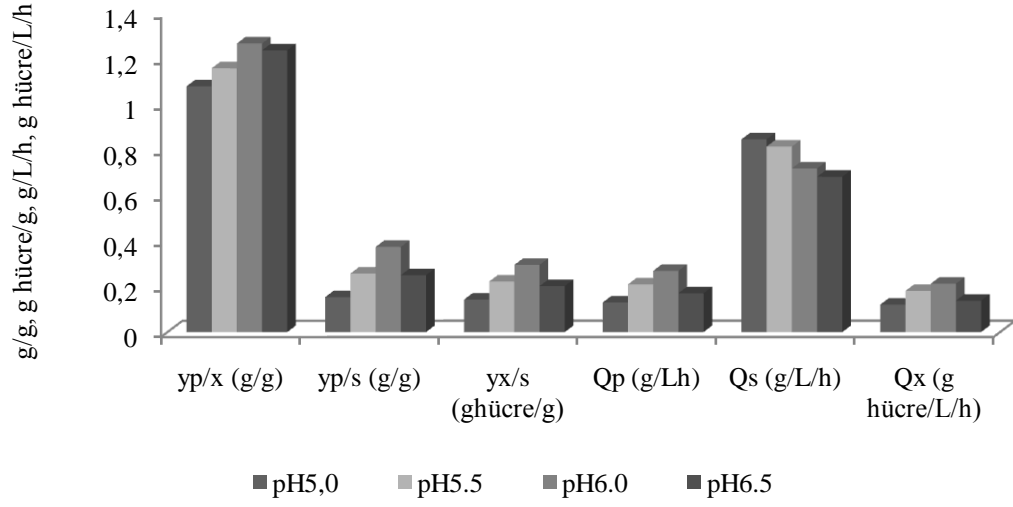


Çizelge 4.9 (devam)

pH 6.5

zaman (saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (g hücre/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$Q_s$ (g/L/h)	$Q_x$ (g/L/h)	$q_p$ (g/g hücre/h)	$q_s$ (g/g hücre/h)
12	0,191	0,182	0,950	0,033	0,183	0,174	0,016	0,088
24	0,648	0,260	0,401	0,108	0,417	0,167	0,027	0,104
48	0,882	0,271	0,308	0,164	0,604	0,186	0,018	0,068
72	1,211	0,264	0,218	0,202	0,764	0,167	0,017	0,064
96	0,856	0,242	0,283	0,159	0,656	0,186	0,009	0,037
120	0,872	0,250	0,286	0,171	0,683	0,196	0,007	0,029
<b>144</b>	<b>0,932</b>	<b>0,250</b>	<b>0,268</b>	<b>0,170</b>	<b>0,682</b>	<b>0,183</b>	<b>0,006</b>	<b>0,026</b>
168	0,760	0,206	0,271	0,121	0,590	0,160	0,005	0,022
192	0,782	0,209	0,267	0,110	0,528	0,141	0,004	0,020

Şekil 4.39’de başlangıç pH’sının belirlendiği çalışmada hesaplanan kinetik parametrelerin optimum gün olan 6. gündeki değerler grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiklerden substratın sitrik aside dönüşmesi ve mikrobiyal olarak substratın kullanım verimliliği açısından başlangıç pH’sının 6 olduğu belirlenmiştir. Kullanılan besiyeri veya biyoreaktörün değişmesi optimum başlangıç pH’sını değiştirmemiştir. Bu durum ise *A. niger* 200910 için başlangıç pH’sının 6,0 olması gerektiğini göstermektedir..

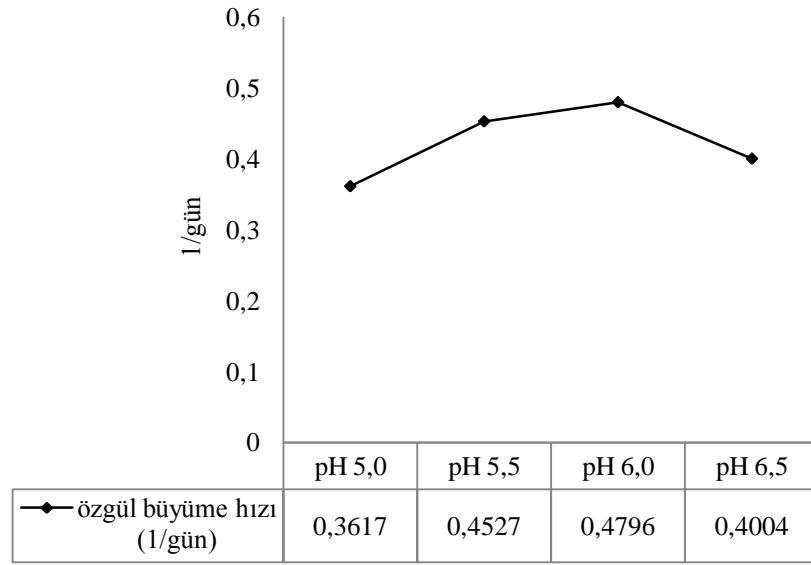


Şekil 4.39. Optimum başlangıç pH'sının belirlenmesi çalışmasında inkübasyonun 6.gününde kinetik parametrelerdeki değişimi. (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Özgül büyüme hızı, ortam koşullarının değişmesi ile değişiklik gösterir. Başlangıç pH'sında değişmesiyle özgül büyüme hızı da değişmiştir. Şekil 4.40'da görüldüğü üzere, başlangıç pH'larına bağlı özgül büyüme hızı değişimi pH 5,0 < pH 6,5 < pH 6,0 < pH 5,5 olarak belirlenmiştir.

Özgül büyüme hızının başlangıç pH değerine göre değişimi Şekil 4.40'da verilmiştir. Özgül büyüme hızı mikroorganizmanın gelişim hızını vermektedir ve

yapılan bu çalışmada pH 6,0'da en yüksek bulunmuştur. Bu ise, pH 6,0 değerinin fermentasyon ortamı için uygun olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmada kullanılan başlangıç pH'larında, en düşük özgül büyüme hızı ise pH 5,0'da bulunmuştur. Bunun nedeni ise düşük pH değerlerinde ferrosiyanür iyonları ortamda misel gelişimine toksik etki göstermektedir. Başlangıç pH'sı 6,0'nın üzerinde olan ortamlarda ise özgül büyüme hızının düşmesi ortam koşullarının misel gelişimi için uygun olmamasından kaynaklı olabilir.



Şekil 4.40. Farklı başlangıç pH değerlerinde özgül büyüme hızı (Başlangıç toplam şeker derişimi 140 /L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Ali ve ark (2002) tarafından yapılan çalışma havalandırmalı biyorekatörde yürütülmüş ve substrat olarak melas kullanılmıştır. Bu çalışmada başlangıç pH'sını belirlemek için pH 4,5 ile 7,0 arasında başlangıç pH'ları çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre maksimum sitrik asit üretimi başlangıç pH'sı 6,0 olan koşulda bulmuşlardır [149]. Başlangıç pH'sı her *A. niger* suşu için farklılık göstermekle birlikte optimum başlangıç pH'sı 1,5 ile 6,5 arasında değişmektedir. Pazouki ve ark (2000) tarafından yapılan çalışmada substrat olarak glikoz ve melas, mikroorganizma olarak *Candida liolytica* ve *A. niger*'in kullanılmıştır. Bu çalışmada mikroorganizma türü ve substrat türünün sitrik asit üretimini nasıl etkilediği ile ilgili karşılaştırma çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *A. niger* için başlangıç pH'sı 5,5

olan koşulda maksimum sitrik asit üretimi gözlenmiştir [134]. Ham hurma atıklarıyla yapılan diğer bir çalışmada ise başlangıç pH'sı 6,5 olan ortamda maksimum sitrik asit üretimi belirlenmiştir [147]. Ateş tarafından yapılan yüksek lisans tezinde substrat olarak melas mikroorganizma olarak *A. niger* kullanılmış ve maksimum sitrik asit üretimi pH 4,5'da tespit edilmiştir. Optimum başlangıç pH'sı ile ilgili olarak oksalik asit birikimi için gerekli pH değeri de kullanılan suşa göre değişiklik gösterecektir. Aynı şekilde ferrosiyonün toksik etki göstereceği düşük pH değerleri de *A. niger* suşuna göre farklılık gösterecektir.

#### 4.4.2. Başlangıç Toplam Şeker Derişiminin Etkisi

Besiyeri ortamında substrat derişimi mikroorganizmalardan son ürünün elde edilmesi açısından oldukça önemlidir. Besiyeri ortamında çözülmüş madde derişiminin değişkenliği mikroorganizmanın farklı ürünler üretmesine neden olabilir. Fermentör ortamında hazırlanan besiyeri ortamının başlangıç pH'sı 6,0 iken, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C ve havalandırma oranı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L olarak ayarlanmıştır.

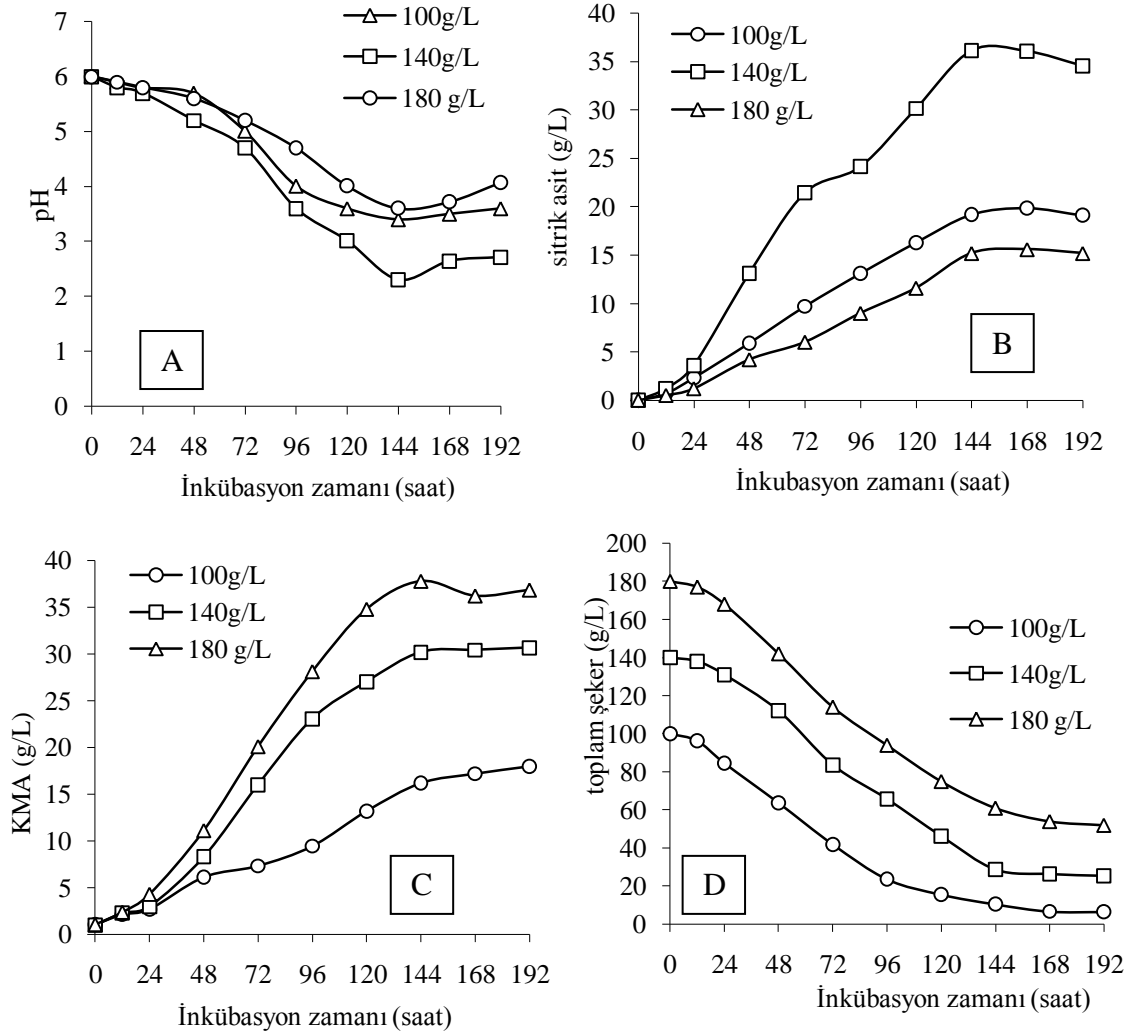
Zamana bağlı olarak ortam pH'sındaki değişim incelendiğinde 140 g/L başlangıç substrat derişimde diğer ortamlara göre daha fazla azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni sitrik asit üretiminden kaynaklanmaktadır. Diğer substrat derişimlerinde pH azalmasının 140 g/L'ye göre yüksek olmamasındaki neden ise üretilen son ürünlerden olabilir. 140 g/L başlangıç toplam şeker derişimin kullanıldığı fermentasyonda inkübasyonun 6. gününde pH'sının 2,3 olduğu diğer başlangıç substrat derişimlerinde 3–4 aralığında olduğu saptanmıştır. 144. saatten sonra fermentasyon ortamında çok yüksek olmamakla birlikte pH değerinde bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.41A).

Sitrik asit üretimi yüksek toplam şeker derişimine ihtiyaç duyar. Genel olarak *A. niger* suşuna bağlı olarak optimum başlangıç toplam şeker derişimi 100-200g/L arasında değişmektedir. Peksel ve Kubicek (2003) tarafından yapılan çalışmada sitrik asit üretimi üzerine sakkaroz derişiminin etkisi araştırılmış ve çalışma sonunda maksimum sitrik asit üretiminin 100g/L sakkaroz derişiminde olduğu bulunmuştur[150]. Ali ve ark. [133] ve Haq ve ark.[36] tarafından yapılan melasla

sitrik asit üretim çalışmalarında optimum toplam şeker derişimi 150 g/L, Saad[143] tarafından ham hurma atıklarıyla yapılan çalışmada ise 240 g/L, Roukas ve Kyriakides [146] tarafından yapılan çalışmada ise 200g/L başlangıç toplam şeker derişiminde maksimum sitrik asit üretimi bulunmuştur. Muhtar(2000) tarafından yapıla yüksek lisans tez çalışmasında ise maksimum sitrik asit üretimi 140 g/L başlangıç toplam şeker içeriğinde gözlenmiştir [28]. 140 veya 150 g/L toplam şeker derişimi ise genel olarak tespit edilen optimum toplam şeker derişimidir. Bu doktora çalışmasında da diğer çalışmalara paralel olarak 140 g/L toplam şeker derişimi belirlenmiştir. İnkübasyonun 144. saatinden sonra sitrik asit derişiminde meydana gelen azalma fungusun yaşlanmasından, fungus tarafından üretilen inhibitörlerden, şekerin ve azotun sitrik asit üretimi için gerekli olan derişimin çok altına düşmesinden kaynaklanabilir (Şekil 4.41B).

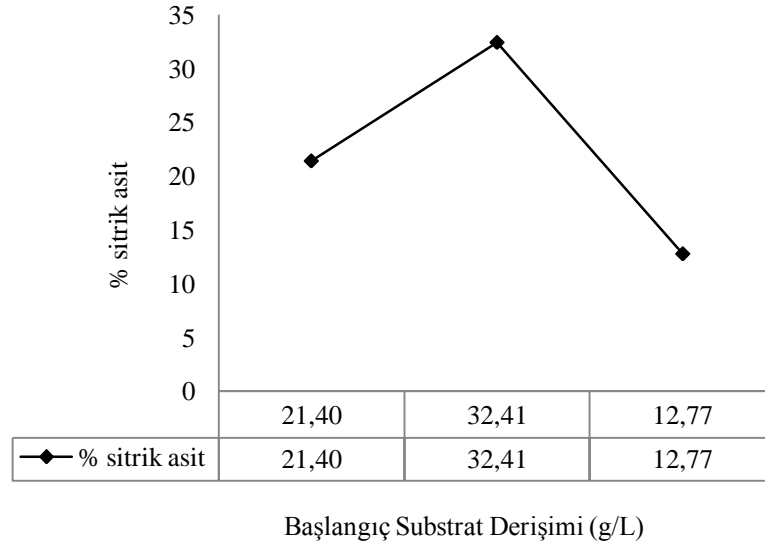
Yüksek substrat derişimlerinde KMA'nın ve kullanılan toplam şeker değerinin diğer ortamlara göre daha yüksek olduğu ancak sitrik asit üretiminin daha düşük olduğu Şekil 4.41'de görülmektedir. Düşük substrat derişimlerinde okzalik asit oluşturması nedeniyle sitrik asit verimi düşer. Yüksek substrat derişimlerinde polioller oluşmakta ve sonuçta sitrik asit üretimi azalmaktadır [92].

İnkübasyon periyodu boyunca tüm koşullarda mikroorganizmanın substratı kullandığı görülmüştür (Şekil 4.41D). Düşük başlangıç substrat derişimlerinde (100g/L) ortamdaki tüm şekerin kullanıldığı (6. günde 10,3 g/L) yüksek olan derişimlerde ise (6. günde 61 g/L) daha az substratın kullanıldığı görülmektedir. Substrat kullanım verimleri 100 g/L için %89,7, 140 g/L için %79,6, 180 g/L için %66,1'dir. Bu sonuçlara göre en düşük başlangıç toplam şeker derişiminde substratın daha verimli bir şekilde kullanıldığı görülmektedir.



Şekil 4.41. Başlangıç toplam şeker derişimini sitrik asit üretimi üzerine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değışimi, B:Sitrik asit derişiminin değışimi, C:Kuru misel ağırlığının değışimi, D:Toplam şeker derişiminin değışimi). (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Sitrik asit üretiminin başlangıç toplam şeker içeriğine bağlı olması Şekil 4.42’de açıkça görülmektedir. Buna göre 100g/L başlangıç toplam şeker derişiminde sitrik asit üretim verimliliği 180 g/L başlangıç toplam şeker derişimine göre daha yüksektir. Ancak en yüksek sitrik asit üretimi başlangıç şeker derişimi 140g/L olan ortamda gözlenmiştir. Kiel ve ark (1981) yılında pamuk sapları ile yaptıkları çalışmada ortamı glikoz ile takviye etmişler ve 140 g/L glikoz takviyesi ile 87 g/L sitrik asit üretimi gözlemişlerdir. Bu makalede glikozun yanında pamuk saplarının da mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirdiğini göstermiştir. Bu durum ise ortamda toplam şeker derişiminin 140g/L’den yüksek olmasını gerektirir [151].



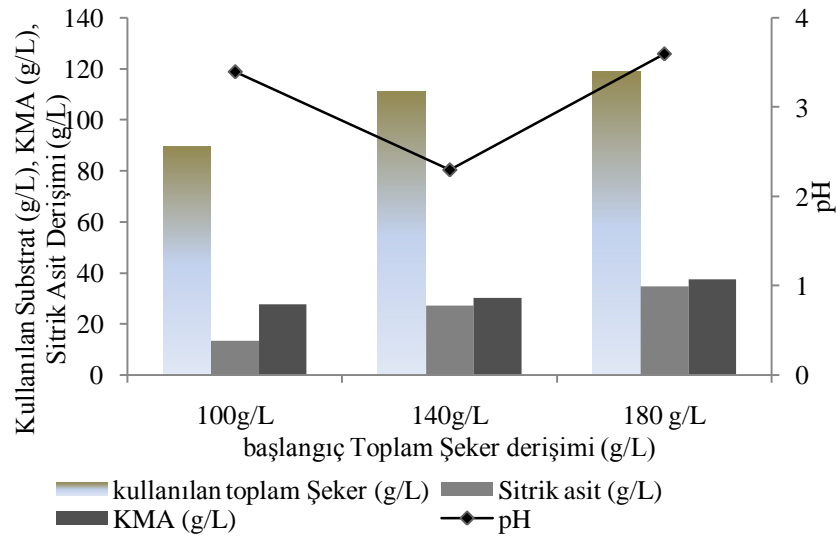
Şekil 4.42. Başlangıç toplam şeker derişimine bağılı sitrik asit üretim verimliliğı (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Ortamda bulunan şeker ve tuz gibi maddelerin konsantrasyonlarına bağılı olarak fermentasyon ortamında osmotik basınç oluşmaktadır. Osmotik basınç ortamdaki mikroorganizma faaliyetini önemli derecede etkiler. Ortamda yüksek çözünür madde konsantrasyonuna bağılı 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 [145]. Çalışmada kullanılan substrat derişimlerinden 180 g/L'de mikroorganizma gelişiminin yüksek olmasının yanında sitrik asit üretiminin az olmasının nedeni bu olabilir.

Başlangıç şeker derişimi mikroorganizma misel fizyolojisini de etkilemektedir. Bu nedenle inkübasyon periyodu boyunca oluşan misel morfolojisi gözlenmiştir. Yüksek başlangıç substrat derişimlerinde misel morfolojisinin bozuk pelet yapısında olduğu, düşük başlangıç substrat derişimlerinde ise geniş pelet genişliğine sahip olduğu saptanmıştır [133]. Papagianni ve Mattew (2004) tarafından sitrik asit üretiminde çeşitli sakkaroz derişimlerinin organizma üzerindeki fiziksel etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda 150 g/L glikoz derişiminde peletlerin fiziksel durumu kısa, ince, yapışkan filament şeklinde ve kaparmış olduğu bulunmuştur. 50

g/L Glikoz derişiminde ise daha büyük ve daha kalın pelet yapısında olduğu ancak yapışkan durumun olmadığı gözlenmiştir. 100 g/L glikoz derişiminde ise peletler orta büyüklükte yapışkanimsı yapının olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada maksimum sitrik asit üretimi 100 g/L başlangıç glikoz derişiminde bulunmuştur [152]. Bu çalışmada da aynı şekilde düşük başlangıç şeker derişimlerinde pelet büyüklüğünün geniş olduğu, yüksek derişimlerde ise oldukça küçük ve yapışkan filament formunda olduğu, 140 g/L şeker derişiminde ise orta genişlikte olduğu görülmüştür.

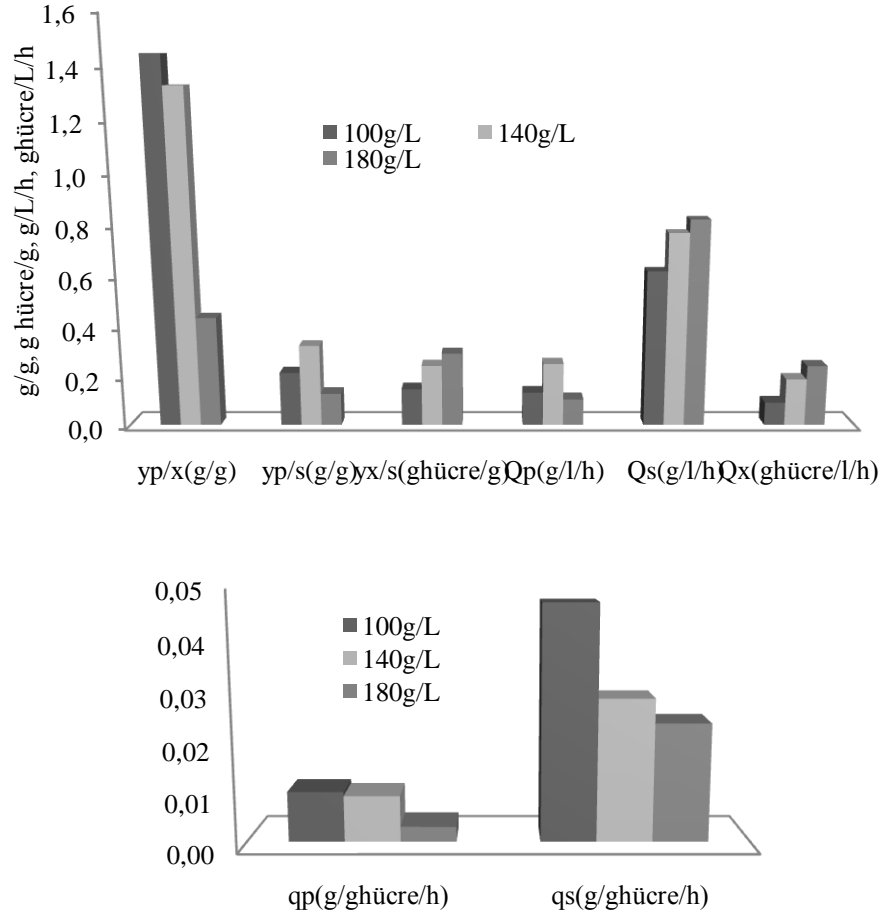
Sitrik asit üretim verimliliği en yüksek 140 g/L başlangıç substratında görülmüştür. Diğer ortamlarda sitrik asit üretiminin çok düşük olduğu Şekil 4.43’de görülmektedir. 144. saatte 140 g/L’de 36,11 g/L; 100 g/L’de 19,20 g/L ve 180 g/L’de 15,20 g/L olduğu bulunmuştur. Her ne kadar substrat derişimi arttıkça KMA değeri de artıyor olarak görülse de ürün sentezi açısından aynı durum geçerli değildir (Şekil 4.41C, Şekil 4.43). Deneysel çalışmada bir gözlem olarak yoğun substrat derişimlerinde misellerin yapısı sitrik asit üretiminin yüksek olduğu koşullardan farklıdır.



Şekil 4.43. Optimum başlangıç toplam şeker değerlerinin belirlenmesi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)



Kinetik parametreler incelendiğinde substrat derişiminin artmasıyla üretilen ürün verimliliğinin değişkenlik gösterdiği Çizelge 4.10'da verilmiştir. Mikroorganizmanın ürün sentez verimliliğinin 140 g/L'de 1,195 g/g iken mikroorganizmanın ürün sentez hızı ise 140 g/L'de 0,251 g/g/h iken 100g/L'de 0,133 g/g/h ve 180 g/L'de 0,106 g/g/h'dir. Bu sonuçlara göre sitrik asit üretimi için optimum başlangıç konsantrasyonunun 140 g/L olduğu görülmektedir (Şekil 4.44). Endüstriyel ölçekte büyük öneme sahip olan qp ve qx değerleri de hesaplanmıştır. Bu değerler ürünün oluşum hızını ve substratın tüketim hızını vermektedir. 140 g/L için qp ve qs değerleri sıra ile 0,005 g/g/h ve 0,026 g/g/h iken; 100 g/L için 0,008 g/g/h ve 0,023 g/g/h; 180 g/L için ise 0,003 g/g/h ve 0,022 g/g/h olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.10).



