

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**SERBEST VE İMMOBİLİZE *Rhizopus oryzae*
FUNGUSU İLE LAKTİK ASİT ÜRETİMİNİN
OPTİMUM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ**

İşık ÇOBAN

**Biyomühendislik Anabilim Dalı
Bilim Kodu: 612.01.00
Sunuş Tarihi: 08.08.2008**

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Bornova-İZMİR

Işık ÇOBAN tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “**Serbest ve İmmobilize *Rhizopus oryzae* Fungusu ile Laktik Asit Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma, E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08/08/2008 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye : Doç. Dr. Oğuz. BAYRAKTAR

ÖZET**SERBEST VE İMMOBİLİZE *Rhizopus oryzae* FUNGUSU İLE
LAKTİK ASİT ÜRETİMİNİN OPTİMUM KOŞULLARININ
BELİRLENMESİ****ÇOBAN, Işık****Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı****Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Sayıt SARGIN****Ağustos 2008, 136 Sayfa**

Bu çalışmada serbest ve immobilize *Rhizopus oryzae* NRLL-395 suşu ile laktik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Beş farklı karbon kaynağının (glukoz, nişasta, melas, peyniraltı suyu, buğday ruşeym küspesi) kullanıldığı çalkalamalı kültür denemelerinde en yüksek laktik asit verim ve verimlilik değerleri % 10 (ağırlık/hacim) glukoz konsantrasyonunda sırasıyla % 78 (g/g) ve 0.87 g/L.saat olarak elde edilmiştir. Karbon kaynaklarının ve fungusun statik kültür denemelerindeki performansı incelenmiş ve laktik asit verimlilik değerleri belirlenmiştir. Katı kültür fermentasyonu ile yapılan üretimlerde ise optimum koşullarda (%23 glukoz konsantrasyonu, % 50 başlangıç nemi ve % 15 inokulasyon oranında) % 9.25 (g/g) oranında bir verim değerine ulaşılmış ve katı kültür fermentasyonunun laktik asit üretimine uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Ca-aljinat boncuklara tutuklanmış *R. oryzae* hücreleriyle gerçekleştirilen üretimlerde sabit glukoz oranı ve sabit ortam koşulları (28°C sıcaklık ve 120 rpm çalkalama hızı) sağlanarak en uygun immobilizasyon tipi ve inokulum yaşı, spor konsantrasyonu, Na-Aljinat

VI

oranı, boncuk çapı ve CaCl₂ özeltisi konsantrasyonun laktik asit üretimine etkisi incelenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen maksimum laktik asit verimlilik değeri (0.35 g/L. saat), misel immobilizasyonunda 2 günlük misellerin kullanıldığı üretimde, 3 mm boncuk çapı, % 2 (ağırlık/hacim) Na-aljinat konsantrasyonu ve 100 mM CaCl₂ özeltisinin kullanıldığı üretimde elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Laktik asit, *Rhizopus oryzae*, immobilizasyon, statik kültür, katı kültür fermentasyonu.

ABSTRACT**DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITIONS FOR LACTIC ACID PRODUCTION BY FREE AND IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae*****ÇOBAN, Işık****MSc Thesis, in Bioengineering****Supervisor: Assistant Prof. Sayıt SARGIN****August 2008, 136 Pages**

In this study free and immobilized *Rhizopus oryzae* NRLL-395 was used for lactic acid production. Five different carbon sources (glucose, starch, molasses, whey and wheat germ pulp) were examined in lactic acid production using shake flask culture and maximum yield and productivity obtained were 78% (g/g) and 0.87 g/L.h respectively in 10 %(w/v) glucose concentration. The performance of the fungus and mentioned carbon sources in static culture conditions were also examined and lactic acid productivities were determined. Lactic acid production was also performed by using solid state fermentation and under optimum conditions (23 % (w/w) glucose concentration, 50 % (v/w) initial moisture content and 15 % (v/w) inoculation ratio) only 9.25 % (g/g) lactic acid yield was achieved and it was concluded that this fermentation system is not suitable for lactic acid production. Immobilization of fungus in Ca-alginate beads was studied at constant concentration of glucose at 28 °C and 120 rpm and the effects of inoculum age, cell loading, bead size, Na-

VIII

Alginate and CaCl_2 concentrations on lactic acid production were investigated. Under optimum conditions 0.35 g/L.h lactic acid productivity was obtained with 2 days old mycelia, 3 mm bead diameter, 2% (w/v) Na-alginate concentration and 100 mM CaCl_2 solution.

Keywords: Lactic acid, *Rhizopus oryzae*, immobilization, static culture, solid state fermentation.

TEŞEKKÜR

Bu tezin meydana geliş sürecinde, tez konusunun belirlenmesinden yazım aşamasına kadar her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Sayıt SARGIN' a, uygulamalardaki yardımlarından ve manevi desteklerinden ötürü başta Yüksek Biyomühendis Ali Özhan AYTEKİN, Ar. Gör. Özlem ÜSTÜN, Biyomühendis M. Özgün ÖZEN, Ar. Gör. Emek ASLAN, Ar. Gör. Müge İŞLETEN, Biyomühendis H. Buğra ÇOBAN, Biyomühendis Aşkın TATLİCAN ve Biyomühendislik Bölümü Lisans Öğrencisi Meltem KOCAMANOĞLU olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma, tez uygulamasının gerçekleştirilmesi için uygun laboratuvar ve ekipman koşullarını sağlayan Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü' ne, hammadde teminindeki yardımlarından ötürü Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü' ne, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen herkese ve son olarak ta doğduğum günden bu yana üzüntülerime benden daha fazla üzülen, tüm sevinçlerime ve başarılarıma da yine benden çok sevinen aileme teşekkür etmeyi borç bilirim.

İyi ki varsınız...

Işık ÇOBAN

İzmir-2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XX
1 GİRİŞ.....	1
2 LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Laktik Asit.....	4
2.1.1 Fiziksel ve kimyasal özellikler.....	4
2.1.2 Üretim Teknolojisi	9
2.2 Katı Kültür Fermentasyonu.....	21
2.2.1 KKF' nin tanımı ve tarihçesi.....	21
2.2.2 Katı Kültür Fermentasyonunda Üretim Koşulları.....	26
2.2.3 KKF' nin DKF ile karşılaştırılması.....	31
2.3 İmmobilizasyon.....	32
3 MATERYAL VE METOD.....	37
3.1 Materyal	37
3.1.1 Mikroorganizma	37
3.1.2 Substratlar.....	37
3.1.3 Kimyasallar	37
3.1.4 Kullanılan Başlıca Cihazlar.....	38
3.1.5 Tampon, Reaktif ve Çözeltiler	39
3.2 Metod	41
3.2.1 Üretim ortamlarının hazırlanışı	41
3.2.2 İnokulasyon.....	43
3.2.3 Üretim koşulları ve örnek alma.....	46
3.2.4 Üretim sonrası işlemler	47
3.2.5 Laktik asit tayini.....	50
3.2.6 Toplam şeker tayini.....	52
4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	54
4.1 Serbest Hücrelerle Laktik Asit Üretimi.....	54
4.1.1 Çalkalamalı kültürde laktik asit üretimi	54
4.1.2 Statik kültürde laktik asit üretimi	66
4.1.3 Katı kültürde laktik asit üretimi	74
4.2 İmmobilize Hücrelerle Laktik Asit Üretimi.....	78
4.2.1 İmmobilize misellerin üretime etkileri.....	79
4.2.2 İmmobilize sporların üretime etkileri.....	82
4.2.3 Na-Aljinat konsantrasyonunun üretime etkileri.....	86
4.2.4 Boncuk büyüklüğünün üretime etkileri.....	90

XII

4.2.5	CaCl ₂ konsantrasyonunun üretime etkileri.....	94
4.2.6	Glukoz konsantrasyonunun üretime etkileri	96
5	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	104
	EKLER.....	120
	ÖZGEÇMİŞ.....	136

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1: Laktik Asitin L ve D Form Optik İzomerleri (Chem systems reports., (2002))	6
Şekil 2.2: <i>R.oryzae</i> ' de Organik asit Sentezinin Kritik Yolizleri (Magnuson and Lasure., 2004).....	13
Şekil 3.1: İmmobilize hücre hazırlama sistemi	46
Şekil 3.2: Laktik asit standart eğrisi.....	52
Şekil 3.3: Glukoz Standart Eğrisi.....	53
Şekil 4.1: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi	55
Şekil 4.2: Farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi	57
Şekil 4.3: Farklı başlangıç melas konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi	61
Şekil 4.4: Farklı başlangıç ruşeym konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi	64
Şekil 4.5: Statik kültürde farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi.....	66
Şekil 4.6: Statik kültürde farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi.....	68
Şekil 4.7: Statik kültürde farklı başlangıç melas şekeri konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi	70
Şekil 4.8: Statik kültürde farklı başlangıç buğday ruşeymi konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi	72

ŞEKİLLER DİZİNİ(Devam)

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9: Buğday kepeği-glukoz karışımı ile maksimum laktik asit (LA) verimlerinin zamana karşı değişimi.....	76
Şekil 4.10: Farklı glukoz konsantrasyonlarında elde edilen maksimum laktik asit (LA) verimleri.....	77
Şekil 4.11: Farklı başlangıç nem oranlarının laktik asit üretimine etkisi.....	77
Şekil 4.12: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim).....	81
Şekil 4.13: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim).....	81
Şekil 4.14: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim).....	81
Şekil 4.15: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (4. Üretim).....	82
Şekil 4.16: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (5. Üretim).....	82
Şekil 4.17: İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim).....	85
Şekil 4.18: İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim).....	85
Şekil 4.19: İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim).....	85
Şekil 4.20: İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (4. Üretim).....	86

ŞEKİLLER DİZİNİ(Devam)

Şekil	Sayfa
Şekil 4.21: İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (5. Üretim).....	86
Şekil 4.22: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim).....	89
Şekil 4.23: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim).....	89
Şekil 4.24: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim).....	89
Şekil 4.25: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (4. Üretim).....	90
Şekil 4.26: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (5. Üretim).....	90
Şekil 4.27: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim).....	93
Şekil 4.28: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim).....	93
Şekil 4.29: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim).....	93

ŞEKİLLER DİZİNİ(Devam)

Şekil	Sayfa
Şekil 4.30: Farklı CaCl ₂ damlatma çözeltisi ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları(1. Üretim).....	96
Şekil 4.31: Farklı CaCl ₂ damlatma çözeltisi ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları(2. Üretim).....	96
Şekil 4.32: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları.....	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1: Laktik asitin bazı fiziksel özellikleri (Vick Roy, 1985).....	7
Çizelge 2.2: Sıvı laktik asitin değişik basınç değerlerindeki kaynama noktası değerleri	8
Çizelge 2.3: Değişik oranlarda laktik asit içeren çözeltilerin yoğunlukları (g/ml) (Holten et al.,1971).....	9
Çizelge 2.4: KKF ile elde edilen çeşitli ürünler.....	24
Çizelge 2.5: İmmobilize <i>R. oryzae</i> ' den Laktik Asit Üretimi	34
Çizelge 3.1: Derin kültürle laktik asit üretim ortamında kullanılan besin elementleri	42
Çizelge 3.2: KKF ile laktik asit üretim ortamında kullanılan nemlendirme sıvısı içerisinde yer alan besin elementleri.....	43
Çizelge 3.3: Laktik asit standartlarının hazırlanmasında kullanılan konsantrasyonlar.....	51
Çizelge 3.4: Toplam şeker tayin yöntemi standart konsantrasyonları ..	52
Çizelge 3.5: Toplam Şeker Tayin Yöntemi (Tüp İçerikleri).....	53
Çizelge 4.1: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	56
Çizelge 4.2: Farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	58
Çizelge 4.3: Farklı başlangıç melas şekeri konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	62
Çizelge 4.4: Buğday Ruşeym Küspesinin Kompozisyonu	63

ÇİZELGELER DİZİNİ(Devam)

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.5: Farklı başlangıç buğday ruşeymi konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	65
Çizelge 4.6: Statik kültürde farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	67
Çizelge 4.7: Statik kültürde farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	69
Çizelge 4.8: Statik kültürde farklı başlangıç melas şekeri konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	71
Çizelge 4.9: Statik kültürde farklı başlangıç buğday ruşeymi konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	73
Çizelge 4.10: Kullanılan substratların laktik asit verimleri	75
Çizelge 4.11: Farklı aşılama oranlarının laktik asit üretimine etkisi	78
Çizelge 4.12: Farklı yaşlardaki misellerle gerçekleştirilen 5 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	80
Çizelge 4.13: Farklı yaşlardaki sporlarla gerçekleştirilen 5 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	84

ÇİZELGELER DİZİNİ(Devam)

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.14: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilen 5 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	88
Çizelge 4.15: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen 3 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	92
Çizelge 4.16: Farklı CaCl ₂ çözeltisi ile gerçekleştirilen 2 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	95
Çizelge 4.17: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri	97

SİMGELER VE KISALTMALAR**Kısaltmalar**

LAB	Laktik Asit Bakterileri
KKF	Katı Kültür Fermentasyon
DKF	Derin Kültür Fermentasyon
PAS	Peyniraltı Suyu
PDA	Patates Dekstrozu Agar
kons.	Konsantrasyon
PVA	Poli vinil alkol
PLA	Poli Laktik Asit
L A	Laktik Asit

1 GİRİŞ

Laktik asit, ekşi tatta, kokusuz, zayıf bir organik asittir ve eczacılık, kimya, plastik, tekstil ve gıda alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle gıda sanayinde kokusuz olması, hafif ekşilikte olması ve kullanıldığı gıdanın lezzetini değiştirmemesi gibi sebeplerle asitliği düzenleyici ve koruyucu olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. Son yıllarda çevre duyarlılığının artması nedeniyle biyolojik olarak parçalanabilen materyallerin üretimi önem kazanmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilir plastiğin (polilaktikasit) başlangıç maddesini oluşturan laktik asitin düşük maliyetler ile üretimi bu polimerin daha yaygın olarak kullanımına da imkan sağlayacağı belirtilmektedir (Vaidya et al., 2005).

2005 yılı verilerine göre Dünya' da laktik asit tüketimi 120000 ton/yıl olarak gerçekleşmiştir (Datta and Henry, 2006). Biyobozunur plastik ve diğer büyük ölçekte endüstriyel üretimlerde laktik asitin kullanılabilir oluşu nedeni ile laktik asit ihtiyacının ilerleyen yıllarda daha da artması beklenmektedir. Henüz pazar payı olarak fiyatı nedeniyle kısıtlı kalmaktadır ve pazarda polistirenle ısı dayanıklılığı yüksek [L(+)] form için rekabettedir ve yüksek dereceli laktik asit polistirenden daha pahalıdır (Mirasol, 1999). Polilaktatların ve laktat esterlerinin ticari olarak başarıya ulaşmaları durumunda, global kullanım oranının % 14 - 19 arasında yükselmesi beklenmektedir (Chem systems reports, 2002; Jarvis, 2003). 2011 yılı sonu itibarıyla global laktik asit kullanımının dünya çapında 200.000 tonu bulması beklenmektedir(Ramesh,2001).

L(+) ve D(-) olmak üzere optikçe aktif iki tane üç boyutlu izomere sahiptir (Reddy et al., 2008). D-izomerin yüksek miktarları insan sağlığına olumsuz etkimekle beraber L(+) laktik asit, metabolize edilebilmesi nedeniyle gıda ve ilaç endüstrilerince tercih edilen izomerdir (Zhang et al.,2007). Laktik asit; hem kimyasal sentezle hem de mikrobiyal olarak üretilebilmektedir (Reddy et al., 2008). Üretilen laktik asitin yaklaşık % 90' lık kısmı laktik asit bakterileri kullanılarak elde edilmekteyken, kalan kısmı laktonitril hidrolizi ile sentetik olarak üretilmektedir (John et al., 2007). Kimyasal sentezle üretim sonucu rasemik DL-laktik asit elde edilirken, optikçe spesifik [L(+),D(-) ve DL karışımı] formu spesifik mikrobiyal suşlar kullanılarak üretilebilmektedir (Reddy et al., 2008). Laktik asit bakterileri(LAB) homofermentatif ve heterofermentatif olabilirler ve laktik asitin L(+), D(-) ve LD rasemik karışımını üretebilirler. Kimyasal sentezle karşılaştırıldığında biyolojik üretimin önemli bir avantajı, melas, peynir altı suyu, nişastalı atıklar, pancar ve kamış şekeri ve başka karbonhidratça zengin maddelerin üretimde kullanılabilmesidir (Anuradha et al., 1999; Ritche and Berthold, 1998; Tsao et al., 1999; Vishnu et al., 1998, 2000).

1982' den beri laktik asit pazarı, gıda ve içecek sanayisi tarafından oluşturulmaktadır ve bugün de bu durum devam etmektedir. Üretilen laktik asitin %50' den fazlası hazır gıda ürünlerinde emülsifiye edici ajan olarak kullanılmaktadır (Reddy et al., 2008).

Ülkemizde domates konservesi, margarinler, et ürünleri, reçel, jöle ve marmelatlar, şekerlemeler, turşu ve zeytin salamuraları, deniz ürünleri ve bira sanayinde kullanılan laktik asitin tümü ithalatla karşılanmaktadır (Göksungur, 1998).

Diğer tüm mikrobiyal metabolitlerin üretiminde başlıca temel unsur ve mühendislik problemi, mümkün olan en düşük maliyetle en yüksek verimi elde edebilmektir. Bu amaçla laktik asit üretiminde de farklı alternatiflerin denenmesi önem taşımaktadır. Üretim yöntemi açısından bakıldığında son yıllarda ekonomik ve mühendislik açıdan derin kültür fermentasyon yöntemine göre alternatif oluşturabilecek olan katı kültür fermentasyon yöntemi bir çok araştırmacı tarafından ilgi çeken bir seçenektir. Ancak laktik asit üretiminde katı kültür fermentasyon yönteminin kullanılması oldukça yeni bir konudur ve üretim verimlerinin belirlenmesi ve üretim koşullarının optimizasyonu önem taşımaktadır. Bununla beraber derin kültür fermantasyonda gerçekleştirilebilecek bir başka alternatif yöntem de serbest hücreler yerine hücrelerin bir destek materyale tutturulması ile gerçekleştirilen immobilize üretimdir. Burada da elde edilecek verimin serbest hücrelerle kıyaslanabilmesi ve üretim koşulları ve immobilizasyon materyalinin optimizasyonu önemlidir.

Bu projede, *Rhizopus oryzae* NRLL -395 suşu kullanılarak laktik asit üretimi, çalkalı ve statik kültürde, katı kültür fermentasyon koşullarında ve Ca-aljinat ile immobilize edilerek incelenmiş, üretim yöntemlerinin kıyaslaması yapılarak optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Laktik Asit

2.1.1 Fiziksel ve kimyasal özellikler

Laktik asitin (2-hidroksipropiyonik asit, 2-hidroksipropanoik asit) saf ve susuz formu beyaz kristal yapıdadır ve erime noktası düşüktür. Ancak saf haldeki asiti elde etmekteki güçlükler nedeniyle genellikle konsantre sıvı çözeltiler veya şurup halinde bulunur. İyi kalitede çözeltiler renksiz ve kokusuzdur (Holten et al., 1971).

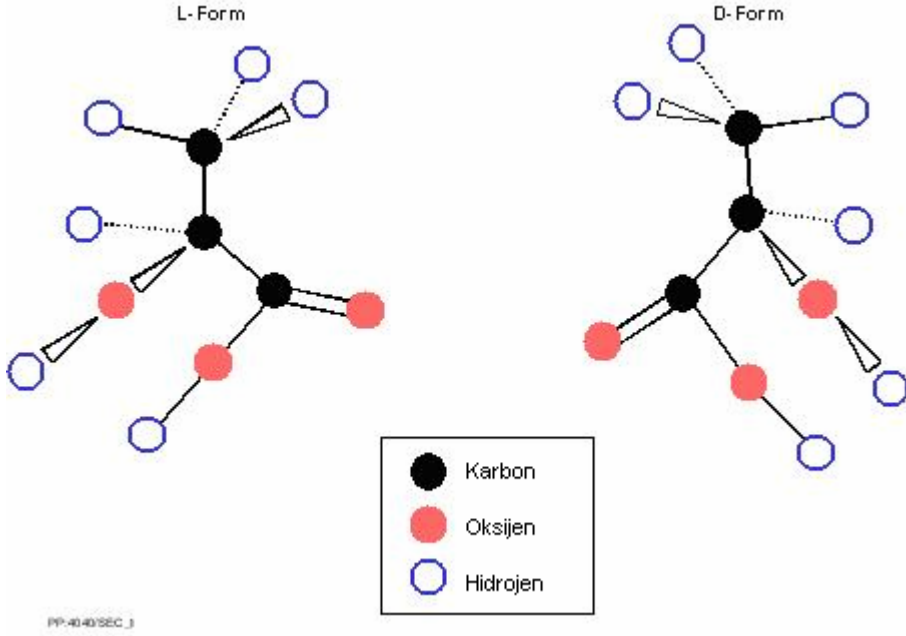
Her oranda su ile karışabilen laktik asit, konsantrasyonu % 20 ve daha fazla olan çözeltilerde içerdiği hidroksil ve karboksil fonksiyonel grupları nedeniyle ısının da etkisiyle esterifikasyona uğrar. Esterifikasyon sonucunda $H[OCH(CH_3)CO]_n OH$ genel formülü ile gösterilebilen siklik dimerler (laktit) veya lineer polimerler (laktoillaktik asit) oluşur (Vick Roy,1985).

Laktik asit molekülünde $-COOH$, $-H$, $-OH$ ve $-CH_3$ olmak üzere 4 değişik grup taşıyan bir karbon atomu vardır. Bu gruplar asimetric karbon atomunun etrafında iki değişik durumda yer alırlar (Şekil 2.1). Eğer üç boyutlu sistemde karboksil grubunun yukarıya doğru olduğu kabul edilirse, hidroksil grubu ya sola (L(+)-laktik asit), ya da sağa dönüktür (D(-)-laktik asit). Birbirinin optik izomeri olan bu yapılardan L(+)-laktik asit polarize ışığı sağa döndürürken, D(-)-laktik asit sola döndürür ve bu iki optik izomer arasında fiziksel ve kimyasal özellikler açısından önemli farklılık yoktur (Hunger, 1984).

Sarkolaktik asit ve paralaktik asit de denilen L(+)-laktik asit, insan ve hayvan vücudundaki dokularda glukoz veya glikojenin metabolik dönüşümü sonucunda üretilir. Bu asit kalp ve iskelet kasları, karaciğer, böbrek ve beyin için önemli bir enerji kaynağıdır. D(-)-laktik asit ise insan vücudunda metabolize edilemez. (Hunger, 1984). İnsanlarda laktik asiti metabolize edebilecek sadece L-laktat dehidrogenaz enzimi olması nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisinde L(+) laktik asit izomeri tercih edilmektedir ve yüksek seviyedeki D(-) laktik asit oranları zararlı olmaktadır (Akerberg et al., 1998; Hofvendahl et al., 2000). Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) günlük D(-)-laktik asit alımının 100 mg/kg vücut ağırlığının üzerine çıkmamasını tavsiye ederken L(+)-laktik asit için ise herhangi bir sınırlama getirmemiştir (Hunger, 1984).

Laktik asit L(+), D(-) veya ikisinin karışımından oluşan ve polarize ışığı sağa veya sola çevirmeyen rasemik halde bulunabilir. Rasemik laktik asit (DL-laktik asit) laktat rasemaz enziminin aktivitesi ile oluşur ve ticari laktik asit çözeltileri genellikle rasemik formdadır (Vick Roy,1985).

Çizelge 2.1 'de laktik asite ait bazı fiziksel özellikler verilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere erime noktası dışında saf izomerlerle rasemik karışım arasında fiziksel özellikler açısından fark yoktur. Ancak rasemik karışımın erime noktası izomerlerinkinden daha düşüktür (Vick Roy,1985).



Şekil 2.1: Laktik Asitin L ve D Form Optik İzomerleri (Chem systems reports., (2002))

Laktik asitin değişik basınçlardaki kaynama noktası değerleri incelendiğinde uçucu olmayan bir asit olduğu (Çizelge 2.2) yoğunluğunun ise konsantrasyon ve sıcaklıkla lineer olarak değiştiği görülmektedir (Çizelge 2.3)(Holten et al.,1971).

Çizelge 2.1: Laktik asitin bazı fiziksel özellikleri (Vick Roy, 1985)

Molekül ağırlığı		90.08 g/mol
Erime noktası	D(-) veya L(+) için	52.8-54 °C
	DL (bileşime göre değişir)	16.8-33 °C
Kaynama noktası, DL		0.5mmHg'da 82°C
		14mmHg'da 122°C
Ayrışma katsayısı, (25 °C'de K_a)		1.37×10^{-4}
Yanma ısısı, (ΔH_c)		1361 kJ mol ⁻¹
Özgül ısı (20°C'de C_p)		190 J mol ⁻¹ °C ⁻¹

Çizelge 2.2: Sıvı laktik asitin değişik basınç değerlerindeki kaynama noktası değerleri (Holten et al., 1971)

Basınç (mm Hg)	Kaynama noktası (°C)
0.1	78
0.3	79-80
0.5	82
1.0	85-98
12	119-123
14	122
15	122
20	125-140

**Çizelge 2.3: Değişik oranlarda laktik asit içeren çözeltilerin yoğunlukları (g/ml)
(Holten et al.,1971)**

% Laktik Asit (w/v)	Sıcaklık(°C)			
	20	40	60	80
20	1.0461	1.0363	1.0246	1.0120
40	1.0959	1.0825	1.0683	1.0542
60	1.1443	1.1284	1.1119	1.0960
80	1.1883	1.1710	1.1527	1.1347
100	1.2246	1.2076	1.1884	1.1680

2.1.2 Üretim Teknolojisi

2.1.2.1 Mikroorganizmalar

Laktik asit, bakteri ve fungus kullanılarak üretilmektedir (Zhang et al., 2007). Bu üreticiler başlıca ve tek metabolik ürünleri laktik asit olan laktik asit bakterileri, gram pozitif, genellikle hareketli olmayan ve spor oluşturmeyen bakteriler ve bazı *Rhizopus oryzae* suşlarıdır. Bütün laktik asit bakterileri anaerobik olarak gelişirler ve çoğu anaerobun aksine oksijene duyarlı olmayıp, oksijen varlığında da gelişmelerini sürdürebilirler. *Rhizopus oryzae* küfü ise aerobik olarak gelişmektedir (Kandler and Weiss, 1986).

Laktik asit üreten bakteriler (LAB), yüksek üreme hızları ve ürün verimleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Buna karşın LAB' ların, kısıtlı B vitamini ve aminoasit sentez edebilirliği nedeniyle karmaşık besinsel gereksinimleri mevcuttur ve maya ekstresi gibi belirli besinleri ortamlarında istemektedirler. Bu ilavelerle meydana gelen karmaşık ortam alt akım maliyetini ve dolayısı ile bakteriyel laktik asit üretiminin toplam maliyetini artırmaktadır (Zhang et al., 2007).

Laktik asit bakterileri iyi tanımlanan Embden-Mayerhof glukoz yol izini kullanarak ana son ürün olarak laktik asit üretebildikleri gibi (homofermentatif), laktik asitin yanında asetik asit, etanol ve CO₂ açığa çıkan pentoz yolizini de kullanabilmektedirler (heterofermentatif) (Vaidya et al., 2005). Heksozlar, Embden - Mayerhof yol izi takip edildiğinde önce piruvata, oluşan piruvat da laktat dehidrojenaz enzimi ile laktik asite dönüştürülür. Homofermentatif bakteriler fruktoz difosfatı trioz fosfata parçalayan aldolaz enzimine sahipken, heterofermentatif bakterilerde bu enzim olmadığı için alternatif bir yol izi takip ederler . Homofermentatif yol izinde 1 molekül glukozdan 2 molekül laktik asit ekle edilirken, heterofermentatif yol izinde 1 mol laktik asit, etil alkol ve CO₂ elde edilir. Ancak diğer yol izlerinden asetik asit, formik asit, gliserol gibi ikincil ürünlerde gelebilir (Brock and Madigan,1991).

Homofermentatif bakteriler glukoz molekülü başına 2 mol ATP üretirken heterofermentatif olanlar 1 mol ATP üretir. ATP verimindeki bu fark, homofermentatif bakterilerin aynı miktarda glukozdan iki kat daha fazla biyokütle oluşturmalarını sağlar (Brock and Madigan,1991).

Laktik asitin endüstriyel üretiminde çoklukla homofermentatif bakteriler kullanılmaktadır, fakat üremeyi kısıtlayıcı karbon kaynağı seviyelerinde bazı suşların homofermentatif davranışları, heterofermentatife dönebilmektedir (De Vries et al., 1970). Mezofilik laktik asit bakterileri için en uygun büyüyebildikleri sıcaklık aralığı 28-45°C iken termofilik laktik asit bakterileri için bu aralık 45-62°C' dir. Kontaminasyon riskini azaltmak için yüksek sıcaklıkta üreyebilen mikroorganizmalar tercih edilmektedir fakat mikrobiyal suşların çoğu pH' a hassastır (Garvie,1980; Teuber,1993). Buchta(1983)' ya göre bakteriyel laktik asit fermentasyonu pH 5.0 ve daha aşağı pH değerlerinde inhibe olmaktadır, 4.5' in altında ise tamamen durmaktadır.

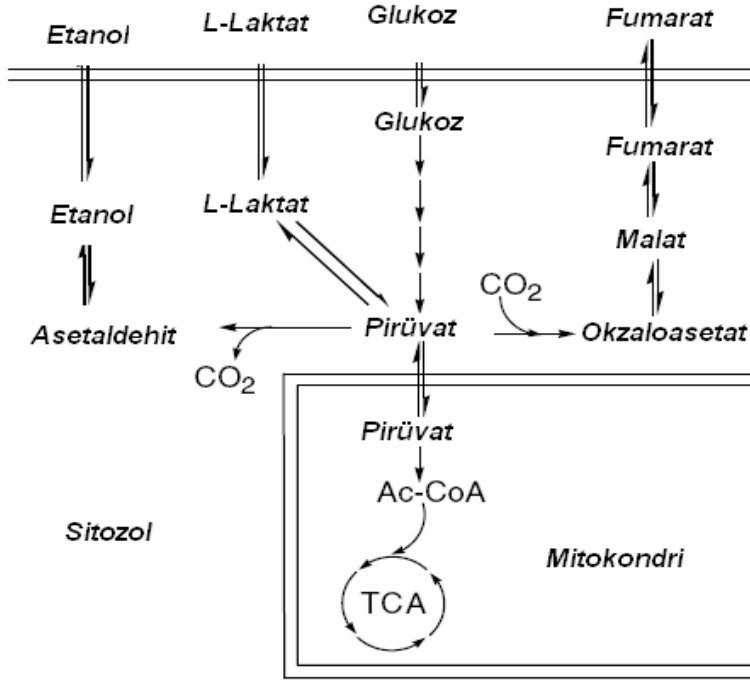
Laktobasiller doğada süt ürünleri, tahıllar, et ve balık ürünleri, su, bira, şarap, meyveler ve meyve sulan, turşular ve daha birçok kaynakta doğal olarak bulunurlar. Gelişebildikleri sıcaklık aralığı oldukça geniştir (2 -53 °C), ancak optimum 30-40 °C arasındadır Diğer laktik asit bakterileri gibi laktobasiller de, asite dayanıklı bakterilerdir ve nötral veya alkali pH değerlerinde üreme hızları azalır. En iyi gelişme gösterdikleri başlangıç pH'sı hafif asidik olan 4.5 - 6.4 aralığıdır (Teuber et al.,1992).

