

171587

KESİKLİ DÜZENDE KARIŞTIRMALI TEPKİME KABINDA  
LACTOBACILLUS DELBRUECKII KULLANILARAK  
GLUKOZ ve SAKKAROZUN LAKTİK ASİTE DÖNÜŞTÜRÜLMESİ

Zümriye AKSU

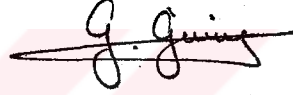
Hacettepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Yönetmeliği'nin  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

ANKARA  
Mart - 1983

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İşbu çalışma, jürimiz tarafından, Kimya Mühendisliği bilim dalında YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Güniz Gürüz



Üye Doç. Dr. H. Tunçer Özdamar



Üye Dr. Tolun Kutsal



ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen üyelerine ait olduğunu onaylarım. 31 / 3 / 1983

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bu araştırmada Lactobacillus delbrückii kullanarak glukoz ve sakkarozun laktik asite dönüştürülmesi karıştırmalı tepkime kabında ve kesikli düzende serbest mikroorganizmalar ile incelenmiştir.

Çalışmaların ilk aşamasında bakterinin en kolay ve çabuk kullanabildiği glukozu içeren besin ortamında çeşitli üretim parametreleri denenmiştir. Bu çalışmalarda ortam bileşiminin, sıcaklığın, başlangıç substrat derişiminin, başlangıç asitliğinin, kullanılan karıştırmalı kap için karıştırma hızının mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızlarına etkileri incelenmiş, laboratuvar koşullarında en uygun değerler saptanmiştir.

Buna göre mikroorganizmanın hızlı ürediği ve iyi bir dönüşüm yaptığı sentetik ortam bileşiminin mutlaka maya özütü ve pepton gibi mikroorganizmanın gereksinim duyduğu bazı amino asit ve vitaminleri içeren kompleks maddeleri, potasyum fosfat, amonyum sitrat, sodyum asetat gibi tuzları, aktivatör etkisi yapan mağnezyum, manganez gibi metal iyonlarını içermesi gerekmektedir. Substrat olarak kullanılan glukoz derişiminin de üretim hızını arttırıcı etkisi vardır, 100 g/l glukoz derişiminde maksimum mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızları elde edilmiştir.

Lactobacillus delbrückii ancak 25-30 g/l laktik asite dayanabildiği için, kinetik parametrelerin denenmesinde 20 g/l şeker derişiminin üzerine çıkılmamıştır.

Sodyum hidroksit çözeltilisi ile pH'ın sürekli

5.5-6 arasında tutulduğu pH kontrollü çalışmalarla başlangıç glukoz derişiminin ürün inhibisyonu önlenmiş olarak, ürün oluşum hızı ve verimine etkisi incelenmiş, sonuçta yine 100 g/l glukoz derişimi maksimum substrat derişimi olarak saptanmıştır.

Endüstriyel üretime benzer olarak yüksek glukoz derişimlerinde çalışabilmek ve ürün inhibisyonunu önlemek için kalsiyum karbonat ile tamponlanmış fermentasyon ortamı ile de çalışılmıştır. pH kontrollü, pH kontrolsüz ve kalsiyum karbonatla tamponlanmış çalışmalarda, en yüksek ürün verimlerine kalsiyum karbonatla tamponlanmış ve pH kontrollü çalışmalarda ulaşılmıştır.

Lactobacillus delbrueckii termofilik bir bakteridir. Çalışma sıcaklığının 42°C bulunması da bunu kanıtlamaktadır. Bakteri pH'ı 6-6.2 gibi nötrale yakın besin ortamlarında maksimum üreme hızlarını vermektedir. Kullanılan tepkime kabında 400 rpm'lik karıştırma hızı en uygun olarak bulunmuştur.

Laktik asit bakterileri anaerobik veya mikroaerofiliktir, havaya gereksinim göstermezler. Lactobacillus delbrueckii için tepkime ortamının hava ile temasının kesilmesinde karbondioksit gazı kullanılmıştır.

Glukozun substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda en kısa sürede en yüksek mikroorganizma ve asit verimine ulaşılmıştır. Stokiyometrik olarak kuramsal verim 1 gr. glukozdan 1 gr. laktik asittir. En uygun laboratuvar koşullarında ise 1 gr. glukozdan 0.85 gr.'ın üzerinde laktik asit elde edilebilmektedir.

Çalışmaların ikinci kısmında şeker fabrikasyon artığı olan melastan laktik asit üretimi planlanmıştır. Bunun için önce saf sakkaroz içeren yapay besin ortamlarında yukarıda denenen parametrelerin bir kısmı denenmiştir. Sıcaklık, pH, başlangıç sakkaroz derişimi gibi değişkenlerin en uygun değerleri glukozlu ortamla yaklaşık aynı olmasına rağmen mikroorganizma ve asit oluşum hızları genel olarak daha düşüktür. Bunun nedeni L.delbrüeckii'nin sakkarozu glucoza dönüştürmek için metabolizmasına bir basamak daha eklemesidir. Melasla yapılan çalışmalarda daha da düşük hız değerleriyle karşılaşılmasıdır. 20 g/l sakkaroz içerecek şekilde seyreltilmiş ve içinde başka bir besi maddesi ve tuz içermeyen melas çözeltisinden elde edilen ürün verimi ancak %50 kadardır. Melasın içine bakterinin üremesi ve gelişmesi için gerekli besi maddeleri ve tuzlar ilave edilerek verimin % 70-75'e çıkması sağlanmıştır. Mikroorganizma bu doğal ortama alıştıktan sonra verimin yükseleceği de kesindir. Melasa aminoasit ve vitamin kaynağı olarak maya özütü, tuz kaynağı olarak di-amonyum hidrojen fosfat, metal iyonu kaynağı olarak da magnezyum sülfat ilave edilerek verim arttırma çalışmaları yapılmıştır.

Lactobacillus delbrüeckii sakkarozu glucoza nazaran daha yavaş kullanmakta, laktozu ise kullanamamaktadır. Ancak bu disakkaridler daha basit yapı taşlarına (glukoz, fruktoz gibi) dönüştürülürse, aynı mikroorganizma ile kısa sürede daha yüksek verimde laktik asit elde edilebilir. Daha ileriki çalışmalarda bu disakkaridleri monosakkaridlere dönüştürecek bir enzimle birlikte L.delbrüeckii'nin

bir arada kullanılacağı katalizör sistemi düşünülmektedir. (Enzim + mikroorganizma) sistemi ile tutuklanmış şekilde dolgulu kolonda veya serbest olarak karıştırmalı kimyasal tepkime kabında çalışılacaktır. Sakkarozu invert şekere dönüştürecek enzim olarak invertaz, laktozu glukozla dönüştürecek enzim olarak ise laktaz düşünülmektedir. Deneysel çalışmaların son kısmında % 50 glukoz + % 50 fruktozdan oluşan invert şeker substrat olarak kullanılmış ve mikroorganizma ve ürün oluşum hızlarının ve asit ve mikroorganizma veriminin glukozun substrat olarak kullanıldığı çalışmaların hız ve verim değerlerine yaklaştığı saptanmıştır. Bu da (enzim + mikroorganizma) sisteminin yüksek verimlilikle kullanılabileceğini göstermektedir.

Türkiye'nin yıllık 10 tona yakın laktik asit ve tuzlarına ihtiyacı vardır. Oldukça fazla miktarda bir atık olan melastan Lactobacillus delbrueckii kullanılarak kesikli karıştırmalı fermentörde laktik asit veya kalsiyum laktat üretimi tekniği kolaylıkla uygulanabilir.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük yardımlarını gördüğüm başta tez hocam sayın Prof.Dr.Arif Çağlar'a, sayın Dr.Tülin Kutsal'a ve sayın Kimya Yüksek Mühendisleri Hanife Büyükgüngör ve Ülkü Kurnaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım süresince tüm olanaklarımdan yararlandığım Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne de teşekkürü bir borç bilirim.





	<u>Sayfa No</u>
3. DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ .....	34
3.1.Mikroorganizma .....	34
3.2.Üretim Yöntemi .....	34
3.3.Aşılama .....	35
3.4.Deney Düzeneği .....	36
3.5.Analiz Yöntemleri .....	37
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR .....	41
4.1.Genel .....	41
4.2.Üretim Parametreleri .....	41
4.3.Glukozlu Besin Ortamı Çalışmaları .....	42
4.3.1.En Uygun Ortam Bileşimi .....	42
4.3.2.Başlangıç Glukoz Derişiminin Etkile-	
ri:	46
4.3.3.Başlangıç pH'ının Etkileri .....	49
4.3.4.pH Kontrollü Başlangıç Glukoz De-	
rişiminin Etkileri .....	52
4.3.5.pH Kontrollü Kademeli Substrat Ek-	
leme .....	54
4.3.6.Sıcaklık Etkileri .....	55
4.3.7.Karıştırma Hızı Etkileri .....	55
4.3.8.İnert Gazların Etkileri .....	57
4.3.9.Mikroorganizma(Aşı)Derişiminin	
Etkileri .....	57
4.3.10.Glukozlu Besin Ortamında Genel	
Çalışmalar .....	57
4.4.Sakkarozlu Besin Ortamı Çalışmaları.....	62
4.4.1.Başlangıç Sakkaroz Derişiminin	
Etkileri .....	62

	<u>Sayfa No</u>
4.4.2.Başlangıç pH'ının Etkileri .....	64
4.4.3.Sıcaklık Etkileri .....	67
4.4.4.Sakkarozlu Besin Ortamında Genel Çalışmalar .....	67
4.4.5.Melas Çalışmaları .....	69
4.5.İnvert Şekerli ve Fruktozlu Besin Ortamı Çalışmaları .....	73
5. SONUÇLAR .....	76
5.1.Laktik Asit Oluşum Hızı .....	76
5.2.Laktik Asit Verimi .....	78
5.3.Mikroorganizma Çoğalma Hızı ve Verimi...	79
6. ELEŞTİRİ VE ÖNERİLER .....	81
7. KAYNAKLAR .....	84
 EKLER	
EK A.LAKTİK ASİT TAYİNİ .....	89
EK B.KALSİYUM LAKTAT TAYİNİ .....	91
EK C.MİKROORGANİZMA DERİŞİMİNİN TAYİNİ .....	93
EK D.GLUKOZ TAYİNİ .....	98
EK E. <u>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</u> İÇİN BESİN ORTAMI BİLEŞENLERİ .....	100
EK F.KULLANILAN ALET VE KİMYASAL MADDELER...	103
EK G.ÖRNEK HESAPLAMALAR .....	105

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa No

(2-1): Rasemik formdaki saf laktik asitin fiziksel özellikleri .....	: 6
(2-2): Laktik asit izomerlerinin farklı fiziksel özellikleri .....	: 7
(2-3): Homofermentatif laktik asit bakterileri..	: 24
(2-4): Heterofermentatif laktik asit bakterileri	: 25
(4-1): Laktik asit fermentasyonunda kullanılan en uygun sıvı besin ortamı .....	: 44
(4-2): Çeşitli başlangıç glukoz derişimlerinde elde edilen maksimum mikroorganizma ve ürün derişimleri, ürün verimi .....	: 47
(4-3): pH kontrollü başlangıç glukoz derişimlerinde elde edilen maksimum mikroorganizma ve ürün derişimleri, ürün verimi .....	: 54
(4-4): Çeşitli bileşimlerdeki melas çözeltilerinde mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızları maksimum mikroorganizma ve asit derişimleri, asit verimi .....	: 72
(4-5): Substrat olarak kullanılan şeker cinsleri için mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızları, ikilenme süreleri, maksimum mikroorganizma ve ürün derişimleri ve ürün verimlerinin karşılaştırılması .....	: 75
(B-1): Kalsiyum laktat tayini için derişime karşı iletkenlik değerleri (T: 42°C da) .....	: 92

(C-1): Mikroorganizma derişiminin tayini için derişime karşı absorbens değerleri(Glukoz- lu besin ortamında).....	: 93
(D-1): Glukoz tayini için derişime karşı absorbens değerleri .....	: 98
(E-1): Melasın ortalama bileşimi .....	: 100
(E-2): Maya özütünün bileşimi .....	: 101
(E-3): Peptonun bileşimi .....	: 102

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
(2-1): Melastan laktik asit üretimi .....	: 19
(3-1): Deney Düzenegi .....	: 38
(3-2): Fermentör .....	: 39
(4-1): Maya özüksüz ve peptonsuz ortamlarda mikroorganizma ve ürün eğrileri .....	: 45
(4-2): Maya özütü derişiminin mikroorganizma ve asit oluşum hızlarına etkisi .....	: 46
(4-3): Pepton derişiminin mikroorganizma ve asit oluşum hızlarına etkisi .....	: 46
(4-4): Başlangıç glukoz derişiminin mikroorga- nizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisi .....	: 50
(4-5): (1/μ,sa) değerlerinin (1/S <sub>Go</sub> , g glukoz/l) değerleriyle değişimi .....	: 50
(4-6): Başlangıç glukoz derişiminin ortamdaki mak- simum mikroorganizma derişimiyle değişimi:	51
(4-7): Başlangıç pH'ının mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi .....	: 53
(4-8): Kontrollü pH'da (pH= 6)başlangıç glukoz derişiminin ürün oluşum hızına etkisi ..	: 53
(4-9): Kontrollü pH'da (pH=6) kademeli substrat eklemede elde edilen ürün eğrileri.....	: 56
(4-10): Sıcaklığın mikroorganizma ve asit oluşum hızlarına etkisi .....	: 58
(4-11): Karıştırma hızının mikroorganizma çoğal- ma ve asit oluşum hızlarına etkisi .....	: 58

- (4-12): Değişik gaz atmosferlerinde mikroorganizma ve ürün eğrileri ..... : 59
- (4-13): Aşı derişiminin farklı glukoz derişimlerinde mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisi ..... : 60
- (4-14): 20 g/l glukoz içeren besin ortamında mikroorganizma, laktik asit ve glukoz eğrileri: 63
- (4-15): 50 g/l glukoz derişimli besin ortamında değişik koşullarda çalışmalarda elde edilen ürün eğrileri ..... : 65
- (4-16): Başlangıç sakkaroz derişiminin mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi ..... : 65
- (4-17): ( $1/\mu$ , sa) değerlerinin ( $1/S_{S0}$ , g sakkaroz/l) değerleriyle değişimi ..... : 65
- (4-18): Başlangıç sakkaroz derişiminin ortamdaki maksimum mikroorganizma derişimiyle değişimi ..... : 66
- (4-19): Başlangıç pH'ının mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi ..... : 68
- (4-20): Sıcaklığın mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi ..... : 68
- (4-21): 20 g/l sakkaroz içeren besin ortamında mikroorganizma ve laktik asit eğrileri... : 70
- (4-22): Glukozlu ve sakkarozlu besin ortamlarında ürün oluşum eğrilerinin karşılaştırılması: 70

- (4-23): 20 g/l sakkaroz içeren melas çözeltilsin-  
de mikroorganizma ve laktik asit eğrileri. : 71
- (4-24): 20 g/l fruktoz içeren besin ortamında mik-  
roorganizma ve laktik asit eğrileri..... : 74
- (4-25): 20 g/l invert şeker içeren besin ortamında  
mikroorganizma ve laktik asit eğrileri.... : 74
- (B-1) Kalsiyum laktat çalışma doğrusu(T:42<sup>o</sup>C da)..: 92
- (C-1): Glukozlu besin ortamında mikroorganizma  
çalışma doğrusu ..... : 94
- (C-2): Yaş ve kuru mikroorganizma ağırlıkları ara-  
sındaki ilişki ..... : 95
- (C-3): Sakkarozlu besin ortamında mikroorganizma  
çalışma doğrusu ..... : 95
- (C-4): Fruktozlu besin ortamında mikroorganizma  
çalışma doğrusu ..... : 96
- (C-5): İnvvert şekerli besin ortamında mikroorganiz-  
ma çalışma doğrusu ..... : 96
- (C-6): 20 g/l sakkaroz içeren melas çözeltilsinde  
mikroorganizma çalışma doğrusu ..... : 97
- (D-1): Glukoz çalışma doğrusu ..... : 99
- (G-1): (dx/dt) ve  $\nu$  nün zamanla değişimi..... : 105
- (G-2): Yarı logaritmik grafik kağıdında glukoz ve  
sakkarozlu besin ortamlarında mikroorganiz-  
ma derişiminin zamanla değişimi ..... : 107

## SİMGELER

A	:Absorbans
$C_{Ca-laktat}$	:Kalsiyum laktat derişimi (g Ca-laktat/l)
$C_G$	:Glukoz derişimi (mg Glukoz/l)
$K_s$	:Monod sabiti (g Substrat/l)
$P_m$	:Maksimum ürün derişimi (g Laktik Asit/l)
$S_{Fo}$	:Başlangıç fruktoz derişimi (g Fruktoz/l)
$S_{Go}$	:Başlangıç glukoz derişimi (g Glukoz/l)
$S_{Io}$	:Başlangıç invert şeker derişimi (g Invert Şeker/l)
$S_{So}$	:Başlangıç sakkaroz derişimi (g Sakkaroz/l)
T	:Sıcaklık ( $^{\circ}C$ )
t	:Zaman (saat)
$t_{ik}$	:İkilenme süresi (saat)
X	:Kuru ağırlık olarak mikroorganizma derişimi ( g Mikroorganizma/l)
$X_m$	:Kuru ağırlık olarak maksimum mikroorganizma derişimi ( g Mikroorganizma/l)
$X_o$	:Kuru ağırlık olarak başlangıçtaki mikroorganizma derişimi ( g Mikroorganizma/l)
$X_y$	:Yaş ağırlık olarak mikroorganizma derişimi ( g Mikroorganizma/l)
$Y_{P/S}$	:Laktik asit verimi ((g Laktik Asit/g Substrat)x100)
$Y_{X/S}$	:Mikroorganizma verimi (g Mikroorganizma/g Substrat)
$\lambda$	:Işığın dalga boyu (nm)
$\mu$	:Mikroorganizmanın özgül büyüme hızı ( $sa^{-1}$ )



- $\mu_{max}$  : Mikroorganizmanın maksimum özgül büyüme hızı ( $sa^{-1}$ )  
 $v$  : Ürünün özgül oluşum hızı (g Laktik Asit/ g Mikroorganizma- sa)

#### Kısaltmalar:

- Ca-laktat : Kalsiyum laktat.  
 F. : Fruktoz  
 G. : Glukoz  
 İ. : İvert şeker  
 K.H. : Karıştırma hızı (rpm)  
 L. : Lactobacillus  
 L.A. : Laktik asit  
 mo. : Mikroorganizma  
 Na-laktat : Sodyum laktat  
 S. : Sakkaroz  
 S : Substrat

#### Sözlük

- Anaerobik mikroorganizma: Havasız koşullarda üreyen mikroorganizma.  
 Gram-pozitif mikroorganizma: Gram boyama yönteminde mor renkte görülenler gram-pozitif mikroorganizmalardır.  
 Heterofermentatif mikroorganizma: Birden fazla ürün üreten mikroorganizma.  
 Homofermentatif mikroorganizma: Tek cins ürün üreten mikroorganizma.  
 Katalaz negatif mikroorganizma: Yapısında katalaz enzimi içermeyen mikroorganizma.

## 1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI

Laktik asit fermentasyonu, homofermentatif laktik asit bakterilerince yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen, anaerobik veya mikroaerofilik bir fermentasyon şeklidir. Fermentasyon, kullanılan hammaddelerin çeşitliliği, tek çeşit ürün oluşumu, havalandırma gereksinimi olmaması, ürün veriminin yüksekliği açısından tercih edilir. Laktik asit bakterilerinin çoğalma ve gelişmeleri için besi ortamının daha değişik besin maddeleri içermesi zorunluluğu, bakterilerin ortam asitliğine dayanıklılıklarının düşük olması, laktik asitin korozif bir madde oluşu, devamlı steril ortamda çalışılması gibi sorunlar ise fermentasyonun dezavantaj gösteren yönleridir.

Laktik asit fermentasyonunda, elde edilmek istenen ürünün kalitesine göre çok çeşitli, glukoz indirgenen karbonhidratları içeren atıklar ve tahıllar geniş ölçüde kullanılmaktadır. Fermentasyon kesikli veya sürekli düzende çalışan karıştırmalı kimyasal tepkime kaplarında gerçekleştirilmektedir. Bu tür tepkime kaplarında ve serbest mikroorganizmalarla elde olunan ürün verimi oldukça yüksektir. Son zamanlarda kolon tipi fermentörlerde ve tutuklanmış laktik asit bakterileriyle çalışılarak, serbest mikroorganizma ile yapılan çalışmaların zorlukları giderilmeye ve yüksek ürün verimi elde edilmeye çalışılmaktadır.

Bu çalışmada laktik asit üretimi, substrat olarak glukoz ve sakkaroz kullanılarak iki kısımda

incelenmiş, seçilen parametrelerin mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına, mikroorganizma ve ürün verimlerine etkileri araştırılmış, karşılaştırmalar yapılmıştır. Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmalar, bir sanayii artığı olan ve % 50 sakkaroz içeren melasın laktik asite dönüşümünde kullanılması için bir basamak oluşturmuştur.

Seçilen parametreler bakterinin fonksiyonel özelliklerinin açıkça gözlenebilmesi açısından ortam bileşimi, sıcaklık, pH, karıştırma hızı, başlangıç substrat derişimi gibi değişkenlerdir.

Çalışmalarda, homofermentatif laktik asit bakterilerinden, substrat olarak seçilen glukoz ve sakkarozu en iyi laktik asite dönüştüren Lactobacillus delbrüeckii kullanılmıştır. Bu bakterinin, oluşturduğu laktik asite dayanıklılığı oldukça düşük olduğu için, ilgili üretim parametrelerinin denenmesinde, bakterinin oluşacak üründen etkilenmeyeceği bir substrat derişimi seçilmiştir.

Bakterinin üremesi, aşı olarak kullanılması ve fermentasyon ortamı için steril koşullar şarttır, yoksa bulaşma önemli bir problemdir.

Bu araştırmanın amacı, Lactobacillus delbrüeckii kullanarak, anaerobik koşullarda glukoz ve sakkarozun laktik aside dönüştürülmesinin, serbest mikroorganizmalarca ve karıştırmalı kimyasal tepkime kaplarında incelenmesidir. Üretimle ilgili olarak seçilen parametrelerin, mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızı, mikroorganizma ve asit

verimine etkileri araştırılmıştır. Glukoz ve sakkarozlu besin ortamı çalışmaları değerlendirilerek, bir fabrikasyon atığı olan melastan laktik asit üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaların son kısmı daha ileriki çalışmalara ışık tutması açısından amaçlanmıştır. Bu çalışmalar (enzim + mikroorganizma) sistemlerinin bir arada kullanılmasını içerecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Laktik Asit Üretimi :

#### 2.1.1. Giriş :

Laktik asit ( $\alpha$ -hidroksi propanoik asit, 2-hidroksi propanoik asit,süt asiti),  $\text{CH}_3\text{.CHOH.COOH}$  kimyasal formülü ile gösterilen, asimetric bir karbon atomu içeren en basit hidroksi asittir.Bilinen en eski organik asitlerdendir.Ekşimiş sütte bulunduğundan insanlar bunu süt sağmağa başladıkları tarihten itibaren tecrübeleriyle tanımışlardır.Süt asiti olarak adlandırılmasının nedeni ekşi sütün birincil bileşeni olmasındandır.Süt asidi doğada yaygın olarak fermente olmuş ortamlarda örneğin, ekşimiş süt,peynir,turşu vb. bulunur.Ayrıca kaslarda çalışma sırasında oluşur ve mide özsuğu değişen miktarlarda laktik asit içerir (16).

İlk defa 1790 da Scheele (16,34) tarafından süt asiti ekşimiş süttten izole edilmiştir.Süt asitinin bir fermentasyon ürünü olduğu ise ilk defa 1847'de Blondeau (16,34) tarafından bulunmuştur. 1857'de Pasteur (16,30,34) laktik asit fermentasyonunu bakterilerin yaptığını bulmuş, 1877 de de Lister (16,30,34) bu süt asidi bakterisinin saf kültürünü elde etmiş ve buna "Streptococcus Lactis" adını vermiştir.

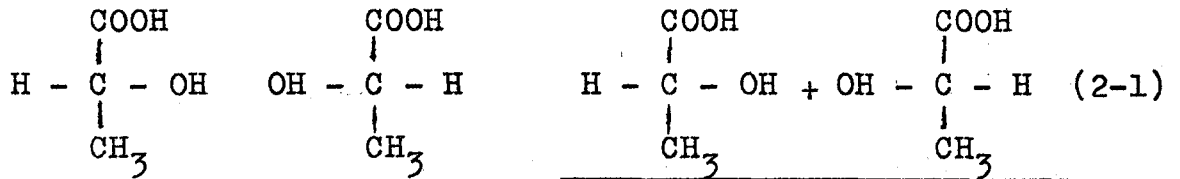
1881 de Avery (16,29,30) endüstriyel olarak laktik asit üreten küçük çapta bir ünite kurmuş,fakat bu yetersiz kalmıştır. 1895 te Wehmer (16,29,30) L.delbrückii'nin saf kültürünü yüksek aşılama sıcaklıklarında laktik

asit fermentasyonuna uygulamış, teorik verimin % 85-90' inına ulaşmıştır. Bu tarihten itibaren laktik asit endüstriyel ölçekte, laktik asit bakterilerininin yardımı ile fermentasyonla üretilmeye başlamıştır. Bugün endüstride mısır şekeri, melas, peynir suyu, hidrolize edilmiş nişasta (mısır, patates) dan laktik asit üretilmektedir, üretim karıştırılmalı fermentörlerde kesikli veya sürekli fermentasyonla sağlanmaktadır (16,29,30,34,36).

### 2.1.2. Özellikleri:

Saf laktik asit berrak ve renksiz, koyu kıvamlı, nem çekiçi bir sıvıdır, fakat elde edildiği ortama göre sarımsak renkte de olabilir. Zehirsiz ve ekşi tada olan laktik asit su, alkol ve eterle her oranda karışır, kloroformda, petrol eterinde ve karbon sülfürde çözünmez.

Laktik asit içerdiği asimetrik karbon atomundan dolayı optikçe aktif bir maddedir ve bunun sonucu olarak polarize ışığı sağa-(L(+)) , sola -(D(-)) çeviren veya polarize ışığı çevirmeyen yani rasemik -(D-L) şeklinde laktik asit tipleri vardır. Endüstriyel üretimi en fazla yapılan laktik asit, optikçe aktif olmayan türüdür.



D(-) Laktik Asit     L(+ ) Laktik Asit     DL- Laktik Asit (Rasemik şekil).  
 (Sarkolaktik veya Paralaktik asit)

Fermentasyon sırasında oluşan laktik asitin genelde aktif olmayan bir karışım olduğuna çok rastlanır. Bunun nedeni laktik asit bakterilerinin bir kısmının, veya ortamdaki kontaminantların oluşturduğu "racemase" enziminin faaliyeti sonucu aktif laktik asitin aktif olmayan laktik asite dönüşmesidir(6,16).

Rasemik şekildeki saf laktik asitin fiziksel özelliklerinden bazıları izelge-(2-1)de verilmiştir (34,16,27,39).

