Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ

Gıda üretiminde ilk çağlardan bu yana, biyolojik güçlerden yararlanıldığı (yoğurt, alkollü içkiler, peynir, sirke, turşu vb.) bilinmekle birlikte, bu gücün büyüklüğü, teknikteki kullanım olanakları yirmi birinci yüzyılın ortalarına doğru anlaşılmaya başlanmıştır. Mikroorganizmaların yalnızca hastalık yapmadığı, uygun şartlarda reaksiyon yapabildikleri gözlenmiş; bu biyokimyasal dönüşümlerle, kimyasal yoldan elde edilen ürünler elde edilebilmiştir.

Biyokimyasal reaksiyonların çoğunlukla, kimyasal reaksiyonlardan daha ekonomik ve kolay oluşu, önceden sadece kimyasal yol ile elde edilebilen bazı ürünlerin fermantasyon yolu ile üretilebilmelerini ekonomik duruma getirmiştir. Hatta kimyasal yol ile gerçekleştirilemeyen bazı reaksiyonlar, fermantasyon yolu ile (biyodönüşüm ile) gerçekleştirilmiştir. Örneğin; ilaç olarak kullanılabilen birçok kimyasal madde (özellikle antibiyotikler) günümüzde, yalnızca fermantasyon yolu ile mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir.

Endüstriyel Mikrobiyolojinin konusu; endüstriyel bir amaca hizmet için mikroorganizmaları kullanmaktır.

Biyolojik elemanlar kullanılarak, endüstriyel boyutlarda gerçekleştirilen üretimlere, genel olarak, “biyoproses-biyoişlem” denilmektedir.

Biyoproseslerde

Hücre----------Enzim

Biyokatalistlere
(serbest veya immobilize) mutlaka gereksinim vardır.

Mikroorganizma hücresi veya hücre bileşeni olan enzim, biyoproseslerde biyokatalist olarak kullanılırlar. Ya da hücre, doğrudan serbest veya immobilize edilmiş olarak kullanılabilir.

Biyoprosesler ile yapılan üretimlerde şu temel koşullar sağlanmalıdır:

1) Uygun endüstriyel mikroorganizma suşunun temini (seleksiyon veya mutasyon yolu ile)
2) Mikroorganizma suşunun geliştirilmesi ve çoğaltılması
3) Uygun substrat seçimi ve formülasyonu
4) Uygun koşullarda biyosentez
5) Ürünün gelişme ortamından ayrılması ve saflaştırılması

HAMMADDE
| Önişlemler (biyoreaktöre konulmadan önce)
| -pH ayarı
| -konsantrasyon ayarı
| -sakkarifikasyon
| -besin ilavesi

SUBSTRAT
|
Sterilizasyon | Biyokatalist (Mikroorganizma veya enzim)
| (Starter ilavesi)

BİYOREAKTÖR
|
|
AYIRMA, SAFLAŞTIRMA
| | |

Ürün Yan ürün Atık

Görüldüğü gibi, biyoreaktörler prosesin kalbi konumundadır. Biyoreaktörde kontrol edilebilen çevre koşullarına ihtiyaç duyulur. Çünkü biyoreaktörler **sıcaklık, pH değişikliği, besin konsantrasyonu (ozmotik basınç)** ve **metal iyonlarına** karşı çok hassastırlar.

Biyoproseslerin başarısı koşulların hangi ölçülerde kontrol edilebildiğine ve optimum değerlerin hangi ölçülerde sabit tutulabildiğine ve hangi ölçülerde optimize edilebildiğine bağlıdır.

Endüstriyel üretimlerde mikroorganizmalar kullanılırken, genellikle tek bir tip mikroorganizma seçilir. Genellikle karışık bir kültür ile çalışılmak istenmez ve tek bir mikroorganizmadan çoğaltılmış saf kültür kullanılır. Böyle bir proseste, çalışma ortamının ve besinlerin de steril olması çok önemlidir. Diğer mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonu önlemek amacıyla, reaktöre giren gaz bile steril edilir.

MİKROORGANİZMLAR HANGİ ÜRETİM ALANLARINDA KULLANILIRLAR?

1. Biyokütle üretimi. (Ekmek mayası üretimi, THP üretimi)
2. Hücre bileşenlerinin üretimi (hücre değil). Örneğin; hücre üzerinden enzim veya nukleik asit üretimi
3. Metabolitlerin üretimi. Bunlar hücrenin metabolik aktivitesi sonucu oluşan etil alkol, organik asitler, antibiyotik, vitamin, vb. kimyasal ürünlerdir.
4. Arıtma (atık su arıtımı, maden arıtımı). Örneğin; düşük yüzdeli kükürt minerallerinden madenlerin kazanılması.

ENDÜSTRİDE KULLANILAN MİKROORGANİZMLARDAN İSTENİLEN ÖZELLİKLER

Endüstride kullanılan mikroorganizmalar, herhangi bir üretimin başarılı olup olmamasında en önemli etkenlerden birisidir. Bu nedenle üretimde kullanılacak mikroorganizma kültüründen, prosese uygun bazı özellikler aranır. Bunlar, genel olarak şöyle özetlenebilir:

1. Mikroorganizma suşu genetik bakımdan stabil olmalıdır. Devamlı ve kendiliğinden başka formlar meydana getiren bir suş istenmez.
2. Suş kolaylıkla ve çok sayıda vegetatif hücre, spor veya diğer çoğalma organları meydana getirebilmelidir.
3. Suş aşılamayı takiben kolaylıkla çoğalabilmelidir.
4. Mikroorganizma kültürü yalnızca mikroskopta görülen diğer mikroorganizmalardan değil, aynı zamanda fajlardan da temiz olmalıdır.
5. Suş kısa sürede ve yüksek verimde istenilen ürünü oluşturabilmelidir.
6. Suş bütün toksik maddelerden temiz bir ürün oluşturmalıdır (GRAS “generally recognised as safe” kabul edilmeli).
7. Ürün üretildiği ortamdan kolaylıkla ayrılabilmelidir.
8. Suş, mümkünse kontaminasyona karşı kendini koruyabilmelidir. Örneğin; kontaminant mikroorganizmalardan daha düşük pH’da veya daha yüksek sıcaklıkta gelişebilmeli, ya da diğer mikroorganizmaların gelişmesini engelleyecek bir metabolit üretebilmelidir.
9. Suş kolaylıkla kültüre alınabilmeli ve kolaylıkla muhafaza edilebilmelidir.
10. Suş, gerektiğinde bazı mutajenler tarafından mutasyona uğrayabilmelidir. Mutasyon ile daha yüksek verimli suşlar elde edilebilir.
11. Suş kendi ürettiği ürünü parçalamamalı ya da istenmeyen başka ürünlerin sentezinde kullanmamalıdır.

Mikroorganizma kültürlerinden istenilen bu özellikler, genel anlamda, endüstride kullanılan bütün mikroorganizmalar için geçerlidir. Ancak; üretimde kullanılan değişik proseslerin kendine özgü teknik koşulları, mikroorganizma kültürünün seçiminde esas olmalıdır.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

ASETİK ASİT ÜRETİMİ (SİRKE ÜRETİMİ)

Sirke: Değişik şekerli meyve şıralarının önce alkol sonra asetik asit fermantasyonuna tabi tutulması ile elde edilen bir çeşni maddesidir.
Sirkenin tarihi şarabın tarihi kadar eskidir. Çünkü, açık kapta bulunan bir şarap kolaylıkla sirkeleşir.

Asetik asit fermantasyonunun biyokimyası
Sirke üretiminde iki ayrı fermantasyon olayı sözkonusudur.

I. $C_6H_{12}O_6$ ---------- ------- $2CH_3CH_2OH + 2CO_2 + 28.2$ kcal (Alkol fermantasyonu)
II. $2CH_3CH_2OH + O_2$ --------- $2CH_3COOH + 2H_2O + 118$ k.kal (Asetik asit ferm.)

Asetik asit fermantasyonunun yolizi ise şöyledir.

CH_3CH_2OH
(etil alkol)
--------- *(Alkoldehidrogenaz)*

CH_3CHO
(asetaldehit)

-------- H_2O

$CH_3CH(OH)_2$
(asetaldehithidrat)

---------- *(Aldehitdehidrogenaz)*

CH_3COOH
(asetik asit)

Reaksiyonda iki defa dehidrogenasyon olmakta, ayrılan hidrojen havanın oksijeni tarafından tutulmaktadır.

Asetik asit bakterileri
Zorunlu aerobik mikroorganizmalar olup, kısa çomak şeklinde, gram-negatif, katalaz-pozitif bakterilerdir. İki cins içerisinde gruplandırılır:
1. Gluconabacter
2. Acetobacter (Endüstride kullanılan)

Asetik asit fermantasyonunda önemli etkenler

Hava (oksijen): Etil alkolün asetik asite dönüşmesi bir oksitlenme reaksiyonu olduğundan, ortamda bol oksijenin bulunması şarttır. 1 g etilalkolün asetik asite oksidasyonu için 12 litre hava gereklidir.

Alkol: Asetik asit bakterileri alkollü sıvılarda yaşadıkları ve kendilerine gerekli enerjiyi alkolü okside ederek sağladıkları halde, alkole dayanıklılıkları sınırlıdır ve bu türlere göre değişir. En fazla alkole (% 13-14) dayanıklı türler; *A. Shützenbachi, A. curvum, A. Acetigenum'*dır.
Uygulamada, sirkeleştirilecek alkollü sıvının alkol oranı % 10-11'e indirilir.
Asit: Asetik asit bakterilerinin kendileriasit oluşturdukları halde, bu aside dayanıklılıkları sınırlıdır. Aside en dayanıklı tür *A. Shützenbachi* olup, %13-14 aside dayanabilmektedir.
Sıcaklık: Asetik asit bakterileri için en uygun sıcaklık 28-32 ^{0}C'dir. Daha düşük ve yüksek sıcaklıklarda faaliyetleri yavaşlar.
Besin maddeleri ve ortam bileşenleri:
Su: Hammadde olarak kuru meyve tahıl veya ispirto kullanılması durumunda, sulandırma suyunun temiz, kokusuz, berrak ve yumuşak olması gerekir.
Aşılama: Sirkeleşmeye bırakılacak alkollü sıvıya başlangıçta bir miktar (1/4-1/10) keskin sirke katılması gerekir. Bu sirke;

- İyi kalite
- Keskin
- Süzülmemiş
- Pastörize edilmemiş

olmalıdır. Ya da yeterince çoğaltılmış saf bakteri kültürü ile aşılanır.

Sirke Üretim Yöntemleri

1. **Yavaş yöntem:** Fıçı damacana gibi ağzı açık ve bol havalanabilen kaplarda alkollü sıvı sirkeleşmeye bırakılır. Sirkeleşme 1.5 -2 ay sürer. Bu yöntemde 1 m^2 zar alanı günde 0.5 litre saf alkolü okside eder.
2. **Çabuk yöntem (Jeneratör yöntemi):** Kabı içerisine üzerine mikroorganizmanın tutunabileceği ve geniş yüzey sağlayacak yonga veya mısır koçanı doldurulur. Alkol içeren ham şarap yukarıdan yağmurlama suretiyle, dolgu materyali üzerine akıtılır. Dolgu materyali üzerine daha önce tutunmuş olan mikroorganizmalar ile temas eden alkol oksidatif bir fermantasyon sonunda asetik asite dönüştürülür. Alkollü sıvının akış hızı alkolün tamamının asite dönüşeceği şekilde ayarlanır. Bu amaçla özel **Frings Jeneratörü** geliştirilmiştir. Jeneratörde 1 m^3 dolgu materyali güne 2.5-3.5 litre alkolü okside eder.
3. **Daldırma (Deri kültür, Submers) yöntemi:** Bu yöntemde asetik asit bakterileri alkollü sıvıların yüzeyinde değil, içinde çalışırlar. Sıvının içerisine çok ince kabarcıklar halinde sürekli olarak hava verilir. Bu yöntemde sirke üretimi jeneratör yöntemine göre 30 kez daha hızlı olmaktadır. Günde asite çevirdiği saf alkol miktarı (L) esas olmak üzere, 25 ….1800 tiplerinde **asetatör**'ler mevcuttur. Asetatörlerde yapılacak üretimlerde "özel bakteri kültürlerinin" kullanılması gerekmektedir.

Alkol sirkesi: Sulandırılmış damıtık alkolden üretilir. Fermantasyon sirkesi ile suni (alkol) sirkesi "Asetil metil karbinol " testi ile ayırt edilir.

Melastan Asetik Asit Üretimi:

- Melas önce alkol fermantasyonuna uğratılır.
- Meydana gelen alkol, derin kültür yöntemi ile asetik asite dönüştürülür.
- Elde edilen %10-12'lik asetik asit etil asetat ile eksrakte edilir. Sonra azeotropik damıtma ile %98-99'luk asetik asit elde edilir.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

BİYOGAZ ÜRETİMİ

Organik maddeler oksijensiz ortamda, yani anaerobik olarak çürümeye uğratılırsa, aralarında yüksek oranda metan gazı bulunan bir gaz karışımı elde edilir. Bu gaz karışımına "biyogaz" denilmektedir. Çoğunluğunu tarım ve sanayi artıklarının oluşturduğu bu organik maddeler havasız ortamlarda biyogaz'a dönüştürülebilirler.

Biyogaz üretimi 3 aşamada oluşur:

1. İlk aşamada yüksek yapıdaki organik bileşikler anaerop mikroorganizmaların salgıladıkları enzimler sayesinde, küçük moleküllü ara ürünlere dönüştürülür (SIVILAŞTIRMA).
2. İkinci aşamada bu ara ürünler önce piruvik asite, sonra küçük moleküllü alkol ve organik asitlere dönüştürülür (ASİTLEŞTİRME).
3. Üçüncü aşamada ise asitleştirme aşamasının ürünleri metan üreten bakteriler tarafından metana dönüştürülür (BİYOGAZ OLUŞUMU).

ATIK SU ARITIMI

Atık su denilince, şehir kanalizasyon suları ve endüstrinin kullandıktan sonra attığı sular anlaşılır. Akarsulara, göllere veya denizler atılan bu sular doğal olarak temizlenme güçlerinin çok üzerinde bir kirlilik ortaya çıkardıklarından, doğayı ve halk sağlığını tehdit eder duruma gelmişlerdir.

Uygun koşullar altında sular, belli miktarda çözünmüş oksijen içerirler ve bu miktar çeşitli etkenlerle değişebilir. Sulardaki çözünmüş oksijenin kirlilik etmenleri tarafından azaltılması halinde, anaerobik mikroorganizmalar organik maddeleri parçalayarak anaerobik kokuşmaya neden olurlar.

Kentlerde ve endüstride atılan suların kirlilik dereceleri, kullanım amaçlarına göre, istenilen düzeye indirilmelidir.

Atık suların kirlilik derecelerinin saptanmasında, şu analizler yapılır:

1. Biyolojik oksijen gereksinimi (BOD)
2. Kimyasal oksijen gereksinimi (COD)
3. Asılı katı madde
4. Permanganat değeri

Atık suların temizlenmesinde ilk aşama, süspansiyon halindeki katı maddelerin ızgara veya kalburlardan geçirilerek tutulması, sonra bekleme havuzlarında çöktürülmesidir. İkinci aşamada ise, kendi ağırlığı ile çökemeyen organik materyal, aktif çamur muamelesi ile, biyolojik olarak parçalanır. Biyolojik işlemlerde, sudaki kirlilik unsurlarına göre, önce anaerobik parçalanma sonra oksidasyon havuzlarında bol oksijen temini ile organik maddelerin aerobik parçalanması gerçekleştirilir.

Atık suların arıtılmasında bir tür başlatıcı kültür olarak kullanılan aktif çamur, başta bakteriler, algler, protozoalar, mantarlar olmak üzere çok çeşitli mikroorganizma gruplarını içermektedir.

Aerobik işlemler sırasında, suları oksijence zenginleştirmek için açık havuzlarda sular ya karıştırılır ya da havaya püskürtülerek, hava ile temas etmesi ve oksijenin su içinde çözünmesi sağlanır.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

EKMEK MAYASI ÜRETİMİ.

Ekmek mayası; hamurda bulunan basit şekerleri fermantasyona uğratarak, meydana gelen CO_2 ile hamurun kabarmasını, diğer maddeler ile de hamurun olgunlaşmasını ve aroma oluşumunu sağlayan *Saccharomyces* cinsine ait mikroorganizmalardır.

Ekmek hamurunun hazırlanmasında 18.yy ortalarına kadar ekşi hamur mayası kullanılmıştır. Bilindiği gibi ekşi hamur mayası, bir gün önce kabarmış olan hamurdan ertesi günkü hamur için ayrılan kısımdır. Bu ekşi hamur mayasının içinde *Saccharomyces* cinsi mayaların yanında çok sayıda laktik asit bakterileri ve diğer bakteriler de bulunmaktadır. Ekşi hamur ile mayalanan hamurda bir yandan mayalar çalışırken diğer yandan da laktik asit bakterilerinin faaliyeti sonucunda hamur ekşi tatta olur.

Daha sonra hamurun kabartılması amacıyla bira ve ispirto fabrikası artığı maya kullanılmaya başlanmıştır. Bu mayaların kalitelerinin sürekli farklılık göstermesi ve özellikle saf ve dayanıklı olmamaları nedeniyle, ekmek mayası üretimi için yeni teknolojiler geliştirilmiştir.

Ekmek mayası üretimi amacıyla gerçekleştirilen ilk uygulamalarda maya çoğalması sırasında bir taraftan da alkol fermantasyonunun devam etmesi nedeniyle verim düşük olmuştur. Ekmek mayası üretiminde substrata hava verilmesine 20. yy başlarında başlanmış, böylece son üründeki maya verimi alkol aleyhine artırılmıştır. Daha sonra havalandırılarak yapılan üretim sırasında az da olsa oluşan alkolün de maya tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmasına olanak tanıyan "Akıtma Yöntemi" geliştirilmiştir.

Ekmek Mayası Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Ekmek Mayası Üretiminde *Saccharomyces cerevisiae* türüne ait suşlar kullanılır. Bu maya suşları;

-Isıya dayanıklı olmalı
-Çabuk çoğalabilmeli
-Enzimatik etkinliklerini uzun süre koruyabilmeli

Ayrıca;

-Hamuru fazla kabartma özelliğinde olmalı
-Ekmeğe yabancı tat ve koku vermemelidir.

Ekmek Mayası Üretim Koşulları

Hammadde: Ekmek mayası üretiminde hammadde olarak en çok melas, ayrıca tahıllar ve nişasta şurupları kullanılmaktadır. Bu hammaddeler tamamen ülke koşulları ile ilgili olup, ülkemizde şeker pancarı melası kullanılmaktadır.

Ekmek mayası üretiminde hammadde olarak kullanılacak melasın şeker dışındaki diğer bileşim öğeleri ve bunların miktarları da dikkate alınmalıdır. Şeker pancarı melasının bileşiminde yaklaşık

% 80 kuru madde
% 50 şeker
% 1.3-2.5 N'lu maddeler bulunur.

Melas bu bileşimi ile maya biyokitlesini oluşturmak amacıyla gereken makro ve mikro elementler yönünden N, P ve bazen da Mg dışında, yeterlidir. Bu eksik olan besin maddeleri organik ve anorganik bileşikler halinde dışarıdan ilave edilmelidir. Azot kaynağı olarak amonyak ve amonyum tuzları, fosfor kaynağı olarak orto-fosfatlar ve fosforik asit yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, Mg tuzları ve vitaminler de (biotin, thiamin) ilave edilmelidir.

Maya (kuru madde üzerinden) yaklaşık,

% 46 karbon
% 32 oksijen
% 8.5 azot
% 6 hidrojen
% 7.5 kül içerir.

Uygun koşullarda 200 g sakarozdan 100 g maya (**Y** x/s = 0.5) elde edildiği kabul edilecek olursa, 100 g maya kuru maddesinin sentezi için;

200 g sakaroz + 10.32 g NH_3 + 100.44 g oksijen + 7.5 g kül --- 100 g maya + 140.14 g CO_2 + 78.12 g H_2O

eşitliğini gerçekleştirecek besin maddeleri ortamda bulunmalıdır.

Oksijen Gereksinimi

Genel olarak 1 g maya kuru maddesinin elde edilebilmesi için 1 g oksijene gereksinim vardır. Endüstriyel uygulamalarda oksijen gereksinimi ortama steril hava verilerek sağlanır.