Lactococcus cinsi bakteriler oral ve hemolitik streptokoklardan, enterokoklardan ve streptokoklardan patojen olan türlerinden ayrılarak gruplandırılmışlar ve insan sağlığına hiçbir zararları tespit edilmemiştir. Laktokoklar süt sanayinde birçok değişik üründe starter kültür olarak geniş çapta kullanılırlar. Bu cinsten başlıca mikroorganizmalar arasında *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L.parviae* ve *L. raffmolocis* sayılabilir (Teuber et al.,1992).

Belirli sayıda başka mikroorganizmalar da bilinen karbon kaynaklarından yüksek miktarda laktik asit üretebilmektedirler. Bunlar arasında en bilineni *Rhizopus* genusudur (Vaidya et al.,2005).

Laktik asit bakterilerinin, çeşitli vitaminler, aminoasitler ve bazı küçük peptidler gibi karmaşık besinsel gereksinimleri mevcuttur (Barton-Wright,1952). Bu nedenle laktik asit fermentasyonu için gereken besin ortamı da oldukça karmaşık ve pahalı olmaktadır. Fungal *Rhizopus* türleri bu nedenle ilgi uyandırmaktadır ve laktik asit üretimi için uygun aday olarak tanımlanmaktadır (Zhang et al., 2007). Laktik asit bakterileriyle kıyaslandığında daha düşük karbonhidrat tüketimine karşın *Rhizopus arrhizus* ve *Rhizopus oryzae*, PLA için yüksek saflıkta laktik asit üretimi gerçekleştirebilmeleri nedeniyle daha ilgi çekici hale gelmiştir (Vaidya et al., 2005).

Laktik asit bakterileri, laktat dehidrogenaz ve rasemazlarının varlığına bağlı olarak D(-)-, L(+)- ve DL-laktik asit üretenler şeklinde ayrılırlar (Garvie,1980;Teuber,1993). LAB' ların aksine laktik asit üreten *Rhizopus* suşları, tek laktik asit izomeri olarak L-Laktik asit üretmektedirler (Şekil 2.2) (Zhang et al., 2007).



Şekil 2.2: *R.oryzae*' de Organik asit Sentezinin Kritik Yolizleri (Magnuson and Lasure., 2004)

Yapılan bir çalışmada, Erlenmayerlerdeki *R. oryzae* hücrelerinden laktik asit üretimi üzerine havalandırma, inokulum konsantrasyonu, pH ve CaCO₃ eklemenin etkileri araştırılmış ve düşük havalandırma hızlarında, yüksek spor konsantrasyonunda ve yüksek CaCO₃ oranında en yüksek hacimsel verimliliğe (1.13 g/L.h) ulaşılmıştır (Dominguez and Vazquez ,1999).

Bir başka çalışmada ise serbest ortamda *Rhizopus oryzae* NRRL-395 suşu kullanılarak 30 °C' de optimum mısır koçanı , CaCO₃ , ve Rapidaz Pomaliq enzimi konsantrasyonlarında (0,2 g/ L CaCO₃ ,0,5 ml/ 100 ml Rapidaz Pomaliq ve 5 g/100 ml mısır koçanı) 48. saat sonunda

299,4 g laktik asit / kg mısır koçanı verim elde edilmiştir (Ruengruglikit and Hang 2003).

Değişik karbon kaynaklarının laktik asit üretimine etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise glukoz, sükroz, melas, keçiyoynuzu ve buğday kepeği karbon kaynağı olarak kullanılmış ve en yüksek laktik asit konsantrasyonu, %60 verimle 150g/L glukoz konsantrasyonunda elde edilmiştir (Bulut et al., 2004).

Bir başka çalışmada, glukoz ve mısır nişastasından L-(+)- laktik asit üretimi için dönen fibröz yataklı biyoreaktör (RFB) geliştirilmiştir. Reaktörde pamuklu kumaş parçalarına tutturulmuş fungus miselleriyle gerçekleştirilen immobilizasyon denemesi sonucunda glukozlu ortamda kesikli beslemeli sistemde 2.5 g/L.h verimlilikle %90 verime (ağırlık/ağırlık) ulaşılmıştır. Mısır nişastasında ise verim yaklaşık %100, verimlilik ise 1.65 g/L.h olarak gerçekleşmiştir (Tay and Yang., 2002).

Son yıllarda mikrobiyoloji alanındaki çalışmalar, laktik asit üretimi için ileri düzeyde mikroorganizmaların geliştirilmesine yönelmektedir. Hedeflenen iyileştirmeler, artan büyüme hızları, artan pH dayanıklılığı ve artan laktik asit verimidir. Bu hedefler de, genetik mühendisliği teknikleri, uygun kültürlenme teknikleri ile metabolik aktivitenin kontrolü ve aside dayanıklı mutantların geliştirilmesi ile hızla gerçekleştirilmektedir (Vaidya et al., 2005).

2.1.2.2 Hammaddeler

Karbonhidrat içeren birçok hammadde laktik asit üretimi için endüstriyel olarak kullanılmış veya kullanımı önerilmiştir. Endüstriyel olarak kullanılacak bir hammaddede; düşük maliyet, az miktarda kontaminant madde içermesi, fermentasyon sonucunda yüksek laktik asit verimi ve verimliliği ve az yan ürün oluşumu, bütün yıl boyunca temin edilebilme, mümkün olduğunca az ön işleme ihtiyaç duyma ve ürünün saflaştırılmasında çıkabilecek safsızlıkların az olması gibi bazı özellikler istenir (Vick Roy, 1985).

Laktik asit üretiminde kullanılacak hammaddeler, ucuz olmalarının yanında aynı zamanda belirli bir saflıkta da olmalıdırlar ki bu, ileriki saflaştırma basamağı için çok önemlidir. Hammadde, çoklukla gerçekleştirilecek uygulamaya ve de alt akım işlemlerinin maliyetine göre belirlenmektedir (Vaidya et al., 2005).

Günümüzde ticari laktik asit üretiminde en çok rafine sakkaroz içeren sentetik ortam, hidrolize nişastadan elde edilen maltoz ve dekstroz, laktoz içeren peynir altı suyu, sakkaroz içeren pancar ve kamış melası kullanılmaktadır (VickRoy, 1985, Vaidya et al., 2005).

Peynir altı suyu, peynir üretimi sırasında ortaya çıkan bir atık maddedir. Üretilen peynir tipine bağlı olmakla beraber 100 kg süttten ortalama 80 - 90 kg peynir altı suyu oluşmaktadır. Peynir altı suyu yaklaşık % 93 su, % 4 laktoz, % 0.9 protein, % 0.6 mineral madde, % 0.3 yağ ve % 0.2 laktik asit içerir. Önemli oranda laktoz ve protein içeren peynir altı suyunun atılması yüksek biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) nedeniyle hem çevre kirlenmesine neden olmakta, hem de ekonomik

olmamaktadır (Beyatlı ve Aslım, 1990). Çok geniş değerlendirme olanakları olan peynir altı suyu; etil alkol, amino asitler (lisin, treonin), metan, tek hücre proteini, organik asitler (laktik, propiyonik ve sitrik asit) ve çözügenlerin (aseton ve bütanol) üretiminde kullanılabilir (Mulligan et al., 1991).

Peynir altı suyundan laktik asit üretimi üzerine çok sayıda bilimsel çalışma vardır. Aeschlimann and Stockar (1989), peynir altı suyu ultrafiltratından *L. helveticus* kullanarak 95 g/l maksimum konsantrasyonda laktik asit üretmiştir. Chiarini et al., (1992), peynir altı suyu ultrafiltratından laktik asit üretiminde azot kaynağı olarak maya ekstraktı kullandıklarında yüksek verim değerleri elde etmişler, ancak pancar melası ile de başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Lund et al., (1992), önceden proteaz enzimi ile hidroliz ettikleri peynir altı suyundan laktik asit üretmişlerdir. Mehaia and Cheryan (1987), peynir altı suyu permeatı tozunu sulandırarak, *L. bulgaricus* ile kesikli sistemde ve ürün içerisindeki bakteri hücrelerini sisteme geri veren membran tipi sürekli biyoreaktörle laktik asit üretmişler ve sürekli sistemde daha yüksek verim değerleri bulmuşlardır. Podlech et al., (1990), *L. bulgaricus* kullanarak peynir altı suyundan yarı sürekli sistemde laktik asit üretmişlerdir. Roy et al., (1986), peynir altı suyu ultra filtratından laktik asit üretiminde kullandıkları bakteriler arasında *L. helveticus* ile en başarılı sonuçları elde etmişlerdir.

Nişasta içerikli maddeler, mısır, patates, buğday, cassava ve diğer bitkilerden sağlanmaktadır. Nişasta, *Lactobacillus amylophilus* ve *L. amylovorus* dışında bilinen laktik asit bakterileri tarafından kullanılmamaktadır. Nişasta hidrolizi, kimyasal ve enzimatik yollarla gerçekleştirilebilmekle beraber, kimyasal yöntemde bazen işlem yarıda

kalmaktadır. Enzimatik hidrolizin ana ürünü maltoz olduğu durumda, sınırlı sayıda mikroorganizma fermentasyon için uygun olmaktadır. Günümüzde nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonu (şekere çevrilmesi), bakteriyel α -amilazlar ve fungal glukoamilazların beraber kullanımları ile gerçekleştirilebilmektedir (Vaidya et al., 2005).

Cheng et al., (1991), bakteriyel α -amilaz ile parçaladıkları mısır nişastasından *L. amylovorus* ile laktik asit üretmişlerdir. Bu işlemde nişastanın sakkarifikasyonu laktik asit fermentasyonu sırasında gerçekleştirilmiştir. Bai et al., (2003), *Rhizopus oryzae* R1021 kullanarak 120 g /L mısır nişastasından 60 saat sonra 79.4 g / L laktik asit üretmişlerdir. Zhang and Cheryan (1991), ham ve enzimatik olarak parçalanmış nişastadan *L. amylovarnis* kullanarak 96.2 g/1 konsantrasyona kadar laktik asit üretmişlerdir. Abdel-Naby et al., (1992), enzimatik nişasta hidrolizatından kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Lactococcus lactis* hücreleri ile sürekli ve kesikli fermentasyon sistemlerinde laktik asit üretmişlerdir.

Özellikle Almanya'da ticari olarak laktik asit üretiminde kullanılan patates ile ilgili olarak Ray et al., (1991), iki aşamalı bir proses ile laktik asit üretmişlerdir. İlk aşamada ham patates nişastası *Aspergillus oryzae* α -amilazı ve amiloglukozidazı ile şekerlendirilmiş, sonraki aşamada ise *L. delbrueckii* ile laktik asit üretilmiştir. Deneme sonucunda patates nişastası % 75 oranında glukoza parçalanmış ve elde edilen glukoz üzerinden % 69 laktik asit verimi elde edilmiştir.

Huang et al., (2005), ise *R. arrhizus* 36017 ve *R. oryzae* 2062' nin, değişik nişastalı materyalleri kullanabilmeleri için sakkarifikasyon ve

fermentasyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, nişasta konsantrasyonu 21,7g/L olan patates nişasta atıksuyu ile 20,0 g/L çözümlü nişastadaki laktik asit üretimlerini karşılaştırmışlar ve beklenildiği üzere çözümlü nişasta ile gerçekleştirilen denemede nişasta hidrolizi ve indirgen şeker birikiminde, patates atıksuyuna oranla daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Bunun nedeni olarak mikroorganizmaların, çözümlü nişastaya, patates atık suyundaki çözünmez nişastaya oranla daha kolay ulaşabilmelerinin olduğunu düşünmüşlerdir.

Klasik olarak kullanılanlar dışında mısır koçanı, mısır sapı, buğday kepeği, saman gibi selülozik maddeler, kağıt fabrikası yan ürünü olan sülfite şurubu, hidrolize odun, yer elması, soya melası, keçiyoynuzu gibi bazı hammaddelerle de laktik asit üretimi için çalışmalar yapılmıştır. Ruengruglikit and Hang, (2003), mısır koçanından laktik asit üretiminde optimum koşulları araştırmışlardır. 5 g/ 100 ml mısır koçanında 299,4 g / kg mısır koçanı optimum koşul olarak belirlemişlerdir. D.-M. Bai et al., (2003), *Rhizopus oryzae* için uygun suş seçiminde ; *Rhizopus oryzae* R1021 kullanarak 34 saat sonunda 88 g/ L glukozun tamamını tüketmiş ve 69.3 g / L laktik asit üretmiştir. Bulut et al., (2004), keçiyoynuzu ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, öncelikle %10 keçiyoynuzu içeren ortamda 23g/L laktik asit elde etmişlerdir (%23 verim). Daha sonra kolay metabolize olabilen şekerlerin ortama eklenmesinin laktik asit üretimini artıracakları düşünülerek %10 keçiyoynuzuna %5 glukoz eklenerek üretim gerçekleştirilmiştir. Bu koşulda da önemli bir laktik asit artışı gözlenmemiştir. Bu da göstermektedir ki her ne kadar keçiyoynuzu % 40-50 şeker içerse de hücreler şekeri bu formda kullanamamaktadırlar. Bu nedenle keçiyoynuzundaki şekerler ekstrakte edilerek üretim ortamı hazırlanmış ve bu durumda maksimum laktik asit konsantrasyonu 58 g/L

ile elde edilmiştir. Park et al. (2004) , kağıt atıklarından % 59 verimle (tüketilen glukoza göre) 49.1 g /L laktik asit üretmişlerdir.

Buğday kepeği gibi tarımsal atıkların laktik asit üretiminde kullanılabilirliği ile ilgili gerçekleştirilen bir denemede, Bulut et al., (2004), %5 (w/v) buğday kepeğini, musluk suyuyla karıştırarak üretim gerçekleştirmişlerdir. Deneme sonunda 6g/L laktik asit elde edilmiştir. Aynı bileşenleri içeren ortama 50g/L glukoz ilavesi laktik asit üretimini 4 kat artırmıştır. Bu da buğday kepeğinin, laktik asit üretimi için birincil karbon kaynağı olarak uygun olmadığını göstermektedir.

Selülozik maddelerin kullanılması ile bir yan ürün olarak asetik asit ortaya çıkmakta ve laktik asitin saflaştırılması aşamasında da problemlerle karşılaşmaktadır. Sülfite şurubu ise hızlı bir mikrobiyal gelişme için bazı ön işlemlere gerek duymaktadır (Vick Roy, 1985). Montelongo et al., (1993), soya proteini üretiminde oluşan bir yan ürün olan soya melasından *L. salivaris* ile laktik asit üretmişler ve optimum koşulları 42 °C, pH=5.6 olarak bulmuşlardır.

Melas ta ucuz ve kolay bulunmasıyla laktik asit üretiminde tercih edilen bir karbon kaynağıdır. Melasta bulunan başlıca şeker sakkarozdur. İndirgen şeker olarak ise kamış melasında % 12 - 35 arasında glukoz ve fruktoz vardır, pancar melasında indirgen şeker miktarı % 1' den daha azdır (Schiweck, 1979).

Melasta bulunan şeker dışındaki organik maddelerin başlıca olan; azotlu maddeler, organik asitler, çözünen gıamlar, nişasta ve pentozanlar gibi kompleks karbonhidratlardır. Ayrıca mumsu maddeler, steroller ve pigmentler de az miktarda bulunur. Melasta bulunan azotlu maddeler

amino asitler, arnidler ve diğler basit azotlu maddelerdir. Melasta bulunan azotun ancak % 40-60 kadarı mikroorganizmalar tarafından kullanılır, bu nedenle endüstriyel uygulamalarda amonyum tuzları, sıvı amonyak veya üre ortama katılarak azot zenginleştirmesi yapılır (Baker, 1979).

Melasta % 4-11 arasında inorganik bileşikler vardır. Bunlardan başlıcaları potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum, demir, sülfat, klorür ve fosfatlardır. Pancar melasında genellikle potasyum oranı daha yüksektir.

Melasın endüstriyel fermentasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır ancak kompleks bir substrat olduğu için bazı toksik maddeler de içerir. Kükürt dioksit, hidrosimetil furfurol, potasyum imidodisulfonat, fenoller ve diğler bazı uçucu bileşikler bu tip maddelerdendir. Bu maddeler dışında bazı mineral maddelerin yüksek konsantrasyonları da inhibitör etki yapmaktadır (Burrows,1970).

Bulut et al., (2004), melaslı besi ortamını, normal melas ve pastörize melaslı olmak üzere iki farklı şekilde hazırlanmışlardır. Pastörize melaslı ortamda laktik asit üretim hızı, işlenmemiş melasa oranla biraz daha fazla olsa da toplam laktik asit üretimi önemli bir farklılık göstermemiştir (~40 g/L). Bunun nedeni olarak pastörize melastaki şekerin *R. oryzae* hücreleri tarafından daha kolay metabolize edilebilmesi gösterilmiştir. Sonuçta her iki durumda da laktik asit üretim miktarı glukoz ve sükrozdan daha düşük gerçekleşmiştir. Melaslı ortama maya ekstresi ilavesi ile (10g/L) daha yüksek laktik asit seviyelerine ulaşılmıştır(~50g/L).

2.2 Katı Kültür Fermentasyonu

2.2.1 KKF' nin tanımı ve tarihçesi

Fermentasyon işlemleri genel olarak derin kültür ve katı kültür olmak üzere ikiye ayrılabilir. Bu iki biyo-işlem arasındaki temel farklılık substrattaki serbest su miktarıdır. Derin kültürde gerçekleştirilen fermentasyon işlemlerinde katı madde miktarı 50 g/l substratın üzerine çıkmamaktadır ve aynı zamanda katı substrattaki nem oranı %12'nin altına düşmemektedir (Robinson et al., 2001). Katı kültür fermentasyonu, serbest halde su olmayan ortamda, fiziksel destek ve besin kaynağı olarak iş gören bir çözünmeyen katı materyal üzerinde gerçekleştirilen fermentasyon olarak tanımlanmaktadır (Pandey, 1992). Her ne kadar katı partiküller arası ve katı partikül yüzeyinde serbest su zerrecikleri bulunuyor olsa da bu bölgelerde daha çok gaz faz bulunmaktadır ve sistemdeki suyun büyük çoğunluğu nemli katı partiküllerin içine absorbe durumdadır (Mitchell et al., 2006). Katı kültür fermentasyonunda (KKF) mikroorganizma, gelişimi için gerekli suyu substratın içinde bulunan bu nemden karşılamaktadır (Cannel and Young, 1980; Mitchell et al., 2000; Gessesse and Mamo, 1999).

Katı kültür fermentasyonu doğada, serbest halde su neredeyse bulunmayan çöp kompostları, ekmekler ve meyvelerde gerçekleşmektedir. Bu nedenle katı kültür fermentasyonu sayesinde organik maddeler doğada kendiliğinden geri dönüşüme uğramaktadırlar (Campbell-Platt., 1994). Bilinen klasik gıda fermentasyonları ve enzim üretimi KKF ile ortaya çıkmıştır (Pandey et al., 2001). Eski zamanlardan beri katı kültür fermentasyonu, insanlar tarafından yerel fermente gıda eldesinde

kullanılmaktadır. Örnek olarak Avrupa ve Ortadoğu’ da peynir, Asya’ da soya sosu, koji, tempeh ve içkiler ve de Afrika’ da fermente sorgum verilebilir (Campbell-Platt., 1994, Pandey et al., 2001). Bunlardan Japonların “koji” olarak adlandırdıkları yiyecek üretimi MÖ 1000 yıllarından bu yana yapılmaktadır. Bu işlem, buhar ile muamele edilmiş pirincin substrat olarak kullanımını ve *Aspergillus oryzae* ile fermente edilmesini içermektedir (Pandey et al., 2001). Endonezya kökenli bir başka örnek ise yumrulu sebzelerden “tempeh” üretimidir. Bu işlem patojen olmayan *Rhizopus* spp. fermentasyonu ile gerçekleştirilir (Pandey et al., 2001, Mital and Garg 1990, Steinkraus 1994). Bu gibi işlemlerde elde edilen geleneksel yiyecek maddelerinde her zaman substratın tamamıyla zenginleştirilmesi söz konusu değildir. Hatta soya fasulyesi gibi yüksek protein içeriği olan sebzelerde besin değerinin kaybedilmesi bile mümkündür. Ancak bu maddelerin spesifik olarak dolaylı yollardan zenginleştirilmesi, sindirilebilirliğin artırılması, toksinlerin uzaklaştırılması yolu ile toksik etkinin ortadan kaldırılması, organik azot içeriğinin değişimi ve tad, koku, doku gibi karakteristiklerin geliştirilmesi yolları ile mümkün olmaktadır (Mitchell and Berovic., 1998). Katı kültür fermentasyonunda kullanılan mikroorganizmalar, polimerik maddeleri küçük ve daha kolay sindirilebilir parçalara ayıracak enzimleri salgılamaktadırlar. Aynı mikroorganizmalar, parçalanmış maddeleri de enzimlere ve diğer başka faydalı ürünlere dönüştürebilmektedirler (Mital and Garg., 1990, Steinkraus., 1994). Soya sosu fermentasyonunda kullanılan *Aspergillus sp.*, soya ve buğdayın protein ve nişastasını, aminoasit ve şekerlere hidrolizleyen hücre dışı enzimleri üretmektedir (Yong and Wood, 1977). Bu aminoasit ve şekerler, soya sosuna özgü tadı veren ikinci bir fermentasyon prosesinde laktik asit bakteri ve mayaları için substrat görevi görmektedir (Rahardjo., 2005).

KKF'da nem oranının düşük olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grubu funguslardır. Termofilik bakteri ve mayalar daha seyrek olarak kullanılmaktadırlar (Mitchell et al., 2006, Subramaniyan and Prema, 2000, Archana and Satyanarayana, 1997). Katı materyaldeki serbest su miktarı ve mikrobiyal gelişimle ilgili olan en önemli parametre su aktivitesidir (a_w). Su aktivitesi, substratın buhar basıncının aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncına oranı olarak tanımlanmaktadır. Kapalı bir sistem için su aktivitesi nispi nemin 100'e bölümüyle elde edilebilir. Birçok bakteri $a_w=0.91$ 'in altında üreyemez. Bu değer mayalar için $a_w=0.88$ funguslar için ise $a_w=0.62-0.65$ 'tir (Raimbault, 1998). Fungusların doğada ağaç kabukları, yapraklar, bitki kökleri gibi yerlerde üreyebildikleri göz önüne alındığında KKF için uygun bir mikroorganizma grubu oldukları açıktır (Cannel and Young, 1980).

Katı kültür fermentasyonu, klasik fermente gıda üretiminin yanında kompostlama proseslerinde, zirai ve gıda işletmelerinin katı atıklarının proteince zenginleştirilerek ve/veya toksik madde içeriği uzaklaştırılarak hayvan yemi olarak değerlendirilmesinde, biyoremediasyon işlemlerinde, beta glukanaazlar, ksilanaz gibi enzimlerin eldesinde, kağıt yapımında pulp fiberlerinin ayrıştırılması(biyopulplama) işleminde ve giberellik asit, aroma ve lezzet artırıcı maddeler, antibiyotikler ve etanol üretimi gibi alanlarda uygulanmaktadır (Çizelge 2.4) (Flickinger and Drew, 1999)

Çizelge 2.4: KKF ile elde edilen çeşitli ürünler (Mitchell and Berovic, 1998)

Ürün/işlem	Mikroorganizma	Substrat
Proteinçe zenginleştirme	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Coprinus spp.</i> <i>Aspergillus tamari</i> <i>Sporotrichum pulverulentum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>	nişastalı materyaller muz atıkları turunçgil kabukları saman şeker pancarı küspesi saman şeker pancarı küspesi cassava şeker pancarı küspesi saman+buğday kepeği şeker kamışı yan ürünleri çeşitli fasulyeler
Kafein uzaklaştırma Pektin uzaklaştırma Fitik asidin uzaklaştırılması Tat karakteristiğinin geliştirilmesi Siyanidin uzaklaştırılması	doğal microflora <i>Fusarium spp.</i> <i>Aspergillus ficuum</i> <i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Rhizopus sp.</i>	kahve bitkisi pulpu çavdar samanı kanola nohut cassava kabuğu
Proteazlar	<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	pirinç kepeği buğday kepeği buğday kepeği
Amilazlar α -amilaz glukoamilaz	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i>	buğday kepeği buğday kepeği buğday k. + pirinç k. buğday k. + mısır unu
Selülazlar	<i>Neuspora crassa</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>T.reesei+A.niger(karışık)</i> <i>Penicillium citrinum</i>	talaş şeker pancarı küspesi şeker pk+buğday kepeği saman+kepek+talaş pirinç kepeği tatlı sorghum silajı pirinç kavuzu
Lipazlar	<i>Penicillium spp.</i>	buğday kepeği

Diğer enzimler Rennet Endo-β glukonazlar Hemiselülazlar Pektinazlar Kitinaz Tanin açıl hidrolaz Oligosakkarit oksidaz	<i>Mucor meihei</i> <i>Penicillium capsulatum</i> <i>Thermonospora</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Taralomyces flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Acremonium sp.</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Lentinula edodes</i>	buğday kepeği buğday kepeği kahve işleme atıkları elma pektini kahve pulpu turunçgil pulpu şeker pancarı küspesi buğday kepeği buğday kepeği odun
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schwanniomycescastelli</i>	üzüm küspesi mısır kırıntıları şeker pancarı küspesi sorghum pancar küspesi
Fitaz, fitik asit	<i>Aspergillus carbonarius</i>	kanola
Sitrik asit Laktik asit	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Rhizophus oryzae</i>	kahve bitkisi kabukları, buğday kepeği, pancar pulpu, pancar melası preslenmiş şeker kamuşu şeker pancarı küspesi
Aminoasitler	<i>Rhizophus oligosporus</i>	tohum kabukları
Kojik asit	<i>Aspergillus oryzae</i>	buharla haşlanmış pirinç
Giberallik asit	<i>Fusarium monoliforme</i> <i>Giberella fujukiroi</i> <i>Fusarium monoliforme</i>	buğday kepeği buğday kepeği mısır unu+buğday kepeği
Antibiyotikler Penisilin Oksitetrasiklin Tetrasiklin iturin	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Streptomyces rimosus</i> <i>Streptomyces</i> <i>iridifaciensis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	şeker pancarı küspesi tatlı patates artığı tatlı patates artığı buğday kepeği
Pigmentler	<i>Monascus purpureus</i>	pirinç
AflatoksinB1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	pirinç
Oktratoksin	<i>Aspergillus alliaceus</i>	mısır ve buğday
Aroma maddeleri	<i>Penicillium roqueforti</i>	granüler lor

Biyolojik kontrol ajanları Mikoherbisit Bioinsektisit	<i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Beauveria bassiana</i>	nemlendirilerek tavlanmış tarımsal atıklar
Biyokütle	<i>Aspergillus tamarii</i> <i>Pleurotus spp.</i>	tahta parçaları, talaş
Delignifikasyon mantarları	<i>Phlebia tremellosa</i> <i>Pleurotus florida</i> <i>Pleurotus cornucopiae</i>	ağaç kütüğü pirinç kepeği kaktüs yaprakları

2.2.2 Katı Kültür Fermentasyonunda Üretim Koşulları

2.2.2.1 Substratlar

KKF' de kullanılan substratlar tarımsal kökenlidir. Genel olarak kullanılan substratları içeriklerine göre 3 gruba ayırmak mümkündür:

- Nişasta içeren substratlar (pirinç, cassava, buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır, patates artıkları, muz artıkları)
- Lignoselülozik substratlar (saman, ağaç parçaları talaş v.b)
- Çözünür şekerleri yapısında bulunduran substratlar (şeker pancarı, üzüm küspesi, meyve artıkları) (Durand et al., 1993).

Birçok durumda substratın ön işlemden geçirilmesi gerekli olabilir. Uygulanan ön işlemler mekanik ya da kimyasal işlemlerdir. Bu işlemlerin amacı daha küçük moleküller elde ederek mikrobiyal penetrasyonun artırılmasıdır. Buhar uygulama, kırma, taneleme, su ile tavlama, küçük parçalara ayırma, elekten geçirme, öğütme, alkali ya da NaCl ile muamele etme bu işlemler arasında sayılabilir (Mitchell and Berovic, 1998).

KKF' de en önemli fiziksel özellik partikül boyutudur. Partikül büyüklüğü yüzey alanının hacme oranını belirleyen bir niceliktir. Partikül boyutu aynı zamanda partiküller arasındaki boşluk hacmini de etkileyen bir faktördür. Küçük boşluklar fungal miseller tarafından kolaylıkla doldurulmaktadır ve difüzyonu büyük oranda kısıtlayarak havalandırılmalı sistemlerde yüksek basınç düşmelerine neden olmaktadır (Raimbault, 1998). Değişik boyutta partiküller söz konusu ise küçük partiküller, büyük partiküllerin arasındaki boşlukları doldurarak toplam boşluk hacmini düşürmektedirler (Pandey, 1991).

2.2.2.2 Nem

Mikrobiyal üremeyi etkileyen başlıca faktör a_w 'dir. Ancak ortamdaki mevcut su miktarının ölçümü daha kolaydır. Su miktarı, bir materyalin ağırlığının su tarafından oluşturulan yüzdesidir. Su aktivitesi ise materyalin buhar basıncının aynı sıcaklıktaki suyun basıncına oranıdır ve mikroorganizma için elverişli olan su miktarını ifade eder. Farklı substratlar değişik su tutma kapasitesine sahip olduklarından serbest suyun görünür hale geldiği düzeyler değişmektedir. Bu nedenle KKF işlemlerinde su miktarları kullanılan substrata göre %30 ile %80 arasında değişmektedir. Bunun yanında su miktarı ile a_w arasındaki ilişki de geniş bir aralıkta lineer olarak değişmemektedir. Su miktarındaki büyük artışlar a_w de küçük değişimlere sebep olabilir (Pandey et al., 2001).

Nemin mikroorganizma fizyolojisi üzerine olan direkt etkisinin yanısıra substrat karakteristiklerini değiştiren etkileri de vardır. Yüksek nem oranı partiküller arasında gazların yer değiştirmesine ve substrat partiküllerinin kümeleşmelerine neden olmaktadır. Her iki durum da gaz difüzyon kısıtlamalarının oluşumunu hızlandırır. Ayrıca yüksek nem

oranı, substrattaki çözünebilir besin öğelerinin substrat dışına çıkmasına yol açmaktadır (Cannel and Young, 1980).

2.2.2.3 pH

Mikrobiyal gelişim substratın pH değerinde önemli değişikliklere neden olmaktadır. Substratın tamamıyla okside edilememesi ya da amonyum iyonlarının bünyeye alınması sonucunda pH düşerken ürenin ya da diğer aminlerin deaminasyonu sonucu amonyum iyonlarının açığa çıkması ile pH yükselir. pH değişimlerinin şiddeti, mikroorganizmanın metabolik aktivitesi ve substratın tamponlama kapasitesi ile bağlantılıdır. Üretim sırasında pH değeri mikroorganizmanın gelişimini engelleyecek düzeye gelebilir. Ancak KKF' da pH kontrolü oldukça zordur. Bu nedenle geniş bir pH aralığında üreyebilen mikroorganizmaların seçilmesi daha uygun bir durumdur (Mitchell and Berovic, 1998).

2.2.2.4 Sıcaklık

Metabolik aktivite sonucunda oluşan sıcaklık artışı fermentasyon işlemlerinde önemli sorunlar yaratmaktadır. KKF' de sıcaklık kontrolü derin kültür fermentasyonuna göre daha zordur. Homojen olmayan substrat özellikleri nedeniyle sıcaklık gradyanları oluşmaktadır. Bu durum sistemde ısı transferini güçleştirerek bölgesel sıcaklık artışlarına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda mikrobiyal gelişim yavaşlamakta ya da bazı durumlarda mikrobiyal hücreler ölmektedirler. Bu nedenle oluşan ısının sistemden uzaklaştırılması gereklidir. KKF sistemleri tasarımında göz önüne alınması gereken en önemli kriterlerden biri de ısının uzaklaştırılmasıdır (Mitchell et al., 2000).