Çizelge-(2-1):Rasemik şekildeki saf laktik asitin fiziksel özellikleri:

---

Molekül ağırlığı (g/mol)	: 90.08
Erime noktası (°C)	: 16.8
Kaynama noktası (°C)	: 122 <sup>14</sup>
Yoğunluğu ( $d_4^{15}$ )	: 1.249
Kırılma indisi (20°C)	: 1.4414
Özlülüğu (cP), (% 75 lik laktik asit)25°C'ta:	13.03
	50°C'ta: 4.98
İyonlaşma değişmezi	: $1.38 \times 10^{-4}$

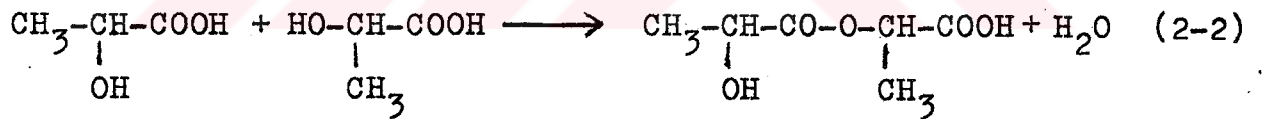
---

Optikçe aktif laktik asit izomerlerinin bazı fiziksel özellikleri daha farklıdır.Bu farklı özellikler izelge-(2-2) de gösterilmiştir:

Çizelge-(2-2): Laktik asit izomerlerinin farklı fiziksel özellikleri:

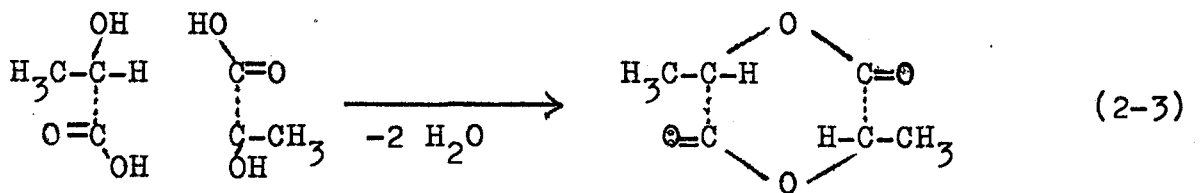
Erime noktası (°C)	D(-)	: 52,8
	L(+)	: 52,8
Kaynama noktası(°C)	D(-)	: -
	L(+)	: Ayrışır
Döndürme $[\alpha]_{5461}^{21-22}$	D(-)	: -2,6
	L(+)	: +2,6

Seyreltik laktik asit deriştirilirken 90°C'ın üstünde iki mol laktik asitten bir mol su ayrışarak laktilaktik asit oluşur.



Su ayrışmasının sürmesi ile di-, tri-, tetra-, ve poli-laktik asitler oluşur.

Laktik asitte hem hidroksil hem de karboksil fonksiyonel grupları bulunduğundan fazla derişik asit çö-zeltisinde kendi kendine esterleşerek halkalı yapıda poliesterler oluşur.



2 molekül laktik asit

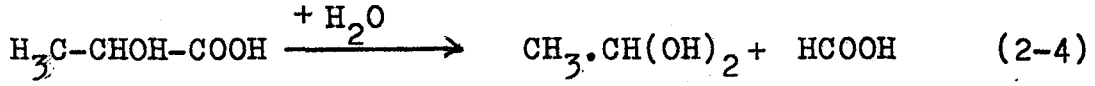
Laktid



% 25'den daha az laktik asit içeren seyreltik çözeltiler monomerik laktik asit ve sudan oluşmuştur.

% 25'in üzerindeki sulu laktik asit çözeltileri ise laktik asit yanında laktilaktik asit ve biraz da laktid içerir.

Seyreltik sülfürik asitin etkisiyle, laktik asit, asetaldehidhidrat ve formikaside parçalanır. Bu durumda seyreltik sülfürik asidin etkisi hidrolize edicidir.

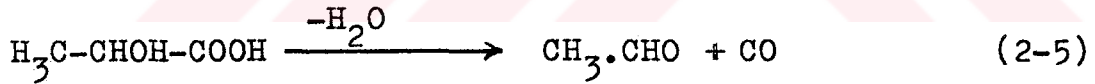


Laktik asit

Asetaldehit-  
hidrat

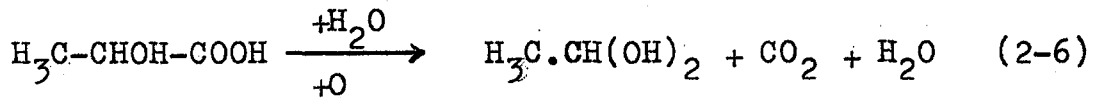
Formik asit

Seyreltik sülfürik asit yerine derişik sülfürik asit etki edecek olursa, ters bir tepkime ile sülfürik asit su bağlayarak laktik asiti asetaldehit ve karbonmonoksit parçalar.



Laktik asitin pirolizi sonucu da asetaldehit, karbon monoksit ve su açığa çıkar.

Laktik asit seyreltik sülfürik asit ve potasyum permanganatın birlikte etkisine uğrarsa asetaldehidhidrat, karbondioksit ve su açığa çıkar. Bu tepkimeler laktik asitin nitel belirlenmesinin esasını oluşturur (16,34).



Laktik asit içerdiği karboksil ve hidroksil gruplarından dolayı hem organik asitlerin hem de alkol-lerin verdiği tepkimelerin pek çoğunu verir (16).

Laktik asit, üretiminde kullanılan ham maddeye ve kullanım yerine göre dört ayrı kalitede üretilir (16,29,30). Bunlar :

1.Ham ya da teknik ya da ticari sınıf laktik asit: Genellikle %22, 44 ve 80'lik derişimlerde piyasaya verilir, rengi sarı-kahverengi arasındadır.Ticari laktik asit üretiminde doğrudan melas, peynir altı suyu gibi doğal besin ortamları kullanılır, ürün saflığı azdır, sülfat, klorür, demir vb. iyonları da ppm derecesinde içerir.

2.Besin sınıfı laktik asit (Edible grade): % 50 ve 80'lik derişimlerde satılır, hafif saman rengindedir.Bu sınıf laktik asitin elde edilmesinde substrat, rafine edilmiş şekerdir.

3.Plastik sınıf laktik asit: %50 ve 80'lik derişimlerde satılır.Bu sınıf laktik asit üretiminde ürün ayırma ve saflaştırma işlemleri daha azdır.

4.USP sınıf laktik asit: % 75 ve 85'lik derişimlerde satılır,renksizdir.En saf laktik asit bu sınıf laktik asittir.

Laktik asit besin ve ilaç sanayiinde düşük derişimlerde kullanıldığı için zararlı bir etkisi yoktur, ancak yüksek derişimlerde, deriye, ağıza, göze temas edilirse, üçüncü derece yanıklara neden olur.

### 2.1.3. Kullanım Yerleri ve Önemi:

Özellikle gıda, fermentasyon, ilaç ve kimya endüstrileri laktik asitin en fazla kullanıldığı yerlerdir.

Ticari laktik asit deri endüstrisinde, tekstil endüstrisinde kumaşların boyanmasında, matbaacılıkta, plastik sanayiinde reçineler için plastikleştirici olarak ve lehimcilikte, metil, etil, n-bütil laktatlar gibi esterlerin elde edilmesinde de hammadde olarak kullanılır.

Besin sınıfı laktik asit gıda endüstrisinde şekerlikte, reçel, meyve usareleri ve esansları, limonata ve şurupların hazırlanmasında, etin terbiye edilmesinde, sebze ve balık konserveciliğinde, hafif alkollü içeceklerde kullanılır. Meşrubatların hafif asit tadı vermesi için laktik asitten yararlanılır. Ayrıca koruyucu madde olarak turşuculuk ve zeytin salamuracılığında, maya üretiminde bütirik asit bakterisinin gelişmesini önleyici olarak, bira yapımında asitleyici olarak kullanılır.

Plastik sınıf laktik asit çeşitli plastiklerin hazırlanmasında, USP sınıf laktik asit ise tıp ve eczacılıkta ve analitik amaçlarda kullanılır.

Ayrıca laktik asit çeşitli tuzları (Ca-laktat, Na-laktat, Al-laktat Cu-II-laktat, Fe-II-laktat vb.) ve türevleri (metil-, etil-, propil-laktat vb. şeklindeki esterleri, asetilat ve alkilat türevleri) şeklinde de geniş kullanım alanı bulmaktadır.

En önemli laktik asit tuzu olan Ca-laktat, kabartma tozu yapımında, kalsiyum tedavisinde, Na-laktat ise nem çekiciliğinden dolayı kağıtçılık ve tekstil endüstrisinde kullanılır (16,30,34,36,38).

#### 2.1.4.Üretim Yöntemleri:

##### 2.1.4.1.Kimyasal Üretim Yöntemleri:

Laktik asitin üretiminde kimyasal yöntemler endüstriyel amaçla ekonomik olmadığı için pek kullanılmamakla beraber Monsanto Co.(A.B.D.), Mushashino (Japonya) firmaları laktonitrilden laktik asit üretmektedir.

Akrlonitril sentezinde bir ara ürün olarak elde edilen laktonitril, metil laktata esterleştirilir ve sonra hidroliz edilerek laktik asite dönüştürülür. Buharlaştırma ile deriştirilir ve saflaştırılır.Genel tepkime denkliği:



1963'e kadar sadece fermentasyonla olan üretim 1963'ten sonra laktonitrilden asit eldesi süreciyle sentez yoluyla üretimi de içermiştir (29,34).

Endüstriyel üretimde önemi olmayan bir sentez de heksoz şekerlerinin kireç ya da sodyum hidroksit ile indirgenmesidir.Tepkime sırasında şekerler çok daha değişik düzenlemelere uğrayabilir, parçalanabilir, yükseltgenebilir. Normal atmosferik koşullarda laktik asit verimi şekerin yapısına, derişimine, alkali türüne ve sıcaklığa bağlı olmakla beraber, verim teoriğin %50'si kadardır (19).

Üçüncü bir kimyasal sentez de asetaldehit ve karbon monoksidin bir katalizleyici eşliğinde 900 atm.de

130°C'dan 200°C'a ısıtılması ile laktik asitin elde edilmesidir. Bu sentezin de ticari bir önemi yoktur (29).

#### 2.1.4.2. Biyokimyasal Üretim Yöntemleri:

Biyokimyasal yöntemlerle laktik asit üretiminin temeli çeşitli şekerlerin, çeşitli laktik asit bakterileri tarafından kullanılarak, fermentasyonla laktik asite dönüştürülmesidir. Bugün dünyada ABD, İngiltere, Fransa, Hollanda, Almanya, İspanya ve Danimarka'da fermentasyonla laktik asit üretimi yapılmaktadır.

##### 2.1.4.2.1. Hammaddenin Seçimi:

Karbonhidrat içeren maddelerin çoğu laktik asit fermentasyonu için kullanılabilir. Hammadde seçiminde, o maddenin ucuzluğu ve bolluğu, kullanılabilirliği, fermente edilebilirliği, maliyeti, ön işleme tabi tutulup tutulmaması, elde edilecek ürünün kalitesi açısından önemlidir. Endüstriyel olarak, şeker sanayi artığı pancar veya kamış melası, peynir altı suyu veya kaymağı alınmış süt, patates (9,30), mısır (30,36,38) pirinç gibi tahıllar, odun şekeri çözeltisi (23,30), sülfat artık likörü (17,30) hammadde olarak kullanılabilir.

Glukoz, sakkaroz veya laktozu yapılarında içeren hammaddeler, fermentasyondan önce bir ön işleme ya hiç gerek göstermezler ya da çok az gerek gösterirler. Mısır, patates, pirinç nişastası gibi poli sakkaridler önce maltoz veya glukozu hidroliz edilmelidir. Bu hidroliz amilaz enzimleri veya asitler tarafından sağlanır (36).

Ham veya teknik laktik asit rafine edilmemiş maddelerden elde edilebilir. Daha iyi ve saf laktik asit üretimi için rafine edilmiş şeker substrat olarak kullanılır. Bundan elde edilen besin veya plastik veya USP sınıf asit için daha az saflaştırma işlemine gerek vardır.

Yukarıda verilen hammaddelerin bir kısmı (melas, nişasta hidrolizatlar gibi.) bakterilerin büyümesi için gerekli olan azot ve inorganik iyonları içermezler. Bu yüzden fermentasyon ortamına bunların da eklenmesi gerekir (23,29,30).

#### 2.1.4.2.2. Mikroorganizmanın Seçimi:

Fermentasyonda, sadece laktik asit oluşturan homofermentatif laktik asit bakterileri kullanılır. Kullanılan hammaddeye ve çalışma sıcaklığına göre seçilerek mikroorganizma farklıdır. Örneğin laktozu içeren süt ve peynir altı suyundan asit üretiminde Lactobacillus bulgaricus en iyisidir. Bundan başka Lactobacillus casei ve Streptococcus lactis de kullanılabilir.

Glukoz, sakkaroz veya maltozu içeren melas, mısır, patates, pirinç vb. nişastalarından asit üretiminde Lactobacillus delbrückii, Lactobacillus leichmannii, Streptococcus lactis, Lactobacillus pentosus, odun şekeri (ksiloz)nden asit üretiminde Lactobacillus pentoaceticus ve Lactobacillus brevis, artık sülfid liköründeki pentozlardan (ksiloz, arabinoz) asit üretiminde Lactobacillus pentosus ve Lactobacillus plantarum kullanılır (23,30).

### 2.1.4.2.3. Fermentör:

Laktik asit korozif bir madde olduğu için teknikte paslanmaz çelik (cam veya reçine kaplı) veya odun fermentörler kullanılır. Fermentörün çalışma hacmi 20,000-110,000 l arasında olabilir. Çalışma sıcaklığını sağlamak için genellikle fermentör içine yerleştirilmiş, içinden sıcak veya soğuk su geçirilebilen boru sistemlerinden faydalanılır. Fermentörde ayrıca karıştırma, doldurma ve boşaltma işlemleri için düzenekler de mevcuttur (16,26).

### 2.1.4.2.4. Fermentasyon Koşulları:

Fermentasyon koşulları Bölüm-(2.2.3) de geniş olarak açıklanmıştır.

### 2.1.4.2.5. Ürün elde etme, ayırma ve saflaştırma işlemleri:

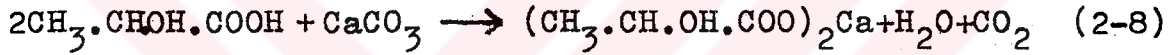
Bu bölümde genel olarak melas, peynir altı suyu ve nişastalı hammaddelerden laktik asit üretimi ve ayırma ve saflaştırma işlemlerinden bahsedilmiştir.

#### 2.1.4.2.5.1.Melastan Laktik Asit Üretimi:

Melas, şeker fabrikasyonu artığı, koyu kıvamlı ve renkli bir sıvıdır.Yaklaşık % 50 sakkaroz içerir,pH'ı ise 7'nin üzerindedir. Melasın, fermentasyondan önce şeker derişiminin % 20 nin altına, sülfürik asitle pH'ının 6-6.2 arasına düşürülmesi ve ayrıca bakterinin ihtiyacı olan besi maddelerince de takviye edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla katkı olarak malt çimi, hububat ezmesi, mısır ıslatma suyu, diamonyum fosfat kullanılır (7,19,30,35). Ayrıca bakterinin oluşan asitten zarar görmemesi için de belli miktar kalsiyum



karbonatın da ortama eklenmesi gerekir. Bu işlemler bittikten sonra ortam steril edilir ve steril olarak fermentöre aktarılır. Aşı olarak hazırlanmış saf laktik asit bakterisi % 5-10 oranında fermentöre eklenir. Kullanılacak bakteriye göre seçilen sıcaklıkta fermentasyon başlar, pH'ı 6 da tutmak için aralıklı olarak ortama kalsiyum karbonat veya kireç sütü eklenir. Bunun sonucu olarak asitin nötralleşmesinden dolayı aşağıdaki tepkimeye göre karbon dioksit gazı açığa çıkar:



Fermentasyon şeker derişimine göre 5-8 gün sürebilir. Karbon dioksit çıkışının sona ermesi fermentasyonun bittiğini gösterir. Ortama son kez ilave edilen kalsiyum karbonatla bütün laktik asit kalsiyum laktata dönüştürülür (Ca-laktat verimi % 85'in üzerindedir).

Fermentasyon bittikten sonra tüm mayşe, ortamdaki bakterilerin öldürülmesi ve proteinlerin çöktürülmesi için önce ısıtılır, sonra kalsiyum karbonatın fazlası, tortu maddelerinin ve biyolojik bulanıklıkların fermentasyon ortamından ayrılmasını sağlamak için filtreden geçirilir. Bu şekilde berraklaştırılmış ve Ca-laktat içeren ham sıvıdan amaca göre Ca-laktat veya laktik asit elde edilir.

Elde edilmek istenen Ca-laktat ise, ham sıvı, bir buharlaştırıcıda hafif vakum altında deriştirilir ve kristallendiriciye yollanır. Ca-laktat 10-12 saat içinde 10-15°C da kristalleşir, kristaller santrifüjle ayrılır. Kristaller yıkanır, renk giderici katılır, tekrar tekrar süzülür ve



yıkanır. Elde olunan Ca-laktat kristalleri ya USP sınıf laktik asit elde edilmesinde ya da doğrudan kurutulularak Ca-laktat olarak kullanılır.

Laktik asit piyasaya daha önce de anlatıldığı gibi değişik kalitelere sunulmaktadır, buna göre laktik asitin saflaştırma işlemleri de farklılıklar gösterir.

Teknik laktik asit üretimi için, vakumlu buharlaştırıcıda deriştirilen Ca-laktat çözeltisi kullanılır. Bu karışıma eşdeğer miktarda derişik sülfürik asit ilave edilir, laktik asit serbest hale geçer. Karışım vakum filtreden geçirilerek oluşan kalsiyum sülfat ve diğer tortu maddeleri ayrılır. Filtrat yine vakum altında % 70-80 lik laktik asite deriştirilir. Hammaddedeki suda çözünen proteinler, demir ve bakır bileşiklerinden ileri gelen renk maddeleri kömürle adsorbe edilir ve filtre edilerek ayrılır. Geri kalan tuzlar iyon değıştirici kolonundan geçirmek suretiyle alınır ve % 80 lik derişik ve temizlenmiş laktik asit elde edilmiş olur.

Gıda sanayiinde kullanılan ve bu nedenle daha saf olan laktik asidin eldesinde ilk kristallendirmeden sonra santrifüjden alınan yıkanmış katı Ca-laktat kristalleri kullanılır. Bu kristaller çok az su içinde çözünür ve eşdeğer miktarda  $H_2SO_4$  ilavesiyle  $CaSO_4$  çöktürülürken asit serbest duruma getirilir. Renk giderici kömür ve ağır metal iyonlarını gidericiler katılır, karışım çalkalanır, çökelek vakum filtreden ayrılır, laktik asit deriştirilir, saflaştırma yinelenir, en nihayet % 44-50 asit derişimine seyreltilerek satışa sunulur.

Çok yüksek saflıkta (USP ve plastik sınıf) laktik asit elde etmek için, yaş veya kuru ve USP saflığında Ca-laktattan faydalanılır. Ürün ayırma yukardaki gibidir. Deriştirilen laktik asit hammaddenin renk öğelerinden ve ağır metal iyonlarından aktif karbonla (Norit) arındırılır ve filtre edilir. Kalan diğer tuzlar iyon değiştiricide alınır ve daha sonra % 80 asitliğe deriştirilir. Kötü koku ve tad gidermede permanganat ve hidrojen peroksit kullanılır (7,16,30,36,38,).

Laktik asitin saflaştırılmasında daha değişik yöntemler de geliştirilmiştir. USP sınıf laktik asit elde-sinde bunlardan biri ham laktik asit çözeltisi içinden katalizleyici olarak  $H_2SO_4$  kullanılarak,  $100^\circ C$  da metanol buharı geçirilerek uçucu metil laktat esterinin oluşturul-masıdır. Oluşan bu ester metanol buharı içinde birlikte bu-har haline gelir ve metanol, su ve metil-laktat buhar karışı-mı soğutucuda yoğuşturulur. Kondenzat ısıtılarak metil-lak-tat hidrolize edilir ve metanol damıtılarak saf laktik asit elde edilir (16,30).

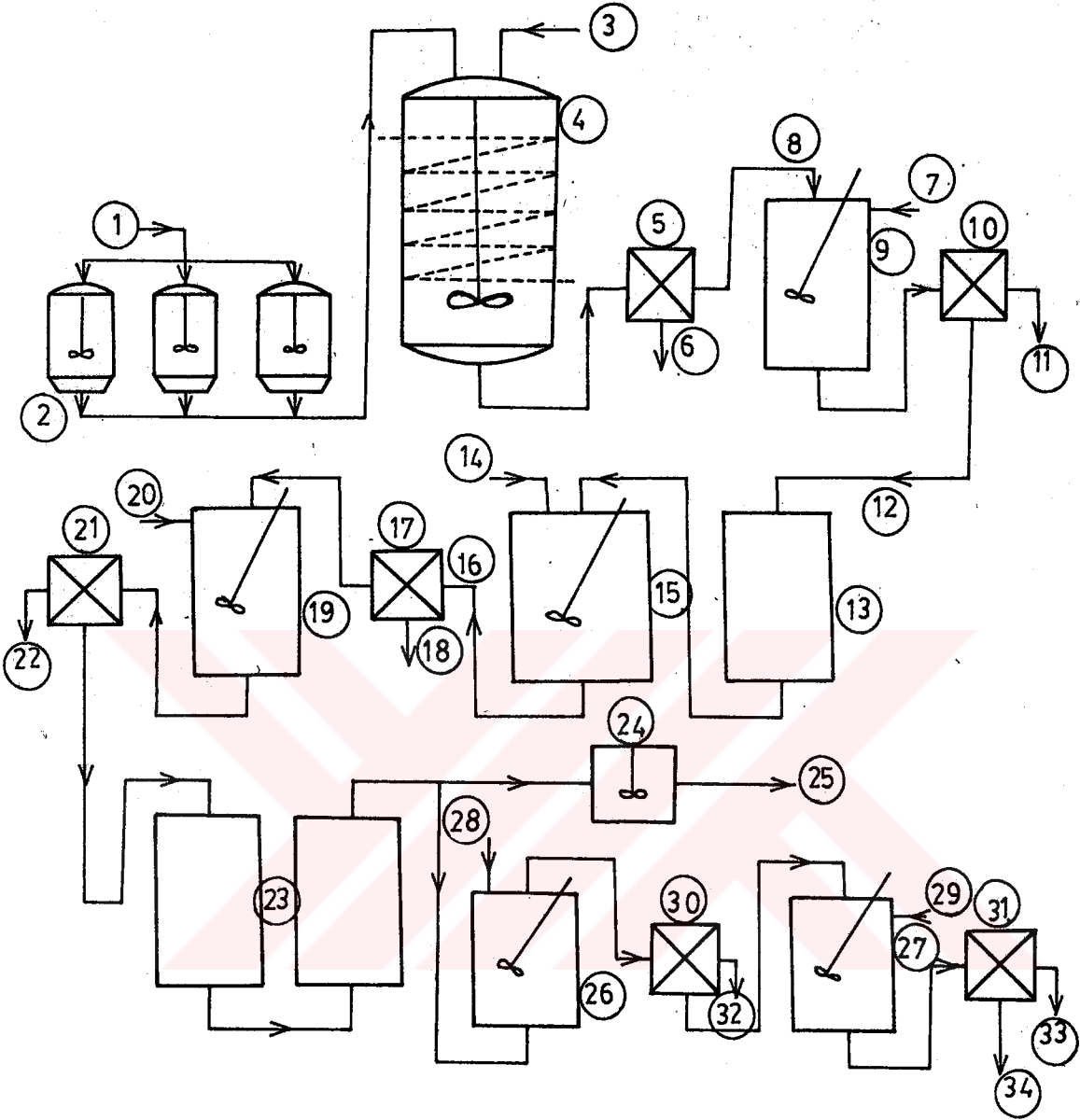
Saflaştırmada diğer bir yöntem de besin sınıfı laktik asit eldesinde ham laktik asit çözeltisinin izo-propil eter gibi bir çözücüyle ortamdan özütlenmesidir. Bu sü-reçte, derişik ham laktik asit çözeltisi bir sıvı-sıvı özüt-leme kolonunun tepesinden, izopropil eterde altından sürekl-i olarak beslenir. Laktik asit içeren izo-propil eter çözel-tisi bu kolonun tepesinden ikinci bir özütleme kolonuna pompalanır. Ters akımlı çalışan bu kolonda, suya izo-propil

eterdeki laktik asit geri özütlenir.Saf laktik asit çözel-tisi ikinci kolonun altından alınır,izo-propil eter tek-rar kullanılmak üzere birinci kolonun altına pompalanır. Özütlemede izopropil eterden başka çözücülerde kullanılmak-tadır (16,16,30,40).

#### 2.1.4.2.5.2.Peynir altı suyu ve sütten laktik asit üretimi:

Fermentasyonda peynir altı suyu doğrudan,süt ise kazeini çöktürülerek, hammadde olarak kullanılır.Kazeinin çöktürül-mesinde laktik asit kullanılır ve kazein içermeyen besi or-tamı yaklaşık % 4,6 laktoz, laktalbumin, vitamin G,mineral tuzları ve su içerir.Bu ortam laktik asit bakterilerinin substrat ve besin ortamıdır.Pastörize edilmiş besin ortamı L.bulgaricus içeren saf bakteri kültürüyle % 5-10 oranın-da aşılır. Fermentasyon 45-50°C da gerçekleşir.pH ın 6 nın altına düşmemesi için ortama aralıklarla kireç sütü verilir. 2 günün sonunda fermentasyon bitiminde laktalbu-min ısı yardımıyla çöktürülür.Daha sonra Ca-laktat çözeltil-si durultma ve süzme işleminden sonra aktif karbonla renk giderme, yine süzme ve buharlaştırma işlemlerinden geçirilir. Arkasından kristallendirme gelir.Daha sonraki işlemler Bölüm 2.1.4.2.5.1.de anlatıldığı gibi, elde edilecek laktik asitin kalitesine göre değişir (8,30).

Endüstride sürekli fermentasyonla laktik asit üretimi kısıtlıdır.Laktozdan sürekli fermentasyonla da laktik asit üretimi yapılmaktadır.Laktik asitin fermentas-yon ortamından geri kazanılmasında kullanılmayan artık şe-ker sorun yaratmaktadır (6,13,30,41).



Şekil-(2-1): Melastan laktik asit üretimi

1-Kültür, 2-Kültür tankları, 3-Melas+besi maddeleri+ kalsiyum karbonat+ su, 4-Fermentör, 5-Döner filtre, 6-Filtre artığı, 7-Renk giderici ve safsızlıkları adsorblayıcı maddeler, 8-Ham Ca-laktat çözeltisi, 9-1.Ağartma kabı, 10-Filtre pres, 11-Filtre artığı, 12-Ca-laktat çözeltisi, 13-Ca-laktat buharlaşma tankı, 14-Teknik sülfürik asit, 15-Laktik asite dönüştürme kabı, 16-Ham laktik asit çözeltisi, 17-Döner filtre, 18-Kalsiyum sülfat, 19-2.Ağartma kabı,

20-Renk ağartıcı ve safsızlıkları adsorblayıcı maddeler,  
21-Filtre pres,22-Filtre artığı,23-Asit buharlaştırıcılar,  
24-Su ekleme tankı,25-% 22 ve % 44 lük teknik laktik asit,  
26-27-3. ve 4.Ağartma kapları,28-,29-Renk ağartıcı ve safsızlıkları giderici adsorblayıcı maddeler , 30-,31-Filtre presler, 32-,33-Filtre artıkları,34-%50'lik besin sınıfı laktik asit.



2.1.4.2.5.3. Nişastalı hammaddelerden laktik asit üretimi:

Nişasta çok fazla sayıda glükoz molekülünün 1-4 veya 1-6 glikozidik bağlarla birbirine bağlanmasından oluşan bitkisel bir depo maddesidir. İki kısımdan oluşur: Amiloz denen ve nişasta tanesinin % 20-30'unu oluşturan kısım, glükoz molekülünün 1-4 glikozidik bağlarla bağlanması sonucu 250-300 kadar glükoz molekülünden meydana gelir ve parçalanması daha kolaydır. Dallanmamış bir yapıya sahiptir. Yalnız glükoz zinciri düz olmayıp helezon şeklinde kıvrımlıdır. Amilopektin olarak tanımlanan ve nişasta tanesinin asıl büyük bölümünü (% 70-80) oluşturan kısım, 1-4 glikozidik bağ yanında 1-6 bağlarını da içeren, dallanmış bir yapıdır ve bu nedenle parçalanması daha zordur. Her iki kısım da asitlerle tepkimeye girdiğinde yapı taşı olan glükoza parçalanır. Ancak teknikte daha çok enzimlerle parçalama uygulanır.

Amiloz ve amilopektin olarak tanımlanan iki kısımdan oluşan nişasta taneleri bitki tohum ve yumrularında depolanır. Tahıl taneleri ve patates yumruları nişasta içeren maddelere örnek verilebilir. Bu hammaddelerden laktik asit üretimi için önce nişastanın fermente olabilen şekerlere dönüştürülmesi gerekir.