Saccharomyces cerevisiae mayaları aynı zamanda alkol ürettiğinden ortamın havalandırılmasıyla mayaların fermantasyona yönelmeleri engellenecek, substrat biyokütle oluşumu için kullanılacaktır (Pastör etkisi). Örneğin; anaerobik koşullarda maya verim katsayısı (**Y** x/s) 0.075 iken, aerobik koşullarda verim katsayısı (**Y** x/s) 0.5'in üzerine çıkabilmektedir.

May üretiminde ortama verilen oksijen miktarından çok oksijenin sıvı fazda çözünen ve maya hücresi tarafından kullanılabilecek oranı (çözünmüş oksijen konsantrasyonu) büyük önem taşır. Bu nedenle fermentöre verilen havanın küçük kabarcıklar halinde sıvı içinde dağılmasına özen gösterilmelidir. İyi bir karıştırma sonucu verilen oksijenin % 40-50'sinin sıvı faza transferi ve maya tarafından kullanımı sağlanabilir.

Şeker Konsantrasyonu

Substrattaki şeker konsantrasyonunu yüksek olması halinde maya verimi düşmekte, CO_2 ve etil alkol üretimi artmaktadır. Maksimum verim için şeker konsantrasyonunun 0.3 g/L yi geçmesi istenmez. Böyle düşük şeker konsantrasyonu, bolca havalandırılan fermentöre melasın kademeli olarak verilmesi ile sağlanır.

pH

Ekmek mayası üretiminde biyokütle gelişimi için en uygun pH 4.5 - 5.0 arasındadır. Düşük pH değerlerinde bakteriyel kontaminasyon riski azalacağında, en iyisi başlangıçta 4.2 – 4.5 pH' da çalışmaya balanır, sonlara doğru pH 4.8 – 5.0'e yükseltilir.

Sıcaklık
En uygun sıcaklık 28-30 ^{0}C'dir.

Ekmek Mayasını Üretim Aşamaları

1. Melasın hazırlanması
2. Ana mayanın elde edilmesi
3. Mayanın elde edilmesi
4. Mayanın ayrılması, paketlenmesi, depolanması

Melasın Hazırlanması
Melas, ekmek mayası üretiminde doğrudan kullanılamaz. Fermantasyon yeteneği yüksek ve açık renkli maya elde etmek için, aynı zamanda mayanın muhafazasını kolaylaştırmak amacıyla, özellikle melastaki renk maddelerinin ve diğer yabancı maddelerin uzaklaştırılması gerekir.

Melas iki aşamada berraklaştırılır;
1. 1: 1 oranında sulandırıldıktan sonra 4.5–5.0 pH'ya kadar H_2SO_4 ile asitlendirilir ve kaynatılır.
2. Sonra, santrifüf edilerek kaba tortusundan ayrılır.

Melas çözeltisi hemen kullanılmayacaksa 60 ^{0}C'nin üzerinde ya da 15 ^{0}C'nin altında tutulur. Berraklaştırılan melasa mayanın gelişmesi için gerekli besin maddeleri ilave edilir.

Mayanın Elde Edilmesi
Maya üretimine laboratuvarda saf kültür ile başlanır. Yatık agardaki saf kültür gittikçe artan hacımlara aşılanarak, sonuçta 25–50 kg maya kültürü elde edilir. Daha sonra işletmelerdeki 15 –200 m^3 hacmındaki fermentörlere 2.5–4.0 ton işletme mayası verilerek, 18–20 saat sonunda maya kütlesinde 6-7 kat artış sağlanır.

Ekmek mayası üretiminde geleneksel olarak kesikli yöntem uygulanmakta ve melas kademeli olarak (şeker maya tarafından kullanıldıkça) fermentöre verilmektedir.

Mayanın Ayrılması
Yaklaşık 150–200 g/L oranında maya içeren sıvı ortam separatörden geçirilerek maya kreması sıvı kısımdan ayrılır. Bol su ile yıkanıp, tekrara separatörden geçirilir ve gerekirse bu işlem birkaç kez tekrarlanır. Bakteriyel kontaminasyonu önlemek için bu maya kreması pH 2.0'e kadar asitlendirilir ve bu pH'da 1-2 saat tutulur. Yıkama ve separasyon işlemlerinden sonra maya tortusu 4 ^{0}C'ye soğutulur.

Pres Maya
Soğutulmuş maya kremasının bir kısım suyu, döner vakumlu filtreler veya filtre presler yardımı ile ayrılır. Bu işlem sonunda maya kuru maddesi % 27-30'a yükselir. Filtrasyon sonunda elde edilen maya kekine şekil verilerek ambalajlanır ve 3-4 ^{0}C'de depolanır. 24-48 saat bu sıcaklıkta tutulduktan sonra, soğutma donanımına sahip araçlarla satışa sunulur. Paketlenmiş pres maya % 2'den fazla ölü hücre içermemelidir.

Aktif Kuru Maya

Aktif kuru maya, dağıtımda ve depolamada soğuk zincirin yetersiz olduğu durumlarda, ayrıca dağıtımın uzun mesafelere ve uygun olmayan koşullarda yapılması halinde, pres mayanın yerine kullanılmaktadır. Mayada gözlenen canlılık kaybı kurutma yöntemine göre değişmekte, ancak önemli bir kaybın olmamasına çalışılmaktadır.

Aktif kuru maya üretiminde, filtrasyon ile elde edilen pres keki şekil verilerek kurutucuya gönderilir. Kurutucu olarak, çoğunlukla sürekli tünel tipi kurutucular ile akışkan yataklı kurutucular kullanılır. Kurutma sırasında verilen havanın sıcaklığı 25-45 ^{0}C arasında değişir. 2-4 saat sonunda % 7.5-8.5 nem içeren aktif kuru maya elde edilir. Değişik boyutlarda ambalajlanarak (birkaç gramdan 10 kg'a kadar) satışa sunulur. Küçük ambalajlar azot atmosferinde, büyük ambalajlar vakum altında paketlenir. Azot gazı veya vakum altında yapılan ambalajlama sonunda, aktivite kaybı ayda % 1 dolayındadır.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

SUBSTRAT FORMÜLASYONU

Substrat içerisinde mikroorganizmanın gelişmesini, biyosentez ve diğer faaliyetlerin en iyi olmasını sağlayacak gerekli besin maddeleri bulunmalıdır. Gereksinim duyulan besin maddelerini yeterli miktarda ve uygun formlarda içeren bir substrat başarılı bir üretim için ilk adımdır.

Substratın kimyasal bileşimi, hücre ve ürün sentezi için elementel gereksinimlerin tümünü karşılamasının yanısıra hücre muhafazası ve metabolik faaliyetler için gerekli enerjiyi de sağlamalıdır.

Buradan da anlaşılacağı gibi, mikrobiyal aktivite için iki önemli beslenme faktörü vardır:

a- Hücre metabolizması için gerekli enerji kaynakları,
b- Hücreyi oluşturan ve ürünlerin biyosentezi için gerekli olan madde kaynakları.

Substrat bileşimi özel amaçlara göre farklı düzenlenir. Örneğin, gelişme besiyeri mikroorganizmanın aktif gelişmesini sağlayacak bileşiminde, buna karşılık muhafaza besiyeri gelişme için uygun olmayan koşullarda, yalnızca mikroorganizmanın canlılığını korumak için hazırlanır. Biyokitle üretimi amacıyla hazırlanan substratlarda karbon kaynağının konsantrasyonu düşük, metabolik ürün sentezi için kullanılacak substratlarda daha yüksek tutulur.

Besiyerleri kullanılan hammaddenin türüne bağlı olarak genelde iki grup altında toplanırlar.

* Tam olarak bilinen miktarlarda ve saf maddeler kullanılarak hazırlanan besiyerlerine “yapay besiyeri” adı verilir.

* Kimyasal yapıları tam olarak belirlenmeyen; kan, et özütleri, melas, pamuk çekirdeği, mısır unu, soya unu, malt çimi, peynir suyu vb doğal maddelerle hazırlanan besiyerlerine “kompleks” veya “doğal besiyeri” denir.

Yapay besiyerleri araştırma amaçları için seçilirler. Bunlar araştırıcıya aynı koşullarda çalışmayı yineleme olanağı, saydamlık, az köpürme, ürünün kolaylıkla saflaştırılması gibi avantajlar sağlar. Bilimsel açıdan birçok yararları olmasına karşın bu tip besiyerlerinde elde edilen ürün verimi genellikle düşüktür ve daha önemlisi maliyet yüksektir. Bu nedenle endüstriyel fermentasyonlarda çoğunlukla doğal besiyerleri kullanılır. Bununla birlikte endüstriyel fermentasyonların ilk kademelerini oluşturan laboratuvar dönemlerindeki besiyerlerinde daha çok saf maddeler tercih edilir.

Endüstriyel Substrat Seçimi ve Formülasyondaki Genel İlkeler

Belirli bir üretime yönelik substrat seçimi için kesin bir yöntem yoktur, bu daha çok bir uzmanlık işidir. Deneysel ve teorik çalışmalar birlikte yürütülerek en verimli ve ekonomik substrat seçilir. Bu nedenle bu bilgiler, çoğunlukla, endüstriyel bir sır olarak saklanır.

Substrat formüle edilirken aşağıdaki hususlara özellikle dikkat edilmelidir:

a- Substrat hücre gelişmesi ve biyosentez için gerekli besin maddelerini, mikroorganizmaların yararlanabileceği uygun bileşikler halinde içermelidir. Eksik olanlar takviye edilmeledir.
b- Endüstriyel substrat formülasyonları hazırlanırken yöresel hammaddenin seçimi ve üretimde kullanılması büyük önem taşır. Belirli bir substrat içinde çok iyi gelişen bir suş, aynı hammaddenin başka bir yöreden temin edilmesi durumunda gelişmeyebilir. Bu durum hammaddenin üretiminde yöresel koşullara bağlı farklılıklardan kaynaklanabilir. Bu farklılıkların kimyasal analizler ile tespit edilmesi zor olduğundan, en iyisi mikroorganizmanın yöresel hammaddeye uyumu (adaptasyonu) sağlanmalıdır.
c- Hammaddenin kimyasal kalite kontrol analizlerinin yanısıra, küçük çapta üretim denemeleri ile biyolojik yönden uygunluğu denenmelidir.
d- Hammaddedeki gereksiz fazlalıkların olumsuz sonuçlara neden olabileceği dikkate alınmalıdır.
e- Subtrat formülasyonları saptanırken, hammaddeler ile ilgili birim ve taşıma maliyeti, depolama süresi ve koşulları, korozyon gibi ekonomik faktörler gözönünde tutulmalıdır.
f- Hammadde içindeki toksik özellikteki maddeler substrattan uzaklaştırılmaya çalışılmalıdır.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

ETİL ALKOL ÜRETİMİ

ETİL ALKOL, başta maya olmak üzere bazı mikroorganizmalar tarafından şekerin fermentasyonu sonucu meydana gelir. Alkol fermentasyonunu ilk kez Fransız Gay-Lussac, günümüzde de geçerli olan şu eşitlikle özetlemiştir;

$$C_6H_{12}O_6 \text{ ---------- } 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 28.2 \text{ kcal}$$

Bu genel eşitliğe göre 100 g şekerden 51.1 g etil alkol meydana gelmektedir. Ancak gerçek etil alkol verimi, teorik olarak hesaplanan verimin biraz altındadır. Çünkü fermentasyon sırasında şeker yalnızca alkol ve CO2 oluşumu için kullanılmamakta, şekerin yaklaşık % 5'i mayalar tarafından yeni hücrelerin oluşumu ve diğer yan ürünlerin oluşumu için kullanılmaktadır.

Alkol fermentasyonunun Gay-Lussac'ın belirlediği genel eşitlikteki gibi basit olmadığı ve birbirini izleyen bir seri biyokimyasal olayların son ürünü olduğu, daha sonraki araştırmalar sonucu ortaya konmuştur. Bu uzun ve karmaşık biyokimyasal olaylar sırasında açığa çıkan ürünler, **fermentasyon ana ürünleri** ve **fermentasyon yan ürünleri** olarak iki grupta toplanabilir.

*Alkol fermentasyonun ana ürünleri **etil alkol** ve **karbondioksit**tir.
*Alkol fermentasyonu sırasında, fermentasyon koşullarına bağlı olarak az miktarda da olsa, diğer bazı ürünler (gliserin, asetaldehit, yüksek alkoller, asit ,esterler, metil alkol) de oluşur ve bunlara **fermentasyon yan ürünleri** denir

Alkol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler
Alkol üretiminde en önemli biyokimyasal olay, **fermente olabilen şekerlerin** mayalar tarafından alkole dönüştürülmesi olduğuna göre, bileşiminde alkol ve fermente olabilen şeker içeren maddelerle, fermente olabilen şekerlere dönüştürülebilen tüm maddeler, bu üretimde kullanılabilirler.
Alkol üretiminde kullanılan hammaddeler üç grupta toplanabilir:

- Alkol içeren hammaddeler,
- Fermente olabilen şeker içeren hammaddeler,
- Fermente olabilen şekerlere dönüştürülebilen karbonhidratları içeren hammaddeler.

Alkol içeren hammaddeler,
Bu maddelerden ilk gruba başka amaçlarla alkol fermantasyonuna uğratılmış, kalite vb. nedenlerle ispirtoya işlenmesi daha uygun olan ve alkol içeren bira ve şarap artıkları gibi maddeler girer. Ayrıca bazı yöntemlerle ekmek mayası üretiminde maya ayrıldıktan sonra kalan alkollü sıvı da bu gruptadır. ikinci grupta ise, içki alkolü üretimi için elde olunan şarap ve bira benzeri alkollü sıvılar yer alır.

Fermente olabilen şeker içeren hammaddeler
Bu maddelerin içerdiği şekerler başka bir ön işlemi gerektirmeksizin fermente olabilirler. Bunlarda fermentasyondan önce uygulanan işlem, hammaddelerin parçalanması veya sıkılması ile şekerli sıvının (şıra) elde edilmesidir. Bu hammaddeler şeker, şeker pancarı veya kamışı, melas, kuru veya taze şekerli meyveler, keçi boynuzu, palmiye suyu gibi bazı bitki özsuları, yağsız süt vb.dir.

Ülkemizde bunlar arasında günümüzde, içki ve diğer ispirtoların üretiminde kullanılan hammaddeler "kuru üzüm" ve "melas"tır.

Fermente olabilen şekerlere dönüştürülebilen karbonhidratları içeren hammaddeler
Bu grupta patates ve tahıllar gibi nişasta içeren hammaddeler yanında, nişasta gibi bir polisakkarit olan inulin ve selüloz içerenler söz konusudur. Bu maddeler değişik bitkilerin tohum, yumru, kök ve gövdelerini oluştururlar. Bu hammadelerin alkol üretiminde kullanılabilmesi için, içerdikleri karbonhidratların, ön işlemlerle, fermente olabilen şekerlere dönüştürülmeleri gerekir.

KURU ÜZÜMDEN ALKOL ÜRETİMİ

1. Öğütme : Üzümler elevatörler ile kıyma makinaları gibi çalışan parçalama değirmenlerine gönderilir.Üzümlerin değirmene bulaşmaması ve topaklanmaması için az miktarda su sürekli olarak verilir. Kıyılarak parçalanan üzümler özel mayşeleme kazanlarına (melanjör) gönderilir.
2. Mayşeleme : Karıştırma, soğutma ve ısıtma düzenlerine sahip olan melanjörlerde yapılır.Melanjöre alınan her bir birim üzüm için dört birim su ilave edilir. Mayşeleme sıcaklığı 22-25°C'a ayarlanır ve bu sıcaklıkta devamlı karıştırılmak suretiyle 30 dakika tutulur. Elde edilen mayşenin şeker konsantrasyonu 15-16 balling'e ayarlanır ve fermentasyon kaplarına gönderilir.
3. Fermentasyon: Fermentasyon kaplarına (5-50 tonluk) gelen mayşe bekletilmeden hemen daha önce hazırlanmış olan maya ile aşılanır. Fermentasyonun gidişi balling veya benzeri bir areometre ile kontrol edilir ve balling derecesi 6-6.5'e düşünce, hazırlanan ikinci parti mayşe katılır.Bu işlem kap doluncaya kadar sürdürülür. Toplam fermentasyon süresi 50-60 saat, fermentasyon sıcaklığı 28-32°C dir. Fermentasyonu bitiren % 8 alkollü mayşe, kaba tortunun dibe çökmesi için 8-10 saat dinlendirilir ve sonra damıtmaya gönderilir.
4. Damıtma:

MELASTAN ALKOL ÜRETİMİ

Ortalama % 80 kurumadde, % 50 şeker içeren ve pH 'sı yüksek olan melas sulandırılıp, asitlendirilerek mayaların çalışabileceği bir ortam haline getirilmelidir. Ayrıca melasta bulunan tortu yapıcı maddelerin uzaklaştırılması, inhibe edici maddelerin ve zararlı mikroorganizmaların ısıtılarak yok edilmesi veya azaltılması gereklidir.

Melas önce ön depoya alınır. Buradan hazırlama kabına alınarak % 60 kurumaddeye sulandırılır, asitlendirilir ve kaynatılır. Kaynatmada ayrılan kireç ve protein çökeltisi kabın dibinde toplanır. Melas kabın yan yüzündeki seviye musluklarından alınır.
Bu şekilde hazırlanan melas mayşeleme kazanında %25-33 kuru maddeye sulandırılır.
Maya çoğaltma ön ve asıl fermentasyon için melas farklı derecelerde sulandırılır.
Maya bu seyreltik şıra içinde hava verilerek ve besin maddeleri katılarak çoğaltılır.

Kesikli fermentasyonun bizde uygulanan şekli şöyledir:
Önceden hazırlanmış olan ve 10 ton kadar olan maya fermentasyon kabına alınır. Üzerine kabın 1/3-1/4'üne kadar %22 kuru maddeli melas şırası ilave edilir. Fermentasyon hızlı duruma ulaşınca yeniden kabın 1/3 -1/4'ü kadar şıra ilave edilir. Bu işleme kap doldurulunca kadar devam edilir. 10-12 saatte fermentasyon kabı dolar. Kap dolduktan sonra fermentasyon, tüm şekerin alkole dönüşmesine , kuru maddenin % 6-7 'ye düşmesine kadar, 10-12 saat sürer.

Fermentasyon işlemi bittikten sonra %8-10 alkollü mayşe **kolonlarda damıtılarak**,%96'lık teknik alkol elde olunur.

NİŞASTALI HAMMADDELERİN ETİL ALKOLE İŞLENMESİ

1. Buharlama
2. Mayşeleme, şekerlendirme
3. Mayanın hazırlanması
4. Fermentasyon
5. Damıtma

Nişasta doğrudan fermente edilemez. Önce nişastanın pişirilip çirişlenmesi, sulandırılması ve sonra şekerlendirilmesi gerekir. Alkol üretiminde nişastanın şekere çevrilmesi genellikle maltta bulunan enzimlerin etkisi ile sağlanır. Bu amaçla fark yöntemler uygulanarak, nişasta yapı taşları olan maltoza ve glikoza hidrolize edilir. Nişastanın hidrolizasyonu asitlerle veya enzimlerle olmaktadır. Hidrolizasyonda sonra elde olunan mayşe maya ile aşılanarak fermentasyona bırakılır.

Nişastalı Hammaddelerin Buharlanması

Patates ve tahıl gibi hammaddeler karbonhidrat olarak büyük ölçüde nişasta içerirler. Nişastanın fermente olabilen şekerlere parçalanması gerekir. Bunun için önce nişastanın çirişlenmesi ve sulanması gerekir. Bu da nişastalı hammaddenin kapalı kaplarda, yüksek basınç altında, buharlanması ile sağlanır. Buharlamanın sonunda, nişastalı hammaddenin buharlama kabından mayşeleme kazanına gönderilmesi sırasında, basıncın birden bire düşmesi sonucunda, nişasta hücreleri parçalanır. Yüksek basınç altında buharlama, *henze* kazanı denilen cihazlarda yapılır.

Şekerlendirme

Buharlanmış olan nişastalı hammadde su ile karıştırılıp, belli sıcaklıklarda amilaz enzimlerinin etkisine bırakılır. Sulandırma enzimi olarak bilinen alfa-amilazın çalışması için önce 70-75 ^{0}C'ye, daha sonra şekerlendirme enzimlerinin (beta-amilaz ve amiloglukozidaz) çalışmaları için 55-60 ^{0}C'ye soğutulur.
Şekerlendirme yaklaşık 30 dakika sürer. Şekerlenen mayşe fermantasyon sıcaklığına soğutularak maya ile aşılanır ve fermantasyona bırakılr.