KKF' de kullanılan birçok mikroorganizma mezofiliktir. Optimum üreme sıcaklığı 20°C ile 40°C arasında değişmektedir. Maksimum üreme sıcaklığı ise 50°C'nin altındadır (Pandey et al., 2001).

2.2.2.5 Havalandırma ve Karıştırma

KKF işlemlerinin büyük çoğunluğu aerobik koşullarda gerçekleştirilmektedir. Gaz fazı katı partiküller ile temas halindedir ve katı partikül üzerindeki sıvı tabakasına oksijen transferi için oldukça geniş bir yüzey alanı mevcuttur. KKF' de temel hedef, partiküller arasında yüksek oksijen bulunmasını sağlarken karbondioksit miktarının düşük seviyede tutulmasıdır (Desgranges and Durand, 1990). Partiküller arası boşluktan oksijen alımı 4 ana basamakta gerçekleşir:

- Oksijenin partiküller arasındaki yoğun fazdan partikül yüzeyindeki durgun gaz film tabakasına transferi,
- Oksijenin durgun gaz tabakasından substrat yüzeyindeki sıvı tabakasına transferi,
- Misellerin konumuna bağlı olarak mikroorganizmanın oksijeni substrat yüzeyindeki durgun gaz tabakasından ya da sıvı tabakasından bünyesine alması,
- Oksijenin substrattaki sıvı tabakasından partikülün iç kısmına geçişi (Mitchell and Berovic, 1998).

Havalandırmada göz önünde bulundurulması gereken önemli bir nokta da biyoreaktöre giren havanın kalitesi ve nemidir. Doygun hava kullanımı substratın kurumasını ve su aktivitesinin düşmesini önlemede yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu uygulama her zaman

tavsiye edilmemektedir. Havalandırmanın bir fonksiyonu da fermentasyon sırasında oluşan ısıyı uzaklaştırmaktır (Murthy et al., 1993). Suyun buharlaşması ve çevre ile yapılan ısı transferi işlemleri fermentasyon sıcaklığını istenilen düzeyde tutmayı sağlayan işlemlerdir. Dolayısıyla nemin korunması ve aynı zamanda ısının uzaklaştırılması gibi çelişkili iki durum söz konusudur (Mitchell et al., 1999).

KKF' de heterojen yapıyı düzenlemek üzere yapılabilecek işlemlerden birisi de karıştırma işlemidir. Karıştırma, oluşan gradyanları ortadan kaldırarak homojen bir yapı meydana getirmeyi sağlar. Ancak özellikle fungal kültürlerin kullanıldığı sistemlere karıştırma uygulandığında misellerin zarar gördüğü belirtilmektedir (Purkarthofer et al., 1993). Bunu aşmak için kesikli bir karıştırma işlemi uygulandığında genellikle olumlu sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Kalegoris et al., 2003). Bakterilerin kullanıldığı üretimlerde ise eğer hücreler substrat üzerinde çok sıkı bir yapı oluşturmuşlarsa sürekli bir karıştırma işleminin biyokütle verimini arttırdığı belirtilmektedir (Pandey et al., 2001).

2.2.2.6 Mikroorganizmalar

Funguslar dışında nadiren de olsa maya ve bakterilerin kullanıldığı katı kültür ya da yarı katı kültür fermentasyonları yolu ile üretimler yapılmaktadır.

Mayalar genel olarak katı substratlar üzerinde üreyebilen mikroorganizmalar içinde ikincil öneme sahip mikroorganizma grubudur. Anaerobik koşullarda tarımsal ürünlerin % 60- 75 nem oranında fermente

edildiği silaj işleminin erken aşamalarında mayaların etkisi söz konusudur. Mayalar içerisinde *Saccharomyces cerevisiae* elma küspesinde, şeker pancarı ve üzüm küspesi kullanılarak etil alkol üretiminde yarı katı kültürde kullanılmıştır. Ayrıca çeşitli nişastalı substratların proteince zenginleştirilmelerinde mayalar kullanılmışlardır (Mitchell and Berovic, 1998).

Bakteriler de KKF' de birincil ya da ikincil mikroorganizmalar olarak önem taşımaktadırlar. Silaj işleminde laktobasiller önemli rol oynamaktadırlar. *Bacillus subtilis* Japonların "Natto" adını verdikleri fermente yiyecekte soya fasulyesi üzerinde yapışkan bir tabaka oluşturan organizmadır (Raimbault, 1998). Bunun yanı sıra özellikle *Bacillus* sp. bakterilerin enzim üretiminde kullanıldığı KKF çalışmaları da bulunmaktadır (Babu and Satyanarayana, 1995; Archana and Satyanarayana, 1997). Bakterilerin KKF' deki bir başka önemi de gerek geleneksel fermente gıda maddelerinin üretiminde gerekse diğer KKF' de kontaminasyona neden olmalarıdır.

2.2.3 KKF' nin DKF ile karşılaştırılması

KKF yönteminin kullanımının derin kültür üretim tekniğinin kullanıldığı sistemlere göre çeşitli avantajları vardır. Sistemin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

1. Basit ve ucuz substratların kullanımı,
2. Az miktarda su kullanımı ve substratın konsantre olması,
3. Direkt olarak spor aşılması yapılması sebebiyle ön aşı hazırlama tankına ihtiyaç duyulmaması,

4. Düşük nemli substrat üzerinde bakteriyel kontaminasyon riskinin az olması,
5. Substrat partikülleri arasında boşlukları bulunması nedeniyle havalandırmaya olanak tanınması,
6. Ekstrakte edilecek olan ürün için az miktarda ekstraksiyon sıvısı kullanılması. Elde edilen ürünün derişik olması nedeni ile ayırma/safılaştırma işlemlerinin maliyetinin düşük olması,
7. Verimin derin kültür sistemlerindekiine eşit ya da daha yüksek olması,
8. Sıvı atık miktarının ya çok düşük olması ya da hiç olmaması,
9. Üretim sonrası geriye kalan katı kısmın da hayvan yemi olarak değerlendirilebilmesi (Haltrich et al., 1996; Raimbault, 1998; Mitchell and Berovic, 1998; Pandey et al., 2001),
10. Katı kültür fermentasyon tesisi, aynı kapasitede bir derin fermentasyon tesisine oranla önemli ekonomik avantajlar içermektedir. Üretilen enzim tipine göre:
 - Toplam yatırım %50-80 daha azdır
 - Enerji harcaması %30-60 daha azdır
 - Ana hammadde % 50-70 daha ucuzdur (Pandey et al., 2001).

2.3 İmmobilizasyon

Hücre immobilizasyonunun, bilinen süspanse hücre fermentasyonları karşısında, yüksek hücre yoğunluğu, artan hücre verimliliği ve reaksiyon sisteminden daha iyi ayrılabilmesi gibi avantajları, yarı sürekli ve sürekli immobilizasyon uygulamalarının değişik reaktör tiplerinde gerçekleştirilebilmesine olanak sağlamaktadır (Zhang et al., 2007).

Birçok mikroorganizma için immobilizasyon doğal bir durumdur çünkü birçok fungus bir yüzeye tutunarak üremektedirler. Endüstriyel uygulamalarda immobilize mikrobiyal hücre sistemleri serbest hücrelerle karşılaştırıldığında; biyomasın tekrarlı kullanımı, basit bir katı-sıvı ayrımı ile altakımın kolaylaştırılması ve sürekli akış sistemlerinde minimum tıkanma sorunları yaratması gibi birtakım önemli avantajlara sahiptir (Rodríguez Cauto et al., 2004).

Fungal hücreler polimer destek üzerine adsorbsiyon veya aljinat jel gibi doğal polimerler ya da sentetik polimerler içine tutuklama gibi yöntemlerle immobilize edilebilirler (Zhang et al., 2007, Rodríguez Cauto et al., 2004). Bunlardan birincisinde mikroorganizmalar yüzeye ya da diğer mikroorganizmalara adezyon ya da kimyasal bağlanma yöntemleri ile bağlanırlar. Tutuklama yönteminde ise organizmalar, fibröz ya da delikli materyaller içine hapsedilirler ya da stabil bir jel ya da membran gibi katı ya da delikli bir matriks içinde fiziksel olarak alıkonulurlar (Rodríguez Cauto et al. 2004). Aljinat, kitosan, kitin ve selüloz türevleri gibi doğal polimerler, tutuklama tekniğinde immobilizasyon matriksi olarak çoklukla kullanılmaktadırlar (Arica et al. 2001), bununla beraber poliüretan köpükler, naylon süngerler gibi sentetik köpükler ve bulaşık teli gibi delikli maddelerin yanında (Rodríguez Cauto et al., 2004), kabak lifi gibi organik delikli materyaller adsorbsiyon yönteminde kullanılmaktadırlar (Ganguly et al., 2007, Bulut et al., 2004).

Laktik asit üretimi için *R. oryzae*' nin immobilizasyonu birtakım taşıyıcılar ve prosesler için denenmiştir ve sonuçlar Çizelge 2.5' tedir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, hem çalkalamalı Erlenmayer sisteminde hem de konik kolonlu akışkan yatak kesikli reaktör

sistemindeki kalsiyum aljinat kürecikler ve ayrıca poliüretan küpler laktik asit üretimini artırıcı en etkin fungal hücre immobilizasyon metodu olarak bulunmuştur (Zhang et al. 2007).

Çizelge 2.5: İmmobilize *R. oryzae*' den Laktik Asit Üretimi (Zhang et al., 2007)

Destek Materyal	Proses	Substrat	Verim (%)	Verimlilik (g/L.h)	Konsantrasyon (g/L)
Kalsiyum Aljinat	Tekrarlı kesikli	Glukoz	72	2.5	62
	Kesikli	Glukoz	65	1.6	73
	Sürekli	Glukoz	71	-	71.5
Dönen Disk	Kesikli ve Sürekli	Glukoz	70	-	-
Poliüretan Köpük	Tekrarlı kesikli	Glukoz	78	4.6	40
	Sürekli	Glukoz	-	6.2	-
	Kesikli	Glukoz	65	-	-
Pamuk kumaş	Tekrarlı kesikli ve kesikli beslemeli	Nişasta	100	1.65	127
		Glukoz	90	2.5	226
PVA-kriyojel	Kesikli	Glukoz	94	5.0	112
	Yarı Kesikli	Glukoz	78	2.8	173

Sun et al., (1999) , hava kaldırmalı reaktörde immobilize *R. oryzae* ile sürekli sistemde L-laktik asit üretimi için çift tabakalı reaksiyon difüzyon modeli geliştirmiştir. Bir yalancı yatışkın durumdaki proseste, laktik asit verimliliği, artan seyrelme hızı ve besleme glukoz konsantrasyonu ile artmaktadır

Lin et al., (1998) dönen diskler üzerine *R. oryzae* hücrelerini immobilize ederek L-Laktik asit üretiminde kullandıkları bir dönen disk kontaktörü tasarlamışlardır. Glukozun L-laktik asite dönüşüm oranı 0.7 g/g civarındır ve fermentasyon hızı 62.5 g glukoz/Saat * m² disk yüzey alanı olmuştur. Bundan başka polimer destek olarak gamma ışın yardımıyla

polimerizasyon kullanılmıştır fakat diğer taşıyıcılarla gerçekleştirilen çalışmalardan daha düşük verim elde edilmiştir(Yuru et al., 2000).

Lin et al.,(2007), bir başka çalışmalarında ekstraksiyon ünitesi eklenmiş üç fazlı akışkan yataklı biyoreaktör sistemi tasarlamışlardır. Sistemde Ca-aljinat boncuklara tutturulmuş *R.oryzae* hücreleriyle sürekli sistemde L-laktik asit üretimi denemişler ve sonuç olarak 11 g L-laktik asit/saat. L konsantrasyona ulaşmışlardır.

Tay and Yang (2002), *R. oryzae* için fibröz yatakta pamuklu bez taşıyıcı geliştirmişlerdir ve tekrarlı kesikli ve kesikli beslemeli üretim koşullarında laktik asit verimi glukozlu çalışma için % 90' a ürün konsantrasyonu ise 127g/L' ye, nişasta ile gerçekleştirilen çalışma içinse verim %100' e, ürün konsantrasyonu 126g/L' ye ulaşmıştır.

Hang et al., (1989), kalsiyum aljinat boncuklar üzerinde *R. oryzae* immobilizasyonunu denemişler ve sonuçta glukozlu ortamda tekrarlı kesikli üretim sisteminde 0.72 g/g verim 2.5 g/L.saat hacimsel verimlilikle 62 g/L laktik asit konsantrasyonuna ulaşmışlardır. Benzer bir başka çalışmada Hamamcı ve ark.(1994) yine kalsiyum aljinata bağlı *R.oryzae* hücreleriyle glukozlu ortamda kesikli üretim metodunda 0.65 g/g verim ve 1.6 g/L.saat verimliliğe ulaşmışlardır.

Kalsiyum aljinat denenen bir diğer çalışmada ise Xuemei et al., (1999), *R. oryzae* hücrelerini poliüretan parçacıklar üzerine immobilize edildikleri üç fazlı akışkan yatak denemesi de gerçekleştirilmiştir. Bu proses, üretilen laktik asitin eşzamanlı olarak elektrodializle ayrımının gerçekleştirilmesi nedeniyle yüksek verime sahiptir.

Yakın zamanda, en umut vaad eden taşıyıcılar, markoporoz taşıyıcı olan poli (vinil alkol) kriyojel (PVA kriyojel)' lerdir ve *R. oryzae* immobilizasyonu başarıyla denenmiştir(Zhang et al., 2007). Efremenko et al., (2006), kesikli çalışma koşullarında çalkalayıcılı sistemde PVA-kriyojel' e immobilize edilmiş *R. oryzae* hücreleri ile 5.0 g/L.saat verimlilikle 0,94 g/g laktik asit verimine ulaşmışlardır.

Her ne kadar laboratuvar ölçeğinde çalışmalarda fungal hücre immobilizasyonu çokça denense de, ölçek büyütme çalışmalarına uygunluğu hala yeterli değildir. Bu tür proseslerin teknik ve ekonomik olarak geliştirilebilmesi için pilot ölçekte çalışmalara önem verilmesi kaçınılmazdır (Zhang et al., 2007).

3 MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma

Laktik asit üretimi için *Rhizopus oryzae* NRLL-395 suşu kullanılmıştır. Fungal kültür, Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck Ltd., Germany) içeren eğik agarlarda +4 °C’de stok kültür olarak depolanmıştır.

3.1.2 Substratlar

Çalkalamalı kültür ve statik kültür üretimlerde karbon kaynağı olarak glukoz (Merck Ltd., Germany) ve nişastanın(Merck Ltd., Germany) yanı sıra Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarından ham olarak temin edilen ve Biyomühendislik Bölümü laboratuvarlarında önışlemeden geçirilen melas, Balkan Süt Ürünleri San. Ve Tic. AŞ., (İzmir) ‘ den temin edilen peyniraltı suyu ve Setfors Ltd., (Söke)’ den temin edilen buğday ruşeymi kullanılmıştır.

Katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat olarak çeşitli karbon kaynakları ve tarımsal ürünler kullanılmıştır. Kullanılan substratlar: buğday kepeği-nişasta, buğday kepeği-peynir altı suyu, buğday kepeği-glukoz ve buğday kepeği-melas karışımlarıdır.

3.1.3 Kimyasallar

Çalışmalarda ortam bileşiminde MgSO₄ (Merck Ltd., Almanya), (NH₄)₂SO₄ (Carlo Erba, İtalya), KH₂PO₄ (Merck Ltd., Almanya) ve ZnSO₄ (Riedel de Haen, Hollanda), laktik asit tayininde CuSO₄ (Merck

Ltd., Almanya), 4-fenilfenol (Aldrich, ABD), L(+)-laktik asit (Sigma, ABD) ve sülfürik asit (Merck Ltd., Almanya), toplam şeker tayininde d-glukoz (Merck Ltd., Almanya), fenol (Riedel de Haen, Hollanda) ve sülfürik asit (Merck Ltd., Almanya), pH ayarlama ve dengeleme işlemlerinde NaOH (Merck Ltd., Almanya), HCl (Merck Ltd., Almanya) ve CaCO₃ (Carlo Erba, İtalya), inokulasyonda Tween 80 (Merck Ltd., Almanya), immobilizasyonda ise Na-aljinat (Sigma, ABD) ve CaCl₂ (Merck Ltd., Almanya) kullanılmış olup, kullanılan tüm bu kimyasallar analitik saflıktadır.

3.1.4 Kullanılan Başlıca Cihazlar

Otoklav (Hirayama HV-110L)

Statik İnkübatör (Sanyo)

Çalkalamalı İnkübatör (Gerhardt Thermoshake)

Analitik Hassas Terazî (Precisa)

Santrifüjler (Hettich Rotofix 32 ve Hettich Mikroliter D7200)

Pastör fırını (Memmert)

Su banyosu (Memmert)

Spektrofotometre (Jenway 6400 VIS)

pH metre (Mettler Toledo)

Manyetik Isıtıcı ve Karıştırıcı (IKA)

Tüp Karıştırıcı (Heidolph Reax)

Derin donduruculu Buzdolabı (Bosch)

Peristaltik Pompa (Masterflex)

3.1.5 Tampon, Reaktif ve Çözeltiler

3.1.5.1 Laktik Asit Tayini Reaktif ve Çözeltileri

L(+)-Laktik Asit Standart Çözeltisi (%0.25 ağırlık/hacim): 0.25 g L(+)-laktik asit (Sigma) tartılarak, bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra distile suyla 100 ml hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti +4 °C' de saklanmıştır.

4-Fenilfenol Çözeltisi (%1.5 ağırlık/hacim): 1.5 g 4-fenilfenol (Aldrich) tartılarak bir miktar %95' lik etil alkolde (hacim/hacim) çözdürülmüştür. Ardından yine %95' lik etil alkolle (hacim/hacim) 100 ml' lik hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4 °C' de saklanmıştır.

Bakır Sülfat Çözeltisi (%4.0 ağırlık/hacim): 4.0 g CuSO₄ (Merck) tartılarak bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra distile suyla 100 ml hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti +4 °C' de saklanmıştır.

Derişik Sülfürik Asit: % 95-98 saflıktaki H₂SO₄ (Merck) kullanılmıştır.

3.1.5.2 Toplam Şeker Tayini Reaktif ve Çözeltileri

Glukoz Standart Çözeltisi (%0.01 ağırlık/hacim): 0.01 g d-glukoz (Merck) tartılarak bir miktar distile suda çözdürüldükten sonra yine distile suyla 100 ml hacme tamamlanmıştır. Stok çözelti +4°C' de saklanmıştır.

Fenol Çözeltisi (% 5.0 ağırlık/hacim): 5.0 g fenol (Riedel de Hæn) tartılarak bir beherde, bir miktar distile suyla ısıtılarak çözdürülmüştür. Fenolün tamamen çözünmesinden sonra distile suyla 100 ml hacme tamamlanmıştır. Stok çözelti +4°C' de saklanmıştır.

Derişik Sülfürik Asit: % 95-98 saflıktaki H₂SO₄ (Merck) kullanılmıştır.

3.1.5.3 İnokulasyon ve pH Dengeleme Reaktif ve Çözeltileri

Tween 80 Çözeltisi (% 0.2 hacim/hacim): Tween 80 (Merck) reaktifinden 200 µl alınarak, hacmi 100 ml' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, inokulasyondan önce 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

HCl Çözeltisi (0.1 N): % 37' lik derişik HCl (Merck) reaktifinden 8.32 ml alınarak, hacmi 1L' ye tamamlanmıştır.

NaOH Çözeltisi (0.1 N): 4.0 g NaOH (Merck) tartılarak bir miktar distile suda çözdürülmüştür. NaOH tamamen çözüldükten sonra distile suyla hacim 1L' ye tamamlanmıştır.

CaCO₃ Çözeltisi (% 10 ağırlık/hacim): 30g CaCO₃ (Carlo Erba) tartılarak bir miktar distile suda çözdürülmüştür. CaCO₃ tamamen çözüldükten sonra distile suyla hacim 300 ml' ye tamamlanmıştır.

3.1.5.4 İmmobilizasyon Çözeltileri

CaCl₂ Çözeltisi (Boncuk Oluşturma Çözeltisi) (100mM): 3,17 g CaCl₂ (Merck Ltd., Almanya) tartılarak bir miktar distile suyla tamamen çözdürüldükten sonra distile suyla hacim 300 ml' ye tamamlanmıştır.

CaCl₂ Çözeltisi(Boncuk Saklama Çözeltisi) (5 mM): 0,65 g CaCl₂ (Merck Ltd., Almanya) tartılarak bir miktar distile suyla tamamen çözdürüldükten sonra 250 ml hacimli bir erlen içinde distile suyla hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır.

3.2 *Metod*

3.2.1 Üretim ortamlarının hazırlanışı

3.2.1.1 Çalkalamalı kültür üretim ortamlarının hazırlanışı

Çalkalamalı kültür için Erlenmayerlerde yapılan üretimlerde 250 ml hacimli Erlenmayerler 50 ml sıvı hacmi içerecek şekilde kullanılmıştır. Erlenlerdeki sıvı hacminin ağırlıkça %2-4-6-8-10-12' si olacak şekilde değişen konsantrasyonlarda glukoz(Merck), nişasta(Merck), melas ve buğday ruşeymi erlenlere konulduktan sonra, Çizelge 3.1' de verilen besin elementlerinden hazırlanan çözelti ile hacim 50 ml' ye tamamlanmıştır. Peyniraltı suyu ile hazırlanan ortamda ise, 50 ml peyniraltı suyu içerisine Çizelge 3.1' deki besin elementleri uygun miktarlarda eklenmiştir. Hazırlanan ortamların pH' ları 5.00' a ayarlanmıştır. pH ayarlamalarında 1 N HCl ve 1 N NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Erlenmayerlerin ağız kısımları pamuk tıpa ile kapatıldıktan sonra alüminyum folyo ile

kaplanmış ve 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmişlerdir. Sterilizasyon bitiminde Erlenmayerler oda sıcaklığında bekletilerek soğutulmuş ve inokulasyon işlemine hazır hale getirilmişlerdir.

Çizelge 3.1: Derin kültürle laktik asit üretim ortamında kullanılan besin elementleri

Besin Elementi	Miktar (g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,9
KH ₂ PO ₄	0,6

3.2.1.2 Statik kültür üretim ortamlarının hazırlanışı

Statik kültür laktik asit üretiminde, çalkalamalı kültür üretim için 3.2.1.2’ de verilen ortamlar aynı yöntemle hazırlanıp sterilize edilerek inokulasyon işlemine hazır hale getirilmişlerdir.

3.2.1.3 Katı kültür üretim ortamlarının hazırlanışı

Katı kültür için Erlenmayerlerde yapılan tüm üretimlerde 500 ml hacimli Erlenmayerler kullanılmıştır. 10 g substrat ya da substrat karışımı, Çizelge 3.2’ de verilen besin elementleri ile nemlendirilerek Erlenmayerlerin içerisine aktarılmışlardır. Nemlendirme sıvısı ortama eklenmeden önce pH 5.00’ a ayarlanmıştır. pH ayarlamalarında 1 N HCl ve 1 N NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Erlenmayerlerin ağız kısımları pamuk tıpa ile kapatıldıktan sonra alüminyum folyo ile kaplanmış ve 121°C’de 30 dakika süre ile sterilize edilmişlerdir. Sterilizasyon bitiminde

Erlenmayerler oda sıcaklığında bekletilerek soğutulmuş ve inokulasyon işlemine hazır hale getirilmişlerdir.

Çizelge 3.2: KKF ile laktik asit üretim ortamında kullanılan nemlendirme sıvısı içerisinde yer alan besin elementleri.

Besin elementi	Miktar (g/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
KH_2PO_4	1.7

3.2.1.4 İmmobilize üretim ortamlarının hazırlanışı

İmmobilize hücrelerle laktik asit üretiminde, sıvı hacminin ağırlıkça %2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14' ü kadar glukoz içeren ortamlar 3.2.1.2' de verildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2 İnokulasyon

3.2.2.1 Serbest hücrelerle üretimler için inokulasyon

Rhizopus oryzae NRLL -395, PDA(Merck) içeren kültür şişelerinde 28 °C 'de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda agar yüzeylerine 10 ml % 0.2 (hacim/hacim) steril Tween 80 eklenmiştir. Sporlar öze yardımıyla agar yüzeyinden kazanmış ve steril bir Erlenmayer içerisinde spor süspansiyonları toplanmıştır. Gerekli

seyreltmeler yapıldıktan sonra “Thoma” lamıyla sayım yapılarak süspansiyondaki hücre sayısı belirlenmiştir. Derin kültür ve statik kültür üretimleri için üretim ortamı içeren Erlenmayerlerin herbirine aseptik koşullarda $1,5 \times 10^5$ kob/ml spor içeren bu spor süspansiyonundan 1 ml (%2) transfer edilmiştir. Katı kültür üretimleri için ise Erlenmayerlerin herbirine aseptik koşullarda spor süspansiyonundan 2 ml (%2) transfer edilmiştir. İnokulumun homojen bir şekilde dağılması amacıyla erlenler yavaşça çalkalanarak inkübatöre yerleştirilmişlerdir.

3.2.2.2 İmmobilize üretimler için inokulasyon

Misel immobilizasyonu için inokulasyon

Rhizopus oryzae NRLL -395, Malt Ekstrakt Broth çözeltisi içeren 50 ml ortamda sırasıyla 2,3,4 ve 5 gün süreyle 28°C’ de statik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuru ağırlık tayini yapılarak inokule edilecek mikroorganizma miktarı 2, 3, 4 ve 5 günlük mikroorganizmalar için sırasıyla 0.1015, 0.1091, 0.1217 ve 0.1331 g bulunmuştur. Üremenin gerçekleştiği erlen içindeki ortam yüzeyinde bulunan miselli yapı steril öze yardımı ile başka bir erlendeki 50 ml steril saf su içine aktarılmıştır. Misellerin aktarıldığı erlendeki ortam, homojenizatör ile 1 dakika süre ile muamele edilerek misellerin parçalanmaları sağlanmıştır. Bir başka erlendeki steril saf su içerisine, miseller eklendikten sonra oluşacak toplam hacmin % 2’ si olacak şekilde Na-aljinat (Sigma, ABD) tartılarak eklenmiştir ve tamamen çözdürülmüştür. Çözünmüş haldeki Na-aljinat çözeltisine misel içeren saf su ortamı tamamen boşaltılarak toplamda 100 ml Na-aljinat-misel karışımı

elde edilmiştir. Elde edilen bu karışım, peristaltik pompa yardımı ile 100 mM CaCl₂ çözeltisi içeren şişeye damlatılarak, her bir damlada 3mm çapında boncuk elde edilmiştir. İşlemin gerçekleştirildiği sistem Şekil 3.1’ de gösterilmektedir. Tüm ortamın kullanılmasının ardından boncuklar steril saf su ile yıkanmış ve 5 mM CaCl₂ çözeltisinde bekletilmişlerdir. Daha sonra tekrar steril saf su ile yıkanarak besi ortamına (%10 glukoz içeren ortam) aktarılmışlardır.

Spor immobilizasyonu için inokulasyon

Rhizopus oryzae NRLL -395, PDA(Merck) içeren kültür şişelerinde 28 °C ‘de 2,3,4 ve 5 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda agar yüzeylerine 10 ml steril saf su eklenmiştir. Sporlar öze yardımıyla agar yüzeyinden kazınmış ve steril bir Erlenmayer içerisinde toplam 50 ml olacak şekilde spor süspansiyonları toplanmıştır. Gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra “Thoma” lamıyla sayım yapılmıştır ve 2,3,4 ve de 5 günlük sporlar için sırasıyla 0.5x10⁴, 1x10⁴, 0,5x10⁵ ve 1,2x10⁵ kob/ml değerlerinin elde edildiği belirlenmiştir . Bir başka erlendeki steril saf su içerisine, spor çözeltisi eklendikten sonra oluşacak hacmin ağırlıkça % 2’ si kadar Na-aljinat (Sigma, ABD) tartılarak eklenmiştir ve çözdürülmüştür. Çözünmüş haldeki Na-aljinat çözeltisine spor içeren saf su ortamı boşaltılarak 100 ml Na-aljinat - spor karışımı elde edilmiştir. Elde edilen bu karışım, peristaltik pompa yardımı ile 100 mM CaCl₂ çözeltisi içeren şişeye damlatılarak, her bir damlada bir boncuk elde edilmiştir. Sistem, Şekil 3.1’ de görülmektedir. Tüm ortamın kullanılmasının ardından boncuklar steril saf su ile yıkandıktan sonra 5 mM CaCl₂ çözeltisinde bir süre bekletilmişlerdir ve hemen ardından tekrar

46

steril saf su ile yıkanarak besi ortamına (%10 glukoz içeren ortam) aktarılmışlardır.



Şekil 3.1: İmmobilize hücre hazırlama sistemi

3.2.3 Üretim koşulları ve örnek alma

3.2.3.1 Çalkalamalı kültür üretim

İnokulasyon işlemi tamamlanan Erlenmayerler, Gerhardt marka inkübatörde 28 °C' de ve 120 rpm çalkalama hızında üretime alınmışlardır. Örnek alma her gün belirli zaman aralıklarıyla 2 kez 1 adet Erlenmayerin alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2 Statik kültür üretim

İnokulasyon işlemi tamamlanan Erlenmayerler Sanyo marka inkübatörde 28 °C'de üretime alınmışlardır. Örnek alma her gün belirli

zaman aralıklarıyla 2 kez 1 adet Erlenmayerin alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3 Katı kültür üretim

İnokulasyon işlemi tamamlanan Erlenmayerler Sanyo marka inkübatörde 28 °C'de üretime alınmışlardır. Örnek alma her gün 1 adet Erlenmayerin alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir

3.2.3.4 İmmobilize hücrelerle üretim

İnokulasyon işlemi tamamlanan Erlenmayerler, Gerhardt marka inkübatörde 28 °C' de ve 150 rpm çalkalama hızında üretime alınmışlardır. Örnek alma her gün belirli zaman aralıklarıyla 2 kez Erlenmayerlerin aseptik koşullarda açılarak 2-3 ml sıvı ortamın örnek tüplerine alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Üretim sonrası işlemler

3.2.4.1 Derin kültür için üretim sonrası işlemler

pH ölçümü

Günlük pH ölçümleri Mettler Toledo marka pH metre ile yapılmıştır. pH ölçümüne bağlı olarak gerektiği durumda üretimi devam eden erlenlere %10 CaCO₃ (ağırlık/hacim), pH'ı 5.00' a getirecek hacimde eklenmiştir.

Laktik asit ekstraktının elde edilmesi

pH ölçüm işlemi tamamlanan sıvı kısım Hettich marka soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 10000 devir/dakika dönme hızında 15 dakika süre ile

santrifüjlenmiştir. İşlem sonrasında elde edilen supernatant, laktik asit ekstraktı olarak 2.0 ml' lik eppendorf tüplere alınmış ve $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmıştır.

3.2.4.2 Statik kültür için üretim sonrası işlemler

pH ölçümü

Günlük pH ölçümleri Mettler Toledo marka pH metre ile yapılmıştır. pH ölçümüne bağlı olarak gerektiği durumda üretimi devam eden erlenlere %10 CaCO_3 (ağırlık/hacim), pH'ı 5.00' a getirecek hacimde eklenmiştir.

Laktik asit ekstraktının elde edilmesi

pH ölçüm işlemi tamamlanan sıvı kısım Hettich marka soğutmalı santrifüjde $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 devir/dakika dönme hızında 15 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. İşlem sonrasında elde edilen supernatant, laktik asit ekstraktı olarak 2.0 ml' lik eppendorf tüplere alınmış ve $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmıştır.