Nişastanın şekerlendirilmesi için daha çok tahıl maltı kullanılır. Bu amaçla malt üretiminde küçük taneli ve proteince daha zengin arpa kullanılır ve çimlendirme, enzim miktarının ve etkinliğinin artması için en az iki hafta kadar sürer. Bu şekilde elde olunan yeşil malt,

yarısına kadar su doldurulmuş ve 45°C'a ısıtılmış mayşeleme kazanına malt sütü olarak verilir ve % 50'lik laktik asitle asitlendirilir. Daha sonra iyi bir karıştırma uygulanarak mayşe kazanına patates nişastası veya parçalanmış tahıl eklenerek karışım yarım saatlik bir süre içinde 70-80°C'a ısıtılarak nişastanın çirleşmesi sağlanır. Bu nişasta şekerlenme sıcaklığı olan 56-58°C'a soğutulduktan sonra yeniden malt sütü ilave edilir, sıcaklık her saatte 1°C arttırılarak 4-5 saatlik bir şekerlenme süresi beklenir. Şekerlendirme sona erince mayşe 80°C'da pastörize edilir ve su ilavesiyle şeker derişimi % 15'in altına düşürülür. Şekerin büyük kısmı glukoz, geri kalan ise maltozdır (30,36,38).

Şekerlendirme işleminin mantar amilazı kullanılarak yapılması da mümkündür. 100 kg nişastanın şekerlendirilmesi için 10 kg. arpa maltı veya 6-8 kg mantar maltı gerekir. Nişastanın asitle hidroliz edilerek hidrolizatın, laktik asit bakterilerince laktik asite fermentasyonu da teknikde uygulanmaktadır.

Fermentasyon Bölüm-(2.1.4.2.5.3)'de anlatılan melas fermentasyonu gibi gerçekleştirilir. Ürün olarak ya Ca-laktat ya da istenen kalitede laktik asit elde edilir.

## 2.2. Laktik Asit Bakterileri:

### 2.2.1. Tanımı ve Saflaştırılması:

Laktik asit bakterileri şeker ve şeker içeren karbonhidratları laktik asite dönüştüren bakteriler olarak tanımlanabilir. Genel olarak toprakta, karbonhidrat içeren, fermente olmuş

bitki ve hayvan ürünlerinde; süt ve süt mamülleri, hububat ve et mamülleri, bira, şarap, meyve ve meyve öz suları, sebze salamura ve turşuların da, sıcakkanlı hayvanların ve insanların ağız ve bağırsak bölgelerinde laktik asit bakterilerine rastlanır. Endüstriyel laktik asit üretimi için uygun laktik asit bakterileri, 40-45°C gibi yüksek sıcaklıklarda fermente olmuş hububat ve sebze ezmelerinden, malt çiminden, süt ürünlerinden izole edilebilir. İzolasyonun esası seçici besi yerleri kullanarak aranılan mikroorganizmanın önce zenginleştirilmesi ve sonra bu zenginleştirici kültürden saf kültürlerin elde olunmasıdır.

Düz veya eğik çubuk şeklinde olan, tek başına veya koloni oluşturarak yaşayan laktik asit bakterilerinin hepsi de gram-pozitifdir. Mikroaerofilik veya fakültatif aeropturlar. Gelişme sıcaklıklarına göre de termofil veya mezofil olan bu bakteriler genellikle hareketsiz, spor oluşturmayan, hepsi de katalaz negatif mikroorganizmalardır (4, 24, 25).

### 2.2.2. Sınıflandırılmaları:

Laktik asitin 1750 yılında izole edilmesi, ilk kez 1877'de saf laktik asit bakterisi kültürünün yetiştirilmesine karşın, laktik asit bakterilerinin gerçekçi bir tanımı ve sınıflaması ancak 20. yüzyılın başlarından sonra gerçekleştirilmiştir.

Bergey'e göre sistematikte "Lactobacteriaceae = Lactobacillaceae" familyasına dahil olan bu mikroorganizmalar "Lactobacillaceae" ve "Streptococceae" olmak üzere iki alt



takıma ayrılır. Bu sistematığe göre endüstriyel önemi olan laktik asit bakterileri "Lactobacilleae" takımının "Lactobacillus" cinsi bakterileridir (4).

Fermentasyon şekillerine göre homofermentatif ve heterofermentatif olarak ikiye ayrılan bu bakterilerden (Çizelge-(2-3) ve (2-4)) homofermentatif olanlar fermentasyon sonucu sadece laktik asit oluştururken, heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik asit yanında etil alkol, asetik asit, karbondioksit ve levülöz fermentasyonunda mannitol gibi ürünleri de oluştururlar.

Çizelge-(2-3) : Homofermentatif laktik asit bakterileri

---

A. En uygun gelişme sıcaklığı 28-32°C olanlar:

Lactobacillus casei

Lactobacillus leichmannii

Lactobacillus plantorum

B. En uygun gelişme sıcaklığı 37-62°C olanlar:

Lactobacillus delbrückii

Lactobacillus bulgaricus

Lactobacillus pentosus

Lactobacillus lactis

Lactobacillus helveticus

Lactobacillus bifidus

Lactobacillus thermophilus

---

Çizelge-(2-4) : Heterofermentatif laktik asit bakterileri

---

A.En uygun gelişme sıcaklığı 28-32°C olanlar

*Lactobacillus pastorianus*

*Lactobacillus buchneri*

*Lactobacillus brevis*

*Leuconostoc dextranicum*

B.En uygun gelişme sıcaklığı 35-40°C olanlar

*Lactobacillus fermenti*

---

"Streptococceae" takımından homofermentatif ve fakültatif aerob Streptococcus Lactis'de teknikte laktik asit üretiminde kullanılmaktadır.

Bir küf türü olan Rhizopus Oryzae de glukozdan sadece L(+) şekilde laktik asit üretmektedir, ama fermentasyon süresi uzun, verim düşük olduğu için teknikte pek kullanılmamaktadır(6).

### 2.2.3.Gelişme Koşulları:

Laktik asit fermentasyonunda kullanılan laktik asit bakterilerinin üremeleri ve üretebilmeleri için gerekli ve yeterli koşullar aşağıda verilmiştir.

#### 2.2.3.1. Sıcaklık:

Laktik asit fermentasyonu diğer fermentasyonlara nazaran daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleşir.Termofil laktik asit bakterileri için 40-50°C, mezofil laktik asit bakterileri için 30°C en uygun üreme sıcaklıklarıdır.Örneğin

L.delbrüeckii 40-44°C, L.bulgaricus ve L.pentosus 45-50°C, L.casei ve Streptococcus lactis 30°C de iyi gelişirler. Sıcaklığın nisbeten yüksek olması fermentasyon ortamında başka bakterilerin üremesini önler (24,30).

#### 2.2.3.2.pH:

Laktik asit bakterileri nötrale yakın pH'larda, pH=5.5-6 civarında iyi gelişirler.Fermentasyon sırasında zamanla asit üretimi arttıkça yüksek asitli ortamda bakteriler fermentasyonu tamamlayamazlar.pH'ın 4.5'un altına düşmesi hücre üzerine olumsuz etki yapar, ( verimi düşürür. Bu yüzden tepkime ortamında oluşan asitin nötralleştirilmesi, pH'ın nötrale yakın asit tarafta tutulması gerekir.Bunun için ya fermentasyon başlamadan ya da fermentasyon süresince pH düştükçe, ortama elde edilmek istenen laktat tuzuna göre  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH (oluşan tuz sodyumlaktat)  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (oluşan tuz kalsiyum laktat),  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NH}_3$  çözeltisi (oluşan tuz amonyum laktat) gibi nötralle edici maddeler ilave edilir (30,36,38).

#### 2.2.3.3.Şeker Derişimi:

Fermentasyonda, şeker derişimi kullanılan hammadde ve fabrikasyon koşullarına göre % 5-15 arasında değişmektedir. % 15 ten daha yüksek şeker derişimlerinde ürün ve substrat inhibisyonları mikroorganizmanın etkinliğini kaybetmesine neden olmakta, ürün ayırma zorlaşmakta, % 5 ten daha düşük şeker derişimlerinde ise saflaştırma işlemleri nedeniyle masrafların birim ürüne oranı artmakta,maliyeti yükselmektedir (30,36,38).

#### 2.2.3.4. Havanın Etkisi:

Laktik asit bakterileri çoğunlukla mikroaerofilik veya anaeropturlar. Teknik laktik asit üretiminde kullanılan türlerden yalnızca Streptococcus lactis fakültatif aeroptur. Bu nedenle laktik asit fermentasyonu için hava veya havalandırma gereksizdir. Hatta fermentasyon ortamının hava ile temasını kesmek için fermentörden karbondioksit ve azot gibi inert gazlar geçirilmektedir(11,18,30,36).

#### 2.2.3.5. Besin Maddeleri:

Besin maddeleri bakımından laktik asit bakterileri oldukça aşırı istek gösteren mikroorganizmalardır. Özellikle bazı amino asitlerin, riboflavin, nikotinik asit, pantotenik asit, biyotin, tiyamin gibi bazı vitaminlerin,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $PO_4^{=}$  ve  $Ac^-$  gibi iyonların ortamda mutlaka bulunması gerekir (12,23,28,36).

Melas, peynir altı suyu gibi doğal besin ortamları ile yapılacak çalışmalarda, bakterinin üremesi ve yüksek verim için, ortama eksik olan besin maddelerinin dışardan ilave edilmesi gerekmektedir (7,19,35).

Sentetik besin ortamlarının hazırlanmasında ise karbon kaynağı olarak glukoz, sakkaroz, laktoz gibi bir şeker, laktik asit bakterilerinin üremesi ve gelişmesi için gerekli amino asit, vitamin ve tuzları içeren kompleks yapıda pepton ve maya özütü; fosfat, sülfat, asetat tuzları, magnezyum, sodyum, potasyum, mangan gibi metal iyonları belirli oranlarda kullanılmaktadır (10,28,30,36,37).

#### 2.2.4. Aktifleştirilme ve Saklanması:

Yüksek verimlilik elde edebilmek için saf laktik asit bakterisi kültürüyle çalışmak gerekmektedir. Bunun için steril koşullarda ve dikkatli bir çalışma ile kültürün bulaşma olmaksızın üremesi sağlanmalıdır.

Agarlı katı besin ortamlarında mikroorganizmanın iyi üretilmesi mümkündür, ancak bakteri bu ortamda uzun süre olarak saklanamaz, sık aralıklarla aktarım yapılmasını gerektirir.

Dondurarak saklama (Lyophilization) laktik asit bakterilerinin saklanması için iyi bir yöntem olabilir fakat bakterinin yüksek ölüm hızlarıyla karşılaşılır.

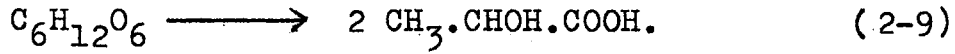
Bakterilerin aktifliğini yitirmeden en iyi şekilde saklanması için en uygun yöntem olarak, bakterilerin ortam asitliğinden etkilenmemeleri için kalsiyum karbonat ile tamponlanmış, düşük şeker derişimi içeren yapay besi ortamlarında veya kaymağı alınmış sütlü besin ortamında üretildikten sonra, buzdolabında  $+4^{\circ}\text{C}$ 'da 1-2 ay saklanabilmeleri önerilebilir (6).

Bu şekilde saklanan kültürün aktifleştirilerek yeniden kullanılabilmesi için, steril olarak hazırlanmış, uygun besin ortamına, yine steril olarak, 1/10 oranında saklanan kültürden eklenir, uygun sıcaklık ve karıştırma hızında havasız ortamda üremenin olması beklenir. Bakterilerin üreyerek kültürün aktifleştirilmesi 2 gün sürer.

### 2.3.Laktik Asit Fermentasyonu:

#### 2.3.1. Glukozun laktik asite dönüşümünün biyokimyası:

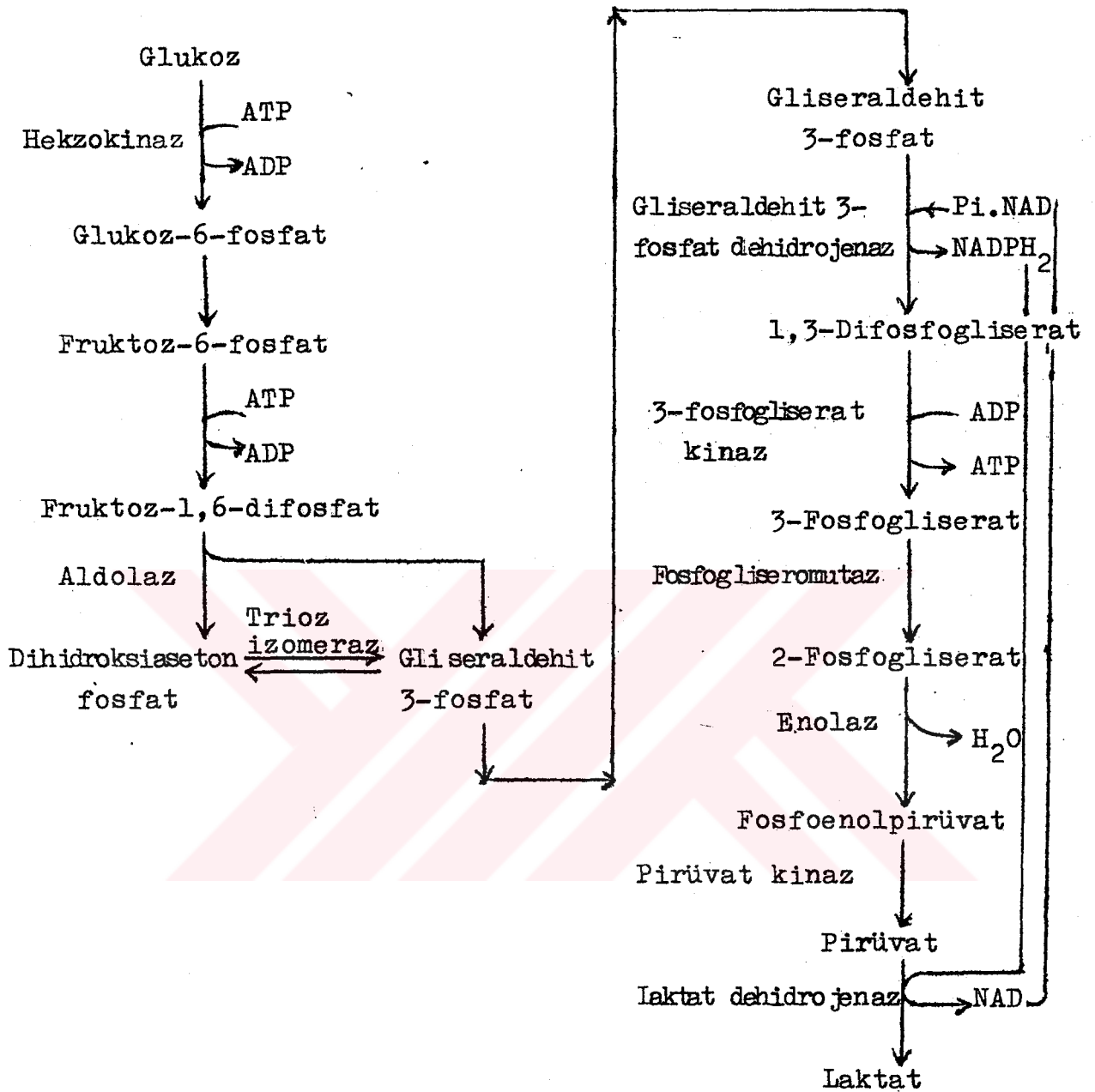
Homofermentatif laktik asit bakterileri, glukozun fermentasyonu sırasında kuramsal olarak yalnızca laktik asit oluştururlar. Bu fermentasyonun genel formülü;



olarak gösterilirse de, bu kadar kısa ve basit değildir.

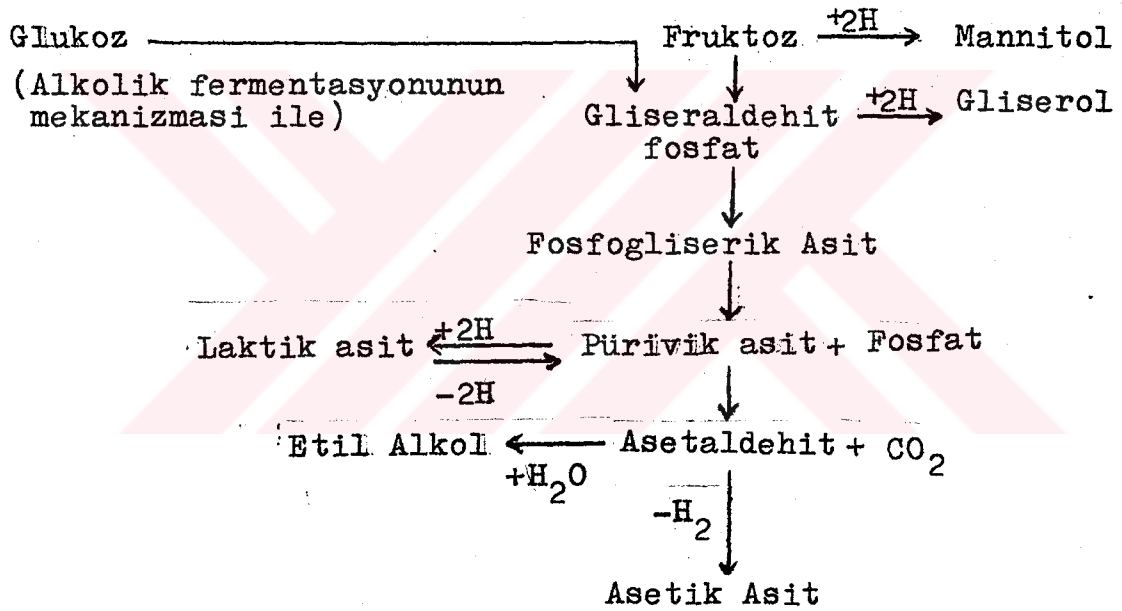
Homofermentatif laktik asit fermentasyonunda, şeker, başlangıçta alkol fermentasyonunda olduğu gibi "Embden Mayerhoff Parnas (EMP) yolu" üzerinden pürivik asite dönüştürülmektedir. Ancak çoğu laktik asit bakterisi karboksilaz" enzimine sahip olmadığından, oluşan pürivik asiti dekarboksile ederek asetaldehite dönüştüremez. Tersine "laktik dehidrojenaz" enzimine sahip olan bu mikroorganizmalar pürivik asiti laktik asite indirgerler ( Şekil-(2-2) ).

Oluşan laktik asitin şekli pürivik asite etki eden "laktik dehidrojenaz" enziminin tipine bağlıdır. Eğer etkin enzim L(+) şeklinde ise, oluşan asit de aynı şekildedir. Etkin enzim türü ise mikroorganizmaya bağlıdır. Örneğin "Streptococcus" ve "Bacillus" türleri L(+), "Leuconostoc" ve bazı "Laktobacillus" türleri D(-), fakat çoğu laktik asit bakterileri, bu ikisinin karışımı "laktik dehidrojenaz" enzimine sahiptir (4,29,30).



Şekil-(2-2): Homofermentatif laktik asit bakterilerinin EMP yolu üzerinden laktik asit üretim şeması.

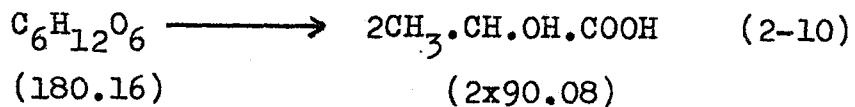
Heterofermentatif laktik asit bakterilerinin kullanıldığı fermentasyonlarda durum daha değişiktir, fermentasyon sonucu laktik asit yanında önemli miktarlarda etil alkol, asetik asit, gliserin, karbon dioksit ve mannit de oluşmaktadır. Bunlarda şekerin parçalanması daha değişik şekilde olmaktadır. Nelson ve Werkman (12,22,29,30)'ın çalışmalarına göre heterofermentatif laktik asit fermentasyonu şu yolla gerçekleşmektedir (Şekil-(2-3) ).



Şekil-(2-3): Heterofermentatif laktik Asit Bakterilerince yapılan laktik asit fermentasyonu.

### 2.3.2. Verim Hesabı:

Glukozun laktik asite dönüşümü tepkimesinde bir mol glukozdan kuramsal olarak iki mol laktik asit oluşur:

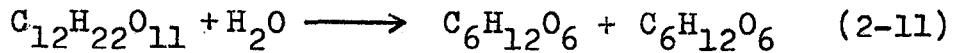




Stokiyometrik olarak 1 gram glukozdan 1 gram laktik asitin oluşması gerekir. Pratikte bu pek gerçekleşmez, ancak kuramsal verimin %85-90'ı elde edilebilir. Bu da oldukça yüksek bir verimdir. Bakterinin metabolizmasında karbon kaynağı olarak besin ortamındaki glukozu kullanması çalışma sıcaklığında bir miktar ürünün buharlaşması, saflaştırma işlemlerinden dolayı ürün kayıpları gibi nedenler verimin düşmesine sebep olarak sayılabilir. Eğer heterofermentatif laktik asit bakterileri fermentasyonda kullanılmışsa, fermentasyon sonucu laktik asit yanında etil alkol, asetik asit vb. maddeler de oluşacağından verim daha da düşer.

Sakkaroz veya laktoz gibi bir disakkarid laktik asit fermentasyonunda kullanılıyorsa, uygun laktik asit bakterileri salgıladığı enzimlerle bu şekerleri basit yapıllı monosakkaridlere (glukoz, fruktoz, galaktoz vb.) dönüştürerek fermentasyonda kullanırlar, verim teorik verimin % 85'ine ulaşır.

Laktoz veya sakkarozun monosakkaridlere ayrışması şöyle gösterilebilir.



Laktoz	Glukoz	Galaktoz
(Sakkaroz)	(Glukoz)	(Fruktoz)

Nişasta içeren hammaddeler için öncelikle nişastanın enzim veya asitlerle hidroliz edilerek monosakkaridlere dönüşmesi sağlanır. Daha sonra laktik asit bakterileri

bu monosakkaridleri laktik asite dönüştürürler. Bu nedenle nişasta içeren hammaddeler de verim daha da düşüktür. Çünkü nişastanın hidrolizi sırasında madde kayıpları ortaya çıkmaktadır.



### 3.DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ

#### 3.1. Mikroorganizma:

Çalışmalarda İngiliz Endüstriyel Bakteri Koleksiyonundan liyofilize olarak NRRL B445 koduyla getirtilen L.delbrüeckii kullanılmıştır.

Lactobacillus delbrüeckii'nin en kolay şekilde doğal kaynaklardan izolasyonu fermente maltozdan sağlanmaktadır. Daha sonra bakterinin glukozlu besin ortamına alışması sağlanır, doğrudan glukozlu ortamdaki izolasyon yapılamaz(6).

Lactobacillus delbrüeckii çubuk şeklinde, 2-9 µm uzunluğunda, hareketsiz, 40-45°C gibi yüksek sıcaklıklarda ve nötrale yakın pH'larda iyi gelişen "lactobacillus" cinsi homofermentatif bir bakteridir, özel besin istekleri fazla olan bu bakteriler glukozu yüksek verimde sadece laktik aside dönüştürürler (4,6).

Kullanılan mikroorganizma besin ortamına aşılandıktan sonra 4-5 saat sonra üssel üreme bölgesine ulaşmakta, mikroorganizma'nın çoğalması ve ürün oluşumu birbirine paralel gitmektedir. Mikroorganizma ancak % 2.5-3 asitliğe dayanabildiği için ve ayrıca zaman ve kolaylık açısından kinetik parametrelerin denenmesinde şeker derişimleri 20 g/l olarak alınmıştır.

#### 3.2. Üretim Yöntemi:

Bakteri kültürünün, laboratuvar koşullarında en iyi şekilde üretilmesi sağlandıktan sonra deneysel çalışmalara geçilmiştir. Gerek mikroorganizma üretiminde, gerek deneysel

çalışmalarda kullanılan besin ortamının mutlaka steril olması gerekmektedir. Fermentasyon ortamı otoklavda, basınçlı su buharı ile fiziksel olarak sterilizasyon yapılmaktadır. Ayrıca pH'ı derişik sülfürik asit çözeltisi ile 2'ye ayarlanmış % 70'lik alkol çözeltisi de bir kimyasal sterilleyici olarak bazı durumlarda kullanılmıştır.

Saf kültür olarak liyofilize halde getirtilen Lactobacillus delbrückii önce petri tabakları ve tüplerde agarlı katı ortamlarda uygun sıcaklıkta ve CO<sub>2</sub> atmosferinde üretilerek aktifleştirilmiş, bu ortamlardan da sıvı tüp ve erlenlere aktarılmıştır. Sürekli aktarmalarla kültürün katı ve sıvı besin ortamlarına alışması sağlandıktan sonra deneysel çalışmalara geçilmiştir.

Çalışmalarda laktik asit bakterilerinin üremeleri ve gelişmeleri için gerekli besin maddelerini içeren yapay besin ortamlarının hazırlanmasında Friedman ve Gaden(10), Gillies(11), Finn, Halvorson ve Piret(18)'in çalışmalarından yararlanılmıştır.

### 3.3.Aşılama

Hangi tepkime ortamında çalışılacaksa, önceden erlen-de, o tepkime ortamının bileşimini içeren sıvı ortamda, mikroorganizma'nın üremesi sağlanır. Bakteri kültürü üssel üreme bölgesine gelince, sterillik bozulmadan tepkime kabına belli miktarda aktarılır. Tepkimenin başlangıcında, ortamdaki mikroorganizma miktarı ve ortamın asitliği tayin edilir.

Bazı çalışmalar ise yarı kesikli düzende yapılmıştır. Yarı kesikli düzende fermentörde tepkime tamamlandıkça, tepkime kabında belli bir miktar aşı olarak kalacak şekilde, tepkime çözeltisinin büyük kısmı fermentörden alınmış, yeni besin ortamı kalan aşının üzerine ilave edilmiştir. Bu işlem birkaç kez tekrarlanmıştır.

Yüksek verimde fermentasyonun sağlanabilmesi için başlangıç mikroorganizma derişiminin belli bir değerde olması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar en uygun miktarın 20 g/l şeker derişimi için 0.10-0.12 g/l olduğunu göstermiştir.

#### 3.4. Deney Düzenegi:

Deneysel çalışmaların bir kısmı 250 ml'lik erlenlerde 100-150 ml çalışma hacminde, sabit karıştırma hızı ve sıcaklıkta çalışan çalkalayıcı su banyosunda, diğerleri de Şekil-(3-1)'de gösterilen deney düzeneginde yapılmıştır.

Deney parametrelerinin denendiği asıl deney düzenegi 1 l hacminde pyrex camdan yapılmış bir fermentör ile, buna ait çeşitli ek parçalar, bağlantı elemanları ve denetim birimlerinden oluşmaktadır.

Fermentör kapağı paslanmaz çelikten olup, kapak üzerinde giriş-çıkış boru bağlantıları, karıştırıcı mil yatağı, pH elektrodu ve hava filtresi yer almaktadır. Karıştırıcı olarak paslanmaz çelikten yapılmış dört kanatlı karıştırıcı kullanılmıştır. Fermentörün içinde vorteks oluşumunu önleyen tampon levha vardır. Fermentörün

çalışma hacmi 750-800 ml'dir.

Sabit sıcaklıkta (T:40-42°C) ısıtılan bir su banyosunda bulunan fermentör,kapak üzerine yerleştirilmiş sterillenebilir pH elektrodu ile pH metreye bağlanmıştır. pH kontrollü çalışmalarda düzeneğe, pH'ın düşmesini önlemek için sisteme verilecek sodyum hidroksit çözeltisinin bulunduğu bir tank, sisteme verilen bazın hacmini ölçmeye yarayan bir dereceli kap(büret) ve fermentöre aktaran bir pompa eklenmiştir.

Hava ile fermentasyon ortamının temasını kesmek için tepkime kabına belli akış hızında, steril bir filtreden geçirilerek içindeki safsızlıklardan arındırılmış karbondioksit gazı yollanmıştır.