Damıtma

Fermantasyonu tamamlamış alkollü sıvıda yaklaşık % 7-10 alkol bulunur. Bu kadar düşük konsantrasyonda bulunan alkolün konsantrasyonunun yükseltilmesi ve aynı zamanda saflaştırılması için, fermente olmuş sıvıdan ayrılması gerekir. Bu ise fermente olmuş sıvının damıtılmasıyla gerçekleştirilir. Damıtma ile kaynama noktaları birbirinden farklı, fakat birbiri içerisinde kolayca çözünen maddeleri birbirinden ayırmak mümkündür.

Damıtma; bir eriyikteki veya sıvı karışımındaki unsurları önce buharlaştırmak, sonra soğutarak yoğunlaştırmak suretiyle yapılan bir ayırma işlemidir.
Eriyik veya sıvı karışımını oluşturan unsurların kaynama noktalarının birbirinden farklı olması nedeniyle, karışım ile o karışımdan oluşan buhardaki unsurların konsantrasyonlarının farklı olması, ayrılmanın esasını teşkil eder

Damıtma işlemine, damıtılan sıvıda alkol kalmayıncaya kadar devam edilir. Elde edilen alkolce zengin damıtığın yeniden damıtılmasıyla ve bu işlemin tekrarlanmasıyla alkol konsantrasyonu % 96'ya kadar çıkarılabilir.

ALKOL VERİMİ

Etil alkol üretiminde kullanılan hammaddelerin alkol verimleri, içerdikleri fermente olabilen şeker veya şekere dönüştürülebilen karbonhidrat miktarına ve işletmelerde kullanılan yöntemlere göre değişir.

LAKTİK ASİT ÜRETİMİ

Laktik asit ekşi tatta, kokusuz ve besinlerin muhafazası amacıyla kullanılabilen bir organik asittir. Laktik asitin fermantasyon yolu ile üretimi ilk kez 1881 yılında **Avery** tarafından gerçekleştirilmiştir.

Laktik asit bir asimetrik karbon atomu içerir. Buna göre;

```
     COOH                                  COOH
     I                                     I
HO-C-H                                   H-C-OH
     I                                     I
     CH3                                 CH3
```

(L-laktik asit) (D- laktik asit)

Biyokimyası

Laktik asit bakterileri, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif, sitokroma sahip olmayan, asidi tolere edebilen ve karbonhidrat fermantasyonu sırasında başlıca son ürünü laktik asit olan bakteriler olarak tanımlanmaktadır.

LAB (Laktik Asit Bakterileri) karbonhidrat metabolizmasına göre;

- Homofermantatif LAB (temel olarak laktik asit üreten),
- Heterofermantatif LAB (laktik asitin yanısıra, karbon dioksit, etanol, asetik asit, gliserin üretenler)

olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

Homofermantatif Laktik Asit Fermantasyonu, alkol fermantasyonunda olduğu gibi, piruvik asit oluşana kadar EMP yolunu izler. Ancak, çoğu LAB "karboksilaz" enzimine sahip olmadığından, oluşan piruvik asiti asetaldehit'e dönüştüremez. Laktat dehidrogenaz enzimine sahip olan bu bakteriler piruvik asiti laktik asite dönüştürürler.

Heterofermantatif LAB'nde, EMP yolunun izlenebilmesi için gerekli aldolaz ve triyozfosfat izomeraz enzimleri yoktur. Heterofermantatif LAB'nin bir kısmı "heksozmonofosfat" yolunu, bir kısmı ise "fruktoz-6-fosfat" yolunu izler.

Laktik Asit Bakterileri

- Termofil (37-60 ^{0}C)
  (*Lb. delbrucki, Lb. bulgaricus, Lb. thermophilus*)
- Mezofil (30-35 ^{0}C)
  (Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. casei, Lb. pentosus)

Streptococcus lactis ve *Leuconostoc*' lar da, teknikte kullanılır.

Üretimde kullanılan hammaddeler

- Melas
- Laktoz içeren hammaddeler (PAS)
- Kağıt sanayii atıkları (odun şekeri)
- Turunçgillerin meyve suyu artığı
- Nişastalı hammaddeler

Hammaddenin;

- Ucuz
- Bol bulunan
- Her mevsim bulunabilen
- İşlenmesi kolay olması gerekir.

Üretim

Bakteri çoğaltma:
Steril 10 mL malt şırası-------100 mL Ca' lu besiyeri----- 1-2 L Ca' lu besiyeri------

Sıcaklık
Termofiller (*Lb. delbrucki, Lb. bulgaricus*) için 45-50 ^{0}C
Mezofiller (*(Lb. plantarum, Lb. brevis)* için 30-32 ^{0}C

Şeker konsantrasyonu
Uygun başlangıç şeker konsantrasyonu, % 5-18, PAS'da % 4.5 laktoz var.

Oksijen (hava)
Anaerop'turlar. Sadece *Str. Lactis* fakültatif aerop'tur.

pH
En uygun pH 5.5-6.0 dır. pH'yı nötralize etmek için ortama $CaCO_3$ ilave edilir.

Fermantasyon Süresi
2-8 gün

Verim: Teorik verimin yaklaşık % 90-95'i elde edilebilir. (Teorik olarak, 100 g glikozdan 100.5 g laktik asit elde edilebiliyor).
Fermantasyon sırasında yan ürün olarak, % 2 oranında asetik asit ve propiyonik asit oluşabilir.

Melastan Laktik Asit Üretimi
-Şeker oranı % 50'den % 20'nin altına inecek şekilde, melas sulandırılır.
-pH 7-8'den 5.5-6.0'ya düşürülür.
-Besin tuzları (malt çimi veya diamonyumfosfat) ilave edilir.
-Oluşan asidi nötralize etmesi için, tampon olarak $CaCO_3$ ilave edilir.
-Sonra % 5 oranında starter ilave edilerek, fermantasyona başlanır.

Fermantasyon sırasında;

- Asit kontrolü
- Şeker kontrolü
- Biyolojik kontrol

yapılır.

Fermente olmuş ortamdan laktik asitin ayrılması
- $CaCO_3$ ilavesi (pH 10'a kadar) ile kalsiyum laktat'ın elde edilmesi
-H_2SO_4 ilavesi ile $CaSO_4$' ın (jips) çöktürülmesi
-Aktif kömül ile renk giderme
-Damıtma suretiyle konsantrasyon artırma

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

MİKROORGANİZMA GELİŞMESİNİN ÇEVRE İLE İLİŞKİSİ

Bir mikroorganizmanın belirli bir çevrede gelişme ve ürün sentezleme yeteneği organizmanın genetik özellikleri ile belirlenir. Fermantasyon prosesinin başarıyla ilerlemesi, önce seleksiyon veya mutasyon yolu ile iyi bir mikroorganizma suşunun elde edilmesine, sonra çevre koşullarının gelişme ve ürün oluşumu için iyi uyarlanmasına bağlıdır.

1. Sıcaklığın Etkisi

Mikroorganizmaların gelişmeleri ve ürün oluşturmaları bir dizi kimyasal reaksiyonların sonucudur ve tüm kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi sıcaktan etkilenirler. Genel bir gelişme modelini aşağıdaki gibi tanımlayabiliriz.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \alpha X$$

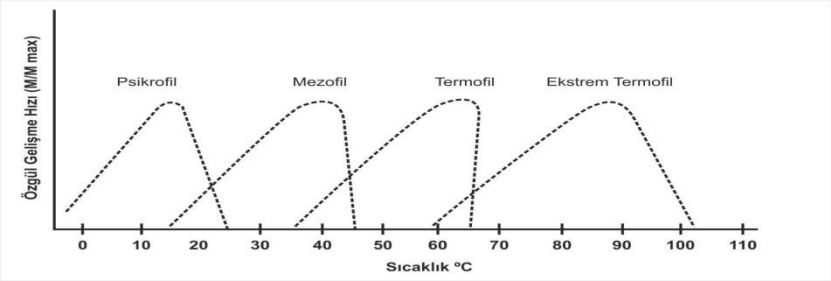
veya

$$\frac{1}{X}\frac{dX}{dt} = \mu - \alpha$$

Burada α özgül ölüm hızıdır. Bu eşitlikte görülen özgül gelişme hızı, (1/X) dX/dt, gelişme ve ölüm arasındaki bir dengedir. Genellikle, mikroorganizmalar $\mu > \alpha$ olduğu zaman gelişirler ve bu aşamada α ihmal edilebilir. Buna rağmen, gerek μ gerekse α sıcaklığa oldukça bağımlı olduklarından burada her ikisi de birlikte düşünülmelidir.

Şekil 4.1'de psikrofilik, mezofilik ve termofilik gelişme ile ilgili 3 değişik gelişme sıcaklığı kurvesi görülmektedir. Bazı istisnaları varsa da çoğu mikroorganizma 20-30 ^{o}C sıcaklık sınırının içerisinde gelişirler. Ayrıca çoğu mikroorganizma da bu gruplardan birinin içerisindedir. Maksimum gelişme sıcaklığı 20 ^{o}C'nin altında olanlar psikrofilik, 30-35 ^{o}C civarında olanlar mezofilik ve 50 ^{o}C'nin üzerinde olanlar termofiliktir.

Kurveler şekildeki gibidir. Sıcaklık optimum gelişme sıcaklığına doğru yükseldikçe, 10°C'lik bir sıcaklık aralığında gelişme hızı yaklaşık 2 kat artar. Optimum gelişme sıcaklığının üzerinde artan sıcaklıkla birlikte gelişme hızı hızla düşer.



Şekil... Psikrofil, mezofil ve termofil mikroorganizmalar için tipik gelişme kurveleri

Gelişme ve hızları Arrhenius eşitlikleri ile açıklanabilir:

$$\mu = Åe^{-Ea/RT}$$

ve

$$\alpha = Å'e^{-Ea'/RT}$$

Burada	A ve A′	; Arrhenius sabitleri
	Ea ve Ea′	; Aktivasyon enerjileri
	R	; Gaz sabiti (1.987 cal/mol ^{o}K)
	T	; Mutlak sıcaklık (^{o}K)

Tipik aktivasyon enerjisi gelişme için 15-20 k.cal/mol, ölüm için 60-70 k.cal/mol'dür. Buradan, ölüm hızının sıcaklığa karşı gelişme hızından daha duyarlı olduğu anlaşılmaktadır.

Mikroorganizmaların ürün oluşturmaları da, gelişmedekine benzer şekilde sıcaklığa bağımlıdır. Buna rağmen gelişme ve ürün oluşumu için optimum sıcaklıklar aynı olmayabilir ve ayrı ayrı saptanmalıdır. Böylece proses sırasında her iki amaca uygun olacak bir sıcaklık seçilmelidir.

Sıcaklığın optimum değerin üzerine çıkmasıyla hücre verimi hızla azalır. Sıcaklık yükseldiğinde hücre veriminin azalmasının en önemli nedeni, hücrenin muhafaza gereksiniminin artmasıdır. Muhafaza katsayısı artan sıcaklıkla birlikte 15-20 k cal/mol aktivasyon enerjisi ile artar. Sonuç olarak, gelişme sırasında sıcaklık yükseldiğinde, hücrenin muhafaza gereksinimini karşılaması amacıyla karbon ve enerji kaynağı kullanımı da artar.

2. pH'nın Etkisi

Kültür ortamının pH'sı gelişme ve ürün oluşumuna etki edecek önemli bir parametredir. Çoğu mikroorganizma 3-4 pH birimi aralığında fonksiyon gösterir. Maksimum gelişme hızı ise çoğunlukla 1-1.5 pH birimi genişliğinde görülür. pH, bu kadar önemli olduğundan, çoğu fermentasyonlarda, tampon ilavesi veya pH kontrol sistemleri yardımı ile kontrol edilir.
Mikroorganizma gelişmesinin pH'ya bağımlılığı ile ilgili birçok genelleme yapılabilir. Bakteriler, genellikle, pH 4-8 arasında gelişir. Mayalar 3-6, küfler 3-7 ve yüksek ökaryotik hücreler pH 6.5-7.5'i tercih ederler. Sonuç olarak; kontaminasyon tehlikesini en aza indirecek bir çevre koşulunun yaratılması amacıyla bazan bu durumdan yararlanılabilir ve bakteri gelişmesinin engelleneceği, mayaların gelişebilecekleri bir pH seçimi yapılabilir. Örneğin; pH 3'de yapılan bir maya fermentasyonunda bakteri kontaminasyonu riski düşünülemez.

Fermentasyon sırasında pH çeşitli nedenlerle değişme eğilimindedir. Azot kaynağı olarak amonyum kullanıldığında pH düşme eğilimi gösterir. Çözelti içindeki amonyak amonyum $(NH_4)^+$ halindedir ve mikroorganizma bunu hücre içinde $R\text{-}NH_3^+$ şeklinde birleştirir. Buradaki R bir karbon iskeletidir. İşlem sırasında H ortamda serbest kalır. Azot kaynağı nitrat ise, hidrojen iyonları $NO^{=}_3$'ü $R\text{-}NH^+_3$ indirgemek için ortamdan ayrılır ve pH yükselme eğilimi gösterir.

pH' daki değişmelerin diğer bir nedeni; laktik asit, asetik asit, sitrik asit vb organik asitlerin üretimlerinde görülür. Eğer pH değişikliğindeki en önemli etken biliniyorsa, bu değişikliği nötralize etmek için ilave edilen asit veya alkalinin ölçülmesiyle, gelişme ve ürün oluşumu üzerine bazı bilgiler elde etmek mümkündür.

3. Yüksek Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Besin konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda substrat inhibisyonu meydana gelir. Bu inhibisyonun değişik nedenleri vardır. Glikoz vb besinler için inhibisyon oldukça yüksek şeker seviyelerine kadar (100-150 g/L), genellikle, meydana gelmez, fakat konsantrasyonun 350-500 g/L'ye ulaştığı durumlarda birçok mikroorganizma için gelişme olanaksızdır. Bunun nedenine ilişkin en uygun açıklama, bu konsantrasyonlarda hücrenin dehidrasyona uğramasıdır. Böyle çözeltilerde yalnızca ozmofilik veya ozmotolerant mikroorganizmalar gelişebilir. Benzer durum 40 g/l NaCl konsantrasyonunun üzerideki gibi yüksek tuz çözeltilerinde meydana gelir. Böyle çözeltilerde de yalnızca halofilik mikroorganizmalar gelişebilir. Bu iki örnek bazı gıdaların muhafazalarında çok önemlidir.

Substrat inhibisyonunun görüldüğü durumlarda Monod bağlantısının

$$\mu = \frac{\mu max\ Sx}{Ks+S}\left(\frac{Ki}{Ki+S}\right) = \frac{\mu max\ S}{Ks+S\left(1+\frac{S}{Ki}\right)}$$

şeklinde yazılabileceği deneysel veriler sonucunda bulunmuştur. Burada Ki substrat inhibisyonuna bağlı ayrışma sabitidir.

Substratın çok düşük olduğu koşullarda, Ki yanında S ihmal edilebileceğinden, yukarıdaki eşitlikler inhibisyonsuz koşullar için verine normal Monod bağıntısına dönüşmektedir.

Çok sık kullanılan besinler için inhisibyona neden olabilecek limit değerler şöyledir; amonyum iyonu 5 g/L, fosfat tuzları 10 g/L, nitrat 5 g/L, etanol 10 g/L, glikoz 100 g/L.

4. İnhibitörlerin Etkisi

Bazı özel bileşikler hücrenin yapısal bileşenleri veya anahtar özellikleri enzimler üzerinde toksik etki göstererek inhibisyona neden olur ve böylece gelişmeyi yavaşlatır veya tamamen engellerler. Birçok mikroorganizma 1 g/L'nin üzerindeki konsantrasyonlardaki fenol, formaldehit, toluen, metanol vb belişiklerden inhibe olur. Buna rağmen eğer konsantrasyonları yeterince düşükse, bu bileşikler gelişme için kolaylıkla kullanılabilirler.

Bu tür engelleyici etki gösteren inhibitörler, mikroorganizmaların bünyelerine girebilmeleri yönünden bazen substratlarla rekabete girebilir ve böylece "rekabet edici (kompetitif) inhibisyona" neden olurlar. Kompetitif olmayan inhibisyonlarda ise inhibitör, mikroorganizma ile substrat arasındaki ilişkiye bir etkide bulunmaz.

Diğer taraftan, gelişme için gerekli olmayan fakat gelişme hızını artıran maddelere de "aktivatör" denilmektedir. İnhibitör, gelişen bir mikroorganizmanın μmax değerini azaltır ve

Ks değerini artırır, aktivatör ise tersine μmax değerini artırır, buna karşılık Ks değerini azaltır.

Deneysel sonuçlar, kompetitif inhibitör bulunan besiyerindeki üreme kinetiği için Monod denklemenin aşağıdaki şeklinin geçerli olabileceğini göstermektedir:

$$\mu \frac{\mu max.S}{\alpha\ Ks+S}$$

Buradaki α katsayısı mikroorganizma ve inhibitörün türü ile konsantrasyonuna bağlı olup;

$$\alpha = 1+ \frac{[\ I\ ]}{Ki}$$

eşitliği ile belirlenmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi inhibitörsüz besiyerinde [I] = 0 olduğundan yukarıdaki eşitlik normal Monod bağlantısına dönüşecektir. Ayrıca Ki sabiti çok büyük olan inhibitörler için [I]/Ki "1" yanında yok sayılabileceğinden gene aynı şekilde normal Monod bağıntısı geçerli olacaktır.

Kompetitif inhibisyonlar için geçerli olan yukarıdaki bu eşitlik, Ks sabitinin α faktörüne bağlı olarak arttığını, fakat "μmax" değerinin değişmediğini göstermektedir.

Kompetitif olmayan inhibisyonlar ise, Monod bağıntısının aşağıdaki şekli geçerli olmaktadır:

$$\mu = \frac{\mu max.S}{\alpha\ (S+Ks)}$$

Bu eşitlikten de anlaşılacağı gibi bu tür inhibisyonlarda inhibitör, mikroorganizmanın Ks değerini değiştirmeden maksimum özgül gelişme hızını (μmax) azaltmaktadır. Ks'nin çok küçük olduğu durumlarda, S yanında yok sayılabileceğinden

$$\mu = \frac{\mu max}{\alpha}$$

eşitliği geçerlilik kazanır.

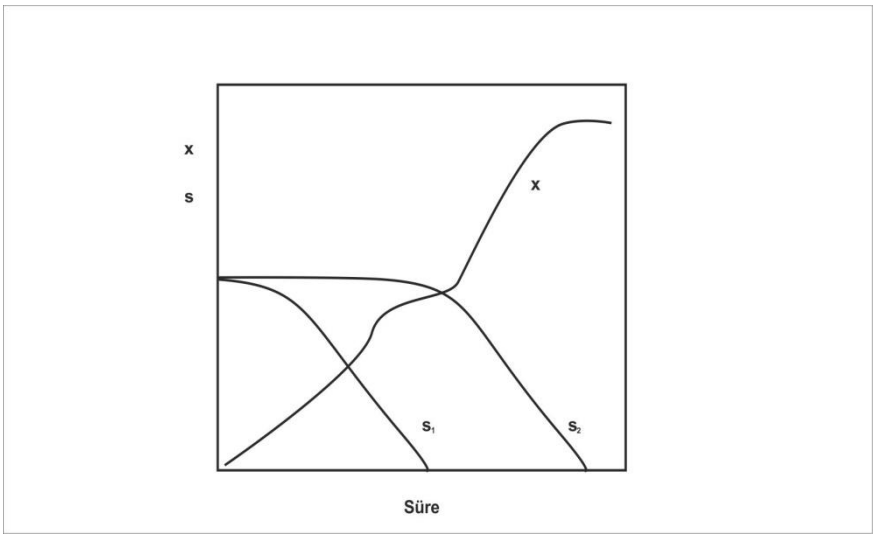
5. Suda Çözünmeyen Bileşiklerin Etkisi

Mikroorganizmalar gelişme için gerekli fakat suda çözünmeyen besinler üzerinde geliştirdikleri zaman, gelişme difüzyon hızı veya besinlerin çözünme hızları tarafından engellenebilir. Bu durum, hücrelerin havalı koşullarda çalkalamalı veya çalkalamasız geliştirilmelerinde açık biçimde gözlenebilir. Oksijen suda az çözünen bir gazdır ve oksijenin hava kabarcıkları halinde veya sıvı-hava yüzeyinden kültür ortamına taşınması gerekir. Çünkü gelişme hızı ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonuna bağımlıdır. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu kritik konsantrasyon değerinin altına düştüğünde mikroorganizmanın özgül gelişme hızında bir azalmaya neden olur. Bu kritik oksijen konsantrasyonu değeri mikroorganizma türüne göre değişir. Örneğin, bakteri ve mayalar için bu değer hava doymuşluğunun %3-10'u arasında olup, küfler için daha yüksektir ve hava doymuşluğunun %10-50'si arasında değişebilir.