3.2.4.3 Katı kültür için üretim sonrası işlemler

Ekstraksiyon

Üretim sırasında alınan her 1 kısım örneğe 5 kısım % 0.2 (hacim/hacim) Tween 80 içeren çözelti eklenmiş ve erlenler $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat süre ile bekletilmişlerdir. Bu süre içerisinde her 15 dakikalık periyotta cam baget yardımıyla karıştırılmışlardır. Daha sonra ortam, bir cendere bezinden filtre edilmiş ve sıvı kısım pH ölçümüne alınmıştır.

pH ölçümü

pH ölçümleri Metler Toledo marka pH metre ile yapılmıştır.

Laktik asit ekstraktının elde edilmesi

Filtrasyon ve pH ölçüm işlemi tamamlanan sıvı kısım Hettich marka soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 10000 devir/dakika dönme hızında 15 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. İşlem sonrasında elde edilen supernatant, laktik asit ekstraktı olarak 2.0 ml’ lik eppendorf tüplere alınmış ve –18 °C’de depolanmıştır.

3.2.4.4 İmmobilize üretimler için üretim sonrası işlemler

pH ölçümü

Günlük pH ölçümleri Metler Toledo marka pH metre ile yapılmıştır. pH ölçümüne bağlı olarak gerektiği durumda erlenlere %10 CaCO₃ (ağırlık/hacim), pH’ı 5.00’ a getirecek hacimde eklenmiştir.

Laktik asit ekstraktının elde edilmesi

pH ölçüm işlemi tamamlanan sıvı kısım Hettich marka soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 10000 devir/dakika dönme hızında 15 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. İşlem sonrasında elde edilen supernatant, laktik asit ekstraktı olarak 2.0 ml’ lik eppendorf tüplere alınmış ve –18 °C’de depolanmıştır.

Boncukların aktarılması

Elde edilen laktik asit ekstraktlarıyla gerçekleştirilen günlük laktik asit tayini sonucuna göre immobilize üretimin sonlandırılması gereken

zaman belirlenmiştir. Üretimin sonlandırılmasından sonra boncuklar, steril saf suyla yıkanarak ortam kalıntılarında arındırıldıktan sonra yeni üretim hemen gerçekleştirilecekse 5 mM CaCl₂ çözeltisinde bir süre bekletildikten sonra tekrar steril saf suyla yıkanarak taze besi ortamına aktarılmışlardır. Eğer yeni üretim hemen gerçekleştirilmeyecekse boncuklar 5 mM CaCl₂ çözeltisi içerisinde +4°C' de bekletilmişler ve yeni üretim yapılacağı zaman steril saf suyla yıkanarak taze besi ortamına alınmışlardır.

3.2.5 Laktik asit tayini

Laktik asit tayini, Kimberley and Taylor, 1996' da belirtilen şekilde spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Tayin prosedürü aşağıda sunulmuştur.

Standard hazırlama

Laktik asit standardı hazırlanırken 2.5 mg/ml stok çözelti 100 kez seyreltilerek 25 µg/ml laktik asit standart stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stoktan Çizelge 3.3' te verilen seyreltmeler yapılmıştır.

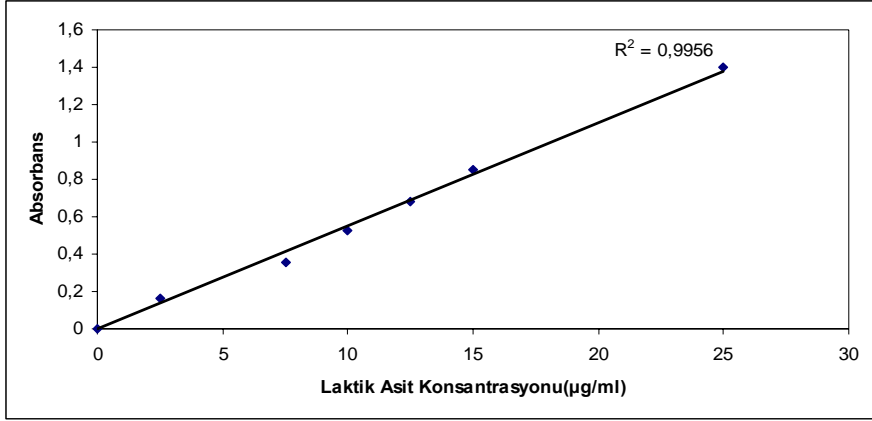
Çizelge 3.3: Laktik asit standartlarının hazırlanmasında kullanılan konsantrasyonlar

Stoktan Alınan Miktar (µl)	Eklenen Su Miktarı (µl)	Son Konsantrasyon (µg / ml)
50	450	2,5
100	400	5
150	350	7,5
250	250	12,5
300	200	15
500	0	25

Tayin Basamakları

- Standart ve fermentasyon ortamı örneklerinden 500' er µl tüplere aktarılır.
- 3 ml derişik H₂SO₄ eklenir ve 10 dakika kaynayan suda bekletilir.
- Karışım oda sıcaklığında soğutulduktan sonra tüplere sırasıyla, 50 µl CuSO₄ ve 100 µl 4-fenilfenol çözeltileri eklenir ve tüpler, tüp karıştırıcı ile karıştırılırlar.
- 20 dk sonra 570 nm dalga boyunda standarda karşı, örneklerin absorbens değerleri okunur.
- Elde edilen standart grafiklerinden regresyonla örneklerdeki laktik asit miktarı hesaplanır.

Laktik asit standart grafiğı Şekil 3.2' de sunulmuştur.



Şekil 3.2: Laktik asit standart eğrisi

3.2.6 Toplam şeker tayini

Toplam şeker tayini için Fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır.

Standard hazırlama

Standart olarak glukoz çözeltisi (Çizelge 3.4).’ teki şekilde seyreltilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.4: Toplam şeker tayin yöntemi standart konsantrasyonları

	%0.01’ lik glukoz (ml)	Distile su (ml)	Glukoz kons.(mg/ml)
Std 1	0	1	0
Std 2	0.2	0.8	20
Std 3	0.4	0.6	40
Std 4	0.6	0.4	60
Std 5	0.8	0.2	80
Std 6	1.0	0	100

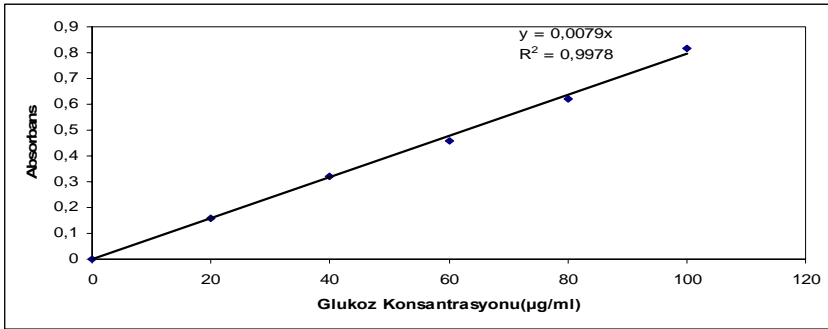
Tayin Basamakları

Çizelge 3.5: Toplam Şeker Tayin Yöntemi (Tüp İçerikleri)

	Kör	Std 1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Örnek
Glukoz (% 0,01) (ml)	-	1	1	1	1	1	1	-
Örnek (ml)	-	-	-	-	-	-	-	1
Fenol (%5) (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Derişik H ₂ SO ₄ (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5

- Tüpler, tüp karıştırıcı ile karıştırılır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilirler.
- Tekrar tüp karıştırıcı ile karıştırılırlar. Su banyosunda 25-30 °C' de 20 dakika bekletilirler.
- Heksozlar için 490 nm'de Pentozlar ve Üronik Asitler için 480 nm'de köre karşı absorbans değerleri okunur.

Toplam şeker analizlerine (Fenol-Sülfürik asit) ait veriler Şekil 3.3'te verilen glukoz standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3: Glukoz Standart Eğrisi

4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

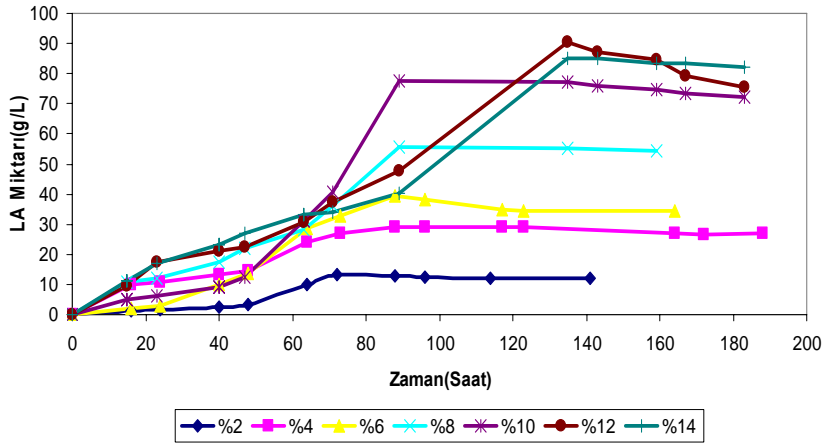
Çalkalamalı kültür, statik kültür ve katı kültür çalışmalarında mikroorganizmanın beş farklı karbon kaynağında (glukoz, nişasta, melas, peyniraltı suyu ve buğday ruşeymi) laktik asit üretimleri karşılaştırılmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmalardan elde edilen veriler sonucu elde edilen değerler göz önüne alınarak, mikroorganizmanın Ca-aljinat boncuklara tutuklanarak gerçekleştirilen üretimlerinde kullanılan besi ortamında karbon kaynağı ve ortamdaki yüzdesi belirlenmiştir. Ca-aljinat boncuklara tutuklanmış *R. oryzae* hücreleriyle gerçekleştirilen üretimlerde karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmıştır. Sabit glukoz oranı ve sabit ortam koşulları (28°C sıcaklık ve 120 rpm çalkalama hızı sağlanarak en uygun immobilizasyon tipi ve inokulum yaşı, spor konsantrasyonu, Na-aljinat oranı, boncuk çapı ve CaCl₂ çözeltisi konsantrasyonunun laktik asit üretimine etkisi incelenmiştir.

4.1 Serbest Hücrelerle Laktik Asit Üretimi

4.1.1 Çalkalamalı kültürde laktik asit üretimi

4.1.1.1 Substrat olarak glukoz kullanılan üretim

Başlangıç glukoz konsantrasyonlarının *R. oryzae* ile laktik asit fermentasyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatörde 28°C ortam sıcaklığında, 5.00 başlangıç pH değerinde ve 120 rpm çalkalama hızında %2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14 (ağırlık/hacim) glukoz içeren besi ortamları ile üretimler gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu üretimler sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 4.1' de verilmektedir.



Şekil 4.1: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Gerçekleştirilen üretimler sonucunda substrat konsantrasyonu arttıkça elde edilen laktik asit miktarının arttığı, ağırlıkça % 12 konsantrasyon değerinden sonra ise azalmaya başladığı görülmüştür(Çizelge 4.1).

En yüksek verim ve verimlilik değerleri ağırlıkça % 10 başlangıç glukoz konsantrasyonu ile gerçekleştirilen üretimde elde edilmiştir ve sırasıyla % 78 (g/g) ve 0.87 g/L.saat' tir. En yüksek laktik asit miktarına ise ağırlıkça % 12 başlangıç glukoz konsantrasyonu ile gerçekleştirilen üretimde ulaşılmıştır (90.33 ± 0.8 g/L). Elde edilen verim ve verimlilik değerlerinin yüksek oluşu nedeniyle en uygun ortamın ağırlıkça %10 başlangıç glukoz konsantrasyonuna sahip ortam olduğu belirlenmiştir. Ağırlıkça % 12 glukoz konsantrasyonunda, laktik asit miktarında artış meydana gelmesi nedeniyle % 14 glukoz konsantrasyonu da denenmiştir ancak deneme sonucunda daha yüksek laktik asit miktarı, verim ve verimlilik değerlerine ulaşamamıştır. Bunun nedeni olarak,

literatürlerden elde edilen bilgiler de göz önünde bulundurularak laktik asit üretiminin belirli bir konsantrasyona kadar arttığı, bu glukoz konsantrasyonundan sonra ise, ortam vizkozitesine bağlı kütle transfer kısıtlarından ve yüksek substrat konsantrasyonu ve buna bağlı asit üretiminden mikroorganizmanın olumsuz etkilenmesi gösterilmiştir (Bulut, 2001).

Çizelge 4.1: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

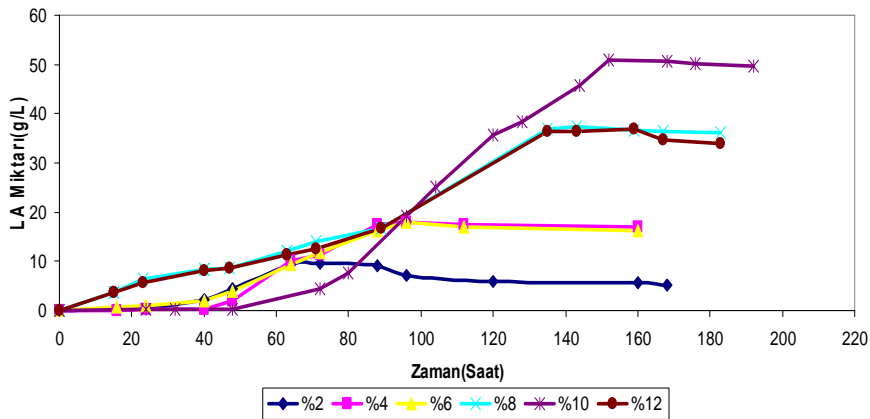
Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
2	13.39±0.5	72	67	0.19
4	29.20±0.5	88	73	0.33
6	39.40±0.6	88	66	0.45
8	55.58±0.6	88	69	0.63
10	77.67±0.6	89	78	0.87
12	90.33±0.8	135	75	0.67
14	85.22±0.7	135	61	0.63

Substrat olarak glukozun kullanıldığı denemeler, bazı araştırmacıların çalışmalarında da yer almıştır. Bu çalışmalardan bir tanesinde Bulut et al. (2004), farklı karbon kaynaklarının *R. oryzae* NRRL 395 suşu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit üretimine etkisini incelemiştir. Glukozun denendiği çalışmada başlangıç substrat konsantrasyonunun 25 g/l' den 150 g/l' ye kadar çıkarıldığında laktik asit üretiminin arttığı, 150 g/l' nin üzerindeki değerlere çıkarıldığında ise laktik asit üretiminin azalmaya başladığı ifade edilmiştir.

Glukozun substrat olarak kullanıldığı fermentasyon ortamında zamana karşı laktik asit üretimi ve pH değişimi grafiği EK 3' te verilmektedir. Fermentasyon ortamında, zamanla meydana gelen pH düşüşünü tamponlaması amacıyla ağırlıkça % 10' luk CaCO_3 çözeltisi kullanılmıştır. Tüm glukoz konsantrasyonlarında , ortamın pH'ı ilk 24 saatlik periyotta 3.00 – 4.00 arası değerlere düşmektedir. Tampon çözelti ile pH tekrar 5.00 değerine getirildikten sonra aynı işlem üretilen laktik asit miktarına bağlı olarak üretimin ilerleyen aşamalarında tekrar edilmiştir.

4.1.1.2 Substrat olarak nişasta kullanılan üretim

Başlangıç nişasta konsantrasyonlarının laktik asit üretimine etkilerini incelemek amacıyla yine sıcaklık kontrollü çalkalamalı karıştırıcıda 28 °C ortam sıcaklığında, 5.00 başlangıç pH değerinde ve 120 rpm çalkalama hızında ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 konsantrasyonda nişasta içeren besi ortamları kullanılmıştır. Gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.2' de verilmektedir.



Şekil 4.2: Farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Şekilde zamana karşı oluşan laktik asit miktarı arası ilişki yer almaktadır. Şekilde de görüldüğü üzere nişasta konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit miktarı da artmaktadır. Ağırlıkça % 10' un üzerine çıktığında ise laktik asit miktarı düşüş göstermektedir. Bu durumun, yüksek nişasta konsantrasyonunun ortam viskozitesini artırmasından ve kütle transferini zorlaştırmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Bulut, 2001).

En yüksek laktik asit miktarı, ağırlıkça % 10 nişasta konsantrasyonunda, 50.99 ± 1.4 g/L bulunmuştur(Çizelge 4.2). Çizelgede belirtildiği üzere en yüksek verim ve verimlilik değerleri ise sırasıyla % 51 (g/g) ve 0.34 g/L.saat ile yine ağırlıkça % 10 nişasta konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.2:Farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.saa)
2	9.27±0.9	64	46	0.14
4	17.53±0.9	88	44	0.20
6	17.98±1.1	96	30	0.19
8	36.88±1.0	135	46	0.27
10	50.99±1.4	152	51	0.34
12	36.35±1.8	135	30	0.27

Nişastanın substrat olarak kullanıldığı çalışmalardan bir tanesinde Bai et al. (2003) , *Rhizopus oryzae* R1021 kullanarak 120 g/L mısır nişastasından 60 saat sonra 79.4 g / L laktik asit üretmişlerdir.

Benzer bir başka çalışmada Huang et al. (2005), *R. oryzae* 2062 ve *R. arrhizus* 36017 kullanarak patates nişastası atık suyundan laktik asit ürettikleri çalışmalarında başlangıç nişasta konsantrasyonunun laktik asit üretimine etkisini incelemişler ve artan nişasta konsantrasyonunda laktik asit üretiminin arttığını, daha yüksek değerlere çıkıldığında ise üretimin azaldığını ifade etmişlerdir. *R. oryzae* 2062'yi kullandıkları denemelerinde nişasta konsantrasyonunun 12.5 g/l' den 18.6 g/l' ye çıkarılması durumunda laktik asit üretiminin 5.02 g/l' den 13.62 g/l' ye çıktığını, nişasta konsantrasyonunun 37.5 g/l olduğu koşulda ise laktik asit üretiminin 5.34 g/l'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Azalmanın nedenini, mikroorganizmanın sahip olduğu amilaz aktivitesinin nişasta içeren karbon kaynaklarının hidrolizi için yeterli olmayabileceği şeklinde açıklamışlardır.

Yin et al.(1997), yapmış oldukları çalışmada *R. oryzae* NRRL 395 ile air-lift biyoreaktör içerisinde mısır nişastasından laktik asit üretimini incelemişlerdir. Farklı mısır nişastası konsantrasyonlarının laktik asit üretimi üzerine etkisini araştırdıkları denemelerinde 100 g/l ile 240 g/l arasındaki mısır nişastası konsantrasyonlarında denemeler gerçekleştirmişler ve artan mısır nişastası konsantrasyonlarında laktik asit veriminin (%), başlangıç mısır nişastası konsantrasyonu üzerinden) azaldığını tespit etmişlerdir. Laktik asit üretimi incelendiğinde ise 150 g/l mısır nişastası konsantrasyonuna kadar laktik asit üretiminin arttığı, daha yüksek konsantrasyonlarda ise üretimin azaldığı gözlenmiştir. Artan mısır nişastası konsantrasyonunda ortam viskozitesinin artmasına bağlı olarak üretimin azalmış olabileceği belirtilmiştir.

Ray ve ark. (1991), iki aşamalı bir proses ile laktik asit üretmişlerdir. İlk aşamada ham patates nişastası *Aspergillus oryzae* α -

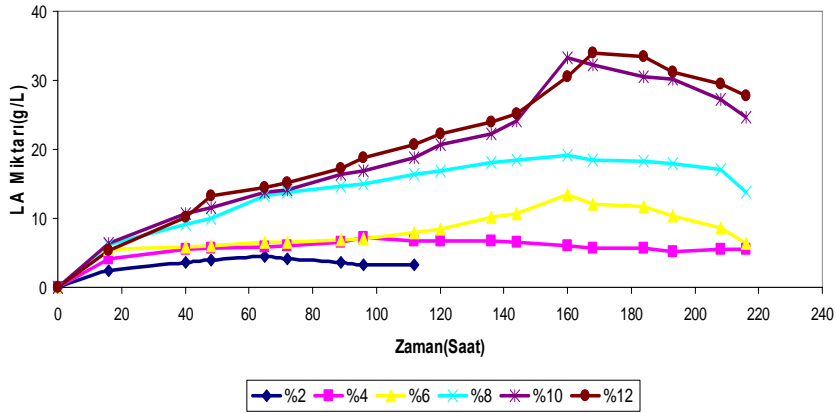
amilazı ve amiloglukozidazı ile şekerlendirilmiş, sonraki aşamada ise *L. delbrueckii* ile laktik asit üretilmiştir. Deneme sonucunda patates nişastası % 75 oranında glukozu parçalanmış ve elde edilen glukoz üzerinden % 69 laktik asit verimi elde edilmiştir.

EK 3' te laktik asit üretiminin ve ortam pH' ının zamana karşı değişimi grafiği verilmiştir. Bu denemede de pH değişimi, glukozlu üretime benzerlik göstermiştir.

4.1.1.3 Substrat olarak melas kullanılan üretim

Ucuz olma ve kolay bulunma gibi birtakım özellikleri ile melas, endüstriyel üretim ortamlarında yaygın olarak kullanılan olan bir hammaddedir ve çalışmada ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 konsantrasyonda şeker içeren altı farklı melaslı besi ortamı kullanılmıştır. Melas, doğrudan kullanılabilirdiği gibi, farklı yöntemlerle ön işlemlerden geçirilerek te (Göksungur, 1998, Roukas, 1998; Pakmaya Yeast Ind. Com.,2002; Adıyaman-Koltuksuz' dan 2007) ortamlara eklenebilmektedir. Literatürde, ön işlemden geçirilmiş melasın, işlenmemiş melasa oranla mikroorganizmanın şekeri daha kolay kullanabilmesine olanak tanıdığı belirtilmektedir (Bulut, 2001). Bu nedenle üretimde, çeşitli ön işlemlerden geçirilmiş melas kullanılmıştır. Kullanılan melasın içeriği ve uygulanan ön işlemler EK 1' de sunulmuştur.

Gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.3' te verilmektedir.



Şekil 4.3: Farklı başlangıç melas konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Şekil 4.3' te görüldüğü gibi melas konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit miktarı da artmaktadır. Ancak yine diğer üretimlere benzer şekilde substrat konsantrasyonu ağırlıkça %10' un üzerine çıktığında laktik asit verimi düşüş göstermektedir. Bu durum, yüksek sükröz konsantrasyonunun ortam viskozitesini artırıp kütle transferini zorlaştırmasına bağlanmıştır (Bulut, 2001). Üretim sonucu en yüksek laktik asit miktarı, ağırlıkça % 10 ve 12 şeker konsantrasyonunda sırasıyla 33.21 ± 1.1 ve 33.94 ± 1.0 g/L olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Çizelge' de belirtildiği üzere en yüksek verim ve verimlilik değerleri de yine bu iki konsantrasyonda birbirine çok yakın olmakla beraber verimler % 33 (g/g) ve % 28 (g/g), verimlilik değerleri ise 0.21g/L.saat ve 0.20 g/L.saat olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.3:Farklı başlangıç melas şekeri konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
2	4.41±1.1	65	22	0.07
4	7.22±0.9	96	18	0.08
6	13.41±0.9	160	22	0.08
8	19.15±1.0	160	24	0.12
10	33.21±1.1	160	33	0.21
12	33.94±1.0	168	28	0.20

Melas kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalara örnek olabilecek bir çalışmada Bulut et al.(2004), ilk olarak, işlem görmemiş melasın farklı konsantrasyonlarında laktik asit üretimini incelemişler ve melas konsantrasyonu artışına paralel olarak laktik asit üretiminin de arttığını ifade etmişlerdir. Pastörize edilmiş melas kullandıkları denemelerde ise laktik asit üretiminin, melas konsantrasyonu arttığında artış gösterdiğini ve ayrıca laktik asit üretim hızının pastörize melasta daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen laktik asit miktarları açısından işlem görmüş melas ve pastörize melas arasında belirgin bir fark olmadığı saptanmıştır. Bir diğer denemede pastörize edilmiş melasa %10 maya ekstraktı ilave edilmiş ve artan melas konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin arttığı, elde edilen laktik asit miktarlarının ise işlem görmemiş melas ve pastörize melasla yapılan denemelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

EK 3' te laktik asit üretiminin ve ortam pH' ının zamana karşı değişim grafiği verilmiştir. Bu denemede önceki denemelerden farklı

olarak üretim süresince ortam pH' ı 5.00' dan belirgin bir düşüş göstermemiştir.

4.1.1.4 Substrat olarak buğday ruşeymi kullanılan üretim

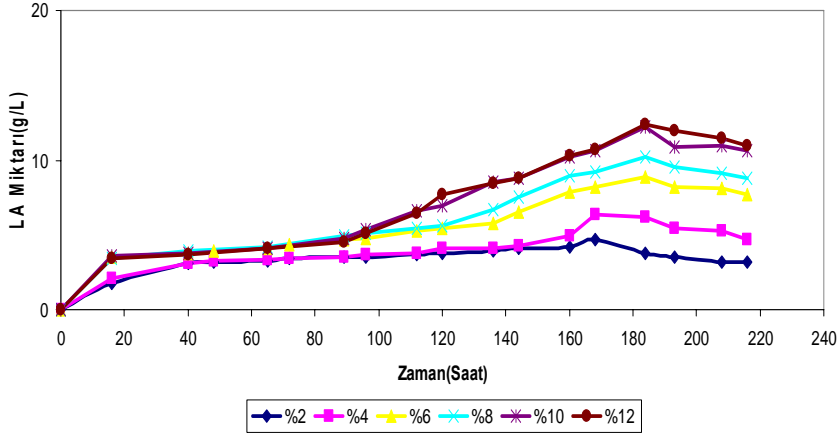
Laktik asit üretiminde zengin bir içeriğe sahip ve fermentasyonda daha önce kullanıldığına dair herhangi bir kaynağa rastlanılmamış olan buğday ruşeym küspesine çalışmada özel bir önem verilmiştir. Bunun için üretim verimi incelenen buğday ruşeym küspesinin içeriği EK 2' de açıklanan yöntemlerle belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4' te sunulmuştur.

Çizelge 4.4: Buğday Ruşeym Küspesinin Kompozisyonu

Analizler	Buğday Ruşeym Küspesi (% Yaş Baz)
Toplam şeker (asit hidrolizi)	71.59±0.86
Toplam şeker (çözünebilen)	11.25±0.72
Protein (N x 6,25)	5.14±0.32
Yağ	0.61±0.11
Ham lif	1.32±0.14
Kül	1.87±0.015
Nem	7.1±0.55
Diğer	1.12

Çizelgede görüldüğü gibi buğday ruşeym küspesi, toplam şeker içeriği bakımından zengin bir kaynak olarak görülmektedir. Çalışmada

ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 buğday ruşeym küspesi içeren altı farklı besi ortamı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4' te görülmektedir.



Şekil 4.4: Farklı başlangıç ruşeym konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Zamana karşı buğday ruşeyimli ortamda oluşan laktik asit miktarını veren şekillerde de görüldüğü üzere ruşeym konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit miktarı da artmaktadır. Substrat konsantrasyonun artışı verimi olumsuz etkilerken, verimliliği ağırlıkça % 10 substrat konsantrasyonuna kadar artırmıştır, % 10' un üzerinde verimlilik artmamıştır. Bu durumun, buğday ruşeyminin üretim ortamında topaklanma meydana getirmesi ve kütle transferini güçleştirmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Çok iyi su absorblama kapasitesine sahip olduğu gözlenen ruşeymin, üretim sırasında ortamdaki serbest suyun büyük kısmını absorblayarak ortamı daha çok katı kültür- yarı katı kültür üretim ortamına dönüştürdüğü gözlemlenmiştir. Üretim sonucu en yüksek laktik asit miktarı, ağırlıkça % 10 ve 12 ruşeym konsantrasyonunda sırasıyla 12.22 ± 1.6 ve 12.38 ± 1.8 g/L olarak elde edilmiştir(Çizelge 4.5). Çizelge' de belirtildiği üzere en yüksek verim değeri % 2 ruşeym

konsantrasyonunda (% 23 (g/g)), verimlilik değeri ise % 10 ve 12 ruşeym konsantrasyonunda 0.07 g/L.saat olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.5:Farklı başlangıç buğday ruşeymi konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
2	4.67±1.4	168	23	0.03
4	6.37±1.4	168	16	0.04
6	8.85±1.5	184	15	0.05
8	10.18±1.5	184	13	0.06
10	12.22±1.6	184	12	0.07
12	12.38±1.8	184	10	0.07

EK 3' teki grafiklerde laktik asit üretiminin ve ortam pH' ının zamana karşı değişimi verilmiştir. Bu denemede de üretim süresince ortam pH' ı 5.00' dan belirgin bir düşüş göstermemiştir.

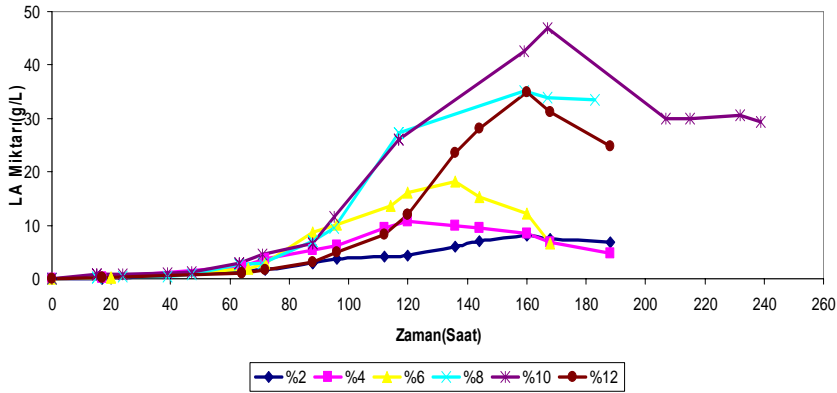
4.1.1.5 Substrat olarak peyniraltı suyu kullanılan üretim

Yüksek protein ve laktoz içeriğine sahip oluşu nedeniyle bakteriyel laktik asit üretiminde sıkça denenen peyniraltı suyu, *R. oryzae* ile laktik asit üretiminde de denenmiştir. Peyniraltı suyuna herhangi bir seyreltme uygulanmadan içerisine tuzların ilave edilmesi ile hazırlanan ortamda gerçekleştirilen üretimde laktik asit üretimi sağlanamamıştır.

4.1.2 Statik kültürde laktik asit üretimi

4.1.2.1 Substrat olarak glukoz kullanılan üretim

Başlangıç glukoz konsantrasyonlarının *R. oryzae* ile statik kültürde laktik asit fermentasyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla sıcaklık kontrollü inkübatörde 28 °C ortam sıcaklığında ve 5.00 başlangıç pH değerinde ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 olacak şekilde altı farklı konsantrasyonda glukoz içeren besi ortamları ile üretimler gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu üretimler sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 4.5' te verilmektedir.



Şekil 4.5: Statik kültürde farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Gerçekleştirilen üretimler sonucunda substrat konsantrasyonu arttıkça elde edilen laktik asit miktarının arttığı, ağırlıkça % 10 glukoz konsantrasyonunun üzerindeki değerlerde ise azalmaya başladığı görülmüştür (Çizelge 4.6). Bu duruma neden olarak ortam viskozitesine bağlı kütle transfer kısıtlarından ve yüksek substrat konsantrasyonu ve buna bağlı asit üretiminden mikroorganizmanın olumsuz etkilenmesi

gösterilmiştir.(Bulut, 2001). Bunun yanında çalkalamanın olmayışı da kütle transferini olumsuz etkilemiştir.