Şekil 4.44. İnkübasyonun 6. gününde farklı başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Çizelge 4.10. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

100 g/L

zaman (saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	Qx (g/L/h)	qp (g/ghücre/h)	qs (g/ghücre/h)
12	0,302	0,184	0,611	0,058	0,317	0,193	0,025	0,136
24	0,458	0,148	0,324	0,096	0,646	0,209	0,019	0,129
48	0,830	0,162	0,195	0,123	0,758	0,148	0,017	0,107
72	0,832	0,167	0,200	0,135	0,808	0,162	0,012	0,069
96	0,754	0,171	0,227	0,136	0,797	0,181	0,008	0,046
120	0,697	0,193	0,277	0,136	0,705	0,195	0,006	0,030
<b>144</b>	<b>0,694</b>	<b>0,214</b>	<b>0,308</b>	<b>0,133</b>	<b>0,623</b>	<b>0,192</b>	<b>0,005</b>	<b>0,023</b>
168	0,708	0,213	0,300	0,118	0,557	0,167	0,004	0,020
192	0,667	0,204	0,306	0,100	0,488	0,149	0,003	0,017

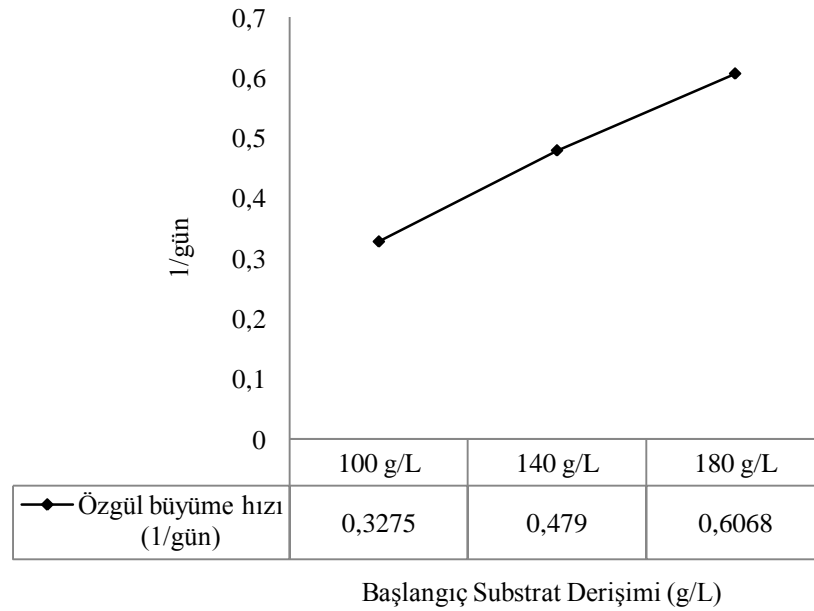
140 g/L

zaman (saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	Qx (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	qs (g/ghücre/h)
12	0,226	0,250	1,105	0,042	0,167	0,184	0,019	0,075
24	1,090	0,219	0,201	0,146	0,667	0,134	0,045	0,208
48	1,247	0,225	0,180	0,211	0,938	0,169	0,026	0,116
72	0,780	0,220	0,283	0,202	0,917	0,259	0,011	0,049
96	0,941	0,240	0,255	0,225	0,938	0,239	0,010	0,041
120	1,203	0,319	0,265	0,274	0,858	0,228	0,010	0,031
<b>144</b>	<b>1,249</b>	<b>0,332</b>	<b>0,266</b>	<b>0,270</b>	<b>0,813</b>	<b>0,216</b>	<b>0,009</b>	<b>0,026</b>
168	1,160	0,309	0,267	0,221	0,714	0,190	0,007	0,022
192	1,176	0,314	0,267	0,198	0,630	0,168	0,006	0,019

180 g/L

zaman (saat)	$y_{p/x}$ (g/g)	$y_{p/s}$ (g/g)	$y_{x/s}$ (g hücre/g)	Qp (g/L/h)	Qs (g/L/h)	Qx (g/L/h)	qp (g/ghücre/h)	qs (g/ghücre/h)
12	0,210	0,167	0,793	0,042	0,250	0,198	0,018	0,105
24	0,193	0,100	0,518	0,050	0,500	0,259	0,008	0,080
48	0,416	0,111	0,266	0,088	0,792	0,210	0,009	0,078
72	0,326	0,091	0,280	0,083	0,917	0,256	0,005	0,050
96	0,396	0,105	0,264	0,094	0,896	0,237	0,004	0,039
120	0,392	0,110	0,282	0,097	0,875	0,247	0,003	0,030
<b>144</b>	<b>0,407</b>	<b>0,128</b>	<b>0,314</b>	<b>0,106</b>	<b>0,826</b>	<b>0,259</b>	<b>0,003</b>	<b>0,022</b>
168	0,411	0,124	0,301	0,093	0,750	0,226	0,002	0,020
192	0,398	0,119	0,299	0,079	0,667	0,199	0,002	0,017

Başlangıç toplam şeker derişimine göre özgül büyüme hızında oluşan değişim ise Şekil 4.45’de verilmiştir. Buna göre substrat derişimi arttıkça özgül büyüme hızı artmaktadır. Substrat derişiminin artmasıyla mikroorganizma hacmi substrat yoğunluğundan dolayı artabilmektedir. Ancak aşırı substrat derişimi stres koşullarının oluşmasına neden olabilmekte ve ürün sentezini engelleyebilmektedir. Papagianni ve Matthey (2004) tarafından yapılan çalışmada glikoz derişiminin fermentasyon hızını etkilediği, yüksek derişimlerde mikrobiyal büyümenin arttığı ancak ürün sentezini değiştirdiği rapor edilmiştir [152] Yapılan deneysel çalışmada elde edilen  $\mu$  değerlerinin değişimi  $\mu(100 \text{ g/L}) < \mu(140 \text{ g/L}) < \mu(180 \text{ g/L})$  olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.45. Farklı başlangıç toplam şeker derişimlerinde özgül büyüme hızına etkisi (Başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

#### 4.4.3. Metanol oranının Etkisi

Sitrik asit üretimi üzerine metanolün etkisi ile ilgili açıklamalar henüz açık değildir. Bu konu ile ilgili birkaç hipotez mevcuttur. Maddox (1986), metanolün sitrik asit üretimini artırmasını ilgili olarak metanolün hücre geçirgenliğini arttırdığını ve hücre içine substrat girişini kolaylaştırdığını belirtmektedir. Fazla miktarda metanolün ise hücre zarını eriterek hücrenin ölümüne yol açtığı tahmin

edilmektedir [52]. Metanolün sitrik asit üretimini arttırması ile ilgili diğer bir fenomen de Kapoor ve ark. (1982) tarafından ortaya atılan, mikroorganizma gelişimini geciktirerek sporulasyonu geciktirdiği ve böylece sitrik asit üretimini arttırdığıdır [153]. Bu fenomen hücre zarının geçirgenliliğini arttırdığı fenomeni de desteklemektedir. Hücre, 2-oxo-glutarate dehidrogenaz solunumu yoluyla hücre içi sitrik asit sentezinin azaltılması şeklinde tepki vermektedir.

Yapılan alışma tüm bu fenomenleri destekler niteliktedir. Ancak yapılan çalışmalar fermentasyonda kullanılan metanol konsantrasyonlarında değişiklik göstermektedir. Pazouki ve ark (2000) tarafından yapılan çalışmada %3 metanol oranı kullanılmıştır. Literatürde %1-4 arasında metanol oranının kullanıldığı görölmektedir [132]. Metanol oranı diğer parametrelerde olduğu gibi mikroorganizmanın özelliğine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu alışma kapsamında metanol oranı olarak %3, %4, %5 derişimler seçilmiş ve optimal derişim saptanmaya çalışılmıştır. %4 metanol oranının uygulandığı fermentasyonlarda pH azalışının, toplam substrat kullanımının, KMA artışıının ve sitrik asit üretiminin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

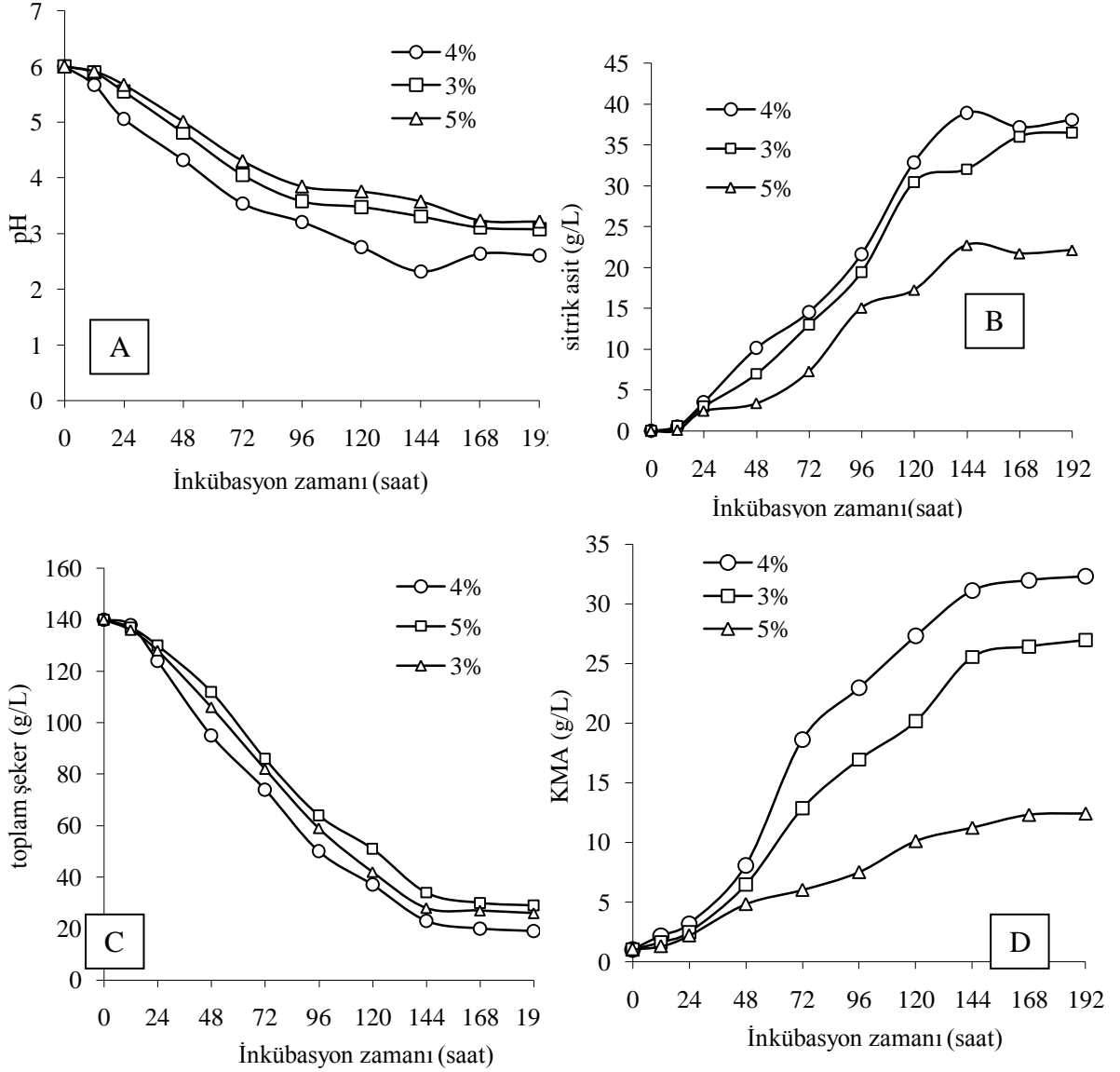
% 4 metanol oranında optimum zaman olan 144. saatte pH'nın 2,32'e; diğer koşullarda %3'de 3,31, %5'de 3,58'e kadar azaldığı belirlenmiştir (şekil 4.46A).

Yüksek metanol oranında mikroorganizma gelişim gösterse de sitrik asit üretimi oldukça düşüktür. Bu da mikroorganizma yapısının bozulmasından veya ürün sentezinin değişmesinden kaynaklanabilir. Çünkü metanolün aşırı ilavesi toksik etki edeceğinden enzim aktivitesini de değiştirecektir. 144. saatte %3 metanol oranında 32 g/L, %4 metanol oranında 38,9 g/L ve %5 metanol oranında 22,8 g/L sitrik asit derişimi saptanmıştır (şekil 4.46B).

Sitrik asit üretimi ile KMA'nın zamana bağlı değişim grafiği birbirine benzerlik göstermiştir. %4 metanol oranında diğer derişimlere oranla mikroorganizma gelişimi daha yüksektir (şekil 4.46C).

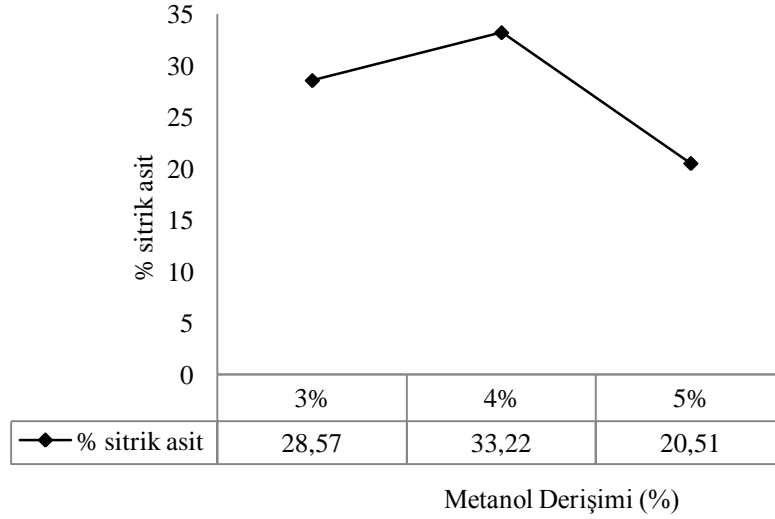
Toplam şeker derişiminin 144. saatte 140 g/L'den; %3'de 28 g/L'ye, %4'de 23 g/L'ye, %5'de 34 g/L'ye azaldığı tespit edilmiştir. Substratın kullanım yüzdesinin sırasıyla %80, %83,5 ve %75 olarak belirlenmiştir. Mikroorganizmanın yüksek

derişimlerde substratı verimli kullanmamasındaki neden hücresel yapının bozulmasından kaynaklanabilir. Ancak bu koşullarda verimlerin birbirine yakın olması substratın mikroorganizma tarafından verimli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir (Şekil 4.46D).



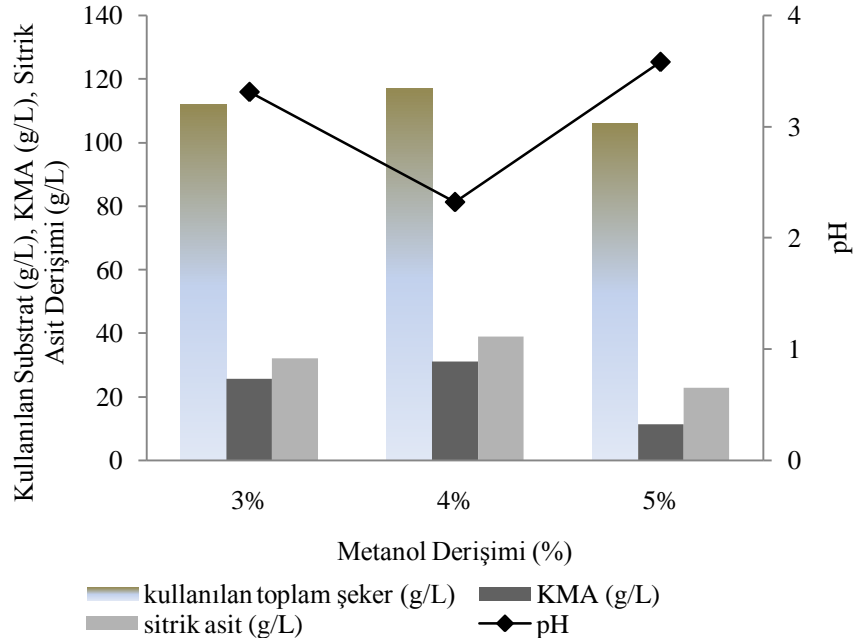
Şekil 4.46. Metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisi. (A:İnkübasyon ortamında pH değışimi, B:Sitrik asit derişiminin değışimi, C:Kuru misel ağırlığının değışimi, D:Toplam şeker derişiminin değışimi). ((Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Kullanılan toplam şeker başına sitrik asit üretim verimliliği hesaplandığında %3 metanol oranında %28,57, %4 metanol oranında %33,22, %5 metanol oranında ise %20,51 olarak bulunmuştur (Şekil 4.47). Bu sonuçlara göre sitrik asit üretimi için çalışmada kullanılan suş ve besiyeri ortamına göre en uygun metanol oranı %4'dür.



Şekil 4.47. İnkübasyonun 6. gününde metanol oranına bağlı sitrik asit üretim verimliliği (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

İnkübasyonun 6. gününde elde edilen tüm deney sonuçları birlikte değerlendirilecek olursa optimum metanol oranı %4 olduğu Şekil 4.48'da da görülmektedir.



Şekil 4.48. Optimum metanol oranının belirlenmesi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Kinetik parametreler diğerk ortamlarda olduğu gibi belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Mikroorganizmanın sitrik asit üretme verimliliğinin en yüksek 1,249 g/g ile %4'lük metanol oranında, en düşük ise %5'lik metanol oranında 0,946 g/g olduğu hesaplanmıştır. Ürün oluşum hızı olan  $q_p$ 'nin en yüksek %4 metanol oranında 0,009 g/g/h, en düşük ise 0,007 g/g/h ile %5 metanol oranında olduğu görülmüştür. Substrat tüketim hızı olan  $q_s$ 'nin, en yüksek %5 metanol oranında 0,031 g/g/h, en düşük ise %4 metanol oranında 0,029 g/g/h'dir.

Çizelge 4.11. Optimum metanol oranının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

%3 metanol

zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Q <sub>s</sub> (g/L/h)	Q <sub>x</sub> (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	qs (g/ghücre/h)
12	0,274	0,150	0,548	0,050	0,333	0,183	0,023	0,152
24	0,524	0,250	0,477	0,125	0,500	0,238	0,022	0,087
48	0,758	0,205	0,271	0,145	0,708	0,192	0,016	0,077
72	0,993	0,224	0,226	0,180	0,806	0,182	0,014	0,062
96	1,145	0,240	0,209	0,202	0,844	0,177	0,012	0,050
120	1,472	0,311	0,211	0,254	0,817	0,172	0,012	0,040
<b>144</b>	<b>1,207</b>	<b>0,286</b>	<b>0,237</b>	<b>0,222</b>	<b>0,778</b>	<b>0,184</b>	<b>0,008</b>	<b>0,029</b>
168	1,247	0,319	0,256	0,214	0,673	0,172	0,007	0,023
192	1,236	0,320	0,259	0,190	0,594	0,154	0,006	0,020

%4 metanol

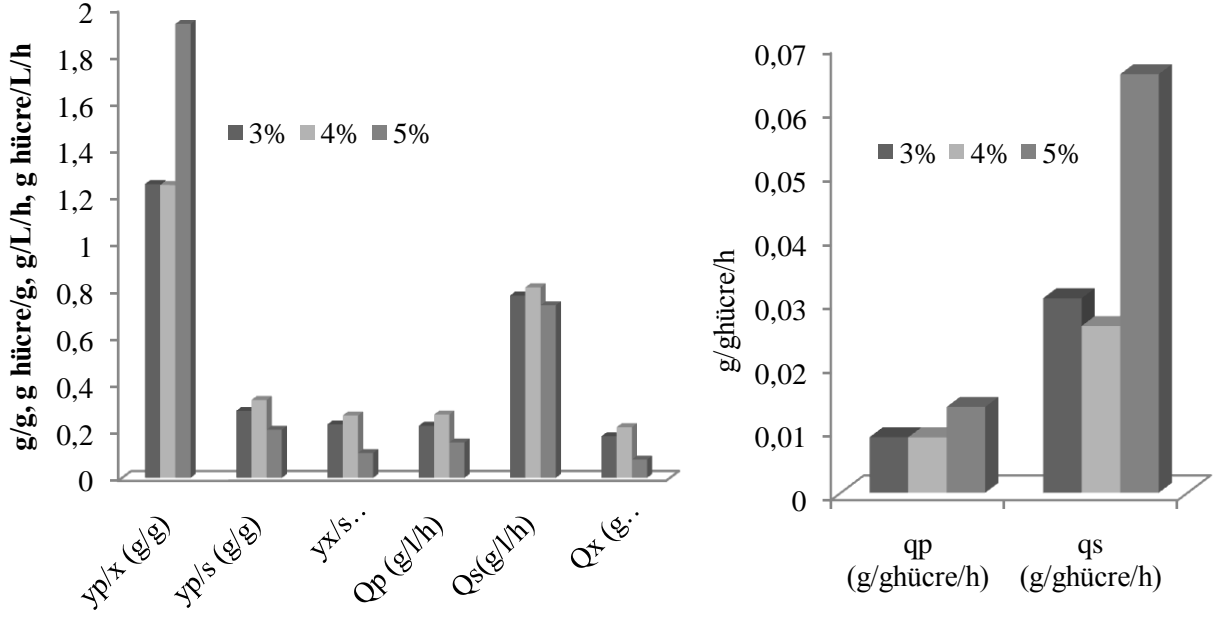
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Q <sub>s</sub> (g/L/h)	Q <sub>x</sub> (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	qs (g/ghücre/h)
12	0,226	0,250	1,105	0,042	0,167	0,184	0,019	0,075
24	0,586	0,219	0,373	0,146	0,667	0,249	0,024	0,112
48	1,038	0,225	0,216	0,211	0,938	0,203	0,022	0,096
72	0,968	0,220	0,228	0,202	0,917	0,209	0,013	0,061
96	1,136	0,240	0,211	0,225	0,938	0,198	0,012	0,049
120	1,214	0,319	0,263	0,274	0,858	0,225	0,010	0,032
<b>144</b>	<b>1,249</b>	<b>0,332</b>	<b>0,266</b>	<b>0,270</b>	<b>0,813</b>	<b>0,216</b>	<b>0,009</b>	<b>0,026</b>
168	1,160	0,309	0,267	0,221	0,714	0,190	0,007	0,022
192	1,176	0,314	0,267	0,198	0,630	0,168	0,006	0,019

%5 metanol

zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Q <sub>s</sub> (g/L/h)	Q <sub>x</sub> (g/L/h)	qp (g/g hücre/h)	qs (g/ghücre/h)
12	0,045	0,033	0,733	0,008	0,250	0,183	0,004	0,114
24	0,458	0,244	0,533	0,102	0,417	0,222	0,019	0,078
48	0,645	0,204	0,317	0,119	0,583	0,185	0,013	0,066
72	0,648	0,135	0,208	0,101	0,750	0,156	0,009	0,067
96	1,027	0,198	0,193	0,157	0,792	0,153	0,011	0,054
120	0,947	0,194	0,205	0,144	0,742	0,152	0,008	0,041
<b>144</b>	<b>0,946</b>	<b>0,215</b>	<b>0,227</b>	<b>0,158</b>	<b>0,736</b>	<b>0,167</b>	<b>0,007</b>	<b>0,031</b>
168	0,850	0,197	0,232	0,129	0,655	0,152	0,005	0,026
192	0,856	0,199	0,233	0,115	0,578	0,135	0,004	0,022



Kinetik parametrelerden tasarım için önemli olanların zamana bağlı grafiği çizildiğinde optimal metanol oranının %4 olduğu Şekil 4. 49'da görülmektedir.



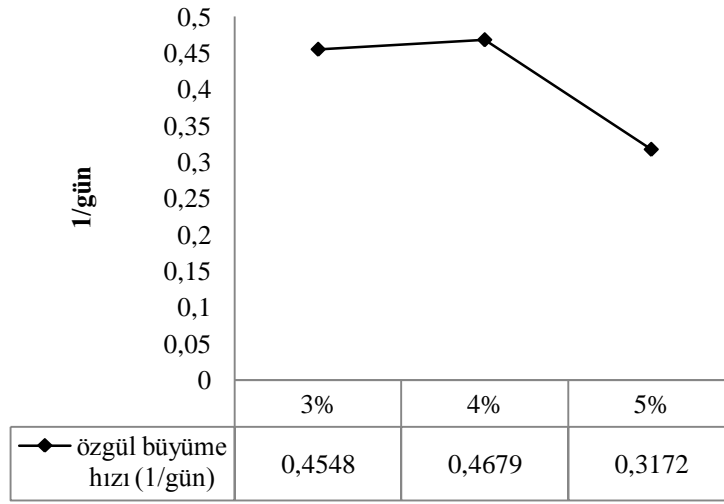
Şekil 4.49. İnkübasyonun 6. gününde metanol oranına bağlı kinetik parametrelerdeki değişim (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Kesikli düzende çalışan havalandırma biyoreaktör sisteminin kullanıldığı bu çalışmada optimum başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık (30°C), potasyum ferrosiyanür derişimi (200 mg/L), köpük önleyici olarak kullanılan mısır özü yağı derişimi (%2) ve havalandırma oranı sabit tutulmuştur.

Yarı katı ve sıvı faz fermentasyonlarda *A. niger*'in morfolojisi sitrik asit üretimi ile yakından ilgilidir. Morfolojiyi etkileyen ana faktörler ise, çalkalamanın uygulanma şekli ve hızı, ortamın başlangıç pH'sı, mikroorganizmanın büyüme hızı, iz elementler ve inokulasyonun derişimi ve tipidir [39].

Sitrik asit üretiminde metanol ilavesi sitrik asit üretimi yanında mikrobiyal büyümeyi de etkilemektedir. Optimal metanol oranı olarak belirlenen %4'lük

metanol oranında kuru misel ağırlığı, diğer metanol derişimlerinde elde edilen kuru misel ağırlıklarına göre daha yüksektir. Buna göre  $\mu$  katsayılarındaki değişim  $\mu(5\%) < \mu(3\%) < \mu(4\%)$  olarak belirlenmiştir. %5'lik metanol oranında özgül büyüme hızı düşük çıkmasındaki neden ise, ortama ilave edilen metanol oranının mikroorganizma için toksik etki göstermesinden olabilir (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. Farklı metanol derişimlerinin özgül büyüme hızına etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, havalandırma hızı 1 L/L/dakika, çalışma hacmi 1000 mL, mikroorganizma oranı %1, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

#### 4.5 KESİKLİ DÜZENDE ÇALIŞAN HAVALANDIRMALI KULE FERMENTÖRÜNDE *Aspergillus niger* İLE PORTAKAL HİDROLİZATI VE MELAS İÇERİKLİ BESİYERİ ORTAMINDA OPTİMUM SİTRİK ASİT ÜRETİM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

##### 4.5.1. Havalandırma Hızının Etkisi

Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörüne hava, akış hızı ayarlanabilen akvaryum pompaları ile verildi. Düzenli olarak oksijen değeri ölçülerek içerdeki havalandırmanın sabit kalması sağlandı. Optimum havalandırma hızının belirlenmesi için 0,5 L/L/dakika, 1,0 L/L/dakika ve 1,5 L/L/dakika olacak

şekilde havalandırma yapılmıştır. Sisteme üç farklı yerden hava verilerek içerdeki hava oranı oksijen metre ile ölçülmüştür.

Belirlenen hava oranlarında pelet yapısında değişiklik olduğu tespit edilmiştir. Düşük havalandırma yapıldığında peletlerin daha küçük ve dağınık olduğu görülmüştür. Optimum havalandırma olarak 1,0 L/L/dakika belirlenmiştir. Bu koşullarda gelişen mikroorganizma Şekil 4.51’de verilmiştir.