6. Çoklu Karbon kaynaklarında ve Kompleks Ortamlarda Mikroorganizmaların Gelişmeleri

Şekil'de görülen gelişme kurvesi, birtek karbon ve enerji kaynağı ile belirli ortamda gelişen mikroorganizmalar için tipik bir gelişme modelidir. Mikroorganizmanın özgül gelişme hızı kullanılan karbon kaynağına sıkıca bağlıdır. Birden fazla karbon ve enerji kaynağı içeren ortamlardaki kesikli kürtürlemede, genellikle belli bir süre için karbon kaynaklarından yalnızca biri kullanılacaktır. Yaygın olarak bilinen bir örnek mikroorganizmaların glikoz ve laktoz içeren bir ortamda geliştirilmeleridir.

Böyle bir ortamda gelişme ve substrat kullanımının kinetiği Şekil'de görülmektedir.



Şekil ... İki karbon ve enerji kaynağı içeren bir ortamda kesikli gelişme

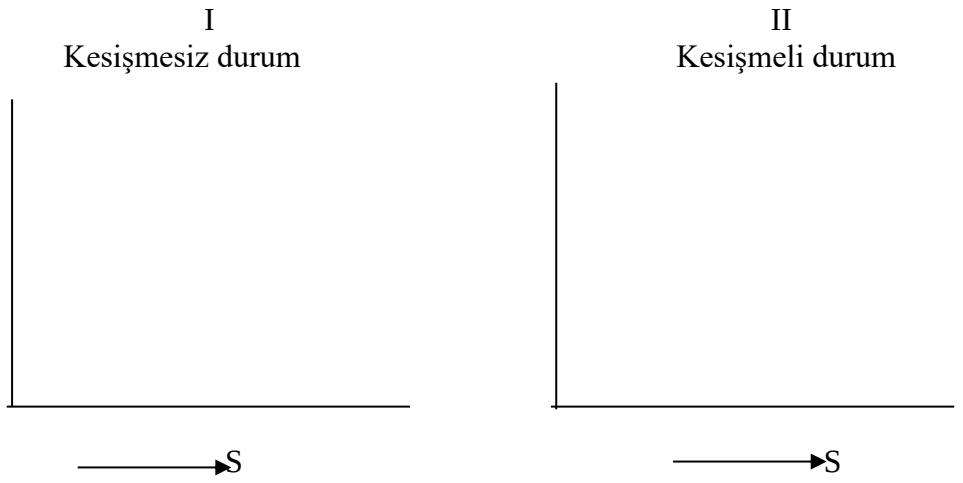
Bu tip iki gelişme fazına sahip davranış "diauxic" gelişme olarak isimlendirilir. Glikoz çok kolay kullanılan bir karbon kaynağı olup, öncelikli kullanılır ve daha sonraki laktoz kullanımı üzerinde katabolik baskıya sebep olur.

Eğer ortamdaki karbon substratlarının sayısı ikiden de fazla ise, birbirini izleyen gelişme hızlarındaki azalma ile birlikte bir seri halinde gelişme fazları gözlenir. Yalnızca çoklu karbon kaynağı değil, aynı zamanda amino asitler, nukleotidler, vitaminler ve diğer metabolik ara ürünler gibi çeşitli bileşenler içeren kompleks bir ortamda, hücreler gelişmeleri sırasında birçok geçiş devreleri gösterirler. Hücreler önceden ilave edilen ara ürünlerin bulunduğu ortamlarda geliştirilirlerse bu bileşenleri katalize eden enzim sistemleri, bu bileşenler tamamen kullanılana kadar sentezlenmez. Bu nedenle, gelişme kompleks ortamlarda gerçekleştirildiğinde, hücre ortamdaki yararlanabileceği ara ürünleri sırasıyla tüketilir ve zamanla daha fazla enzim sentezine gereksinme duyulur. Böylece önceden oluşturulmuş ara ürünler ve kolay kullanılabilen besinler tüketilip gelişme hızı azalır.

7. Birden Fazla Mikroorganizma Türü İçeren Karışık Kültürler

Fermantasyon teknolojisinde genellikle belirli ve tek türden mikroorganizmalar kullanılıyorsa da toprakta, sularda, atık suların arıtılmasında kullanılan aktif çamurda birden fazla türde mikroorganizmalar birarada bulunurlar. Bu bakımdan gıda endüstrisinin bazı dallarında suların biyoteknolojik yöntemlerle arıtılmasında ve bazı fermantasyonlarda (örneğin aspartik asit üretimi) karışık mikroorganizmaların (mixed culture) kinetiği bilinmelidir. Burada basit olması amacıyla, 2 tür mikroorganizmanın birlikte geliştiği kültürlere uyan kinetik bağıntılar üzerinde durulacaktır. Daha çoklu mikroorganizma toplulukları için de ilke aynıdır.

Kesikli kültürde ayrı türdeki mikroorganizmalar kendi gelişme ve üreme hızlarına göre fiziksel ve kimyasal çevre koşullarına bağımlı olarak gelişirler. Ancak, bu sırada bir türün oluşturduğu ürün kendisini inhibe ettiği gibi öteki tür mikroorganizmanın gelişmesini de engelleyebilir. Kültür ortamında bulunan herhangi bir "S" substratının her iki tür mikroorganizma için gelişmeyi sınırlayıcı substrat olduğu düşünülürse; A ve B türündeki mikroorganizmalar için μ ile S ilişkisine ait çizilen Monod grafikleri Şekil 4.5'dekiler gibi olabilir.



Şekil ... İki ayrı tür (A ve B) mikroorganizmanın Monod gelişme grafikleri

Eğer A türünden oluşan ürün yalnız A türü mikroorganizmaları inhibe ediyor, B türüne herhangi bir etki yapmıyorsa;

$$\mu a = \frac{\mu m(a)\ S}{\alpha\ Ks(a)+S}$$

$$\mu b = \frac{\mu m(b)\ S}{Ks(b)+S}$$

bağıntıları geçerli olur. Burada;

P

$$\alpha = (1+ \frac{}{Ki})$$

olarak alınmıştır.

P = 0 iken, yani fermentasyonun başında $\mu a > \mu b$ ise A giderek inhibe olacağı için belirli bir ürün konsantrasyonuna ulaşıldığı zaman $\mu a = \mu b$ olur. Bu durum Şekil II' de görülen kesişmeli duruma uymaktadır.

A türünün ürünü B türünü de inhibe ediyorsa;

$$\mu b = \frac{\mu m(b)\ S}{\alpha'\ Ks(b)+S}$$

olacaktır. Burada α' aşağıdaki bağıntı ile belirlenmektedir.

$$\alpha' = (1+ \frac{P}{K'i})$$

A'nın ürünü B'yi aktive ediyorsa, A ve B türü mikroorganizmaların gelişmelerinde Monod bağıntısının aşağıdaki şekilleri geçerli olur.

$$\mu a = \frac{\mu m(a)\ S}{Ks(a)+S}$$

$$\mu b = \frac{\beta\ \mu m(b)\ S}{Ks(b)+S}$$

Burada β aktivatör olarak hareket eden ürünün ve mikroorganizmanın türüne ilişkin bir katsayıdır.

P = 0 iken $\beta = 1$ dir. $\mu b < \mu a$ ise bu durumda "P" arttıkça β'da artacak ve belirli bir süre sonra $\mu b = \mu a$ olacağı için gene kesişmeli bir grafik gözlenecektir.

Bir mikroorganizma türünün (örneğin A'nın) oluşturduğu ürün öteki türün (bu örnekte B'nin) substratı ise B türü mikroorganizmaların gelişmesi zamanla gene hızlanır. Bu durumda;

$$\mu b = \frac{\mu m(b)\ P}{Ks(b)+P}$$

bağıntısı geçerli olur.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

MİKROORGANİZMA GELİŞMESİ

Mikroorganizmalarda gelişme denilince büyümeyle, hücre bölünmesi veya tomurcuklanmasına bağlı olarak hücre sayısının artmasıyla ortaya çıkan ve geri dönüşümü olmayan canlı madde artışı anlaşılmaktadır. Çok hücreli canlılarda kütlesel büyüklük artarken, tek hücrelilerde hücre sayısı da artış gösterir. Doğal olarak tek hücrelilerde de hücrenin hacim olarak büyüme göstermesi gelişmenin kapsamı içerisindedir. Bu nedenle, mikroorganizmaların gelişmelerinde bu farklılıkları belirtebilmek için mikroorganizma konsantrasyonu, yoğunluğu, bölünme veya tomurcuklanma değeri, büyüme değeri, jenerasyon süresi ve ikilenme süresi gibi farklı tanımlamalar kullanılmaktadır.

Mikroorganizma sayısı (adet/mL) veya bununla ilgili diğer tanımları oluşturan hücre sayısı, değişik sayım yöntemleri ile belirlenebilir. Mikroorganizma yoğunluğu (g/L) ve buna bağlı tanımlamalarda ise, doğrudan veya dolaylı olarak yoğunluk saptamaya yönelik yöntemlerden yararlanılır.

Bakterilerin gelişmesi, genellikle, hücre kütlesi veya hücre sayısının iki katına ulaşması için gerekli zamanla karakterize edilir. Kütlenin ikilenme süresi hücre sayısının ikilenme süresinden farklı olabilir. Çünkü hücre kütlesi hücre sayısında bir artış olmaksızın artabilir. Buna karşın, eğer belirli bir çevre koşulunda hücre kütlesi ve sayısının ikilenmesi arasında bir benzerlik söz konusu ise, organizma üs cinsinden (eksponensiyel hızda) çoğalıyordur.

Mikrobiyel Çoğalmanın Kimyasal Tanımı

Çoğalma, hücre kütlesinin sentezi ile ilgili bir seri kimyasal reaksiyonlar olarak görülebilir. Çoğalma için genelleştirilmiş sitokiyometrik bir formül şöyle yazılabilir.

$$A(C_aH_bO_c) + B(O_2) + D(NH_3) \rightarrow M(C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta) + P(CO_2) + Q(H_2O)$$

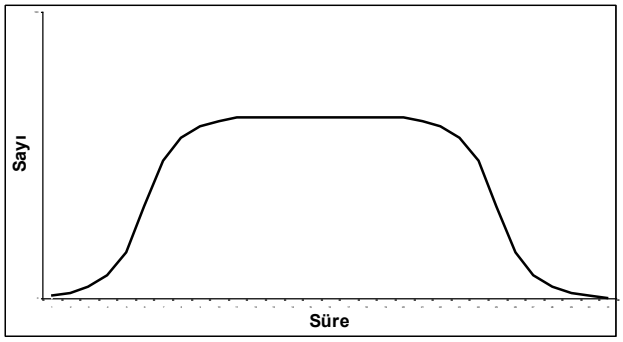
Burada A, B, D, P ve Q ilgili bileşenlerin mol'leridir. $C_aH_bO_c$ karbon enerji kaynağı olarak genelleştirilmiştir. M ise bir birim hücrenin mol sayısıdır ($C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$).

Örneğin; tipik bir maya $C_6H_{11}NO_3$ şeklinde gösterilebilir. Böylece hücrenin organik fraksiyonunun bir biriminin molekül ağırlığı 145 olacaktır. Eğer hücre %90 organik fraksiyon ve %10 kül içeriyorsa, bir birim hücrenin yaklaşık olarak tüm formül ağırlığı 145/0,9 = 161'dir.

Bu sitokiyometrik ilişkiye dayanarak, oluşan her hücre kütlesinin tüketilen her substrat kütlesine oranı (M/A), hücre verimi olarak belirtilir. Bu verim, hem hücre kütlesinde birleştirilmiş, hem de çoğalmak için enerji sağlamak amacıyla CO_2 veya H_2O'ya parçalanmış olan karbon kaynağının kullanım etkinliğine bağlıdır.

02.03. Gelişme Eğrisi (Kurvesi)

Kimyasal yönden belirli bir ortamda ve belli koşullarda gelişen bir bakterinin, kesikli kültürdeki, tipik bir gelişim kurvesi aşağıdaki evreleri kapsamaktadır (Şekil). Gelişme, genellikle hücre kütlesi esas alınarak belirlenmektedir ve aksi belirtilmedikçe bu geçerli olacaktır.



Şekil 02.05. Bir bakterinin kesikli kültürdeki gelişme kurvesi

A. Adaptasyon evresi (Lag Faz): Belirli bir besi ortamına inoküle edilen bakterinin yeni ortama uyum gösterip çoğalmaya başlayana kadar belirli bir süre geçer. Bakteri kültürü bu süreyi, makro ve mikro moleküler bileşimini yeniden düzenlemek, substrata bağlı olarak enzimlerini sentezlemek için kullanır. Bu sürede hücre sayısında hemen hemen hiçbir artış gözlenmez. Fakat hücre kütlesi artabilir.

Moleküler düzeyde devam eden reaksiyonlar çok iyi anlaşılamaz, fakat hücrede önemli ölçüde RNA sentezinin gerçekleştiği bilinmektedir.

Lag fazın süresi bakterinin fizyolojik durumuna ve inoküle edildiği besiyerinin doğasına bağlı olarak değişir. Mikroorganizmanın yaşı, hasarlı olup olmaması, daha önce geliştirildiği ortam ve muhafaza edildiği sıcaklık lag faz süresine etki eden faktörlerdir.

Lag aşamasında bakteri bir anlamda çoğalma için kendini hazırlar, gerekli enzimlerini sentezler. Bakteri bu ortama aşılanmadan önce aktif durumda ise ve besiyeri basit bileşenlerden oluşuyorsa lag süresi kısa olur. Tersine olarak, örneğin glikozlu bir ortamda geliştirilen laktoz$^+$ bakteri laktozlu bir ortama aktarılırsa bakterinin gerekli enzimleri sentezlemesi için daha uzun bir süre gerekir.

Mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen endüstriyel üretimlerde bu sürenin kısaltılması ekonomik yönden büyük yararlar sağlar. Bu süreyi kısaltmak için;
-İnokülasyon oranı yüksek tutulmalı (örneğin; mayalarda %5),
-İnokülasyonda yüksek oranda canlı hücreler kullanılmalı,
-Ortamda çözünmeyen substratlar bulunmamalı (Örneğin; şekerlerle fosfatlar birlikte sterilize edilirlerse bu maddeler suda çözünmeyen, mikroorganizmaların yararlanamayacağı bir form oluştururlar),
-Ortamda toksik maddeler bulunmamalıdır.

Matematiksel olarak, lag fazın süresi yalnızca inokülüm miktarına (X_o) bağlı olup, substrat konsantrasyonuna (S_o) bağlı değildir. Fakat bu süreye yalnızca inoküle edilen hücre sayısı değil, hücrelerin yaş ve fizyolojik durumları da etkili olacağından, logaritmik çoğalma evresindeki hücrelerin kullanıldığı inokülant en uygun önkültürü oluşturacaktır.

Lag süresinin kısa ya da uzun olması, analiz edilen numunedeki mikroorganizma sayısı hakkında bilgi verebilir. Empedans/ kondüktans yöntemi ile yapılan analizler bu sürenin kısa ya da uzun olması esasına dayanır (bknz 08.04. bölüm).

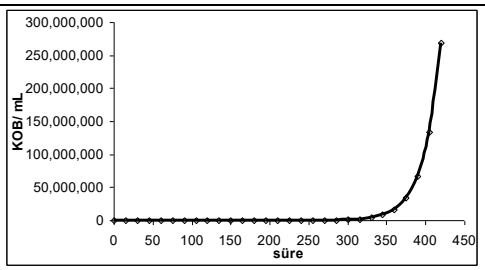
B. Hızlanma evresi: Lag faz ile logaritmik faz arasında yer alan bu evre, genellikle kısa bir süreyi kapsar. Matematik ve biyolojik olarak iyi açıklanamaz. Oğul hücrelerin oranı toplam popülasyonun yarısına ulaşma çabasındadır.

C. Logaritmik (Üs cinsinden) çoğalma evresi: Bu evrede mikroorganizmanın canlı, genç ve dinç olduğu kabul edilir. Hücreler en yüksek hızla bölünme yeteneğindedir. Ortamda besin fazla olup,

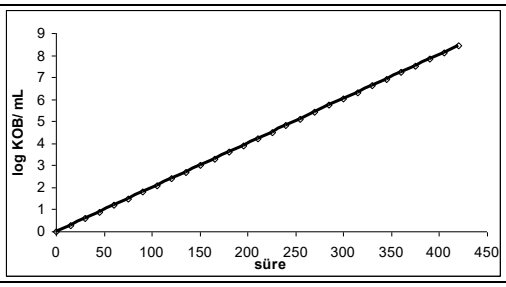
gelişmeyi engelleyici maddeler yoktur. Bu durumda özgül gelişme hızı maksimumdur (μ= sabit= μ_{max}). Mikroorganizmaların ölümü yok sayılabileceğinden kinetik hesaplamalarda bu etmen göz önüne alınmaz.

Bu evrede hücre sayısındaki artışın, hücre kütlesindeki artış ile benzer olduğu gözlenir.

Logaritmik gelişme evresinde zamana bağlı olarak sayı artışı standart şekilde KOB/ mL olarak grafiğe aktarılacak olursa (a) sağlıklı bir grafik elde edilemez (Şekil 02.06). Aynı sayıların logaritması alınarak Log KOB/ mL olarak grafiği çizilirse (b) anlamlı bir grafik elde edilir. Bu evrede de sayı artışı geometrik olup 2'ye katlanma şeklindedir. Logaritmik bir artış yoktur, sayıların logaritmaları alınarak grafiğe işlendiğinde düz bir hat elde edildiği için bu isimle anılır.



a) KOB/ mL



b) log KOB/ mL

Şekil 02.06. Gelişme kurvesinin grafiksel ifadesi

D. Yavaşlama evresi: Mikroorganizmalar hızla çoğalarak en yüksek sayıya (genellikle 10^9 hücre/mL) ulaştıklarından, kültür ortamında besinler giderek azalmaktadır. Aynı zamanda ortamda toksik etkenler olabilecek metabolik ürünler birikmektedir. Sonuç olarak, çevre koşulları mikroorganizma aleyhine değişmektedir. Hücre popülasyonu hâlâ artmaktadır (çoğalma hızı > ölüm hızı), fakat özgül gelişme hızı giderek küçülmekte ($\mu < \mu_{max}$), gelişme gerçekten yavaşlamaktadır. Bu evrede, hücrelerin biyokimyasal ve morfolojik yapıları farklılaşmaktadır. Yeni oğul hücrelerin oluşumu azalır ve durur.

E. Durma evresi (Sabit evre): Besinlerin çoğu kullanıldıktan sonra, gittikçe kısıtlanan koşullar ile gelişme daha fazla süremez. Hücreler bölünmeyi durdurur ve canlı hücreler ölü hücrelerle dengeye ulaşırlar (gelişme hızı= ölüm hızı). Mikroorganizmanın durma evresi, gelişme eğrisinde, oldukça düz seyreden yatay bir çizgi şeklindedir. Net gelişme hızı durmuş olsa da ortamda veya hücrede metabolizma faaliyetleri sürmektedir.

F. Azalma ve ölüm evresi: Mikroorganizmaların ölüm hızları arttığı için zamanla konsantrasyonlarında bir azalma görülür. Otoliz ürünleri ortamda birikmektedir. Özgül gelişme hızı negatif olup ($\mu < 0$), tüm hücreler öldükten sonra sıfır olur. Çok uzun süre inkübasyonda kalmış kültürlerde bu nedenle canlı hücre alınamaz ve bu durum otosterilizasyon olarak tanımlanır.

Mikroorganizmaların gelişmeleri sırasındaki evrelere göre enzimlerin oluşumları da farklı olur. Örneğin; *Bacillus subtilis* gibi bazı mikroorganizmalarda; proteinaz enzimlerinin oluşumu hemen hemen yalnız logaritmik evrede, amilazların oluşumu ise sabit evrede görülür. Hücrelerarası (intracellular) enzimler, genellikle, logaritmik evrede oluştuğu halde, bunların ortama salgılanması azalma evresinde olur. Bu evrede hidrolitik ve lipolitik enzimlerin hücre zarlarında meydana getirdiği parçalanma olayı olan "liziz" gözlenir.

02.04. Gelişme Kinetiği

Gelişme kinetiği; mikroorganizmanın üremesini ve ürün oluşturmasını matematiksel bağıntılarla tanımlar. Bu yalnızca aktif hücre gelişmesini değil, aynı zamanda dinlenen veya gelişmesini durduran hücrelerin aktivitelerini de içermektedir. Çünkü, ticari önemi olan birçok fermantasyon ürünü, hücre gelişmesi tamamlandıktan sonra meydana gelir. Bazı endüstriyel üretimlerde hücre öldükten sonra ortaya salınan enzimler gerekli biyodönüşümleri gerçekleştirerek ürün oluşumunu sağlarlar.