Çizelge 4.6: Statik kültürde farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
2	7.99 ±0.5	160	40	0.05
4	10.69 ±0.6	120	27	0.09
6	18.10 ±0.6	136	30	0.13
8	35.03 ±1.0	159	44	0.22
10	46.90 ±1.1	167	47	0.28
12	34.82 ±1.1	160	29	0.22

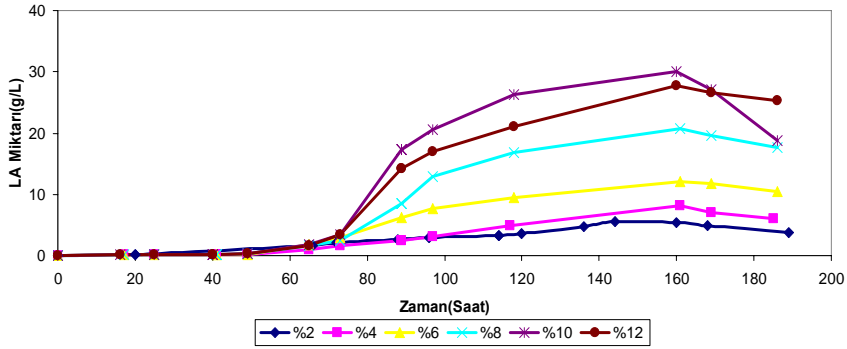
En yüksek verim ve verimlilik ve laktik asit değerleri % 10 başlangıç glukoz konsantrasyonu ile gerçekleştirilen üretimde elde edilmiştir ve sırasıyla 46.90 ± 1.1 g/L, % 47 (g/g) ve 0.28 g/L.saat' tir. Elde edilen bu değerlere bakıldığında % 10 glukoz konsantrasyonu ile statik kültürle gerçekleştirilen üretimin, aynı ortamla gerçekleştirilen çalkalamalı kültürün %60'ı kadar verim değerine, %32' si kadar da verimlilik değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Glukozun substrat olarak kullanıldığı statik kültür fermentasyon ortamında zamana karşı laktik asit üretimi ve pH değişimi grafiği EK 3' te verilmektedir. Fermentasyon ortamında, pH düşüşünü tamponlaması amacıyla 100g/L konsantrasyonda CaCO_3 çözeltisi kullanılmıştır. Şekilde de görüldüğü üzere ortamın pH' ı ilk 24 saatlik periyotta 3.00-4.00 arası

değerlere düşmektedir. Tampon çözelti ile pH tekrar 5.00 değerine getirilmiştir.

4.1.2.2 Substrat olarak nişasta kullanılan üretim

Başlangıç nişasta konsantrasyonlarının statik kültürde laktik asit üretimine etkilerini incelemek amacıyla yine sıcaklık kontrollü inkübatörde 28 °C ortam sıcaklığında ve 5.00 başlangıç pH değerinde ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 olacak şekilde altı farklı konsantrasyonda nişasta içeren besi ortamları çalkalamalı sistemdeki aynı şekliyle hazırlanarak kullanılmıştır. Gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.6' da verilmektedir.



Şekil 4.6: Statik kültürde farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Şekillerde zamanla, farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarında oluşan laktik asit miktarı arası ilişki yer almaktadır. Şekilde de görüldüğü üzere nişasta konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit miktarı da artmaktadır. Ancak konsantrasyon ağırlıkça % 10' un üzerine çıktığında, asit miktarı düşüş göstermektedir. Bu durum, yüksek nişasta konsantrasyonunun ortam viskozitesini artırmasına ve kütle aktarımını

zorlaştırmasına bağlanmıştır(Bulut, 2001). Çalkalama ya da karıştırmanın olmaması da kütle transfer zorluklarının meydana gelmesinde etkin olmuştur. En yüksek laktik asit miktarı 30.02 ± 1.2 g/L olarak, % 10 nişasta konsantrasyonunda elde edilmiştir(Çizelge 4.7). Çizelgede belirtildiği üzere en yüksek verim ve verimlilik değerleri ise sırasıyla % 30 (g/g) ve 0.19g/L. saat' tir ve her iki değer de % 10 başlangıç nişasta konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Çizelge 4.7:Statik kültürde farklı başlangıç nişasta konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

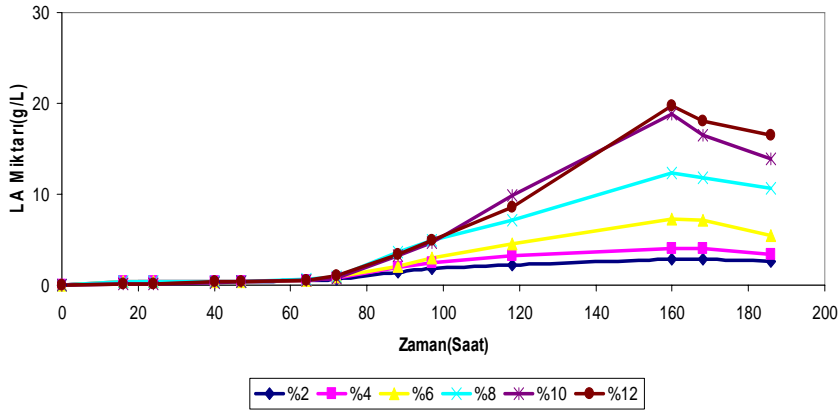
Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
2	5.47 ± 0.6	144	27	0.04
4	8.12 ± 0.6	161	20	0.05
6	12.04 ± 0.9	161	20	0.07
8	20.77 ± 1.2	161	26	0.13
10	30.02 ± 1.2	160	30	0.19
12	27.78 ± 1.5	160	23	0.17

Elde edilen bu verim ve verimlilik değerleri statik kültürde, çalkalamalı kültürle aynı ortamdaki üretim veriminin %59' u, verimlilik değerinin ise %50' si bulunmuştur.

Nişastanın kullanıldığı statik kültür fermentasyon ortamında zamana karşı laktik asit üretimi ve pH değişimi grafiği EK 3' te verilmektedir. pH değişimi glukozlu statik üretime benzerlikler göstermektedir.

4.1.2.3 Substrat olarak melas kullanılan üretim

Melaslı ortam statik kültür uygulaması için çalkalamalı kültüre benzer şekilde ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 konsantrasyonda şeker içeren altı farklı besi ortamı olacak şekilde kullanılmıştır. Melas ortamlarda kullanılmadan önce EK 1 Çizelge 2' deki M4 prosedürüne göre önişlemeden geçirilmiştir. Gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.7' de verilmektedir .



Şekil 4.7: Statik kültürde farklı başlangıç melas şekeri konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Zamana karşı melaslı ortamda oluşan laktik asit miktarını veren şekillerde de görüldüğü üzere melas konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit miktarı da artmaktadır. Ancak substrat konsantrasyonu % 10' un üzerine çıktığında, laktik asit verimi düşüş göstermektedir. Bu durum, yüksek sükröz konsantrasyonunun ortam viskozitesini artırıp kütle transferini zorlaştırmasının(Bulut, 2001) yanında çalkamasız ortamın kütle transfer zorluklarına da bağlanmıştır. Üretim sonucu en yüksek laktik asit miktarı, % 12 şeker konsantrasyonunda 19.70 g/L olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.8) Çizelgede belirtildiği üzere en yüksek verim değeri % 10 melas şekeri konsantrasyonunda % 19 (g/g) olarak elde

edilmiştir, verimlilik değerleri ise % 10 ve 12 konsantrasyonda en yüksek olacak şekilde 0.12 g/L.sa olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değerler statik kültürde, çalkalamalı kültürle aynı ortamda gerçekleştirilen üretimde elde edilen değerlerin sırasıyla %58'i ve %57' si kadardır.

Çizelge 4.8: Statik kültürde farklı başlangıç melas şekeri konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

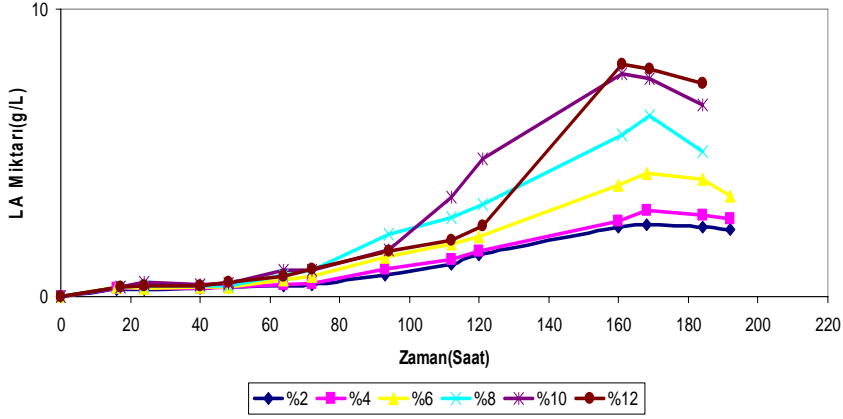
Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
2	2.81±0.6	160	14	0.02
4	4.06±0.8	160	10	0.03
6	7.26±0.8	160	12	0.05
8	12.27±1.1	160	15	0.08
10	18.81±1.0	160	19	0.12
12	19.70±1.0	160	16	0.12

EK 3' teki grafiklerde ortam pH' ının zamanla nasıl değişim gösterdiği görülmektedir. Bu denemede de karıştırılmalı üretimde olduğu gibi üretim süresince ortam pH' ı 5.00' dan aşağı düşmemektedir ve bu nedenle tamponlama çözeltisi ortama eklenerek pH 5.00' da tutulmaya gerek görülmemiştir.

4.1.2.4 Substrat olarak buğday ruşeymi kullanılan üretim

Derin kültürden çok katı kültüre yakın özellikler göstermesi nedeniyle statik kültürde laktik asit üretiminde, buğday ruşeym küspesine ayrı bir önem verilmiştir. Çalışmada çalkalamalı kültürle aynı olacak şekilde ağırlıkça % 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 konsantrasyonda buğday ruşeym

küspesi içeren altı farklı besi ortamı kullanılmıştır. Gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’ de görülmektedir.



Şekil 4.8: Statik kültürde farklı başlangıç buğday ruşeymi konsantrasyonlarında laktik asit üretiminin zamanla değişimi

Zamana karşı buğday ruşeyimli ortamda oluşan laktik asit miktarını veren şekillerde de görüldüğü üzere ruşeym konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit verimi de % 8 ruşeym konsantrasyonuna kadar artmaktadır. Substrat konsantrasyonu ağırlıkça % 10’ un üzerine çıktığında ise, laktik asit verimi düşüş göstermektedir. Bu durum, yüksek nişasta ve partikül konsantrasyonunun ortam viskozitesini artırıp kütle transferini zorlaştırmasına (Bulut, 2001) ve üretimin çalkalamasız koşullarda gerçekleştirilmesi nedeniyle yetersiz havalandırmaya bağlanmıştır. Üretim sonucu en yüksek laktik asit miktarı, % 12 ruşeym konsantrasyonunda 8.09 ± 1.4 g/L olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.9). Tabloda belirtildiği üzere en yüksek verim değeri % 8 ve 10 ruşeym konsantrasyonlarında % 8 (g/g) olarak elde edilmiştir, en yüksek verimlilik değerleri ise % 10 ve 12 ruşeym konsantrasyonlarında 0.05 g/L.saat olarak gerçekleşmiştir ve bu değerler sırasıyla çalkalamalı

kültürde aynı ortamdaki üretimin verim ve verimliliğinin % 67 ve % 71' i kadardır.

Çizelge 4.9: Statik kültürde farklı başlangıç buğday ruşeymi konsantrasyonlarında elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
2	2.48±1.5	168	12	0.01
4	2.98±1.5	168	7	0.02
6	4.29±1.4	168	7	0.03
8	6.29±1.2	169	8	0.04
10	7.76±1.2	161	8	0.05
12	8.09±1.4	161	7	0.05

EK 3' teki grafiklerde ortam pH' ının zamanla nasıl değişim gösterdiği görülmektedir. Bu denemede de çalkalamalı üretimde olduğu gibi üretim süresince ortam pH' ı 5.00' dan aşağı düşmemektedir ve bu nedenle tamponlama çözeltisi ortama eklenerek pH 5.00' da tutulmaya gerek görülmemiştir.

4.1.2.5 Substrat olarak peyniraltı suyu kullanılan üretim

Peyniraltı suyuyla *R. oryzae*' den laktik asit üretimi için planlanan statik kültür denemesi, çalkalamalı kültürde herhangi bir üreme olmaması nedeni ile gerçekleştirilmemiştir.

4.1.3 Katı kültürde laktik asit üretimi

Katı kültür fermentasyonu ile laktik asit üretiminde glukoz, nişasta, peyniraltı suyu, melas, buğday kepeği ve buğday ruşeymi gibi çeşitli karbon kaynakları ve tarımsal ürünler kullanılmıştır.

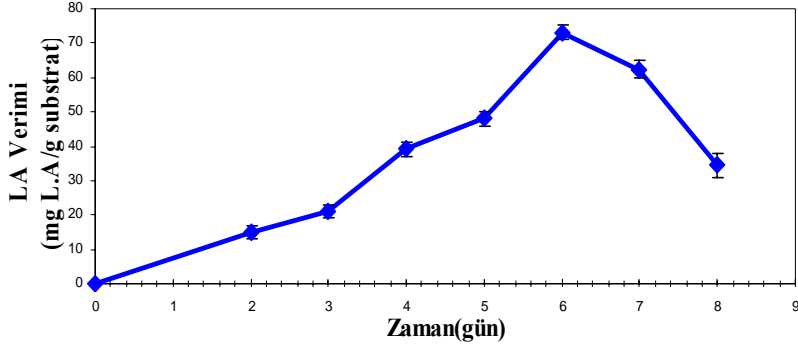
Yapılan ön denemelerde yalnızca buğday kepeği kullanıldığında laktik asit üretimi olmamıştır. Ancak fungal üreme için uygun partikül boyutu sağlaması sebebi ile buğday kepeği, diğer karbon kaynaklarına dayanak materyali olarak kullanılmıştır. Buğday ruşeym küspesinin kullanıldığı ön denemelerde ise bu substratın tek başına kullanımının uygun olmadığı görülmüştür. Buğday ruşeymi, nemlendirme sıvısı ile nemlendirildiğinde topaklaşma eğilimi göstermiş ve yapışkan bir özellik kazanmıştır, bu nedenle buğday ruşeymi küspesinin direkt olarak kullanılması durumunda tekrarlanabilir sonuç elde etmek mümkün olmamıştır. Buğday kepeği ile karıştırıldığında topaklaşma sorunu önemli derecede artmıştır. Bu nedenle daha sert bir destek materyali ile birlikte kullanılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu sorunu aşabilmek amacıyla buğday ruşeym küspesi boyutları küçültülmüş fındık kabukları ile karışım halinde laktik asit üretiminde kullanılmıştır. Fındık kabukları ile desteklenmiş bu üretimlerde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmiştir. Tüm üretimler % 65 başlangıç nem oranı, 5.5 başlangıç pH değeri ve 28 °C ortam sıcaklığında yapılmıştır. Kullanılan substratlar: buğday kepeği-nişasta, buğday kepeği-peynir altı suyu tozu, buğday kepeği-glukoz, buğday kepeği-melas ve fındık kabukları-buğday ruşeym küspesi karışımlarıdır. Bu substratlar, üretim ortamlarına % 3.5 toplam şeker içerecek şekilde eklenmişler ve zamana karşı laktik asit üretiminde kullanılmışlardır.

Denemeye alınan tüm substratlar ve elde edilen maksimum laktik asit verimleri Çizelge 4.10' da sunulmuştur.

Çizelge 4.10: Kullanılan substratların laktik asit verimleri

Substrat	Verim (mg laktik asit/g substrat)	Üretim süresi (Saat)	Verimlilik (mg LA/g substrat.saat)
Buğday kepeği+ nişasta	42.82±2.43	120	0.36
Buğday kepeği+ Peynir altı suyu tozu	68.35±2.86	120	0.57
Buğday kepeği+ Glukoz	73.18±2.84	144	0.51
Buğday kepeği+ Melas	38.80±2.67	144	0.27
Fındık kabukları+ Buğday ruşeym küspesi	36.40±2.98	144	0.25

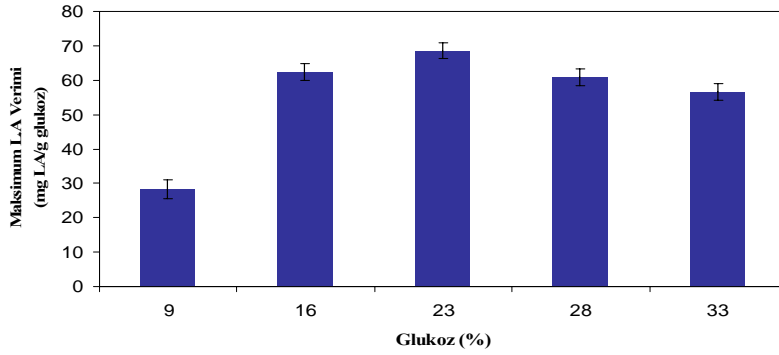
Çizelgede de görüldüğü gibi kullanılan substratlar içerisinde en yüksek laktik asit verimi glukoz bulunan üretim ortamında elde edilmiştir. Glukozu, sırasıyla peynir altı suyu tozu, nişasta, melas ve buğday ruşeym küspesi izlemektedir. Buğday kepeği-glukoz karışımı ile yapılan üretimde zamana karşı laktik asit verimi Şekil 4.9' da sunulmuştur. Elde edilen bu sonuçlara göre peynir altı suyunun kullanıldığı üretimlerde elde edilen laktik asit verimi glukoz kullanılan üretime yakın değerlerde olsa da, peynir altı suyu tozunun artan konsantrasyonlarının üretim ortamında topaklaşma sorununa yol açması nedeniyle optimum koşulların belirlenmesi denemelerine glukoz kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.9: Buğday kepeği-glukoz karışımı ile maksimum laktik asit (LA) verimlerinin zamana karşı değişimi

Değişik glukoz konsantrasyonlarının laktik asit verimlerine etkisini incelemek üzere 10 g buğday kepeği bulunan ortama sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 g glukoz ilavesi ile üretim ortamları hazırlanmış ve zamana karşı laktik asit verimleri incelenmiştir(Şekil 4.10). Üretim ortamında yer alan bu glukoz miktarları ağırlıkça sırasıyla % 9, % 16, % 23, % 28 ve % 33 glukoz konsantrasyonlarına karşılık gelmektedir.

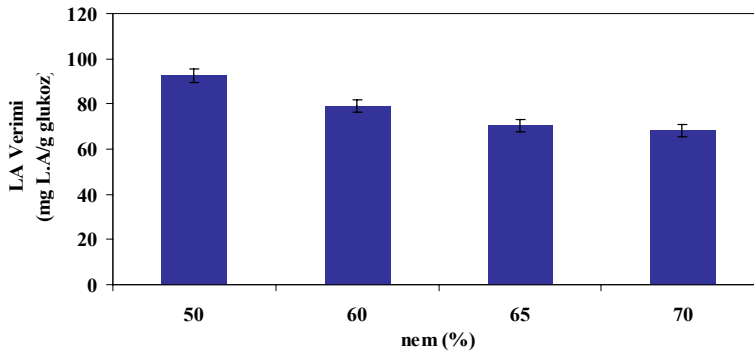
Bu üretimler sonucunda % 9 ve % 33 glukoz içeren buğday kepekli karışımlarda maksimum laktik asit verimleri 5. günde elde edilirken diğer konsantrasyonlarda üretimin 6. gününde elde edilmiştir. Maksimum verim % 23 glukoz konsantrasyonunda elde edilmiştir ($68,47 \pm 2.3$ mg LA/g substrat). Bu sebeple denemelere bu konsantrasyon kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.10: Farklı glukoz konsantrasyonlarında elde edilen maksimum laktik asit (LA) verimleri

Denemelerin substrat seçimi ve glukoz konsantrasyonlarının incelendiği aşamalarında başlangıç nem oranı % 65 olarak ayarlanmıştır. Bu aşama ise bu nem oranının altında ve üstündeki nem oranlarının üretime etkisini incelemek amacıyla sırasıyla nemlendirme sıvısının miktarı ayarlanarak %50, % 60, % 70 başlangıç nem oranında glukoz içeren üretim ortamları hazırlanmış ve laktik asit üretim verimleri incelenmiştir (Şekil 4.11).

Şekilde de gösterildiği üzere en yüksek laktik asit verimi % 50 nem oranında elde edilmiştir (92.45 mg LA/g substrat). Bu nedenle denemelere elde edilen bu nem oranında devam edilmiştir.



Şekil 4.11: Farklı başlangıç nem oranlarının laktik asit üretimine etkisi

Üretim denemelerinde %10 olarak sabit tutulan aşılama oranının değişiminin laktik asit verimi üzerine etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.11). %5, %10 ve %15 aşılama oranlarının uygulandığı üretimlerde, laktik asit veriminde bir değişiklik olmadığı, maksimum laktik asit miktarının %5 ve %10 aşılama oranlarında 6.günde, %15 aşılama oranında ise 5. günde elde edildiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.11: Farklı aşılama oranlarının laktik asit üretimine etkisi

İnokulasyon oranı (%)	Laktik asit verimi (mg/g glukoz)
5	85.12 ± 2.12
10	90.45 ± 2.34
15	88.12 ± 2.44

Yapılan tüm üretimlerde elde edilen laktik asit verimi derin kültürde elde edilen verilerle karşılaştırıldığında oldukça düşük bir seviyede olduğu görülmektedir. Derin kültürde yapılan çalışmalarda laktik asit verimleri kullanılan şeker üzerinden %70-90 arasında değişmektedir (Bulut et al., 2004; Ruengruglikit and Hang, 2003; Bai et al., 2003; Park et al., 2004). Oysa gerçekleştirdiğimiz çalışmada maksimum dönüşüm verimi % 9.25 oranında bulunmuştur (%50 nem, %23 glukoz içeren buğday kepeği-glukoz karışımında).

4.2 İmmobilize Hücrelerle Laktik Asit Üretimi

Erlenlerde immobilize haldeki *R. oryzae* hücreleriyle laktik asit üretiminin incelenmesinde, serbest hücrelerle gerçekleştirilen üretimlerde en iyi laktik asit verim ve verimliliğinin sağlandığı ağırlıkça % 10

glukozlu besi ortamı kullanılmıştır. Üretimde sırasıyla misel ve spor immobilizasyonları, farklı Na-aljinat konsantrasyonları, immobilizasyonun gerçekleştirildiği boncuk çapları, boncuk oluşumu sağlayan CaCl_2 çözeltisinin konsantrasyonları incelenmiştir. Bu denemelerin ardından ortamın glukoz konsantrasyonu değiştirilerek, mikroorganizmanın substrat konsantrasyonuna immobilize haldeki tepkisi incelenmiştir. Tüm üretimler, çalkalamalı derin kültür üretimde mikroorganizmalara sağlanan koşullarda gerçekleştirilmiştir (28 °C, 120 rpm, başlangıç pH 5.00).

4.2.1 İmmobilize misellerin üretime etkileri

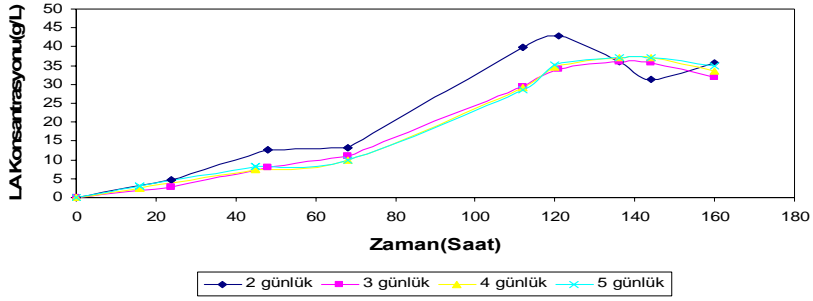
İmmobilize misellerle laktik asit üretimi ağırlıkça % 10 glukoz konsantrasyonuna sahip ortamlarda, %2 Na-aljinat konsantrasyonu ve 100mM CaCl_2 çözeltisi ile hazırlanan 3 mm çapındaki boncuklarda gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen üretimlerde 2 – 3 – 4 ve 5 günlük miseller kullanılmıştır ve birbirlerine karşı laktik asit üretimleri, verim ve verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Hücrelerin tekrar kullanılabilirliklerinin incelenmesi amacıyla, immobilize misel içeren boncuklar 5' er üretimde üst üste kullanılmışlardır.

Üretimlerden elde edilen laktik asit üretim sonuçları, verim ve verimlilik değerleri Çizelge 4.12' de, zamana karşı üretim sonuçları ise Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16' da görülmektedir. Sonuçlara göre denemede en iyi laktik asit üretimi ve verimi 2 günlük misellerle gerçekleştirilen üretimlerden 1. sinde sırasıyla 42.85 ± 0.9 g/L ve % 43 (g/g) olarak gerçekleşmiştir. En yüksek verimlilik değeri de yine 2 günlük miselli üretime aittir ve 0.35 g/L.saat olarak gerçekleşmiştir, bunun

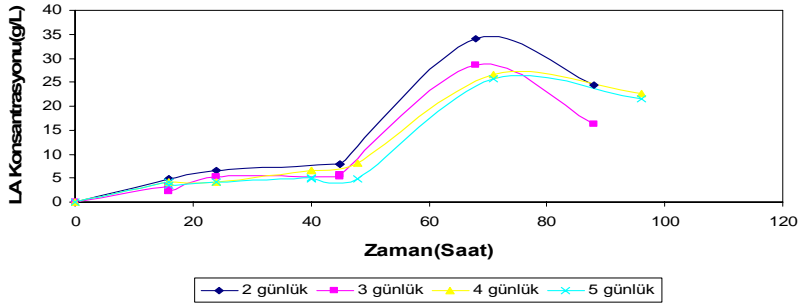
yanında 5 seri denemenin en yüksek verimliliği 2 günlük misellerle gerçekleştirilen 2. üretimde elde edilmiştir ve 0.50 g/L.saat' tir.

Çizelge 4.12: Farklı yaşlardaki misellerle gerçekleştirilen 5 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

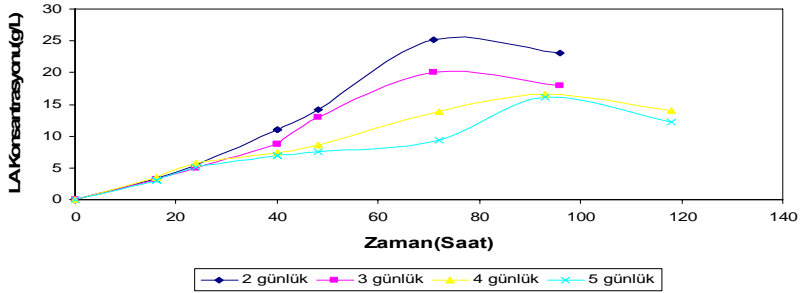
Üretim sayısı	Misel Yaşı (gün)	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
1	2	42.85±0.9	121	43	0.35
	3	35.95±0.9	136	36	0.26
	4	37.21±1.1	136	37	0.27
	5	37.07±1.0	136	37	0.27
2	2	34.12±1.1	68	34	0.50
	3	28.66±1.1	68	29	0.42
	4	26.57±1.3	71	27	0.37
	5	25.81±1.2	71	26	0.36
3	2	25.17±1.0	71	25	0.35
	3	20.09±1.1	71	20	0.28
	4	16.62±1.1	93	17	0.18
	5	16.07±1.2	93	16	0.17
4	2	19.13±1.2	93	19	0.21
	3	15.15±1.2	93	15	0.16
	4	15.91±1.0	113	16	0.14
	5	15.45±1.0	113	15	0.14
5	2	11.25±1.1	137	11	0.08
	3	10.67±1.2	137	11	0.08
	4	9.78±1.2	144	10	0.07
	5	9.45±1.2	144	9	0.07



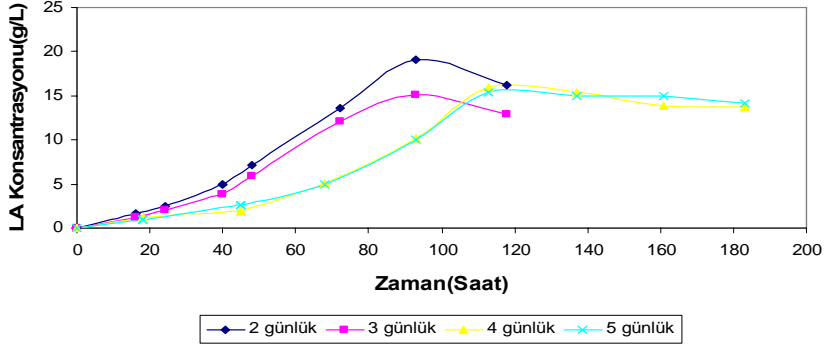
Şekil 4.12: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim)



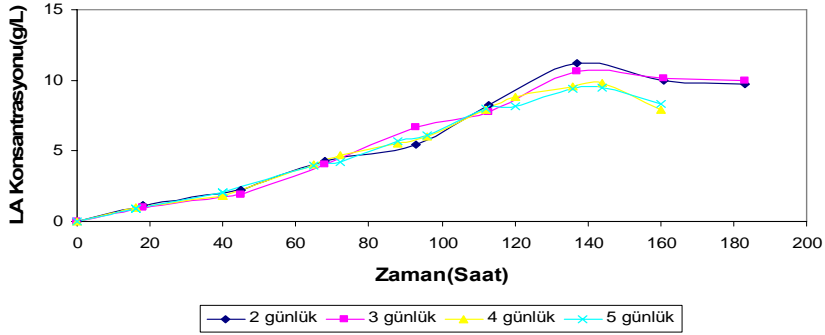
Şekil 4.13: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim)



Şekil 4.14: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim)



Şekil 4.15: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (4. Üretim)



Şekil 4.16: İmmobilize misellerle gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (5. Üretim)

4.2.2 İmmobilize sporların üretime etkileri

İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen laktik asit üretimi de miselli üretime benzer şekilde ağırlıkça % 10 glukoz konsantrasyonuna sahip ortamlarda, %2 Na-aljinat konsantrasyonu ve 100 mM CaCl₂ çözeltisi ile hazırlanan 3 mm çapındaki boncuklarda gerçekleştirilmiştir.

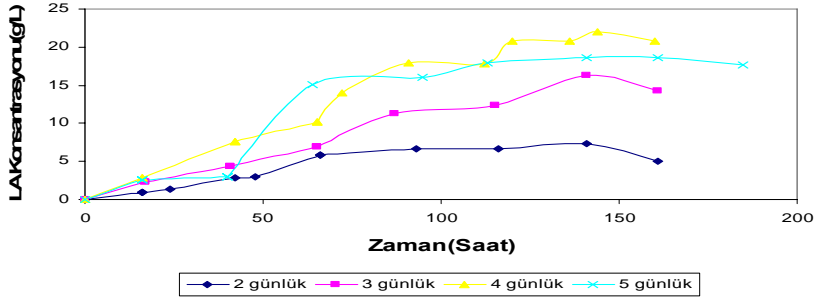
Üretimlerde, $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $0,5 \times 10^5$ ve $1,2 \times 10^5$ kob/ml spor konsantrasyonlarına (sırasıyla 2, 3, 4 ve 5 günde elde edilen spor konsantrasyonları) sahip inokulumlar birbirlerine karşı laktik asit üretimleri, verim ve verimlilikleri açısından karşılaştırılmıştır. Hücrelerin

tekrar kullanılabilirliklerinin incelenmesi amacıyla, immobilize spor içeren boncuklar, miselli boncuklar gibi 5' er üretimde üst üste kullanılmışlardır.