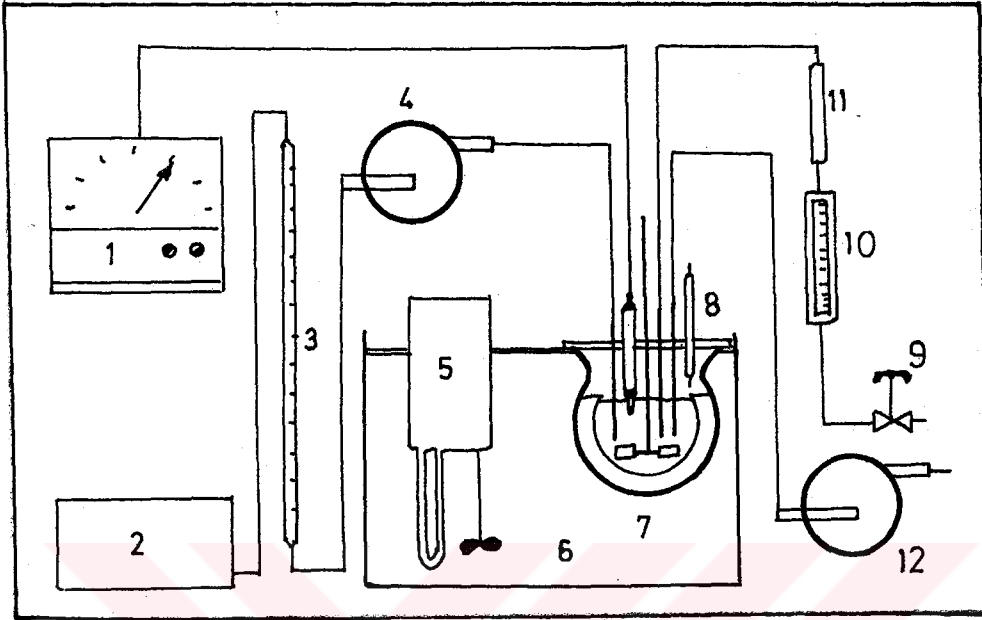
Karıştırıcı motor çeşitli karıştırma hızlarına ayarlanabilir cinstendir.

### 3.5.Analiz Yöntemleri:

Fermentasyon ortamından belirli zaman aralıklarında alınan örnekler için aşağıdaki analizler yapılarak veriler elde edilmiştir.

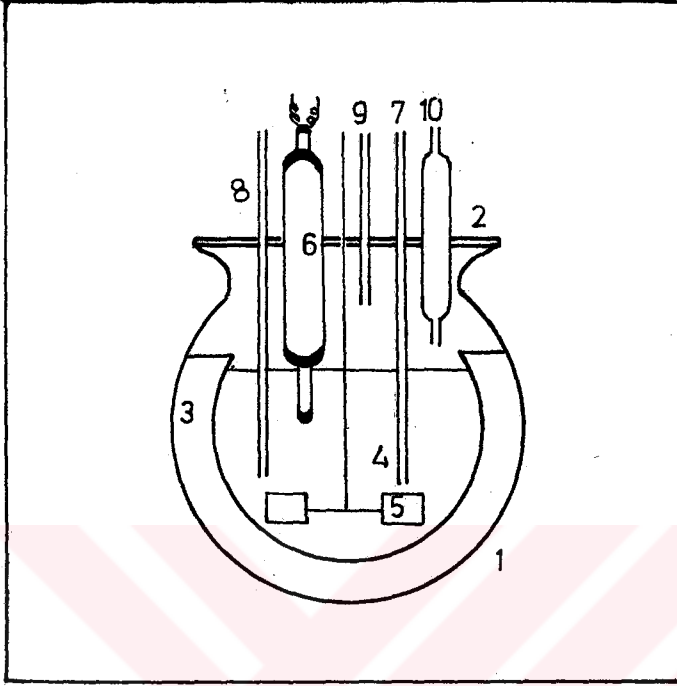
Toplam asitlik: 1 ml örnek üzerinden ve titrimetrik olarak yapılır.Sonuç oluşan laktik asit cinsinden g/l olarak verilir (EK A.).

Mikroorganizma derişimi: Doğrudan veya kör çözeltili ile seyreltilmiş örnek üzerinden spektrofotometrik yöntemle tayin edilir. Sonuç mikroorganizmanın yaş ağırlık cinsinden derişimi, g mo./l olarak verilir (EK C.).



Şekil-(3-1): Deney düzeneği

- 1-pH metre
- 2-1 N'lik sodyum hidroksit çözeltisi tankı
- 3-Büret (50ml'lik)
- 4-Sodyum hidroksit çözeltisi yollama pompası
- 5-Isıtıcı
- 6-Sabit sıcaklık su banyosu
- 7-Fermentör
- 8-Fermentör kapağı
- 9-Karbon dioksit tüpünün vanası
- 10-Rotametre
- 11-Filtre
- 12-Örnek alma pompası



Şekil-(3-2): Fermentör

- 1-Tepkime kabı (Fermentör)
- 2-Fermentör kapağı
- 3-Tampon levha
- 4-Karıştırıcı mili
- 5-Karıştırıcı
- 6-pH elektrodu
- 7-Fermentör sıvı giriş ve çıkış borusu
- 8-Sodyum hidroksit çözeltisi ekleme borusu
- 9-Karbon dioksit yollama borusu
- 10-Filtre



Kalsiyum laktat derişimi: Tepkime ortamından alınan örneğın belirli sıcaklıkta iletkenliğının ölçülmesiyle bulunur, sonuç kalsiyum laktat veya laktik asit cinsinden, g/l olarak verilir (EK B.).

Glukoz derişimi: Tepkime ortamından alınan örneğın belli oranda seyreltilerek GOD-Perid enzim çözeltisiyle, ortamdaki glukozun glukonik aside yükseltgenmesi ve spektrofotometrik yöntemle absorbans ölçümü ile bulunur. Sonuç glukoz cinsinden, g/l olarak verilir (EK D.).

## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR

### 4.1. Genel:

Lactobacillus delbrueckii kullanılarak karıştırmalı kimyasal tepkime kabında yapılan çalışmalar glukoz ve sakkarozun laktik asite dönüşümünü ve bu dönüşümü etkileyen parametrelerin denenmesini içermektedir. Ayrıca yaklaşık % 50 sakkaroz içeren melas da substrat ve besin ortamı olarak denenmiş, verim yükseltme çalışmaları yapılmıştır. Böylece Türkiye'de bol miktarda bulunabilen melas gibi bir artığın laktik asit gibi değerli bir ürüne dönüştürülebilmesinin mümkün olacağı gözlenmiştir.

Çalışmaların sonunda, sakkarozun glukozu nazaran laktik asite dönüşüm hızının daha düşük olması göz önüne alınarak, sakkarozun invert şeker (% 50 fruktoz+% 50 glukoz)'e dönüştüğü varsayılarak bu substratın laktik asit üretimine etkisi incelenmiştir. Sonuçta invert şekerin glukozu yakın, yüksek verimde laktik asite dönüştüğü gözlenmiştir.

Çalışmalar tepkime kinetiğini içerdiği için, zaman, çalışmalarda bağımsız değişken olarak ele alınmış, zaman birimi olarak da "saat" kullanılmıştır. Deneysel verilerin bir kısmı doğrudan kullanılarak, bir kısmı da uygun kinetik verilere dönüştürülerek grafiğe aktarılmıştır.

### 4.2. Üretim Parametreleri:

Kesikli karıştırmalı kimyasal tepkime kabında (fermentörde), seçilen tepkime ortamında mikroorganizma ve asit üretim

hızını etkileyen çeşitli parametreler glukoz ve sakkaroz için incelenmiştir.

Substrat olarak glukozun kullanıldığı çalışmalarda incelenen parametreler besin ortamı bileşenleri, başlangıç glukoz(substrat)derişimi, pH, pH kontrollü glukoz derişimi, sıcaklık, karıştırma hızı,aşı derişimidir.

Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmalarda incelenen parametreler ise başlangıç sakkaroz (substrat) derişimi, pH, sıcaklıktır.

Fermentörde yapılan çalışmalarla üretim parametrelerinin denenmesine geçmeden önce, fermentasyon için uygun sentetik besin ortamı tayin edilmiştir.

#### 4.3.Glukozlu Besin Ortamı Çalışmaları:

##### 4.3.1.En Uygun Ortam Bileşimi:

Laktik asit bakterilerinin üremesi için besin ortamında bazı vitamin, aminoasit ve tuzların mutlaka bulunması gerekir (Bölüm 2.2.3.5.).Bunların bir kısmı maya özütü,pepton gibi kompleks maddelerle, tuzlar ise doğrudan belli miktarlarda besin ortamına ilave edilirler.

Uygun besin ortamının saptanması için steril olarak hazırlanmış 150 ml çalışma hacmine sahip, 250 ml'lik erlenlerle sabit sıcaklık ve karıştırma hızında çalışan çalkalayıcı su banyosunda bir dizi deney yapılmış ve sentetik ortam bileşenlerinin mikroorganizma çoğalma ve asit üretimine etkileri gözlenmiştir.

Şekil-(4-1)'e bakılacak olursa, maya özüksüz ortamda mikroorganizma ve asit üretimi peptonsuz ortama nazaran daha yavaş ve düşüktür. 200 saat sonunda maya özüksüz ortamda 1.4 g/l mikroorganizma ve 11.3 g/l laktik asit, peptonsuz ortamda ise 2.1 g/l mikroorganizma ve 13.5 g/l laktik asit üretimi gözlenmiştir. Buradan mikroorganizmanın büyümesi için maya özütüne daha çok gereksinim duyduğu düşünülebilir.

Şekil-(4-2)'de peptonsuz ortamda maya özütü derişiminin mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızlarına etkisi gösterilmiştir. Maya özütü derişiminin 10 g/l'ye kadar mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızlarını arttırıcı etkisinin fazla olduğu, 10 g/l den sonra ise üretim hızlarını arttırıcı etkisinin azaldığı söylenebilir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda besin ortamına 10 g/l maya özütü konmuştur.

Pepton derişiminin üretim hızlarını arttırıcı etkisi maya özütüne göre daha düşüktür. 5 g/l pepton derişimi asit ve bakteri üretim hızının en çok arttığı derişim olduğu için yine deneysel çalışmalarda besin ortamına 5 g/l pepton konmuştur (Şekil-(4-3)).

Deneysel çalışmalarda kullanılan uygun besin ortamı bileşenleri ve oranları Çizelge-(4-1)'de gösterilmiştir.

Çizelge-(4-1): Laktik asit fermentasyonunda kullanılan  
en uygun sıvı besin ortamı

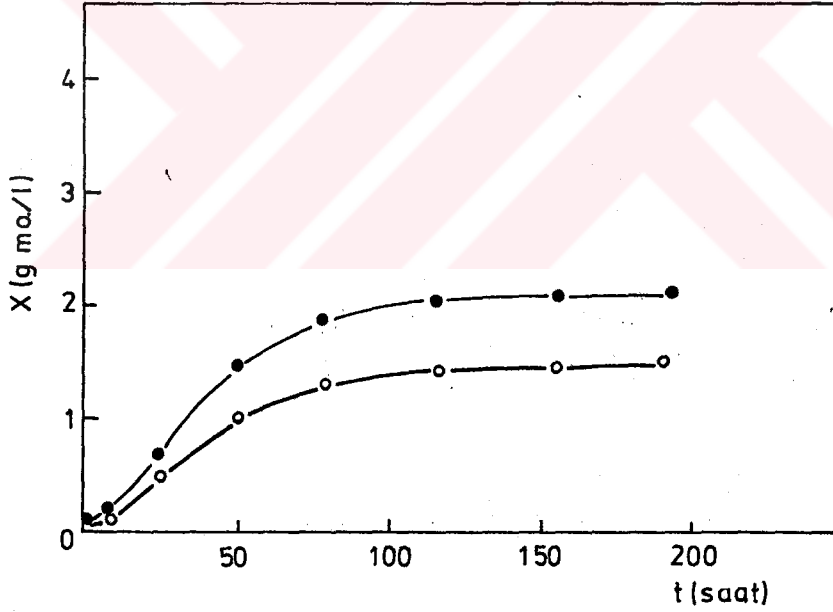
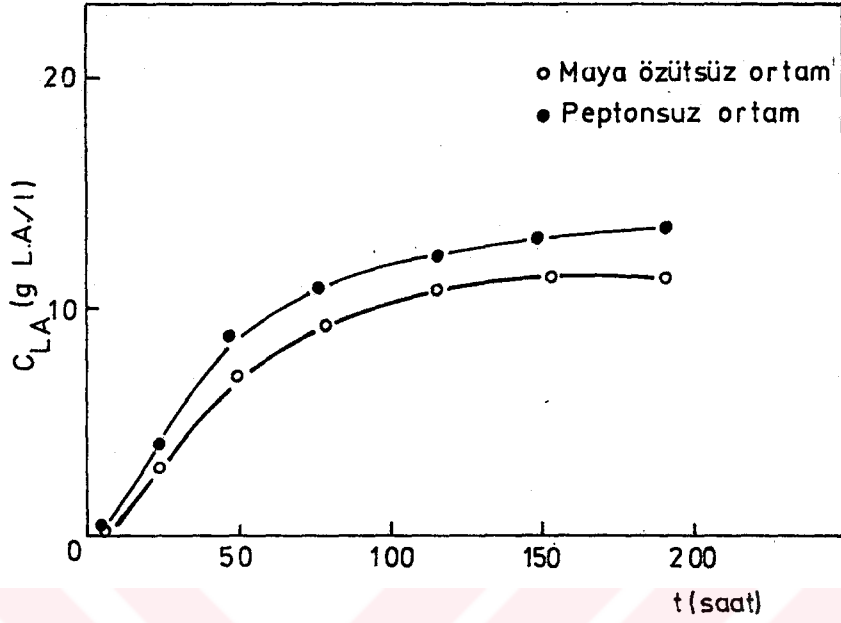
Bileşen	Derişim ( g/l )
Maya özütü	10.0
Pepton	5.0
di-Amonyum hidrojen sitrat	2.0
di-Potasyum hidrojen fosfat	2.0
Sodyum asetat	1.0
Mağnezyum sülfat(7 kristal sulu)	0.2
Mangan sülfat	0.05

Besin ortamına ilave edilen tuzlar mikroorganizmanın çoğalması ve metabolik faaliyetlerini sürdürmesi için gerekli azot, fosfat, sülfat,asetat,  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  kaynaklarını içermektedir.

Mikroorganizmanın karbon kaynağı olarak en rahat kullanabildiği ve en kısa sürede maksimum mikroorganizma ve ürün derişimlerinin elde edilebildiği substrat olan glukozun da mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızlarına etkileri incelenmiştir.

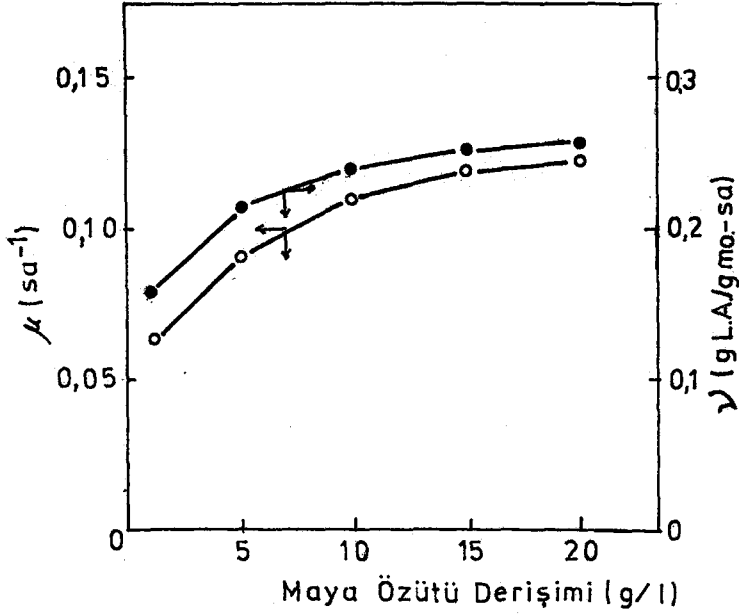
4.3.2.Başlangıç Glukoz Derişiminin Etkileri:

Şekil-(4-4) başlangıç glukoz derişimi arttıkça mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızlarının arttığını,100 g/l başlangıç glukoz derişiminde maksimum üreme ve üretim hızlarına ulaşıldığını, daha yüksek şeker derişimlerinde ise

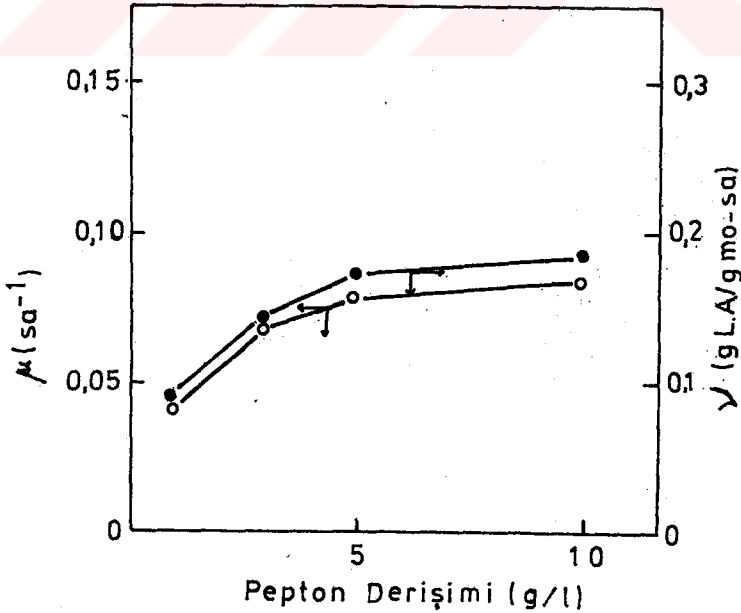


Şekil-(4-1): Maya özüksüz ve peptonsuz ortamlarda mikroorganizma ve ürün eğrileri

T:42°C, K.H.:200 rpm, (g/l) olarak: glukoz:20.0, maya özütü veya pepton: 5.0, di-potasyum hidrojen fosfat:2.0, di-amonyum hidrojen sitrat:2.0, sodyum asetat:1.0, magnezyum sülfat:0.2, mangan sülfat:0.05.



Şekil-(4-2): Maya özütü derişiminin mikroorganizma ve asit oluşum hızlarına etkisi. (T:42°C, K.H.: 200 rpm, (g/l) olarak glukoz:20.0, di-potasyum hidrojen fosfat:2.0, di-amonyum hidrojen sitrat:2.0, sodyum asetat:1.0, Mg<sup>++</sup>:0.2, Mn<sup>++</sup>:0.05 ).  
o:Mikroorganizma, ●:Laktik asit



Şekil-(4-3): Pepton derişiminin mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisi. (T:42°C, K.H.:200 rpm, (g/l) olarak glukoz:20.0, di-potasyum hidrojen fosfat: 2.0, di-amonyum sitrat:2.0, sodyum asetat:1.0, Mg<sup>++</sup>:0.2, Mn<sup>++</sup>:0.05).  
o:Mikroorganizma, ●:Laktik Asit

hızların düştüğünü göstermektedir.Çizelge-(4-2)den de görüldüğü gibi yaklaşık 40 g/l glukoz derişiminden sonra plato bölgesine ulaşılmaktadır.

Çizelge-(4-2): Çeşitli başlangıç glukoz derişimlerinde elde edilen maksimum mikroorganizma,ürün derişimleri ve ürün verimi

$S_{Go}$ (g G/l)	$X_m$ (g mo./l)	$P_m$ (g L.A./l)	$Y_{P/S_{Go}}$
10	1.9	9.0	90
20	2.6	17.0	85
40	3.4	24.4	61
60	3.7	25.6	42
80	3.9	26.8	33
100	3.8	27.2	27
120	3.4	23.0	19
150	3.0	20.0	13

Çizelge-(4-2)'ye dikkat edilecek olursa başlangıç glukoz derişiminin artmasına rağmen ortamdaki laktik asit derişiminin fazla artmadığı, 27.2 g/l nin üzerine çıkmadığı gözlenir. Bunun nedeni L.delbrüeckii'nin ortamdaki ancak 25-30 g/l laktik asite dayanabilmesi, daha yüksek laktik asit derişimlerinde mikroorganizmaların etkinliğini yitirmesidir.

Bu durum göz önüne alınarak çeşitli parametrelerin denenmesinde glukoz derişimi 20 g/l alınmıştır.



20 g/l substrat derişiminde hem bakteri oluşturduğu laktik asitten etkilenmemekte hem de fermentasyon süresi daha kısa olmaktadır.

L.delbrüeckii'nin kullanıldığı laktik asit fermentasyonunda kesikli düzende çalışan karıştırmalı tepkime kabı için mikroorganizma <sup>özgül</sup> üretim hızının başlangıç glukoz derişimi ile değişiminin matematiksel incelenmesinde "Monod Modeli" kabul edilerek  $K_s$  (Monod sabiti, g glukoz/l) ve  $\mu_{max}$  (maksimum özgül büyüme hızı,  $sa^{-1}$ ) değerleri bulunmuştur.

$$\mu = \frac{\mu_{max} S_{Go}}{K_s + S_{Go}} \dots \dots (1)$$

Bu ifadenin doğrusallaştırılmasıyla elde edilen denklik

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_s}{\mu_{max}} \frac{1}{S_{Go}} \dots \dots (2)$$

şeklindedir (Lineweaver-Burke doğrusallaştırılması).

$(1/\mu, sa)$ 'ye karşı  $(1/S_{Go}, 1/g \text{ glukoz})$  grafiğe geçirilerek,  $K_s$  ve  $\mu_{max}$  değerleri bulunmuştur ((şekil-(4-5)). Bu değerlerin bulunmasında substrat ve ürün inhibisyon etkileri göz önüne alınmamıştır.

Doğrunun y eksenini kestiği noktadan  $\mu_{max}=0.15sa^{-1}$ , doğrunun eğiminden  $K_s/\mu_{max}=73 \text{ g glukoz-sa/l}$  ve  $K_s=10.5 \text{ g glukoz/l}$  bulunmuştur.

Mikroorganizma derişimi ile besin yerindeki üremeyi sınırlayıcı substrat (glukoz) derişimi arasındaki sabit oran, üreme verimi;  $Y_{X/S_{Go}}$  olarak tanımlanır.

$$Y_{X/S_{Go}} = - \frac{\Delta X}{\Delta S_G} = \frac{X - X_0}{S_G - S_{Go}} \quad \text{----- (3)}$$

Üremeyi sınırlayan substratın tümünün harcandığı durumda maksimum mikroorganizma derişimine ulaşılacağı düşünülürse:

$$X_m - X_0 = Y_{X/S_{Go}} \cdot S_{Go} \quad \text{----- (4)}$$

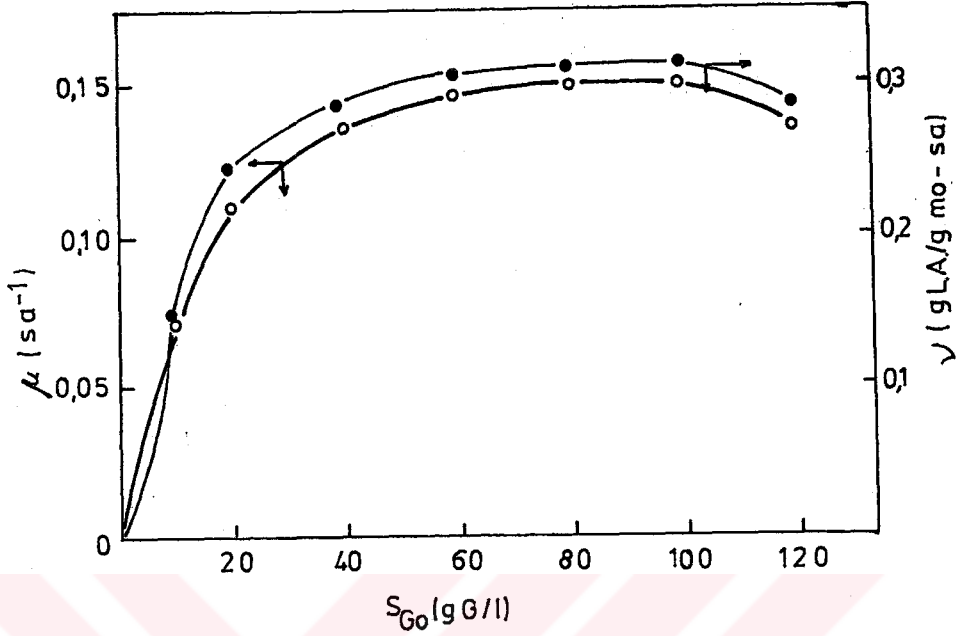
şeklinde bir bağıntı elde edilir.

şekil-(4-6) çeşitli başlangıç glukoz derişimlerinde elde edilebilen maksimum mikroorganizma derişimlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Ürün ve substrat inhibisyonunun gözlenmediği bölgede, mikroorganizma verimi  $Y_{X/S_{Go}} = 0.07 \text{ g mo./g glukoz}$  olarak eğimden bulunmuştur. Daha yüksek glukoz derişimlerinde ise ürün ve substrat inhibisyonlarından dolayı maksimum mikroorganizma derişimlerine ulaşılamadığı için doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir.

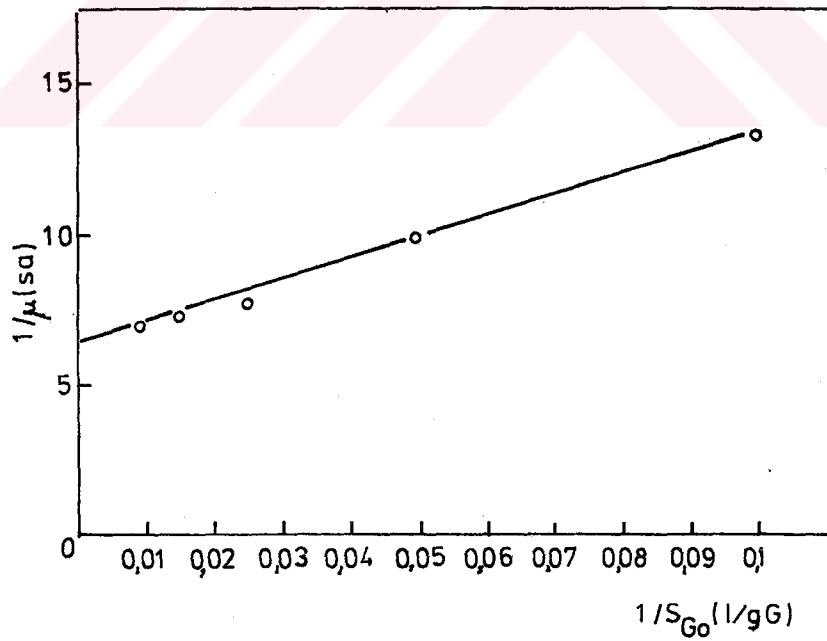
#### 4.3.3. Başlangıç pH'inin Etkileri:

Fermentasyon ortamında oluşan asitin belli bir derişim üzerinde ürün inhibisyonu gösterdiği göz önüne alınarak mikroorganizmanın en uygun çoğalma ve asit üretim hızları ve maksimum mikroorganizma ve asit derişimleri gösterdiği pH bulunmuştur.