Tüm gelişme parametrelerinin (fiziksel, kimyasal, biyolojik) optimize edilmesinden sonra limitsiz bir gelişme düşünülebilir. Koşulları en uygun hale getirebilmek için, yani sınırlanmamış bir gelişmenin olması için;

-Gereksinim duyulan besinlerin, ortamda talep edilenlerden fazla bulunması,
-Ortamda çözünmeyen elementlerin bulunmaması,
-Hücrelerin aktif olması,
-Ortamda gelişmeyi engelleyici inhibitörlerin bulunmaması

gereklidir. Bu koşulda hücre üs cinsinden (eksponensiyel hızda) çoğalıyordur ve çoğalma şöyle tanımlanır:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu_n N$$

Burada;
X ; Hücre konsantrasyonu (g/L)
N ; Hücre konsantrasyonu (adet/mL)
t ; Zaman (h)
μ ; Özgül gelişme hızı (h^{-1}) (kütle)
μ_n ; Özgül gelişme hızı (h^{-1}) (sayı)

-1. Eşitlik zamana bağlı olarak hücre kütlesindeki artışı,
-2. Eşitlik zamana bağlı olarak hücre sayısındaki artışı gösterir.

Bu eşitliğin integrali alındığında;

$$\int_{x1}^{x2} \frac{dX}{dt} = \int_{t1}^{t2} \mu \, dt$$

elde edilir.

Eğer özgül gelişme hızı sabitse,

$$ln \frac{X_2}{X_1} = \mu \Delta t$$

veya;

$$\mu = \frac{lnX_2 - ln X_1}{\Delta t}$$

Mikroorganizma sayısı olarak ifade edildiğinde ise,

$$\mu = \frac{lnN_2 - ln N_1}{\Delta t}$$

eşitliği elde edilir.

$X_2 = X_1$ olması durumunda Δt; $(t_2 - t_1) = t_d$, yani ikilenme süresini gösterir ve buradan;

$$t_d = \frac{ln(X_2/X_1)}{\mu} = ln\,\frac{2}{\mu} = \frac{0{,}693}{\mu})$$

şeklinde gösterilir.

Problem 02.01: Bir mikroorganizma gelişme ortamından belirli aralıklar ile alınan örneklerde ölçülen hücre konsantrasyonu aşağıda verilmiştir. Bu mikroorganizmanın maksimum özgül gelişme hızını hesaplayınız.

Zaman (h)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
X (g/L)	0,95	1,063	1,513	2,010	2,313	2,550	2,750	2,906	3,060	3,068

Çözüm: Öncelikle, zamana karşı hücre konsantrasyonundaki artışı gösteren gelişme kurvesi çizilir. Bu kurve üzerinde, en dik eğim ile belirlenen hücre artışının görüldüğü evre logaritmik evreyi işaret eder. Bu evreyi kapsayan iki zaman aralığında (örneğin; 6-8. saatler arası) hesaplanacak özgül gelişme hızı ise, maksimum özgül gelişme hızını verecektir.

$$\mu = \frac{\ln(X_2/X_1)}{\Delta t} = \frac{\ln(2{,}010/1{,}513)}{2} = \frac{\ln 1{,}328}{2} = \frac{0{,}284}{2} = 0{,}142\ h^{-1}$$

$\mu_{max} = 0{,}142\ h^{-1}$

Problem 02.02: Belirli kültür koşullarında özgül gelişme hızı $\mu = 0{,}462\ h^{-1}$ olan mikroorganizmanın ikilenme süresi (t_d) ne kadardır?

$$t_d = \frac{0{,}693}{\mu} = \frac{0{,}693}{0{,}462} = 1{,}5\ h = 90 \text{ dakikadır.}$$

Logaritmik evrede mikroorganizmaların çoğalmaları üssel,

$$N = N_o\, e^{\mu t}$$

ya da

$$X = X_o\, e^{\mu t}$$

eşitlikleri ile verilmektedir. Burada N_o veya X_o ortamda başlangıçta bulunan hücre konsantrasyonu, N veya X ise herhangi bir t anındaki mikroorganizma konsantrasyonunu göstermektedir. Bu eşitliğin logaritması alınarak;

$$lnN = lnN_o + (\mu\, t)$$

ya da

$$ln\frac{N}{N_0} = \mu\, t$$

şeklinde, daha önce de verilen 2.4 eşitliğine benzer bir eşitlik elde edilir.

Problem 02.03: Bir ortamda bakteriler sürekli olarak ve her saatte mevcut sayılarının % 20'si oranında artıyorlar. Başlangıçtaki hücre sayısı 10^3 KOB/mL ise 6 saat sonra bakteri sayısı ne olur?

Çözüm: $N = No \times e^{\mu \times t}$
$= 1000 \times e^{0,20 \times 6}$
$= 1000 \times e^{1,2}$
$= 1000 \times 3,320$
$= 3320$ KOB/mL$= 3,3 \times 10^3$ KOB/mL

Problem 02.04: Bir sıvı kültürde canlı bakteri sayısı $N_0 = 2,5 \times 10^3$ KOB/mL kadardır. Bu bakterinin ikilenme suresi 17 dakika ise 3,5 saat sonra bakteri sayısı kaça ulaşır?

Çözüm: Önce özgül gelişme hızı ($\mu = 0,693/t_d$), sonra N hesaplanır ($N = N_0 \times e^{\mu t}$). Ancak ikilenme süresi genelde saat (h) olarak verildiğinden t_d'nin de saate çevrilmesi gerekir.

$t_d = 17$ dakika $= 17/60$ h $= 0,28$ h

$\mu = \frac{0,693}{0,28} = 2,47\ h^{-1}$

$N = 2,5 \times 10^3 \times e^{2,47 \times 3,5} = 1,3 \times 10^7$ KOB/mL

Problem 02.05: Oda sıcaklığında ve süt ortamında ikilenme süresi $t_d = 25$ dakika olan gıda bozulma etmeni bir bakterinin sütteki düzeyi başlangıçta $N_0 = 10^4$ KOB/mL olsun. Bu bakterinin sütte bozulma düzeyini 10^7 KOB/mL kabul edersek, bozulma düzeyine ne kadar zamanda ulaşır?

Çözüm: Önce ikilenme süresinden özgül gelişme hızı hesaplanır ($t_d = 25$ dakika $= 0,417$ h)
$\mu = 0,693/0,417 = \underline{1,66\ h^{-1}}$

Sonra ilgili eşitlik kullanılarak süre bulunur.

$N = N_0\, e^{\mu t} \rightarrow N/N_0 = e^{\mu t} \rightarrow \ln \frac{N}{No} = \mu t \rightarrow t = \frac{\ln(N/N_0)}{\mu} = \ln(10^3)/1,66 = \underline{4,16\ h}$

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

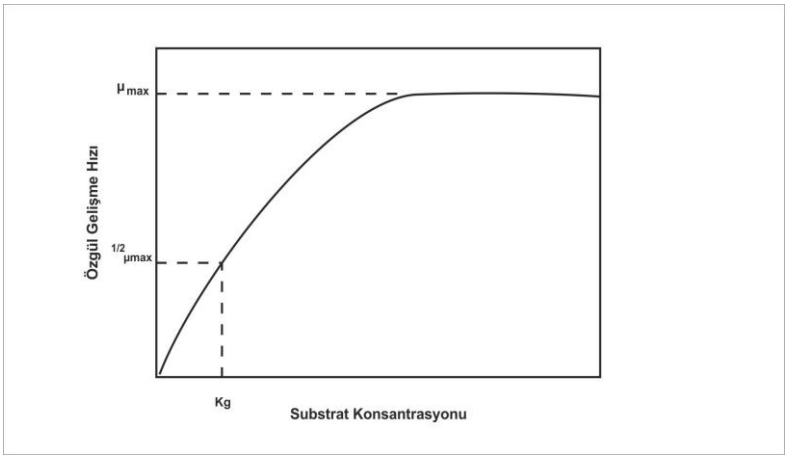
Gelişme Hızının Substrat Konsantrasyonu İle İlişkisi

Besin ortamında bulunan ve gelişmenin niteliği üzerine etki eden belirli besin maddelerine "gelişmeyi sınırlayan substrat (limitleyen substrat)" denilmektedir. Genellikle besi ortamında gelişmeyi sınırlayan birçok türde ve sayıda substrat bulunmaktadır. Ancak; mikrobiyel kinetik bağıntıların türetilmesinde bu besinlerden yalnızca en önemli olan bir tanesini seçilir, diğerlerinin ortamda yeterince var olduğu kabul edilir ve hesaplamaların hangi substrata göre yapıldığını belirtilir (örneğin; $S_{(glikoz)}$).

Keşikli kültürlemede mikroorganizmanın özgül gelişme hızı substrat konsantrasyondaki değişime bağımlıdır. Gelişme hızı kimyasal reaksiyonların hızına benzer şekilde, ortamdaki kimyasal maddelerin konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Gelişme hızı ve substrat konsantrasyonu arasındaki matematiksel ilişki Monod modeli ile 1949 yılında şöyle açıklanmıştır (Şekil 02.07):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{Ks + S}$$

Burada;
μ; Özgül gelişme hızı (h^{-1})
μ_{max}; Maksimum özgül gelişme hızı (h^{-1})
S; Üremeyi sınırlayan substratın konsantrasyonu (g/L)
K_s; $\mu = ½ \mu_{max}$ olduğunda substrat konsantrasyonuna eşit olan bir sabite (doymuşluk sabitesi



Şekil 02.07. Mikrobiyel gelişmeye ilişkin Monod modeli

Çizelge 02.02'den de görüleceği gibi, K_s'nin tipik değerleri "mg/L" şeklinde ifade edilebilecek ölçüde çok küçüktür. Böylece; genel bir yaklaşımla, aşağıdaki varsayımlar yapılabilir.
$S > 10\ K_s$ olduğunda $\mu \cong \mu_{max}$'dır,
$S < 10\ K_s$ olduğunda artık μ, μ_{max}'dan küçüktür.

Görüldüğü gibi özgül gelişme hızı substrat konsantrasyonunun kuvvetli bir fonksiyonudur. Logaritmik evre süresince özgül gelişme hızı sabit olup μ_{max}'a eşittir. Çünkü K_s çok küçüktür.

Hücre ve Ürün Oluşumuna İlişkin Verim Katsayıları

Mikroorganizmaların gelişmeleri ve ürün oluşturmaları biyodönüşüm işlemleridir. Burada fermantasyonu besleyen kimyasal besin maddeleri hücre kütlesi ve metabolitlere dönüşür. Besin maddeleri ve enerji kaynakları ile oluşan hücre kütlesi ve ürünler arasındaki bağlantıları açıklamak için verim etkinliğinin bilinmesi gereklidir. Sözü edilen biyodönüşümler, tüketilen her birim besin maddesine karşı oluşan ürün veya hücre kütlesi olarak ifade edilen verim katsayıları şeklinde kantitatif olarak belirtilebilirler.

$Y_{x/s}$; hücre kütlesi için,
$Y_{p/s}$; ürün için
kullanılan verim katsayılarıdır.

Verim katsayıları, belirli bir zaman periyodunda tüketilen substratın, oluşan ürünün ve hücre kütlesinin ölçümleri ile hesaplanır.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Yukarıdaki değerler gözlemlenen verim katsayılarını ifade eder. İlgili substrat üzerinden hücre kütlesi ve ürünlerin teorik verimlerini hesaplamak da mümkündür. Teorik hücre veriminin anlamı üzerinde hâlâ tartışılmakta ise de, bu değerler denemeleri düzenlemede ve sonuçları yorumlamada bir standart ölçü olarak değer kazanırlar.

Karbon veya enerji kaynağı üzerinden teorik hücre verimini hesaplamak için yaygın olarak kullanılan 2 metot vardır. Bunlardan biri mevcut elektronlar, diğeri ATP'nin sabit verim kavramı üzerinden hesaplanır.

Teorik ürün veriminin hesaplanması ise, ürün oluşumu için bazı sitokiyometri bilgileri gerektirir. Bunun için glikozun etanole dönüşünü örnek alalım.

$$\underset{180}{\text{Glikoz}} \rightarrow \underset{2 \times 46}{2\,C_2H_5OH + 2CO_2}$$

Burada, maksimum dönüşüm 2 mol etanol/ 1 mol glikoz veya 0,51 g etanol/ g glikozdur. Pratikte, substratın bir kısmı hücre kütlesi ve diğer yan ürünlerin oluşumunda harcandığı için, bu teorik verime ulaşılamaz. Fakat çok yakın olabilir. Etanol üretiminde teorik verimin %90-95'ine kolaylıkla ulaşılabilir.

Aminoasitler ve antibiyotikler için stikoyometri daha komplekstir ve teorik verimin hesaplanması daha zordur.

ÖRNEK:

Glikoz içeren bir substrattan etil alkol üretilen bir fermantasyona ait aşağıdaki değerler ölçülmüştür.

	Başlangıç	**48h**
Glikoz (g/L)	**150.2**	**0.1**
Biyoitle (g/L)	**0.3**	**4.5**
Etilalkol (g/L)	**1.2**	**70.6**

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{4.5 - 0.3}{150.2 - 0.1} = 0.028$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{70.6 - 1.2}{150.2 - 0.1} = 0.462$$

Teorik verim % si = Uygulamadaki Verim / Teorik Verim x 100 = 0.462 / 0.51 = % 90.4

Substrat dönüşüm oranı (%) = (150.2 - 0.1) / 150.2 x 100 = % 100

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

MİKROORGANİZMA KÜLTÜRLERİNİ MUHAFAZA YÖNTEMLERİ

Mikroorganizma kültürlerinin özelliklerinin aynı kalması koşuluyla muhafazaları çok önemli bir konudur. Kültür korumanın temel prensibi, varyasyona ve mutasyona uğratmadan mikroorganizmayı saf halde, uzun süre canlı tutmaktır.

Kültür muhafazası amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden herhangi biri tüm mikroorganizmalar için aynı etkinliği göstermediğinden yöntem seçiminde en önemli faktör mikroorganizmanın özelliğidir. Bunun yanında laboratuvardaki cihaz ve ekipman, teknik bilgi, depolama alanı, korunacak kültür sayısı gibi faktörler de yöntem seçiminde etkili olmaktadır.

Kültür muhafazasında kullanılan yöntemleri genel olarak iki gruba ayırabiliriz.

1. Kısa süreli muhafaza yöntemleri (Basit Yöntemler)
2. Uzun süreli muhafaza yöntemleri (Modern Yöntemler)

1. Kısa Süreli Muhafaza Yöntemleri

1.1. Transfer (Pasaj, Subkültür)

Bilinen en eski uygulamadır. Aktif kültür sıvı veya agarla karıştırılmış besiyeri üzerine aktarılır. Pasajlar arasındaki süre mikroorganizmanın cins ve türüne, kullanılan besiyeri ve dış koşullara (örneğin depolama sıcaklığına) bağlıdır. Bazı mikroorganizmaların hergün transfer edilmeleri gerekirken, bazıları için transfer süresi 4-5 aya hatta birkaç yıla kadar çıkabilir.

Genel olarak bu amaçla kullanılacak besiyeri en az düzeyde besin maddeleri içermelidir. Böylece mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri yavaşlar, dolayısıyla transferler arasındaki süre uzar.

Transfer yönteminin sakıncaları ve alınacak önlemler şunlardır:

- **Yanlış Etiketleme:** Transfer sırasında dalgınlıkla kültürü tanıtan etiketler değişebilir. Transfer edilecek kültür sayısını 100 ile sınırlamak suretiyle dikkatin dağılmaması sağlanmalıdır.

- **Bulaşma:** Çok dikkatli olunsa bile, kısa aralıklarla yapılan transferlerde, özellikle *Bacillus* türleriyle kontaminasyon riski sözkonusudur.

- **Varyantların Ortaya Çıkması:** Üzerinden uzun süre geçmiş kültürlerden transfer yapılıyorsa, mikroorganizmanın karakterinde bir değişme söz konusu olabilir.

- **Kuruma:** Tüplerin ağzı sıkı bir şekilde kapatılmalı, bu amaçla vidalı kapaklı tüpler veya lastik tıpalar kullanılmalıdır.

1.2. Sıvı Parafin Altında Muhafaza

Maya, küf mantarı ve bazı bakteriler için çok uygun ve kolay bir yöntemdir. Uygun bir besiyerinde veya yatık agarda geliştirilmiş kültürün üzerine steril sıvı parafin, besiyerini tamamen örtecek ve 1,5-2,0 cm kalınlıkta olacak şekilde ilave edilirler.

Kültür yeniden transfer edileceğinde bir aşı iğnesi ile parafin altındaki kültüre ulaşılabilir.

1.3. Damıtık Su İçinde Muhafaza

Mikroorganizma uygun besiyerinde üredikten sonra veya spor yaptıktan sonra steril damıtık su içinde süspansiyonu yapılır. Saf su içinde metabolizma faaliyetleri yavaşladığından, ağzı iyice kapanabilen şişe veya tüplerde hücreler 1-5 yıl canlı kalabilirler.

1.4. Kurutma Yöntemi

Özellikle spor oluşturan bakteriler kurumaya karşı dayanıklı olduklarından, bu teknik birçok mikroorganizma için kullanışlı bir yöntemdir. Çeşitli şekillerde yapılabilir.

1.4.1. **Toprak veya Kum İçinde Kurutma:** Özellikle spor oluşturan mikroorganizmalar bu yöntemle yıllarca korunabilir. Mikroorganizma süspansiyonları doğrudan sterilize edilmiş toprak veya kuma aktarılır. Aseptik koşullarda havada veya desikatör içinde kurutulur. Tüpün ağzı kapatılıp , buzdolabına alınır.

1.4.2. **Kağıt Diskler Üzerinde Kurutma:** Kültürler steril filtre kağıtları üzerinde kurutulduktan sonra steril plastik tabaklar arasında kapatılır. Aynı kültürü içeren çok sayıda disk aynı tüp içinde buzdolabında korunabilir. Bu özelliği nedeniyle depolama yönünden çok az yere gereksinim gösterir.

Bu şekilde muhafaza edilen kültürlerin posta ile ucuz ve kolay bir şekilde taşınması mümkündür. Kültürlerin transferi gerektiğinde steril bir pens ile bir disk alınarak sıvı besiyerine aktarılır.

Kağıt diskler yerine jelatin diskler de kullanılabilir.

1.4.3. **Destek Maddeleri Üzerinde Kurutma:** Destek materyali olarak jelatin, nişasta veya silikajel kullanılabilir. Steril destek materyali üzerine damlatılan mikroorganizma süspansiyonu aseptik koşullarda kurutularak saklanır.

1.4.4. **Sıvı fazla kurutma (L-drying Yöntemi) :** Özellikle liyofilizasyona (dondurarak kurutma) dayanamayan mikroorganizmalar için uygundur. Hücre süspansiyonu tüpü, su banyosu içine daldırılarak, vakum pompası yardımıyla kurutulur.

2. Uzun Süreli Muhafaza Yöntemleri (Modern Yöntemler)

2.1. Liyofilizasyon (Dondurarak kurutma)

Çeşitli tipteki mikroorganizmalar bu yöntemle uzun yıllar canlı kalabilmektedir. Bazı bakterilerin 30 yıldan fazla canlı kaldığı görülmüştür.

Dondurarak kurutma işlemi basit olarak, donmuş materyalden suyun süblimasyon ile uçurulması şeklindedir. Süspansiyon katı hale getirilip, su buhar halinde alındığından, mikroorganizmalar yapıları bozulmadan muhafaza edilmiş olur.

Bu yöntem şöyle uygulanır: Mikroorganizma uygun bir besiyerinde geliştirildikten sonra kültürün koruyucu içeren bir sıvıda süspansiyonu yapılır. Bu süspansiyondan 0,1-0,2 ml aseptik koşullarda ve köpük oluşturmadan liyofilizasyon tüplerine aktarılır. Liyofilizasyon cihazına yerleştirilerek vakum altında birinci kurutma yapıldıktan sonra pamuklar içeriye

itilip ampullerin boyun kısmı inceltilir. İkinci kurutma uygulandıktan sonra ampuller çapraz alev yardımıyla vakum altında kapatılır.

Muhafaza edilecek kültürler dondurma ve kurutmanın zararlı etkilerini önleyecek koruyucu özellikteki maddeler (kriyoprotektan) içeren sıvılarda süspansiyon haline getirilmelidir.