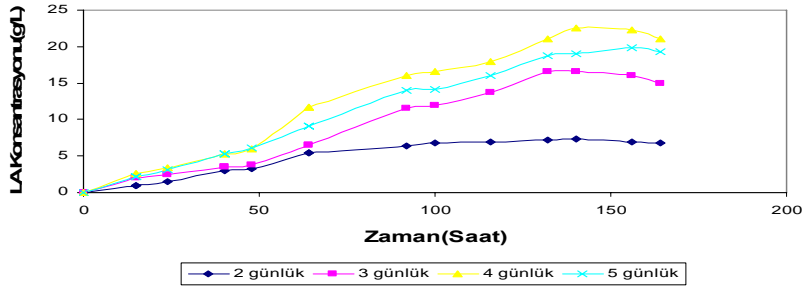
Üretimlerden elde edilen laktik asit üretim sonuçları, verim ve verimlilik değerleri Çizelge 4.13' te, zamana karşı üretim sonuçları ise Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21' de görülmektedir. Sonuçlara göre denemede en yüksek ürün konsantrasyonu ve verim $0,5 \times 10^5$ kob/ml sayıdaki sporla gerçekleştirilen üretimlerde elde edilmiştir ve ilk üretimlerde elde edilen en yüksek laktik asit konsantrasyonu 22.04 ± 1.1 g/L, verim ve verimlilik değerleri ise sırasıyla % 22 (g/g) ve 0.15g/L. saat olarak gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.13: Farklı yaşlardaki sporlarla gerçekleştirilen 5 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

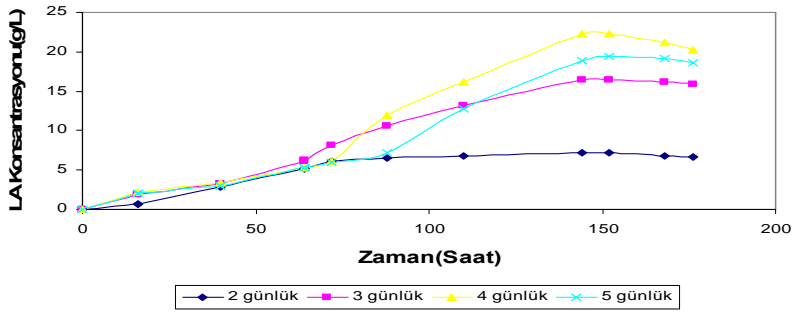
Üretim sayısı	Spor Yaşı (gün)	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim	Verimlilik (g/L.sa)
1	2	7.3±1.0	141	0.07	0.05
	3	16.34±1.0	141	0.16	0.12
	4	22.04±1.1	144	0.22	0.15
	5	18.68±1.1	141	0.19	0.13
2	2	7.33±1.1	140	0.07	0.05
	3	16.64±1.1	140	0.17	0.12
	4	22.56±1.0	140	0.23	0.16
	5	19.88±1.2	156	0.20	0.13
3	2	7.25±1.1	152	0.07	0.05
	3	16.44±1.1	144	0.16	0.11
	4	23.34±1.2	144	0.23	0.16
	5	19.45±1.2	152	0.19	0.13
4	2	7.54±1.3	152	0.08	0.05
	3	16.56±1.1	160	0.17	0.10
	4	22.49±1.0	152	0.22	0.15
	5	20.27±1.0	152	0.20	0.13
5	2	7.41±0.9	160	0.07	0.05
	3	16.11±1.0	160	0.16	0.10
	4	22.32±1.1	160	0.22	0.14
	5	20.01±1.1	160	0.20	0.13



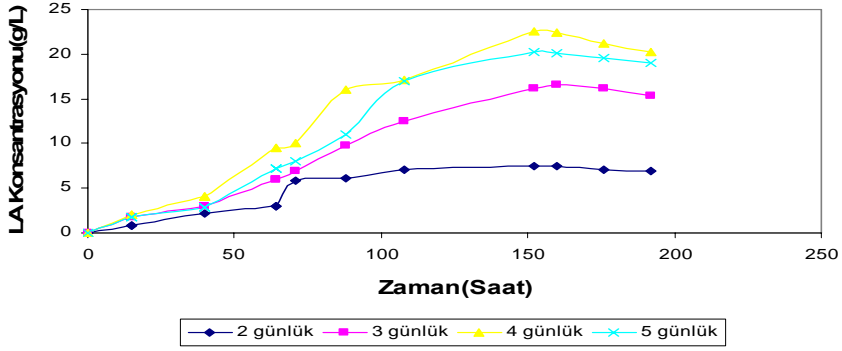
Şekil 4.17:İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim)



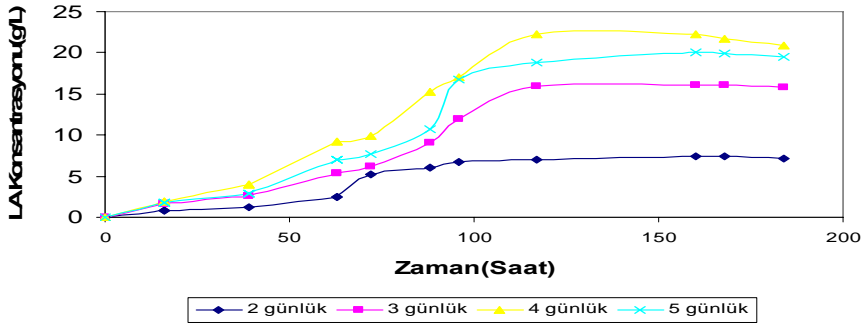
Şekil 4.18:İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim)



Şekil 4.19:İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim)



Şekil 4.20:İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (4. Üretim)



Şekil 4.21:İmmobilize sporlarla gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (5. Üretim)

Gerçekleştirilen miselli ve sporlu immobilizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlara göre en yüksek laktik asit konsantrasyonu, verim ve verimlilik değerleri 2 günlük misellerin kullanıldıkları çalışmada elde edilmiştir. Bu nedenle, hücre immobilizasyon koşullarının incelenmesi için yapılan diğer denemelerde 2 günlük miseller kullanılmıştır.

4.2.3 Na-Aljinat konsantrasyonunun üretime etkileri

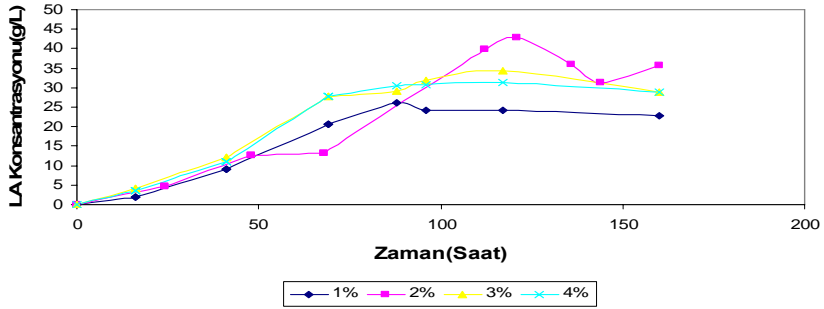
R. oryzae hücreleri ile immobilize halde laktik asit üretiminin incelenmesinde misel kullanımının daha olumlu sonuçlar verdiği

görüldükten sonra uygun Na-Aljinat konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle 2 günlük hücre miselleri ile hazırlanan ve 100 mM CaCl₂ çözeltisine damlatılarak hazırlanan % 1 - 2 - 3 ve 4 Na-aljinat konsantrasyonuna sahip 3 mm çapındaki boncuklar, laktik asit üretimi için ağırlıkça % 10 glukoz konsantrasyonuna sahip ortamlarda inkübe edilmişlerdir. Gerçekleştirilen üretimlerde, farklı Na-Aljinat konsantrasyonu ile hazırlanan boncuklara immobilize halde üretimde kullanılan hücre misellerinin birbirlerine karşı laktik asit üretimleri, verim ve verimlilik açısından karşılaştırılmıştır. Hücrelerin tekrar kullanılabilirliklerinin incelenmesi amacıyla, immobilize misel içeren boncuklar 5'er üretimde üst üste kullanılmışlardır.

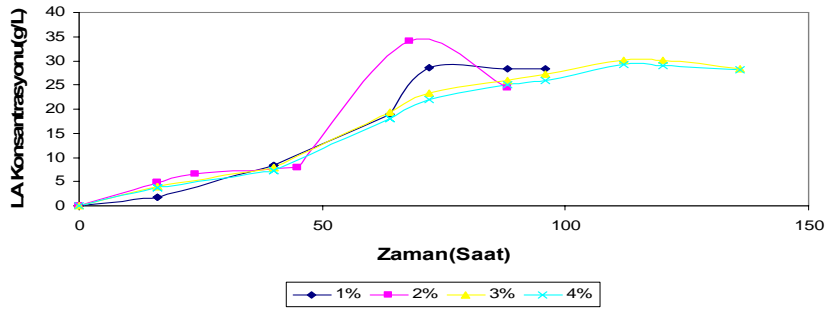
Üretimlerden elde edilen laktik asit üretim sonuçları, verim ve verimlilik değerleri Çizelge 4.14' te, zamana karşı üretim sonuçları ise Şekil 4.22, 4.23, 4.24, 4.25 ve 4.26' da görülmektedir. Sonuçlara göre denemede en yüksek laktik asit miktarı, verim ve verimlilik değerleri % 2 Na-aljinat konsantrasyonu ile gerçekleştirilen üretimde sırasıyla 42.85 ± 0.9 g/L, % 43 (g/g) ve 0.35 g/L.saat olarak gerçekleşmiştir, bunun yanında 5 seri denemenin en yüksek verimliliği % 2 Na-aljinat konsantrasyonu ile gerçekleştirilen 2. üretimde elde edilmiştir ve % 50 (g/g)' dir. Üretimlerden elde edilen sonuçlara göre en yüksek ürün konsantrasyonu, verim ve verimlilik değerlerine sahip olan % 2 Na-Aljinat konsantrasyonu, hücre immobilizasyonuna farklı değişkenlerin etkilerinin incelendiği diğer basamaklarda kullanılmıştır.

Çizelge 4.14: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilen 5 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

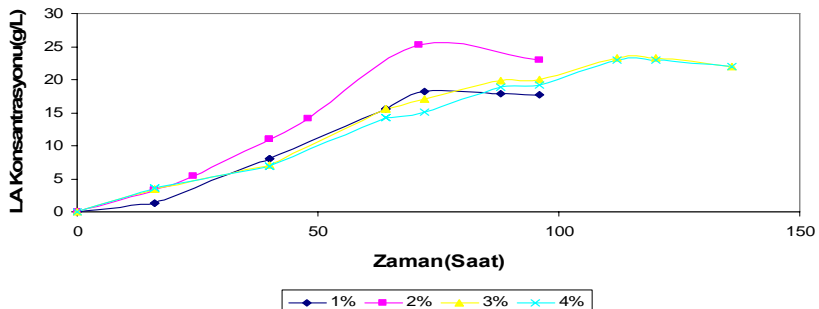
Üretim sayısı	Na-Aljinat Kons.(%)	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.saat)
1	1	26.21±1.0	88	26	0.30
	2	42.85±0.9	121	43	0.35
	3	34.24±0.8	117	34	0.29
	4	31.38±0.9	117	31	0.27
2	1	28.56±1.1	72	29	0.40
	2	34.12±1.1	68	34	0.50
	3	30.11±1.1	112	30	0.27
	4	29.34±1.1	112	29	0.26
3	1	18.21±1.2	72	18	0.25
	2	25.17±1.4	71	25	0.35
	3	23.31±1.2	112	23	0.21
	4	23.02±1.2	112	23	0.21
4	1	16.49±1.2	69	16	0.24
	2	19.13±1.1	93	19	0.21
	3	17.57±1.1	112	18	0.16
	4	17.13±1.1	120	17	0.14
5	1	19.13±1.4	92	19	0.21
	2	11.25±1.3	137	11	0.08
	3	16.87±1.0	120	17	0.14
	4	18.04±1.0	136	18	0.13



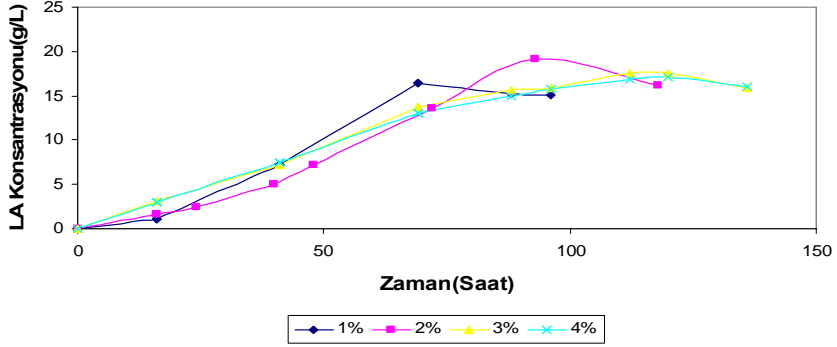
Şekil 4.22: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim)



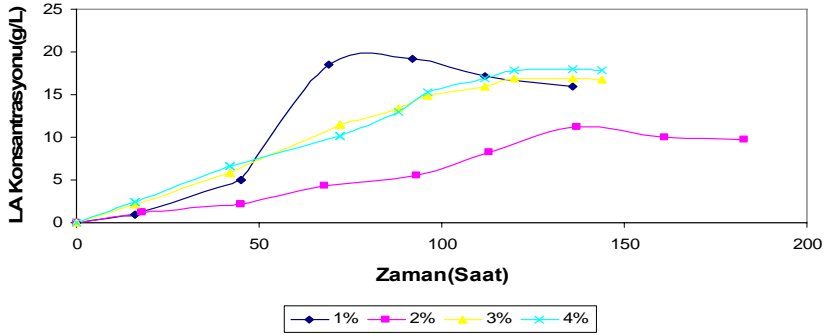
Şekil 4.23: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim)



Şekil 4.24: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim)



Şekil 4.25: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (4. Üretim)



Şekil 4.26: Farklı Na-Aljinat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (5. Üretim)

4.2.4 Boncuk büyüklüğünün üretime etkileri

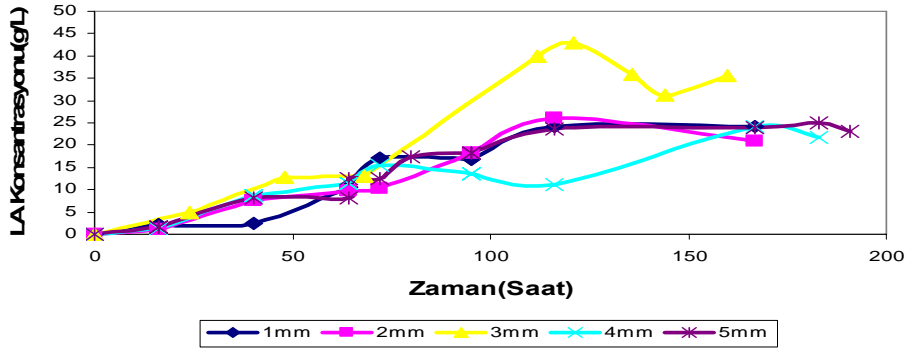
İmmobilize *R. oryzae* hücreleri ile laktik asit üretiminin incelenmesinde 2 günlük misellerin ve ağırlıkça %2 Na-Aljinat konsantrasyonunun uygun olduğu belirlendikten sonra uygun boncuk büyüklüğü belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle 2 günlük hücre miselleri ile hazırlanan ve 100 mM CaCl_2 çözeltisine damlatılarak elde edilen % 2 Na-aljinat konsantrasyonuna sahip 1 - 2 - 3 - 4 - 5 mm çapındaki boncuklar, laktik asit üretimi için ağırlıkça % 10 glukoz konsantrasyonuna sahip ortamlarda inkübe edilmişlerdir. Gerçekleştirilen üretimlerde, farklı

büyükliklerdeki boncuklara immobilize halde üretimde kullanılan hücre miselleri laktik asit üretimi, verim ve verimlilik açısından karşılaştırılmıştır. Hücrelerin tekrar kullanılabilirliklerinin incelenmesi amacıyla boncuklar 3' er üretimde üst üste kullanılmışlardır.

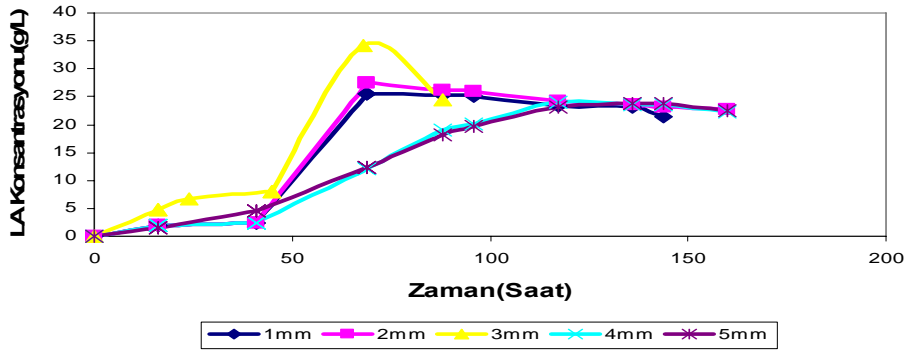
Elde edilen laktik asit miktarı, verim ve verimlilik değerleri Çizelge 4.15' te, zamana karşı üretim sonuçları Şekil 4.27, 4.28 ve 4.29' da görülmektedir. Sonuçlara göre denemede en yüksek laktik asit miktarı, verim ve verimlilik değerleri 3 mm' lik boncuklarla gerçekleştirilen üretimde sırasıyla 42.85 ± 0.9 g/L, % 43 (g/g) ve 0.35 g/L.saat olarak gerçekleşmiştir. Yapılan 3 seri denemenin en iyi verimliliği ise 3mm' lik boncuklarla gerçekleştirilen 2. üretimde elde edilmiştir ve 0.50 g/L.saat' tir. Üretimlerden elde edilen sonuçlara göre en yüksek laktik asit konsantrasyonu, verim ve verimlilik değerlerine sahip olan 3 mm' lik boncuk büyüklüğü, hücre immobilizasyon parametrelerinin incelendiği diğer aşamalarda kullanılmıştır.

Çizelge 4.15: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen 3 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

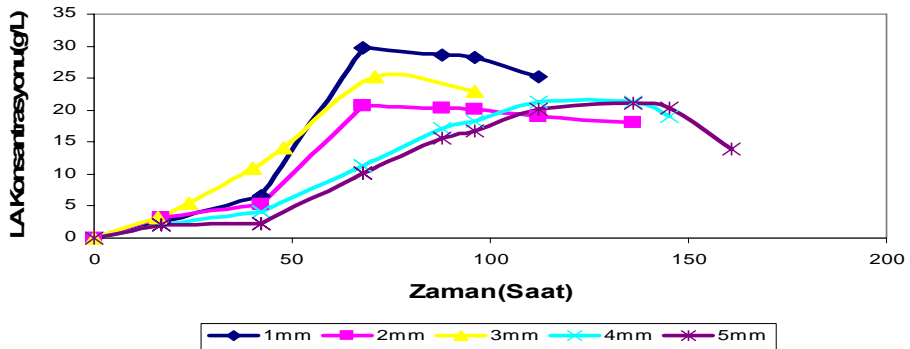
Üretim sayısı	Boncuk Çapı (mm)	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
1	1	24.32±1.1	116	24	0.21
	2	26.09±1.0	116	26	0.22
	3	42.85±1.0	121	43	0.35
	4	24.29±1.1	167	24	0.15
	5	24.93±1.1	183	25	0.14
2	1	25.45±1.4	69	25	0.37
	2	27.54±1.4	69	28	0.40
	3	34.12±1.0	68	34	0.50
	4	24.01±1.1	117	24	0.21
	5	23.84±1.0	136	24	0.18
3	1	29.76±1.0	68	30	0.44
	2	20.67±0.9	68	21	0.30
	3	25.17±0.9	71	25	0.35
	4	21.32±1.2	112	21	0.19
	5	21.01±1.1	136	21	0.15



Şekil 4.27: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (1. Üretim)



Şekil 4.28: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (2. Üretim)



Şekil 4.29: Farklı boncuk büyüklükleri ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları (3. Üretim)

4.2.5 CaCl₂ konsantrasyonunun üretime etkileri

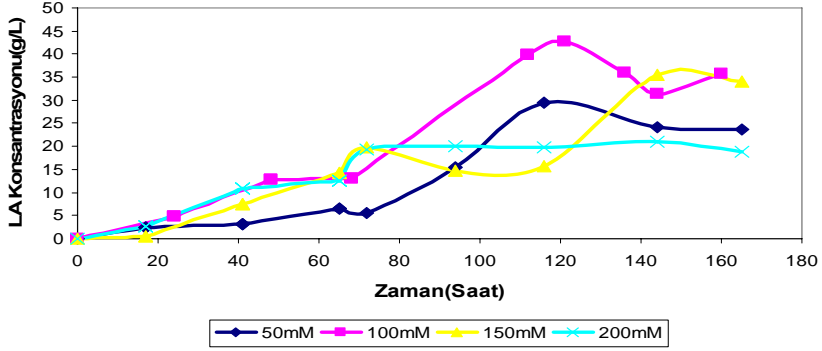
Denemeler sonucu 2 günlük miseller, ağırlıkça % 2 Na-Aljinat konsantrasyonu ve 3 mm boncuk çapının en verimli olduğu bulunduktan sonra CaCl₂ çözeltisi konsantrasyonu, immobilize *R. oryzae* ile laktik asit üretiminin incelenmesinde denenmiştir. Bu nedenle 2 günlük hücre miselleri ile hazırlanan ve % 2 Na-Aljinat konsantrasyonuna sahip 3 mm çapındaki boncuklar, 50 – 100 – 150 ve 200 mM CaCl₂ çözeltisine damlatılarak elde edilmiş ve laktik asit üretimi için ağırlıkça % 10 glukoz konsantrasyonuna sahip ortamlarda inkübe edilmişlerdir. Gerçekleştirilen üretimlerde, farklı konsantrasyondaki CaCl₂ çözeltisi ile hazırlanan boncuklarda immobilize edilmiş hücre misellerinin laktik asit üretimleri, verim ve verimlilik açısından karşılaştırılmıştır. Hücrelerin tekrar kullanılabilirliklerinin incelenmesi amacıyla boncuklar 2' şer üretimde üst üste kullanılmışlardır.

Denemelerden elde edilen laktik asit üretim sonuçları, verim ve verimlilik değerleri Çizelge 4.16' da, zamana karşı üretim sonuçları ise Şekil 4.30 ve 4.31' de görülmektedir. Sonuçlara göre denemede en iyi üretim miktarı, verim ve verimlilik değerleri 100 mM' lık CaCl₂ çözeltisinde oluşan boncuklarla gerçekleştirilen üretimde sırasıyla 42.85 ± 0.9 g/L, % 43 (g/g) ve 0.35 g/L.saat olarak gerçekleşmiştir. Uygulanan 2 seri denemenin en yüksek verimliliği ise 100 mM' lık çözeltide oluşan boncuklarla gerçekleştirilen 2. üretimde elde edilmiştir ve 0.50 g/L.saat' tir. Üretimlerden elde edilen sonuçlara göre, en yüksek laktik asit konsantrasyonu, verim ve verimlilik değerlerine 100 mM' lık çözeltiyle gerçekleştirilen üretimlerde ulaşılmıştır. Elde edilen bu veriler, immobilize

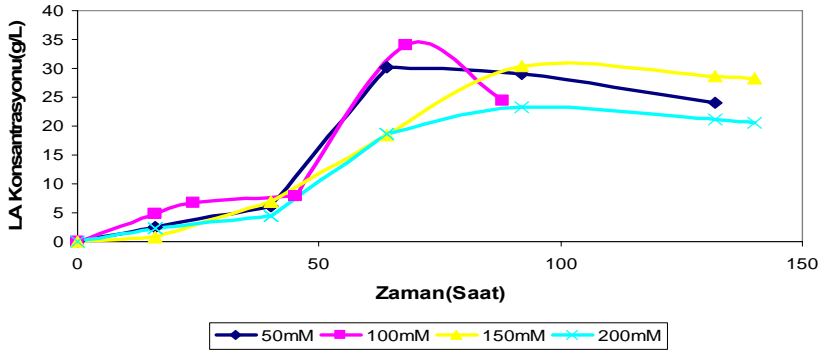
hücrelerin farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarındaki davranışlarının denendiği üretim setinde kullanılmıştır.

Çizelge 4.16: Farklı CaCl₂ çözeltisi ile gerçekleştirilen 2 seri üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

Üretim sayısı	CaCl ₂ Çözeltisi Kons. (mM)	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
1	50	29.56±1,8	116	30	0.25
	100	42.85±1.0	121	43	0.35
	150	35.49±1.0	144	35	0.25
	200	20.97±0.7	144	21	0.15
2	50	30.11±2.2	64	30	0.47
	100	34.12±1.0	68	34	0.50
	150	30.34±1.0	92	30	0.33
	200	23.34±0.9	92	23	0.25



Şekil 4.30: Farklı CaCl₂ damlatma çözeltisi ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları(1. Üretim)



Şekil 4.31: Farklı CaCl₂ damlatma çözeltisi ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları(2. Üretim)

4.2.6 Glukoz konsantrasyonunun üretime etkileri

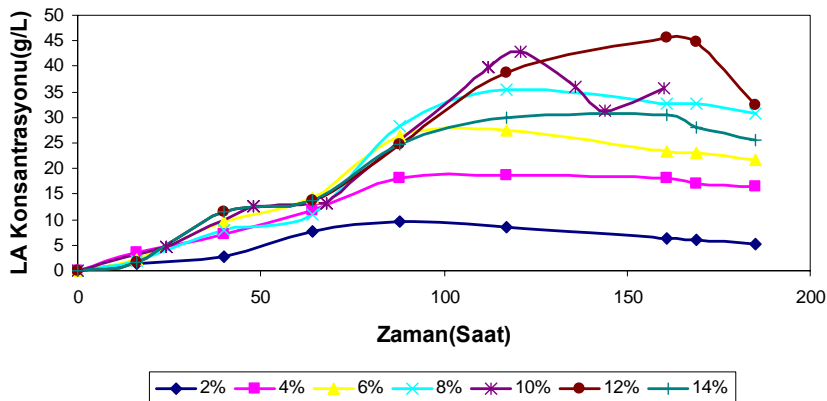
İmmobilize üretimde son deneme olarak, karbon kaynağı konsantrasyonuna immobilize hücrelerin tepkilerini ölçmek amacıyla farklı başlangıç glukoz konsantrasyonlarının laktik asit üretimine etkileri denenmiştir. Bu nedenle önceki denemelerde en iyi sonucu veren 2 günlük hücre miselleri ile hazırlanan ve % 2 Na-Aljinat, 100 mM CaCl₂ çözeltisine damlatılarak elde edilen 3 mm çapındaki boncuklar, laktik asit

üretimi için ağırlıkça % 2 – 4 – 6 – 8 – 10 – 12 – 14 başlangıç glukoz konsantrasyonuna sahip ortamlarda inkübe edilmişlerdir.

Elde edilen laktik asit konsantrasyonu, verim ve verimlilik değerleri Çizelge 4.17’ de, zamana karşı üretim sonuçları ise Şekil 4.32’ de görülmektedir.

Çizelge 4.17: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimde elde edilen en yüksek LA konsantrasyonu, üretim zamanı, verim ve verimlilik değerleri

Üretim sayısı	Ağırlıkça % Substrat Kons.	Üretilen En Yüksek LA Miktarı (g/L)	Zaman (Saat)	Verim (%)	Verimlilik (g/L.sa)
1	2	9.55±1.4	88	48	0.11
	4	18.79±1.2	117	47	0.16
	6	27.41±1.2	117	46	0.23
	8	35.34±1.0	117	44	0.30
	10	42.85±1.0	121	43	0.35
	12	45.55±1.0	161	38	0.28
	14	30.38±1.1	161	22	0.19



Şekil 4.32: Farklı başlangıç glukoz konsantrasyonları ile gerçekleştirilen üretimlerde zamanla üretilen laktik asit miktarları

Sonuçlara göre denemede en yüksek ürün konsantrasyonu ve verimlilik değeri % 10 glukoz konsantrasyonu içeren ortamda sırasıyla 42.85 ± 0.9 g/L, ve 0.35 g/L.saat olarak gerçekleşmiştir, en yüksek verim değeri ise % 2 glukoz konsantrasyonunda % 48 (g/g) olarak elde edilmiştir, ancak üretilen laktik asit konsantrasyonu ve verimliliği açısından % 10 başlangıç glukoz konsantrasyonu daha yüksek olduğu için uygun ortamın % 10 glukoz konsantrasyonuna sahip olan ortam olduğu belirlenmiştir.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalkalamalı kültür, statik kültür ve katı kültür çalışmalarında mikroorganizmanın beş farklı karbon kaynağında (glukoz, nişasta, melas, peyniraltı suyu ve buğday ruşeymi) laktik asit üretimleri karşılaştırılmıştır.

Çalkalamalı kültürde laktik asit üretiminin ortam koşullarıyla ilgili literatürde yeterli bilgi bulunması nedeniyle çalışmada ortam koşulları sabit tutularak farklı substratların ve bunların ortamdaki konsantrasyonlarının üretime etkileri incelenmeye çalışılmıştır. Deneme sonucunda en yüksek laktik asit konsantrasyonuna, %12 başlangıç glukoz konsantrasyonu ile gerçekleştirilen üretimde ulaşılmıştır (90.33 ± 0.8 g/L). Üretimin verim ve verimlilik değerleri sırasıyla, %75 (g/g) ve 0,67 g/L.saat olarak elde edilmiştir. En yüksek verim ve verimlilik değerleri ise % 10 başlangıç glukoz konsantrasyonu ile gerçekleştirilen üretimde elde edilmiştir ve sırasıyla % 78 (g/g) ve 0.87 g/L.saat' tir. Elde edilen verim ve verimlilik değerlerinin yüksek oluşu nedeniyle en uygun ortamın % 10 başlangıç glukoz konsantrasyonuna sahip ortam olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan diğer ortamlardan glukozlu üretimde elde edilen değerlere en yakın olanı nişastalı ortam olmuştur (50.99 ± 1.4 g/L laktik asit konsantrasyonu, % 51 (g/g) verim ve 0.34 g/L.saat verimlilik). Bu durumun nedeni olarak glukozun, mikroorganizmalar için en kolay metabolize edilebilen karbon kaynağı olması gösterilmiştir.

Sentetik ortam içeriklerinin yanında tarımsal atık ya da başka üretim atıkları da değerlendirilmeye çalışılmıştır. Literatürde bugüne kadar denenmediği görülen buğday ruşeym küspesi de çalışmada denenmiştir. Ancak yüksek su tutma kapasitesi ve nişasta içeriği, üretim ortamında

viskozite artışına neden olarak üretimi zorlaştırmıştır. Elde edilen üretim sonuçlarına bakıldığında en yüksek laktik asit üretimi ağırlıkça %12 ruşeym konsantrasyonunda 12.38 ± 1.8 g/L olarak elde edilmiştir ve verimi % 10 (g/g), verimliliği ise 0.07 g/L.saat' tir. En yüksek verim değeri ise % 2 ruşeym konsantrasyonunda %23 (g/g) olarak bulunmuştur ve glukozlu üretim sonuçlarının verimde % 15-30'u kadardır. Hammaddenin bir kimyasal ya da biyokimyasal bir önışlemeden geçirilerek yalnız şeker içeriğinin üretimde değerlendirilmesinin daha doğru olacağı düşünülmektedir.

Bakteriyel yolla laktik asit üretiminde sıklıkla kullanılan peyniraltı suyu da üretimde denenmiştir. Ancak ortamda fungus gelişimi gözlenmemekle beraber laktik asit üretimi de gerçekleşmemiştir.

Üretimde kullanılan bir diğer üretim atığı hammadde de melastır. Üretimden ayrılan ham melas laboratuvarında önışleme tabi tutularak ortamda kullanılmıştır. Üretim sonucunda en yüksek laktik asit miktarı 33.21 ± 1.1 g/L, en yüksek verim ve verimlilik ise sırasıyla % 33 (g/g) ve 0.21 g/L.saat bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, ruşeym ve peyniraltı suyuna oranla daha kullanışlı olduğunu gösterse de, sentetik ortamlara ve literatürdeki melaslı denemelere(Bulut et al.,2004) göre oldukça düşüktür. Bunun nedeni olarak uygulanan önışlemin substratın kullanımı için yeterli gelmediği düşünülmüştür.