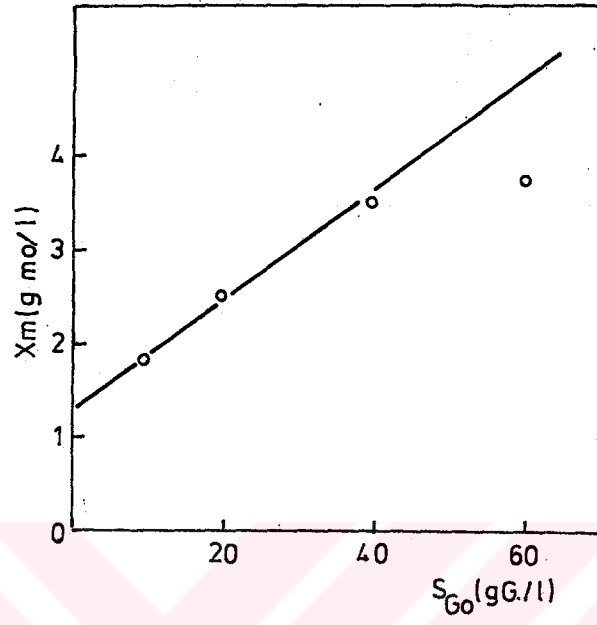
şekil-(4-7) başlangıç pH'inin mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisini göstermektedir. Bu şekilde başlangıç pH'inin 6 olduğu değer, maksimum mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarının ve maksimum mikroorganizma ve ürün derişimlerinin elde edildiği



Şekil-(4-4): Başlangıç glukoz derişiminin mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisi  
T:42°C, K.H.:400 rpm, CO<sub>2</sub> atmosferinde



Şekil-(4-5): ( $1/\mu$ , sa) değerlerinin ( $1/S_{G0}$ , l/g G.) değerleriyle değişimi



Şekil-(4-6): Başlangıç glukoz derişiminin ortamdaki maksimum mikroorganizma derişimiyle değişimi

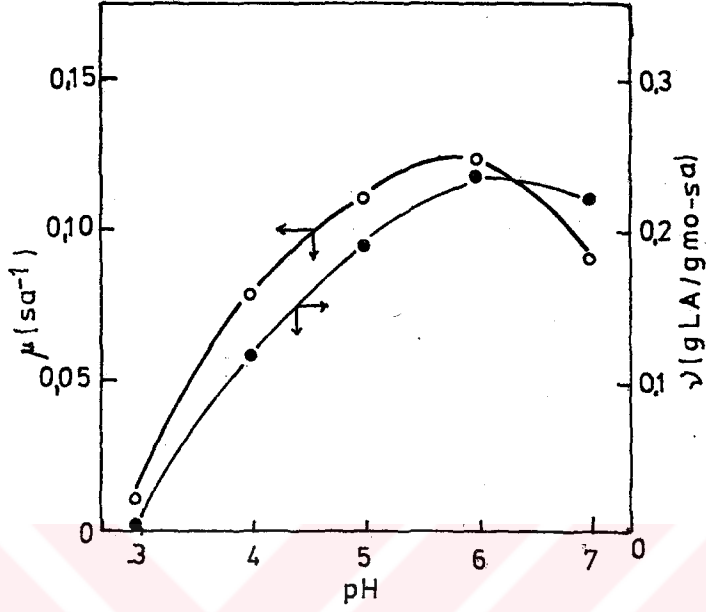
değerdir. pH 4'ün altında mikroorganizma, çoğalma ve asit üretme faaliyetini kaybetmekte, pH 6'nın üstünde de, yine özellikle mikroorganizma çoğalma hızında ve ürün üretim hızında düşme gözlenmektedir.

#### 4.3.4. pH Kontrollü Başlangıç Glukoz Derişiminin Etkileri:

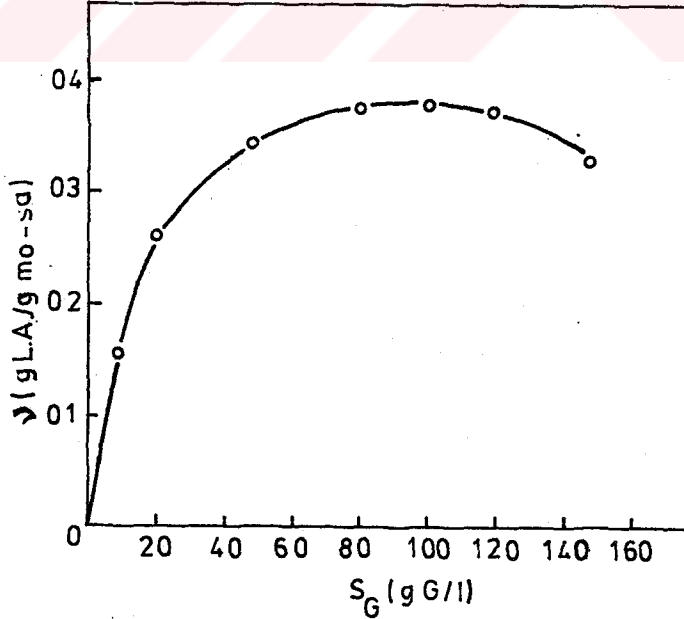
Değişik başlangıç glukoz derişimlerinde pH kontrollü çalışmada fermentasyon ortamında oluşan asiti nötralleştirerek pH'ı 5.5-6 arasında tutmak için 1 N lik stok sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmış, laktik asit derişimi titrasyon ve nötralleştirme için harcanan baz miktarlarından bulunmuştur.

pH kontrollü çalışmalarda değişik başlangıç glukoz derişimlerinde gözlenen asit oluşum hızları ve verimleri, pH kontrolsüz çalışmalara nazaran daha yüksektir. Bakteri ortam asitliğinin düşük olması yüzünden rahatça yüksek verimde dönüşüm yapabilmektedir.

pH kontrollü çalışmalarda da yine en yüksek hız ve verim  $S_{G0} = 100$  g/l de elde edilmiştir, daha yüksek glukoz derişimlerinde substrat ve ürün inhibisyonları hızın düşmesine neden olmaktadır. Sonuçlar Şekil-(4-8) ve Çizelge-(4-3)'de görülmektedir.



Şekil-(4-7): Başlangıç pH'ının mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi  
 T:42°C, K.H.:300 rpm,  $S_{Go} = 20$  g G./l  
 CO<sub>2</sub> atmosferinde



Şekil-(4-8): Kontrollü pH'da (pH=6) başlangıç glukoz derişiminin ürün oluşum hızına etkisi  
 T:42°C, K.H.: 400 rpm, CO<sub>2</sub> atmosferinde

Çizelge-(4-3): pH kontrollü başlangıç glukoz derişimle-  
rinde elde edilen maksimum mikroorganizma,  
ürün derişimleri ve ürün verimi.

$S_{Go}$ (g G/l)	$X_m$ (g mo./l)	$P_m$ (g L.A./l)	$Y_{P/S_{Go}}$
10	1.9	9.3	93
20	2.6	17.4	87
40	3.6	35.0	87
80	4.2	69.2	86
100	4.2	87.0	87
120	3.5	84.5	70
150	3.1	92.0	61

#### 4.3.5. pH Kontrollü Kademeli Substrat Ekleme:

pH kontrollü glukoz derişiminin mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisi incelenecek olursa  $S_G = 120$  g/l den sonra verim ve hız değerlerinin oldukça düştüğü, substrat ve ürün inhibisyonunun çok etkili olduğu görülür. Yüksek glukoz derişimlerinde çalışmak yerine, daha düşük glukoz derişimlerinde, yarı kesikli düzende çalışılarak amaçlanan yüksek glukoz derişimlerine ulaşılmaya çalışılmıştır.

Bunun için 50 g/l glukoz derişimli çözelti ile pH kontrollü çalışılmış, mikroorganizma artık dönüşüm yapmayınca, tepkime kabında yeterli aşı miktarı bırakılarak sistem boşaltılmış, yeniden 50 g/l glukoz derişimli taze çözelti tepkime kabına aktarılmıştır. Bu işlem dört

kere tekrarlanmıştır.

Şekil-(4-9) bu çalışmanın sonuçlarını göstermektedir. İlk çalışmadan sonra ortama daha iyi alışan mo.daha yüksek hız ve verimde dönüşüm yapmıştır.İlk aşamada  $\nu = 0.34$  g L.A./g m o-sa bulunmuşken son çalışmada  $\nu = 0.35$  g L.A./g m o-sa değerine ulaşmıştır.Laktik asit verimi de % 80 den %85'e kadar yükselmiştir.

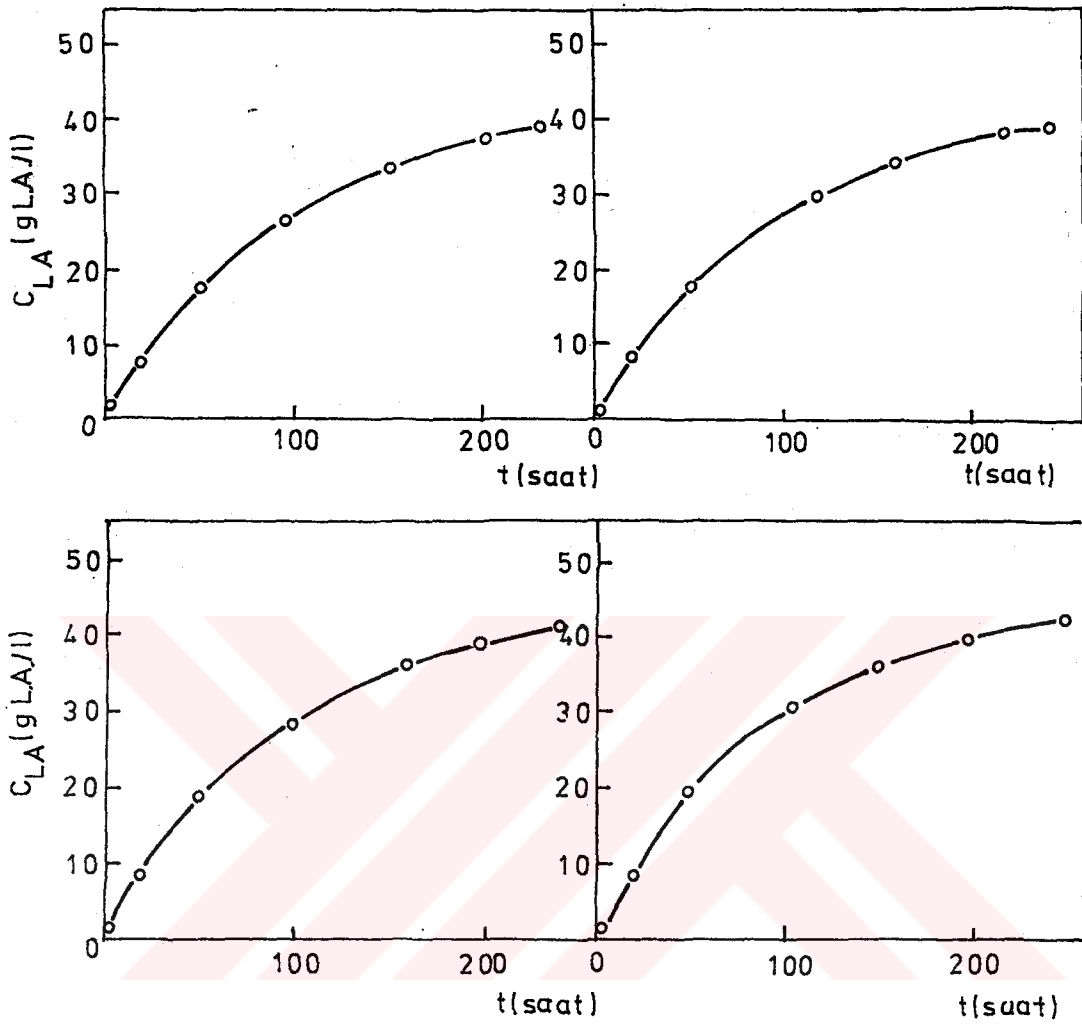
#### 4.3.6.Sıcaklık Etkileri:

Glukozun substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda,incelenen kinetik parametrelerden biri de sıcaklıktır.L.delbrüeckii termofilik bir laktik asit bakterisidir,bu bakteri için en uygun gelişme sıcaklığı laboratuvar koşullarında  $42^{\circ}\text{C}$  olarak bulunmuştur.Daha yüksek sıcaklıklarda mikroorganizma etkinliğini kaybetmekte ve ürün oluşum hızı da düşmektedir. Bu da mikroorganizmanın içerdiği enzimlerin yüksek sıcaklıklarda yapılarının bozulmasından ileri gelmektedir (Şekil-4-10)).

#### 4.3.7.Karıştırma Hızı Etkileri:

Laktik asit üretimi,deney düzeneğinden de görüldüğü gibi karıştırmalı bir tepkime kabında gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma'ın besin ortamı ile iyi bir temasının sağlanması için karıştırma gereklidir.Karıştırma hızının bir kinetik parametre olarak mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızına etkisi incelenmiştir.Karıştırma hızı 400 rpm'e kadar arttıkça  $\mu$  ( $\text{sa}^{-1}$ ) ve  $\nu$  (g L.A./g mo.-sa)





Şekil-(4-9): pH=6 da kademeli substrat eklemeye elde edilen ürün eğrileri

T:42°C, K.H.:400rpm,  $S_{G0}$ =50 g G/l,

CO<sub>2</sub> atmosferinde

değerleri oldukça yavaş artmış 400 r.p.m.'de maksimum hız ve verim değerleri elde edilmiş, daha yüksek hızlarda mikroorganizma parçalanmaya başladığı için mikroorganizma ve asit üretim hızlarında düşüş kaydedilmiştir (Şekil-(4-11)).

#### 4.3.8.İnert Gazların Etkileri:

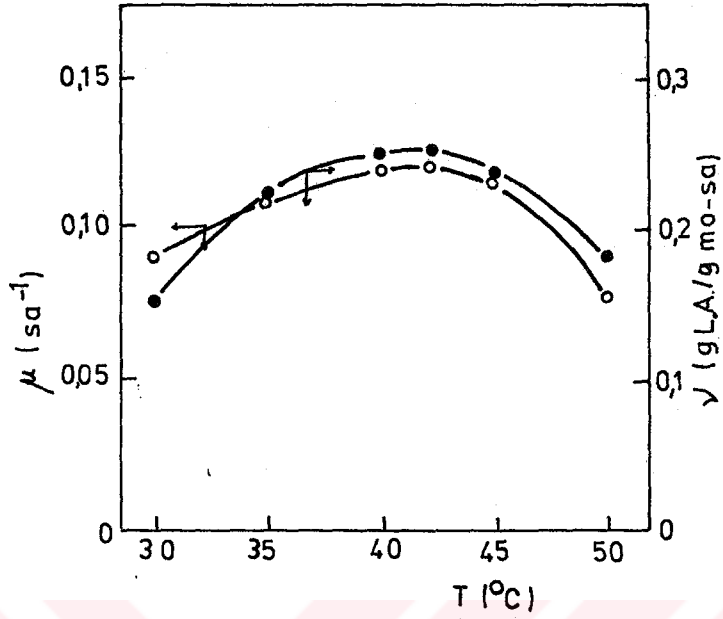
L.delbrüeckii mikroaerofilik bir mikroorganizmadır.Çalışmalarda tepkime ortamının hava ile temasını kesmek için karbondioksit gazı kullanılmıştır.Karbondioksit gibi inert bir gazdan başka, yine inert bir gaz olan azot atmosferinde bir çalışma yapılmış, sonuçta iki gaz atmosferinde de hız ve verimler de pek farklılık gözlenmemiştir(Şekil-(4-12)).

#### 4.3.9.Mikroorganizma Derişiminin Etkileri:

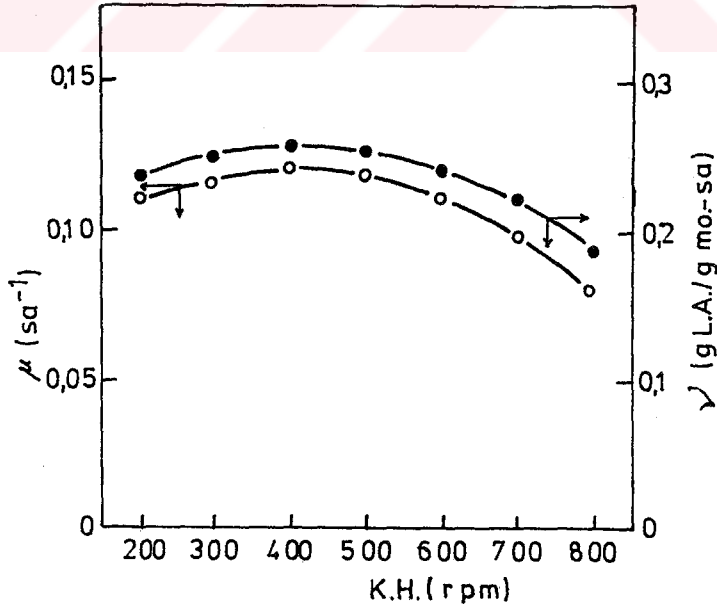
Laktik asit fermentasyonunda, fermentasyonun kısa sürede yüksek verimle sonuçlanması için,başlangıçta belli miktar aktif mikroorganizmanın aşısı olarak ortama konulması gerekmektedir.Bu miktar, substrat derişimine göre değişmektedir. 20 g/l glukoz çalışmalarında ortama başlangıçta daima yaklaşık 0,10-0.12 g mikroorganizma aşılanmıştır.Daha yüksek glukoz derişimlerinde,"glukoz derişimi/ mikroorganizma derişimi" oranı 200 alınmıştır (Şekil-(4-13)). Buna göre 50 g/l glukoz derişimi için başlangıç mikroorganizma miktarı 0.25 gramdır.

#### 4.3.10.Glukozlu Besin Ortamında Genel Çalışmalar

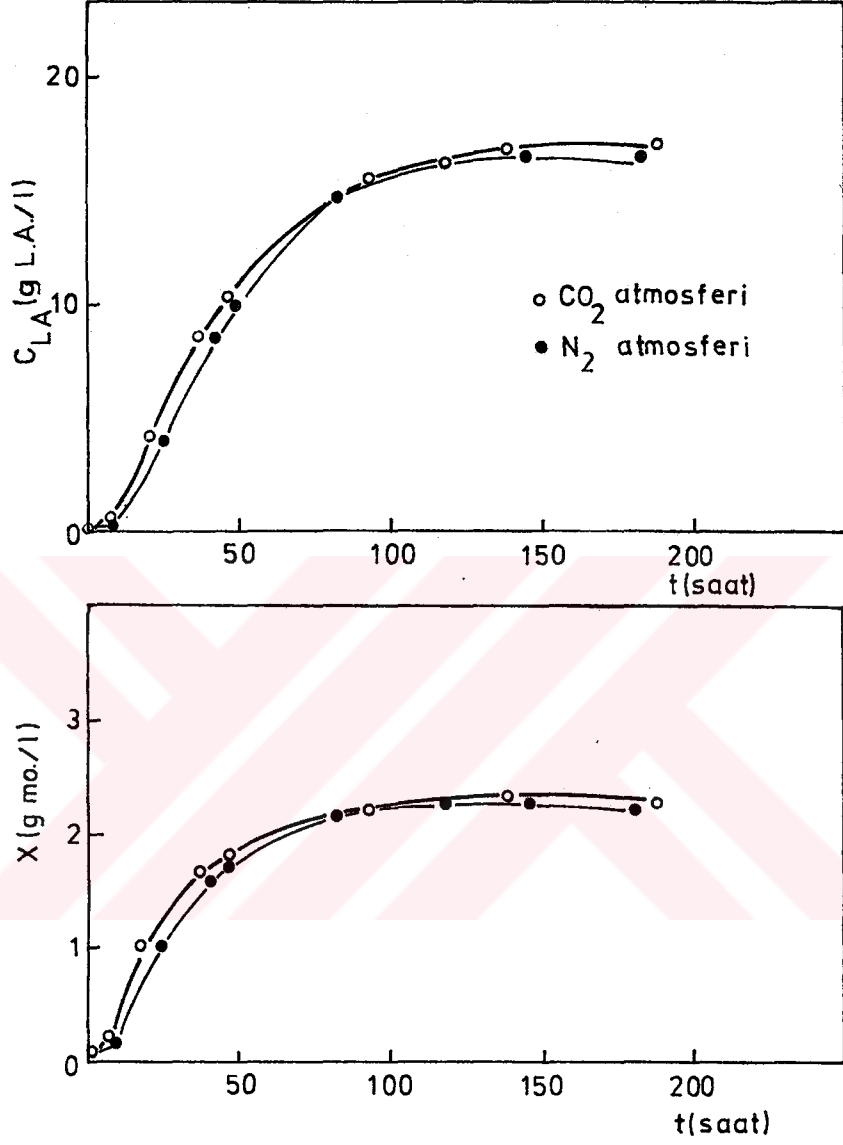
Kesikli karıştırmalı tepkime kabında 20 g/l glukoz derişimli besin ortamında mikroorganizma çoğalma ve asit



Şekil-(4-10): Sıcaklığın mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisi  
 K.H.300 rpm,  $S_{G_0}=20$  g G./l  $CO_2$  atmosferinde  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik Asit

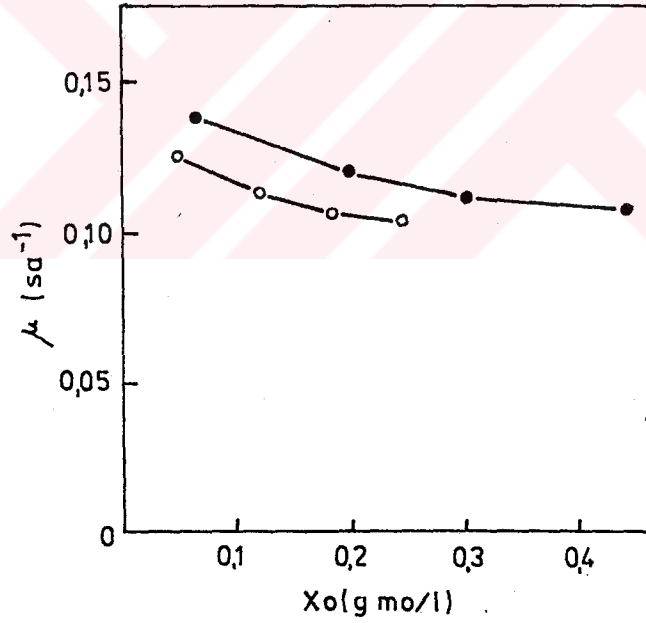
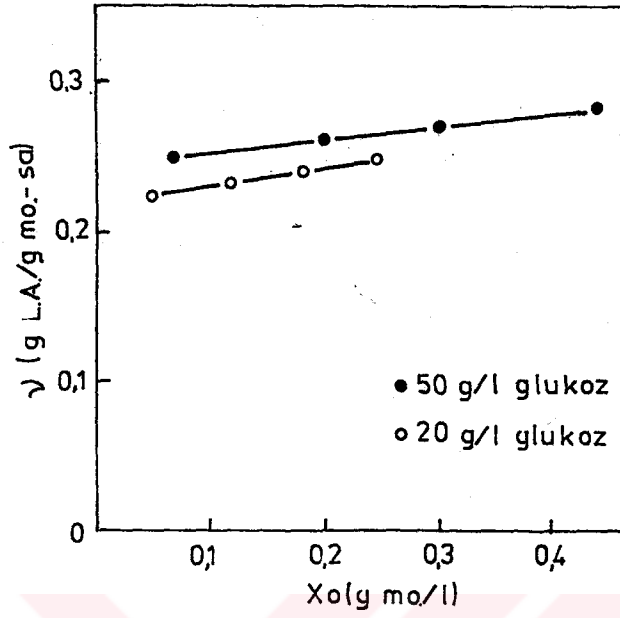


Şekil-(4-11): Karıştırma hızının mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum hızlarına etkisi  
 T:42°C,  $S_{G_0}=20$  g G./l;  $CO_2$  atmosferinde  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik Asit



Şekil-(4-12): Değişik gaz atmosferlerinde mikroorganizma ve ürün eğrileri

T:42°C, K.H.:300 rpm,  $S_{GO}=20$  g G./l



Şekil-(4-13): Mikroorganizma(Aşı) derişiminin farklı glukoz derişimlerinde mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi  
 T:42°C K.H.:200 rpm  $S_{G0}=20$  g G./l

üretim eğrileri Şekil-(4-14)'de verilmiştir.Mikroorganizmanın büyüme eğrisinden L.delbrüeckii ile ilgili şu evreler saptanmıştır.

1.Gecikme Evresi(Lag Faz): Bu evre fermentasyon başlangıcından itibaren 1-2 saat kadardır.Bu süre, çalışılacak besin ortamına alıştıırılmış aktif mikroorganizma ile aşılama yapıldığı için genelde kısa bir süredir.Bakterinin ilk üretilme çalışmalarında ise bu süre 4-5 saat olarak gözlenmiştir.Bu evrede bakterinin çoğalma hızı yaklaşık sıfırdır.

2.Geçiş Evresi: Gecikme evresi ile üssel üreme evresi arasında yer alan bu süre 3-4 saati aşmamaktadır.Bu evrede mikroorganizmanın özgül büyüme hızı oldukça düşüktür.

3.Üssel Üreme Evresi: Geçiş evresinde belli bir sayıya ulaşan mikroorganizmalar üssel üreme evresine geçmektedir, bu süre yaklaşık 12-14 saat sürmektedir.Bu evrede bakterinin özgül büyüme hızı  $0.127 \text{ sa}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

4.Duraklama Evresi: Logaritmik evrede ortamdaki besin maddelerinin gittikçe azalması, inhibe edici ürün miktarının artması mikroorganizmanın ideal ve maksimum derişime ulaşmasını önlediği için mikroorganizmanın üreme hızında bir azalma gözlenmektedir.Bu evre yaklaşık 50 saat sürmektedir.

5.Sabit Evre: Bu evrede zamana göre mikroorganizma sayısında net bir artış veya azalış gözlenmemektedir. Bakterinin üreme hızı hemen hemen ölüm hızına eşittir, 75-80 saat kadar bu evre devam etmektedir.

6.Ölüm Evresi:  $t = 150$  saatten sonra mikroorganizma derişiminde bir azalma gözlenmektedir ve bu evreye ölüm evresi (lysis) denilmektedir.

Glukozlu ortamda mikroorganizma ve ürün için bulunan kinetik veriler Çizelge-(4-5)'de verilmiştir.

Ayrıca 50 g/l glukoz derişimi ile bir dizi deney; serbest çalışma, NaOH çözeltisi ile pH kontrollü, kalsiyum karbonat ile tamponlanmış, ortamlarda yapılmıştır.

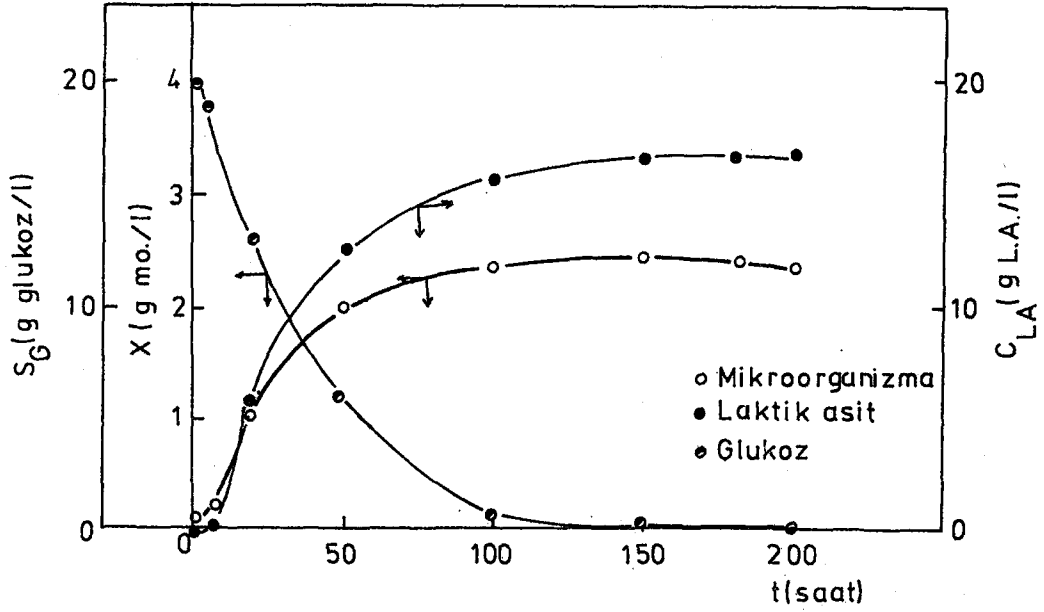
Şekil-(4-15) den bu üç tür çalışma için asit üretim hız ve verimlerine bakıldığında, en düşük hız ve verimin 50 g/l glukoz derişimli serbest çalışma olduğu görülür. Bu da normal bir sonuçtur, çünkü L.delbrüeckii 25-30 g/l laktik asit derişimi üstünde aktifliğini kaybetmektedir. En yüksek hız ve verimler diğer iki çalışmada gözlenmiştir. pH kontrolsüz çalışmada özgül asit oluşum hızı 0.30 g L.A./g mo.-sa bulunmuşken, diğer iki çalışmada bu değer 0.35 g L.A./ g mo.-sa'e ulaşmıştır.