Şekil 4.51. Portakal Hidrolizati ve ön işlemden geçirilmiş melasın substrat olarak kullanıldığı ortamda sitrik asit üretimi (Kesikli düzende çalışan kule fermentöründe optimum koşullarda gelişen peletler)

Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü çalışmasında optimum havalandırma hızının belirlenmesi için yapılan çalışmada elde edilen deney sonuçlarına göre, 1 L/L/dakika’dan fazla havalandırma hızlarında sitrik asit üretiminin düşük olduğu görülmüştür. Havalandırma hızlarına bağlı olarak toplam şeker kullanımı, sitrik asit üretimi ve mikroorganizma gelişimlerinin de değişmektedir.

Endüstriyel sitrik asit üreticiler kesikli sistemlerde havalandırma hızının farklı ve yüksek olması ürün üzerinde zarar verici etkiye neden olmaktadır. Eğer havalandırma hızı çok yüksek olursa ortamdaki çözünmüş CO<sub>2</sub> oranı çok düşük olabilir. Karbondioksit, pürivat karboksilat için önemli bir substrattır. Kullanılabilir karbondioksit, pürivat karboksilat reaksiyonunun devamında pürivat dekarboksilaz reaksiyonu sonucu üretilir. Eğer havalandırma çok yüksek olursa bu enzimlerin aktivasyonlarından dolayı üretim az olacaktır. McIntyre ve McNeil (1997) bu reaksiyonlar sonucu son kuru misel ağırlığı ve sitrik asit üretiminin de az olacağını

tespit etmişlerdir [154]. Besiyeri içeriğinde oksijenin doygunluğa ulaşması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunun için yapılan en önemli çalışma ise çeşitli yağların ilave edilmesidir. Adham (2002) tarafından yapılan çalışmada sitrik asit üretimi için çeşitli yağların etkisi araştırılmıştır. Sitrik asit üretiminin mısırözü yağı, zeytinyağı, ayçiçeği yağının kullanıldığı koşullarda daha yüksek olduğu bulunmuştur [130]. Kılıç tarafından yapılan yüksek lisans tezinde substrat olarak melasın kullanıldığı sitrik asit üretim çalışmasında %2 mısır özü yağı derişiminin sitrik asit üretimini arttırdığı tespit edilmiştir [74]. Bu doktora çalışmasında da mısır özü yağı, hem köpük kırıcı olarak hem de oksijenin doygunluk seviyesine ulaşması için yardımcı katkı maddesi olarak kullanılmıştır.

Ortam pH'sındaki azalma en iyi 1,0 L/L/dakika havalandırma hızının olduğu koşulda gözlenmiştir. İnkübasyonun 6. gününde 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 2,78, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 2,01, 1,5 L/L/dakika havalandırma hızında ise 3,02'ye azalmıştır. 1,5 L/L/dakika'lık havalandırma hızının olduğu koşulda pH değişiminde bir dalgalanma gözlenmiştir (Şekil 4.52A). Dalgalanmanın nedeni enzimatik reaksiyonlar olabilir.

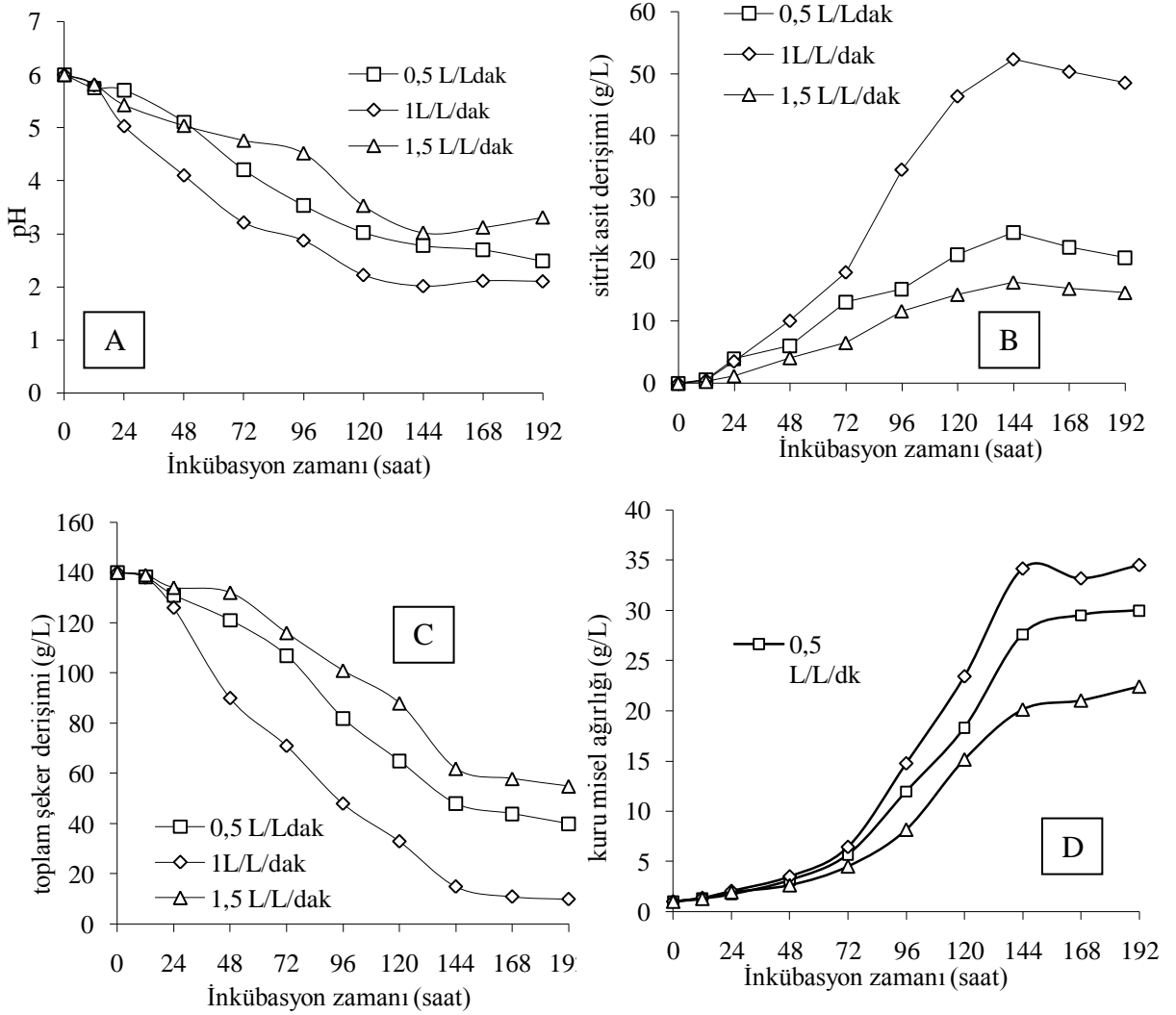
Havalandırma hızına bağlı olarak sitrik asit üretim verileri Şekil 4.52B'de değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek sitrik asit üretimi 1,0 L/L/dakika'da, en düşük asit üretimi ise 1,5 L/L/dakika'da tespit edilmiştir. Havalandırma hızı arttıkça enzimatik reaksiyonlarda inhibisyonlar nedeniyle sitrik asit üretimi azalmaktadır. Düşük havalandırma oranlarında ise mikroorganizmanın gelişimi yavaşladığı için sitrik asit üretimi de düşmektedir. Ayrıca düşük havalandırma oranlarında pelet gelişimi de zayıftır. İnkübasyonun sonuna doğru dağımık üremeler gözlenmiş ve pelet yapısı bozulmuştur.

İnkübasyonun 6. gününde üretilen sitrik asit derişimi; 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 24,39 g/L, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 52,39 g/L, 1,5 L/L/dakika havalandırma hızında ise 16,32 g/L olarak hesaplanmıştır.

Kuru misel ağırlığı, mikroorganizma gelişimi ile ilgilidir. Ön inkübasyonda ortama hazırlanan mikroorganizmalar Kesikli düzende çalışan havalandırma kule fermentörüne alındıktan hemen sonra numuneler alınmıştır. 24. saate kadar 3. kez örnekleme yapılmıştır. 24.saatten sonra numuneler 24 saat aralıklarla alınmıştır.

Metanol ilavesi 24. saatte yapılmıştır. Mikrobiyal büyüme kütleli olarak en yüksek 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında gözlenmiştir (Şekil 4.52C). İnkübasyonun 6. gününde kuru misel ağırlığı; 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 27,67 g/L, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 34,19 g/L, 1,5 L/Ldakika havalandırma hızında ise 20,14 g/L olarak hesaplanmıştır. En düşük mikrobiyal gelişme en yüksek havalandırma koşulunda (1,5 L/L/dakika) belirlenmiştir.

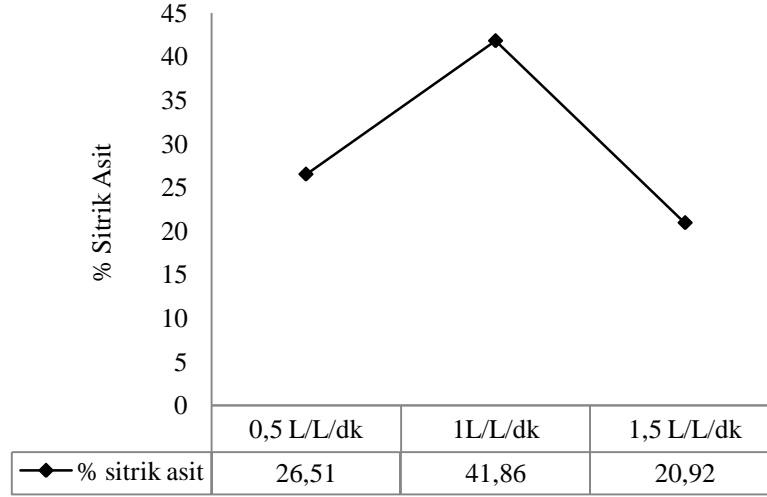
Havalandırma hızına bağlı olarak toplam şeker kullanımı ile ilgili veriler Şekil 4.52D'de değerlendirilmiştir. Ortama ilave edilen substratların en iyi şekilde kullanılması için ortam havalandırma hızının çok önemli olduğu tespit edilmiştir. En yüksek substrat kullanımı 1,0 L/L/dakika da, en düşük ise 1,5 L/L/dakika'da belirlenmiştir. Havalandırma hızının yüksek olması mikroorganizma gelişimini etkilemesi nedeniyle substratın kullanımını da etkilemektedir. Sitrik asit üretimi ise mikroorganizma morfolojisi ve gelişimi ile yakından ilgilidir. İnkübasyonun 6. gününde kalan toplam şeker içeriği; 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 48 g/L, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 15 g/L, 1,5 L/Ldakika havalandırma hızında ise 62 g/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.52. Farklı havalandırma hızlarının sitrik asit üretimine etkisi (A:İnkübasyon ortamında pH değışimi, B:Sitrik asit derişiminin değışimi, C:Kuru misel ağırlığının değışimi, D:Toplam şeker derişiminin değışimi). (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

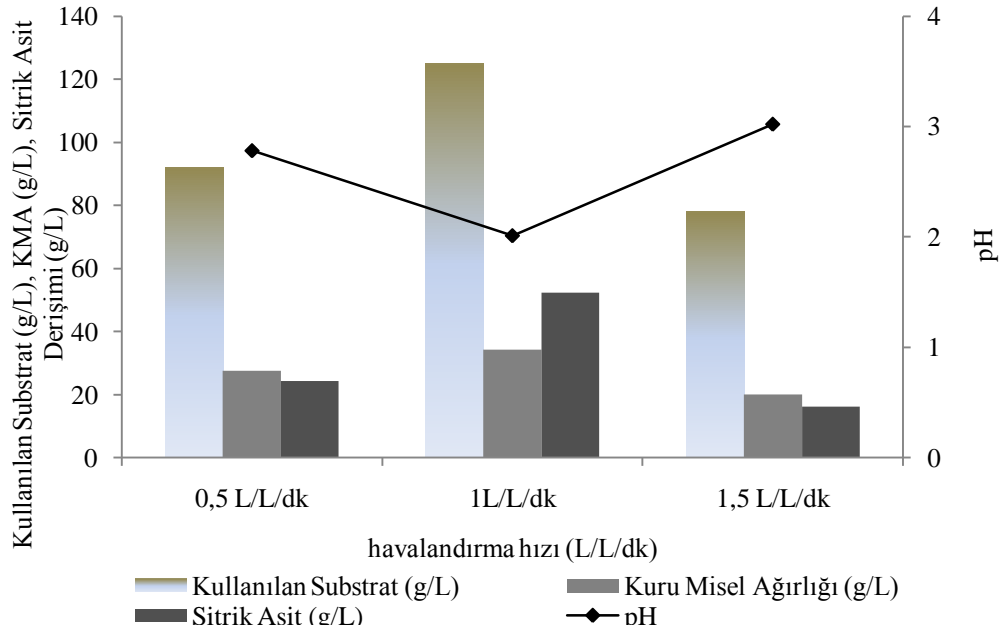
Havalandırma oranı da diğler parametrelerde olduğu mikroorganizmaya değışiklik göstermektedir. Ancak sitrik asit üretimi sırasında *A. niger* yüksek havalandırma hızına ihtiyaç duymaktadır. Havalandırma ihtiyacı ayrıca kullanılan besiyeri ortamı ve fermentörün büyüklüğüne göre de değışmektedir[36]. Besiyeri içerisinde doygun çözünmüş oksijen derişiminin yüksek olması sitrik asit üretimini tetiklemektedir [154] Bu çalışmada maksimum sitrik asit üretimi ve kullanılan topla şeker temelinde sitrik asit üretim verimliliği 1L/L/dakika havalandırma oranında

bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kullanılan toplam şeker temelinde sitrik asit üretim verimliliği 0,5 L/L/dakika da %26,51, 1 L/L/dakika da %41,86, 1,5 L/L/dakika da %20,92 olarak hesaplanmıştır (Şekil4.53)



Şekil 4.53. Farklı havalandırma hızlarında kullanılan substrat başına hesaplanan sitrik asit verimliliği (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

İnkübasyonun 6. gününde üretilen sitrik asit derişimi, kullanılan substrat derişimi, ortam pH'sı ve kuru misel ağırlığı sonuçlarını bir arada değerlendirilmiştir (Şekil 4.54). 1 L/L/dakika havalandırma hızı sitrik asit üretimi için en uygun havalandırma olduğu görülmüştür. Bu koşul, substratın en verimli şekilde kullanıldığı, sitrik asit üretiminin en yüksek olduğu, mikroorganizmanın en verimli şekilde ürediği koşuldur (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. Farklı havalandırma hızlarının sitrik asit üretimi üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Havalandırma hızı ile ilgili deney sonuçlarının değerlendirilerek hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.12’de verilmiştir. Buna inkübasyonun 6. gününde mikroorganizma başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/x}$ ); 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 0,882 g/g, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 1,531 g/g, 1,5 L/L/dakika havalandırma hızında ise 0,810 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/s}$ ); 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 0,265 g/g, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 0,419 g/g, 1,5 L/L/dakika havalandırma hızında ise 0,209 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen mikroorganizma oranı ( $y_{x/s}$ ); 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 0,301 g/g, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 0,274 g/g, 1,5 L/L/dakika havalandırma hızında ise 0,258 g/g olarak hesaplanmıştır. Düşük havalandırma hızında substrat daha yüksek kullanılıyor görünse de üretilen ürün açısından 1,0 L/L/dakika en optimum havalandırma hızıdır. Diğer kinetik parametreler de aynı şekilde belirlenmiştir.



Çizelge 4.12. Optimum havalandırma hızının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler(Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

0,5 L/L/dakika

zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	qp(g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)
12	0,448	0,333	0,744	0,050	0,150	0,037	0,112	0,115
24	2,291	0,446	0,194	0,167	0,375	0,095	0,073	0,192
48	1,911	0,318	0,166	0,126	0,396	0,040	0,066	0,149
72	2,292	0,397	0,173	0,182	0,458	0,032	0,079	0,101
96	1,269	0,263	0,207	0,159	0,604	0,013	0,125	0,074
120	1,131	0,277	0,245	0,173	0,625	0,009	0,153	0,041
<b>144</b>	<b>0,882</b>	<b>0,265</b>	<b>0,301</b>	<b>0,169</b>	<b>0,639</b>	<b>0,006</b>	<b>0,192</b>	<b>0,032</b>
168	0,743	0,229	0,308	0,131	0,571	0,004	0,176	0,027
192	0,677	0,203	0,300	0,106	0,521	0,004	0,156	0,023

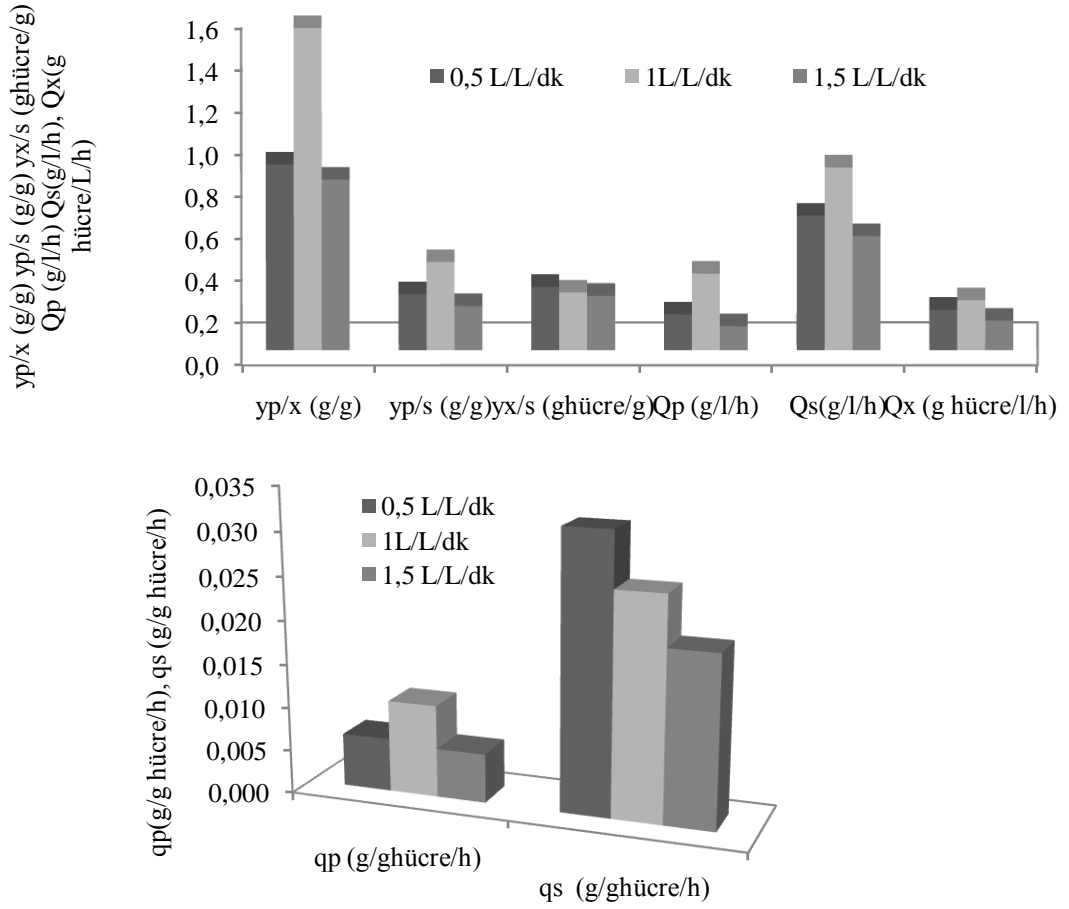
1 L/L/dakika

zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	qp (g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	qs(g/g hücre/h)
12	0,365	0,250	0,685	0,042	0,167	0,030	0,114	0,122
24	1,728	0,254	0,147	0,148	0,583	0,072	0,086	0,283
48	2,880	0,202	0,070	0,211	1,042	0,060	0,073	0,297
72	2,781	0,260	0,093	0,249	0,958	0,039	0,090	0,149
96	2,335	0,375	0,161	0,359	0,958	0,024	0,154	0,065
120	1,977	0,433	0,219	0,386	0,892	0,016	0,195	0,038
<b>144</b>	<b>1,531</b>	<b>0,419</b>	<b>0,274</b>	<b>0,363</b>	<b>0,868</b>	<b>0,011</b>	<b>0,237</b>	<b>0,025</b>
168	1,516	0,390	0,257	0,300	0,768	0,009	0,198	0,023
192	1,405	0,373	0,266	0,253	0,677	0,007	0,180	0,020

1,5 L/L/dakika

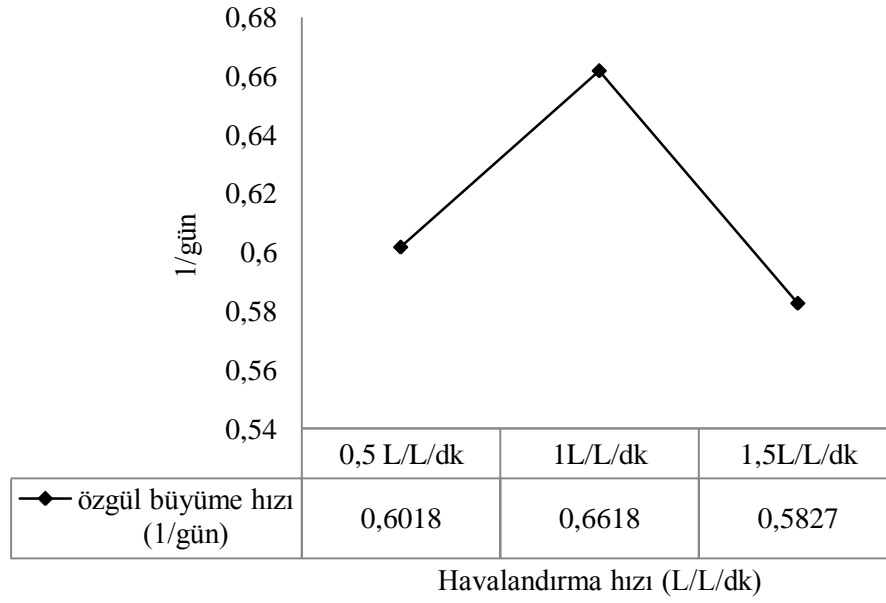
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (g hücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	qp (g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	qs (g/g hücre/h)
12	0,231	0,300	1,300	0,025	0,083	0,019	0,108	0,062
24	0,615	0,200	0,325	0,050	0,250	0,026	0,081	0,143
48	1,555	0,515	0,331	0,086	0,167	0,032	0,055	0,053
72	1,451	0,273	0,188	0,091	0,333	0,020	0,063	0,058
96	1,427	0,299	0,210	0,122	0,406	0,015	0,085	0,034
120	0,945	0,276	0,292	0,120	0,433	0,008	0,126	0,024
<b>144</b>	<b>0,810</b>	<b>0,209</b>	<b>0,258</b>	<b>0,113</b>	<b>0,542</b>	<b>0,006</b>	<b>0,140</b>	<b>0,020</b>
168	0,728	0,187	0,257	0,091	0,488	0,004	0,125	0,017
192	0,653	0,172	0,264	0,076	0,443	0,003	0,117	0,015

İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametreler Şekil 4.55’de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda optimum havalandırma hızı kesin olarak ortaya çıkmıştır. 1 L/L/dakika’da üretilen mikroorganizmanın sitrik asit üretimi diğer koşullara göre oldukça yüksektir. Ayrıca saatte kullanılan substrat ve ürün sentezi açısından da maksimum üretim ve kullanım miktarı 1 L/L/dakika’lık havalandırma koşulunda gözlenmiştir. Kubicek ve Rohr (1986) yüksek hava akış hızı ya da saf oksijen ile havalandırma sitrik asit üretimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Bu makaleye göre fermentasyonda saf oksijen kullanımı prosesi pahalı yapacağı ve proste kullanılan gaz kullanıldıktan sonra CO<sub>2</sub>’i ayrılıp tekrar sisteme verilebileceği bildirilmiştir. [45]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda 1 L/L/dakika’lık havalandırma hızının sitrik asit üretimi için uygun olduğu saptanmıştır. ve Babeipour (2002) tarafından elma posalarıyla yapılan sitrik asit üretim çalışmasında sitrik asit üretiminin 0,8 L/L/dakika’lık havalandırma koşulunda maksimum olduğu ve havalandırma hızının 1,4 L/L/dakika’e çıkmasıyla sitrik asit üretiminin yarı yarıya düştüğü görülmüştür [56]. Haq ve ark [36] ve Sanjay ve Sarma [155] tarafından yalpan çalışmalarda maksimum sitrik asit üretimi 1 L/L/dakika havalandırma hızında saptanmış ve bu değer üzerindeki havalandırma hızında üretimin düştüğü saptanmıştır. Portakal hidrolizatı ve melasın substrat olarak kullanıldığı bu çalışmada da diğer çalışmalarda da elde edildiği gibi maksimum sitrik asit üretimi 1L/L/dakika’da belirlenmiştir.



Şekil 4.55. Farklı havalandırma hızlarının inkübasyonun 6. gününde kinetik parametreler üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Özgül büyüme hızı ( $\mu$ ), ortam koşullarına bağlıdır. Mikroorganizma büyümesi ile yakından ilgilidir. Havalandırma hızına bağlı olarak hesaplanan özgül büyüme hızları 0,5 L/L/dakika havalandırma hızında 0,6018 gün<sup>-1</sup>, 1,0 L/L/dakika havalandırma hızında 0,6622 gün<sup>-1</sup>, 1,5 L/L/dakika havalandırma hızında ise 0,5827 gün<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. Farklı havalandırma hızlarının özgül büyüme hızı üzerine etkisi (Başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, %4 metanol, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

#### 4.5.2. Mikroorganizma oranının Etkisi

Çalışmanın bu aşaması, ön inkübasyon sonucunda üretilen mikroorganizmaların Kesikli düzende çalışan havalandırma kule fermentörüne aktarılma oranı ile ilgilidir. Ön inkübasyonda ortama mikroorganizmalar daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi aktarıldı. Kesikli düzende çalışan havalandırma kule fermentörünün çalışma hacmi 750 mL'dir. Ön inkübasyonda gelişen mikroorganizmaların fermentöre steril koşullarda aktarılması %2 (15 mL), %3 (22,5 mL) ve %4 (30 mL) olacak şekilde yapılmıştır. Ekim derişimi sitrik asit üretimi arttırmaktadır. Ancak aşırı mikroorganizma oranı ideal değildir [ 128, 129]. Çalışma koşulları; 1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mikroorganizma oranı %2, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L olarak sabit tutulmuştur.

Deney sonucu elde edilen verilere göre; inkübasyonun 6.gününde %2, %3 ve %4'lük mikroorganizma oranı koşullarında ortam pH'sı sırasıyla 2,68, 2,01, 2,34 olarak; kuru misel ağırlığı sırasıyla 21,14 g/L, 34,19 g/L, 48,32 g/L olarak, sitrik asit

derişimi sırasıyla 38,7 g/L, 52,33 g/L,46,08 g/L; kalan toplam şeker derişimi ise 48 g/L, 15 g/L, 26 g/L olarak bulunmuştur.