Literatürde derin kültür kapsamında çok yaygın olmadan incelenen statik kültüre de çalışmada geniş yer ayrılmıştır. Çalkalamalı kültürle aynı hazırlanan ortamlar sadece çalkalamasız inkübatörde üretime alınmışlardır. Deneme sonunda sonuçlar çalkalamalı kültürle aynı yönde

olmakla birlikte elde edilen değerler tüm üretim setlerinde çalkalamalı kültürün % 50-70' i kadar laktik asit üretimi, verim ve verimlilik değerlerine ulaşılabildiğini göstermektedir. Statik kültürün büyük ölçüğe aktarımının zorluğu ve önemli kütle transfer kısıtları, üretim için çalkalamalı kültür kadar verimli bir sistem olmadığını ve immobilize üretimler için çok uygun olmadığını göstermektedir.

Literatürde birtakım avantajları ile derin kültüre önemli bir alternatif olabileceği düşünülen katı kültürde, laktik asit üretimi için uygun ortam koşullarının belirlenmesine çalışılmıştır. Derin kültürde olduğu kadar üretim koşulları çok tanımlanmış olmadığı için katı kültürde, substrat ve ortamdaki konsantrasyonunun yanında, ortam nemliliği ve inokulum oranı da denenerek belirlenmiştir. Denemeler sonunda yine derin kültür üretimleri gibi glukoz içeren ortam (ağırlıkça %23 glukoz + buğday kepeği) en yüksek sonucu vermiştir (92.45 mg LA/g substrat). Denemede en uygun nem oranı %50 bulunurken, inokulumun üretime önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Derin kültürle karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlara göre katı kültürün laktik asit üretimi için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Denenen 3 farklı üretim metodundan en yüksek değerleri veren ağırlıkça %10 glukozlu derin kültür ortam çalkalamalı olarak immobilizasyon denemelerinde kullanılmıştır.

İmmobilizasyon çalışmasında da ortam koşulları sabit tutularak immobilizasyon materyali ve hücre ile ilgili denemeler gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla misel yaşı ve spor konsantrasyonlarının etkileri, Na-Aljinat konsantrasyonu, boncuk büyüklüğü, CaCl₂ konsantrasyonu ve başlangıç

glukoz konsantrasyonunun üretime etkileri incelenmiştir. Tüm immobilizasyon denemeleri sonucu en yüksek değerler, 2 günlük misellerle, %2 Na-Aljinat konsantrasyonunda, 100mM' lık CaCl_2 çözeltisine damlatılarak elde edilen 3 mm' lik boncuklar kullanılarak, ağırlıkça %10 glukoz içeren ortamlarda elde edilmiştir (42.85 ± 0.9 g/L laktik asit konsantrasyonu, % 43 (g/g) verim ve 0.35 g/L.saat verimlilik).

Üretim sırasında düşük Na-Aljinat konsantrasyonunda (ağırlıkça %1) ve küçük boncuklarda patlamalar görülmüştür. Bunun nedeni olarak boncuk çapı ve Na-Aljinat konsantrasyonunun ortamda kütle transfer kısıtı yaratması ve düşük çap ve Na-Aljinat konsantrasyonu değerlerinde azalan bu kısıtlar nedeniyle mikroorganizmanın daha çabuk gelişip boncuklara zarar verdiği düşünülmüştür. Yüksek Na-Aljinat konsantrasyonu ve büyük boncuklarda bu sorun görülmezken, bu üretim setlerinde ise daha yavaş laktik asit üretimi gözlenmiştir.

İmmobilize üretimlerden elde edilen üretim değerleri literatürle karşılaştırıldığında erlen denemelerine oranla yüksek olmasına rağmen özellikle biyoreaktör denemelerinde daha yüksek değerlerin de elde edildiği görülmüştür.

Bu çalışmada, *Rhizopus oryzae* fungusunun 4 farklı üretim sistemindeki laktik asit üretim performansı incelenmiş ve önemli ölçüde veri elde edilmiştir. Fungusun yüksek üreme hızının statik kültürde değerlendirilmesi ve bunun için farklı substratlar yanında ticari sitrik asit üretiminin gerçekleştirildiği tepsili sistemlerde üretim denemelerinin gerçekleştirilmesi faydalı olacaktır. Bunun yanında immobilizasyon veriminin artırılması da Ca-aljinat immobilizasyonunda gerçekleştirilecek

optimizasyon işlemlerinin yanı sıra farklı immobilizasyon işlemlerinin denenmesi ile mümkün olabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdel-Naby, M., Mok, C. and Lee, C., (1992), Production of organic acids from enzymatic hydrolyzate of starch by immobilized lactic acid bacteria, UNIDO Proceedings, Korea, 227-243.

Adıyaman Koltuksuz, T., (2007), Doktora Tezi, Tarımda biyolojik savaşta kullanılabilecek biyopreparat formülasyonlarının büyük ölçekte üretilmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji AD, S 62

Aeschlimann, A. and von Stockar, U., (1989), The production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*, Biotechnol Lett 11: 195–200.

Åkerberg, C., Hofvendahl, K., Zacchi, G., Hahn-Hägerdal, B., (1998), Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis ssp lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 682-690.

Anuradha, R., Suresh, A.K., Venkatesh, K.V., (1999), Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid, Process Biochem; 35:367–75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Archana, A. and Satyanarayana, T., (1997), Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid state-fermentation, Enzyme and Microbial Technology, 21: 12-17.

Arica, M.Y., Kacar, Y., Genc, O., (2001), Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution, Biores. Technol. 80, 121–129.

Babu, K.R. and Satyanarayana, T., (1995), α -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation, Process Biochemistry 30 (4) : 305-309.

Bai, D-M., Jia, M-Z., Zhao, X-M., Ban, R., Shen, F., Li, X-G., Xu, S-M., (2003), L-(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R 1021 in a stirred tank reactor, Chemical Engineering Science, 58 785-791.

Baker, B.P., (1979), The availability, composition and properties of cane molasses, 113-127, Symposium on Problems with Molasses in the Yeast Industry, Sinda, E. and Parkkinen E. (Eds.), 127p

Barton-Wright, E.C., (1952), The microbiological assay of vitamin B complex and amino acids, Sir Isaac Pitman and Son Ltd., London.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

Beyatlı, Y. ve Aslım, B., (1990), *Candida tropicalis* ve *Kluyveromyces lactis* mayalarının peynir altı suyunda üreme durumları, Kükem dergisi,13(12):43-50.

Brock, T.D. and Madigan, M.T., (1991), *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, P 847.

Buchta, K., (1983), *Lactic Acid*, in Rehm H.J. “Biotechnology.” Germany: VCH Verlag. 3. 409-417.

Bulut, Ş., (2001), *Rhizopus oryzae*’ den laktik asit üretimi Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Bulut, Ş., Elibol, M., Özer, D., (2004), *Effect of different carbon sources on I(+)- lactic acid production by Rhizopus oryzae*, Biochem. Eng. J. 21: 33–37.

Burrows, S., (1970), *Baker’s yeast*, 365-369, The Yeasts, Rose A H. and Harrison J S.(Eds), Academic Press, London and New York.

Campbell-Platt, G., (1994), *Fermented foods – a world perspective*, Food Research International, 27, 253–257.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Cannel, E. and Young, M., (1980), Solid-state fermentation systems, Process Biochemistry, 2-28.

Chem systems reports., (2002), Biotech routes to lactic acid/polylactic acid, Process Evaluation/Research Planning (PERP) Program; 2002 (June).

Cheng, P., Mueller, R.E., Jaeger, S., Baijpai, R. and Iannotti, E.L., (1991), Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*, Journal of Industrial Microbiology, 7:27-34

Chiarini, L., Mara, L. and Tabacchioni, S., (1992), Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*, Appl.Microbiol.Biotechnol., 36(4):461-464

Datta, R. and Henry, M., (2006), Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies- a review, J. Chem. Technol. Biotechnol. 81: 1119–1129.

Desgranges, C. and Durand, A., (1990), Effect of pCO₂ on growth, conidiation and enzyme production in solid state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS, Enzyme and Microbial Technology, 12: 546-551.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

De Vries, W., Kapteijn, W.M.C., Van Der Beek, E.G. and Stouthamer, A.H., (1970), Molar growth yield and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch culture and in continuous cultures, *J. Gen. Microbiol.* 63, 33–345.

Domínguez, J. M., Vázquez, M., (1999), Effect of the operational conditions on the l-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*, *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol. 2, No. 3, pp. 113-118.

Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M. and Desgranges, C., (1993), Solid state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant, *Biotechnological Advances*, 11: 591-597.

Efremenko, E.N., Spiricheva, O.V., Veremeenko, D.V., Baibak, A.V. and Lozinsky, V.I., (2006), L(+)-Lactic Acid Production Using Poly(vinyl alcohol)-cryogel- entrapped *Rhizopus oryzae* Fungal Cells, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81 (4), 519.

Flickinger, M.C. and Drew, S.W., (1999), *The encyclopedia of bioprocess technology : fermentation, biocatalysis, and bioseparation*, John Wiley & Sons, Inc. New York / Chichester / Weinheim / Brisbane / Singapore / Toronto P 2407- 2462

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ganguly, R., Dwivedi, P., Singh, R.P., (2007), Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10, Bioresource Technology 98: 1246–1251

Garvie, E.I., (1980), Bacterial lactate dehydrogenases, Microbiol. Res. 44, 106–139.

Gessesse, A. and Mamo, G., (1999), High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid state fermentation, Enzyme and Microbial Technology, 25: 68-72.

Göksungur, Y., (1998), Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova/İzmir.

Haltrich, D., Preiß, M. and Steiner, W., (1994), Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*, Enzyme and Microbial Technology, 15: 854-860.

Hamamci, H. and Ryu, D.D.Y., (1994), Production of l(+)-lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae*, Appl. Biochem. Biotechnol. 44: 125–127.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

Hang, Y.D., Hamamci, H., Woodams, E., (1989), Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels, Biotechnol Lett 11:119–120.

Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., (2000), Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, Enzyme Microb. Technology; 26:87-107.

Holten, C.H., Muller, A. and Rehbinder, D., (1971), Properties and chemistry of lactic acid and derivates, Verlag Chemie Gmbh, Weinheim-Bergstr., P 61.

Huang, L.P., Jin, B., Lant, P., Zhou, J., (2005), Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*, Biochemical Engineering Journal 23: 265–276

Hunger, W., (1984), Dextro-rotatory lactic acid: their signifiante and occurance in sour milk products, Danish Dairy Industry – World Wide, 4:39-42.

Jarvis, L., (2003), Prospects for lactic acid are healthy as demand for all end uses grows, Chemical market reporter; 2003 (Feb 10).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

John, R.P., Sukumaran, R.K., Madhavan Nampoothiri, K., Pandey, A., (2007), Statistical optimization of simultaneous saccharification and l(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology, Biochemical Engineering Journal 36: 262–267

Kalogeris, E., Iniotaki, F., Topakas, E., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B.J., (2003), Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw, Bioresource Technology, 86 : 207-213.

Kandler, O. and Weiss, N., (1986), Regular, nonsporing gram-positive rods, 1208-1234, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2. Sneath, P.h., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.g. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, P 2648

Kimberley, A.C. and Taylor, C.A., (1996), A simple calorimetric assay for muramic acid and lactic acid, Applied Biochemistry and Biotechnology, 56, 49-58.

Lin, J.P., Ruan, S.D., Cen, P.L., (1998), Mathematical model of l-lactic acid fermentation in an RDC coupled with product separation by ion exchange, Chem. Eng. Commun. 168: 59–79.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Lin, J., Zhou, M., Zhao, X., Luo, S., Lu, Y., (2007), Extractive fermentation of l-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed, Chemical Engineering and Processing 46: 369–374.

Lund, B., Norddahl, B. and Ahring, B., (1992), Production of lactic acid from whey hydrolysed whey protein as nitrogen source, Biotechnology Letters, 14(9):851-856.

Magnuson, J.K., & Lasure, L.L., (2004), Organic acid production by filamentous fungi, In J. Lange & L. Lange (Eds.), Advance in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine (pp. 307–340). Washington: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Mehaia, M.A. and Cheryan, M., (1987), Production of lactic acid from sweet whey permeate concentrates, Process biochemistry, 22(6):185-188.

Mirasol, F., (1999), Lactic acid prices falter as competition toughens, Chemical market reporter; 1999 (March).

Mital, B.K. and Garg, S.K., (1990), Tempeh – technology and food value, Food Rev. Int. 6:213-224.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Mitchell, D. and Berovič, M., (1998), Solid state fermentations, Bioprocess Engineering Course, Edt M Berovic, National Institute of Chemistry, Slovenia, 128-167.

Mitchell, D., Pandey, A., Sangsurasak, P. and Krieger, N., (1999), Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid state fermentation, 35: 167-178.

Mitchell, D., Krieger, N., Stuart, D. and Pandey, A., (2000), New developments in solid state fermentation II. Rational approaches to design, operation and scale-up of bioreactors, Process Biochemistry, 35 : 1211-1215.

Mitchell, D.A., Krieger, N. and Berovič, M.(Eds.), (2006), Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, P 1-2.

Montelongo, J.L., Chassy, B.M. and Mc Cord, J.D., (1993), *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid, Journal of Food Science, 58(4):863-866.

Mulligan, C.M., Safi, B.F. and Groleau, D., (1991), Continuous production of ammonium lactate by *Streptococcus cremoris* in a three-stage reactor, Biotechnology and Bioengineering, 38(10):1173-1181.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

Murthy, M.V., Karanth , N.G. and Raghava, K.S., (1993), Biochemical engineering aspects of solid state fermentation, Advanced and Applied Microbiology, 38: 99-147.

Pakmaya Yeast Ind. Com., (2002), Pretreatment of Beet Molasses, P1

Pandey, A., (1991), Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid state fermentation, Bioresorce Technology, 37: 169-172.

Pandey, A., Sccol, C., Leon, J.A. and Nigam, P., (2001), Solid state fermentation in biotechnology: Fundementals and applications, Asiatech Publishers Inc, New Delhi, P 221.

Pandey, A., (1992), Recent process developments in solid-state fermentation, Process Biochemistry, 27, 109–117.

Park, E.Y., Anh, P.N., Okuda, N., (2004), Bioconversion of waste office paper to L(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*, Bioresource Technology 93: 77-83.

Podlech, P.A.S., Luna, M.F., Jerke, P.R., Neto, C.A.C.S., Passos, R.F., Souza, O. and Borzani, W., (1990), Semicontinuous lactic acid fermentantion of whey by *Lactobacillus bulgaricus*.1.Experimental results, Biotechnology Letters,12(7):531-534.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

Purkarthofer, H., Siner, M. and Steiner, W., (1993), Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* : optimization of production in submerged and solid state culture, Enzyme and Microbial Technology, 17: 114-118.

Rahardjo, YSP., (2005), Fungal Mats in Solid-State Fermentation PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 164: P10-12.

Raimbault, M., (1998), General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, Electronic Journal of Biotechnology, 1 (3) : 1-16.

Ramesh, M.V., (2001), A wonder chemical that will help make biodegradable plastic why India needs to milk the full potential of lactic acid, India markets empowering business, April 2.

Ray, L., Mukherjee, G., Majumdar, S.K., (1991), Production of lactic acid from potato fermentation, Indian J Exp Biol 29: 681- 685

Reddy, G., Altaf, Md., Naveena B.J., Venkateshwar, M., Vijay Kumar, E., (2008), Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review, Biotechnology Advances 26: 22–34

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Richter, K., Berthold, C., (1998), Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid, J Agric Eng Res ; 71:181–91.

Robinson, T., Singh, D. and Nigam, P., (2001), Solid state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production, Applied Microbiology and Biotechnology, 55: 284-289.

Rodríguez Couto, S., Sanromán, M.A., Hofer, D., Gübitz, G.M., (2004), Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes, Bioresource Technology 95 (2004) 67–72.

Roukas, T., (1998), Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production, Process Biochemistry 33(8): 805-810.

Roy, D., Le Duy, A. and Goulet, J., (1987), Kinetics of growth and lactic acid production from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*, the Canadian Journal of Chemical Engineering, 65(4):597-603.

Ruengruglikit, C. and Hang, Y.D., (2003), L-(+)-lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL-395, Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 36: 573–575.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Schiweck, H., (1979), The influence of the different constituents of molasses on its suitability for yeast production, 21-38, Symposium on Problems with Molasses in the Yeast Industry, Sinda, E. (Eds.), 127p.

Steinkraus, K.H., (1994), Nutritional significance of fermented foods, Food Res Int 27: 259-267.

Subramaniyan, S. and Prema, P., (2000), Cellulase-free xylanase from *Bacillus* and other microorganisms, FEMS Microbiology Letters, 183:1-7.

Sun, Y., Li, Y. and Bai, S., (1999), Modelling of continuous L (+)-lactic acid production with immobilized *R. oryzae* in an airlift bioreactor, Biochemical Engineering Journal, February 1999, vol. 3, p. 87-90.

Tay, A. and Yang, S-T., (2002), Production of L-Lactic Acid From Glucose and Starch by Immobilized Cells of *Rhizopus oryzae* in a Rotating Fibrous Bed Bioreactor, Biotechnology and Bioengineering Volume 80 No:1, Wiley Periodicals Inc.

Teuber, M., (1993), Lactic acid bacteria, In Biotechnology, vol. 1, 2nd Ed eds. H.J. Rehm, G. Reed, pp. 325–366. Weinheim

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

Teuber, M., Geis, A. and Neve, H., (1992), The genus *Lactococcus*, 1482-1501, The Prokaryotes, Balows A., Trüper H G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K H. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Tsao, G.T., Cao, N.J., Cong, C.S., (1999), Production of multifunctional organic acids from renewable sources, Adv Bioeng Biotechnol ;65: 245–77.

Vaidya, A.N., Pandey, R.A., Mudliar, S., Suresh Kumar, M., Chakrabarti, T. And Devotta, S., (2005), Production and Recovery of Lactic Acid for Polylactide—An Overview, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 35: 429–467.

Vick Roy, T.B., (1985), Lactic acid, 761-776, Comprehensive Biotechnology Volume 3, Moo-Young,M.,(Ed.), Pergamon Press,Oxford, P 1136.

Vishnu, C., (2000), Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by amyolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6, Ph. D. Thesis in Microbiology, Osmania University, Hyderabad, India.

Vishnu, C., Sudha Rani, K., Reddy, G., Seenayya, G., (1998), Amyolytic bacteria producing lactic acid, J Sci Ind Res; 57: 600–603.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Xuemei, L., Jianping, L., Mo'e, L., Peilin, C., (1999), I-Lactic acid production using immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidize-bed with simulataneous product separation by electrodialyses, Bioprocess Eng. 20: 231–237.

Yin, P., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Park, Y., Okabe, M., (1997), Enhanced Production of L(+)-Lactic Acid from Corn Starch in a Culture of *Rhizopus oryzae* Using an Air-Lift Bioreactor, Journal of Fermentation and Bioengineering, 84(3): 249-253.

Yong, F.M. and Wood, B.J., (1977), Biochemical changes in experimental koji, Journal of Food Technology 12:163-175.

Yuru, C., Liming, X., Peilin, C., (2000), I-Lactic acid fermentation by immobilization of *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized-bed, Acta Microbiol. Sin. 40: 415–419.

Zhang, D.X. and Cheryan, M., (1991), Direct fermentantion of starch to lactic acid by *Lactobacillus amylovorus*, Biotechnology Letters,13(10):733-738.

Zhang, Z.Y., Jin, B., Kelly, J.M., (2007), Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*, Biochemical Engineering Journal 35 (2007) 251–263.

EKLER

EK 1 MELAS BİLEŞİMİ VE ÖNİŞLEMLERİ

Çizelge1: Şeker pancarı melasının ortalama bileşimi (Göksungur,1998).

Bileşen	Miktarı
Kuru Madde	% 75-78
Sakaro	% 46-47
İnvert Şeker	% 0,5-1,1
Rafinoz	% 1,0
Kül	% 8-9
Toplam Azot	% 1,8-2,0
Uçucu Asitler	% 1,2
Kükürtdioksit	% 0,05
Yoğunluk(g/cm³)	1,353
Viskozite(p)	120

Çizelge2: Melasa uygulanan farklı önışlem yöntemleri (M1:Göksungur,1998., M2,M3: Roukas, 1998., M4: Pakmaya Yeast Ind. Com., 2002.; Adıyaman-Koltuksuz' dan 2007).

KOD	YÖNTEM AÇIKLAMASI
M1	% 35 şeker içeren melas örneği H ₂ SO ₄ ile pH 4,0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 100°C' de 5 dakika kaynatılır. Örnek daha sonra santrifüj edilir ve son olarak ta elde edilen sıvı kısma filtrasyon işlemleri uygulanır.
M2	% 7 şeker içeren melas örneği, H ₂ SO ₄ ile pH 3,0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 24 saat oda sıcaklığında bekletilir. Örnek daha sonra santrifüj edilir ve son olarak ta elde edilen sıvı kısma filtrasyon işlemleri uygulanır.
M3	Melas örneğine herhangi bir seyreltme işlemleri uygulanmadan, 100 ppm EDTA ilave edilir, HCl ile pH 5,5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 100°C' de 15 dakika kaynatılır. Örnek daha sonra 24 saat oda sıcaklığında bekletilir ve santrifüj edilir. Son olarak elde edilen sıvı kısma filtrasyon işlemleri uygulanır.
M4	%33 şeker içeren melas örneği H ₂ SO ₄ ile pH 6,0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 80°C' de 1 saat ısıtılır. Örnek daha sonra santrifüj edilir ve son olarak ta elde edilen sıvı kısma filtrasyon işlemleri uygulanır.

EK 2 BUĞDAY RUŞEYM KÜSPESİNE UYGULANAN TAYİNLER

Nem Tayini

Üretim ortamından alınan örnekler darası alınıp sabit tartıma getirilmiş saat camı üzerine tartılmıştır. Daha sonra Memmert marka etüvde 105 °C'de sabit tartıma getirilmişlerdir ve % nem oranı, alınan örnekten buharlaşan su miktarı hesaplanarak bulunmuştur.

Ham Lif Tayini

- *Metodun Prensipleri*

Küspe numunesinin, konsantrasyonu belli bir sülfürik asit ve sodyum hidroksit çözeltisi ile kaynatılması, asit ve alkalide çözünmeyen kısmın ayrılması, yıkanması, kurutulup tartılması ve yakma sonunda tekrar tartılarak ağırlıkça azalan kısmın saptanmasıdır.

- *Reaktifler*

Sülfürik asit çözeltisi, 0,255 N \pm 0,005 N (100 ml içinde 1,25 g derişik sülfürik asit olabilir).

Sodyum hidroksit çözeltisi, 0,313 N \pm 0,005 N (100 ml içinde 1,25 g sodyum hidroksit olabilir).

Bu çözeltide karbonatların bulunmaması gerekir.

Aseton, veya etanol % 95 lik (hacim olarak), veya metanol yahut izopropanol.

Yağın uzaklaştırılması için çözücü, n-hekzan teknik, veya petrol eter (kaynama noktası 40-60°C), veya saf dietileter.

- *İşlem*

Önceden öğütülmüş ve 1 mm'lik elekten geçirilerek hazırlanmış küspe numunesinden 0,001 g duyarlıkla, yaklaşık 3 g deney numunesi tartılır.

- *Asit Ortamda Kaynatma*

Deney numunesi, gerektiğinde fazla yağı uzaklaştırıldıktan sonra, kaynatma kabı (Madde 2.1) içerisine alınır. Gerektiğinde köpürmeyi önleyici ve kaynama düzenleyici madde katılır. Oda sıcaklığındaki sülfürik asit çözeltisinden 200 ml konur ve üzerine, içinden soğuk su geçirilen soğutma balonu yerleştirilir. Isıtma düzeni yardımı ile (2 dakika içerisinde) kaynar hale getirilince 30 ± 1 dakika normal şekilde kaynatılır. Kenarlara yapışan parçacıkları süspansiyon haline getirmek için zaman zaman kaynatma kabı çalkalanır.

Belirtilen kaynatma süresi sonunda, yaklaşık 50 ml soğuk su konur ve seçilen süzme düzeni (Madde 2.4) yardımıyla çözünmeyen kısım hemen ayrılır. Kaynatma kabı her defasında 50 ml sıcak damıtık su (95° - 100° C sıcaklıkta) ile birkaç defa yıkanır ve yıkama suları süzme düzeni ile ayrılmış olan çözünmeyen kısım üzerine boşaltılır. Bu yıkama işlemine, süzüntü suları nötr oluncaya kadar devam edilir.

Süzme ve yıkama işlemi 30 dakikadan daha az bir süre içinde yapılmalıdır.

- *Alkali Ortamda Kaynatma*

Yıkanmış olan kalıntı tekrar kaynatma kabı içine alınır ve gerektiğinde köpürme önleyici ve kaynama düzenleyici ilave edilir; oda sıcaklığındaki 200 ml sodyum hidroksit çözeltisi konur ve üzerine soğutma balonu yerleştirilir. Isıtma düzeni yardımıyla kabın hemen kaynama sıcaklığına kadar 2 dakika içinde ısıtılması sağlanır. Tekrar 30 ± 1 dakika normal şekilde kaynatılır.

Bildirilen kaynama süresi sonunda, yaklaşık 50 ml soğuk su ilave edilir ve seçilen süzme düzeni yardımıyla çözünmeyen kısım ayrılır, 55°C sıcaklıktaki 25 ml sülfürik asit çözeltisi ile yıkanır. Yıkama işlemine damıtık su ile daha önce belirtilen şekilde devam edilir. Geride kalan çözünmeyen kısım, bir defa da reaktiflerden biri ile yıkanarak susuzlaştırılır; sabunlaşmayan yağları uzaklaştırmak için çözücü ile yıkanır. Uygulanan süzme tekniğine göre, kalıntının tümü darası alınmış bir yakma kapsülü yahut süzücü bir kroze içerisinde toplanır.

- *Kurutma*

Kapsül veya süzücü kroze ve içerisindekiler 103°C ± 2°C a ayarlı etüvde kurutulur. Desikatörde laboratuvar sıcaklığına kadar soğutulur ve yaklaşık 0,0005 g duyarlılıkla tartılır. Bu kurutma işlemi, son iki tartı arasındaki fark 0,001 g'dan fazla olmayıncaya kadar tekrar edilir.

Genel olarak 2 saatlik bir kurutma süresi yeterlidir.

- *Yakma*

Kurutmadan sonra kalıntı 550°C ± 15°C ye ayarlı bir yakma fırını içerisinde sabit ağırlığa kadar yakılır, bir desikatör içerisinde oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılır ve 0,0005 g a yakın duyarlılıkla tekrar tartılır.

- *Hesaplama*

Numunedeki ham selüloz miktarı (HS) ağırlıkça % olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$HS = m_1 - (m_2 + m_3) \frac{100}{m_0}$$

124

Burada;

m_0 = deney numunesinin miktarı, g

m_1 = kurutmadan sonra kapsül ile birlikte ağırlığı, g

m_2 = yakmadan sonra kapsül ile birlikte ağırlığı, g

m_3 = tanık deneyde, kuru ağırlık ile yakma sonundaki ağırlık arasındaki fark.

3.2.6.5 Yağ Tayini

- *Reaktifler*

Yağın küspeden ayrılması için çözücü, n-hekzan teknik, veya petrol eter (kaynama noktası 40-60°C), veya saf dietileter.

- *İşlem*

Önceden öğütülmüş ve 1 mm'lik elekten geçirilerek hazırlanmış küspe numunesinden 0,001 g duyarlıkla, yaklaşık 10 g deney numunesi tartılır ve düzgün kesilmiş kurutma kağıtları içerisine konulur.

- *Balonların Hazırlanması*

Deterjanlı su ile iyice yıkanan ve distile sudan geçirilen balonlar 70°C'deki etüvde 1 gece(denge tartım sıcaklığında) bekletilirler ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılıp daraları alınır.

- *Yağ Ekstraksiyonu*

İçerisinde örnek bulunan kurutma kağıtları katlanarak zımba ile açık kısımlar kapatılır. Hazırlanan örnekler, balon üzerine yerleştirilecek sifona konulur ve üstten hafifçe bastırılarak sifon dibine itilir. Hazırlanan sifonlar

balon üzerine yerleştirildikten sonra sistem kaynatma kabına yerleştirilir ve üstten örnek seviyesini geçecek kadar(yaklaşık 200ml) n-hekzan eklenir. Sifonun üst kısmına geri soğutucu bağlanır ve yaklaşık 7-8 sifon yapması(kimyasalla yağın tam karşılaşp birden ayrılması) sağlanır. Ekstraksiyon işleminin tamamlanmasının ardından evaporasyona geçilir.

- *Evaporasyon İşlemi*

Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra içerisinde yağ-çözgen karışımı bulunan balonlar sırayla vakumlu evaporatöre alınır ve sürekli dönerek çözgenin tamamına yakınının buharlaşması sağlanır.

- *Kurutma*

Çözgeninin büyük kısmı buharlaştırılan balonlar 103°C ± 2°C' deki etüve alınırlar. Desikatörde laboratuvar sıcaklığına kadar soğutulur ve yaklaşık 0,0005 g duyarlıkla tartılırlar. Bu kurutma işlemi, son iki tartı arasındaki fark 0,001 g'dan fazla olmayıncaya kadar tekrar edilir.