#### 4.4. Sakkarozlu Besin Ortamı Çalışmaları

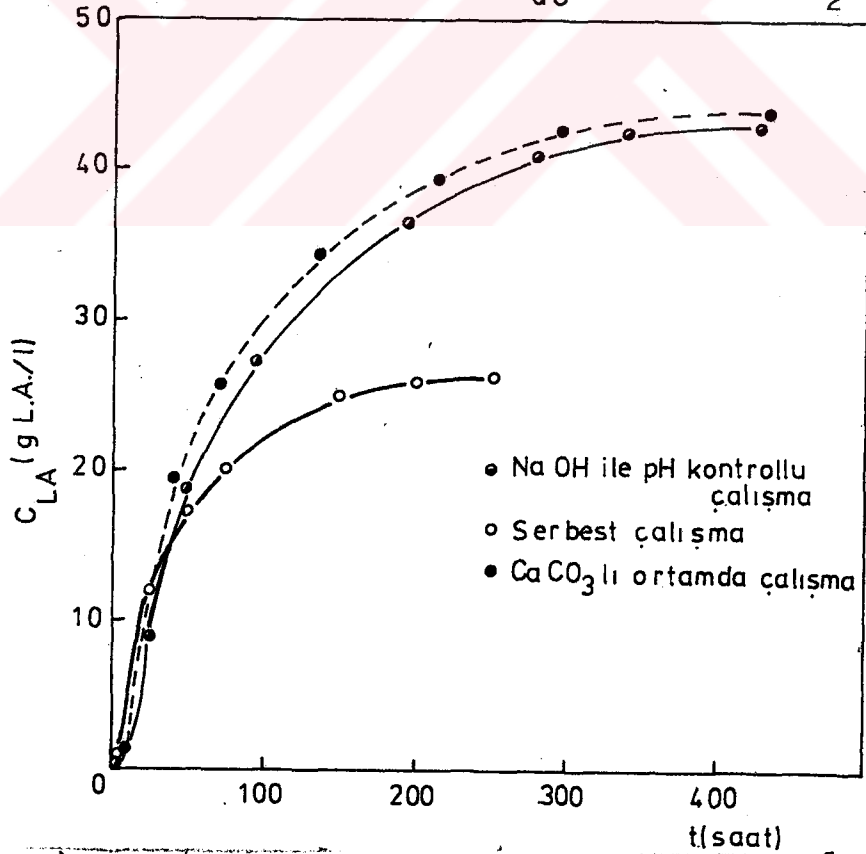
Melasla yapılan çalışmalara geçmeden önce melasın yaklaşık % 50'sini oluşturan sakkaroz için, glukoz için dene- nen parametrelerden bir kaçı denenerek mikroorganizmanın bu şeker türüne karşı davranışları ve asit üretimini nasıl etkilediği incelenmiştir.

##### 4.4.1. Başlangıç Sakkaroz Derişiminin Etkileri

Sakkaroz bir disakkariddir ve mikroorganizmanın bu şekerini kullanabilmesi için, monosakkaridlerine (glukoz ve fruktoz) ayrışması gerekmektedir. L.delbrüeckii yapısındaki



Şekil-(4-14): Glukozlu besin ortamında mikroorganizma, laktik asit ve glukoz eğrileri  
 T: 42°C, K.H: 400 rpm, S<sub>G0</sub> = 20 g G./l, CO<sub>2</sub> atmosferinde



Şekil-(4-15): 50 g/l başlangıç glukoz derişimli besin ortamında değişik koşullarda çalışmalarda elde edilen ürün eğrileri  
 T: 42°C, K.H.: 400 rpm, S<sub>G0</sub> = 50 g G./l



enzimlerle bu işi gerçekleştirmekte, sakkarozu D-glukoz ve D-fruktoza dönüştürerek kendi üremesi ve asit üretimi için kullanabilmektedir.

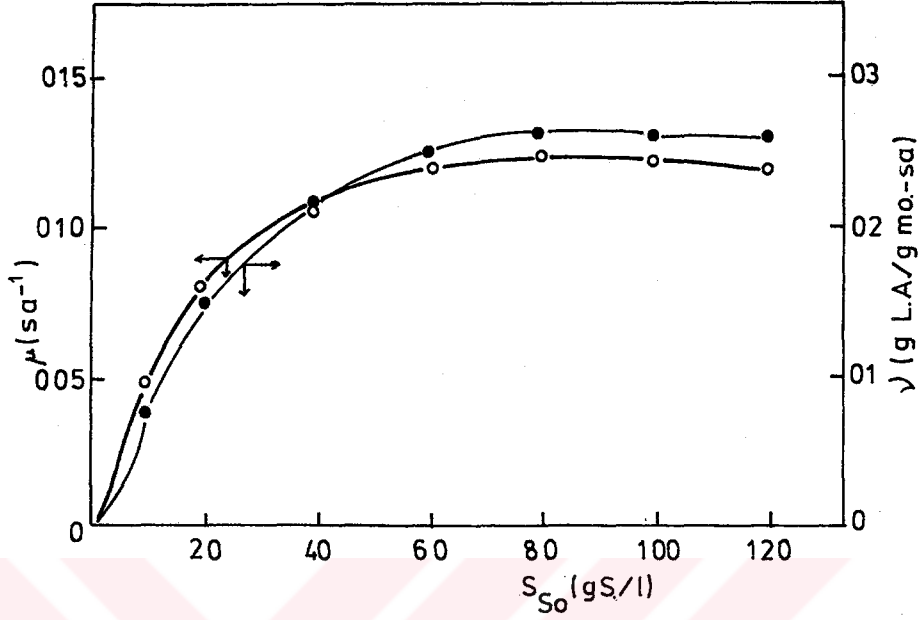
Şekil-(4-16) başlangıç sakkaroz derişiminin mikroorganizma çoğalması ve asit üretimine etkisini göstermektedir. Eğri şekli ve maksimum başlangıç substrat derişimi, başlangıç glukoz derişimi etkisine benzerdir. Yalnız gözlenen hız değerleri daha düşüktür. Bunun nedeni de yukarda açıklandığı gibi mikroorganizmanın sakkarozu kullanabilmek için, metabolizmasına şekeri parçaladığı bir basamağı da eklemesidir.

Glukozlu ortam çalışmalarına benzer olarak, sakkarozlu ortam çalışmalarında  $\mu_{max} = 0.129 \text{ sa}^{-1}$ ,  $K_s = 14 \text{ g sakkaroz/l}$  olarak bulunmuştur (Şekil-(4-17)). Mikroorganizma verimi  $Y_{X/S_{So}}$  ise  $0.04 \text{ g mo./g sakkaroz'dur}$  (Şekil-

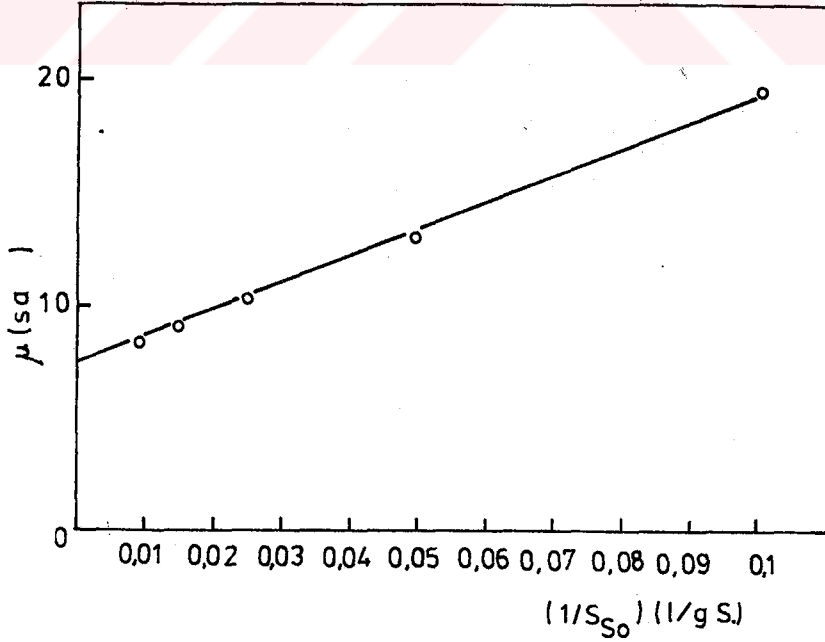
(4-18)) Glukozlu besin ortamı çalışmalarında ise  $\mu_{max} = 0.15 \text{ sa}^{-1}$ ,  $K_s = 10.5 \text{ g glukoz/l}$  ve  $Y_{X/S_{Go}} = 0.07 \text{ g mo./g glukoz}$  bulunmuştu. Bu ortamda gözlenen mikroorganizmanın maksimum özgül büyüme hızı, sakkarozlu ortama nazaran daha yüksektir.  $K_s$  değeri substrata bağlı olarak değişmektedir. Mikroorganizma verimleri açısından ise glukozlu besin ortamında oldukça yüksek bir verimliliğe ulaşılmıştır.

#### 4.4.2. Başlangıç pH'nın Etkileri

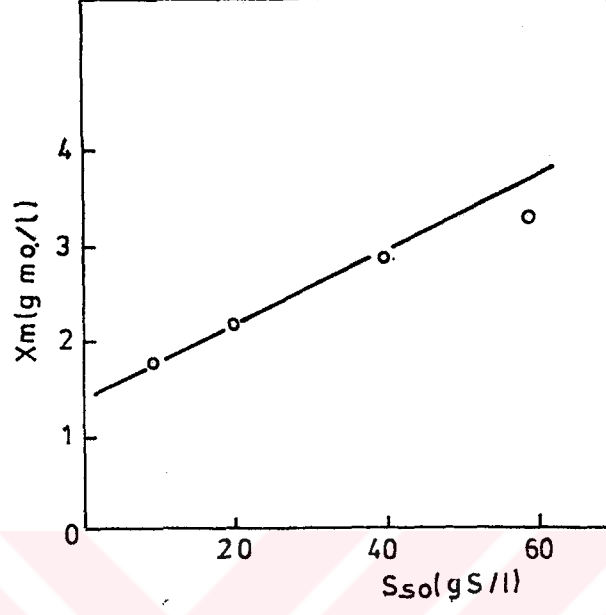
L.delbrüeckii sakkarozlu ortamda da maksimum hız ve verimi  $\text{pH} = 6$  da göstermiştir. Şekil-(4-19) incelenecek olursa daha düşük üreme ve ürün oluşum hızları gözlenmekle beraber, eğri şeklinin Şekil-(4-7)'ye benzediği söylenebilir.



Şekil-(4-16): Başlangıç sakkaroz derişiminin mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi  
 T:42°C, K.H.: 200 rpm  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik asit



Şekil-(4-17):  $1/\mu$  (sa)- $(1/S_{S_0})$  (l / g S.) değişimi



Şekil-(4-18): Başlangıç sakkaroz derişiminin ortamdaki maksimum mikroorganizma derişimiyle değişimi.

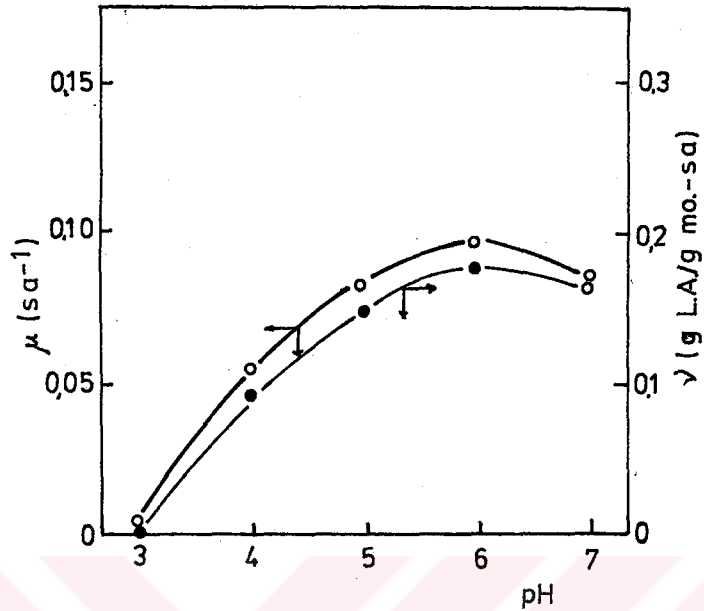
#### 4.4.3.Sıcaklık Etkileri

Sakkarozlu ortamda L.delbrüeckii glukoza nazaran daha düşük sıcaklıklarda da ( $T : 35-40^{\circ}\text{C}$ ) iyi üremekte , yalnız ürün oluşum hızı düşük olmaktadır.Daha yüksek sıcaklıklarda ( $T : 40-45^{\circ}\text{C}$ ) hem mikroorganizma hem ürün oluşum hızları yükselmekte, sıcaklık  $45^{\circ}\text{C}$  üzerine çıktığında iki hız değeri de azalmaktadır. Saptanan optimum sıcaklık  $40-42^{\circ}\text{C}$  dir (Şekil-(4-20)).

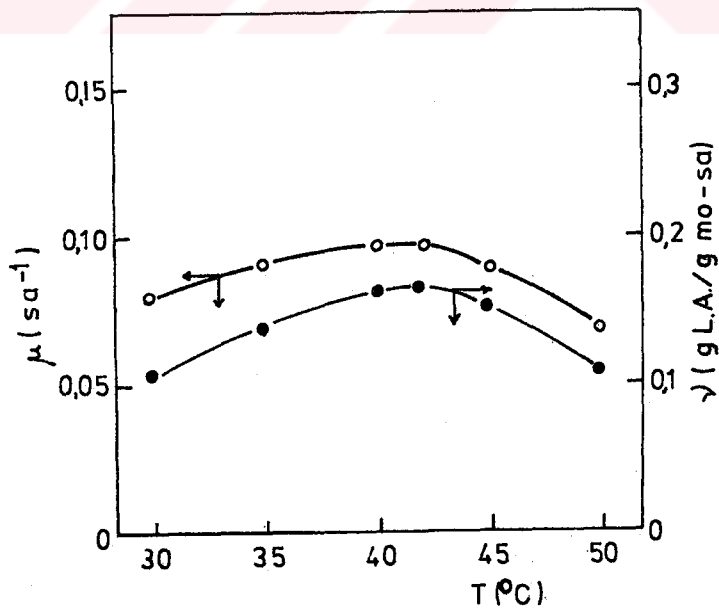
#### 4.4.4.Sakkarozlu Besin Ortamında Genel Çalışmalar

Şekil-(4-21) kesikli karıştırmalı tepkime kabında 20 g/l sakkaroz derişimli besin ortamında mikroorganizma çoğalma ve asit oluşum eğrilerini göstermektedir. Mikroorganizmanın glukozlu besin ortamı için saptanan büyüme evreleri sakkarozlu besin ortamında geçerliliğini yitirmektedir. Bu ortamda gecikme ve gelişme evreleri glukozlu ortama nazaran 1-2 saat daha fazla sürmekte, üssel üreme evresinde ise glukozlu ortam kadar yüksek bir üreme hızına ulaşılammakta, yalnız üssel üreme evresi daha uzun süreli olmaktadır.(Yaklaşık 18-20 saat) Duraklama evresi ise glukozlu ortandan daha uzun sürelidir,sabit evre iki ortamda da yaklaşık aynıdır,  $t = 220-240$  saatten sonra ölüm evresi başlamaktadır.

Şekil-(4-22) kesikli karıştırmalı tepkime kabında 20 g/l glukoz ve 20 g/l sakkarozlu ortamlarda laktik asit oluşum eğrilerinin bir karşılaştırmasını göstermektedir.Sakkarozlu ortamda ürün oluşum hız ve verimi glukozlu



Şekil-(4-19): Başlangıç pH'nın mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi  
 T:42°C , K.H.: 200 rpm, S<sub>So</sub>=20 g S./l  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik asit



Şekil-(4-20): Sıcaklığın mikroorganizma çoğalma ve ürün oluşum hızlarına etkisi  
 K.H.: 200 rpm, S<sub>So</sub>=20 g S./l  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik Asit

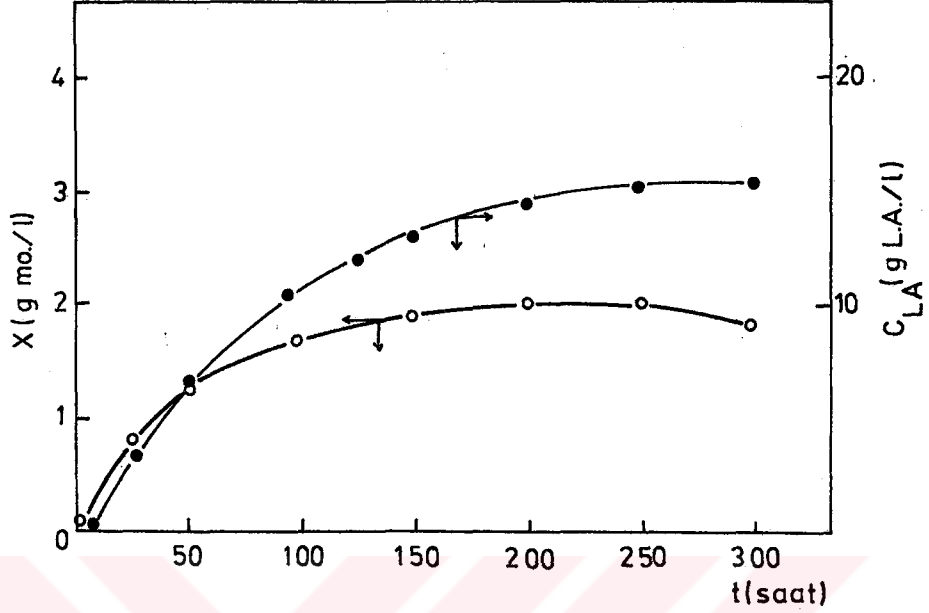
ortama nazaran daha düşüktür. Glukozlu ortamda ürünün özgül oluşum hızı 0.26-0.27 g L.A./g mo.-sa iken, sakkarozlu ortamda bu değer ancak 0.15-0.16 g L.A./g mo.-sa'e ulaşmaktadır. t=200 saat sonra glukozlu ortamda ürün verimi % 87 iken, sakkarozlu ortamda % 73 tür.

En uygun değerlerin glukozlu ortam değerleriyle yaklaşık olarak aynı çıkması, daha sonraki çalışmalarda, melas, fruktoz, invert şekerin substrat olarak kullanıldığı deneyler için bir kolaylık getirmiştir ve çalışmalar glukozlu ortam için saptanan uygun koşullarda gerçekleştirilmiştir.

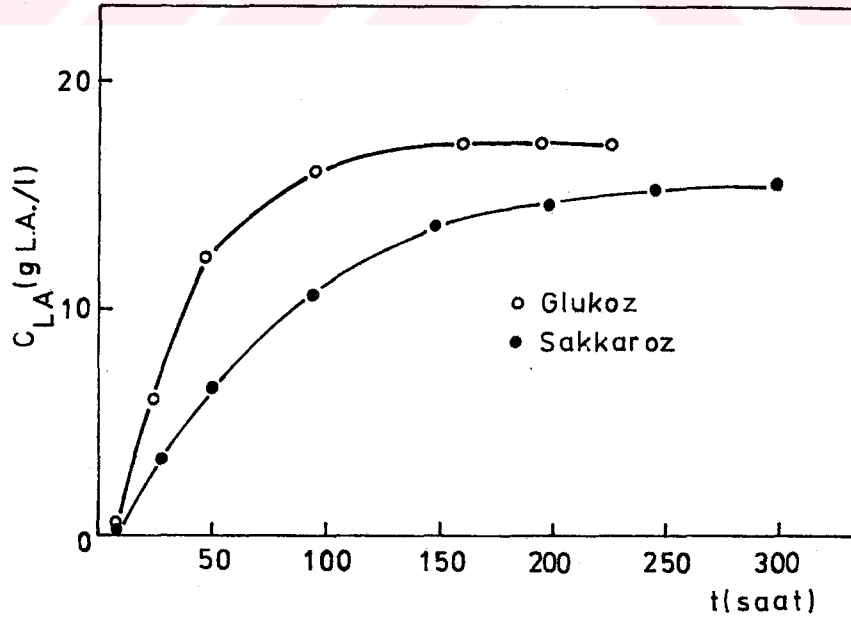
#### 4.4.5.Melas Çalışmaları

Deneysel çalışmalarda kullanılan melas, Ankara Şeker Fabrikasından getirtilmiştir, bileşimi Çizelge-(E-1) de verilmiştir.

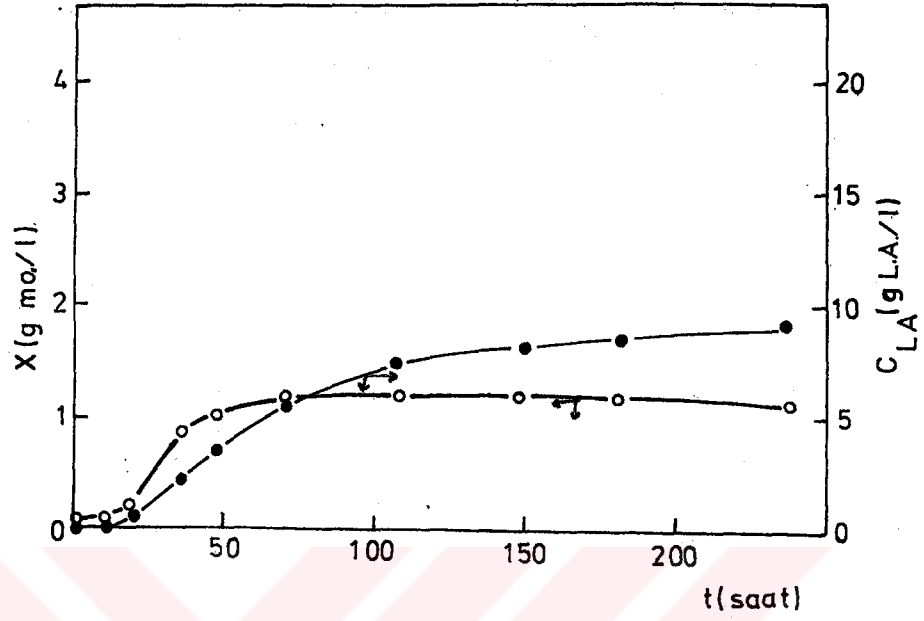
% 50 sakkaroz içeren melas, çalışmalar için 20 g/l sakkaroz içeren melas çözeltisine seyreltilmiş, pH'ı  $H_2SO_4$  ile 6 ya ayarlanmıştır. Melas çalışmalarının ilk kısmında mikroorganizmanın bu yeni ortama uyum sağlaması ve üretilmesine uğraşılmıştır. Şekil-(4-23)den de görüldüğü gibi seyreltilmiş melas çözeltisinde asit ve mikroorganizma verimi, mikroorganizma üreme ve asit oluşum hızları diğer ortamlara nazaran oldukça düşüktür. Bunun nedeni L.delbrüeckii nin üreyebilmesi için besin ortamında mutlaka bulunması gereken bazı aminoasit, vitamin ve tuzların melasın içinde bulunmamasıdır.



Şekil-(4-21): Sakkarozlu besin ortamında mikroorganizma ve ürün eğrileri  
 T:42°C, K.H.:400 rpm, S<sub>So</sub>=20 g S./l  
 o:Mikroorganizma, •:Laktik Asit



Şekil-(4-22): Glukozlu ve sakkarozlu besin ortamlarında ürün oluşum eğrilerinin karşılaştırılması  
 (İki besin ortamında mikroorganizma-zaman eğrilerinin karşılaştırılması Şekil-(G-2)'de gösterilmiştir).



Şekil-(4-23): 20 g/l sakkaroz içeren melas çözeltisinde mikroorganizma ve ürün eğrileri  
 T:42°C, K.H.:400 rpm, S<sub>So</sub>=20 g S./l  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik Asit



Çalışmaların ikinci kısmında 20 g/l sakkaroz içerecek şekilde seyreltilmiş melas çözeltisine belirli oranlarda maya özütü, di-amonyum bifosfat, magnezyum sülfat eklenerek mikroorganizmanın üreme ve asit oluşum hızları incelenmiştir. Denenen ortam bileşimleri aşağıda verilmiştir.

Ortam 1 : 20 g/l sakkaroz içeren sade melas çözeltisi,

Ortam 2 : Ortam 1+ 0.5 g/l maya özütü + 0.5 g/l di-amonyum bifosfat + 0.2 g/l  $Mg^{++}$ ,

Ortam 3 : Ortam 1+ 1.0 g/l maya özütü + 0.5 g/l di-amonyum bifosfat + 0.2 g/l  $Mg^{++}$  ,

Ortam 4 : Ortam 1+ 2.0 g/l maya özütü + 0.5 g/l di-amonyum bifosfat + 0.2 g/l  $Mg^{++}$  ,

Ortam 5 : Ortam 1+ 2.0 g/l maya özütü + 1.0 g/l di-amonyum bifosfat + 0.2 g/l  $Mg^{++}$  ,

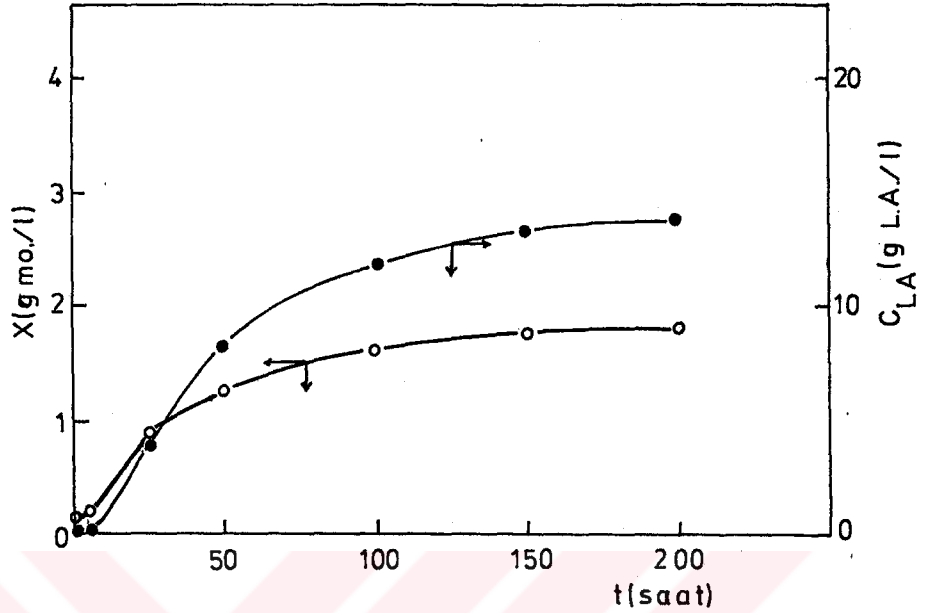
Çizelge-(4-4): Çeşitli bileşimlerdeki melas çözeltilerinde, mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızları, maksimum mikroorganizma ve asit derişimleri, asit verimi (  $t=250$  saat,  $S_{So}=20$  g S./l,  $T:42^{\circ}C$ , K.H.400 rpm).