İnoküle edilen mikroorganizma oranı arttıkça mikroorganizmaların gelişimi de değişmektedir. Yüksek derişimlerde mikroorganizma gelişimi daha hızlı ve hacimce fazla olsa da morfolojisi değişiklik göstermektedir. İnokülasyon derişimi arttıkça pelet yapısı küçülmekte ve dağınık üremeleri artmaktadır.

Ortam pH'sındaki değişim incelendiğinde mikroorganizma oranı en düşük olan ortamda pH azalması mikroorganizma oranı en fazla olan ortama göre daha azdır. Ancak en iyi pH azalması %3'lük mikroorganizma oranının olduğu koşulda gözlenmiştir (Şekil 4.57A).

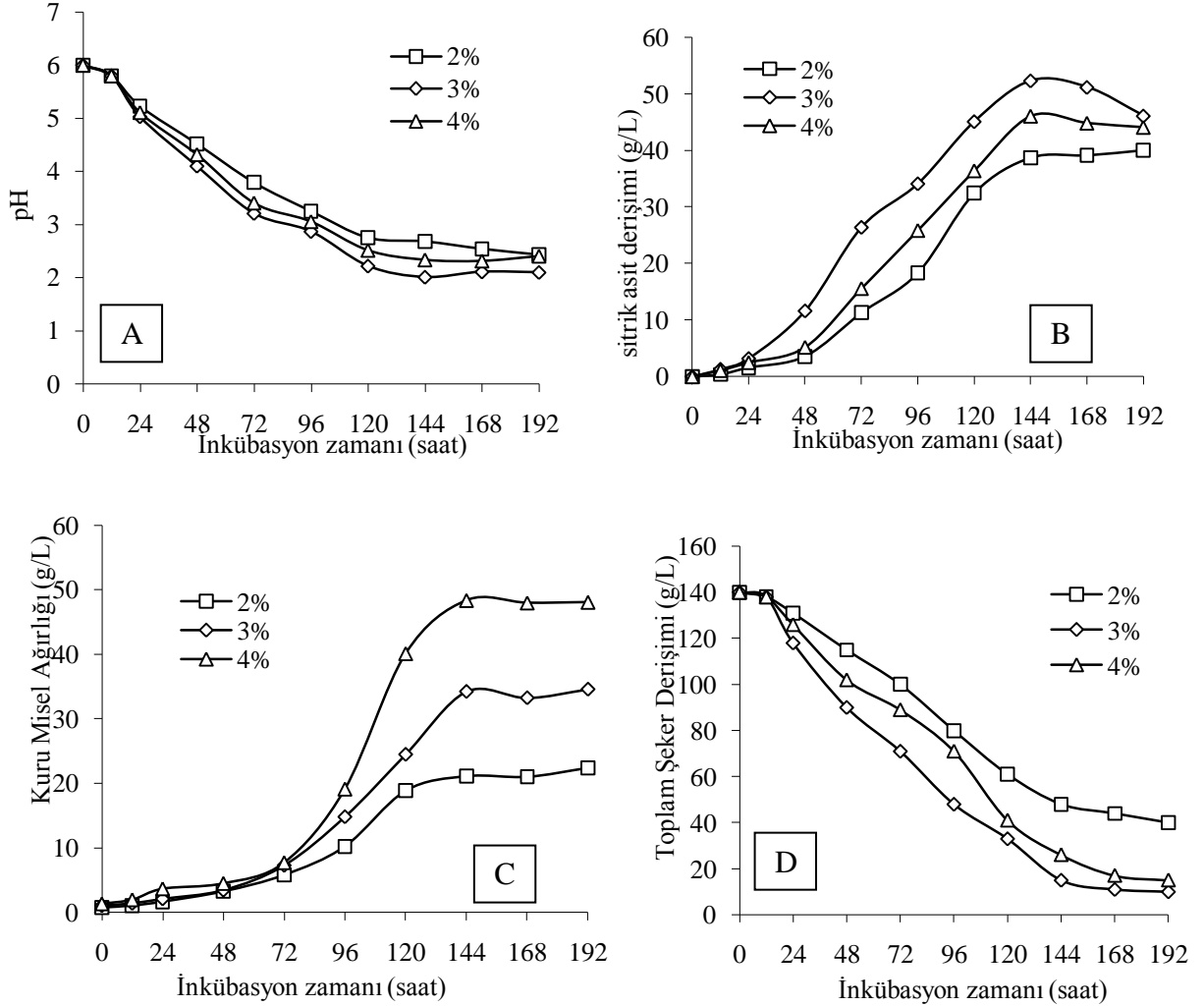
Sitrik asit üretimi de substrat kullanımına ve mikroorganizma gelişimine bağlı olarak değişmektedir. Kuru misel ağırlığında ve toplam şeker derişiminde oluşan değişime paralel olarak sitrik asit üretimi de %3'lük mikroorganizma oranının olduğu koşullarda en yüksektir. İnkübasyonun 144. saatinde sitrik asit derişimindeki azalma ise mikroorganizmaların sitrik asidi besi maddesi olarak kullanmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 4. 57B). Sitrik asit üretimi çalışmasında yüksek aşılama oranı, fermentasyonun ilk fazında düşük çözünmüş oksijen seviyesine neden olur. Bu durum da amonyum iyonlarının yavaş alımı ile ilişkilidir.

Miseller dağılmış morfolojide gelişirken besiyeri ortamında önemli seviyede glikozamin oluşur bu da sitrik asit üretimi engeller [148].

En yüksek mikroorganizma gelişimi, mikroorganizma oranı %4 olan koşulda görülmüştür (Şekil 4.57C). İnkübasyonun 72. saatine kadar mikroorganizmalar pelet yapılarını oluşturmuş ortama alışma süreleri tamamlanmış ve gelişimleri hızlı bir şekilde artmaya devam etmiştir. 72. saatten sonra ise mikroorganizma oranı yüksek olan %4'lük koşulda mikroorganizma gelişimi daha fazla olmuş, en düşük olan %2'lik koşulda en az olmuştur (Şekil 4.57C).

Substrat kullanımı açısından veriler değerlendirildiğinde mikroorganizma oranı substratın kullanımını etkilemektedir. Substrat kullanımı, %3'ük mikroorganizma oranında en yüksek, %2'lik mikroorganizma oranında ise en düşüktür. Pelet yapısı ise %2'lik mikroorganizma oranında belirgin ve daha büyüktür. Pelet genişliği asit

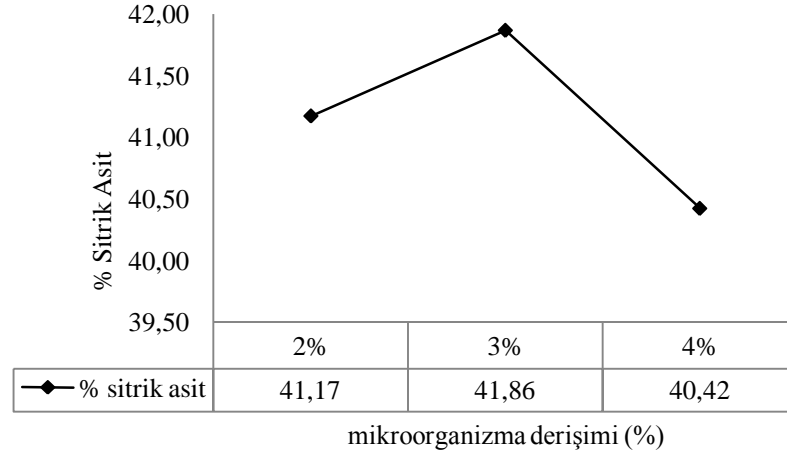
verimliliğini artırsa da mikroorganizma oranının yetersizliği nedeniyle substrat kullanımını düşüktür (Şekil 4.57D).



Şekil 4.57. Farklı mikroorganizma derişimlerinin zamana bağlı ortam pH'sındaki değişim (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30oC, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

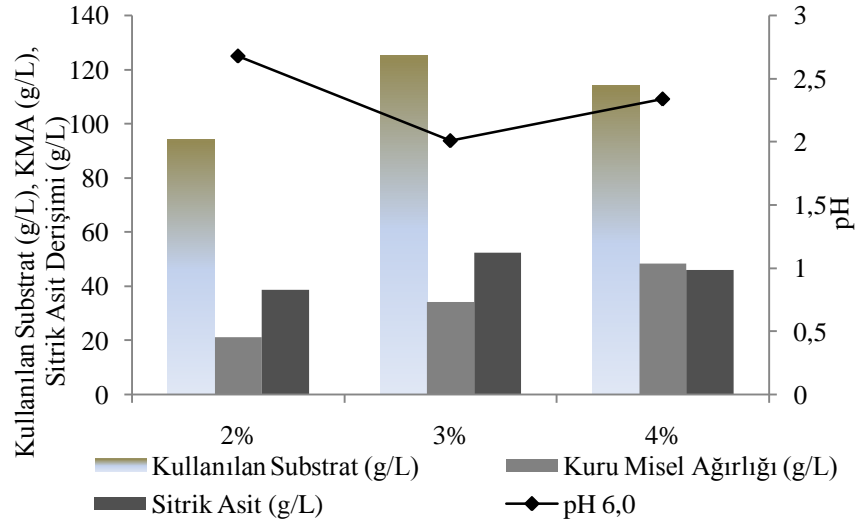
Farklı mikroorganizma derişimlerinin sitrik asit üretimi üzerine etkisinin belirlenmesinde sitrik asit verimliliği oldukça önemlidir. Kullanılan toplam şeker temelinde sitrik asit üretim verimliliği %2 mikroorganizma oranında %41,17, %3 mikroorganizma oranında %41,86, %4 mikroorganizma oranında ise %40,42 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.58). Her çalışmada kullanılan mikroorganizma oranı

birbirinden farklıdır. Melasın substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada mikroorganizma oranında maksimum üretim %1 mikroorganizma oranında belirlenmiştir [149]. Melasla ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise %4 mikroorganizma oranında sitrik asit üretimi açısından maksimum sonuç bulunmuştur [36]. Yapılan bu çalışmada ise maksimum sitrik asit üretimi %3 mikroorganizma oranında bulunmuştur.



Şekil 4.58. Farklı mikroorganizma derişimlerinde kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit üretim verimliliği (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

İnkübasyonun 6. gününde üretilen sitrik asit derişimi, kullanılan substrat derişimi, ortam pH'sı ve kuru misel ağırlığı sonuçlarını bir arada değerlendirilmiştir (Şekil 4.59). %3'lük mikroorganizma oranı sitrik asit üretimi için en uygun havalandırma olduğu belirlenmiştir. Bu koşul, substratın en verimli şekilde kullanıldığı, sitrik asit üretiminin en yüksek olduğu, mikroorganizmanın en verimli şekilde ürettiği koşuldur (Şekil 4.59). Sitrik asit üretim verimliliği açısından mikroorganizma oranının etkisinin düşük gibi görünse de sitrik asit üretimi substratın kullanılması ve misel yapısı açısından optimum mikroorganizma oranı %3'dür.



Şekil 4.59. Farklı mikroorganizma derişimlerinin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Mikroorganizma oranı ile ilgili deney sonuçlarının değerlendirilerek hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.13'de verilmiştir. Buna inkübasyonun 6. gününde mikroorganizma başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/x}$ ); %2 mikroorganizma oranında 1,831 g/g, %3 mikroorganizma oranında 1,531 g/g, %4 mikroorganizma oranında ise 0,954 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/s}$ ); %2 mikroorganizma oranında 0,421 g/g, %3 mikroorganizma oranında 0,419 g/g, %4 mikroorganizma oranında ise 0,404 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen mikroorganizma oranı ( $y_{x/s}$ ); %2 mikroorganizma oranında 0,230 g/g, %3 mikroorganizma oranında 0,274 g/g, %4 mikroorganizma oranında ise 0,424 g/g olarak hesaplanmıştır. %2 mikroorganizma oranında sitrik asit üretimi daha yüksektir. Ancak mikroorganizmanın substratı kullanım verimliliği %4 mikroorganizma oranında daha yüksektir. Bu da tamamen mikroorganizma oranı ile ilgilidir. Ancak sitrik asit üretimi en yüksek %3 mikroorganizma oranında tespit edilmiştir.



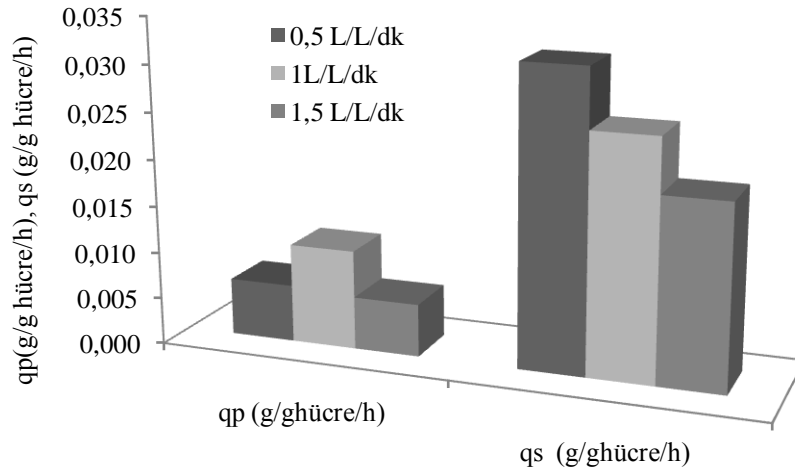
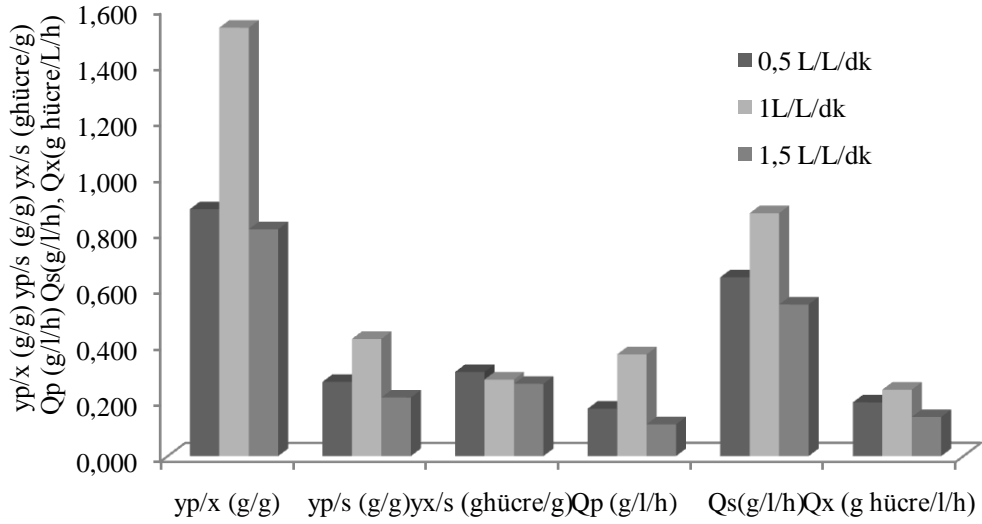
Çizelge 4.13. Optimum mikroorganizma oranının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağ% 2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

%2								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/g hücre/h)
12	0,388	0,200	0,515	0,033	0,167	0,032	0,086	0,162
24	0,982	0,178	0,181	0,067	0,375	0,041	0,068	0,230
48	1,115	0,144	0,129	0,075	0,521	0,023	0,067	0,161
72	1,952	0,283	0,145	0,157	0,556	0,027	0,080	0,096
96	1,795	0,306	0,171	0,191	0,625	0,019	0,107	0,061
120	1,720	0,411	0,239	0,271	0,658	0,014	0,157	0,035
<b>144</b>	<b>1,831</b>	<b>0,421</b>	<b>0,230</b>	<b>0,269</b>	<b>0,639</b>	<b>0,013</b>	<b>0,147</b>	<b>0,030</b>
168	1,859	0,407	0,219	0,233	0,571	0,011	0,125	0,027
192	1,784	0,400	0,224	0,208	0,521	0,009	0,117	0,023

%3								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/g hücre/h)
12	0,365	0,250	0,685	0,042	0,167	0,030	0,114	0,122
24	1,728	0,254	0,147	0,148	0,583	0,072	0,086	0,283
48	2,965	0,202	0,068	0,211	1,042	0,062	0,071	0,305
72	2,474	0,260	0,105	0,249	0,958	0,034	0,101	0,132
96	2,335	0,375	0,161	0,359	0,958	0,024	0,154	0,065
120	1,896	0,433	0,229	0,386	0,892	0,016	0,204	0,036
<b>144</b>	<b>1,531</b>	<b>0,419</b>	<b>0,274</b>	<b>0,363</b>	<b>0,868</b>	<b>0,011</b>	<b>0,237</b>	<b>0,025</b>
168	1,516	0,390	0,257	0,300	0,768	0,009	0,198	0,023
192	1,405	0,373	0,266	0,253	0,677	0,007	0,180	0,020

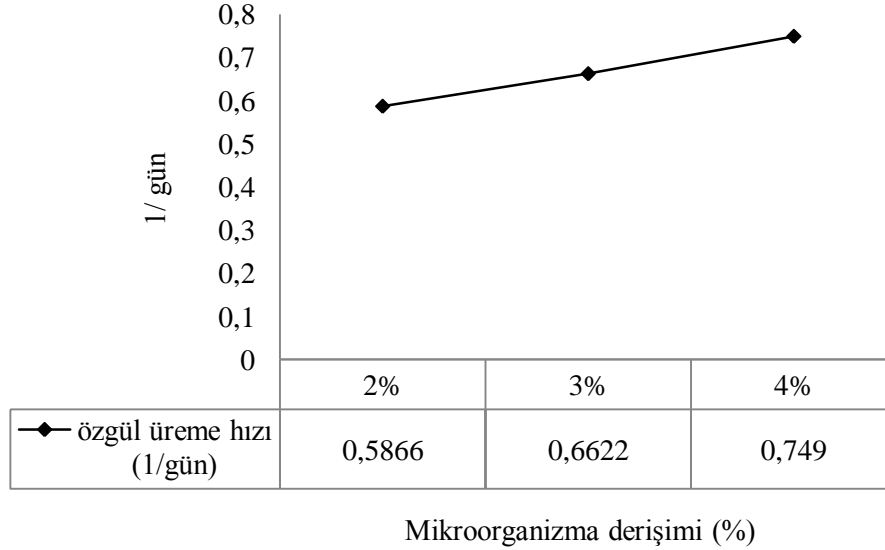
%4								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,567	0,550	0,970	0,092	0,167	0,047	0,162	0,086
24	0,687	0,179	0,260	0,104	0,583	0,029	0,152	0,160
48	1,163	0,137	0,118	0,108	0,792	0,024	0,093	0,177
72	2,029	0,306	0,151	0,217	0,708	0,028	0,107	0,092
96	1,355	0,375	0,277	0,269	0,719	0,014	0,199	0,038
120	0,909	0,368	0,405	0,304	0,825	0,008	0,334	0,021
<b>144</b>	<b>0,954</b>	<b>0,404</b>	<b>0,424</b>	<b>0,320</b>	<b>0,792</b>	<b>0,007</b>	0,336	<b>0,016</b>
168	0,935	0,365	0,390	0,267	0,732	0,006	0,285	0,015
192	0,918	0,353	0,384	0,230	0,651	0,005	0,250	0,014

İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametreler Şekil 4.60'de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda optimum mikroorganizma oranı %3 olarak ortaya çıkmıştır. Mikroorganizma başına sitrik asit üretiminin ve saat başına substrat kullanımı %3 mikroorganizma oranında maksimumdur.



Şekil 4.60. Farklı mikroorganizma derişimlerinin kinetik parametreler üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30oC, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Özgül büyüme hızı ( $\mu$ ), mikroorganizma oranı ile yakından ilgilidir. Mikroorganizma oranına bağlı olarak özgül büyüme hızı da artmıştır. Mikroorganizma oranına bağlı olarak hesaplanan özgül büyüme hızları %2 mikroorganizma oranında  $0,5866 \text{ gün}^{-1}$ , %3 mikroorganizma oranında  $0,6622 \text{ gün}^{-1}$ , %4 mikroorganizma oranında ise  $0,7490 \text{ gün}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.61).



Şekil 4.61. Farklı mikroorganizma derişimlerinin özgül büyüme hızına etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  derişimi 200 mg/L)

#### 4.5.3. Başlangıç pH Değerinin Etkisi

Çalışmanın bu aşaması, hazırlanan besiyeri ortamının pH'sı ile ilgilidir. *A. niger* sitrik asitin yanında oksalik ve glukonik asit olmak üzere birçok asiti de üretme yeteneğine sahiptir. Bu asitlerin üretim derişimleri ise başlangıç pH'sı ile yakından ilgilidir. pH 6,0 değerinde başlayan bir fermentasyonda öncelikle oksalik asit oluşmakta ve daha sonra üretilen diğer yan ürünlerle, ortamda  $\text{H}^+$  iyonu derişiminin artmasıyla fermentasyon sitrik asit üretimine dönmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre başlangıç pH'sı değıştikçe inkübasyon zamanına bağlı olarak ortam pH'sında azalma farklılık göstermiştir. Ayrıca substrat kullanımı ve ürün üretimi de değışkenlik göstermiştir. İnkübasyon periyodununun 144. saatinde başlangıç pH'sı 5,5 olan ortamda pH 2,56, sitrik asit 34,57 g/L, kalan toplam şeker 31 g/L ve kuru misel ağırlığı 27,76 g/L olarak bulunmuştur. Başlangıç

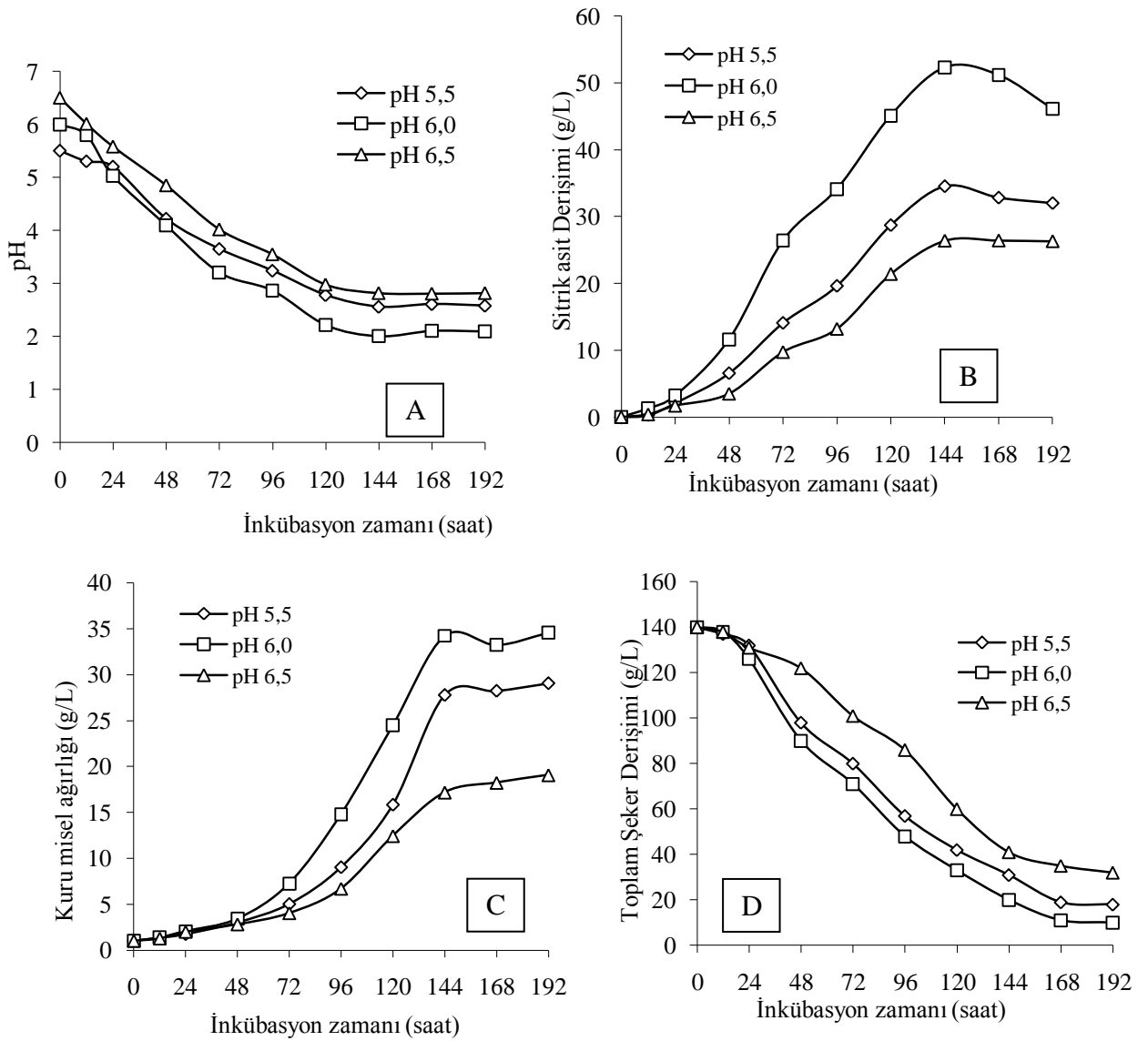
pH'sı 6,0 olan koşulda ise ortamda pH 2,01, sitrik asit 52,33 g/L, kalan toplam şeker 15 g/L ve kuru misel ağırlığı 34,19 g/L olarak bulunmuştur. Başlangıç pH'sı 6,5 olan koşulda ise ortamda pH 2,82, sitrik asit 26,41 g/L, kalan toplam şeker 41 g/L ve kuru misel ağırlığı 17,18 g/L olarak bulunmuştur

Sitrik asit üretim çalışmalarında en önemli parametrelerden biri başlangıç pH'sıdır. Fermentasyon sırasında tampon çözelti kullanılmaz. *A.niger* bulunduğu koşullara uygun olarak sentezleyeceği ürünü belirler. Seçilen başlangıç pH aralığı oldukça hassas belirlenmiştir. Bundan önce yapılan çalışmalarda elde edilen veriler doğrultusunda bu aralık seçilmiştir. En fazla pH azalışı pH 6,0'da en az pH azalışı ise pH 6,5'da görülmüştür (Şekil 4.62A).

Sitrik asit üretimi açısından ise, başlangıç pH'sı 6,0 olan koşulda en yüksek, pH 6,5'da ise en düşük seviyede üretildiği tespit edilmiştir. Yüksek pH değerlerinde sitrik asit üretiminin az olması bir yandan mikroorganizmanın doğal yapısından kaynaklanabileceği gibi üretilen yan ürünlerden de kaynaklanabilir (Şekil 4.62B).

DeneySEL çalışmadan elde edilen KMA sonuçları değerlendirildiğinde optimum başlangıç pH'sı 6,0 olarak belirlenmiştir. Başlangıç pH'sı 6,0 da en yüksek, pH 6,5 da ise en düşük kuru misel ağırlığına sahiptir (Şekil 4.62C).

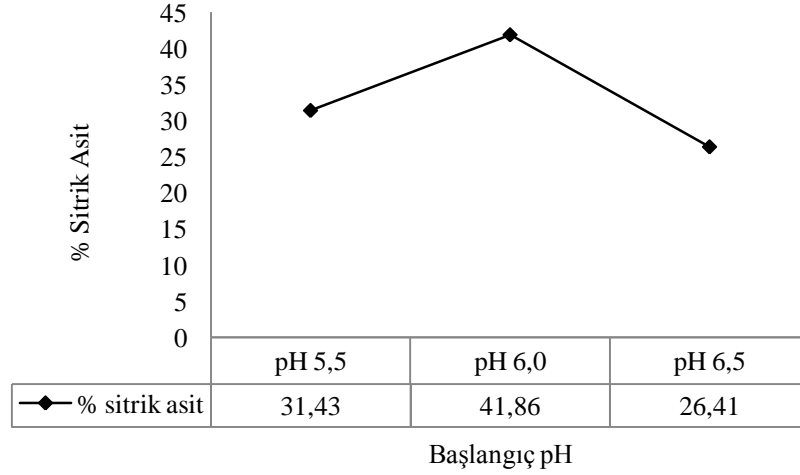
Substrat kullanımını açısından deneysel veriler incelendiğinde, başlangıç pH'sı 6,0 olan koşulda en yüksek verimde olduğu, başlangıç pH'sının ise 6,5'da en düşük verimlilikte kullanıldığı görülmektedir (Şekil 4.62D).



Şekil 4.62. Farklı başlangıç pH değerlerinin zamana bağlı ortam pH'sındaki değişim (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L).

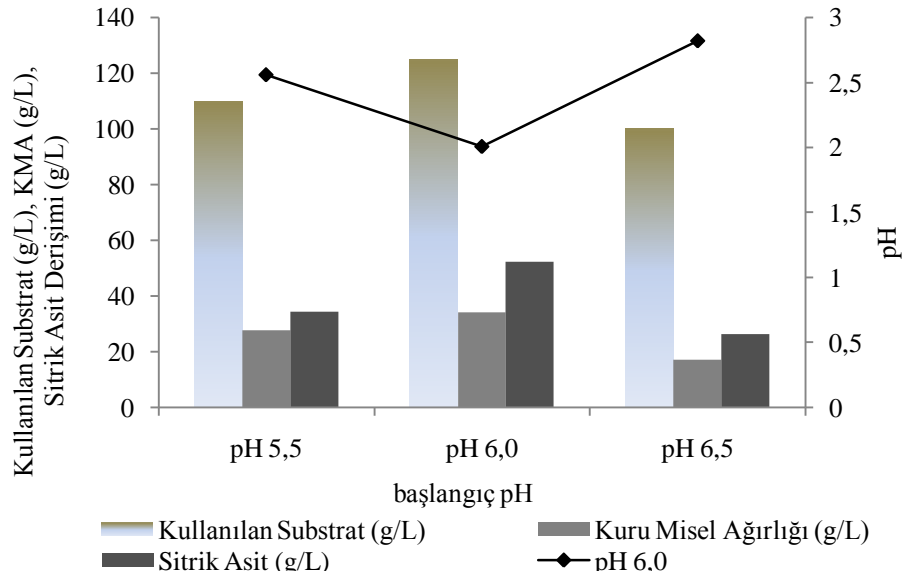
Kullanılan toplam şeker derişimi başına sitrik asit üretim verimliliği pH 5,5'da %31,43, pH 6,0'da %41,86, pH 6,5'da ise %26,41'dir (Şekil 4.63). Elde edilen sonuçlar bir önceki çalışmada kullanılan elde edilen sonuçlardan daha yüksektir. Sitrik asiti üretimi açısından Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörünün kullanılması halinde sitrik asit üretiminin artacağını göstermektedir.

Bu durum sitrik asit üretiminde kullanılan suş ve besiyerinin yanı sıra kullanılan fermentörün de etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.63. Farklı başlangıç pH değerlerinde kullanılan toplam şeker derişimi başına üretilen sitrik asit verimliliği (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Optimum zaman olarak belirlenen 6. gün (144 h)'de elde edilen sonuçları başlangıç pH'sına bağlı olarak grafiklendirildiğinde kullanılan substrat verimliliği, üretilen sitrik asit derişimi ve pH azalmasına bağlı olarak optimum başlangıç pH'sının 6,0 olduğu görülmektedir (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. Farklı başlangıç pH değerlerinin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).

Başlangıç pH'sı ile ilgili deney sonuçlarının değerlendirilerek hesaplanan kinetik parametreler Çizelge4.14'de verilmiştir. Buna inkübasyonun 6. gününde mikroorganizma başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/x}$ ); pH 5,5'da 1,245 g/g, pH 6,0'da 1,531 g/g, pH 6,5'da ise 1,537 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/s}$ ); pH 5,5'da 0,317 g/g, pH 6,0'da 0,436 g/g, pH 6,5'da ise 0,267 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen mikroorganizma oranı ( $y_{x/s}$ ); pH 5,5'da 0,255 g/g, pH 6,0'da 0,285 g/g, pH 6,5'da ise 0,174 g/g olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.14. Kesikli düzende çalışan havalandırılmalı kule fermentörünün kullanılan optimum başlangıç pH değerinin belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

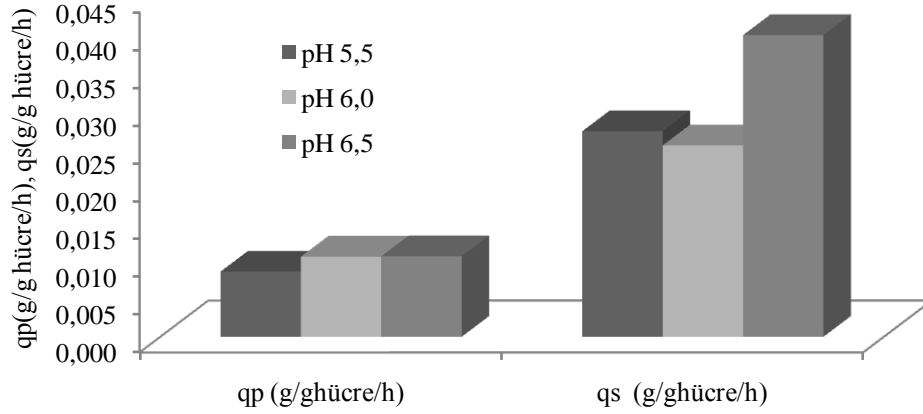
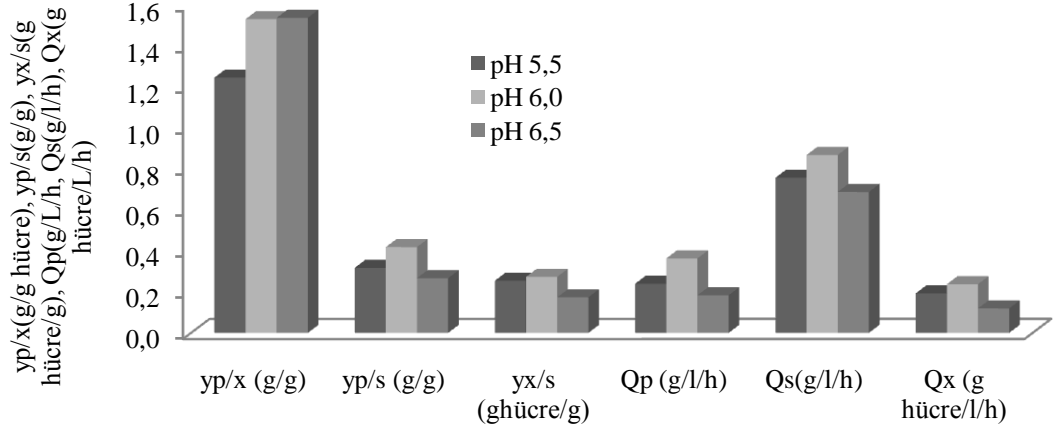
pH 5,5								
zaman (saat)	Y <sub>p/x</sub> (g/g)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/ghücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,226	0,038	0,166	0,025	0,667	0,019	0,111	0,501
24	1,207	0,263	0,218	0,088	0,333	0,050	0,073	0,192
48	2,183	0,156	0,072	0,137	0,875	0,045	0,063	0,291
72	2,809	0,235	0,084	0,196	0,833	0,039	0,070	0,166
96	2,177	0,237	0,109	0,205	0,865	0,023	0,094	0,096
120	1,817	0,293	0,161	0,240	0,817	0,015	0,132	0,052
<b>144</b>	<b>1,245</b>	<b>0,317</b>	<b>0,255</b>	<b>0,240</b>	<b>0,757</b>	<b>0,009</b>	<b>0,193</b>	<b>0,027</b>
168	1,165	0,272	0,233	0,196	0,720	0,007	0,168	0,026
192	1,103	0,263	0,238	0,167	0,635	0,006	0,151	0,022

pH 6,0								
zaman (saat)	Y <sub>p/x</sub> (g/g)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/ghücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,365	0,250	0,685	0,042	0,167	0,030	0,114	0,122
24	1,728	0,254	0,147	0,148	0,583	0,072	0,086	0,283
48	2,965	0,202	0,068	0,211	1,042	0,062	0,071	0,305
72	2,474	0,260	0,105	0,249	0,958	0,034	0,101	0,132
96	2,335	0,375	0,161	0,359	0,958	0,024	0,154	0,065
120	1,896	0,433	0,229	0,386	0,892	0,016	0,204	0,036
<b>144</b>	<b>1,531</b>	<b>0,436</b>	<b>0,285</b>	<b>0,363</b>	<b>0,833</b>	<b>0,011</b>	<b>0,237</b>	<b>0,024</b>
168	1,516	0,390	0,257	0,300	0,768	0,009	0,198	0,023
192	1,405	0,373	0,266	0,253	0,677	0,007	0,180	0,020

pH 6,5								
zaman (saat)	Y <sub>p/x</sub> (g/g)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/ghücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,310	0,200	0,645	0,033	0,167	0,026	0,108	0,129
24	0,842	0,189	0,224	0,071	0,375	0,035	0,084	0,186
48	1,237	0,194	0,157	0,073	0,375	0,026	0,059	0,133
72	2,405	0,250	0,104	0,135	0,542	0,033	0,056	0,134
96	1,969	0,245	0,124	0,138	0,563	0,021	0,070	0,084
120	1,722	0,268	0,156	0,179	0,667	0,014	0,104	0,054
<b>144</b>	<b>1,537</b>	<b>0,267</b>	<b>0,174</b>	<b>0,183</b>	<b>0,688</b>	<b>0,011</b>	<b>0,119</b>	<b>0,040</b>
168	1,450	0,252	0,174	0,157	0,625	0,009	0,109	0,034
192	1,381	0,244	0,177	0,137	0,563	0,007	0,099	0,029



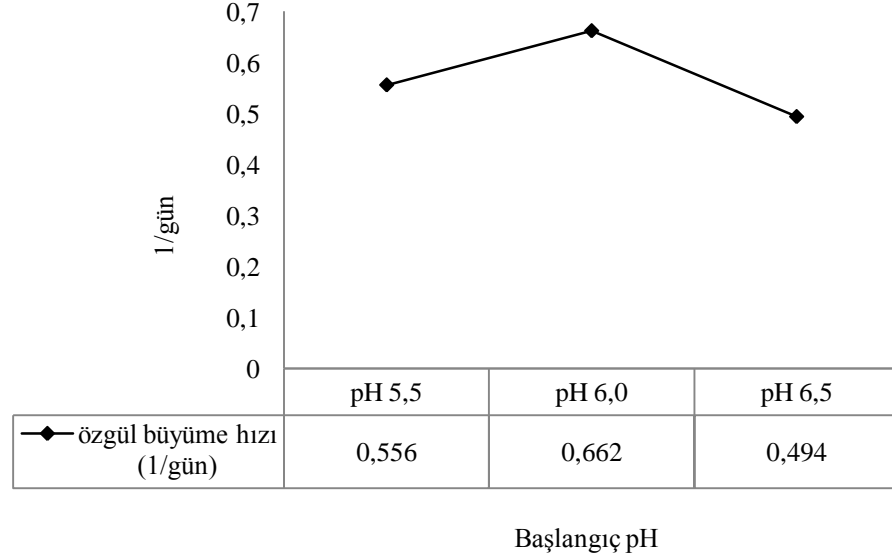
İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametreler Şekil 4.65’de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda optimum başlangıç pH’sının 6,0 olduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.65. Farklı başlangıç pH değerlerinin kinetik parametreler üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağ ı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L).

Özgül büyüme hızı ( $\mu$ ), ortam koşullarından etkilenen bir parametredir. Başlangıç pH değerine bağılı olarak özgül büyüme hızı da değışiklik göstermiştir. Başlangıç pH değeri farklı olan koşullarda gelişen mikroorganizmaların kuru misel ağırlıklarına bağılı olarak hesaplanan özgül büyüme hızları pH 5,5’da 0,5560 gün<sup>-1</sup>,

pH 6,0'da 0,6622 gün<sup>-1</sup>, pH 6,5'da ise 0,4940 gün<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.66).



Şekil 4.66. Farklı başlangıç pH değerlerinin özgül büyüme hızına etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağ %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L).

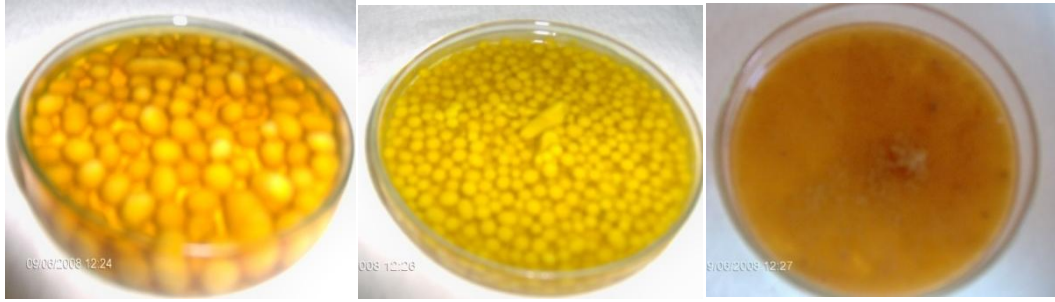
#### 4.5.4. Başlangıç Toplam Şeker Derişiminin Etkisi

Bu deneysel çalışmada, melas ve portakal hidrolizatları için sitrik asit üretimi maksimum olan şeker derişimi 140 g/L olarak belirlenmiştir. 140 g/L başlangıç toplam şeker derişiminin olduğu koşullarda inkübasyonun 144 saatinde sitrik asit derişimi 52,33 g/L olarak ölçülmüştür. İnkübasyonda substratın şeker derişimi arttıkça sitrik asit derişimi azalma göstermiştir. Ortamın viskozitesinin şeker derişimi nedeniyle artması miselyum yapısının artmasına neden olabilir. Düşük şeker derişimlerinde ise oksalik asit birikimi nedeniyle sitrik asit verimliliği düşecektir.

100 g/L başlangıç toplam şeker derişiminin olduğu koşulda 144 saatte sitrik asit derişimi 41,20 g/L, 180 g/L başlangıç toplam şeker derişiminin olduğu koşulda ise sitrik asit derişimi 29,2 g/L olarak ölçülmüştür.

Farklı başlangıç şeker derişimlerinde mikrobiyal morfoloji de farklılık göstermektedir. Optimum şeker derişimi olarak belirlenen ortamda renkte bir açılma

da gözlenmiştir (Şekil 4.67). Farklı substrat derişimlerinde gelişen *A. niger* peletleri, substrat derişiminin artışıyla küçülmektedir. En büyük pelet yapısı 100 g/L substrat derişiminde gözlenmiştir. Papagianni ve Matthey (2004) tarafından yapılan çalışmada sitrik asit üretimi için 50, 100 ve 150 g/L glikoz derişimleri kullanılmıştır. Bu ortamlarda geliştirilen mikroorganizmaların pelet genişlikleri sırasıyla 3,4, 3 ve 2.2 mm'dir[152].



Şekil 4.67. Farklı başlangıç şeker derişimlerinde gelişen *A. niger* peletleri

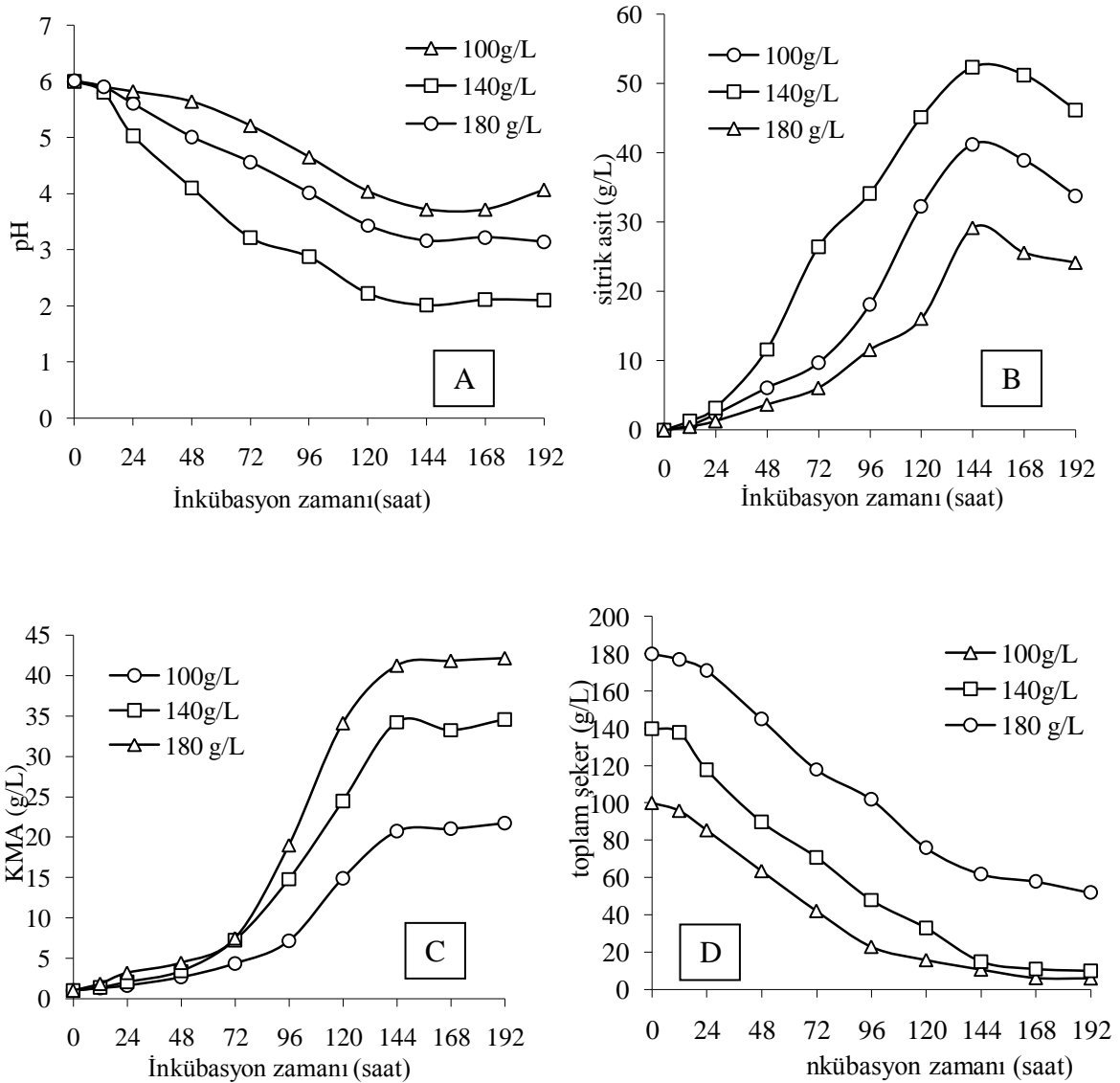
Şekil 4.68A'de görüldüğü gibi, başlangıç toplam şeker içeriği 100 g/L olan ortamda diğer ortamlara göre pH azalışı daha az olmuştur. Bunun nedeni düşük substrat derişimlerinde oksalik asit birikiminden kaynaklanabilir [34]. pH azalışı mikroorganizmanın gelişimi ile ilgili de bilgi verebilmektedir. Ortam substrat derişimi ise üretilecek üründe değişiklik göstermesine neden olabilir. Yüksek substrat derişimlerinde polioller oluşmakta ve sonuçta sitrik asit üretimi azalmaktadır [148].

Substratın toplam şeker içeriği arttıkça sitrik asit üretimi düşmektedir. Düşük substrat derişimlerinde ise sitrik asit üretimi düşüktür. Sitrik asit veriminin 6. güne kadar gittikçe artmakta olduğu, 7. ve 8. günlerde sitrik asit verimliliğinin azaldığı Şekil 4.68B'de görülmektedir. 144. saat sonrasındaki azalma ise sitrik asidin mikroorganizma tarafından kullanılması ve değişik yan ürünlere dönüşmesinden kaynaklı olabilir. Kesikli düzende çalışan havalandırılmalı kule fermentörünün verimliliği havalandırılmalı biyorekatordeki verimlilikten daha yüksektir. Bu durum inkübasyonun 6. gününde sitrik asit derişiminde azalmaya neden olmuştur. Çünkü substrat bu fermentörde daha verimli kullanıldığından ortamda sitrik asit üretimi için

yeterli substrat derişimi bitmiştir. Bundan dolayı inkübasyonun 6.gününden sonra sitrik asit parçalanmış olabilir. Çünkü sitrik asit mikroorganizmalarca çok kolay parçalanma yeteneğine sahiptir.

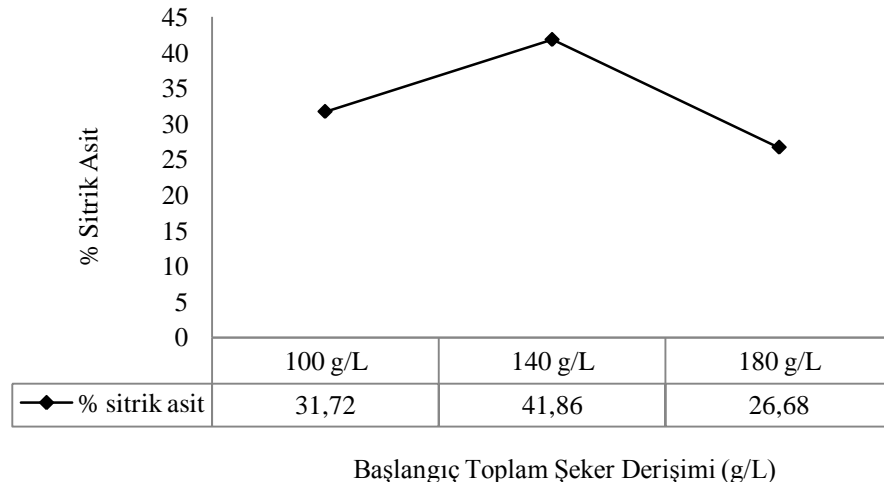
Substrat içeriği arttıkça kuru misel ağırlığında artış gözlenmiştir. Düşük substrat derişimlerinde ise daha düşük misel gelişimi gözlenmiştir. Tüm koşullarda 144 saate kadar düzenli bir artış gözlenmiştir. 144 saat sonrasında ise mikrobiyal biyokütle sabitlenmiştir. 144 saat sonrasına biyokütle durağan evreye geçmiştir (Şekil 4.68C). Bu durum sitrik asit üretimi ile doğru orantılıdır. Çünkü sitrik asit primer bir metabolittir.

Farklı başlangıç toplam şeker derişimlerinde *A. niger* besiyeri ortamını verimli bir şekilde kullanmıştır. 144 saate kadar 100g/L ve 140 g/L olan koşullarda ortam toplam şeker içeriğinde düzenli bir azalış gözlenmiş ve 144 h sonra ise toplam şeker içeriğinde sabitleme olduğu görülmüştür. Ancak 180 g/L olan koşulda substrat kullanımı 144 h sonra da devam etmiştir (Şekil 4.68D). Roukas ve Kyriakides (2002) tarafından yapılan çalışmada artan substrat derişimine bağlı olarak mikroorganizmanın substratı kullanım verimliliğinin arttığı 200g/L substrat derişiminde sonra ise azaldığı tespit edilmiştir. Bunun neden yüksek substrat derişiminin mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada optimum başlangıç toplam şeker derişimi 200g/L olarak tespit edilmiştir[146].



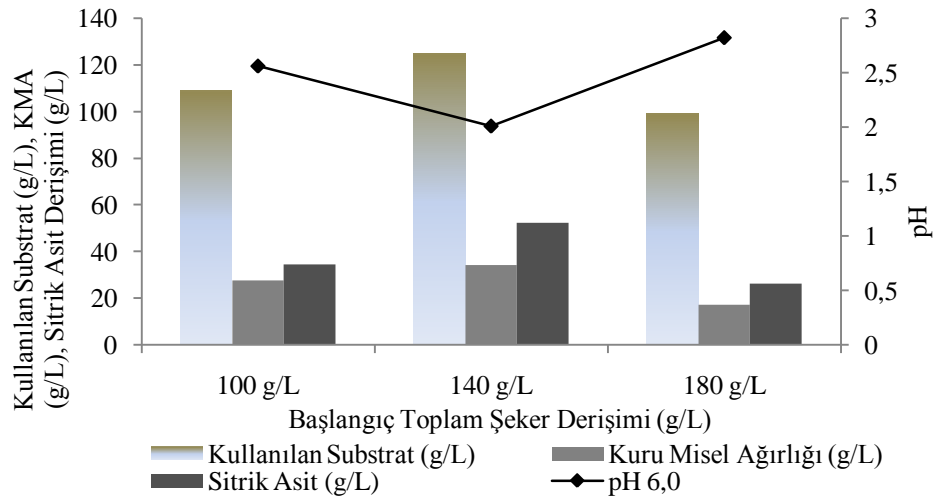
Şekil 4.68. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin zamana bağı ortam pH'sındaki değişim (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi) (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L).

Elde edilen verilere göre sitrik asit üretimi için optimum substrat derişimi 140 g/L'dir (Şekil 4.69). Bu derişimi Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktör kısmında anlatıldığı gibi mikroorganizma tür ve suşuna bağı olarak değişmektedir. Ayrıca kullanılan substratın özellikleri ve kaynağına göre de değişiklik gösterebilmektedir.



Şekil 4.69. Farklı başlangıç toplam şeker derişimine bağı sitrik asit üretim verimliliğı (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL., mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).

Optimum zaman olarak belirlenen 6. gün (144 h)'de elde edilen sonuçları başlangıç toplam şeker derişimine bağı olarak grafiklendirildiğinde kullanılan substrat verimliliğı, üretilen sitrik asit derişimi ve pH azalmasına bağı olarak optimum başlangıç toplam şeker derişiminin 140 g/L olduğı görülmektedir (Şekil 4.70).



Şekil 4.70. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL., mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).

Başlangıç toplam şeker derişimi ile ilgili deney sonuçlarının değerlendirilerek hesaplanan kinetik parametreler izelge 4.15’de verilmiştir. İnkübasyonun 6. gününde mikroorganizma başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/x}$ ); 100 g/L için 1,987 g/g, 140 g/L için 1,531 g/g, 180 g/L için ise 0,708 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/s}$ ); 100 g/L için 0,461 g/g, 140 g/L için 0,436 g/g, 180 g/L için ise 0,247 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen mikroorganizma oranı ( $y_{x/s}$ ); 100 g/L için 0,232 g/g, 140 g/L için 0,285 g/g, 180 g/L için ise 0,350 g/g olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.15. Başlangıç toplam şeker derişiminin kinetik parametreler üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L).

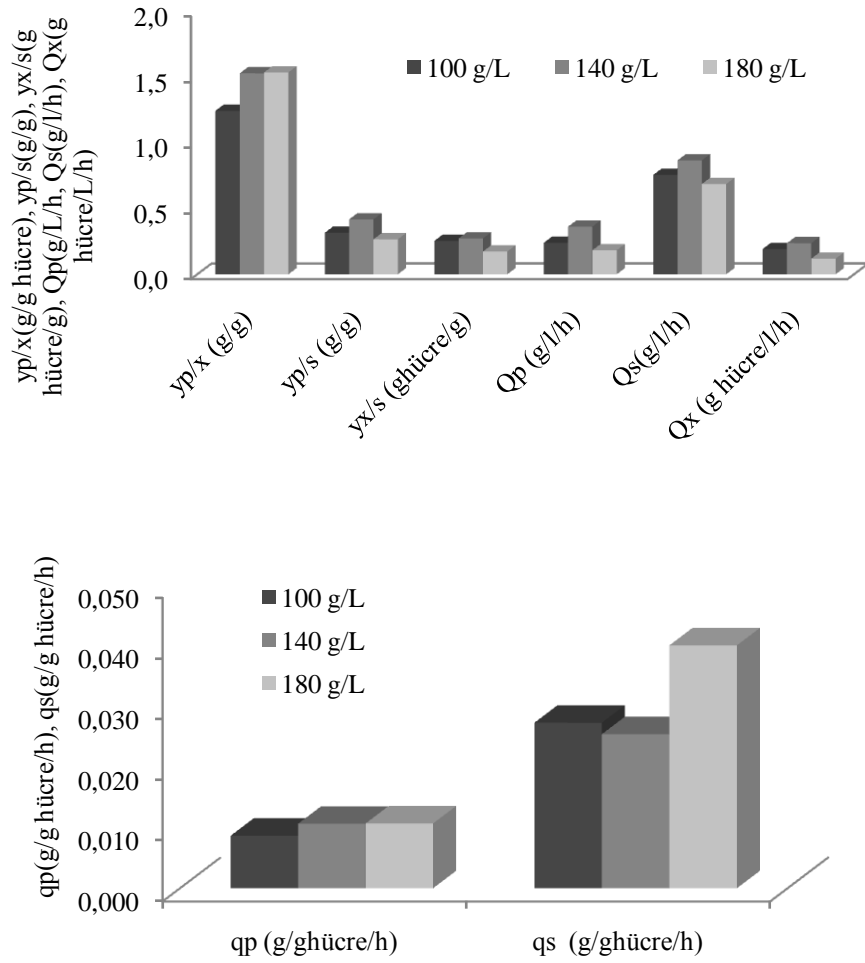
100 g/L								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,534	0,167	0,312	0,058	0,350	0,045	0,109	0,267
24	1,402	0,158	0,112	0,096	0,608	0,058	0,068	0,371
48	2,285	0,167	0,073	0,127	0,760	0,048	0,056	0,285
72	2,220	0,168	0,075	0,135	0,804	0,031	0,061	0,184
96	2,528	0,235	0,093	0,189	0,803	0,026	0,075	0,112
120	2,163	0,384	0,177	0,269	0,702	0,018	0,124	0,047
<b>144</b>	<b>1,987</b>	<b>0,461</b>	<b>0,232</b>	<b>0,286</b>	<b>0,620</b>	<b>0,014</b>	0,144	<b>0,030</b>
168	1,847	0,414	0,224	0,231	0,558	0,011	0,125	0,027
192	1,553	0,359	0,231	0,176	0,490	0,008	0,113	0,023

140 g/L								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/ghücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,365	0,250	0,685	0,042	0,167	0,030	0,114	0,122
24	1,728	0,254	0,147	0,148	0,583	0,072	0,086	0,283
48	2,965	0,202	0,068	0,211	1,042	0,062	0,071	0,305
72	2,474	0,260	0,105	0,249	0,958	0,034	0,101	0,132
96	2,335	0,375	0,161	0,359	0,958	0,024	0,154	0,065
120	1,896	0,433	0,229	0,386	0,892	0,016	0,204	0,036
<b>144</b>	<b>1,531</b>	<b>0,436</b>	<b>0,285</b>	<b>0,363</b>	<b>0,833</b>	<b>0,011</b>	<b>0,237</b>	<b>0,024</b>
168	1,516	0,390	0,257	0,300	0,768	0,009	0,198	0,023
192	1,405	0,373	0,266	0,253	0,677	0,007	0,180	0,020

180 g/L								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/g hücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,269	0,167	0,620	0,042	0,250	0,022	0,155	0,134
24	0,405	0,144	0,357	0,054	0,375	0,017	0,134	0,117
48	0,830	0,106	0,127	0,077	0,729	0,017	0,093	0,163
72	0,814	0,098	0,121	0,085	0,861	0,011	0,104	0,115
96	0,610	0,149	0,244	0,121	0,813	0,006	0,198	0,043
120	0,472	0,155	0,328	0,134	0,867	0,004	0,284	0,025
<b>144</b>	<b>0,708</b>	<b>0,247</b>	<b>0,350</b>	<b>0,203</b>	<b>0,819</b>	<b>0,005</b>	<b>0,286</b>	<b>0,020</b>
168	0,612	0,210	0,343	0,152	0,726	0,004	0,249	0,017
192	0,573	0,189	0,329	0,126	0,667	0,003	0,220	0,016

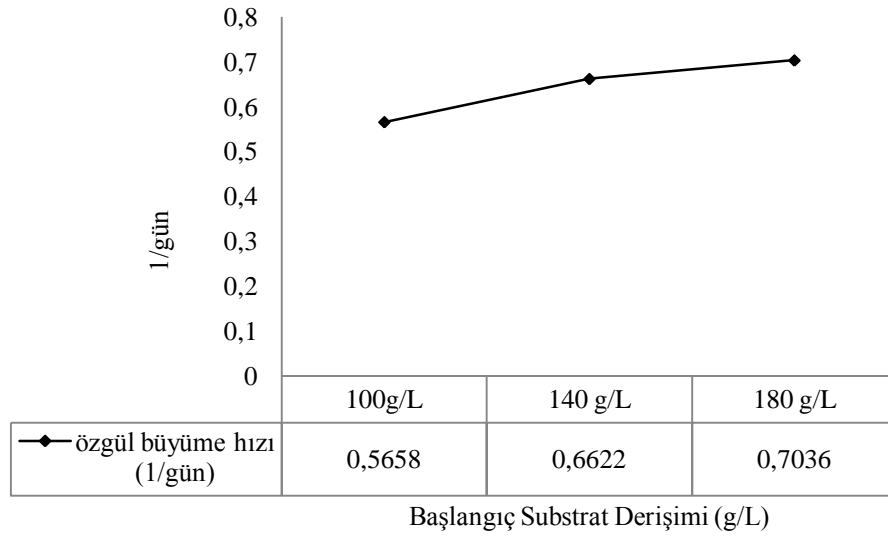


İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametreler Şekil 4.71’de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda optimum başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L olduğu ortaya çıkmıştır. Üretilen mikroorganizma başına üretilen ürün sentezi 140 g/L ile 180 g/L birbirine oldukça yakındır. Ancak substrat derişiminin yüksek olduğu koşullarda sitrik asit üretim verimliliği 140 g/L ‘de daha yüksektir.



Şekil 4.71. İnkübasyonun 6. gününde farklı başlangıç toplam şeker derişimine bağlı kinetik parametrelerin karşılaştırılması (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).

Başlangıç toplam şeker derişimine bağlı olarak özgül büyüme hızı ( $\mu$ ) da değişiklik göstermiştir (Şekil 4.72). Doktora tezi kapsamında yapılan diğer optimizasyon çalışmalarında da bu çalışmada elde edilen optimum substrat derişimi olan 140g/L toplam şeker içeriği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç substrat veya biyoreaktörün farklı oluşu optimum başlangıç substrat derişimini etkilememektedir. Ancak substrat veya biyoreaktör farklılığı sitrik asit üretim verimliliğini değiştirmektedir.



Şekil 4.72. Farklı başlangıç toplam şeker derişiminin zamana bağlı özgül büyüme hızındaki değişim (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, metanol oranı %4, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).

#### 4.4.5. Metanol oranının Etkisi

Metanol oranının belirlenmesi amacıyla yapılan deneyde çalışma koşulları; 1 L/L/dakika havalandırma hızı, başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, mikroorganizma oranı %3 olarak sabit tutulmuştur.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre inkübasyon periyodununun 144. saatinde %3'lük metanol oranı olan ortamda pH 2,94, toplam şeker derişimi 28 g/L, kuru misel ağırlığı 27,16 g/L ve sitrik asit 38,3 g/L olara belirlenmiştir. % 4'lük metanol oranının olduğu ortamda pH 2,01, sitrik asit 52,33g/L, kalan toplam şeker 15 g/L ve kuru misel ağırlığı 34,19 g/L olarak bulunmuştur. %5'lik metanol oranının

olduğu ortamda ise, pH 3,56, sitrik asit 22,7 g/L, kalan toplam şeker 54 g/L ve kuru misel ağırlığı 20,56 g/L olarak belirlenmiştir.

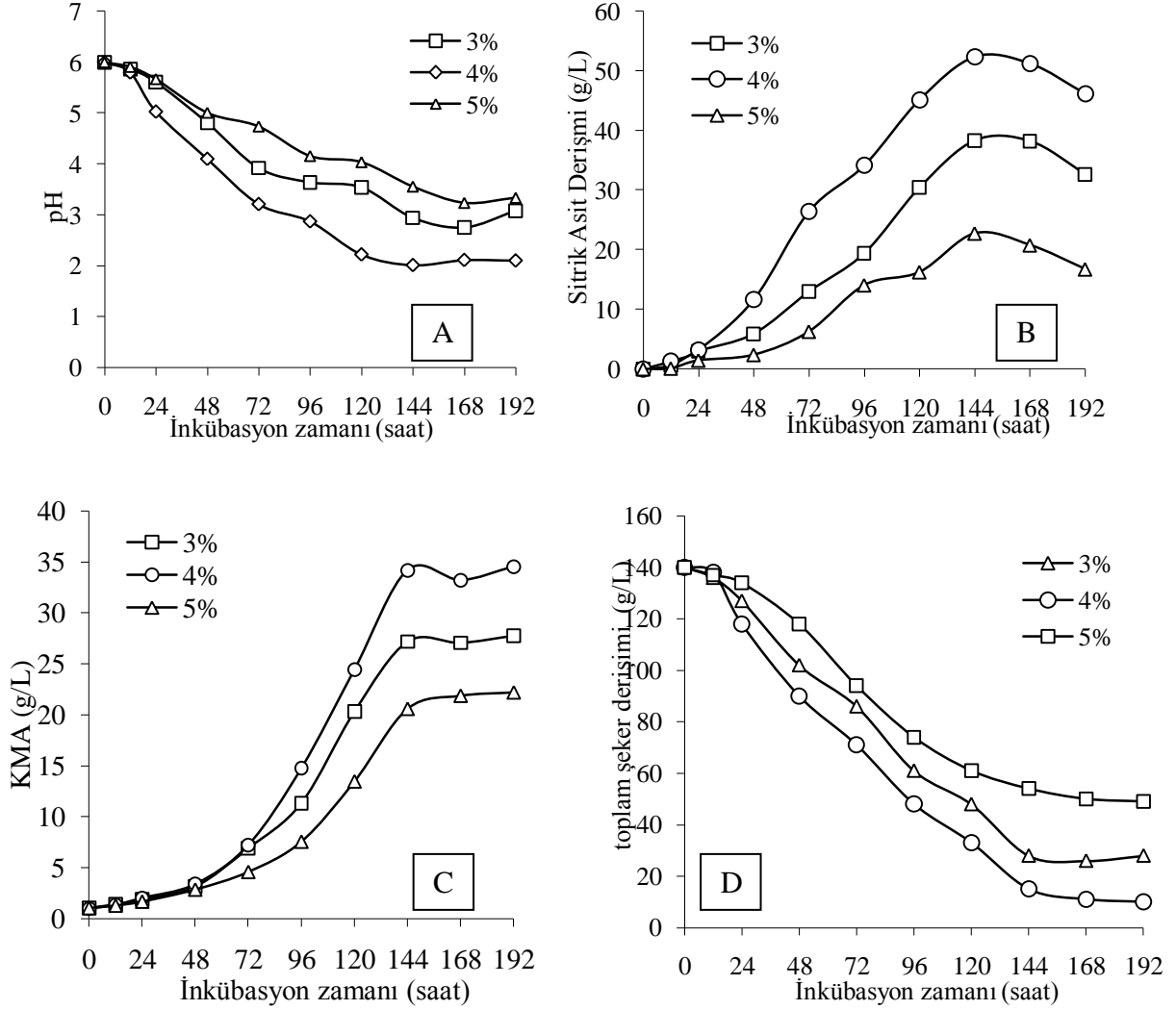
şekil 4.73A’da grldğ üzere metanol oranı ortam pH’sı üzerinde de etkili olmuştur. Mikrobiyolojik aktiviteyi etkilemesi nedeniyle her ortamda pH azalışı birbirinde farklıdır. şekil 4.73B’de ise metanol oranı arttıka sitrik asit üretimi arttığı belirlenmiştir. Ancak metanol oranının %5 ve üzerine çıktığı durumlarda asit üretiminde azalma grlmektedir. Bu durum mikroorganizmanın morfolojisinde veya enzimatik yapısında meydana gelen bir değişiklikten kaynaklanabilir. Düşük metanol derişimlerinde asit üretiminin az olması ise metanolun asit üretimi üzerine olumlu etkisini göstermektedir.

Elde edilen deneysel sonuçlara göre, metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisine bakıldığında %4 metanol oranı sitrik asit üretimini arttırmıştır. En düşük sitrik asit üretimi %5 metanol oranında gözlenmiştir (şekil 4.73B). Diğer verilerle birlikte değerlendirilecek olursa %4 metanol oranında substratın daha verimli kullanıldığı, kuru miselin daha fazla ürediği ve asit üretiminin daha etkin olduğu görülmüştür.

Metanol oranının kuru misel ağırlıkları üzerine etkisi şekil 4.73C’de gösterilmiştir. En yüksek kuru misel artışı %4 metanol oranında gözlenmiştir. Metanol mikrobiyal gelişime olumlu etki göstermiştir. Hücre zarında oluşan değişiklik substratın hücre içine alımını arttırmış olabilir. Bu şekilde substrat kullanımını ve sitrik asit üretim verimliliği de artmış olabilir. şekil 4.73 metanol oranının mikrobiyal yapıda değişikliklere neden olduğunun bir göstergesi olabilir. Çünkü %5 metanol oranının ilave edildiği ortamda mikrobiyal büyüme göstergesi olan kuru misel ağılığı artışı en düşüktür. Daha yüksek seviyeli metanol derişimlerinde ise mikrobiyal büyüme olmamıştır. Bununla ilgili çalışma yapılarak gözlem yapılmıştır. Ancak olumlu bir gelişme olmadığı için sonuçlar verilmemiştir.

İnkübasyon periyodu boyunca substratın mikroorganizmalarca kullanılabilirliğini gösteren zamana bağlı toplam şeker içeriği ile ilgili grafik şekil 4.73D’de verilmiştir. Metanolun hücresel yapıda oluşturduğu değişiklik hipotezine dayalı olarak düşünecek olursak hücre zarında geçişin kolaylaşması substratın hücre içine rahat alımını sağlamaktadır. Bu şekilde sitrik asit üretimi ve substratın

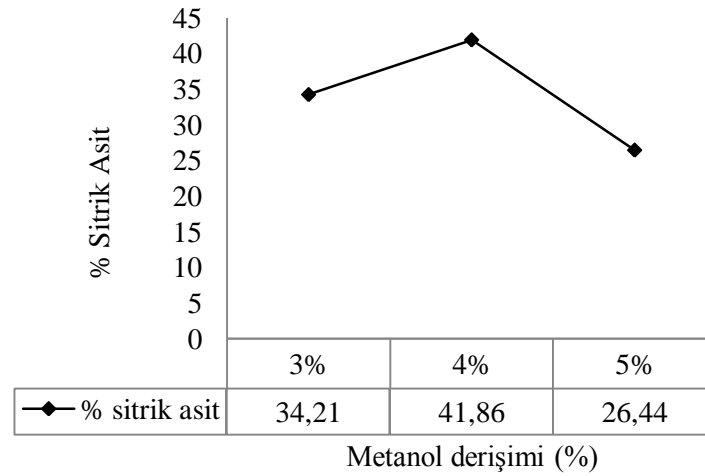
kullanımı artacaktır. Şekil 4.73D’de görüldüğü gibi %3 metanol içeriğinde toplam şeker içeriğindeki azalma %4 metanol içeriğine göre daha azdır. %5 metanol içeriğinde ise toplam şeker azalması en azdır. Bu sonuçlara göre optimum metanol içeriği substrat kullanımını arttırmaktadır.



Şekil 4.73. Farklı metanol derişimlerinin zamana bağlı ortam pH değerindeki değişim. (A:İnkübasyon ortamında pH değişimi, B:Sitrik asit derişiminin değişimi, C:Kuru misel ağırlığının değişimi, D:Toplam şeker derişiminin değişimi). (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L).

Kullanılan toplam şeker derişimi başına sitrik asit üretim verimliliği metanol oranına bağlı olarak değişmiştir (Şekil 4.74). Hesaplanan sonuçlara göre %3 metanol oranında %34,21, %4 metanol oranında 41,86, %5 metanol erişiminde ise %26,44 sitrik asit üretim verimliliği bulunmuştur. Bu sonuçlar, portakal hidrolizatının sitrik

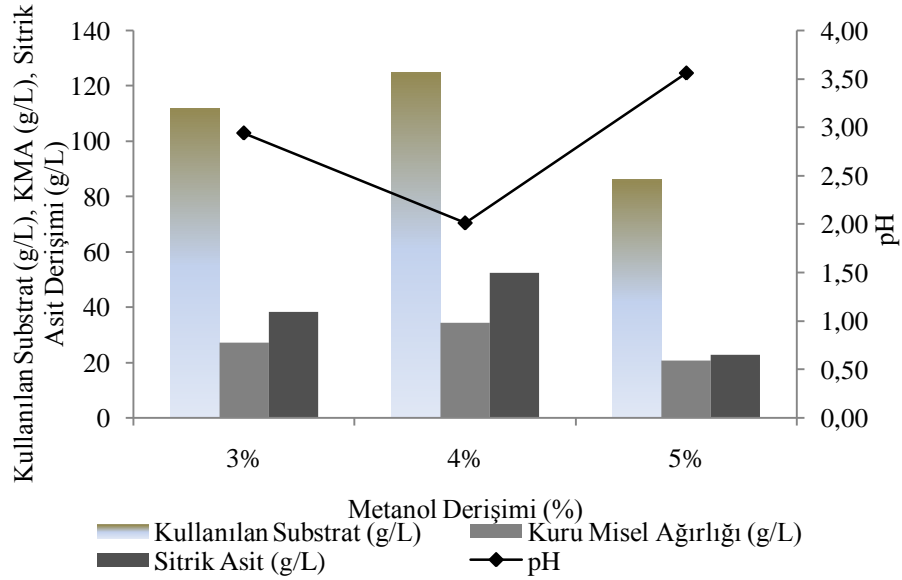
asit üretimi için uygun bir substrat olduğunu ayrıca kule fermentörünün sitrik asit üretimi için uygun olduğunu göstermektedir. Metanol oranı kullanılan substrata ve mikroorganizma ve suşuna bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda %1 ile %6 aralığında optimum metanol oranı saptanmıştır. Navaratnam ve ark [136] tarafından yapılan çalışmada %30mL/L, Roukas ve Kyriakides [146] tarafından yapılan çalışmada %4, Roukas [53] tarafından yapılan çalışmada %6, Mazhar ve ark [43] tarafından yapılan çalışmada %1, Pazouki ve ark [134] tarafından yapılan çalışmada %3 metanol oranı maksimum sitrik asit üretimi için gerekli olduğu belirlenmiştir. Alkol olarak metanol yerine diğer alkoller de kullanılabilir. Ali ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada %0,5 metanol oranında sitrik asit derişimi 50,70 g /L iken %1 metanol oranında 76,02 g/L olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Etanolün metanol yerine kullanılabilirliği de incelenmiştir. Çalışma sonucunda 0,2:0,8 metanol etanol derişiminde sitrik asit derişimi 55,05 g/L, 0,4:0,6 metanol etanol derişiminde sitrik asit derişimi 62,76 g/L, metanol etanol derişiminde sitrik asit derişimi 48,55 g/L olarak tespit edilmiştir [44].



Şekil 4.74: Farklı metanol derişimlerinde kullanılan toplam şeker başına sitrik asit üretim verimliliği (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L).

Optimum zaman olarak belirlenen 6. gün (144 h)'de elde edilen sonuçları metanol oranına bağlı olarak grafiklendirildiğinde kullanılan substrat verimliliği,

üretilen sitrik asit derişimi ve pH azalmasına bağlı olarak optimum metanol oranı %4 olarak görölmektedir (Şekil 4.75).



Şekil 4.75. Farklı metanol derişimlerinin sitrik asit üretimi üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırozü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Metanol oranının belirlenmesi ile ilgili deney sonuçlarının değerlendirilerek hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 10'da verilmiştir. İnkübasyonun 6. gününde mikroorganizma başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/x}$ ); %3 metanol oranı için 1,411 g/g, %4 metanol oranı için 1,531 g/g, %5 metanol oranı için ise 1,106 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen sitrik asit derişimi ( $y_{p/s}$ ); %3 metanol oranı için 0,342 g/g, %4 metanol oranı için 0,419 g/g, %5 metanol oranı için 0,264 g/g olarak hesaplanmıştır. Kullanılan substrat başına üretilen mikroorganizma oranı ( $y_{x/s}$ ); %3 metanol oranı için 0,243 g/g, %4 metanol derişim için 0,274 g/g, %5 metanol oranı için ise 0,239 g/g olarak hesaplanmıştır.

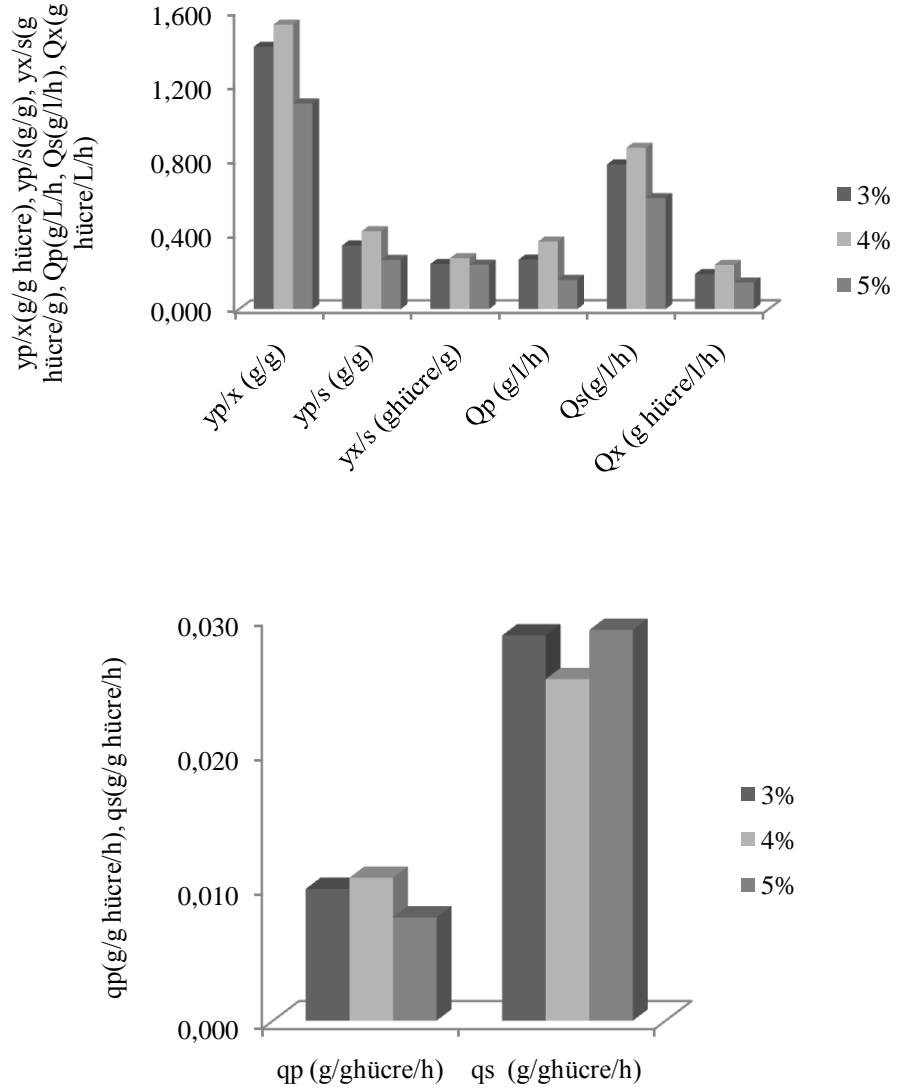
Çizelge 4.16: Optimum metanol oranının belirlenmesi çalışmasında hesaplanan kinetik parametreler (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

%3								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/ghücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,435	0,150	0,345	0,050	0,333	0,036	0,115	0,242
24	1,613	0,231	0,143	0,125	0,542	0,067	0,078	0,291
48	1,897	0,156	0,082	0,123	0,792	0,040	0,065	0,254
72	1,891	0,241	0,127	0,180	0,750	0,026	0,095	0,109
96	1,715	0,246	0,143	0,202	0,823	0,018	0,118	0,073
120	1,498	0,331	0,221	0,254	0,767	0,012	0,169	0,038
<b>144</b>	<b>1,411</b>	<b>0,342</b>	<b>0,243</b>	<b>0,266</b>	<b>0,778</b>	<b>0,010</b>	<b>0,189</b>	<b>0,029</b>
168	1,412	0,335	0,237	0,227	0,679	0,008	0,161	0,025
192	1,177	0,292	0,248	0,170	0,583	0,006	0,144	0,021

%4								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/ghücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,365	0,250	0,685	0,042	0,167	0,030	0,114	0,122
24	1,728	0,254	0,147	0,148	0,583	0,072	0,086	0,283
48	2,965	0,202	0,068	0,211	1,042	0,062	0,071	0,305
72	2,474	0,260	0,105	0,249	0,958	0,034	0,101	0,132
96	2,335	0,375	0,161	0,359	0,958	0,024	0,154	0,065
120	1,896	0,433	0,229	0,386	0,892	0,016	0,204	0,036
<b>144</b>	<b>1,531</b>	<b>0,419</b>	<b>0,274</b>	<b>0,363</b>	<b>0,868</b>	<b>0,011</b>	<b>0,237</b>	<b>0,025</b>
168	1,516	0,390	0,257	0,300	0,768	0,009	0,198	0,023
192	1,405	0,373	0,266	0,253	0,677	0,007	0,180	0,020

%5								
zaman (saat)	y <sub>p/x</sub> (g/g)	y <sub>p/s</sub> (g/g)	y <sub>x/s</sub> (ghücre/g)	Q <sub>p</sub> (g/l/h)	Q <sub>s</sub> (g/l/h)	q <sub>p</sub> (g/ghücre/h)	Q <sub>x</sub> (g hücre/l/h)	q <sub>s</sub> (g/ghücre/h)
12	0,079	0,033	0,420	0,008	0,250	0,007	0,105	0,198
24	0,873	0,240	0,275	0,060	0,250	0,036	0,069	0,152
48	0,841	0,108	0,129	0,050	0,458	0,018	0,059	0,162
72	1,377	0,137	0,099	0,087	0,639	0,019	0,063	0,140
96	1,867	0,213	0,114	0,146	0,688	0,019	0,078	0,091
120	1,209	0,206	0,170	0,135	0,658	0,010	0,112	0,049
<b>144</b>	<b>1,106</b>	<b>0,264</b>	<b>0,239</b>	<b>0,158</b>	<b>0,597</b>	<b>0,008</b>	<b>0,143</b>	<b>0,029</b>
168	0,951	0,231	0,243	0,124	0,536	0,006	0,130	0,025
192	0,755	0,184	0,244	0,087	0,474	0,004	0,115	0,021

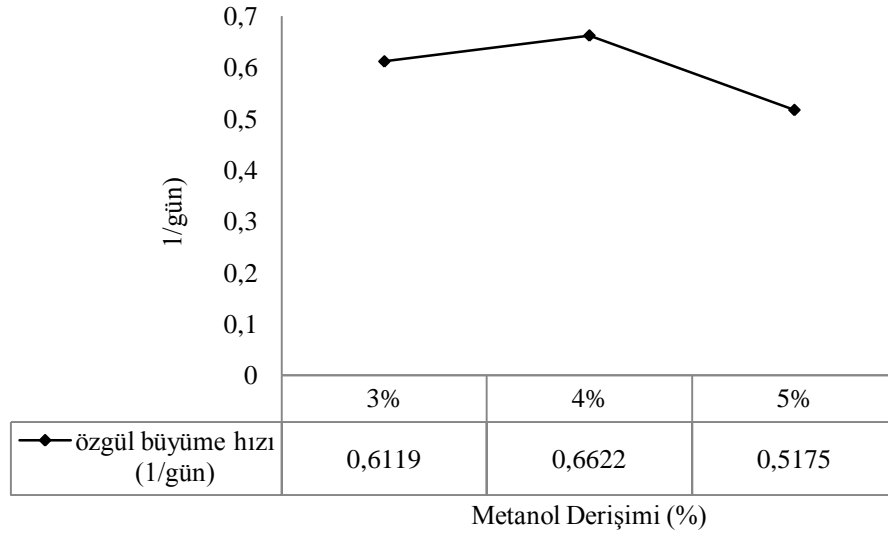
İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametreler Şekil 4.76'da değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda optimum metanol oranı %4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.76. İnkübasyonun 6. gününde hesaplanan kinetik parametrelerin farklı metanol derişimlerine bağı olarak karşılaştırılması (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> derişimi 200 mg/L)

Metanol oranına bağı olarak özgül büyüme hızı( $\mu$ ) da değışiklik göstermiştir. Metanol oranı farklı olan koşullarda gelişen mikroorganizmaların kuru misel ağırlıklarına bağı olarak hesaplanan özgül büyüme hızları Şekil 4. 77'de verilmiştir.





Şekil 4.77. Farklı metanol derişimlerinin özgül büyüme hızı( $\mu$ ) üzerine etkisi (1 L/L/dakika havalandırma hızı, %3 mikroorganizma oranı, başlangıç pH 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L, ortam sıcaklığı 30°C, çalışma hacmi 750 mL,, mısırözü yağı %2,  $K_4Fe(CN)_6$  derişimi 200 mg/L)

Kule fermentöründe yürütülen bu çalışmada diğer optimizasyon çalışmasında olduğu gibi substrat olarak portakal posası hidrolizatı ve melas kullanılmıştır. Kule fermentörü kesikli düzende çalışmaktadır. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentöründen elde edilen sonuçların diğer biyoreaktörlere göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum ise kule fermentörlerinin sitrik asit üretiminde verimli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Şu anda kule fermentörleri zeytin karasuyunun arıtımı, çeşitli biraların yapımında ve sirke üretiminde kullanılmaktadır [156, 157, 158]. Sitrik asit üretimi ile ilgili herhangi bir çalışma veya uygulama bulunmamaktadır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- ✓ Narenciye posaları ile ilgili birçok çalışma vardır. Bu çalışmalar narenciye posalarını değerlendirme gereksinimini ortaya koymaktadır. Yaptığımız bu çalışma ile narenciye posası değerlendirilmesine yeni bir katkı sağlanmıştır. Sitrik asit ihtiyacı da gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışma ile sitrik asit üretiminde kullanılabilecek yeni bir substrat bileşimi belirlenmiştir.
- ✓ Yapılan doktora çalışması 5 kısımdan oluşmuştur. Birinci aşamada sakkaroz ile kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde optimizasyon çalışması, ikinci aşamada narenciye posası hidroliz çalışması, üçüncü aşamada narenciye posası ve melas ile kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde optimizasyon çalışması dördüncü aşamada kesikli düzende çalışan havalandırılmalı reaktörde optimizasyon çalışması ve son olarak kesikli düzende çalışan havalandırılmalı kesikli düzende çalışan havalandırılmalı kule fermentörü optimizasyon çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tüm biyoreaktörlerde sitrik asit üretimi birbirinden farklı olmuştur. Bu durum sitrik asit üretiminin kullanılan fermentör türüne bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.
- ✓ Çalışmanın ilk kısmında çalışma hacmi 100 mL, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak sabit tutulmuştur.
- ✓ Çalışmanın ilk aşamasında substrat olarak sakkaroz kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında başlangıç pH'sı (4,5–6,5), başlangıç toplam şeker derişimi (100 g/L–180 g/L) ve metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda optimum sitrik asit üretiminin başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L ve metanol oranının %4 olan koşulda sağlandığı bulunmuştur. Sukrozun substrat olarak kullanıldığı çalışmada maksimum sitrik asit derişimi 21,6 g/L bulunmuştur.

- ✓ Bu çalışma aşamasında başlangıç pH'sının sitrik asit üretimi üzerine etkili olduğu; pH 4,5 ve pH 6,5 değerlerinde sitrik asitin minimum, pH 6,0 değerinde ise maksimum seviyede üretildiği bulunmuştur.
- ✓ Başlangıç substrat derişiminin belirlenmesi çalışmasında 100 g/L, 140 g/L ve 180 g/L'lik toplam şeker içeriğine sahip ortamlar hazırlanmıştır. Bu ortamlardan elde edilen sonuçlara göre 140 g/L başlangıç substrat derişimi olan koşullarda sitrik asit üretiminin en yüksek olduğu bulunmuştur. 100g/L'lik başlangıç toplam şeker derişiminde pelet yapısının diğer ortamlara göre oldukça geniş olduğu ancak sitrik asit üretiminin diğer ortamlara göre düşük olduğu belirlenmiştir. Toplam şeker derişimi arttıkça pelet yapısının küçüldüğü ve bozulduğu makroskobik incelemeler sonucunda belirlenmiştir.
- ✓ Sakkaroz ortamında metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla inkübasyonun 24. saatinde ortama %3, %4 ve %5 oranında metanol ilavesi yapılmıştır. Makroskoik incelemeler sonucunda pelet yapısının belirginleştiği ve bozulmanın geciktiği tespit edilmiştir. B durum metanolün hücre yapısına etki ettiğini göstermektedir. Metanol oranı arttıkça sitrik asit üretiminin arttığı ancak %5 metanol oranında sitrik asit üretiminin diğer ortamlara göre oldukça düştüğü görülmüştür.
- ✓ Çalışmanın ikinci aşamasında substrat olarak portakal posası ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Portakal posasının direk veya yarı katı fazda kullanımının sitrik asit üretimi için uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla portakal posasının yapısında bulunan şekerlerin su fazına geçmesi sağlanmıştır. Bunun için çeşitli asitler ve bazlar hidroliz için kullanılmıştır. Yapılan çalışmada yüksek derişimlerde asit kullanımının posa yapısında bulunan polisakaritlerin tamamen bozulduğu ve aşırı baz kullanımına neden olduğu bulunmuştur. Denemeler sonucunda mikrobiyal üremenin olduğu ve baz kullanımının düştüğü optimum hidroliz koşulları belirlenmiştir. %5 HCl'lik asit ve 3N KOH'in hidroliz için optimum olduğu tespit edilmiştir.

- ✓ Ayrıca hidroliz çalışmasında optimum hidroliz için en uygun partikül büyüklüğü ve derişimi de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 100g posa /L optimum derişim olarak ve -300 $\mu$ m +212 $\mu$ m (70 mesh üstü) fraksiyonu ise optimum tanecik büyüklüğü olarak belirlenmiştir.
- ✓ Çalışmanın üçüncü aşamasında kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde substrat olarak hidroliz çalışmasında belirlen yÖnteme göre hazırlanan posa hidrolizatlarının kullanılmıştır. Ancak optimum şeker derişimi açısından posanın toplam şeker içeriğı yetersiz kalmıştır. Bunun için ortamın şeker açısından desteklenmesi için önişlemeden geçirilmiş melas kullanılmıştır.
- ✓ Melasın substrat olarak kullanımı için çeşitli önişlemler denenmiş ve en uygun önişlem koşulu çalışmanın diğer aşamalarında da kullanılmıştır.
- ✓ Ayrıca melas yapısında bulunan ağır metallerin sitrik asit üretimi ve mikrobiyal aktiviteyi engellememesi için sterilizasyondan önce ve sonra olmak üzere toplamda 200mg/L  $K_4Fe(CN)_6$  ilave edilmiştir.
- ✓ Melas kullanımından kaynaklanan köpüğün kırılması için ve fermentör koşullarında suda doygun oksijen derişimini arttırmak için %2 oranında mısırözü yağı kullanılmıştır.
- ✓ Bunun haricinde diğer sabit tutulan parametreler çalışma hacmi 100 mL, 150 rpm çalkalama hızı, 30°C inkübasyon sıcaklığı ve %1 mikroorganizma oranıdır. Ayrıca inkübasyon ortamına mikroorganizmalar ön inkübasyondan sonra ilave edilmiştir. Ayarlanan bu koşullar dolayısıyla sitrik asit üretimi sakkaroz ortamına göre oldukça artmıştır.

- ✓ Portakal hidrolizatı ve önişlemeden geçirilmiş melasın substrat olarak kullanıldığı bu çalışmada alışma evresi ön inkübasyon aşamasında tamamlanmıştır. Mikroorganizma aktivitesinin yüksek olması için yeni genç hücreler kullanılmıştır. Ön inkübasyondan inkübasyon ortamına alınan kültürlerin direk logaritmik faz göstermesi, alışma evresinin ön inkübasyonda tamamlandığını göstermektedir.
- ✓ Bu çalışma kapsamında başlangıç pH'sı (4,5-6,5), başlangıç toplam şeker derişimi (100 g/L-180 g/L) ve metanol oranının sitrik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda optimum sitrik asit üretiminin başlangıç pH'sı 6,0, başlangıç toplam şeker derişimi 140 g/L ve metanol oranının %4 olan koşulda sağlandığı bulunmuştur. Çalışma sonucunda üretilen maksimum sitrik asit derişimi 35,6 g/L'dir. Bu değer substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmada elde edilen değerden daha yüksektir. Bu durum mikroorganizma oranından, ön inkübasyon uygulanmasından kaynaklanmaktadır.
- ✓ Sakkaroz ortamında belirlenen optimum koşullara portakal hidrolizatı ve melas için belirlenen koşullarla aynı bulunmuş olup sitrik asit üretim verimliliğinin portakal posa hidrolizatı kullanılan koşulda daha yüksek olduğu bulunmuştur.
- ✓ Belirlenen optimum koşullarda sakkaroz ortamında kullanılan toplam şeker temelinde sitrik asit üretim verimliliği %19,07 iken, portakal hidrolizatı ve melas ortamında %32,99 olduğu tespit edilmiştir. Bu durum portakal hidrolizatının sitrik asit üretimi için uygun olduğunu göstermektedir.
- ✓ Her iki substrat ortamında da özgül büyüme hızının başlangıç pH, başlangıç substrat derişimi ve metanol oranına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Her fermentasyon ortamında zamana bağlı olarak tüm kinetik parametreler ve özgül büyüme hızları hesaplanmıştır.

- ✓ Çalışmanın dördüncü aşamasında kesikli düzende çalışan kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde ve beşinci aşamasında kesikli düzende çalışan havalandırmalı kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü kullanılmıştır. İki fermentör koşullarında substrat olarak portakal hidrolizatı ve melas birlikte kullanılmış ve çalışmada şeker derişimi (100g/L-180 g/L), pH (5,5-6,5) ve metanol oranı (%3-%5) açısından en uygun koşullar belirlenmiştir. Kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde kullanılan optimizasyon aralığı fermentör aşamasında daraltılmıştır.
- ✓ Fermentör olarak kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde kullanılan çalışmada sabit tutulan parametreler; 1 L/L/dk havalandırma hızı, çalışma hacmi 1000 mL, 30°C inkübasyon sıcaklığı ve %1 mikroorganizma oranı, 200mg/L olacak şekilde  $K_4Fe(CN)_6$  ve %2 mısırozü yağdır.
- ✓ Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde koşulunda belirlenen optimum koşullar kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde belirlenen optimum koşulla ile aynıdır. Sitrik asit üretim koşulları her mikroorganizma ve suşuna göre farklılık göstermektedir. *A. niger* 200910 suşu ve portakal hidrolizatı için en uygun koşullar belirlenmiştir.
- ✓ Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde optimum koşullarda maksimum sitrik asit derişimi 38,7 g/L olarak belirlenmiştir. Bu değer sakkaroz ortamında elde edilen maksimum değerlerle birbirine oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Kullanılan toplam şeker temelinde sitrik asit üretim verimliliği kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde de %37,40 olarak hesaplanmıştır. Kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde sitrik asit üretim verimliliği ise %32,99 olarak hesaplanmıştır. Fermentör ve erlen koşullarında sitrik asit üretiminin birbirine çok yakındır.

- ✓ Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde özgül büyüme hızı ve kinetik parametreler hesaplanmış ve belirlenen etkinin kesikli düzende çalışan çalkalamalı biyoreaktörde etkiye benzer olduğu saptanmıştır.
- ✓ Sitrik asit üretiminin reaktör ortamına göre değişip değişmediğini belirlemek amacıyla diğer bir fermentör olarak kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü kullanılmıştır. Kullanılan besiyeri içeriği ve ortamı kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörle aynıdır. Kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörden farklı olarak bu koşulda mikroorganizma oranının (%2-%4) ve havalandırma hızının (0,5-1,5 l/L/dk) sitrik asit üretimine etkisi de belirlenmiştir.
- ✓ Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü 52,33 g/L olan maksimum sitrik asit üretimi 1L/L/dk havalandırma hızında ve %3 mikroorganizma oranında belirlenmiştir. Diğer koşullar diğer ortamlarda elde edilen optimum koşullarla aynıdır. Sitrik asit üretiminin kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktör koşuluna göre iki katı oranında arttığı belirlenmiştir.
- ✓ Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentöründe gelişen peletler makroskobik olarak incelendiğinde diğer koşullarda gelişen peletlerden daha belirgin olduğu ve dağılmık üremenin olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü inkübasyonun ileriki aşamalarında besiyeri ortamının renginin açıldığı ve berraklaştığı gözlenmiştir.
- ✓ Daha önce yapılan çalışmada portakal posalarından tek hücre proteini üretimi yapılmış ve protein içeriği yüksek ürünler elde edilmişti. Bu çalışma kapsamında üretilen sitrik asit yanında üretilen biyokütle de tek hücre proteini olarak kullanılabilir. Çünkü sitrik asit primer bir metabolittir ve mikroorganizma oranıyla sitrik asit üretimi doğru orantılıdır.

- ✓ Sitrık asit üretimi mikroorganizmaya göre değişmekle birlikte iz elementlere de oldukça hassastır. Ayrıca çeşitli yağlar ve kimyasal maddeler de sitrik asit üretimi de etkilemektedir. Bu tip parametrelerin optimizasyonu da sitrik asit derişimi arttırılabilir.
- ✓ Sitrık asit üretim için en önemli aşama pilot ölçekli çalışmaların yapılmasıdır. Portakal hidrolizatlarının ve malsın substrat olarak kullanılacak çalışmada polipropilenden imal edilmiş pilot ölçekli kule fermentörü ile ilgili çalışmaların yapılması gereklidir.
- ✓ Bu çalışma sonucunda substrata ve kullanılan fermentöre göre sitrik asit derişiminin değiştii belirlenmiştir. Ancak kullanılan mikroorganizma türüne göre optimum koşulların değişmediği tespit edilmiştir.
- ✓ Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü kullanılan toplam şeker temelinde sitrik asit üretim verimliliği %41,86, kesikli düzende çalışan havalandırmalı biyoreaktörde ortamında ise %32,99 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre kesikli düzende çalışan havalandırmalı kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentöründe sitrik asit üretimi havalandırmalı reaktörden %50 oranında daha verimli olmuştur.
- ✓ Çalışma kesikli sistemlerde yürütölmüştür. Sürekli sistemler sitrik asit üretimi için uygun olmadığı belirlenmiştir. Çünkü sitrik asit üretimi ortam koşullarının pH azalışına bağlı olarak üretilmektedir. Bu yüzden kesikli sistemlerin daha sistematik olarak işletilmesi için gerekli çalışmaların yapılması gereklidir.
- ✓ Kesikli düzende çalışan havalandırmalı kule fermentörü bira ve sirke yapımı haricinde kullanımı kısıtlı olan bir biyoreaktördür. Karıştırma maliyetinin olmadığı bu sistemler sitrik asit üretimi için oldukça verimli olduğu bu çalışmada saptanmıştır. Ancak kule fermentörünün havalandırma ve sitrik asit üretimi için modifiye edilmesi gerekliliği çalışma sırasında saptanmıştır.



Bu nedenle kesikli düzende çalışan havalandırılmalı kule fermentörü havalandırma için modifiye edilmiştir.

- ✓ Akdeniz Bölgesinde yoğun üretimi yapılan portakal, hem ülke içi kullanımı hem de ihracat açısından diğer meyvelerden daha önemli bir yere sahiptir. Bu durum atık potansiyelini arttırmaktadır. Atık potansiyeli yüksek olan bir atığın hem proteince zengin biyokütle oluşturulması hem de sitrik asit gibi değerli ürünlerin oluşturulması açısından oldukça uygundur.

## KAYNAKLAR

- [1] Pomeraz, Y. And Meloan, C.E., "Food Analysis Theory and Practice", Third Edition, Chapman & Hall ITP An International Thompson Publishing Company, New York, 798s., (1994).
- [2] Filya, İ., Karabulut, A., Değirmencioglu, T., Canbolat, Ö., Kalkan, H., "Turunçgil Posalarının Muhafaza ve Yem Değeri özelliklerinin Değiştirilmesi", Vet. Anim. Sci. **25**:939-945, (2001).
- [3] Doğan, E.Ü., "Narenciye Atıklarının Tek Hücre Protein Üretiminde Değerlendirilmesi" Yüksek lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 87s, (2002).
- [4] Vacarino, R., Lo Curto, R., Tripodo, M.M., Patane, R., Lagana, G. Schachter, S., "SCP from Orange Peel by Fermentation with Fungi-Submerged and Surface Fermentation" Biological Wastes, **29**:279-287, (1989).
- [5] Karapınar, M. ve Okuyan, M., "The Utilisation of Citrus Waste as Substrate for Microbial Protein, Production by the Fungus *Sporotrichum pulverulentum*", J. Chem. Tech, Biotechnol., **32**:1055-1058, (1982).
- [6] Karapınar, M. ve Okuyan, M., "Composition of Fungal Biomass Grown on Citrus Waste" Chem. Mikrobiol. Tech. Lebensm, **7**:134-136, (1982).
- [7] Israelidis, C.J., and M.I. Coduonis, "Utilisation of agricultural wastes for animal feed and energy". Agricul. Research **6**: 243-253. (1982).
- [8] Wainwright, M., "An Introduction to Fungal Biotechnology", Baskı, Wiley Biotechnology Series, England, 202s, (1992).
- [9] Kimball D.A., "Citrus Processing (a complete guide)" Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland USA, 476s, (1999)
- [10] TDG Technical Brief, "Fruit waste utilisation" (02 Ağustos 2002) Erişim: [http://www.itdg.org/html/technical\\_enquiries/docs/fruit\\_waste\\_utilisation.pdf](http://www.itdg.org/html/technical_enquiries/docs/fruit_waste_utilisation.pdf) (18.10.2008)
- [11] Samuel C., Cecil G., "Industrial Microbiology", McGraw Hill Book Company Inc. Third Edition, 1176s, London, (1959).
- [12] Demirel G., "Tutuklanmış *Aspergillus niger* Kullanılarak Sitrik Asit Üretimi ve Sitrik Asit Üretimi Üzerine Çeşitli Etkilerin İncelenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara 54 s. (2003).

- [13] Aravantinos-Zaris, G., Tzia, C., Oreopoullou, V., Thomopoubs, C. D., “Fermentation of orange processing wastes for citric acid production”, *Journal of Science of Food and Agriculture*, **65**:117–120, (1994).
- [14] Etiler, D., “Yaş meyve sebze ihracatçıları birliği değerlendirme raporu-Türkiye geneli(2007/2008 ocak-eylül dönemi)”, Akdeniz İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, (2008).
- [15] Çakır İ., “Potasyum Gübrelmesinin Kütdiken Limonu Ve Valencia Portakalı Yapraklarında Besin Elementlerinin Mevsimsel Değişmesi, Meyve Verim Ve Kaliteye Etkisinin Saptanması”, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 300s, (1998).
- [16] DİE Enstitüsü Raporu, Özel İhtisas Komisyonu Raporları, (2001).
- [17] Karahocagil, P., “Turunçgiller”, *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, TAEA Bakış*, 2:**11**:1-4, (2003).
- [18] TUIK, “Narenciye üretim ve tüketim bilgileri”, (2008).
- [19] Cemeroglu B., Karadeniz, F., “Meyve Suyu Üretim Teknolojisi”, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları no:25*, s 384, Ankara, (2001).
- [20] Braddlock J.R., “Handbook of citrus By-products and Processing Technology”, Wiley-Interscience Publication, New York, 247, (1999).
- [21] Carriedo M.O.N., Shaw P.E., “Componasien of Volatile Flavor Components in Fresh and Processed Orange – Juices” *J.Agric. Food. Chem*, **38**:1048-1052 (1990).
- [22] Nagy S., Attaway J.A., “Anticancer Phytochemicals of Citrus Fruits and Their Juice Products” *Flüssiger Obst* 61:**11**:349-354 (1994).
- [23] Lam L.K.T., Zhang J., Haseqawa S., “Citrus Limonoid Reduction of Chemically Induced Tumorigenesis” *Food Technology*, 104-108 (1994).
- [24] Middleton E., Kandaswami C., “The Impoct of Plant Flavanoids and Mammalion Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer” *The Flavonoids: Advances in Research sin 1986*, Chapman & Hall, London, 619-652 (1986).
- [25] Jacop R., Hasegava S., Manners G., “The Potential of Citrus Limnoids as Anticancer Agents” *Perishables Hondling Quarterly*, **102**:6-9 (2000).

- [26] Baker, R. A. "Potential dietary benefits of citrus pectin and fiber", Food Technol. **11**:133-139, (1994).
- [27] Çetinkaya A., "Şeker Pancarı Melasından Sitrik Asit Üretiminde Optimum Koşulların Belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara 99 s. (2002).
- [28] Muhtar, S., "Aspergillus niger Kullanılarak Melastan Sitrik Asit Üretimi", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 73 s.,(2000).
- [29] Tuik "Seçilmiş maddelerin dış ticaret bilgileri (Melas ve Sitrik Asit ile türevleri), (2008).
- [30] Curie, J.N., "The Citric Acid Fermentation of Aspergillus niger" J. Biol. Chem., 31:15-37, (1917).
- [31] Nelson, D.L., "Lehninger Principles of Biochemistry", Worth Publisher, New York, 1119 s., (2008).
- [32] Jongh W.A., Nielsen J., "Enhanced Citrate Production Through Gene Insertion in Aspergillus niger" Metabolic Engineering, **10**:87-96 (2008).
- [33] Lotfy W.A., Ghanem K.M., El-Helow E.R., "Citric Acid Production by a Novel Aspergillus niger Isolate Studies" Bioresource Technology, **98**:3464-3469 (2007).
- [34] Sikander A., Ikram-Ul-Haq, Iqbal J., "The role of Mn<sup>++</sup> ions for high and consistent yield of citric acid in recycling fed-batch bioreactor system and its novelty on kinetic basis", Process Biotechnology, 5:2:110-117, (2002).
- [35] Haq, I., Ali, S., Qadeer, M.A., Iqbal, J., "Citric Acid Production By Selected Mutants of Aspergillus niger From Cane Molasses" , Bioresource Tech., **93**:125-130, (2004).
- [36] Haq I., Ali S., Qadeer M.A., Iqbal J. "Citric acid fermentation by mutant strain of Aspergillus niger GCMC7 using molasses based medium" EJB Electronic Journal of Biotechnology **5**:2, (2002)
- [37] Rehman A., Ali S., Ikram-ul Haq, "Phosphate Limitation for Enhanced Citric Acid Fermentation Using Aspergillus niger Mutant UV-M9 on Semi-Pilot Scale" Pakistan J. Biological Sci., 6:14:1247-1249, (2003).

- [38] Ikram-ul Haq, Khurshid S., Ali S., Ashraf H., Qadeer M.A., Rajoka M.I., "Mutation of *Aspergillus niger* For Hyperproduction of Citric Acid From Black Strap Molasses" World Journal of Microbiology & Biotechnology, **17**:35-37 (2001).
- [39] Haq I.U., Ali S., Iqbal J., "Effect of Volume of Culture Medium on Enhanced Citric Acid Productivity by a Mutant Culture of *Aspergillus niger*" Letters in Applied Microbiology, **36**:302-306 (2003).
- [40] Rehman A.U., Ali S., Ikram-ul Haq., "Selection of Fermentation for Citric Acid in Bioreactor" Biotechnology, **3**:178-184 (2003).
- [41] Rehman A., Ali S., Ikram-ul Haq, "Temperature Optima for Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*", Biotech, **1**:2-4:108-110, (2002).
- [42] Haq I., Ali S., Qadeer M.A., ve Iqbal J., "A high performance fermentation process for citric acid production by *Aspergillus niger* NG<sup>GCB</sup>-11 using vermiculite as an additive in a stirred bioreactor" World journal of Microbiology & Biotechnology **20**: 463-467, (2004).
- [43] Mahzar, R., Ali, S., Haq, İ., Waheed, A., "Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* NG-110 in Shake Flask", Online J. Biolog. Sci, **3**:3:360-370, (2003).
- [44] Ali S., Ashraf H. Ve Haq I. " Enhancement in Citrate Production by Alcoholic Limitation" Online Journal of Biological Sciences **2**:2 70-72, (2002).
- [45] Kubicek, C.P. ve Rohr, M. "Citric acid", CRC Critical Reviews of Biotechnology **3**:331–367, (1986).
- [46] Kubicek, C.P. & Rohr, M. "Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation", European Journal of Applied Microbiology. **4**:167–173, (1977).
- [47] Gomez R., Schnabel I., Garmdo J.: "Pellets Growth And Citric Acid Yield". *Enzyme Microb. Technol.* **10**:188-191 (1988).
- [48] Scragg A.H., "Biotechnology for Engineers", Jhon Wiley&Sons, England, s.724, (1988)
- [49] Ateş A., "Ekstraktif Sitrik Asit Fermentasyonu" Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara 99 s. (1998).

- [50] Barrington S., Kim J.W., “Response Surface Optimization of Medium Components For Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown in Peat Moss” *Bioresource Technology*, 99:368-377 (2008).
- [51] Bayraktar E., “Tutuklanmış *Aspergillus niger* İle Sitrik Asit Üretimini Gerçekleştirdiği Üç Fazlı Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Modellenmesi” Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara 153 s. (1998).
- [52] Maddox, I.S., Hussain, M., Brooks, J.D., “The effect of methanol on citric acid production from galactose by *Aspergillus niger*”, *App. Microbiol. Biotech.*, **23**:203-205, (1986).
- [53] Roukas, T., “Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Tech.*, **24**:54-59, (1999).
- [54] Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, A., Lebeault, J.M., “Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*” *Bioresource tech.*, **74**:175-178, (2000).
- [55] Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A., “Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation”, **38**:1725-1729, (2003).
- [56] Shojaosadati, S. A., & Babaeipour, V., “Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed solid-state bioreactor”, *Process Biochemistry*, **37**:909–914, (2002).
- [57] Darani K.K., Zoghi A., “Comparison of Pretreatment Strategies of Sugarcane Baggase: Experimental Design For Citric Acid Production” *Bioresource Technology*, **99**:6986-6993 (2008).
- [58] Röhr, M., Kubicek C.P., Kominek, J., “Citric acid”, *Biotechnology vol. 3*, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, s.456-478,(1983).
- [59] Marison I.W., “*Biotechnology for Engineers*” John Wiley & Sons, New York s.390, (1983).
- [60] Haq, I.U., Ali, S., Iqbal, J., “Effect of volume of culture medium on enhanced citric acid productivity by a mutant culture of *Aspergillus niger* in stirred fermentor” *Letters in Applied Microbiology*, **36**: 302–306, (2003).

- [61] Alben, E., Erkmen, O., “Production of Citric Acid from a New Substrate, Undersized Semolina, by *Aspergillus niger*”, Food Tech. Biotech., 42:1:19-22. (2004).
- [62] Demirel, G., Yaykaşlı, K.O., Yaşar, A., “The Production of Citric Acid by Using Immobilized *Aspergillus niger* A-9 and Investigation of Its Various Effects”, Food Chemistry, 89:3:393-396, (2005).
- [63] Yiğitoğlu, M., “Production Of Citric Acid By Fungi” Journal of Islamic Acedemy of Sciences, 5:2:100-106,(1992).
- [64] Yigitoglu M, McNeil B, Kristiansen B, "Extended Summaries SCI Biotechnology Group 2<sup>nd</sup> Annual Students' Meeting on Fermentation Biotechnology, Effect of pH on citric acid production in a stirred tank reactor" , J Chem Tech Biotech, 4:297-305, (1992).
- [65] Vassileva M., Azcon R., Berea J.M., Vassilev N., “Application of Encapsulated Filamentous Fungus in Solubilization of İnorganic Phosphate” Journal of Biotechnology, 63:67-72 (1998).
- [66] Ikram-ul H., Ali S., Qadeer, M.A.,Iqbal J., “Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses”Bioresource Technology 93:125–130, (2004).
- [67] Connor J. M, “The Citric Acid Industry”., Global price fixing, Kluwer Academic Publishers, (2001).
- [68] Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A., “Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation”,38:1725-1729, (2003).
- [69] Erkmen O., Alben, E., “Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina” Journal of Food Engineering 52:161–166, (2002).
- [70] Selahzadeh, R. M., Roehr, “Citric Acid Fermentation and the Effects of Temperature”, Acta Biotechnol. 23:1: 95–100, (2003).
- [71] Gupta S. and Sharma C.B., “Biochemical studies of citric acid production and accumulation by *Aspergillus niger* mutants”World Journal of Microbiology & Biotechnology 18: 379–383, (2002).

- [72] Kubicek, C.P., Rohr, M., "Influence of manganese on enzyme syntesis and citric acid accumulation. European Journal of Applied Microbiology". **4**: 167–173, (1977).
- [73] Clark DS, Ito K, Horitsu H. "Effect of manganese and other heavy metals on derin kültür citric acid fermentation of molasses" Biotech Bioeng, **8**:4:465, (1966).
- [74] Kılıç M., "Ekstraktif Fermentasyonla Sitrik Asit Üretimi" Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 96 s., (2001).
- [75] Jernejk, K., Cimerman A., Vendiamin, M., Perdih, A., "Lipids of a Citric Acid Producing *Aspergillus niger* strain Grown in Capper-and in Manganese-Supplemented Media", Appl. Microbiol. Biotechnol, **32**:699-703, (1990)
- [76] Hamissa F.A., "Effect o Alcohol and Related Compounds on Citric Acid Production From Beet Molasses by *Aspergillus niger*" Chem. Microbiol. Technol., **5**:157-160 (1978).
- [77] Hang Y.D., Splittstoesser D.F., Woodams E.E., Sherman R.M., "Citric Acid Production by *Aspergillus niger*" Biotechnol. Letts. **6**:763-764 (1984).
- [78] Manonmani H.K., Sreekantiah K.R., "Effect of Additives on The Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in Defined Media" J. Microbiol. Biotechnol., **2**:75-89 (1989).
- [79] Manonmani H.K., Sreekantiah K.R., "Effect of Additives on The Citric Acid Production by *Aspergillus niger*" J. Fd. Sci. Technol., **25**:159-161 (1988).
- [80] Kubicek C.P., Zehentgfuher O., Kalak H.E., Röhr M., "Regulation of Citric Acid Production by Oxygen: Effect of Dissolved Oxygen Tension on Adenylate Levels and Respiration in *Aspergillus niger*" Eur. J. Apple. Microbiol. Biotechnol., **5**:157-160 (1980).
- [81] Kahlon S.S., "Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* sp. I solated From Different Sources" J. Res. Puncab Agric. Univ., **19**:44-50 (1982).
- [82] Shadafzu D. Ogawa T., Fazeli A., "Comparison of Citric Acid Production From Beet Molasses and Date Syrup With *Aspergillus niger*" Hakko Kogaku Zasshi, **54**:65-75 (1976).



- [83] Srivasta A.S., De S.K., “Effect of Cultral Conditions on Microbiol Citric Acid Formation” Ind. J. Agric. Chem., **13**:39-44 (1980).
- [84] Bizukoje M., Ledakowicz S., “The Knetics of Simultaneous Glucose and Fructose Uptake and Product Formation by *Aspergillus niger* in Citric Acid Fermentation” Process Biochemistry, **39**:2261-2268 (2004).
- [85] Cayford, B., Sutton K., Bramwell-King M., Chami S., “Chemostat Project: Improvemnet Of Citric Acid Production By *Aspergillus Niger* In A Continuous Culture” N301 Industrial & Environmental Microbiology, (2000).
- [86] Munir E., Yoon J.J., Tokimatsu T., Hattor T., ve Shimada M., “ A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete Fomitopsis palustris” [www.pnas.org/cgi/doi](http://www.pnas.org/cgi/doi) 98:20:11126-11130, (2001).
- [87] Mandal S.K., Banerjee P.C., “Submerged Production of Oxalic Acid From Glucose by Immobilized *Aspergillus niger*” Process Biochemistry, **40**:1605-1610 (2005).
- [88] Milsom P.E., Meers J.L. “Gluconic and Itaconic Acids” Comprehensive Biotechnology vol. 3, Oxford: Pergamon Press, 681-700 (1985).
- [89] Rane K.D., Sims K.A., “Oxygen Uptake and Citric Acid Production by *Candida lipolitica* Y1090.kevin” Biotech and Bioengineer., **43**:131-137, (1994).
- [90] Rane K.D., Sims K.A.,”Citric Acid Production by *Candida lipolitica* Y1095 in Cell Recyand Fet-batch Fermentors” Biotech and Bioengineer, **46**:325-332, (1995).
- [91] Roukas T., Kotzekidou P., “Influence of Some Trace Metals and Stimulants on Citric Acid Production From Brewery Waste by *Aspergillus niger*” Enz. Microbiol. Technol., **9**:391-394 (1987).
- [92] Tokatman A.K., “Sitrik asit üretiminde verim üzerine bazı poliollerin etkisi” Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, (2001).
- [93] Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P., “Microbial Production of Organic Acids Expanding the Markets” Trends of Biotec., **26**:2: 100-108, (2007)
- [94] Ertugay,Z., Certel, M., “Biyoteknoloji 1”,Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu Yayın No:135, (1992).

- [95] Shuler, M.L., Kargı, F., “Bioprocess Engineering: Basic Concepts”, Prentice-Hall PTR, ISBN: 0-13-478215-1, (1992).
- [96] Pekin, B., Biyokimya Mühendisliği (Biyoteknoloji), Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayınları No:3, İzmir, (1981).
- [97] Achrekar, J., “Citric Acid Biotechnology” Dominant Publisher and Distributars, New Delti 110002, 246 s. (2006).
- [98] Luedeking R, Piret EL, “A kinetic study of the lactic acid fermentation”, J Biochem Microbiol Technol Eng. 1: 393-412, (1959)
- [99] Kubicek and Röhr, Citric acid fermentation, Crit Rev Biotechnol 4:331–373. (1989)
- [100] Kristiansen, B., Sinclair, C.G., “Production Of Citric Acid In Continuous Culture”. Biotechnology And Bioengineering, 21:2:297-315, (1979)
- [101] Ho S.F., Kristiansen B., Matthey M., “Phase-related mathematical model of the production of citric acid by *Aspergillus niger*”, *Proc European Federation of Biotechnology International Conference on Modeling of Filamentous Fungi* p. 57 Otocec, Slovenia, (1994).
- [102] Arzumanova T.E., Sidorova, I.A., Shishkanovaa, N.V., Finogenovaa, T.V., , “Mathematical modeling of citric acid production by repeated batch culture”, *Enzyme and Microbial Technology* 26:826–833, (2000).
- [103] Levinson W.S., Kurtzman C.P., Kuo T.M., “Characterization of *Yarrowia lipolytica* and Related Species For Citric Acid Production From Glycerol” *Enzyme and Microbial Technology*, 41:292-295 (2007).
- [104] İleri, R., “Çevre Biyoteknolojisi”, Değişim Yayınları, Adapazarı, 661s, (2000)
- [105] Tyagi R.D., Tran F.T., Chowdhury A.K.M.M., “Apilot study biodegradation of petrolium refinery wastewater in a polyurethane-atteded RBC”, *Process Biochemistry*, 28:75-82, (1993)
- [106] Jianlong W., “Production of citric acid by immobilized *aspergillus niger* using a rotating biological contactor (RBC)” *Bioresource tech.*, 75:245-247, (2000).
- [107] Saha M.L., Sakai Y., Takahashi F., “Citric acid fereemntation by Magnetic Drum Conductor: Use of Methanol and aethanol for higher production”, *Journal of Biosci and Bioeng.*, 87:3:394-396. (1999).

- [108] Lu, M.Y., Maddox, I.S., Brooks, J.D., “Application of a Multi-Layer Packed-Bed Reactor to Citric Acid Production in Solid State Fermentation Using *Aspergillus niger*”, *Process Biochem.*, **33**:2:117-123 (1998).
- [109] Serieys M., Goma, G., Durand G., “Design and Oxygen Transfer Potential of A pulsed Continious Tubuler Fermenter”, *Biotech and Bioeng.* **20**:1393-1406 (1978).
- [110] Greenshield R.N., Smith E.L., “Tower Fermentation Systems And Their Application”, *Chemical Engineer.*, **249**:182-190, (1971).
- [111] Morris G.G., Greenshield R.N., Smith E.L., “Aeration in Tower Fermenter Containing Microorganism” *Biotech and Bioeng.* **4**:535-545, (1973).
- [112] Özyurt, M., “Kule fermentasyonu ile endüstriyel mikroorganizmaların zeytin susyunda üretimi”, *TUBİTAK VI. Bilim Kongresi, Ankara*, 119-123., (1977).
- [113] Kolonkaya, N., Saglam, N., “Biyodelignifikasyon Ve Biyoteknolojik Önemi” *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, **3**:251-256, (1988).
- [114] Okur, M.T., “Ayçiçeği Kabuğu Hemiselülozik Hidrolizatına Adapte Edilmiş *Pichia Stipitis* Mayası İle Alkol Üretimine Zehir Giderme Ön İşlemlerinin Etkisi” *Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der.*, **22**: **2**: 385-391, (2007).
- [115] Ramsay, J.A., Hassan, M.C.A., Ramsay B.A., “Biological conversion of hemicellulose to propionic acid”, *Enzyme and Microbial Technol.*, **22**:292-295, (1998).
- [116] Martin. C., Fenandez T., Garcia R., Carrillo, E., Marcet, M., Galbe, M., Jönsson, L., “Preparation of hydrolysates from tobacco satlks and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*”, *W. Jour. Of Microbio. Biotech*, **18**:857-862, (2002).
- [117] Rudolf, A. Alkasrawi, Am., Zacchi, G., Liden G., “A comparison between batch ad fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce” *Enzyme and Microbial Technol.*, **37**: 195-204, (2005).
- [118] Mohagheghi, A., Ruth,M., Schell, D.J., “Condition hemicellulose hydrolysate for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and etanol yields” *Pross. Biochem.* **40**:1806-1811 (2006).

- [119] Villarreal M.L.M., Prata A.M.R., Felipe M.G.A., Silva, J.B.A.E., “Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*”, *Enz. Microbio. Technol.* **40**:17-24, (2006).
- [120] Larsson, S., Nilvebrant, O., Jönsson, L.J., “Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:167-174 (2001).
- [121] Kubanoğlu E., Kurbanoglu N.I., “Production of Citric Acid From Horn Hydrolysate by *Aspergillus niger*” *Process Biochemistry*, **38**:1421-1424 (2003).
- [122] Kurbanoglu E.B., Algur O.F., “Use of Ram Horn Hydrolysate as Peptone for Bacterial Growth” *Turk J. Biol.*, **26**:115-23 (2002).
- [123] Kurbanoglu E.B., Algur O.F. “The Influence of Ram Horn Hydrolyzate on The Crop Yield of The Mushroom *Agaricus bisporus*” *Sci. Hort.*, **94**: 351-7 (2002).
- [124] Kurbanoglu E.B., “Production of Single-Cell Protein From Ram Horn Hydrolysate” *Turk J. Biol.*, **25**:371-7 (2001).
- [125] Pazouki, M. and Panda, T., “Understanding the Morphology of Fungi” *Bioprocess Eng.*, **22**:127-143, (2000).
- [126] Wang N.S. “Cellulose Degradation” University of Maryland, Department of Chemical Engineering, Ders Notu
- [127] Gigras, P., Sahai, V., Gupta, R., “Statistical media optimization and production of ITS  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor”. *Current Microbiology.* **45**:203-208 (2002).
- [128] Fatemi, S. S., Shojaosadatoei S. A., "Citric acid production from apple pomace by using solid-state fermentation", *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, **18**:(1-2): 44-47 (1999)
- [129] Khosravi-Darani, K., Zoghi A., Alavi S.A., Fatemi S.S.A., “Application of Plackett-Burman Design for Citric Acid Production from pretreated and untreated wheat straw”, *Iran J. Chem. Eng.*, **2**:1-15, (2008)
- [130] Adham, N.Z., “Attempt at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet molasses medium”, *Bioresource Tech.*, **84**:97-100, (2002)

- [131] Marier J.R. and Boulet M, "Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method", *J.Dairy sci.*, **41**:1683-92, (1958).
- [132] Southgate, D.,A.,T., "Determination of food carbohydrates", 1st. Edition, Applied Science Publishers Ltd, England, s.108, (1976).
- [133] Ali S.,İkram-ul Haq, Qader M.A, Iqbal J., "Biosynthesis of Acid By Locally Isolated *Aspergillus niger* Using Sucrose Salt Media" *Online Journal of Biological Sciences* 1, **4**: 178-181 (2001).
- [134] Pazouki M., Fesle P.A., Sinha J., Panda T., "Comparative Studies on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* and *Candida Lipolytica* Using Molasses and Glucose" *Bioprocess Engineering*, **22**:353-361 (2000).
- [135] Gibbs P.A., Seviour R.J., ve Schmid F. "Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions" *Critical Reviews in Biotechnology* **20**:1:17-48, (2000).
- [136] Haq, I., Ali, S., Iqbal, J., "Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*", *Process Biochemistry*, **38**:921-924, (2003).
- [137] Navaratman P., Arasaratman V., Balasubramaniam K., "Channelling of Glucose by Methanol for Citric Acid Production From *Aspergillus niger*" *World Journal of Microbioglogy &Biotechnology*, **14**:559-563 (1998).
- [138] Roukas T. And Kotzekidou, " Pretreatment of Date Syrup to Increase Citric Acid Production" *Enzyme and Microbial Technol*, **21**:273-276 (1997).
- [139] Kirimura K., Lee S. P., Nakajima L., Kawabe S., Usami S., "Improvement in Citric Acid Production by Haploidization of *Aspergillus niger* Diploid Strains" *J. Ferment. Technol.*, **66**:375-382 (1988).
- [140] Fiedurek J., Pluta B., Szczodrak J., Jamroz J., "Relationship Between Citric Acid and Extracelllar Acid Phosphatase Production by *Aspergillus niger*" *Acta Biotechnol.*, **16**:207-213, (1996).
- [141] Pascual J.M., Carmona, J.F., "Composition of citrus pulp", *Animal Feed Sci. And Tech.*, **5**:1-10, (1980).
- [142] Karabulut A., Canpolat Ö., "Yem değerlendirme ve analiz yöntemleri", *Uludağ Üniversitesi Yayınları*, 520s, (2005).

- [143] Contreras-Govea, F.E., and R.E. Muck., “Microbial inoculants for silage. Wisconsin Extension Team Forage. Focus on forage fact sheets., [http://www.uwex.edu/ces/crops/teamforage/\(20.10.2008\)](http://www.uwex.edu/ces/crops/teamforage/(20.10.2008)) (2006).
- [144] Demirbağ, Z., “Genel mikrobiyoloji”, Sonhaber matbaacılık, Trabzon, s314, (2006).
- [145] Ertugay,Z., Certel, M., “Biyoteknoloji 1”,Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu Yayın No:135, (1992).
- [146] Roukas, T, Kyriakides, M.L., “Optimization study for the production of citric acid and gluconic acid from fig water extract by *Aspergillus niger* in surface fermentation”, Food Biotechnol., 16:1:17-28, (2002).
- [147] Saad M.M. “Citric Acid Production from Pretreating Crude Date Syrup by *Aspergillus niger* NRRL595”, J. App. Sci. Research, 2:2:74-79, (2006).
- [148] Papagianni, M., “Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biotechnology aspects, membrane transport and modelling”, Biotechnology Advances **25**:244-263, (2007).
- [149] Ali, S., Haq, I., Qadeer, M.A., Iqbal, J., “Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor”, Electronic J. Biotech., **5**:3:258-271, (2002).
- [150] Peksel, A., Kubicek, C.P., “Effects of Sucrose Concentration During Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*” Turk J. Chem., **27**:581-590, (2003).
- [151] Kiel, H., Guvrin, R., Henis, Y., “Citric Acid Fermentataion by *Aspergillus niger* on Low Sugar Concentratations Cotton Waste”, App., Enviro. Microviol., **42**:1:1-4, (1981).
- [152] Papagianni, M., Mattey, M., “Physiological aspect of free and immobilized *Aspergillus niger* culture producing citric acid under various glucose concentratations”, Process Biocehm., **39**:1963-1970, (2004).
- [153] Kapoor, K.K., Chaudhary, K.; Tauro, P., “Citric acid” AVI Publishing Co., Westport, CT, 709-747, (1982).
- [154] McIntyre M, McNeil B. , “Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth and citrate production in *Aspergillus niger* A60”, Enzyme Microb Technol, **20**:135–42, (1997).

- [155] Sanjay, K., and Sharma P., “A Highly performance fermentation process for production of citric acid from sugarcane molasses”, J. Microbiol., **23**:211-217, (1994).
- [156] Morris G.G., Greenshield R.N., Smith E.L., “Aeration in Tower Fermenter Containing Microorganism” Biotech And Bioeng., **4**:535-545, (1973).
- [157] Russel, T.W.F., Dunn, I.J., Blanch, H.W., “The Tubular Loop Batch Fermenter : Basic Concepts”, Biotech And Bioengineer., **16**:1261-1272, (1974).
- [158] Özyurt, M. “Kule Fermentörü ile Endüstriyel Mikroorganizmaların Zeytin Suyunda Üretimi”, VI. Bilim Kongresi, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Tebliğler, Gıda ve Fermentasyon Teknolojisi Seksiyonu, TÜBİTAK, s.119-123. (1977).

## ÖZGEÇMİŞ

29.07.1978 yılında Mersin’de doğdum. İlkokulumu Çiftlikköy İlköğretim Okulunda, lise öğrenimi Tevfik Sırrı Gür Lisesinde 1994 yılında tamamladım. 1998 yılında Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümünden mezun oldum. 2002 yılında Mersin üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek lisansımı tamamlayarak Yüksek Mühendis ünvanımı aldım. 2002 yılında Mersin Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimime başladım. 2001 yılından itibaren Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evli ve 1 çocuk annesiyim.

- Lisans Bitirme Tezi: Tekstil Atık Sularının Beyaz Çürükçül Funguslarla Sürekli Sistemde Giderimi, 1998 / Mersin Üniversitesi, Mersin
- Yüksek Lisans: Tarımsal Atıkların Tek Hücre Protein Üretiminde Değerlendirilmesi, 2002/ Mersin Üniversitesi, Mersin

### **Bilimsel Etkinlikler:**

#### **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlananlar**

- Mustafa Ozyurt-Ece U. Deveci, “Conversion of Agricultural And Industrial Wastes For Single-Cell Protein Production And Pollution Potential Reduction: A Review, , Fresenius Environmental Bulletin, Vol:13, No 8,pp: 693-699, 2004
- E.U. Deveci-Mustafa Ozyurt “Evaluation Of Citrus Wastes For Roduction Of Single Cell Protein”, Adv. In Food Sci., Vol:26, No:3, pp: 130-134, 2004
- E.U. Deveci-Mustafa Ozyurt “Evaluation of Lemon And Grapefruit Pulps For Single Cell Protein Production Using *Aspergillus niger* And *Penicillium roqueort*”i, Advanced in Food Sciences, Vol:27, No:2, pp: 77-84, 2005



## **Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlananlar**

- Yalvaç, M., Deveci, E.Ü., “Mezitli Deresi’nin Yağışlı-Yağışsız Dönemlerde Su Kalitesindeki Değişiminin Araştırılması” Türk Sucul Yaşam Dergisi, Isbn 978-994-3825-17-2, Yıl:3-5, Sayı:5-8, S.584-595, 2007

## **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler.**

- Ece Ummu Dogan and Mustafa Ozyurt, “Evaluation of Citrus Decayed Juice For Production of Single-Cell Protein”, 12th International Symposium On Environmental Pollution And Its Impact On Life In The Mediterranean Region Appropriate Solutions For Environmental Problems In Emerging Economies, Abstract Book, pp:211, 4–8 October 2003, Antalya, Turkey,
- Mustafa Özyurt, Ece Ümmü Deveci, Ahmet Acar ,Hakan Aygün, Bahar Tank, İrfan Sayan, Veysi Özel, “Investigation of Microbiological Pollution of Sea Water in Mersin”, International Conference On Environment: Survival And Sustainability, 19-24 February 2007, Nicosia, Northern Cyprus, pp: 720

## **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

- E.U. Doğan- Mustafa Ozyurt, “Tarımsal Atıkların Tek Hücre Protein Üretimi ile Değerlendirilmesi”, II Ulusal Çevre Sorunları Sempozyumu, 16–18 Ekim 2002, Erzurum, Bildiriler Kitabı, pp:276–284
- E.U. Doğan- Mustafa Ozyurt, “Narenciye Atıklarının (posa) Tek Hücre Protein Üretiminde Değerlendirilmesi”, XIII: Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, Bildiriler Kitabı, pp:319-324.
- Emel Deniz Avcı, Ece Ümmü Deveci, Halil Kumbur, "Çevre Kirliliğinde Ve Kontrolünde Ekolojik Tarımın Yeri", Gap IV. Tarım Kongresi, 21–23 Eylül 2005, Şanlıurfa, Bildiriler Kitabı, pp: 684-692.

- Deveci E.Ü., Özyurt M., "Akdeniz Bölgesinde Narenciye Atık Potansiyeli Ve Bu Atıkların Değerlendirme Yollarının Araştırılması", 6. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi" Poster sunumlar kitabı, 24-26 Kasım 2005, İstanbul, pp:22-27
- Ece Ümmü Deveci Mustafa Özyurt, "Biyolojik İşlemlerde Farklı Analiz Yöntemleri Kullanarak Mikrobiyal Yıkımın Saptanması", III. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Çanakkale, 5-7 Temmuz 2006, Bildiri Özetleri, pp: 180
- Deveci E.Ü. Özyurt M., "Sitrik Asit Üretim Teknolojisi Ve Tarımsal Atıkların Substrat Olarak Kullanılabilirliği", Ulusal Çevre Sempozyumu 2007, 16-21 Nisan 2007,(UÇS 2007), CD-ROM tam metin, poster sunum, Mersin
- Özyurt M., Deveci E.Ü., Acar A., Aygün H., Tank B., Sayan İ., Özel V., "Mersin İli Kıyı Şeridinde Deniz Suyunun Fizikokimyasal Ve Mikrobiyolojik Kirlilik Durumunun İncelenmesi", Mersin Sempozyumu 2008, 19-22 Kasım 2008, Mersin, Tam Metin (Basımda)

### **Diğer Yayınlar**

- Ece Ü. DEVECİ, "Akdeniz Bölgesindeki Narenciye Atık Potansiyeli Ve Bu Atıkların Değerlendirme Yollarının Araştırılması" Bölüm İçi Seminer, 12 Mayıs 2004, MEÜ. Mühendislik Fakültesi
- Ece Ümmü DOĞAN "Tarımsal Atıkların Değerlendirme Yöntemleri" Bölüm İçi Seminer, 14 Mayıs 2003, MEÜ. Mühendislik Fakültesi

### **Projeler**

**Proje Adı:** "Narenciye Atıklarının *Aspergillus niger* Filamentli Fungusu Kullanılarak Sitrik Asit Üretiminde Değerlendirilmesi" FBEÇM(EÜD)2005-3DR kodlu BAP Projesi, (5000 YTL, 2005- devam ediyor)

### **Üyelikler**

TMMOB Çevre Mühendisleri Odası üyeliği