- *Hesaplama*

Numunedeki yağ miktarı (Y) ağırlıkça % olarak aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$Y = (m_2 - m_1) \frac{100}{m_n}$$

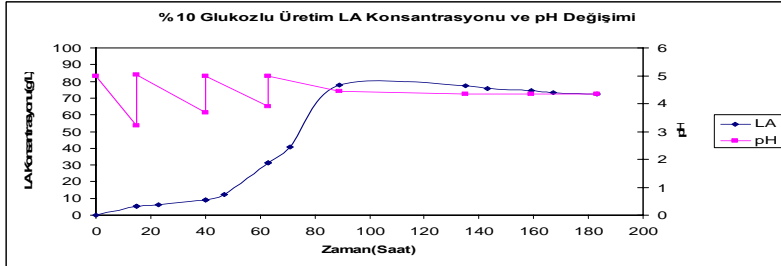
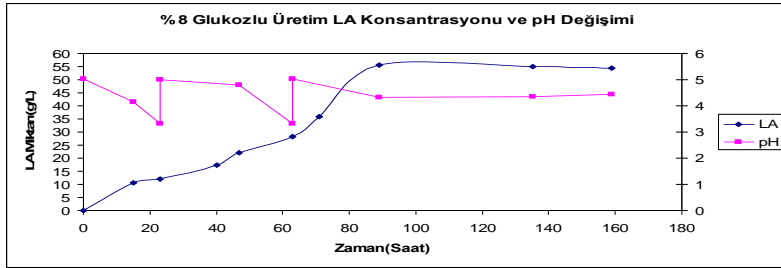
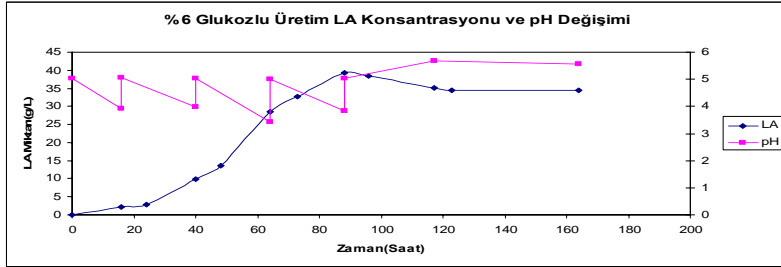
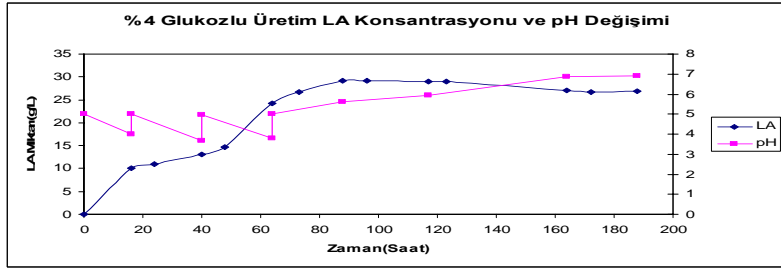
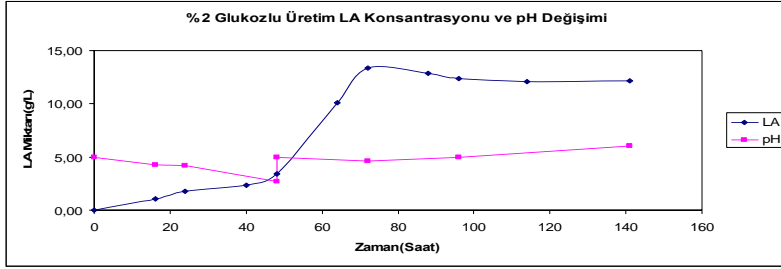
m_2 = Kurutmadan sonraki balon ağırlıkları,g

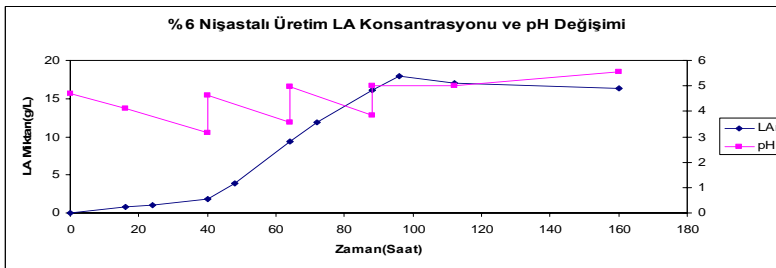
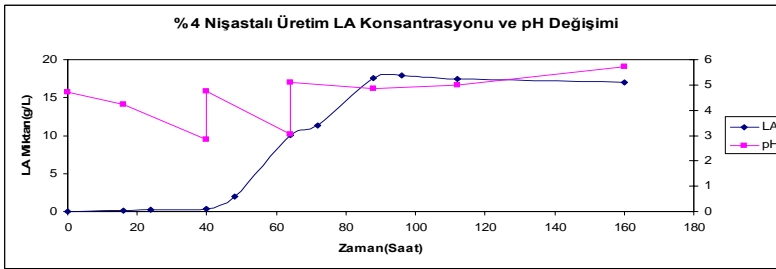
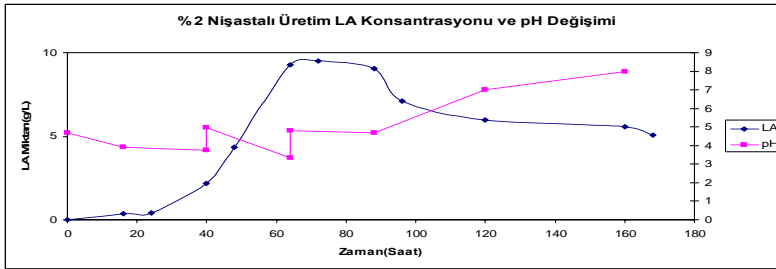
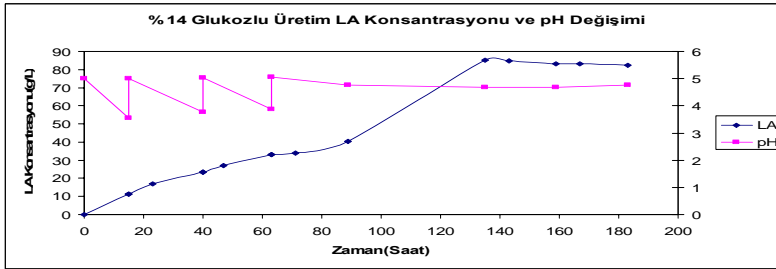
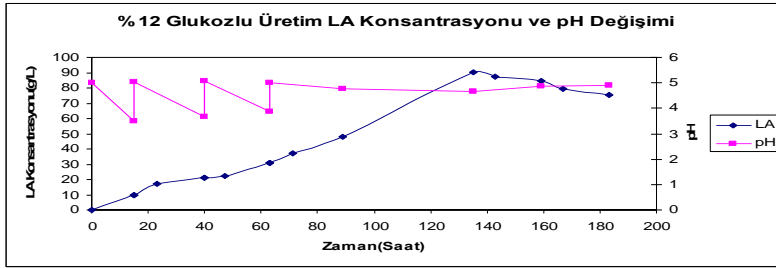
m_1 = Balon daraları,g

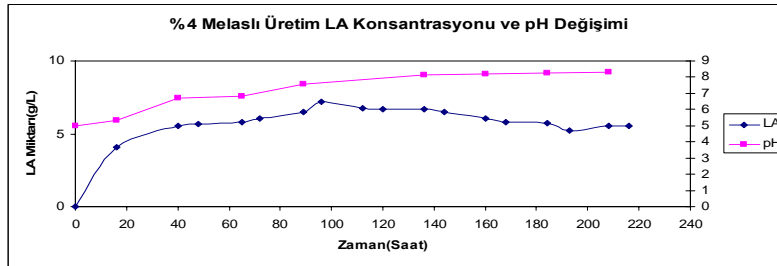
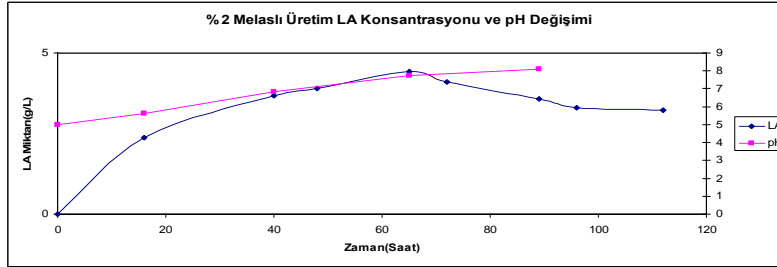
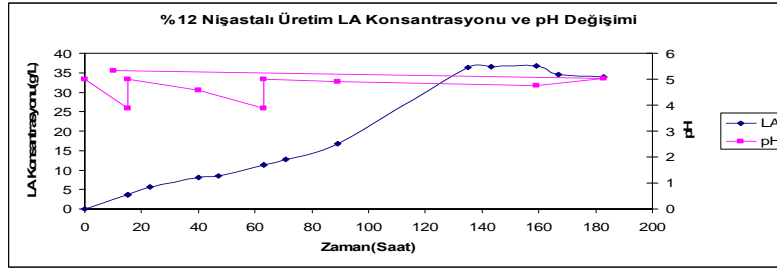
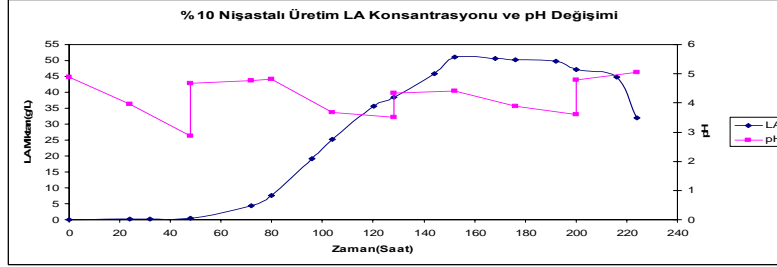
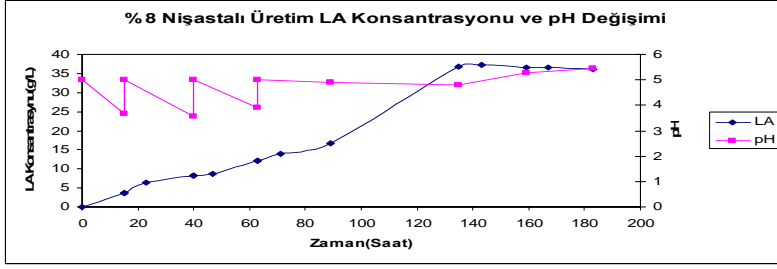
m_n = Numune ağırlıkları,g

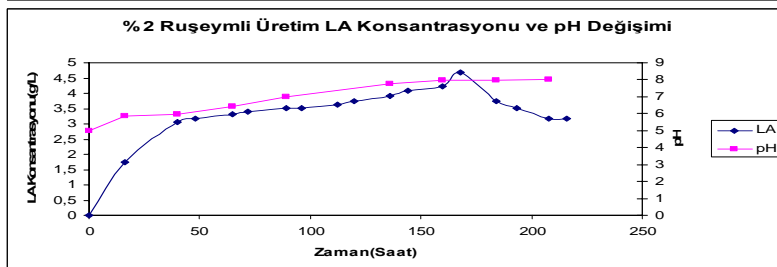
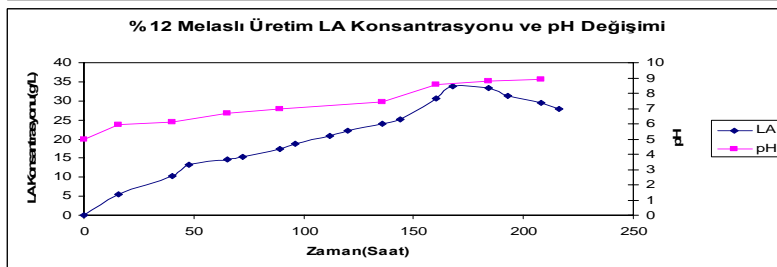
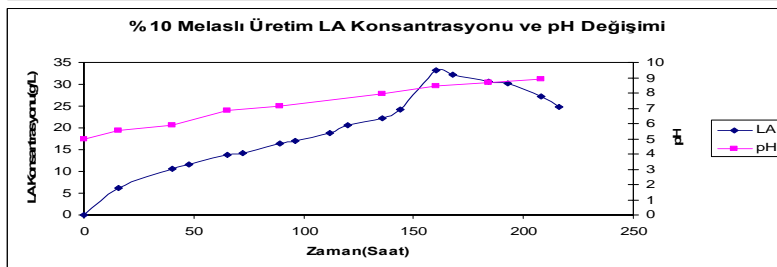
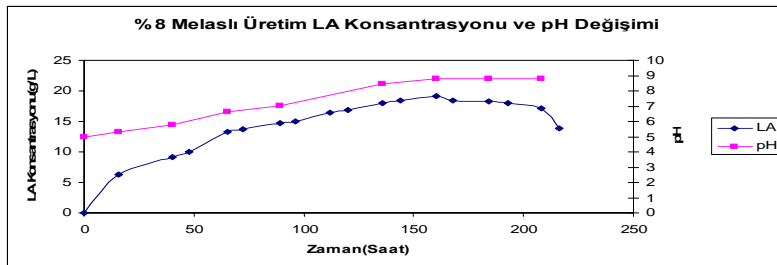
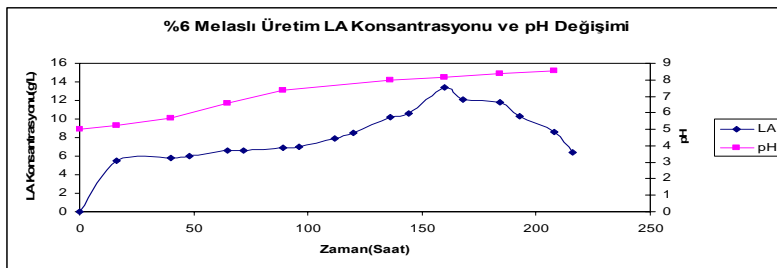
EK 3 ÜRETİM SONUÇ ve pH GRAFİKLERİ

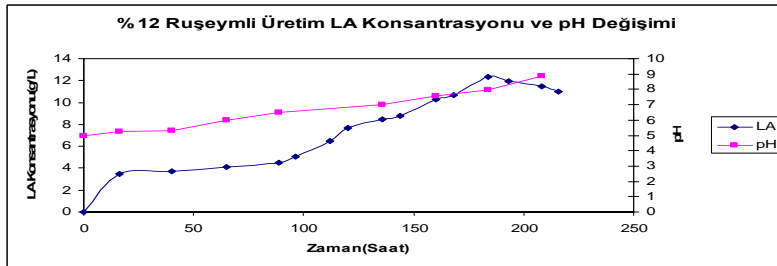
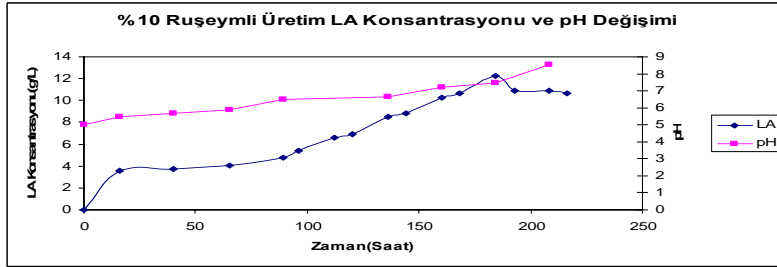
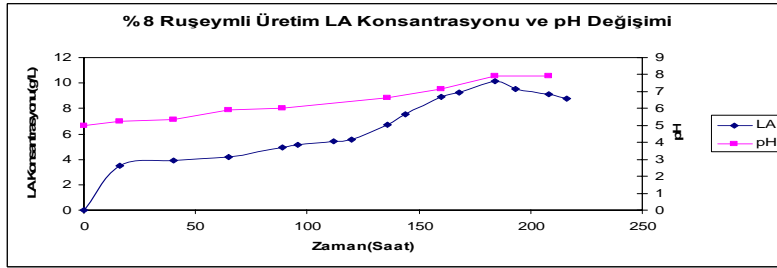
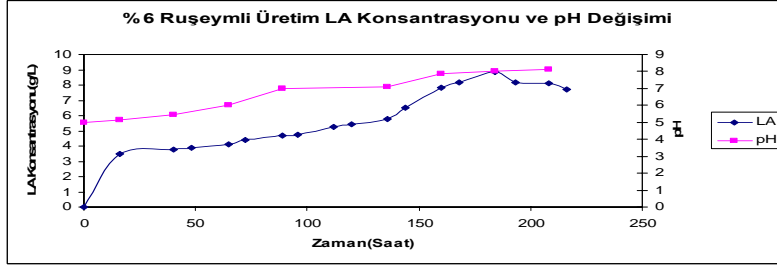
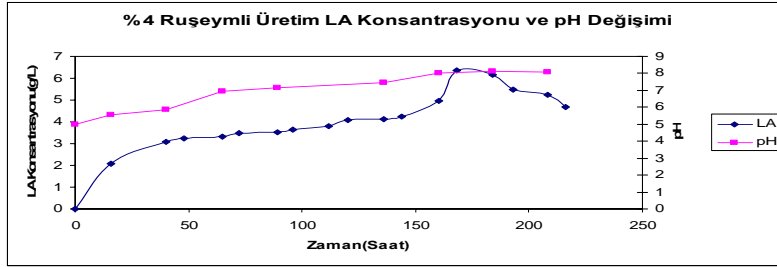
Çalkalamalı Kültür



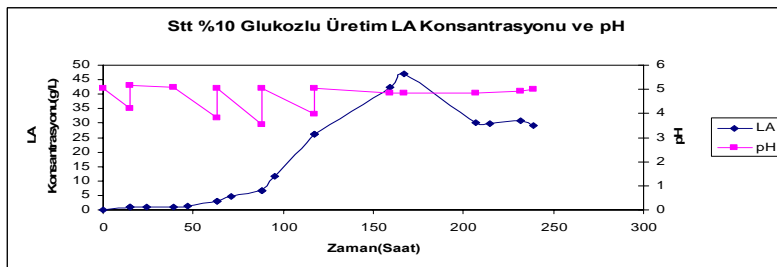
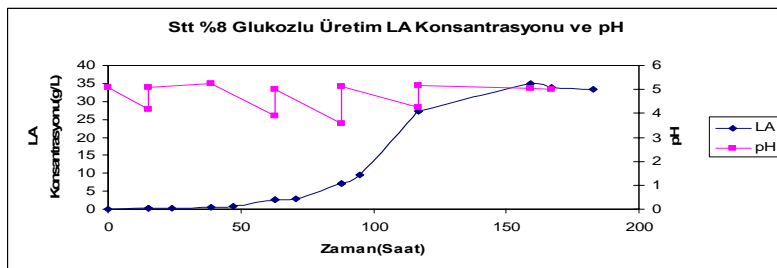
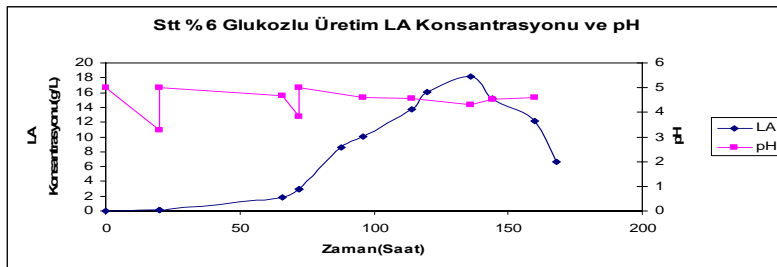
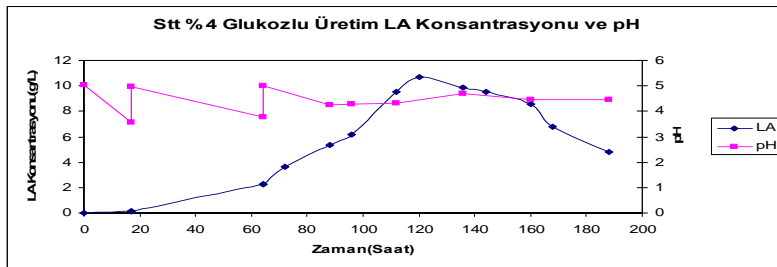
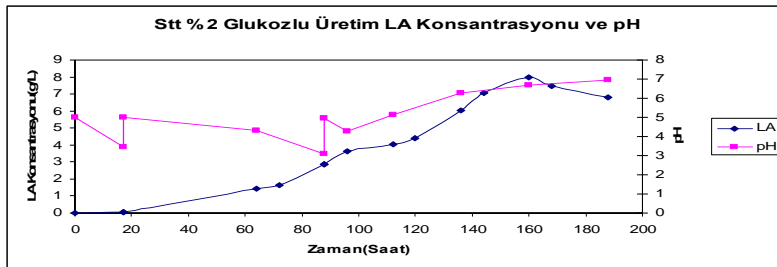


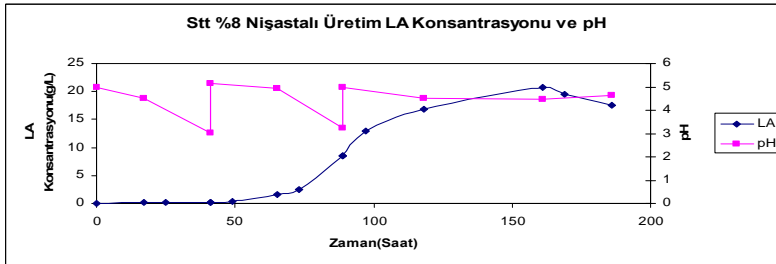
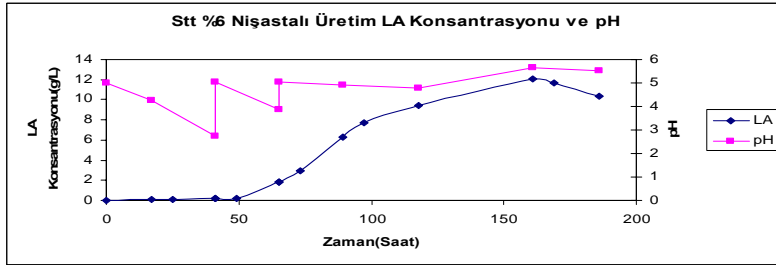
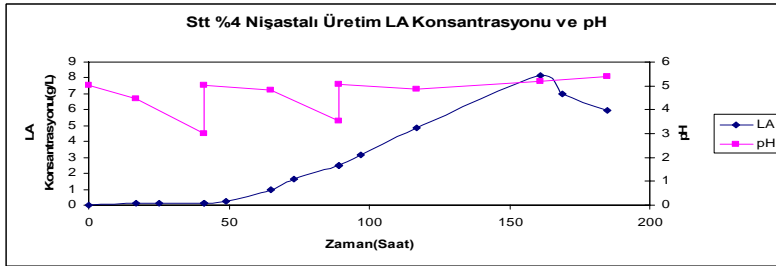
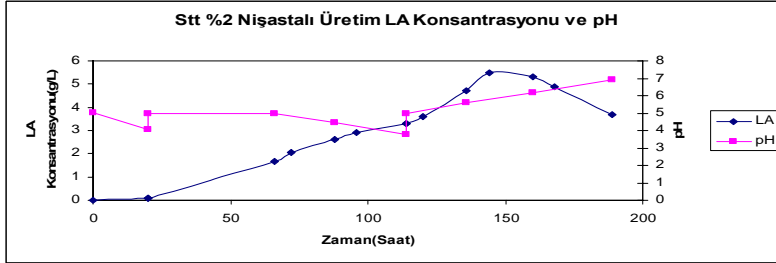
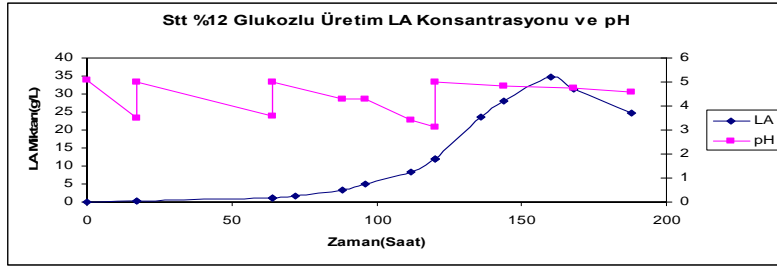


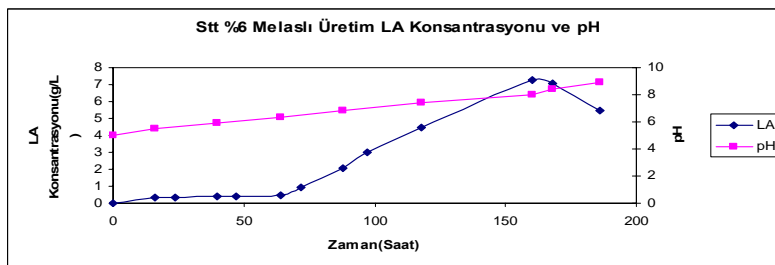
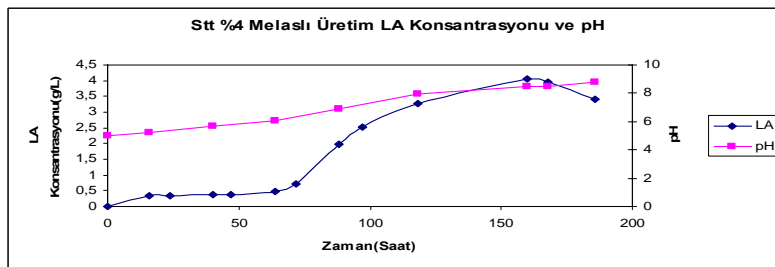
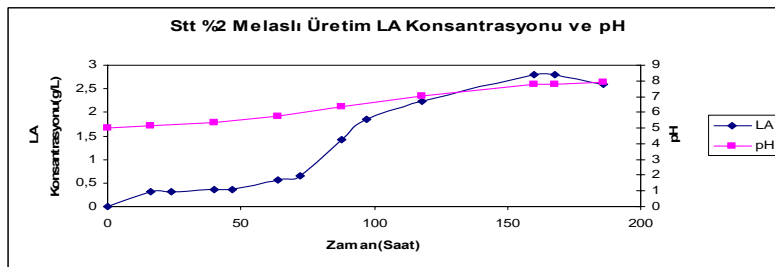
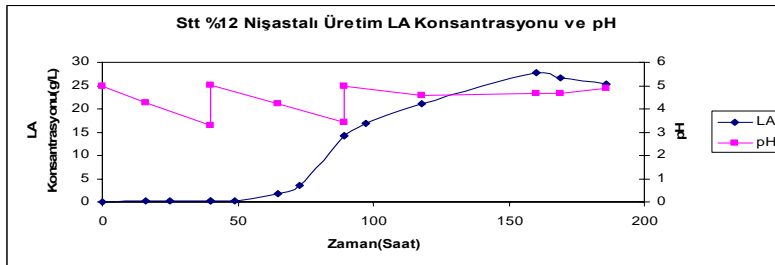
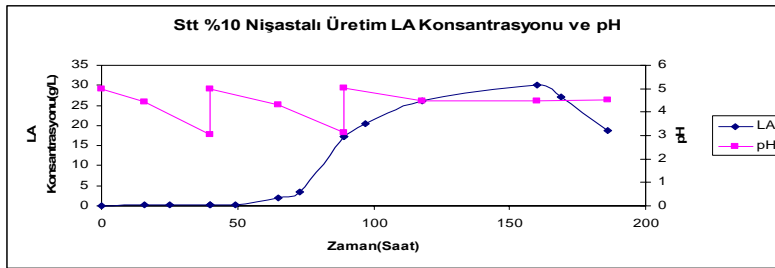


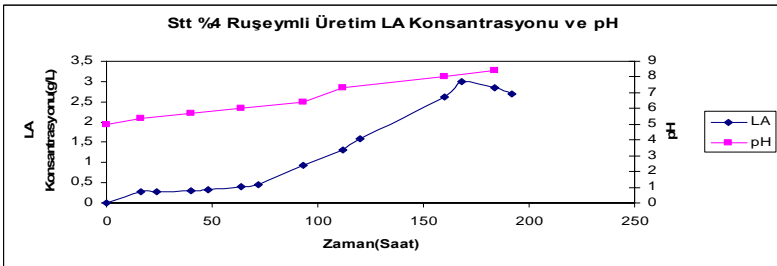
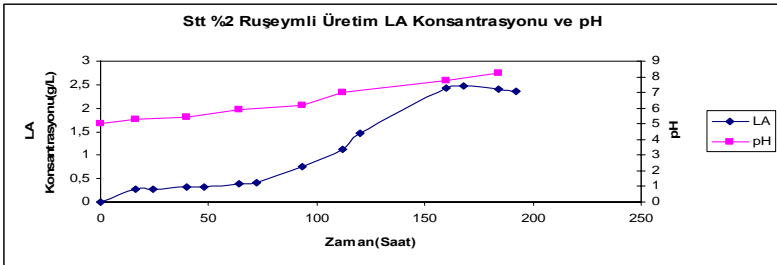
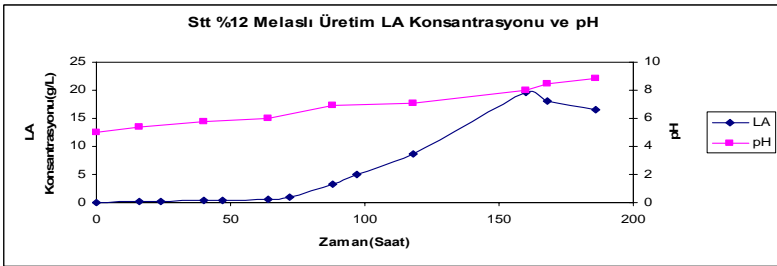
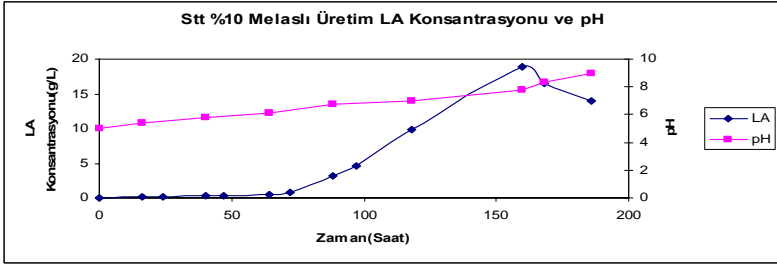
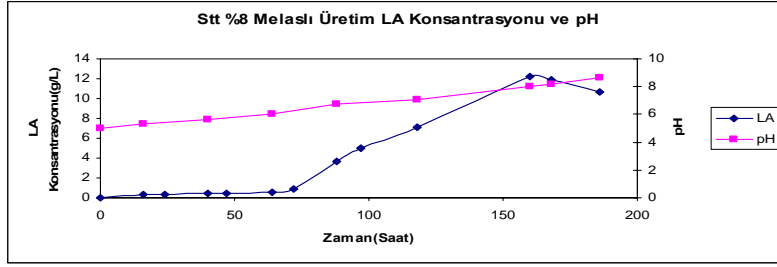


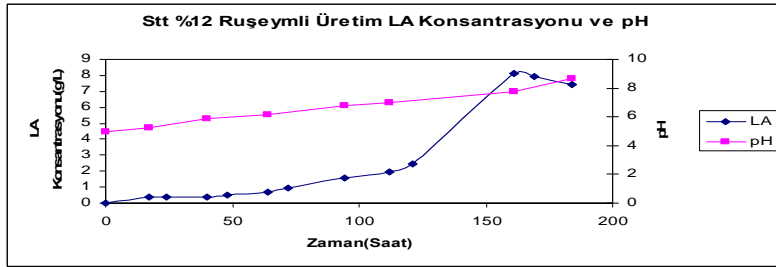
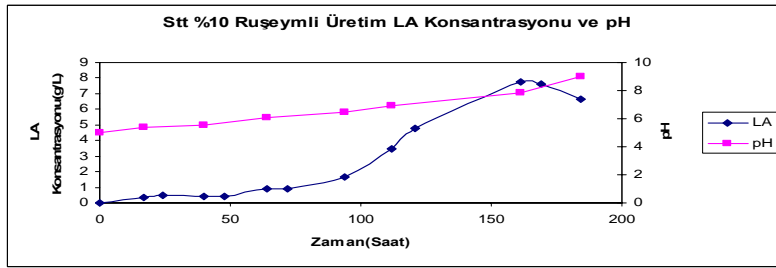
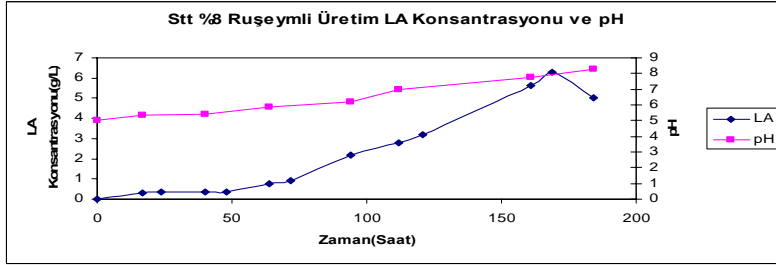
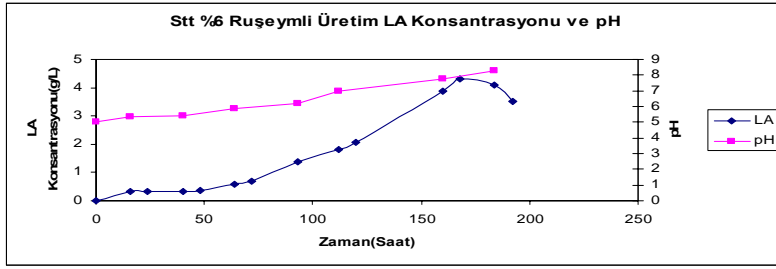
Statik Kültür











ÖZGEÇMİŞ

Işık ÇOBAN 1981 yılında Bornova/İZMİR’ de doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini Uşak’ ta tamamlamıştır. 2005 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’ nden “ Gen Ekspresyon Analizleri” Lisans Bitirme Tezi ile mezun olmuştur. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.