	$X_m$ (g mo./l)	$\mu$ (sa <sup>-1</sup> )	$P_m$ (g L.A./l)	$\chi$ (g L.A./gmo.-sa)	$Y_{P/S_{So}}$
Ortam 1	6.0	0.06	9.2	0.080	46
Ortam 2	7.8	0.075	11.7	0.095	58
Ortam 3	9.4	0.090	13.7	0.113	68
Ortam 4	10.0	0.100	14.4	0.127	72
Ortam 5	10.5	0.105	14.7	0.130	73

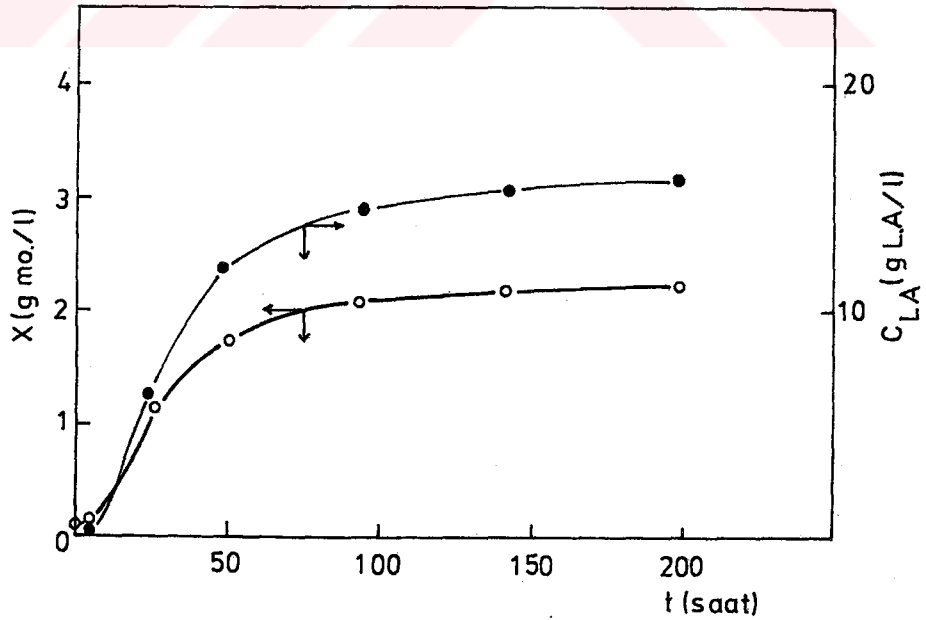
#### 4.5. İnvvert Şekerli ve Fruktozlu Besin Ortamı Çalışmaları

Daha ileriki çalışmalarda (enzim + L.delbrüeckii)'nin bir arada kullanılacağı, mikroorganizmanın yavaş kullandığı veya hiç kullanmadığı şekerlerin enzimler tarafından basit yapıllı şekerlere dönüştürülmesi, bu şekerlerin de mikroorganizma tarafından kullanılarak ürün oluşumunun kinetik incelenmesi düşünülmektedir. Bir ön çalışma olarak sakkarozun invertaz enzimiyle invert şeker(% 50 fruktoz + % 50 glukoz) e dönüştürüldüğü varsayılarak, invert şekerin substrat olarak kullanıldığı çalışmada mikroorganizma ve asit üretimi incelenmiştir. Şekil-(4-24), 20 g/l fruktoz, Şekil-(4-25), 20 g/l invert şekerin substrat olarak kullanıldığı besin ortamları için mikroorganizma ve asit oluşum eğrilerini göstermektedir.

Deneylerde kullanılan dört tür şeker için verim ve hız değerlerinin karşılaştırılması Çizelge-(4-5)'de gösterilmiştir.



Şekil-(4-24): Fruktozlu besin ortamında mikroorganizma ve ürün eğrileri  
 T:42°C K.H.:400 rpm, S<sub>FO</sub>=20 g F./l  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik Asit



Şekil-(4-25): İvert şekerli besin ortamında mikroorganizma ve ürün eğrileri  
 T:42°C, K.H.:400 rpm, S<sub>İO</sub>=20 g İ./l  
 o:Mikroorganizma, ●:Laktik Asit

Çizelge-(4-5):Substrat olarak kullanılan şeker cinsleri için mikroorganizma çoğalma ve asit üretim hızlarının, ikilenme sürelerinin, maksimum mikroorganizma ve ürün derişimlerinin ve ürün veriminin karşılaştırılması (t= 200 sa).

Şeker Cinsi (20 g/l)	$X_m$ (gmo/l)	$\mu$ (sa <sup>-1</sup> )	$t_{ik}$ (sa)	$P_m$ (g L.A./l)	$\nu$ (g L.A./gmo.-sa)	$Y_{P/S}$
Glukoz	13.0	0.125	5.5	17.4	0.26	87
Sakkaroz	10.0	0.10	7.0	14.5	0.15	73
Fruktoz	8.5	0.105	6.5	14.2	0.21	71
İnvert şeker	11.5	0.115	6.0	16.2	0.26	81
Sakkaroz(sade melasta)	6.0	0.06	11.5	9.2	0.08	46

Çizelge-(4-5)'den glukozun substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda maksimum hız ve verime ulaşıldığı, fruktoz ve sakkaroz için minimum hız ve verim değerlerinin elde edildiği, invert şeker içinse glukozu yakın yüksek verim ve hız değerlerine yaklaşıldığı görülmektedir. Dolayısıyla kullanımı daha yavaş olan sakkaroz yerine, sakkarozun enzimlerle parçalanarak dönüştüğü ve daha hızlı ve yüksek verimde ürün elde edilebilen invert şekerin kullanımı (enzim+mikroorganizma) sistemlerinin incelenmesinde iyi bir neden olabilir.

## 5. SONUÇLAR

Lactobacillus delbrückii kullanarak glukoz ve sakkarozun laktik asite dönüştürülmesi kesikli düzende çalışan karıştırma tepkime kabında serbest mikroorganizmalarca incelenmiştir. Üretim parametrelerinin denenmesi ile elde edilen deney verileri laktik asit için laktik asit oluşum hızı ve laktik asit verimi, mikroorganizma için mikroorganizma çoğalma hızı ve verimi açısından değerlendirilmiştir.

### 5.1.Laktik Asit Oluşum Hızı

Glukozun substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda diğer kullanılan substratlara göre daha yüksek asit oluşum hızlarına ulaşılmıştır. Maksimum ürün oluşum hızı için optimum parametreler; CO<sub>2</sub> atmosferinde ve uygun bileşimli besin ortamında 100 g/l glukoz, ortam pH'ı 5.5-6, sıcaklık 42°C, karıştırma hızı 400 rpm dir. Bu koşullarda özgül ürün oluşum hızı 0,38 g L.A./g mo.-sa bulunmuştur(Şekil-(4-8)).

pH kontrolsüz çalışmalarda, aynı koşullarda daha düşük asit oluşum hızı değeri,  $\nu = 0.315$  g L.A./g mo.-sa elde edilmiştir. Bunun nedeni de ortam asitliğinin artmasının mikroorganizmaların faaliyetine engel olmasıdır(Şekil-(4-4)).

Endüstriyel üretimde en uygun yöntem olarak kullanılan kalsiyum karbonatla tamponlanmış besin ortamında, saptanan en uygun koşullarda 50 g/l başlangıç glukoz derişiminde yapılan çalışmalarda ise ürün oluşum hızı

$\nu = 0.35$  g.L.A./g.mo.-sa olarak bulunmuştur(Şekil-(4-15)).

Yüksek şeker ve ürün derişimlerinin neden olduğu inhibisyonu önlemek için kademeli substrat ekleme yöntemi ile yarıkesikli düzende çalışılarak mikroorganizmanın daha yüksek hız ve verimde asit üretmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada ortalama 0,35 g L.A./g mo.-sa asit oluşum hızı değerine ulaşılmıştır(Şekil-(4-9)).

Diğer substratlarla karşılaştırma yapılmasında kolaylık sağlanması açısından 20 g/l glukoz derişimli en uygun koşullarda yapılan çalışmanın asit oluşum hızı 0.26 g L.A./g mo.-sa bulunmuştur.

Sakkarozun substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda ise genel asit oluşum hız değerleri daha düşüktür. Sakkarozun bir disakkarid olması ve bunun basit yapılı şekerlere dönüştürülmesi için mikroorganizmanın çalışmasına bir basamak daha eklenmesi tepkimeyi yavaşlatmaktadır. Sakkarozlu besin ortamında da en uygun pH, sıcaklık, substrat derişiminin glukozlu besin ortamıyla yaklaşık aynı çıkması çalışmalara kolaylık getirmiştir. Diğer substratlar için de aynı koşullarda deneme yapılmıştır.

20 g/l sakkaroz derişimli çalışmada aynı koşullarda 0.16 g L.A./g mo.-sa asit oluşum hızı değeri elde edilmiştir (Şekil-(4-21)). Bu değer glukoz için yapılan aynı çalışmada bulunan değerden yaklaşık % 40 daha azdır.

Sakkarozlu besin ortamı çalışmaları melas için bir ön basamaktır. Melas %20 sakkaroz içerecek şekilde seyreltilerek saptanan optimum koşullarda çalışılmıştır. Çizelge-(4-4).Çeşitli bileşimli melas çözeltilerinde elde edilen sonuçları göstermektedir. Melasta maya özütü derişimi

arttıkça, asit oluşum hızı da artmaktadır, di-amonyum fosfat derişiminin artması asit oluşum hızını arttırıcı yönde çok az değiştirmiştir. Maya özütü derişimi organizmanın melasa alışmasını sağlamak açısından mümkün olduğu kadar düşük tutulmuştur. Ancak tek başına belli sakkaroz derişimine seyreltilmiş melas L.delbrüeckii'nin yüksek hızla üremesi ve üretim yapması için yeterli olamamıştır (Şekil-(4-23)).

Daha sonraki çalışmalara başlangıç olarak saptanan uygun koşullarda, fruktoz ve invert şekerin substrat olarak kullanıldığı çalışmalar, asit oluşum hızının glukozlu besin ortamındaki kadar yüksek olmamakla beraber (Çizelge-(4-5)), invert şekerli besin ortamı çalışmasının glukozu daha yakın sonuçlar verdiğini göstermektedir.

### 5.2.Laktik Asit Verimi

En kısa sürede, en yüksek verim değerlerine glukozlu ortamda yapılan çalışmalarda ulaşılmıştır. En uygun koşullarda % 87 olarak bulunan asit verimi literatürle de uygunluk gösterecek şekilde, oldukça iyi bir verimdir(Çizelge-(4-3)). İncelenen bir parametrenin, ürün verimine etkisi, ürün oluşum hızına etkisine benzerdir. Maksimum ürün oluşum hızlarının gözlendiği değerlerde genellikle maksimum ürün verimleri de gözlenmiştir.

Glukozlu besin ortamında pH kontrolsüz, pH kontrolü ve  $\text{CaCO}_3$  tamponlu ortam çalışmalarında en düşük verim pH kontrolsüz çalışmada % 54 iken, diğer çalışmalarda % 87-88 arasındadır.

Sakkarozlu besin ortamında yapılan çalışmalarda da laktik asit verimi glukozlu besin ortamına yakındır, yalnız sakkarozlu besin ortamı çalışmalarında yüksek asit verimine ulaşabilmek için geçen fermentasyon süresi değerinin en az 1.5 katıdır. Glukoz ve sakkarozlu besin ortamlarında laktik asit oluşum eğrilerinin Şekil-(4-22)de bir karşılaştırması verilmiştir. Glukozlu besin ortamında daha kısa sürede yüksek bir ürün derişimine ulaşılmaktadır.

20 g/l substrat içeren besin ortamlarıyla yapılan çalışmalarda t=200 saat sonundaki laktik asit verimleri Çizelge-(4-5) te verilmiştir. En düşük laktik asit verimi melasta elde edilmiştir. Bunun nedeni de melasın bakterinin üremesi için gerekli olan besin maddelerini içermemesidir.

Laktik asit veriminin yükselmesi mikroorganizmanın zamanla besin ortamına daha iyi alışmasına bağlıdır. Zengin besin ortamında iyi üreyen bakteri daha zayıf besin ortamlarına alıştırılarak zayıf besin ortamlarında da yüksek asit verimi elde edilebilmiştir.

### 5.3. Mikroorganizma Çoğalma Hızı ve Verimi

Lactobacillus delbrückii'nin glukozlu besin ortamında saptanan en uygun koşullarda maksimum özgül büyüme hızı  $0.15 \text{ sa}^{-1}$ , mikroorganizma derişimi 3.8 g/l bulunmuştur (Çizelge-(4-3)). pH kontrollü başlangıç glukoz derişiminin mikroorganizma çoğalma hızına etkisi incelenememiş yalnız en uygun koşullarda 4.2 g/l mikroorganizma derişimi elde edilmiştir (Çizelge-(4-4)). Bu değerler elde edilen maksimum mikroorganizma derişimleridir. Mikroorganizma verimi ise 0.07 g mo./gG.dur.



Sakkarozlu besin ortamında da L.delbrückii iyi üremektedir. Bu ortamda ve uygun koşullarda maksimum özgül büyüme hızı  $0.129 \text{ sa}^{-1}$ , maksimum mikroorganizma derişimi  $3.6 \text{ g/l}$  bulunmuştur.

20 g/l substrat içeren besin ortamlarıyla yapılan çalışmalarda en düşük mikroorganizma oluşum hızına melasta rastlanmış, melasa çeşitli besin maddeleri ilave edilerek mikroorganizma oluşum hızının  $0.105 \text{ sa}^{-1}$  e yükseltilmesi sağlanmıştır (Çizelge-(4-4). ve Çizelge-(4-5)).

## 6. ELEŞTİRİ VE ÖNERİLER

Laboratuvar koşullarında, deney sonuçlarına göre iyi olarak değerlendirilebilecek bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Deney sürelerinin oldukça uzun olması, sürekli steril koşullarda çalışma zorunluluğu, duyarlı deney sonuçlarının elde edilebilmesi için deneylerin çoğunun 2-3 defa tekrarlanması, zaman zaman ortaya çıkan teknik ve biyolojik aksaklıklar, deneylerin uzamasına neden olmuştur. Eldeki olanakların ve zamanın kısıtlılığı, yapılmasında yarar görülen ve planlanan bir kısım deneyin gerçekleştirilmesini engellemiştir.

Fermentasyonu etkileyen parametrelerin sadece birinin değiştirilmesi ve diğerlerinin sabit tutulabilmesi, mikroorganizmaların kullanıldığı diğer biyoteknolojik üretim proseslerinde olduğu gibi neredeyse olanaksızdır. Bu, biyolojik sistemlerin kendi içindeki sürekli dinamik ve kompleks yapısından kaynaklanan bir durumdur.

- Glukozlu besin ortamı çalışmaları yeterli görülmekte beraber, melas ve daha ileriki çalışmalara yönelik ön çalışmalar eksiktir. Glukozlu besin ortamı için denenen parametrelerin hepsi sakkarozlu besin ortamında denenememiştir. Melas çalışmalarında, melas doğal bir besin ortamı olmasına karşın, L.delbrüeckii'nin iyi üremesini sağlamak için melasa ilave edilen ana besin maddelerinden maya özütü yapay, kompleks bir maddedir. Gerek endüstriyel üretimde, gerek bilimsel araştırmalarda melasa ilave edilen besin kaynaklarınının malt çimi, hububat ezmesi, mısır ıslatma suyu gibi doğal kaynaklar olduğu saptanmıştır. Melas çalışmalarının endüstriye uygulanabilirliği açısından bunun göz önüne

alınması gerekirdi, sürenin kısıtlılığı ve bu maddelerin temini için gerekli temasların yapılamayışı buna neden olmuştur.

Bir parametrenin denenmesi, aynı anda, aynı koşullarda çalışan bir seri tepkime kabında gerçekleştirilseydi deneylerin duyarlılığı daha da arttırılabilirdi. Ancak bunun gerçekleştirilmesinin oldukça zor olacağı da bir gerçektir.

Çalışmalar süresince devamlı olarak yapılan mikroorganizma ve asit analizleri kolaylığı ve pratikliliği açısından tercih edilmiştir. Laktik asitin nicel analizi titrimetrik olarak yapılmıştır. Laktik asit yüzdesi çalışılan derişimlerde düşük olduğu için doğrudan titrasyonla laktik asit tayini yeterli görülmüştür. Mikroorganizma derişimi ise spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiş, başka bir yöntem geliştirilmemiştir.

Deney düzeneği kesikli veya yarı kesikli çalışmalar için hazırlanmıştır. Sürekli fermentasyonla da laktik asit üretimi gerçekleştirilebilir. Düzenekte gerekli değişiklikler yapılarak, L.delbrüeckii kullanılarak sürekli laktik asit fermentasyonunun kinetiği incelenebilir, sürekli sistemde geri döngülü çalışılabilir. Kesikli düzenden elde edilen veriler sürekli düzen için kullanılabilir, silinme noktası, özgül büyüme hızı, verim gibi kinetik veriler saptanabilir.

Kesikli karıştırmalı kapta çalışmalar, serbest mikroorganizmalarca yapılmıştır. Tutuklanmış mikroorganizma sistemleri ile kesikli karıştırmalı kapta çalışılabilir,

çeşitli kinetik veriler tutuklanmış sistem için saptanıp serbest mikroorganizma çalışmaları ile karşılaştırılabilir. Ayrıca kesikli karıştırmalı fermentörde elde edilen veriler kule tipi fermentör çalışmalarına de verim yönünden karşılaştırılabilir.

Daha ileriki çalışmalarda (enzim + mikroorganizma) nın bir arada kullanıldığı kesikli veya sürekli çalışan karıştırmalı veya kule tipi fermentörlerde, mikroorganizmanın kullanmadığı karbonhidratların enzimle daha basit şekerlere dönüştürülmesi ve bu şekerlerin de mikroorganizmaca kullanılması ve bütün çalışmalar için kinetik verilerin elde edilmesi planlanmıştır. Ancak sürenin kısıtlılığı bu amaca yönelik bir ön çalışma yapılmasını engellemiş, sadece sakkaroz invert şekere dönüştüğünde, L.delbrüeckii'nin invert şekerli besin ortamındaki davranışı incelenmiş, bu besin ortamında mikroorganizmanın yüksek hız ve verimde laktik asit oluşturduğu gözlenmiştir.

Tezde, kesikli düzende çalışan fermentör için matematiksel bir model geliştirilmemiş, bu tür sistemler için kabul edilen "Monod bağıntısı"ndan  $K_s$ ,  $\mu_m$ ,  $Y_{x/s}$  değerleri hesaplanmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F., "Biochemical Engineering", 1st ed., 95-106, 186-201, Academic Press, New York (1965).
- 2- Bailey, J.E., Ollis, D.F., "Biochemical Engineering Fundamentals", 1st ed., 28-36, 334-406, McGraw-Hill, Tokyo (1977).
- 3- Barker, S.B., Summerson, W.H., "The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material", Journal of the Biological Chemistry, Volume 138, 535-554, (1941).
- 4- Bergey, D.H., "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. 576-593, Williams and Wilkins, Baltimore (1974).
- 5- Bergmeyer H.U. "Methods of Enzymatic Analysis", 2nd ed. 123-128, Academic Press, (1965).
- 6- Casida, L.E., "Industrial Microbiology", 1st ed., 304-314, John Wiley and Sons, New York (1968).
- 7- Doherty, W.H., "Sugar, Still the Cheapest Food", Sugar, 31-36, (December, 1949).
- 8- Faith, W.L., Keyes, D.B., Clark R.T., "Industrial Chemicals", 3rd ed. 477-481, John Wiley and Sons, New York (1966).
- 9- Forney, L.J., Reddy, G.A., "Fermentative Conversion of Potato-Processing Wastes into a Crude Protein Feed Supplement by Lactobacillus Delbrückii", "Developments in Industrial Microbiology, Vol. 18, 135-143, (1977).

- 10- Friedman, M.R., Gaden, A.G., "Growth and Acid Production by Lactobacillus Delbrückii in a Dialysis Culture System", *Biotech. and Bioeng.*, Vol. 12, 961-974, (1970).
- 11- Hanson, T.P., Tsao, G.T., "Kinetic Studies of the Lactic Acid Fermentation in Batch and Continuous Cultures," *Biotech. and Bioeng.*, Vol 14, 233-252, (1972).
- 12- Hunt, G.A., "The Gaseous Metabolism of L. Pentoaceticus with Reference to Several Representative Members of the Lactobacillus Group", *Journal of Bacteriology*, Vol 26, 341-361, (1933).
- 13- Keller, A.K., Gerthardt, P., "Continuous Lactic Acid Fermentation of Whey to Produce a Ruminant Feed Supplement High in Crude Protein", *Biotech. and Bioeng.*, Vol. 17, 997-1018, (1975).
- 14- Kempe, L.L., Halvorson, H.O., Piret, L.E., "Effect of Continuously Controlled pH on Lactic Acid Fermentation", *Ind. and Eng. Chem.*, Vol. 42, 1852-1861, (1950).
- 15- Kempe, L.L., West, R.E., "The Effect of Agitation on the Rate of Acid Formation by Lactobacillus Delbrückii", *Biotech. and Bioeng.*, Vol 1, 335-348, (1959).
- 16- Kirk, R.E., Othmer, D.F., "Encyclopedia of Chemical Technology," 2.ed., Vol. 12, 170-187, Wiley-Interscience, New York (1963-1972).
- 17- Leonard R.H., Peterson W.H., Johnson M.J., "Lactic Acid from Fermentation of Sulfite Waste Liquor", *Ind. and Eng. Chem.*, Vol. 40, 57-67, (1948).

- 18- Luedeking, R., Piret, E.L., "A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation Batch Process at Controlled pH", *Biotech. and Bioeng.*, Vol.1, 393-412, (1959).
- 19- Montgomery, R., Ronca, A.R., "Chemical Production of Lactic and Other Acids from Molasses," *Ind. and Eng. Chem.*, Vol. 45, 1136-1141, (1953).
- 20- Morton, R.F., Elmer, L.G.Jr., "Growth and Acid Production by Lactobacillus Delbrückii' in a Dialysis Culture System," *Biotech and Bioeng.*, Vol.12, 961-974, (1970).
- 21- Needle, H.C., Aries R.S., "Lactic Acid and Lactates," *Sugar*, 32-36, (December, 1949).
- 22- Nelson, M.E., Werkman, C.H., "Dissimilation of Glucose by Heterofermentative Lactic Acid Bacteria", *Jour. Bact.*, Vol. 30, 547-557, (1935).
- 23- Pamir, H., "Teknik ve Endüstriyel Mikrobiyoloji", 1.Baskı, 11-52, 80-87, A.Ü.Ziraat Fak.Yayınları 681, Ankara(1978).
- 24- - - - - "Fermentasyon Mikrobiyolojisi, 1.Baskı, 76-97, A.Ü.Ziraat Fak. Yayınları 639, Ankara (1977).
- 25- Pekin, B., "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)", 1.Kitap, Kısım 1 ve 2, 23-64, 417-424, 555-765, E.Ü. Kim. Fak.Yayınları 3, İzmir(1980).
- 26- Peppler, J.H., "Microbial Technology", 1st ed., 407-409, Reinhold Publishing (1967).
- 27- Perry, R.H., Chilton, G.H., "Chemical Engineers" Handbook, 5th ed., McGraw-Hill, Tokyo (1973).

- 28- Peters, J.V., Snell, E.E., "The Nutritional Requirements of Lactobacillus Delbrückii", Journal of Bacteriology. Vol. 67, 69-76, (1954).
- 29- Porter, J.R., "Bacterial Chemistry and Physiology", 1st ed. 933-941, Wiley and Sons, New York (1946).
- 30- Prescott, S.C., Dunn, C.G., "Industrial Microbiology", 1st ed., 304-331, McGraw-Hill, New York (1959).
- 31- Pryce, J.D., "A Modification of the Barker-Summerson Method for the Determination of Lactic Acid", Analyst, Vol. 94, 1151-1152, (1969).
- 32- Reid, H.L., Peterson W.H., Johnson M.J., "Lactic Acid From Fermentation of Sulfite Waste Liquor" Ind. Eng. Chem., Vol. 40, 57-67, (1948).
- 33- Smith, R.J., "Determination of Lactic Acid in Heavy Corn Steep Liquor", Anal. Chem., Vol. 25, 505-507, (1953).
- 34- Snell F.D., Ettore, L.S., "Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis", Vol. 15, 125-149, John Wiley and Sons, New York (1974).
- 35- Stiles, H.R., Pruess, L.M., "Nutrient Requirements of Lactobacillus Delbrückii in the Lactic Acid Fermentation of Molasses", Vol. 36, 149, (1938).
- 36- Şahin, İ., "Asit Fermentasyonları", 1. baskı, 57-74, A.Ü. Ziraat Fak. Ders Notu, No 78, Ankara (1982).
- 37- "The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and Other Laboratory Services", 3rd ed., 178, 212, Oxoid Ltd. London (1976).
- 38- Türker, İ. "Asit Fermentasyonları", 1. baskı, 93-103, A.Ü. Basımevi, Ankara (1975).



- 39- Weast,R.C., "CRC Handbook of Chemistry and Physics, 60th ed., Chemical Rubber Co., Florida(1979).
- 40- Weiser,R.B., Geankoplis, C.J., "Lactic Acid Purification by Extraction", Ind. and Eng.Chem., Vol.47, 858-863, (1955).
- 41- Whittier, E.O.,Rogers,L.A."Continuous Fermentation in the Production of Lactic Acid,"Ind. and Eng.Chem, Vol.23, 532-534,(1931).
- 42- William, A.S.,Lee, Y.Y., Anthony, W.B., "Lactic Acid Fermentation of Crude Sorghum Extract",Biotech.and Bioeng., Vol.22., 757-777,(1980)

## EK A. LAKTİK ASİT TAYİNİ

Erlen çalışmalarında tepkime ortamından örnek almak için sterilliğin bozulmamasına dikkat etmek gerekir. Bu yüzden erlenlerden örnekler alev karşısında, her erlenden tüpe yaklaşık 6-7 ml aktarılarak alınır. Alınan örneğin 1 ml'si asit tayininde, geri kalanı mikroorganizma derişimi tayininde kullanılır.

Tepkime kabında yapılan çalışmalarda, tepkime ortamından, tepkime kabının steril örnek alma hortumundan bir sağmal pompa yardımıyla yukardaki gibi yine yaklaşık 6-7 ml örnek alınır.

Örnekten alınan 1 ml, 150 ml'lik erlende 10-15 ml saf su ile seyreltilir, üzerine indikatör olarak 2-3 damla brom-timol mavisi damlatılır, ayarlı 0.05 N sodyum hidroksit çözeltisi ile ortamın sarı renkten mavi-yeşil renge dönüşümü gözlenene dek titre edilir.

Sodyum hidroksit çözeltisinin ayarlanması, primer standart sodyum karbonat ile ayarlanmış 0.1 N hidroklorik asit çözeltisi ile yapılır.

Her örnek alışıta yapılan titrasyon işlemi sonucu harcanan baz miktarından, deney başlangıcında aşılardan hemen sonra yapılan ilk analizde harcanan baz miktarı çıkarılarak "oluşan laktik asit" için harcanan baz miktarı bulunur. Buradan g/l olarak laktik asit derişimine geçilir. 1 ml 0.05 N sodyum hidroksit 4.5 g laktik asite eşdeğerdur.

Laktik asitin nicel analizi Barker ve Summerson (3) tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemle de

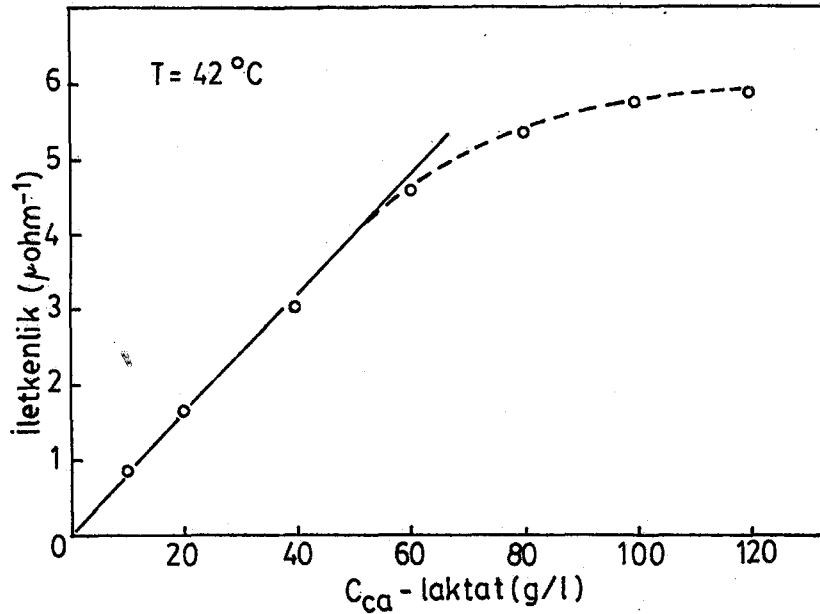
yapılabilir. Bu yöntem belli miktar laktik asit içeren çözeltiliye sıcakta, derişik sülfürik asit ilave edilerek laktik asitin asetaldehite dönüştürülmesi ve soğukta, dimetil formamidde çözülmüş p-hidroksi difenil eklenmesiyle renkli bir kompleksin oluşması esasına dayanır. İşlem bakır sülfat katalizörlüğünde gerçekleştirilir. Oluşan kompleksin spektrofotometrede uygun dalga boyunda absorbanşı okunur. p-Hidroksi difenil temin edilemediği için nicel analizde bu yöntem istenilmesine rağmen kullanılamamıştır (3,16,31,33,34).