Hücrelerin logaritmik gelişme dönemlerinin sonunda veya durma devresinin başında liyofilize edilmeleri gerekmektedir. Bu dönemde kültürler aktif ve işlem zararlarına karşı dayanıklıdırlar.

2.2. Düşük Sıcaklık Derecelerinde Muhafaza

2.2.1. Derin Dondurucularda Muhafaza

Düşük sıcaklıklarda hücredeki metabolizma hızı, buna bağlı olarak biyokimyasal reaksiyonlar çok yavaşlar. Mikroorganizma kültürlerinin muhafazasında bu özellikten yararlanılır.

Hücrelerin düşük sıcaklıklarda dondurulması işlemi olanaklar ölçüsünde çabuk yapılmalıdır. Ani dondurma ile hücre içinde büyük buz kristalleri oluşmaz, dolayısıyla hücre daha az zarar görür.

Muhafaza sıcaklıkları -70 ^{o}C, -90 ^{o}C veya -196 ^{o}C' ler olabilir. Hücreler -70 ^{o}C, -90 ^{o}C arasındaki dondurucularda ya da CO_2 buzunda muhafaza edilebilirler. Fakat bu sıcaklık derecelerinde bile canlılıkta bir kayıp sözkonusudur.

Hücrelerin donma zararlarından etkilenmesini en aza indirmek amacıyla hücre süspansiyon sıvılarına "kriyoprotektan" denen koruyucu maddeler ilave edilmelidir.

Koruyucu maddeler hücre içine girebilmelerine göre 2 ayrı grupta toplanabilir.

a- Gliserol, dimetilsülfoksit (DMSO) gibi maddeler hücre içine girerek donma zararlarına karşı mikroorganizmayı hem içerden hem dışardan korurlar.
b- Sakkaroz, laktoz, glikoz sorbitol, mannitol, dekstran, nişasta gibi maddeler koruyucu etkilerini sadece hücre membranı dışında gösterirler.
Ayrıca yağı alınmış süt, malt ekstraktı gibi kompleks besiyerleri de koruyucu özelliktedirler.

2.2.2. Sıvı Azot İçinde Muhafaza

-196 ^{o}C' deki sıvı azot altında muhafaza metabolizmayı tamamen durdurur. Bu sıcaklıkta muhafaza bilinen en iyi kültür koruma yöntemidir. Bu yöntemin uygulama alanı geniş olup, çeşitli mikroorganizmaların muhafazası için özellikle tercih edilir.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

SİTRİK ASİT ÜRETİMİ

Ticari amaçla sitrik asit önceleri tümüyle olgunlaşmamış limondan ve ananastan üretilmiş olup; 20. yüzyılın ilk yarısından sonra mikroorganizmalar tarafından fermantasyon yolu ile elde edilmeye başlanmıştır. Günümüzde ticari amaçla sitrik asit *A. niger* küfü kullanılarak üretilmektedir.

Sitrik Asit Oluşumunun Biyokimyası

$C_6H_{12}O_6 + 3/2\ 0_2$----------$C_6H_8O_7 + 2H_2O$

Sitrik asit fermantasyonunun, glikozdan piruvik asite kadar bir glikoliz olduğu, yani EMP yolu ile şekerin piruvik asite dönüştüğü kabul edilmektedir. Bu aşamadan sonrası için farklı görüşler ortaya atılmış, son olarak şekerin glikolizi ile oluşan piruvik asitin bir yandan okzalasetik asite, diğer yandan asetil Co A' ya dönüştüğü ve bunların tepkimesi ile sitrik asitin meydana geldiği anlaşılmıştır.

Fermantasyon sırasında yalnızca sitrik asit değil, bir miktar okzalik ve glikonik asitler de meydana gelir. Fermantasyonda yan ürün olarak oluşan diğer organik asitlerin miktarları ve birbirine oranları;

1. Kullanılan mikroorganizma suşuna,
2. Ortamın bileşimine,
3. Fermantasyon sıcaklığına
4. Fermantasyon pH' sına,
5. Üst yüzeyin hacme oranına,
6. Ön işlemlerde kullanılan potasyum ferrosiyanür miktarına

bağlı olarak değişir.

Mikroorganizmalar:
Ticari sitrik asit üretimi amacıyla, çoğunlukla *A. niger* ve *A. wentii* küfleri kullanılmaktadır.

Hammadde:
Başta sakkaroz olmak üzere früktoz ve glikoz içeren ortamlar, özellikle melas ve nişastalı hammaddeler kullanılır.

Sitrik asit üretiminde önemli etkenler:

1. pH'nın etkisi: *A. niger* suşları ortam pH'sına göre sitrik, okzalik veya glikonik asitlerinden birini fazlaca oluşturur. pH düşerse sitrik asit, pH yükselirse okzalik ve glikonik asit oluşumu artar.
   *Üst yüzey yönteminde önerilen pH değeri 2.0-3.5 arasında değişir.

2. Ortamdaki şekerin etkisi: Genellikle yüksek konsantrasyonda sitrik asit üretimi için, yüksek şeker konsantrasyonu (% 14-20) önerilir.
   Melas için; daldırma yönteminde % 10-13
   yüzey yönteminde % 14-17

3. Ortam bileşiminin etkisi: Fermantasyonu gerçekleştiren küflerin gerek gelişip çoğalmaları, gerekse şekeri asite dönüştürmeleri için ortamda C,H ve O den başka gerekli elementler (N,K,P,S ve Mg) bulunmalıdır.

4. Havanın (O) etkisi: Sitrik asit fermantasyonu oksidatif bir fermantasyon, mikroorganizmalar da aerop olduklarından, fermantasyon sırasında havalandırma çok önemlidir. Bu nedenle üst yüzey üretiminde derinliği az yüzeyi fazla olan kaplar kullanılır.
   Daldırma yönteminde, her bir ton asit üretimi için yaklaşık 250 m^3 oksijen ortama verilmelidir.

5. Fermantasyon sıcaklığı: En uygun fermantasyon sıcaklığı 28-32 ^{0}C‘ dır. 35-36 ^{0}C‘de fermantasyon hızlanır, ancak sitrik asit verimi düşer. Diğer asitlerin oranları artar.

6. Melas renginin etkisi: Melas rengi koyulaştıkça, sitrik asit fermantasyonu olumsuz etkilenir. Melas rengi kampanya başlarında açık, sonlarında koyulaşır.

7. Melastaki demiri gidermede kullanılan potasyum ferrosiyanür’ün etkisi: Melasta buluna ve sitrik asit oluşumunu olumsuz etkileyen Fe fazlasının giderilmesi gerekir. Bunun için laboratuvarda ön denemeler ile, uygun potasyum ferrosiyanür dozu belirlenmelidir. Genellikle uygun doz, melasa göre, % 0.04-0.12 arasındadır.

   Ayrıca, melasta bulunan uçucu organik asitlerin fazlası fermantasyonu olumsuz etkiler.

Fermantasyon:

- Üst yüzey yöntemi: Üretim tavalarda gerçekleştirilir, *A. niger* suşları kullanılır.
- Daldırma yöntemi: Daha çok peletler şeklinde misel oluşturan *A. wentii* suşları kullanılır.

Fermente olmuş ortamdan sitrik asitin eldesi:

1. Misellerin ayrılması
2. Ca bileşikleri veya kireç ilavesi ile, Ca- sitratın elde edilmesi
3. H_2SO_4 ilavesi ile, Ca-sitratın parçalanması ve $CaSO_4$’ın (jips) çöktürülmesi
4. Ham sitrik asitin berraklaştırılması Fe’ den arındırılması
5. Buharlaştırma ve yoğunlaştırma
6. Kristalizasyon

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİDE STARTER HAZIRLAMA

- STARTER, Kelime anlamı; BAŞLATICI
- Kontrollü koşullar altında, belli bir üretim amacıyla kullanılan mikroorganizma kültürü

Saf kültür

- Mikrobiyel üretimlerde, genellikle, tek bir mikroorganizmadan çoğaltılmış saf kültür ile çalışılmak istenir.
- Gelişme ortamında yabancı bir mikroorganizmanın bulunması istenmez.
- Bunun için gelişme ortamı, aşılama öncesi sterilize edilerek doğal mikroorganizmalardan arındırılır.

  Ya da fazla miktarda starter ilave edilerek, doğal mikroorganizmalar çoğalamadan, starter kültürün ortama hakim olması sağlanır.
- Starter tek bir mikroorganizmadan çoğaltılmış saf kültür ya da karışık kültür olabilir.

Fermantasyon endüstrisinde kullanılan mikroorganizmalar herhangi bir fermantasyonun başarılı olup olmamasında başlıca etkendir. Çünkü fermantasyonun katalisti mikroorganizmadır. Bu nedenle bir mikrobiyel kültürden prosese uygun bazı özellikler aranır.

ALKOL FERMANTASYONUNDA KULLANILAN MAYALAR

Alkol fermantasyonunda kullanılan mayalar ***Saccharomyces cerevisiae*** türüne ait mayalar olup, teknik olarak "ispirto mayaları" olarak tanımlanırlar.

S.cerevisiae türüne dahil her maya alkol üretiminde kullanılamaz. Alkol fermentasyonu için seçilen **S.cerevisiae susu** dışında kalan, fakat bu türe ait mayalar bile alkol endüstrisinde "yabani maya" olarak tanımlanır.

Ancak, asıl yabani mayalar, diğer bir çok fermantasyon ürünlerinin üretiminde olduğu gibi, **zar yapan ve oluşan alkolü parçalayarak alkol kaybına neden olan mayalardır.**

<u>Alkol fermantasyonunda kullanılacak mayadan istenilen özellikler</u>

- Etkili substrat kullanımı,
- Hızlı fermantasyon,
- Yüksek etanol verimliliği ve toleransı,
- Düşük pH'ya dayanıklılık,
- Yüksek sıcaklığı dayanıklılık,
- Hücrelerin yüksek oranda canlılığı,
- Maya kütlesinin teknik yönden kolay işlenebilmesi,
- Enfeksiyonlara karşı dayanıklılık,
- İçki üretiminde iyi aromalı ürün vermesi

ŞARAP MAYALARININ GENEL ÖZELLİKLERİ

- Şarap mayaları ***Saccharomyces*** cinsine ait, çoğunlukla ***S.cerevisiae*** olmak üzere ***S.bayanus, S.ellipsoides ve S.pastorianum*** türleri içerisindedir.
- Alt fermantasyon mayaları olup, fermantasyon sıvısının içinde veya dibinde fermantasyon yaparlar. Fermantasyon sonunda kolaylıkla çökme özelliğindedirler.

Şarap mayalarından istenilen özellikler

- Fermantasyon derecesi yüksek olmalı,
- Yüksek ve düşük ısıya dayanıklı olmalı,
- Kuvvetli kükürtlenmiş şırada çalışabilmeli,
- Yüksek alkole dayanıklı olmalı,
- Kırmızı şarap üretiminde kullanılan maya tanene duyarlı olmamalı,
- Yüksek şeker konsantrasyonuna dayanıklı olmalı,
- Az köpük oluşturmalı,
- Kap cidarına tutunmamalı ve dibe kolay çökmeli,
- Çevre koşullarına dayanıklı olmalı,
- Şarapta özel tat ve koku maddeleri oluşturabilmeli,
- Şarapta arzulanmayan fermantasyon yan ürünlerini az oluşturmalı.

Bira mayaları

Bira mayaları teknik yönden "**üst ve alt fermantasyon mayaları**" olarak iki gruba ayrılırlar.
* Üst fermantasyon mayaları (***S. cerevisiae***) fermantasyon sırasında mayşenin yüzeyine çıktıkları halde,
* Alt fermantasyon mayaları (***S. carlsbergensis***)

Fermantasyon sırasında mayşe içinde kalırlar ve fermantasyonun sonuna doğru dibe çökerler.

Bira mayalarında istenilen özellikler

1-Biraya yabancı bir flavor vermemelidir
2-Hızla çoğalabilmelidir.
3- Köpük durumu 2—3 gün sürmeli, bu sürenin sonunda köpük hızla çökmelidir.
4-Fermantasyondan sonra sıvı berrak olmalıdır.
5- Tortunun sağlamlığı ve rengi de mayanın seçiminde önemlidir. Tortu yeknesak olmalı ve yüzeyi düz olmalıdır.
6- Rengi açık sarı olmalı, esmer olmamalıdır.
7-Fermantasyonun seyrinde köpük oluşumu, köpük çöküşü, berraklaşma aşamaları birbirini izlemelidir.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

SUBSTRAT FORMÜLASYONU

Substrat içerisinde mikroorganizmanın gelişmesini, biyosentez ve diğer faaliyetlerin en iyi olmasını sağlayacak gerekli besin maddeleri bulunmalıdır. Gereksinim duyulan besin maddelerini yeterli miktarda ve uygun formlarda içeren bir substrat başarılı bir üretim için ilk adımdır. Substratın kimyasal bileşimi, hücre ve ürün sentezi için elementel gereksinimlerin tümünü karşılamasının yanısıra hücre muhafazası ve metabolik faaliyetler için gerekli enerjiyi de sağlamalıdır.

Buradan da anlaşılacağı gibi, mikrobiyal aktivite için iki önemli beslenme faktörü vardır:

a- Hücre metabolizması için gerekli enerji kaynakları,
b- Hücreyi oluşturan ve ürünlerin biyosentezi için gerekli olan madde kaynakları.

Mikroorganizmalar gereksinimleri olan enerjiyi, ortamda bulunan bazı bileşiklerin kimyasal bağlarındaki depolanmış enerjiyi kullanarak sağlarlar. Bunlar organik veya inorganik maddeler olabilir. En iyi enerji kaynakları karbonhidratlardır.

İkinci beslenme faktörü ise biyokütle oluşumu ve biyosentez için gerekli olan C, H, O, N, P, S gibi ana elementler ve iz elementlerdir. Bunlar substrat içinde basit bileşikler halinde bulunabileceği gibi kompleks bileşikler halinde de bulunabilirler.

Substrat bileşimi özel amaçlara göre farklı düzenlenir. Örneğin, gelişme besiyeri mikroorganizmanın aktif gelişmesini sağlayacak bileşiminde, buna karşılık muhafaza besiyeri gelişme için uygun olmayan koşullarda, yalnızca mikroorganizmanın canlılığını korumak için hazırlanır. Biyokütle üretimi amacıyla hazırlanan substratlarda karbon kaynağının konsantrasyonu düşük, metabolik ürün sentezi için kullanılacak substratlarda daha yüksek tutulur.

Besiyerleri kullanılan hammaddenin türüne bağlı olarak genelde iki grup altında toplanırlar. Tam olarak bilinen miktarlarda ve saf maddeler kullanılarak hazırlanan besiyerlerine “yapay besiyeri” adı verilir. Kimyasal yapıları tam olarak belirlenmeyen; kan, et özütleri, melas, pamuk çekirdeği, mısır unu, soya unu, malt çimi, peynir suyu vb doğal maddelerle hazırlanan besiyerlerine “kompleks” veya “doğal besiyeri” denir.

Yapay besiyerleri araştırma amaçları için seçilirler. Bunlar araştırıcıya aynı koşullarda çalışmayı yineleme olanağı, saydamlık, az köpürme, ürünün kolaylıkla saflaştırılması gibi avantajlar sağlar. Bilimsel açıdan birçok yararları olmasına karşın bu tip besiyerlerinde elde edilen ürün verimi genellikle düşüktür ve daha önemlisi maliyet yüksektir. Bu nedenle endüstriyel fermantasyonlarda çoğunlukla doğal besiyerleri kullanılır. Bununla birlikte endüstriyel fermantasyonların ilk kademelerini oluşturan laboratuvar dönemlerindeki besiyerlerinde daha çok saf maddeler tercih edilir.

1. Substrat İçinde Bulunan Temel Bileşenler

Substrat içinde bulunan bileşenler temel fonksiyonlarına göre; karbon, azot kaynakları, inorganik bileşikler ve vitaminler olarak gruplandırılır.

a- Karbon kaynakları:

Karbon kaynaklarının başında karbonhidratlar gelir. Biyokütle yaklaşık %50 C içerdiğinden, karbonhidratlar besiyerlerinde diğer besin maddelerinden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar ve çok iyi oksijen, hidrojen ve metabolik enerji kaynaklarıdır.

Bazı karbon kaynakları gelişmeyi artırırlar, fakat bunun yanısıra biyosentez hızı yavaşlar. Karbonhidratların mikroorganizmalar tarafından metabolize edilme kolaylığı heksozlardan polisakkaritlere doğru gidildikçe azalır. Böyle durumlarda gelişmeyi artıran karbonhidrat ile birlikte biyosentez hızını artırıcı etki gösteren karbonhidrat da ortamda bulunmalıdır.

En önemli karbonhidrat kaynakları glikoz, sakkaroz, melas, mısır, buğday, patates, pirinç, arpa, yulaf nişastaları ve unlarıdır. Melas karbonhidrat kaynağı olmasının yanısıra azot, inorganik bileşikler ve vitaminler de içerdiğinden ucuz ve iyi bir hammaddedir.

Bunların dışında hidrokarbonlar; yağlar, alkoller, selüloz ve türevleri de mikroorganizmaların cinslerine göre substrat içerisinde karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmaktadır.

b- Azot kaynakları:

Hücre yapısında karbon ve oksijenden sonra en fazla bulunan element azottur. Azot kaynakları inorganik veya organik olabilir. Çoğu mikroorganizma moleküler azotu, nitratları, nitritleri, amonyağı azot kaynağı olarak kullanabilir. Amonyak, aynı zamanda fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutma amacı ile de kullanılabilir.

Mikroorganizmaların büyük çoğunluğu organik azot kullanırlar. Organik azot kullanımı hücrenin gelişme hızını artırır. Fazla kullanımı olumlu etki gösterebileceği gibi üretim verimini de düşürebilir.

Organik azot kaynaklarının başlıcaları amino asitler, pürinler, pirimidinler, üre, bitkisel ve hayvansal proteinlerdir. Bu proteinler gıda ve tarım endüstrisinin yan ürünleri olup, saf azotlu bileşiklerden daha ucuz olmalarının yanısıra, hücre gelişmesi için gerekli olan vitaminleri, çeşitli mineralleri ve çeşitli büyüme faktörlerini de içerirler.

Substratta bulunan azot kaynağının hücre tarafından kolayca kullanılabilir olması dikkate alınmalıdır. Örneğin proteinler, yalnızca hücre dışı proteazlar salgılayarak proteinleri enzimatik olarak aminoasitlere hidrolize edebilen mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir. Bu özelliği olmayan mikroorganizmanın protein hidrolizatlarına, peptonlara veya proteinli maddeleri asit veya enzimlerle hidroliz etmek suretiyle hazırlanmış ve serbest amino asitleri içeren azotlu maddelere gereksinimleri vardır.

c- İnorganik bileşenler:

Biyokütlenin ortalama %5-10'u küldür. Külün büyük bölümünü fosfor (%60) ve kükürt (%20) oluşturur. Ayrıca K, Mg, Na, Ca, Fe, Mn, Mo, Co, Zn, Cl gibi elementler bulunur. Fosfor en fazla şeker fosfatları, kükürt ise en çok sistin ve methionin aminoasitlerinde bulunur. Diğer elementler çoğunlukla enzimlerle kompleks halde bulunur.

Mikroorganizmaların mineral gereksinimlerini tam olarak bilmek her zaman gerekli değildir. Çünkü endüstriyel karbon ve azot kaynaklarının çoğu, hatta şehir suyu yeterli miktarda mineral içerir. Bazan bu maddeleri azot, fosfat ve sülfatlarla, nadiren de Mg ile takviye etmek gerekebilir.

d- Vitaminler :

Koenzim veya koenzimlerin bileşikleri olarak vitaminlerin hücre içerisinde önemli katalitik fonksiyonları vardır ve metabolizma için gereklidir. En sık gereksinme duyulan vitaminler thiamin, biotin, niasin, pantotenat, riboflavin ve B_6 vitaminleridir.

Vitaminler endüstriyel fermantasyonlarda kullanılan karbon ve azot kaynaklarının içinde çoğunlukla yeterli miktarda bulunduklarından, ayrıca substrata ilave edilmeleri gerekmeyebilir.

e- Diğer katkı maddeleri:

Bütün bunların dışında substrata, çeşitli amaçlara yönelik katkı maddeleri ilave edilebilir:

- Aşırı gelişmeyi yavaşlatan (misel artış hızını yavaşlatan), metabolik ürünün biyosentez hızını artıran maddeler (inhibitör). Örneğin; antibiyotik fermantasyonlarında bu amaçla benzil-tiyosiyanat kullanılmaktadır.

- Biyosentez kademelerinde reaksiyona giren ve ürün verimini artıran maddeler (prekürsörler). Örneğin; klortetrasiklin fermantasyonunda ortama tuz ilavesi, penisilin G fermantasyonunda fenilalalin, fenilasetik asit ilavesi,

- Fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutmak için ilave edilen asit, baz veya tampon karakterinde maddeler.

- Köpürmeyi azaltıcı yüzey aktif maddeler (bitkisel ve hayvansal yağlar, silikonlar vb).

2. Hücre Bileşimi

Substrat formülasyona girmeden önce hücre bileşiminin açıklanması yararlı olacaktır. Genellikle, hücre bileşimi ile ilgili detaylı elementel analizler burada belirtilmeyecek, fakat kullanılacak değerler substrat formülasyonunda bir rehber niteliğinde olacaktır. Bir mikroorganizma hücresinin tipik elementel bileşimi Tablo 5.1'de görülmektedir. Mikrobiyal gelişme için kullanılacak herhangi bir ortam, en azından, bu elementleri uygun oranda içermelidir.

Tablo1. Mikroorganizmaların tipik elementel bileşimi

Element	**Hücre kuru ağırlığına göre %**
Karbon	50
Azot	7-12
Fosfor	1-3
Kükürt	0,5-1,0
Magnezyum	0,5

Karbon, oksijen ve hidrojen hariç substrat içerisindeki besinlerin formülasyonu Tablo 5.1'deki verileri esas alır. Örneğin; azot ve kükürt kaynağı olarak amonyum sülfat kullanılarak 30 g/L maya hücresi kitlesinin sentezi arzulanıyorsa, 12 g/L $(NH_4)_2$ SO_4' in ortamda bulunması gereklidir. Bu miktar $(NH_4)_2SO_4$ 2,4 g/L azot ve 3.0 g/L kükürt sağlayacaktır. Azot gereksiniminin temin edilmesi ile kükürt gereksiniminin fazlaca karşılanabileceği görülmektedir.

Benzer bir hesaplama, 3,0 g/L hücre biyokütlesinin sentezi için Tablo 5.2'de görülen minimal ortamın düzenlenmesine olanak verir.

Tablo 2. Seçilmiş bir karbon kaynağından 30 g/L maya üretimi için düzenlenmiş bir gelişme ortamı

Ortam Bileşenleri	**Konsantrasyon (g/L)**
Karbon enerji kaynağı	
Metanol	60.0
Etanol	40.0
Glikoz	60.0
$(NH_4)_2SO_4$	12.0
KH_2PO_4	1.3
$MgSO_4$	1.5
İz elementler	
(Cu, Co, Fe, Ca, Zn, Mo, Mn)	10^{-4}M

Biyokimyasal ko-faktörler veya yapısal komponentler olarak iz elementlere de gereksinim duyulmaktadır. Fakat bu elementlere olan gereksinimi tahmin etmek çok zordur. Buna rağmen, bir kural olarak, Tablo 5.2.'de görülen iz elementler 30 g/L hücre için 10^{-4}M, 3 g/L hücre için 10^{-5}M konsantrasyonlarında ilave edilebilirler. Bazı mikroorganizmaların bir veya daha fazla iz elemente normalden daha fazla ihtiyaç duyulabileceği, ayrıca hatırlanmalıdır.

3. Özel Biyokimyasal Gereksinimler

Birçok mikroorganizma basit mineral tuzları içeren ortamlarda iyi gelişebilirlerse de, bazıları bir veya daha fazla özel biyokimyasal bileşiklere gereksinim duyarlar. Bu bazı mikroorganizmaların gereksinim duydukları tüm biyokimyasal bileşikleri kendilerinin sentezleyememesinden kaynaklanmaktadır. En fazla gereksinim duyulanlar vitaminler ve aminoasitlerdir. Örneğin; mayalar çoğunlukla biotin, thiamin ve riboflavine gereksinim duyarlar. Bazı mikroorganizmalar oldukça müşkülpesenttir ve 10-12 tane biyokimyasal komponentin besiyerine ilavesi gerekir. Genellikle, vitaminlere olan gereksinim az miktarlardadır ve bunlar tipik olarak litreye "mg" düzeyinde ilave edilirler.

4. Enerji Gereksinimleri

Mikroorganizmalar temel kimyasal maddeleri kompleks moleküllere çevirirlerken bu reaksiyon serilerini gerçekleştirebilmek için, enerji kullanmaya gereksinim duyarlar. Çoğunlukla, bu enerji indirgenen organik bileşiklerin kontrollü oksidasyonu ile temin edilir. Bu tür karbon bileşikleri hücrelerin elementel karbon gereksinimlerini karşılamalarının yanısıra, biyosentez enerjisi üretmek amacıyla da kullanılırlar. Biyosenteze ilave olarak; hücre yapısının muhafazası, moleküllerin aktif transportu, hücre ve çevresi arasındaki konsantrasyon değişimlerini dengelemek ve bazen hücre hareketi için de enerjiye gereksinim duyulur.

Bu nedenlerle, besiyeri ortamında tüm bu gereksinimleri karşılayacak yeterli karbon kaynağı bulunmalıdır. Hücre gelişmesi için karbon kaynağı gereksiniminin hesaplanması, arzulanan hücre yoğunluğunun ümit edilen hücre verimine ($Y_{x/s}$) bölünmesi suretiyle yapılır. Örneğin; verim 0,5 g hücre/g metanol olduğu zaman, metanolden 30 g/L hücre elde etmek için, Tablo 5.2'de görüldüğü gibi, 60 g/L metanole gereksinim duyulur.

Temel besinlerden biri olan oksijen, suda zor çözünen bir gaz olduğundan, fermantasyonda özel bir kütle transferi sorunu getirir. Bununla birlikte, oksijen gereksiniminin mikroorganizmaya, karbon kaynağına ve kullanımındaki etkinliğe bağlı olduğu söylenebilir.

5. Endüstriyel Substrat Seçimi ve Formülasyondaki Genel İlkeler

Belirli bir üretime yönelik substrat seçimi için kesin bir yöntem yoktur, bu daha çok bir uzmanlık işidir. Deneysel ve teorik çalışmalar birlikte yürütülerek en verimli ve ekonomik substrat seçilir. Bu nedenle bu bilgiler, çoğunlukla, endüstriyel bir sır olarak saklanır.

Substrat formüle edilirken aşağıdaki hususlara özellikle dikkat edilmelidir:

a- Substrat hücre gelişmesi ve biyosentez için gerekli besin maddelerini, mikroorganizmaların yararlanabileceği uygun bileşikler halinde içermelidir. Eksik olanlar takviye edilmeledir.
b- Endüstriyel substrat formülasyonları hazırlanırken yöresel hammaddenin seçimi ve üretimde kullanılması büyük önem taşır. Belirli bir substrat içinde çok iyi gelişen bir suş, aynı hammaddenin başka bir yöreden temin edilmesi durumunda gelişmeyebilir. Bu durum hammaddenin üretiminde yöresel koşullara bağlı farklılıklardan kaynaklanabilir. Bu farklılıkların kimyasal analizler ile tespit edilmesi zor olduğundan, en iyisi mikroorganizmanın yöresel hammaddeye uyumu (adaptasyonu) sağlanmalıdır.
c- Hammaddenin kimyasal kalite kontrol analizlerinin yanısıra, küçük çapta üretim denemeleri ile biyolojik yönden uygunluğu denenmelidir.
d- Hammaddedeki gereksiz fazlalıkların olumsuz sonuçlara neden olabileceği dikkate alınmalıdır.
e- Subtrat formülasyonları saptanırken, hammaddeler ile ilgili birim ve taşıma maliyeti, depolama süresi ve koşulları, korozyon gibi ekonomik faktörler gözönünde tutulmalıdır.
f- Hammadde içindeki toksik özellikteki maddeler substrattan uzaklaştırılmaya çalışılmalıdır.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

SUBSTRAT FORMÜLASYONU

Substrat içerisinde mikroorganizmanın gelişmesini, biyosentez ve diğer faaliyetlerin en iyi olmasını sağlayacak gerekli besin maddeleri bulunmalıdır. Gereksinim duyulan besin maddelerini yeterli miktarda ve uygun formlarda içeren bir substrat başarılı bir üretim için ilk adımdır. Substratın kimyasal bileşimi, hücre ve ürün sentezi için elementel gereksinimlerin tümünü karşılamasının yanısıra hücre muhafazası ve metabolik faaliyetler için gerekli enerjiyi de sağlamalıdır.

Buradan da anlaşılacağı gibi, mikrobiyal aktivite için iki önemli beslenme faktörü vardır:

a- Hücre metabolizması için gerekli enerji kaynakları,
b- Hücreyi oluşturan ve ürünlerin biyosentezi için gerekli olan madde kaynakları.

Mikroorganizmalar gereksinimleri olan enerjiyi, ortamda bulunan bazı bileşiklerin kimyasal bağlarındaki depolanmış enerjiyi kullanarak sağlarlar. Bunlar organik veya inorganik maddeler olabilir. En iyi enerji kaynakları karbonhidratlardır.

İkinci beslenme faktörü ise biyokütle oluşumu ve biyosentez için gerekli olan C, H, O, N, P, S gibi ana elementler ve iz elementlerdir. Bunlar substrat içinde basit bileşikler halinde bulunabileceği gibi kompleks bileşikler halinde de bulunabilirler.

Substrat bileşimi özel amaçlara göre farklı düzenlenir. Örneğin, gelişme besiyeri mikroorganizmanın aktif gelişmesini sağlayacak bileşiminde, buna karşılık muhafaza besiyeri gelişme için uygun olmayan koşullarda, yalnızca mikroorganizmanın canlılığını korumak için hazırlanır. Biyokütle üretimi amacıyla hazırlanan substratlarda karbon kaynağının konsantrasyonu düşük, metabolik ürün sentezi için kullanılacak substratlarda daha yüksek tutulur.

Besiyerleri kullanılan hammaddenin türüne bağlı olarak genelde iki grup altında toplanırlar. Tam olarak bilinen miktarlarda ve saf maddeler kullanılarak hazırlanan besiyerlerine “yapay besiyeri” adı verilir. Kimyasal yapıları tam olarak belirlenmeyen; kan, et özütleri, melas, pamuk çekirdeği, mısır unu, soya unu, malt çimi, peynir suyu vb doğal maddelerle hazırlanan besiyerlerine “kompleks” veya “doğal besiyeri” denir.

Yapay besiyerleri araştırma amaçları için seçilirler. Bunlar araştırıcıya aynı koşullarda çalışmayı yineleme olanağı, saydamlık, az köpürme, ürünün kolaylıkla saflaştırılması gibi avantajlar sağlar. Bilimsel açıdan birçok yararları olmasına karşın bu tip besiyerlerinde elde edilen ürün verimi genellikle düşüktür ve daha önemlisi maliyet yüksektir. Bu nedenle endüstriyel fermantasyonlarda çoğunlukla doğal besiyerleri kullanılır. Bununla birlikte endüstriyel fermantasyonların ilk kademelerini oluşturan laboratuvar dönemlerindeki besiyerlerinde daha çok saf maddeler tercih edilir.

1. Substrat İçinde Bulunan Temel Bileşenler

Substrat içinde bulunan bileşenler temel fonksiyonlarına göre; karbon, azot kaynakları, inorganik bileşikler ve vitaminler olarak gruplandırılır.

a- Karbon kaynakları:

Karbon kaynaklarının başında karbonhidratlar gelir. Biyokütle yaklaşık %50 C içerdiğinden, karbonhidratlar besiyerlerinde diğer besin maddelerinden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar ve çok iyi oksijen, hidrojen ve metabolik enerji kaynaklarıdır.

Bazı karbon kaynakları gelişmeyi artırırlar, fakat bunun yanısıra biyosentez hızı yavaşlar. Karbonhidratların mikroorganizmalar tarafından metabolize edilme kolaylığı heksozlardan polisakkaritlere doğru gidildikçe azalır. Böyle durumlarda gelişmeyi artıran karbonhidrat ile birlikte biyosentez hızını artırıcı etki gösteren karbonhidrat da ortamda bulunmalıdır.

En önemli karbonhidrat kaynakları glikoz, sakkaroz, melas, mısır, buğday, patates, pirinç, arpa, yulaf nişastaları ve unlarıdır. Melas karbonhidrat kaynağı olmasının yanısıra azot, inorganik bileşikler ve vitaminler de içerdiğinden ucuz ve iyi bir hammaddedir.

Bunların dışında hidrokarbonlar; yağlar, alkoller, selüloz ve türevleri de mikroorganizmaların cinslerine göre substrat içerisinde karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmaktadır.

b- Azot kaynakları:

Hücre yapısında karbon ve oksijenden sonra en fazla bulunan element azottur. Azot kaynakları inorganik veya organik olabilir. Çoğu mikroorganizma moleküler azotu, nitratları, nitritleri, amonyağı azot kaynağı olarak kullanabilir. Amonyak, aynı zamanda fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutma amacı ile de kullanılabilir.

Mikroorganizmaların büyük çoğunluğu organik azot kullanırlar. Organik azot kullanımı hücrenin gelişme hızını artırır. Fazla kullanımı olumlu etki gösterebileceği gibi üretim verimini de düşürebilir.

Organik azot kaynaklarının başlıcaları amino asitler, pürinler, pirimidinler, üre, bitkisel ve hayvansal proteinlerdir. Bu proteinler gıda ve tarım endüstrisinin yan ürünleri olup, saf azotlu bileşiklerden daha ucuz olmalarının yanısıra, hücre gelişmesi için gerekli olan vitaminleri, çeşitli mineralleri ve çeşitli büyüme faktörlerini de içerirler.

Substratta bulunan azot kaynağının hücre tarafından kolayca kullanılabilir olması dikkate alınmalıdır. Örneğin proteinler, yalnızca hücre dışı proteazlar salgılayarak proteinleri enzimatik olarak aminoasitlere hidrolize edebilen mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir. Bu özelliği olmayan mikroorganizmanın protein hidrolizatlarına, peptonlara veya proteinli maddeleri asit veya enzimlerle hidroliz etmek suretiyle hazırlanmış ve serbest amino asitleri içeren azotlu maddelere gereksinimleri vardır.

c- İnorganik bileşenler:

Biyokütlenin ortalama %5-10'u küldür. Külün büyük bölümünü fosfor (%60) ve kükürt (%20) oluşturur. Ayrıca K, Mg, Na, Ca, Fe, Mn, Mo, Co, Zn, Cl gibi elementler bulunur. Fosfor en fazla şeker fosfatları, kükürt ise en çok sistin ve methionin aminoasitlerinde bulunur. Diğer elementler çoğunlukla enzimlerle kompleks halde bulunur.

Mikroorganizmaların mineral gereksinimlerini tam olarak bilmek her zaman gerekli değildir. Çünkü endüstriyel karbon ve azot kaynaklarının çoğu, hatta şehir suyu yeterli miktarda mineral içerir. Bazan bu maddeleri azot, fosfat ve sülfatlarla, nadiren de Mg ile takviye etmek gerekebilir.

d- Vitaminler :

Koenzim veya koenzimlerin bileşikleri olarak vitaminlerin hücre içerisinde önemli katalitik fonksiyonları vardır ve metabolizma için gereklidir. En sık gereksinme duyulan vitaminler thiamin, biotin, niasin, pantotenat, riboflavin ve B_6 vitaminleridir.

Vitaminler endüstriyel fermantasyonlarda kullanılan karbon ve azot kaynaklarının içinde çoğunlukla yeterli miktarda bulunduklarından, ayrıca substrata ilave edilmeleri gerekmeyebilir.

e- Diğer katkı maddeleri:

Bütün bunların dışında substrata, çeşitli amaçlara yönelik katkı maddeleri ilave edilebilir:

- Aşırı gelişmeyi yavaşlatan (misel artış hızını yavaşlatan), metabolik ürünün biyosentez hızını artıran maddeler (inhibitör). Örneğin; antibiyotik fermantasyonlarında bu amaçla benzil-tiyosiyanat kullanılmaktadır.

- Biyosentez kademelerinde reaksiyona giren ve ürün verimini artıran maddeler (prekürsörler). Örneğin; klortetrasiklin fermantasyonunda ortama tuz ilavesi, penisilin G fermantasyonunda fenilalalin, fenilasetik asit ilavesi,

- Fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutmak için ilave edilen asit, baz veya tampon karakterinde maddeler.

- Köpürmeyi azaltıcı yüzey aktif maddeler (bitkisel ve hayvansal yağlar, silikonlar vb).

2. Hücre Bileşimi

Substrat formülasyona girmeden önce hücre bileşiminin açıklanması yararlı olacaktır. Genellikle, hücre bileşimi ile ilgili detaylı elementel analizler burada belirtilmeyecek, fakat kullanılacak değerler substrat formülasyonunda bir rehber niteliğinde olacaktır. Bir mikroorganizma hücresinin tipik elementel bileşimi Tablo 5.1'de görülmektedir. Mikrobiyal gelişme için kullanılacak herhangi bir ortam, en azından, bu elementleri uygun oranda içermelidir.

Tablo1. Mikroorganizmaların tipik elementel bileşimi

Element	**Hücre kuru ağırlığına göre %**
Karbon	50
Azot	7-12
Fosfor	1-3
Kükürt	0,5-1,0
Magnezyum	0,5

Karbon, oksijen ve hidrojen hariç substrat içerisindeki besinlerin formülasyonu Tablo 5.1'deki verileri esas alır. Örneğin; azot ve kükürt kaynağı olarak amonyum sülfat kullanılarak 30 g/L maya hücresi kitlesinin sentezi arzulanıyorsa, 12 g/L $(NH_4)_2$ SO_4' in ortamda bulunması gereklidir. Bu miktar $(NH_4)_2SO_4$ 2,4 g/L azot ve 3.0 g/L kükürt sağlayacaktır. Azot gereksiniminin temin edilmesi ile kükürt gereksiniminin fazlaca karşılanabileceği görülmektedir.

Benzer bir hesaplama, 3,0 g/L hücre biyokütlesinin sentezi için Tablo 5.2'de görülen minimal ortamın düzenlenmesine olanak verir.

Tablo 2. Seçilmiş bir karbon kaynağından 30 g/L maya üretimi için düzenlenmiş bir gelişme ortamı

Ortam Bileşenleri	**Konsantrasyon (g/L)**
Karbon enerji kaynağı	
Metanol	60.0
Etanol	40.0
Glikoz	60.0
$(NH_4)_2SO_4$	12.0
KH_2PO_4	1.3
$MgSO_4$	1.5
İz elementler	
(Cu, Co, Fe, Ca, Zn, Mo, Mn)	10^{-4}M

Biyokimyasal ko-faktörler veya yapısal komponentler olarak iz elementlere de gereksinim duyulmaktadır. Fakat bu elementlere olan gereksinimi tahmin etmek çok zordur. Buna rağmen, bir kural olarak, Tablo 5.2.'de görülen iz elementler 30 g/L hücre için 10^{-4}M, 3 g/L hücre için 10^{-5}M konsantrasyonlarında ilave edilebilirler. Bazı mikroorganizmaların bir veya daha fazla iz elemente normalden daha fazla ihtiyaç duyulabileceği, ayrıca hatırlanmalıdır.

3. Özel Biyokimyasal Gereksinimler

Birçok mikroorganizma basit mineral tuzları içeren ortamlarda iyi gelişebilirlerse de, bazıları bir veya daha fazla özel biyokimyasal bileşiklere gereksinim duyarlar. Bu bazı mikroorganizmaların gereksinim duydukları tüm biyokimyasal bileşikleri kendilerinin sentezleyememesinden kaynaklanmaktadır. En fazla gereksinim duyulanlar vitaminler ve aminoasitlerdir. Örneğin; mayalar çoğunlukla biotin, thiamin ve riboflavine gereksinim duyarlar. Bazı mikroorganizmalar oldukça müşkülpesenttir ve 10-12 tane biyokimyasal komponentin besiyerine ilavesi gerekir. Genellikle, vitaminlere olan gereksinim az miktarlardadır ve bunlar tipik olarak litreye "mg" düzeyinde ilave edilirler.

4. Enerji Gereksinimleri

Mikroorganizmalar temel kimyasal maddeleri kompleks moleküllere çevirirlerken bu reaksiyon serilerini gerçekleştirebilmek için, enerji kullanmaya gereksinim duyarlar. Çoğunlukla, bu enerji indirgenen organik bileşiklerin kontrollü oksidasyonu ile temin edilir. Bu tür karbon bileşikleri hücrelerin elementel karbon gereksinimlerini karşılamalarının yanısıra, biyosentez enerjisi üretmek amacıyla da kullanılırlar. Biyosenteze ilave olarak; hücre yapısının muhafazası, moleküllerin aktif transportu, hücre ve çevresi arasındaki konsantrasyon değişimlerini dengelemek ve bazen hücre hareketi için de enerjiye gereksinim duyulur.

Bu nedenlerle, besiyeri ortamında tüm bu gereksinimleri karşılayacak yeterli karbon kaynağı bulunmalıdır. Hücre gelişmesi için karbon kaynağı gereksiniminin hesaplanması, arzulanan hücre yoğunluğunun ümit edilen hücre verimine ($Y_{x/s}$) bölünmesi suretiyle yapılır. Örneğin; verim 0,5 g hücre/g metanol olduğu zaman, metanolden 30 g/L hücre elde etmek için, Tablo 5.2'de görüldüğü gibi, 60 g/L metanole gereksinim duyulur.

Temel besinlerden biri olan oksijen, suda zor çözünen bir gaz olduğundan, fermantasyonda özel bir kütle transferi sorunu getirir. Bununla birlikte, oksijen gereksiniminin mikroorganizmaya, karbon kaynağına ve kullanımındaki etkinliğe bağlı olduğu söylenebilir.

5. Endüstriyel Substrat Seçimi ve Formülasyondaki Genel İlkeler

Belirli bir üretime yönelik substrat seçimi için kesin bir yöntem yoktur, bu daha çok bir uzmanlık işidir. Deneysel ve teorik çalışmalar birlikte yürütülerek en verimli ve ekonomik substrat seçilir. Bu nedenle bu bilgiler, çoğunlukla, endüstriyel bir sır olarak saklanır.

Substrat formüle edilirken aşağıdaki hususlara özellikle dikkat edilmelidir:

a- Substrat hücre gelişmesi ve biyosentez için gerekli besin maddelerini, mikroorganizmaların yararlanabileceği uygun bileşikler halinde içermelidir. Eksik olanlar takviye edilmeledir.
b- Endüstriyel substrat formülasyonları hazırlanırken yöresel hammaddenin seçimi ve üretimde kullanılması büyük önem taşır. Belirli bir substrat içinde çok iyi gelişen bir suş, aynı hammaddenin başka bir yöreden temin edilmesi durumunda gelişmeyebilir. Bu durum hammaddenin üretiminde yöresel koşullara bağlı farklılıklardan kaynaklanabilir. Bu farklılıkların kimyasal analizler ile tespit edilmesi zor olduğundan, en iyisi mikroorganizmanın yöresel hammaddeye uyumu (adaptasyonu) sağlanmalıdır.
c- Hammaddenin kimyasal kalite kontrol analizlerinin yanısıra, küçük çapta üretim denemeleri ile biyolojik yönden uygunluğu denenmelidir.
d- Hammaddedeki gereksiz fazlalıkların olumsuz sonuçlara neden olabileceği dikkate alınmalıdır.
e- Subtrat formülasyonları saptanırken, hammaddeler ile ilgili birim ve taşıma maliyeti, depolama süresi ve koşulları, korozyon gibi ekonomik faktörler gözönünde tutulmalıdır.
f- Hammadde içindeki toksik özellikteki maddeler substrattan uzaklaştırılmaya çalışılmalıdır.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

1. THP

THP değişik besi yerlerinde uygun koşullar altında çoğaltılan mikroorganizmaların (bakteri, küf veya algler) oluşturduğu biyokütlenin bir ürünüdür.

Hızla artan dünya nüfusu ile birlikte ortaya çıkan gıda ve protein sorunu karşısında, gıda formülasyonlarında yer alacak yeni protein kaynaklarına yöneliş de artmaktadır. Giderek büyüyen bu protein açığının kapatılmasında en önemli alternatiflerden birisini Tek Hücre Proteini (THP) oluşturmaktadır. Çoğu bakteri, maya ve küf hayvansal ürünlere eşdeğer protein içeriğine sahiptir ve uygun koşullarda geliştirildiklerinde bitkisel proteinlerden daha iyi bir protein kaynağıdırlar. THP, çoğunlukla mikroorganizmaların pahalı olmayan bir azot kaynağı üzerinde geliştirilmesi ile üretilmektedir.

Mikroorganizmalar, bitki ve hayvanlardan daha hızlı çoğaldıkları ve bazıları optimum koşullarda ve uygun substrat üzerinde kendi hücrelerinin %80'i kadar protein oluşturdukları için THP üretiminde kullanılmaktadır. Örneğin, mayalar genellikle 1-3 saat, algler 2-6 saat, funguslar 4-12 saat ve birçok bakteri uygun ortam olduğunda 1 saatten daha kısa bir sürede çoğalmaktadırlar.

Mikroorganizmaların oluşturduğu proteinin hayvansal proteinle kıyaslanmasında birçok farklılık göze çarpar. Öncelikle mikrobiyal protein üretimi çok hızlıdır. 500 kg ağırlığındaki bir sığır günde 0.5 kg protein üretirken aynı miktarda 500 kg mayanın bir günde ürettiği protein miktarı 50 tondur. (100.000 misli). Mikrobiyal biyomas üretiminin bir diğer üstünlüğü, tarımsal üretimde olduğu gibi geniş alanlar ve elverişli iklim koşullarının sağlanmasının zorunlu olmamasıdır. Bunun yanı sıra substrat olarak kullanılabilecek hammadde çok çeşitli ve ucuzdur.

Mikroorganizmaların doğrudan beslenme amacıyla kullanılmaları ilk defa 19. yüzyıl sonlarında bira atık mayasının hayvan yemine katılması şeklinde olmuştur. İlk defa 1910 yılında Almanya'da THP'nin hayvan ve insan beslenmesinde kullanılması araştırılmaya başlanmış, *S. cerevisiae* mayası üretimi için tesisler açılmıştır. 1930 yılında *Candida utilis*'in kullanılması ile üstün nitelikli gıda ve yem mayası üretilebileceği ortaya konmuştur.

Kullanılan mikroorganizmalar

Bakteriler; çok sayıda patojen olmayan tür içermeleri, diğer mikroorganizmalar tarafından metabolize edilemeyen çeşitli substratları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaları ve diğer mikroorganizmalara oranla çabuk çoğalmaları bakımından üstünlük gösterirler.

Pek çok bakteri karbon enerji kaynağı olarak çok sayıda substratı kullanır. Bunun için petrol ürünleri, azot, doymamış hidrokarbonlar, metanol ve metan, tarımsal artıklar kullanılmaktadır. Bakteri türlerinin pek çoğu THP üretiminde denenmiştir. THP üretiminde uygunluk için yapılan seçimlerde gelişme hızı, verim, pH ve sıcaklık toleransı, genetik stabilite, fajlara direnç gibi pek çok özellik aranır. *Bacillus, Corynobacterium, Lactobacillus, Arthrobacter, Brevibacterium, Pseudomonas* türleri üzerinde çalışılmaktadır. *Pseudomonas fluorescens* ile yapılan bir çalışmada, tarım artıklarının substrat olarak kullanımı sonucu elde edilen proteinin lisin açısından oldukça zengin olduğu bildirilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan laboratuvar deneyleri sonucunda *E. coli*' nin iyi bir protein tamamlayıcısı olduğu saptanmıştır. Ancak

bakteriler metabolizmayı olumsuz yönde etkileyen yüksek oranda nükleik asit içerirler ve fermentasyon sonunda protein ortamdan zor ayrılır.

THP kaynağı olarak kullanılan başlıca mayalar ise *Candida utilis, S. fragilis, Torulopsis utilis, S. cerevisiae* vb' dir. Mayaların üretiminde melas, patates nişastası, şeker, meyvelerin etli kısımları, sülfit sıvısı, peynir altı suyu kullanılmaktadır.

Son yıllarda THP üretiminde küflerin kullanımı da yaygınlaşmıştır. Küflerden elde edilen protein oranı yüksektir. Maya ve bakterilerden daha düşük oranlarda nükleik asit içerirler ve miselleri olması nedeniyle besi ortamından kolay ayrılırlar. Küflerden *Penicillum, Aspergillus, Fusarium, Rhizopus* vb kullanılmaktadır.

THP kaynağı olarak algler fotosentez yetenekleri, yüksek protein içerikleri ve basit besiyerlerinde süratle çoğalmaları nedeniyle kullanılmaktadır. Ancak algler diğer mikroorganizmalardan farklı olarak ışık yeterli oranda karbondioksit isteği gösterirler.

Mikroalgler klorofilli bitkiler olduğundan havanın karbondioksidini özümlerler ve bu nedenle ayrıca bir karbon kaynağına gereksinimleri yoktur. Mikroalglerin havanın azotundan yararlanan türleri de vardır. Mikroalgler fazla miktarda protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve özellikle karoten ve ksantofil içerdiklerinden, beslenme yönünden çok önemlidirler. Fotosentetik algler fotosentez yoluyla karbondioksit, su ve mineral tuzlar gibi inorganik maddeleri doğrudan yüksek kaliteli proteinlere çevirebilmektedirler. Fotosentetik algler diğer bitkilerde olduğu gibi ortamda azota ihtiyaç duyarlar. Bazıları ise kendi azotlarını fikse etme yeteneğine sahiptirler. Meksika ve Sahara'nın geleneksel gıdalarından olan Spirulina fotosentetik bir alg olup, çöllerdeki alkali gölcüklerde doğal olarak yetişmektedir.

Üretim

THP üretimi için sürekli fermantasyon kesikli fermantasyondan daha çok kullanılmaktadır. Bu yöntemde mikroorganizmalar üst cinsinden çoğalıp homojen olarak gelişmektedir. Kuvvetli bir karıştırma ile her hücrenin en iyi düzeyde gelişebilmesi için yeterli besin ve oksijeni alması sağlanmaktadır. Ortamdan hücre süspansiyonu ayrıldıkça, ortam aynı miktarda besiyeri ve ilave edilen besiyerine eşdeğer miktarda oksijen ile desteklenmektedir.

Üretim sonunda hücresel biyokütlenin fermentörden ayrılması ve saflaştırılması gerekmektedir. Fermentörden alınan biyokütle, bulamaç halinde olduğu için saflaştırma amacıyla çöktürme, filtrasyon ya da santrifüjleme işlemleri uygulanmaktadır. Bakteri ve maya hücreleri seperatör yardımıyla ayrılırken, filamentli küfler filtrasyon ile ayrılmaktadır. Bunu izleyen işlemler ise, su oranı yüksek hücresel kütlenin korunması ve sindirilebilme oranının arttırılması için yapılan yıkama ve kurutma işlemleridir.

THP'nin besin kalitesi:

Tek hücre proteininin besin değeri, mikroorganizma kütlesinin fermentörden alındığı sıradaki metabolik durumuna ve hasat sonrası uygulanan işlemlere bağlıdır. Ürünün protein içeriği ve bu proteinin biyolojik olarak yararı ile esensiyel amino asitlerin miktarı THP'nin protein kalitesini, sindirilebilirlik oranını ve kullanılabilirlik durumunu ortaya koymaktadır. THP ürünlerinde protein içeriği, kullanılan mikroorganizmaya göre değişmekte; ancak aminoasit bileşimi hemen hemen aynı olmaktadır.

Mayalardan elde edilen proteinin sindirim ve emilimi %80-90 arasındadır; hücre zarının parçalanması sonucu bu oran artabilmektedir. Kükürtlü aminoasitlerin yeterli düzeyde yer almaması nedeniyle protein değeri düşüktür. Ancak, methionin ilave edilmiş maya proteini tahılların lisin eksikliğini tamamlamakta ve tahıllarla karıştırılarak hayvan beslemede ve çeşitli gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Yapılan araştırmalarda, THP'nin hayvanlar üzerindeki toksik, karsinojenik ve mutajenik özelliğinin bulunmadığı; protein, yağ, vitamin ve mineral metabolizmasında değişikliklere yol açmadığı gözlemlenmiştir. Ancak unutulmamalıdır ki THP üretiminde mikroorganizmaların kurutulması sırasında, toksinlerden arındırılması ve proteinin ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmesiyle bu sonuçlara ulaşılmaktadır.

Birçok THP içeren üründe önemli sorun, yüksek nükleik asit içeriğidir. Yüksek düzeyde THP tüketen kişilerde vücuttaki ürik asit miktarı artmakta, dolayısıyla böbrek taşları oluşmakta, doku ve eklemlerde gut hastalığı gözlemlenmektedir. Bu nedenle THP'nin nükleik asit içeriği; mikrobiyel gelişme sırasında nükleik asit sentezinin kontrolü, protein konsantresi ve izolatlarının üretimi, tüm hücrelerin alkali ile işlem görmesi ve nükleik asitlerin enzimler yardımıyla hidrolizi gibi yöntemlerle azaltılmalıdır.

THP'nin kabul edilebilirliği ve geleceği:

Atık maddeler gerek çevre kirlenmesine yol açtığı, gerekse dünya hammadde kaynaklarının azalmasına yol açtığı için, insanlar endüstriyel atıkları çeşitli şekillerde değerlendirmeye yönelmişlerdir. Genellikle endüstriyel atıkların mikroorganizmalar tarafından kullanılması sonucu elde edilen THP, uzun yıllardır ucuz ve kolaylıkla elde edilebilen protein kaynağı arayan insanlar için bir ümit ışığı olarak görülmektedir. Kötü beslenmenin ve açlığın yaygınlaşması ile birlikte THP üretimi bir alternatif olarak görünmekte ise de, bazı ekonomik ve teknik sorunlar yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir. Bu nedenle öncelikle atığın türüne, bileşimine ve özelliklerine bağlı olarak uygun işleme teknolojisinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Her yeni gıda maddesinde olduğu gibi, mikrobiyel kaynaklı bu ürünün de sağlık yönünden güvenli ve yenilebilir nitelikte olduğunun saptanması ve ispatlanması gerekmektedir.

THP tek başına tüketilemez. Ancak, bazı gıdaların protein yönünden zenginleştirilmesi amacıyla kullanılabilir. Elde edilen THP ürünü buğday unu, mısır, pamuk tohumu, susam gibi ürünlere ilave edilerek çeşitli karışımlar hazırlanabilir. Ayrıca, ekmek, kek, pasta gibi tahıl kaynaklı gıdalarda THP ilavesi, ürünün besin değerinin artmasına yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte İngiltere'de basit karbonhidratlar üzerinde *Fusarium* türü küflerin geliştirilmesi ile elde edilen bir mikro protein, diğer THP ürünlerinden farklı olarak insan tüketimine sunulmuştur. Fermantasyon sonucu elde edilen renksiz, yavan tatta ve lifli yapıdaki ürün, vejeteryanlar için et benzeri gıdaların üretiminde çeşitli katkı maddeleri ile birlikte kullanılmaktadır.

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

ÜRETİM YÖNTEMLERİ

-Yüzey yöntemi

Bu yöntemde mikroorganizmalar sıvı yarı katı ve katı substratlar üzerinde geliştirilirler. Çoğunlukla substrat üzerinde bir zar, küflerde misel örtüsü oluşur. Diğer mikroorganizmalar besiyerinin yalnız bu yüzey kısmında kaldıkları halde küf miselleri daha alt tabakalara kadar inerler.

Bu yöntemde substrat yüzeyinin derinliğe oranı ne kadar fazla ise, üretim o denli hızlı olur.

-Derin kültür (Daldırma- Submers) yöntemi

Bu yöntemde mikroorganizmalar substrat içerisinde geliştirilirler. Gerekli hava, havalandırma düzenekleri yardımıyla substrat içerisine verilir.

Bu yöntemin en basit uygulaması çalkalamadır ve laboratuvarda başlatıcı kültürün (ön kültür) hazırlanmasında, sıklıkla kullanılır. Daha büyük hacimli fermentörlerdeki substrat içerisine, karıştırıcının hemen altından hava verilir. Böylece verilen havanın substrat içerisinde iyice dağılması sağlanmış olur. Derin kültür yönteminde, özellikle aerop mikroorganizmalar ile çalışıldığında, yeterli miktarda havanın sürekli bir biçimde sağlanması zorunludur.

Üretim yöntemleri üretimin sürekliliğine göre, 3'e ayrılır.

-Kesikli yöntem (Batch cultivation) : Bu yöntemde, üretim kabı substrat ile doldurulur, sterilize edilir ve aşılanır. Fermantasyon sonunda üretim kabı boşaltılıp, temizlenir. Yeni bir parti için yeniden substrat ile doldurulur. Görüldüğü gibi, biyodönüşüm (fermantasyon) süresi dışında doldurma, boşaltma, temizleme, sterilizasyon amacıyla, fazlaca zaman harcanmaktadır. Bu, biyodönüşüm süresi dışında harcanan zamandan tasarruf amacıyla, yarı sürekli ve sürekli üretim yöntemleri geliştirilmiştir.

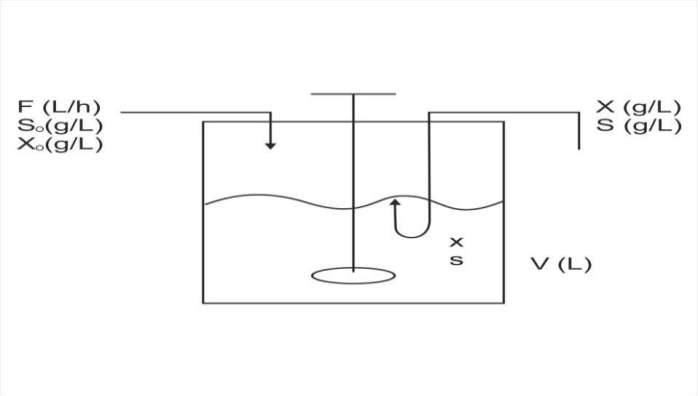
-Yarı sürekli yöntem (Semi-batch cultivation): Kesikli ve sürekli yöntem arasında bir geçiş olarak düşünülebilir. Kesikli yöntemde fermantasyon en üst seviyeye ulaştığı zaman, üretim kabındaki içeriğin bir kısmı alınır, kalanın üzerine yeni substrat verilir. Bu durum her seferinde tekrarlandığı gibi, bazan verilen yeni substrat miktarı azaltılıp çoğaltılarak, fermantasyon süresi kısaltılıp, uzatılabilir.

-Sürekli Yöntem (Continuous cultivation): Karıştırılan bir fermantasyon ortamına sürekli olarak taze substrat verilmekte, aynı zamanda, hücre ve ürün içeren olgun ortam üretim kabından uzaklaştırılarak, sisteme bir süreklilik kazandırılmaktadır.

Bu yöntemde kesikli fermantasyonda olduğu gibi işe başlanır. Mikroorganizmanın üst cinsinden çoğalma evresinin sonunda, hızı ayarlanabilen bir pompa vasıtasıyla ortama, sürekli

ve düzenli olarak taze substrat ilave edilir. Aynı zamanda, verilen substrata eşit miktarda fermente olmuş ortam reaktörden ayrılır.

Sürekli kültürde mikroorganizma gelişmesi uzun süre korunabilir. Ayrıca; hücre konsantrasyonu, özgül gelişme hızı, substrat ve ürün konsantrasyonları gibi kültür koşullarının zamana bağlı olarak değişmediği "yatışkın durum (steady state) " muhafaza edilebilir.



Sürekli kültürde, substrat besleme hızı kültür ortamının kimyasal bileşimine (yani kimyasal çevreye) göre ayarlanıyorsa, buna **"kemostat"**; kültür ortamının optik yoğunluğunu ölçmek suretiyle, kültür kabı içerisindeki hücre konsantrasyonu esas alınarak ayarlanıyorsa, buna da **"türbidiostat"** denir.

Gelişme

$$\frac{F}{V}X_o - \frac{F}{V}X + \mu X = \frac{dX}{dt}$$

Hücre - Hücre + Hücre = Hücre
girişi çıkışı çoğalması birikimi

Genellikle, besin akışı sterildir ve X_o= 0'dır. Böylece Eşitlik 2.25, Eşitlik 2.26'da görüldüğü şekilde basitleştirilebilir;

$$-\frac{F}{V}X + \mu X = \frac{dX}{dt}$$

Sonuç olarak, yatışkın durumda $\frac{dX}{dt} = 0$ olduğundan

$$\mu = \frac{F}{V}$$

şeklinde yazılabilir. Böylece; özgül gelişme hızı ortamın akış hızının kültür hacmine bölünmesi ile belirlenir. Bu oran dilüsyon hızı (D) olarak belirtilirse,

$$D = \frac{F}{V} = \mu$$

böylece, yatışkın durumda **özgül gelişme hızı dilüsyon hızına eşittir** (μ= D).