Laktik asitin nicel analizinde gaz kromatografisi, özütleme gibi yöntemler de kullanılmaktadır (34).

Çizelge-(B-1): Kalsiyum laktat tayini için derişime karşı iletkenlik değerleri(T:42°C da).

Kalsiyum laktat derişimi (g Ca-laktat/l)	İletkenlik ( $\mu\text{ohm}^{-1}$ )
10	0.9
20	1.7
40	3.1
60	4.6
80	5.4
100	5.7
120	5.9

Tepkime ortamındaki 1.2 g Ca-laktat 1 g laktik asite denk gelmektedir.



Şekil-(B-1): Kalsiyum laktat çalışma doğrusu.

### EK C. MİKROORGANİZMA DERİŞİMİNİN TAYİNİ

Mikroorganizma derişimi tayini spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. En uygun dalga boyu olarak seçilen 480 nm de mikroorganizma içermeyen besin ortamı ile 100 ayarı yapıldıktan sonra tepkime ortamından alınan örnek ya doğrudan ya da uygun oranda seyreltilerek spektrofotometreden absorbanı okunur.

Çalışma doğrusu aynı besin ortamında, farklı derişimlerde mikroorganizma içeren çözeltilerin absorbanlarının okunmasıyla hazırlanır.

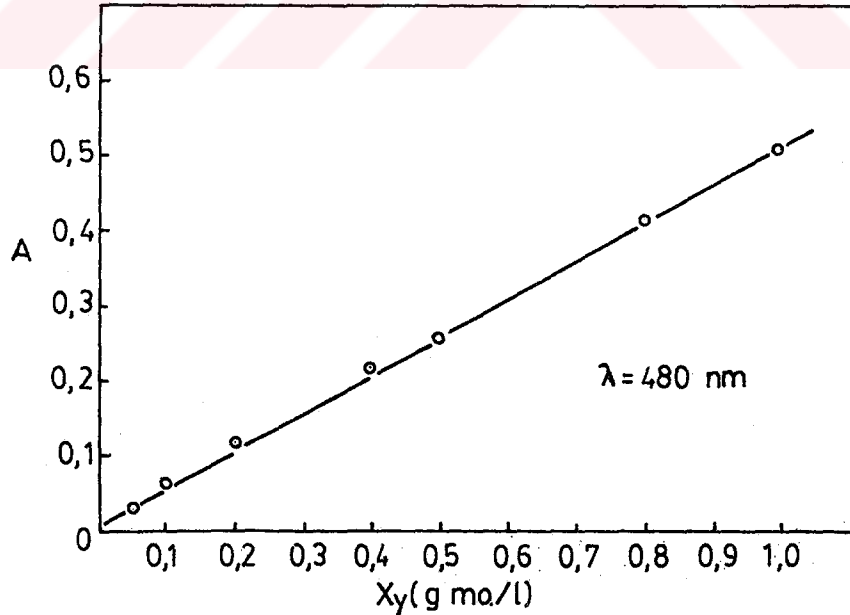
Çizelge-(C-1): Mikroorganizma derişiminin tayini için derişime karşı absorban değerleri (Glukozlu besin ortamında).

Mikroorganizma Derişimi (yaş mo. g/l)	Çözelti Absorbansı ( $\lambda=480$ nm'de)
0.05	0.032
0.10	0.060
0.2	0.115
0.4	0.220
0.5	0.260
0.8	0.420
1.0	0.500

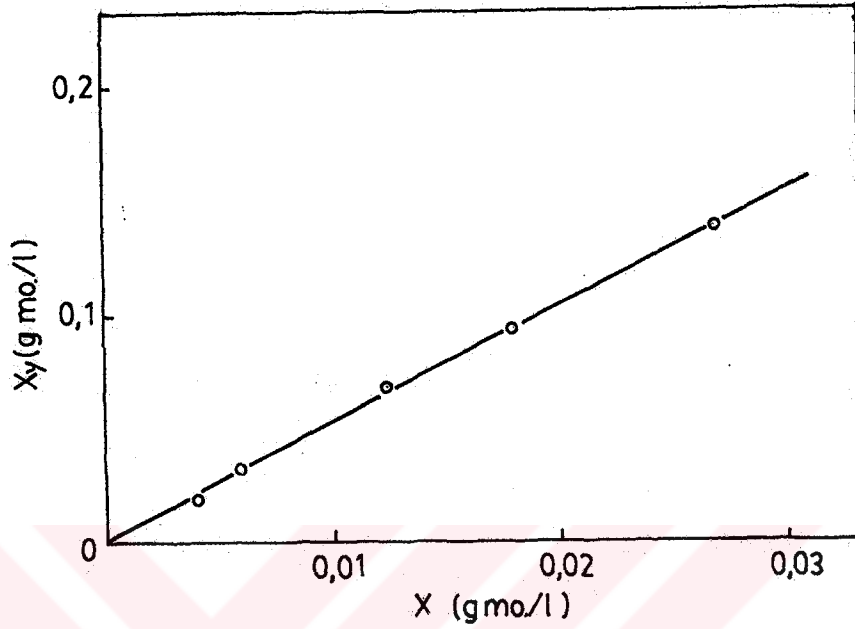
Çalışma doğrusundaki mikroorganizma derişimleri yaş ağırlık temelinde verilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde kuru mikroorganizma ağırlıkları esas alındığı için yaş ağırlık-kuru ağırlık arasındaki ilişkinin bilinmesi gerekir. Bu ilişkinin saptanması için, iyi üremiş bir

ortam santrifüjlenerek dibe çöken mikroorganizmalardan belli miktarlarda kare biçiminde kesilmiş ince alüminyum tabakalara alınarak, hassas terazide tartım yapılır. Yaş ağırlık olarak tartılan mikroorganizmalar  $100^{\circ}\text{C}$  daki etüvde 3 saat kadar tutularak, içerdiği bütün su buharlaştırılır ve tetrar tartılarak kuru ağırlıklar bulunur. Şekil-(C-2) yaş ve kuru ağırlıklar arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Doğru eğiminden Laktobacillus delbrüeckii için yaş Ağırlık/Kuru Ağırlık oranı 5.04 bulunmuştur.

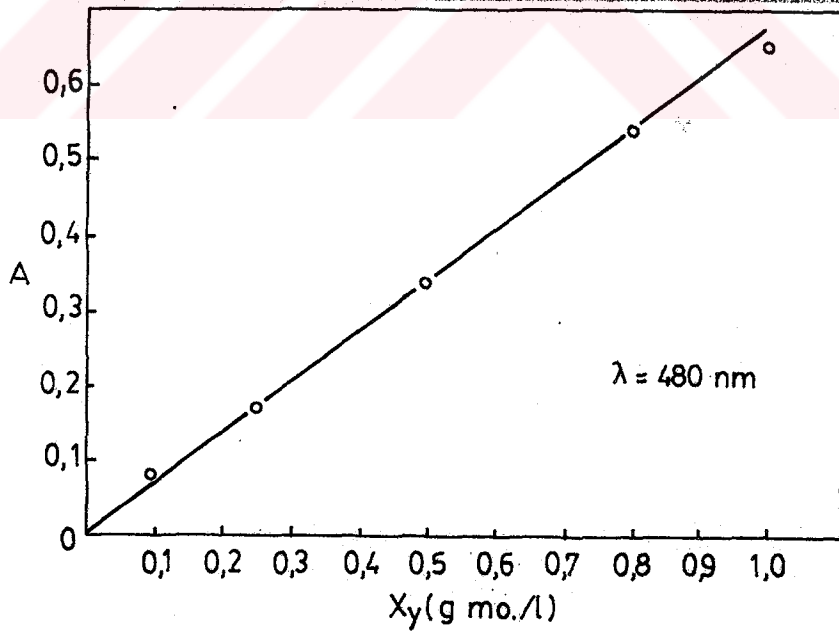
Şekil-(C-3), (C-4), (C-5), (C-6) sırasıyla substratın sakkaroz, fruktoz, invert şeker ve melas içinde sakkaroz olduğu besin ortamlarındaki mikroorganizma çalışma doğrularını göstermektedir.



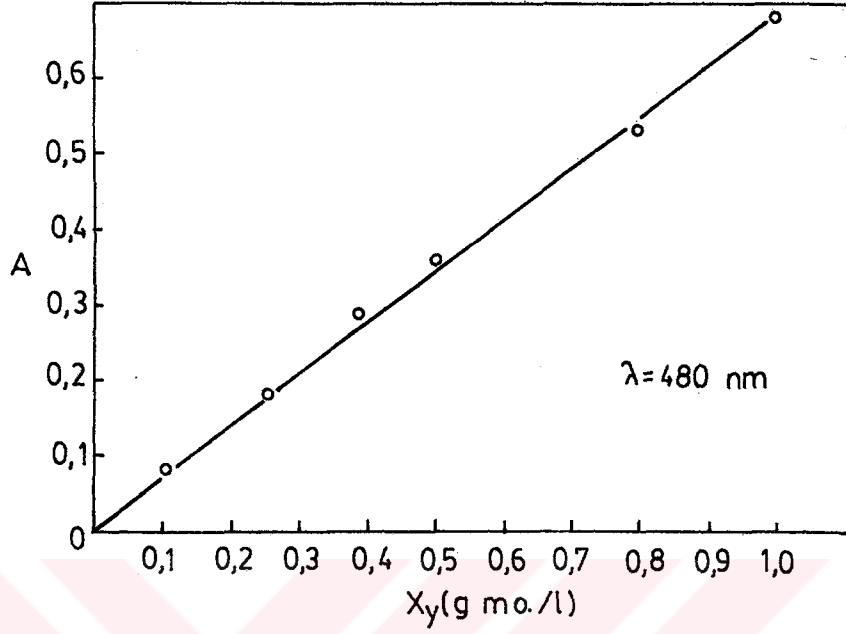
Şekil-(C-1): Glukozlu besin ortamında mikroorganizma çalışma doğrusu.



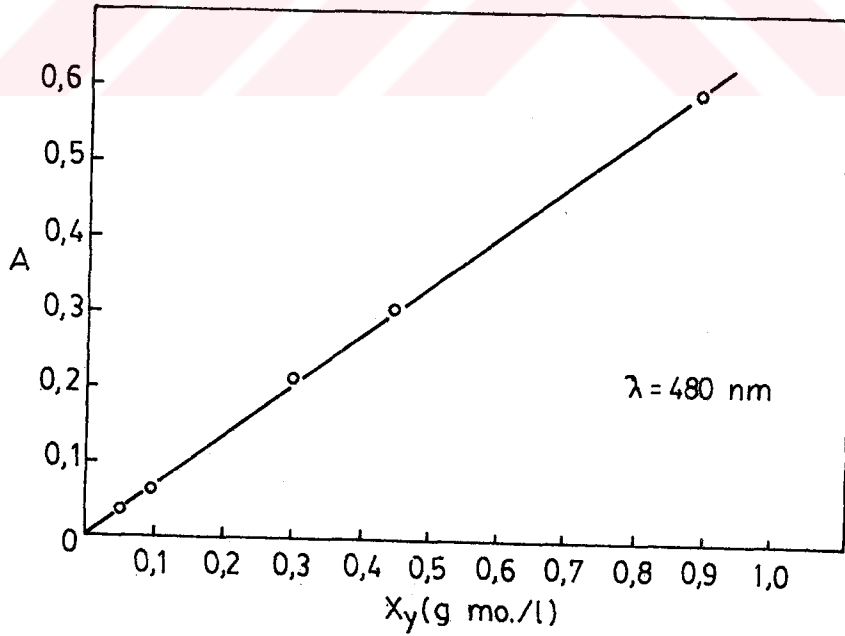
Şekil-(C-2) : Yaş ve kuru mikroorganizma ağırlıkları arasındaki ilişki.



Şekil-(C-3) : Sakkarozlu besin ortamında mikroorganizma çalışma doğrusu.

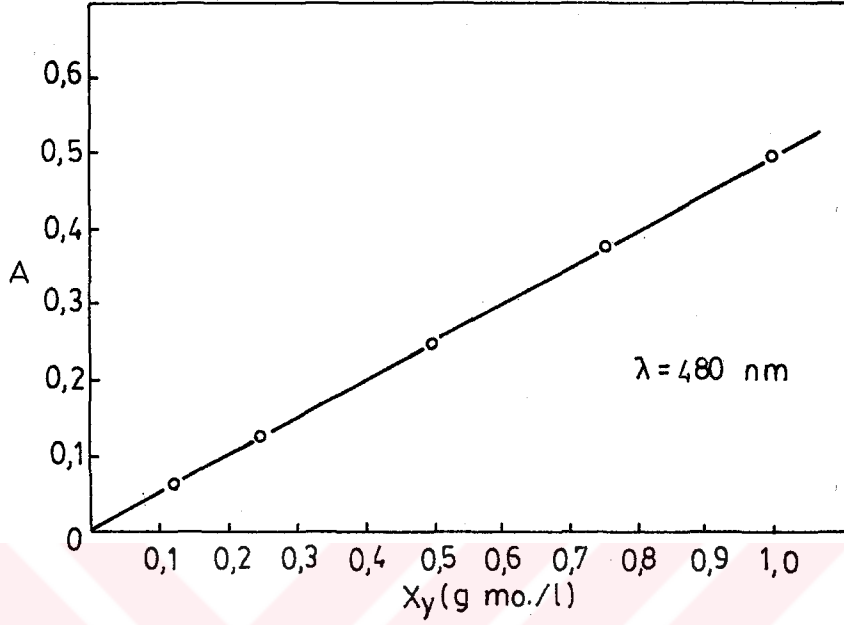


Şekil-(C-4) : Fruktozlu besin ortamında mikroorganizma çalışma doğrusu



Şekil-(C-5) : İvert şekerli besin ortamında mikroorganizma çalışma doğrusu





Şekil-(C-6) : 20 g/l sakkaroz içeren melas çözeltisinde mikroorganizma çalışma doğrusu

## EK D. GLUKOZ TAYİNİ

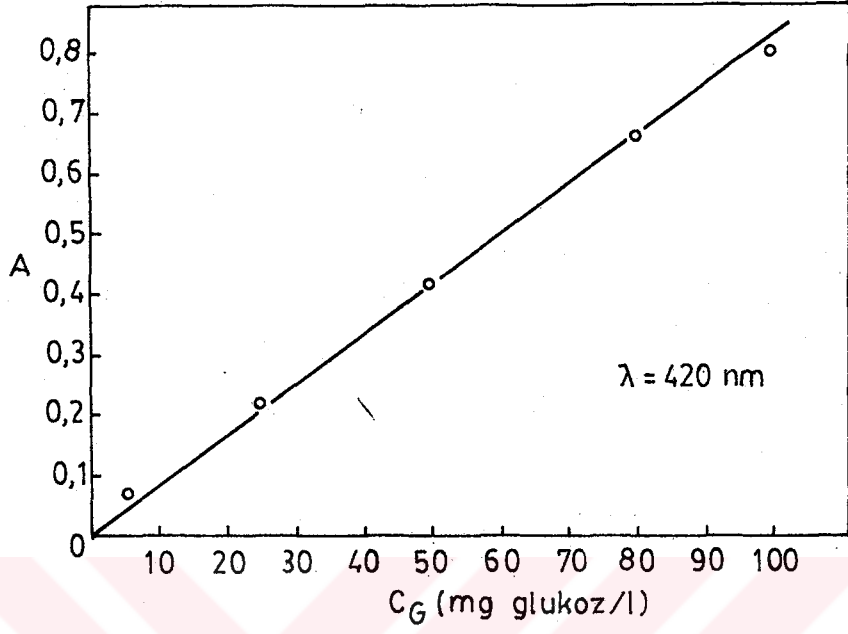
Tepkime ortamından alınan örnekten 0.1 ml'si, glukoz içermeyen besin ortamı ile 200 kat seyreltilir. Seyreltilmiş örnekten 0.2 ml alınır, 6 ml GOD-Perid enzim çözeltisi eklenir. 20-25°C da 50 dakika kadar bekletilir, spektrofotometrede, en uygun dalga boyu olan 420 nm de kör çözeltiye göre absorbansı okunur. Kör çözelti, 0.2 ml glukoz içermeyen besin ortamı ve 6 ml enzim çözeltisinden oluşan bir çözeltidir.

GOD-Perid, D-Glukozu D-Glukonik asite yükseltgeyen, glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimlerini içeren bir maddedir (5). Katalog numarası 15756 olan GOD-Perid'den 1.963 g alınır, 100 ml suda çözülür, buzdolabında koyu renkli bir şişede 6 hafta saklanabilir.

$\lambda_{\max} = 420$  nm de hazırlanan çalışma doğrusu için bulunan veriler ve çalışma grafiği Çizelge-(D-1)'de gösterilmiştir.

Çizelge-(D-1): Glukoz tayini için derişime karşı absorbans değerleri

Glukoz Derişimi (mg G./l)	Absorbans ( $\lambda = 420$ nm'de)
5	0.075
25	0.22
50	0.42
80	0.67
100	0.80



Şekil-(D-1): Glukoz çalışma doğrusu

EK E. LACTOBACILLUS DELBRUECKII İÇİN BESİN ORTAMI BİLEŞENLERİ

E 1. Doğal Besin Ortamı Bileşenleri:

Lactobacillus delbrueckii'nin üremesinin incelendiği tek doğal besin ortamı su ile seyreltilmiş melastır. Ankara Şeker Fabrikası'ndan alınan 1982 melasının ortalama bileşimi Çizelge-(E-1)de verilmiştir.

Çizelge-(E-1) Melasın ortalama bileşimi

Bileşen	Ağırlıkça %
Brix (toplam kuru madde)	86.0
Sakkaroz	49.5
Raffinoz	0.9
Ksiloz	0.6
Invert şeker	0.3
Kül	10.09
İnorganik tuzlar ( $K_2O, Na_2O, Al_2O_3$ CaO, $P_2O_5$ , Nitrat, Nitrit vb.)	

Tek başına seyreltilmiş melas L.delbrueckii'nin üremesi için yeterli olmamıştır. Üremeyi arttıracak, melasta bulunmayan bazı besin maddeleri ortama ilave edilmiştir.

E 2. Sentetik Besin Ortamı Bileşenleri

Sentetik besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan kompleks bileşimli temel besi maddeleri maya özütü ve peptondur. Bunların bileşimlerinde çeşitli organik ve inorganik maddeler bulunur.

Bakterinin azot, vitamin, tuz kaynağı olarak kullanıldığı maya özütünün bileşimi Çizelge-(E-2)de görülmektedir (37).

Çizelge-(E-2) Maya özütünün bileşimi

Bileşen	Ağırlıkça %
Su	4.1
Kül	11.5
Tuz	1.3
Fosfat( $P_2O_5$ )	3.2
Toplam Azot	10.5
Amino azotu	4.6
Nikotinik Asit	1250 ppm
Riboflavin	150 ppm

Genellikle azot kaynağı olarak kullanılan ve ayrıca çeşitli amino asitler ve metal iyonları da içeren peptonun bileşimi de Çizelge-(E-3) de verilmiştir(37).

Çizelge-(E-3): Peptonun Bileşimi

Bileşen	Ağırlıkça %
Su	3.8
Kül	11.3
Klorür(NaCl olarak)	5.5
Fosfat( $P_2O_5$ )	1.2
Toplam azot	3.3
Amino azotu	2.3
Lipidler	0.1
Amonyak	0.47
Amino asitler	70.15
MetaI iyonları	3.7

## EK F. KULLANILAN ALET VE KİMYASAL MADDELER

F 1. Kullanılan Aletler :

Fermentör ( 1 litrelik )	: Pyrex cam, 750 ml çalışma hacmine sahip
pH metre	: Pye-Unicam, model 291
Sıcaklık kontrol birimi	: Techne marka, sıcaklık ayarlı ve karıştırıcılı
Karıştırıcı motor	: Yanke-Kunkel marka, ayarlanabilir devirli
Akış ölçer	: GA Platon marka, rotometre
Pompalar	: Watson-Marlow marka, iki kanallı hız ayarlı sağmal pompa.
Hız ölçer	: Power Instruments marka
Çalkalayıcı	: New-Brunswick model, değişmez sıcaklık ve karıştırma hızında çalışan su banyosu
Spektrofotometre	: Bausch and Lomb, Spectronic 20 model. Görünür ve U.V. bölge ayarlı
Otomatik titratör.	: Ströhlein marka
İletkenlik ölçüm aleti	: Tacussel marka, tip CD7N
Santrifüj	: Hettich marka, devir ayarlı.
Etüv	: Dedeoğlu marka, 100°C ve 300°C lık
Terazi	: Mettler H78 AR ve Mettler PIZION marka
Otoklav	: Webmlw marka

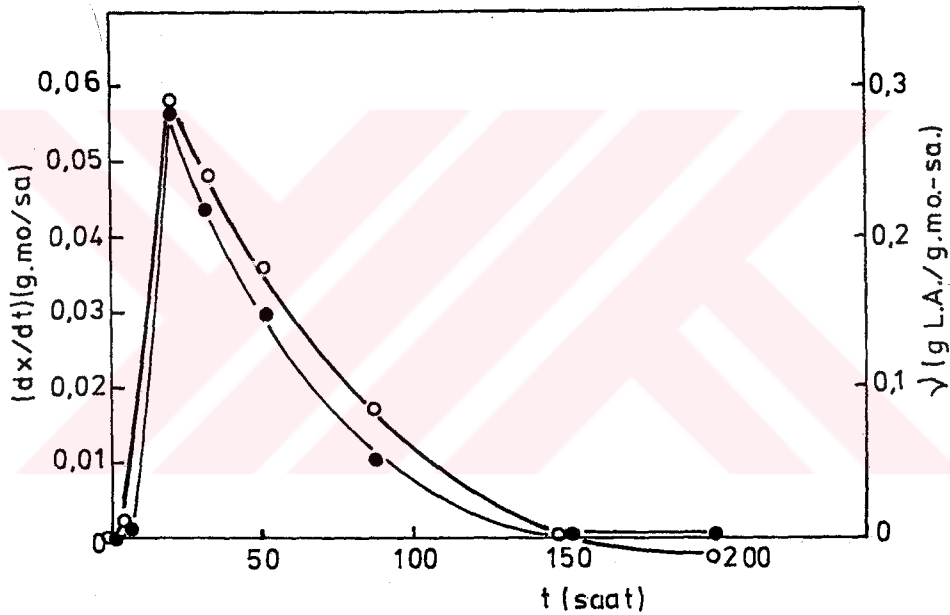
F 2. Kullanılan Kimyasal Maddeler:

D(+)	Glukoz	:	Merck (anhidrit) marka, Teknik kalite (monohidrat)
	Sakkaroz	:	Teknik kalite
	Fruktoz	:	Merck marka
	Maya Özütü (toz)	:	Oxoid marka
	Pepton (toz)	:	Oxoid marka
	di-Potasyum hidrojen fosfat:		BDH Analar kalite, Merck marka
	di-Amonyum hidrojen orto-		
	fosfat	:	BDH Analar kalite
	di-Amonyum hidrojen sitrat:		Merck marka.
	Sodyum asetat (.3 H <sub>2</sub> O)	:	Fisher marka
	Mağnezyum sülfat (.7H <sub>2</sub> O)	:	Fisher marka
	Mangan sülfat	:	Fisher marka
	Agar-agar (toz)	:	Fisher marka, USP.
	Sodyum hidroksit (pellet)	:	BDH , Analar kalite
	Kalsiyum karbonat	:	H-W, Analar kalite
	Kalsiyum laktat	:	Fisher marka
	Sülfürik asit	:	BDH, Analar kalite
	Brom-timol mavisi	:	BDH, Analar kalite (pH aralığı 6.0-7.6)



## EK G. ÖRNEK HESAPLAMALAR

Lactobacillus delbrueckii tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu Deindoerfer sınıflamasına göre mikroorganizma ve ürün bakımından birbirine paralel çoğalma ve üretim şekli gösteren basit bir fermentasyon şeklidir (Şekil-(G-1) ).



Şekil-(G-1):  $(dx/dt)$  ve  $v$  değerlerinin zamanla değişimi

o :  $(dx/dt)$  değerleri

• :  $v$  değerleri

Mikroorganizmanın özgül büyüme hızı,  $\mu$  ( $sa^{-1}$ ), değerlerinin bulunmasında, yarı logaritmik kağıda  $x$  (g mo./l) değerleri y eksenine,  $t$  (sa) değerleri x eksenine geçirilerek, mikroorganizmanın üssel üreme bölgesi saptanmıştır. (Şekil-(G-2) ).

Mikroorganizmaların kullanıldığı biyokimyasal tepkimelerde, kesikli karıştırırmalı kapta üssel üreme bölgesinde mikroorganizmanın çoğalma hızı birinci dereceden şu ifadeyle gösterilir.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \dots\dots (5)$$

Bu denkleğin çözümü,

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \dots\dots (6)$$

şeklindedir.

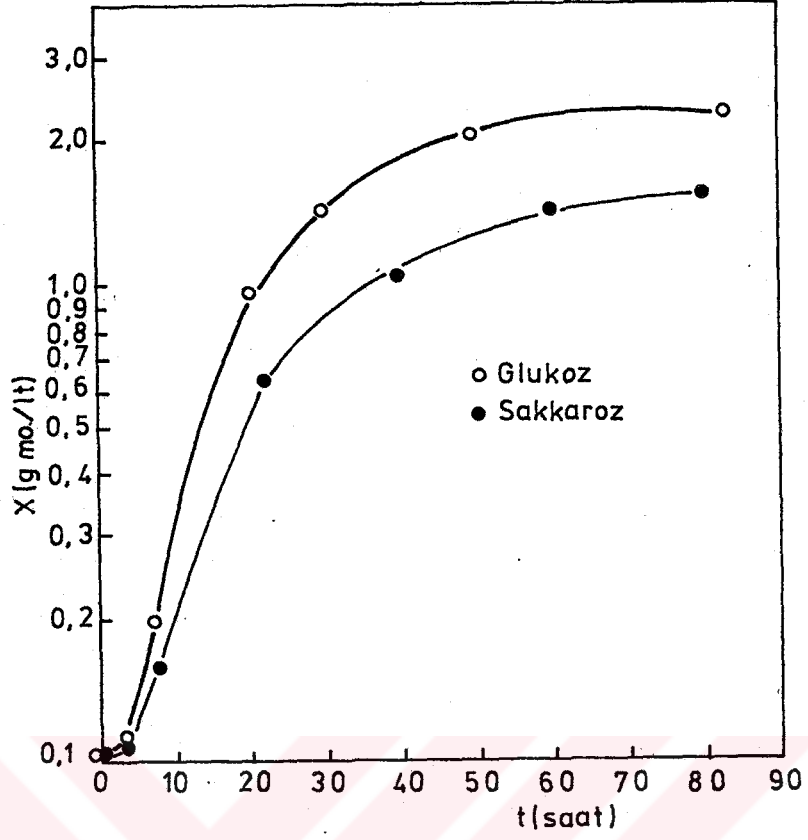
$\mu$  değerleri bu bölgede seçilen  $x$  (g mo./l) ve  $t$  (sa) değerlerinden (6) denkleğine göre bulunur.

Mikroorganizmanın ikilenme süresi:

$$t_{ik} = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots\dots (7)$$

şeklinde verilir. Bu denkleğe göre de L.delbrüeckii için ikilenme süreleri bulunmuştur.

$\nu$  (g.L.A./g mo.-sa) olarak gösterilen ürünün özgül oluşma hızının bulunmasında ise  $C_{LA}$  (g L.A./l)- $t$  (sa) grafiğinde üssel üreme bölgesindeki  $(\Delta C_{LA}/\Delta t)$  (g L.A./l-sa) eğim değerleri hesaplanarak en uygun değer seçilmiş, bu bölgeye denk gelen  $x$  (g mo/l) değeri,  $x$  (g mo/l)- $t$  (sa) grafiğinden alınarak  $\nu = \frac{1}{x} \cdot \frac{\Delta C_{LA}}{\Delta t}$ , (g L.A./g mo.-sa) değeri elde edilmiştir.



Şekil-(G-2) : Yarı logaritmik grafik kağıdında glukoz ve sakkarozlu besin ortamlarında mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi