

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEÇİBOYNUZU MEYVESİNDEN FERMENTASYON YOLUYLA
LAKTİK ASİT VE ETANOL ÜRETİMİ

İRFAN TURHAN

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2009

**KEÇİBOYNUZU MEYVESİNDEN FERMENTASYON YOLUYLA
LAKTİK ASİT VE ETANOL ÜRETİMİ**

İRFAN TURHAN

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez 2008.03.0121.009 Proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEÇİBOYNUZU MEYVESİNDEN FERMENTASYON YOLUYLA
LAKTİK ASİT VE ETANOL ÜRETİMİ

İRFAN TURHAN

DOKTORA TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 24/11/2009 tarihinde aşağıdaki juri tarafından Oybirliği/Oycokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Feramuz ÖZDEMİR

Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY

Doç.Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Yrd.Doç.Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

ÖZET

KEÇİBOYNUZU MEYVESİNDEN FERMENTASYON YOLUYLA LAKTİK ASİT VE ETANOL ÜRETİMİ

İrfan TURHAN

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Mustafa KARHAN

Kasım 2009, 200 Sayfa

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), ülkemizde uzun yıllardan beri sadece orman ağacı olarak yetiştirilmekten öteye gidememiş, baklagiller familyasının *Ceasalpinaceae* alt familyasına dahil bir bitkidir. Bu bitki dünyada Akdeniz ikliminin hakim olduğu bölgelerde yetişmektedir ve ülkemiz anavatanı sınırları içinde yer almaktadır (Seçmen 1974, Seçmen 1975). Son yıllarda keçiboynuzu meyvesinin gıda endüstrisinde değerlendirilmeye başlanması ve ekonomik değerinin artması nedeniyle üreticilerin dikkatini çekmiştir. Diğer birçok meyve türü ile kıyaslandığında, keçiboynuzu yetiştiriciliğinin Türkiye dışında İspanya, İtalya, Portekiz, Fas, Lübnan, İsrail ve Yunanistan gibi sınırlı sayıda Akdeniz ülkesinde yapılması, bu meyvenin ürünlerine olan iç ve dış talebin karşılanmasında bazı zorlukları da beraberinde getirmiştir. Türkiye’de keçiboynuzunu değişik amaçlarla değerlendiren gıda işletmelerinden bazıları sadece tohumu meyveden ayırıp yarı mamul olarak özellikle Avrupa ülkelerine pazarlamakta, bazıları tohumdan keçiboynuzu zıncı elde edip gıda katkı maddesi olarak değerlendirmekte ve meyvenin etli kısmından pekmez üretmekte ve bazıları ise hayvan yemi endüstrisine yönelik olarak üretim yapmaktadır. Meyve tüketim olgunluğuna ulaştığında %91-92 toplam kuru madde ve %62-67 toplam çözünür kuru madde içermekte olup, çözünür kuru maddenin önemli bir bölümünü sakaroz (%34-42), fruktoz (%10-12) ve glukoz (%7-10) oluşturmaktadır (Karkacier ve Artık 1995).

Doğal haliyle preslenmesi mümkün olmayan keçiboynuzu meyvesi, meyve suyu ve pekmez üretimi amacıyla sıcak su ile ekstrakte edilerek işlenmektedir. Bu işlem esnasında meyvedeki suda çözünür kuru maddenin (ÇKM), özellikle de şekerlerin tamamı ekstrakte edilememekte ve posada yaklaşık %10-15 ÇKM kalabilmektedir. Dolayısıyla da ülkemizde pekmez üretimi için kullanılan keçiboynuzu meyvesinden her yıl yaklaşık 20,000–25,000 ton posa açığa çıkmaktadır. Ancak zengin karbonhidrat, protein, pektin ve mineral madde kaynağı olan keçiboynuzu meyvesinin posası hayvan yemi rasyonlarına katılması dışında değerlendirilmemekte; ürünün yoğun bir aromaya sahip olması nedeniyle de yem rasyonlarına sınırlı miktarlarda katılmaktadır. Bu nedenle uygun içeriğe sahip bu meyvenin, posasının ve ekstraktının biyoteknolojik yöntemlerle özellikle de fermentasyonla değerlendirilebilecek niteliklere sahip olduğu düşünülmektedir.

Laktik asit, gıda endüstrisinde koruyucu, asitliği düzenleyici ve lezzet verici olarak kullanılması yanında kimya, tekstil ve eczacılık alanlarında da yaygın kullanım alanına sahip en önemli hammaddelerden birisidir. Son zamanlarda laktik asit tüketimi, bu asidin bakteriler tarafından kolaylıkla parçalanabilen polimer yapıya dönüşebilen poli-laktik asit (PLA) üretiminde kullanılması nedeniyle artmıştır. Sıcaklıkla şekil alabilen bu polimerler, petrol kaynaklı polistiren, polivinilklorid (PVC) ve vinil klorid gibi ürünlerin yapısına benzer olup onların alternatifi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, dünya’da azalan enerji kaynaklarına alternatif olarak kullanılan etanol, fermentasyon yoluyla üretilen ekonomik değeri yüksek ürünler arasındadır. Tarımsal ürünlerden etanol üretimi yenilenebilir enerji kaynakları açısından önemli bir potansiyel olarak görülmektedir. Bunun yanında diğer potansiyel hammaddelerinde etanol üretimi için değerlendirilmesi düşünülmektedir.

Bu projede keçiboynuzu meyvesinin en iyi ekstraksiyon şartları cevap yüzey metodu ile belirlenerek, pulpu, posası ve ekstraktı derin kültür fermentasyonuna tabi tutularak laktik asit ve etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Yine bunun yanında fermentasyon ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının etanol ve laktik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca pH ve inokülasyon miktarının etanol üretimi üzerine etkileri belirlenmiş ve laktik asit üretimi sırasında ekstrakttaki sakaroz, invertaz enzimi

ile parçalanarak laktik asit üretimi artırılmaya çalışılmıştır. Denemelerden elde edilen veriler kullanılarak fermentasyona ait kinetik parametreler hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), etanol, laktik asit, fermentasyon, cevap yüzey metodu.

JÜRİ : Doç.Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)
Prof.Dr. Feramuz ÖZDEMİR
Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY
Doç.Dr. Murat Soner BALCIOĞLU
Yrd.Doç.Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

ABSTRACT

PRODUCTION OF LACTIC ACID AND ETHANOL FROM CAROB PODS USING SUBMERGED FERMENTATION

Irfan TURHAN

Doctor of Philosophy Thesis in Food Engineering

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Mustafa KARHAN

November 2009, 200 pages

Carob, which has been widely grown in Mediterranean region for a long time, belongs to the Caesalpinaceae subfamily of the family Leguminosae. It was not able to be utilized as more than a tree and has been neglected to be grown in our country. But, in recent years, this fruit has been used in the food industry and thus received the attention of producers with increasing market value. When compared to other fruits, its production limited to Mediterranean countries other than Turkey, such as Spain, Italy, Portugal, Morocco and Greece have brought difficulties in meeting the national and international demands. In Turkey, this fruit is used for various applications, using different methods, by variety of companies. Several products are produced from the seed and pod of carob, and economic importance of the crop results from the use, by industry, of locust bean gum that is obtained from the seed. The pod of the carob fruit has long been used a feed for livestock and in human nutrition, including sweets, biscuits and processed pekmez; a traditional concentrate. While, carob seeds are exported to be produced as locust bean gum, carob pod is used for production of carob powder and carob pekmez. When the fruits are ripe enough to be harvested, it has 91-92% total dry matter and 62-67% total soluble solids which consist of 34-42% sucrose, 10-12% fructose and 7-10% glucose.

In its natural form, carob concentrate cannot be extracted by using press methods which are used in fruit juice industry. So, dry carob pod are extracted with hot water. After the extraction process, there are still 10-15% of soluble solids, especially

sugars, left in the pomace. Therefore, from carob pekmez production alone 20,000-25,000 tons of pomace left behind per year. Although carob pomace is rich in carbohydrate, protein, pectin, and minerals, a limited amount of is used as a feed for livestock because of its heavy aroma. With its suitable content, carob pomace, extract and fruit are known to be utilized by biotechnological methods, especially fermentation.

Lactic acid is now considered to be one of the most useful chemicals, used in the food industry as a preservative, acidulant, and flavouring, in the textile and pharmaceutical industries, and in the chemical industry as a raw material. Recently, lactic acid consumption has increased considerably because of its role as a monomer in the production of biodegradable poly lactic acid (PLA), which is well-known as a sustainable bioplastic material. The polymer of PLA is thermoplastic and biodegradable, which makes it highly utilizable instead of petroleum-derived products such as polystyrene, polyvinyl chloride, and vinyl chloride. However, as the petroleum depleted, renewable energy production started to gain attention all over the world. Ethanol production from raw agricultural products has potential to address the renewable energy production. Corn seemed to be the major crop for ethanol production. However, other potential crops need to be evaluated for an environmentally, socially, and economically sound ethanol production.

This study was designed not only to evaluate the potential of carob extract for ethanol and lactic acid production but also to optimize conditions of carob extraction and determine the effect of alternative nitrogen sources on ethanol and lactic acid production. The obtained data revealed the best conditions for carob extract to use it as a fermentation medium and the effect of nitrogen sources, pH, and inoculum size on ethanol production. Moreover, the effect of invertase enzyme on lactic acid fermentation was determined by using obtained carob extract in the best conditions. Obtained data were used for kinetic parameters of fermentation.

KEYWORDS: Carob (*Ceratonia siliqua* L.) bean, ethanol, lactic acid, fermentation, response surface method

COMMITTEE:

Assoc.Prof.Dr. Mustafa KARHAN (Supervisor)

Prof.Dr. Feramuz ÖZDEMİR

Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY

Assoc.Prof.Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Assist.Prof.Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

ÖNSÖZ

Türkiye keçiboynuzunun anavatan bölgesi içerisinde yer alması nedeniyle gen kaynakları açısından büyük bir avantaja sahiptir. Bu durum, ülkemiz koşullarında yapılan seleksiyon çalışmaları ile de ortaya konmuş ve ülkemizin özellikle yabani tipler açısından çok zengin olduğu görülmüştür. Meyvenin tohum dışında kalan ve oransal olarak yaklaşık %90'ını oluşturan etli kısmı başlıca pekmez üretimi ve hayvan yemi üretiminde değerlendirilmektedir. Ancak tohum ile karşılaştırıldığında, meyve etinden elde edilen ürünlerin piyasa değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle meyvenin etli kısmının kullanım alanlarının genişletilmesi bu meyvenin piyasa değerini artırmakla birlikte üreticinin de bu bitkiye daha fazla değer vermesini sağlayacaktır. Bilindiği gibi keçiboynuzu meyvesi zengin şeker içeriğine sahip olup ülkemizin çeşitli bölgelerinde çekirdekleri çıkarıldıktan sonra 5-7 mm kalınlığında küçük parçalara ayrılarak sıcak su ile ekstrakte edilmekte ve elde edilen ekstrakt buharlaştırılarak pekmez üretilmektedir. Bunun yanında çekirdekleri, “keçiboynuzu gamı” olarak adlandırılan kıvam artırıcı üretiminde kullanılmaktadır. Keçiboynuzu meyvesi ülkemizde Akdeniz bölgesi kıyı şeridinde yaygın olarak yetişmekte ve olgunlaştıktan sonra da yeterince değerlendirilemediğinden dolayı yerlere dökülmekte veya dalında çürümektedir. Ancak hasat edilebilen az bir kısım yerel halk tarafından ilkel metotlarla pekmeze işlenmekte veya doğrudan tüketilmektedir.

Dünya’da yeterince değerlendirilemeyen birçok tarımsal ürün, gıda işleyen fabrikaların atıkları ve yüksek karbonhidrat ve polisakkaritleri içeren diğer atıklar fermentasyon yoluyla yeni ve değerli ürün üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok organik asit, vitamin, amino asit, alkol, antibiyotik ve antibodi gibi ekonomik değeri yüksek ürünler fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Bu ürünlerin üretiminde yüksek saflıkta kimyasallar kullanıldığı gibi içeriği uygun tarımsal ürünler veya atıklar da kullanılmaktadır. Saf kimyasallarla üretimin çok pahalı olması ve ayrıca tarımsal ürünlerin organik atıklarının değerlendirilmesi gibi ekonomik ve çevreci yaklaşımlar alternatif olarak doğal yetişen ürünleri hammadde olarak kullanmaya olan ilgiyi artırmıştır. Bu alanda şeker pancarı, melas, şeker kamışı ve mısır gibi birçok bitkisel ürün yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ürünlerden çok daha yüksek düzeyde

şeker ve mineral madde içeren keçiboynuzu meyvesi ve atıklarının günümüze kadar söz konusu biyoteknolojik üretim amacıyla endüstri hammaddesi olarak değerlendirilmediği bir gerçektir. Ayrıca bu konuda yeterli bilimsel çalışmanın yapılmadığı da bilinmektedir.

Etanol, uzun yıllardan beri fermentasyon yoluyla üretilen ürünler arasında geniş bir yer tutmaktadır. Gıda endüstrisi, kimya endüstrisi, tekstil, eczacılık ve birçok alanda geniş kullanım alanına sahip etanol, son zamanlarda araç yakıtı olarak da belirli oranlarda fuel-oil ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Hızla tükenen enerji kaynakları bazı gelişmiş ülkeleri alternatif yollar aramaya yönlendirmiştir. Bu amaçla birçok ülke ucuz ve içeriği uygun materyalleri kullanarak etanol üretimine başlamıştır.

Gıda maddelerinde koruyucu, asitliği düzenleyici ve lezzet verici olarak kullanılması yanında, kimya endüstrisinde, plastik sanayinde ve bilimsel amaçlı olmak üzere yüksek miktarlarda tüketilen laktik asit, fermentasyon yoluyla üretilebilmektedir. Bakteriler tarafından parçalanabilen ve ısıyla şekil alabilen polimer yapıya sahip bileşiklere dönüşebilmesi, laktik asitten birçok yeni ürün üretilmesini cazip hale getirmiştir. Özellikle polimer yapısından dolayı petrol kaynaklı ürünlerin yerine paketlenme materyali niteliğindeki polilaktik asit (PLA) yapımında yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır.

Bu çalışmada biyoteknolojik açıdan içeriğinin uygun olması, ülkemizde çok yaygın olarak yetişmesi, endüstride yeterince değerlendirilememesi ve bu alanda yeni kullanılacak bir ürün olması nedeniyle keçiboynuzu meyvesinden laktik asit ve etanol üretimlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ışığında üretimlerin optimizasyonu yapılmıştır. Bu tez çalışmasının endüstriye aktarılabilir sonuçların elde edilmesi ve elde edilecek ürünlerin saflaştırılması ve ayrılması üzerine daha sonraki çalışmalara da ışık tutacak nitelikte bir çalışma olduğu düşünülmektedir. Dünya’da bazı büyük ticari firmalar tarafından üretilen söz konusu fermentasyon ürünleri saflaştırıldıktan sonra çok yüksek fiyatlarla satılmaktadır. Türkiye’nin de ithal ettiği bu ürünleri üreterek hem ekonomiye katkı sağlanabilecek hem de üretici açısından yeni iş konuları açılacaktır.

Bana bu konuyu araştırma fırsatı veren, çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr. Mustafa KARHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) ve çalışmanın gerçekleşmesinde Amerika Birleşik Devletleri Pennsylvania State Üniversitesi'nde laboratuvarının tüm imkanlarını kullanıma açarak maddi-manevi destek veren Prof.Dr. Ali DEMİRCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışma sırasında tavsiyelerini esirgemeyen Prof.Dr. Muharrem CERTEL'e ve çalışmanın zaman içerisinde gelişiminde, katkı sağlayan Tez İzleme Komitesi Üyeleri'nden Prof.Dr. Feramuz ÖZDEMİR ve Doç.Dr. M.Soner BALCIOĞLU'na ayrıca teşekkür ederim.

Yine çalışmayı materyal ve teknik imkanlarla destekleyen Yenigün AŞ. yetkililerine, çalışmanın analiz ve teknik kısımlarında sürekli destek aldığım Pennsylvania State Üniversitesi'nde Dr. Katherine BIALKA, Dr. Nene Meltem KEKLİK, Dr. Kuan-Chen Cheng ve teknik uzman Randall G. Bock'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak bulguları yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Araş.Gör. Nedim TETİK ve Araş.Gör. Hatice Reyhan ÖZİYCI'ye, araştırmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi yetkili ve çalışanlarına ve her zaman beni destekleyen eşim Nevra TURHAN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. Keçiboynuzu Meyvesinin Özellikleri, Değerlendirme Yöntemleri ve Endüstriyel Olarak Önemi.....	4
2.2. Fermentasyon Mikrobiyolojisi.....	7
2.3. Mikroorganizmalar için Gerekli Hammaddeler.....	9
2.3.1. Besin olarak alınan elementler	10
2.3.2. Karbon, hidrojen ve oksijen kaynakları.....	12
2.3.3. Azot, kükürt ve fosfor kaynakları.....	14
2.3.4. Diğer besin kaynakları (S, K, Mg, Ca, Na, Fe)	15
2.3.5. Gelişme faktörleri.....	15
2.4. Mikroorganizmalarda Beslenme Tipleri.....	16
2.5. Fermentasyon Yöntemleri.....	17
2.5.1. Kesikli fermentasyon.....	17
2.5.2. Sürekli fermentasyon.....	17
2.5.3. Kesikli reaktör kinetiği.....	18
2.6. Mikroorganizmaların Yaşama Evreleri ve Üreme Kinetiği.....	19
2.6.1. Gelişme eğrisi (kurvesi).....	20

2.6.2. Latent veya gizil dönem (Lag fazı).....	21
2.6.3. Ekspansiyonel dönem (Log fazı).....	22
2.6.4. Durma fazı.....	24
2.6.5. Ölme fazı.....	25
2.7. Mikrobiyel Gelişmeye Etki Eden Faktörler.....	26
2.7.1. Osmotik basınç ve su aktivitesi.....	26
2.7.2. Sıcaklık.....	28
2.7.3. pH.....	29
2.7.4. Oksijen.....	30
2.7.5. Karbondioksit.....	31
2.7.6. Basınç.....	31
2.8. Etanol.....	32
2.8.1. Etanolün kullanıldığı alanlar.....	34
2.8.2. Fermentasyon metodu ile etanol üretimi.....	34
2.8.3. Etanol fermentasyonu teknolojisi.....	40
2.8.3.1. Glikoliz fermentasyonu.....	41
2.8.3.2. Etanol metabolizması.....	43
2.8.4. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizmalar.....	43
2.8.5. Etanolün saflaştırılması.....	48
2.9. Laktik asit.....	49
2.9.1. Laktik asidin kullanım alanları.....	51
2.9.2. Laktik asidin üretim teknolojisi.....	54
2.9.3. Laktik asit üretiminde kullanılan hammaddeler.....	56
2.9.4. Laktik asit fermentasyonu.....	60
2.9.5. Laktik asit geri kazanımı (Recovery).....	60
2.10. Deneysel Tasarım Yöntemleri.....	62
2.10.1. Cevap yüzey metodu.....	62
2.10.2. Box-Behnken yöntemi.....	65

3. MATERYAL ve METOT.....	69
3.1. Materyal.....	69
3.2. Ekstraksiyon ve Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Method).....	69
3.3. Keçiboynuzu Meyvesinden Ekstrakt Üretimi.....	70
3.4. Fermentasyonda Kullanılan Reaktör.....	73
3.5. Fermentasyonla Etanol Üretimi.....	74
3.5.1. Mikroorganizma.....	74
3.5.2. Kültürleme ve mikroorganizmanın hazırlanışı	74
3.5.3. Etanol fermentasyonu.....	76
3.5.3.1. Etanol üretiminde deneme deseni.....	77
3.6. Fermentasyonla Laktik Asit Üretimi.....	78
3.6.1. Mikroorganizma.....	78
3.6.2. Mikroorganizma hazırlanışı.....	78
3.6.3. Laktik asit fermentasyonu.....	79
3.6.3.1. Keçiboynuzu ekstraktına invertaz uygulanması.....	80
3.6.3.2. Laktik asit üretiminde deneme deseni.....	80
3.7. Analiz Yöntemleri.....	82
3.7.1. Hücre kütle (biyokütle) miktarı.....	82
3.7.2. Etanol ve laktik asit miktarının HPLC ile belirlenmesi.....	83
3.7.3. Şeker analizi.....	84
3.7.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	86
3.7.5. İstatistiksel analizler.....	90
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	91
4.1. Keçiboynuzu ekstraksiyonunun Optimizasyonu.....	91
4.1.1. Sıcaklığın ekstraksiyon üzerine etkisi.....	92
4.1.2. Sürenin ekstraksiyon üzerine etkisi.....	93
4.1.3. Meyve:su oranının ekstraksiyon üzerine etkisi.....	93
4.1.4. Cevap yüzey metodu modellemesi.....	94

4.2. Etanol Fermentasyonu.....	96
4.2.1. pH'nın etanol üretimi üzerine etkisi.....	96
4.2.1.1. pH kontrolsüz fermentasyon.....	96
4.2.1.2. pH kontrollü etanol üretimi.....	98
4.2.1.3. pH kontrollü ve pH kontrolsüz etanol üretimlerinin karşılaştırılması.....	103
4.2.2. İnokülasyon oranının etanol üretimi üzerine etkisi.....	105
4.2.2.1. % 1 İnokülasyon oranı.....	105
4.2.2.2. % 3 İnokülasyon oranı.....	107
4.2.2.3. % 5 İnokülasyon oranı.....	109
4.2.2.4. Etanol üretimlerinde inokülasyon oranlarının karşılaştırılması.....	111
4.2.3. Farklı azot kaynaklarının etanol üretimi üzerine etkisi.....	115
4.2.3.1. Tavuk eti tozu (Poultry Meal) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	115
4.2.3.2. Kabuk ve tırnak karışım tozları (Hull and Fines Mix) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	117
4.2.3.3. Tüy tozları (Feather Meal) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	119
4.2.3.4. Et ve kemik tozları (Meat-Bone Meal) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	121
4.2.3.5. Etanol üretiminde katkısız keçiyoynuzu ekstraktının kullanılması	124
4.2.3.6. Etanol üretiminde farklı azot kaynaklarının kullanılması ile gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması.....	126
4.2.4. Etanol üretiminde keçiyoynuzu pulpu, posanın pulpu ve posanın ekstraktının kullanılması.....	130
4.3. Laktik Asit Fermentasyonu.....	136
4.3.1. Zenginleştirme işleminin laktik asit üretimi üzerine etkisi.....	136
4.3.1.1. Fermentasyon ortamında 8 g/L maya ekstraktı kullanılması.....	136
4.3.1.2. Fermentasyon ortamında 10 g/L maya ekstraktı kullanılması.....	139

4.3.1.3. Fermentasyon ortamında katkısız keçiyoynuzu ekstraktı kullanılması.....	141
4.3.1.4. Keçiyoynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde farklı miktarlarda kullanılan maya ekstraktlarının karşılaştırılması.....	143
4.3.2. Farklı azot kaynaklarının laktik asit üretimi üzerine etkisi.....	147
4.3.2.1. Tavuk eti tozu (Poultry Meal) kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu.....	147
4.3.2.2. Kabuk ve tırnak karışım tozları (Hull and Fines Mix) kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu.....	149
4.3.2.3. Tüy tozları (Feather Meal) kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu.....	151
4.3.2.4. Et ve kemik tozları (Meat-Bone Meal) kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu.....	153
4.3.2.5. Laktik asit üretiminde farklı azot kaynaklarının kullanılması ile gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması.....	155
4.3.3. İnvertaz enziminin laktik asit üretimi üzerine etkisi.....	160
4.3.3.1. İnvertaz enzimi uygulanmış keçiyoynuzu ekstraktı.....	161
4.3.3.2. İnvertaz enzimi kullanılmış katkısız keçiyoynuzu ekstraktı.....	163
4.3.3.3. İnvertaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması.....	166
4.3.4. Laktik asit üretiminde keçiyoynuzu pulpu, posanın pulpu ve posanın ekstraktının kullanılması.....	169
5. SONUÇ.....	175
6. KAYNAKLAR.....	181
7. EKLER.....	194
Ek-1. Alternatif azot kaynağı olarak kullanılan hammaddelerden tavuk eti tozu (a), tüy tozları (b), et ve kemik tozları (c) ve kabuk ve tırnak karışım tozları (d)	194
Ek-2. Fermentasyon işleminin gerçekleştiği biyoreaktörler.....	195
Ek-3. Etanol ve laktik asit fermentasyonlarında her üretim için gerçekleştirilen	

işlemler.....	196
Ek-4. DNSA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen şeker analizlerinin spektrofotometreden alınmış değerlerle oluşturulan standart şeker çözeltilerine ait eğri ve değerleri (a) ve şeker konsantrasyonlarının belirlendiği formül (b)...	197
Ek-5. Cevap yüzey metodu Kontur Plot grafikleri.....	198
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

m	: Kütle (kg)
μ	: Mikroorganizma için spesifik gelişme hızı
x	: Biyokütle miktarı
dx/dt	: Birim zamanda biyokütle oluşumu
x_0	: Fermentasyon başlangıcındaki biyokütle miktarı
x_{max}	: Maksimum biyokütle miktarı
a_w	: Su aktivitesi
pH	: Hidrojen iyonlarının eksi (-) logaritması
T	: Sıcaklık
μm	: mikrometre
μl	: mikrolitre
ml	: mililitre
kcal	: kilokalori
g	: gram
t	: ton
ha	: hektar
km	: kilometre
cm	: santimetre
mm	: milimetre
mg	: miligram
s	: saniye
dk	: dakika
°Bx	: Briks (% Çözünür kuru madde)
nm	: nanometre

Kısaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
DNSA	: Dinitrosalisilik asit
ÇKM	: Çözünür Kuru Madde
GRAS	: Genel olarak güvenli kabul edilen
PLA	: Polilaktik asit
PVC	: Polivinilklorür
ETS	: Elektron taşıma sistemi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
T	: Sıcaklık
S	: Süre
OD	: Optik yoğunluk
SAS	: Statistical Analysis Software
d/d	: devir/dakika
ATCC	: American Type Culture Collection
S	: Substrat
S_1	: Fermentasyon sonundaki substrat miktarı
S_0	: Fermentasyon başlangıcındaki substrat miktarı
P	: Ürün
P_1	: Fermentasyon sonundaki ürün miktarı
P_0	: Fermentasyon başlangıcındaki ürün miktarı
$Y_{p/S}$	: Birim substrat için üretilen ürün miktarı verimi
$Y_{x/S}$	: Birim substrat için gelişen mikroorganizma miktarı verimi
t_d	: Mikroorganizma miktarının iki katına çıkma süresi
X_1	: Cevap yüzey metodu değişkenlerinden birincisi
X_2	: Cevap yüzey metodu değişkenlerinden ikincisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Mikroorganizmaların büyüme eğrisi.....	20
Şekil 2.2.	Mikroorganizmaların sıcaklığa bağlı olarak gelişme hızı.....	28
Şekil 2.3.	Çeşitli mikroorganizmaların geliştiği sıcaklık aralıkları.....	29
Şekil 2.4.	Etanolün kimyasal yapısı.....	33
Şekil 2.5.	Glukozdan etil alkol üretim reaksiyonu.....	35
Şekil 2.6.	Glukozun parçalanmasıyla gerçekleşen glikoliz.....	42
Şekil 2.7.	Laktik asit kaynaklı ürünler ve kullanımı.....	52
Şekil 2.8.	Glukozdan laktik asit üretim reaksiyonu.....	55
Şekil 2.9.	Cevap yüzey metodu kontur plot grafiği.....	65
Şekil 2.10.	Box-Behnken model tanımı.....	67
Şekil 3.1.	Keçiboynuzu meyvesinin fermentasyonunda kullanılacak ürünler	72
Şekil 3.2.	DNSA metodu ile şeker analizleri.....	85
Şekil 3.3.	Spesifik gelişme hızının hesaplanması.....	89
Şekil 4.1.	pH kontrolü yapılmayan fermentasyon ortamındaki biyokütle miktarı ile pH değişimi.....	98
Şekil 4.2.	Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrolsüz etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	99
Şekil 4.3.	Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrollü etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	101
Şekil 4.4.	pH kontrolü gerçekleştirilmiş ve pH kontrolü yapılmamış örneklerin etanol ve biyokütle miktarlarının karşılaştırılması.....	102
Şekil 4.5.	Keçiboynuzu ekstraktında % 1 inokülasyon oranındaki etanol fermentasyonunda biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	107
Şekil 4.6.	Keçiboynuzu ekstraktında % 3 inokülasyon oranındaki etanol fermentasyonunda biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	109
Şekil 4.7.	Keçiboynuzu ekstraktında % 5 inokülasyon oranındaki etanol fermentasyonunda biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	111
Şekil 4.8.	Keçiboynuzu ekstraktında 3 farklı inokülasyon oranındaki, etanol	

	miktarı ve üretim hızları.....	113
Şekil 4.9.	Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti tozu kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	117
Şekil 4.10.	Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozu kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	119
Şekil 4.11.	Keçiboynuzu ekstraktında tüy tozu kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim..	121
Şekil 4.12.	Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	123
Şekil 4.13.	Keçiboynuzu ekstraktında herhangi bir katkı kullanılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim.....	125
Şekil 4.14.	Keçiboynuzu ekstraktında farklı azot kaynaklarının ve fermentasyon içeriğinin etanol miktarı ve üretim hızları açısından karşılaştırması.....	128
Şekil 4.15.	Keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraksiyonu elde edilen posa ekstraktında etanol miktarı, şeker tüketimi ve biyokütle oluşumu.....	134
Şekil 4.16.	Keçiboynuzu ekstraktından 8 g/L maya ekstraktı kullanılmasıyla elde edilen laktik asit, biyokütle ve şeker tüketimi miktarı.....	138
Şekil 4.17.	Keçiboynuzu ekstraktından 10 g/L maya ekstraktı kullanılmasıyla elde edilen laktik asit, biyokütle ve şeker tüketimi miktarı.....	140
Şekil 4.18.	Keçiboynuzu ekstraktından zenginleştirme yapılmadan kullanılmasıyla elde edilen laktik asit, biyokütle ve şeker tüketimi miktarı.....	142
Şekil 4.19.	Farklı miktarlardaki maya ekstraktının laktik asit üretim hızları ve laktik asit miktarlarının karşılaştırılması.....	145
Şekil 4.20.	Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit	

	miktarlarındaki değişim.....	149
Şekil 4.21.	Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim.....	151
Şekil 4.22.	Keçiboynuzu ekstraktında tüy tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim.....	153
Şekil 4.23.	Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim.....	155
Şekil 4.24.	Keçiboynuzu ekstraktında farklı azot kaynaklarının ve fermentasyon içeriğinin laktik asit miktarı ve üretim hızları açısından karşılaştırılması.....	157
Şekil 4.25.	Keçiboynuzu ekstraktında farklı azot kaynaklarının ve fermentasyon içeriğinin laktik asit miktarının zamana karşı grafiği.....	159
Şekil 4.26.	Keçiboynuzu ekstraktında invertaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim.....	163
Şekil 4.27.	Katkısız keçiboynuzu ekstraktında invertaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim.....	165
Şekil 4.28.	Keçiboynuzu ekstraktında invertazlı ve invertazsız fermentasyon içeriğinin laktik asit miktarı ve üretim hızları açısından karşılaştırılması.	167
Şekil 4.29.	Keçiboynuzu ekstraktında invertaz enzimi uygulanmasıyla elde edilen laktik asit gelişimi.....	168
Şekil 4.30.	Keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraksiyonu elde edilen posa ekstraktında laktik asit miktarı, şeker tüketimi ve biyokütle oluşumu.....	173

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Keçiboynuzu meyvesinin kimyasal bileşimi.....	5
Çizelge 2.2.	Endüstriyel olarak üretilen fermentasyon ürünleri.....	8
Çizelge 2.3.	Fermentasyon işleminde kullanılan yan ürünler.....	9
Çizelge 2.4.	Bazı mikro elementlerin biyolojik işlevleri.....	11
Çizelge 2.5.	Dünyada tahmini etanol üretimi.....	32
Çizelge 2.6.	Etanol üretiminde kullanılan substratlar ve özellikleri.....	37
Çizelge 2.7.	Laktik asit ürünlerinin market hacmi ve değerleri.....	53
Çizelge 2.8.	Laktik asit üretiminde kullanılan bazı hammadde ve mikroorganizmalar.....	57
Çizelge 2.9.	Üç faktörlü Box-Behnken deneme düzenleri.....	66
Çizelge 3.1.	Cevap yüzey metodu için ekstraksiyon parametreleri.....	70
Çizelge 3.2.	Cevap Yüzey Metodu'nun ekstraksiyon için belirlediği şartlar.....	71
Çizelge 3.3.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> için gerekli besiyeri bileşimi.....	75
Çizelge 3.4.	Etanol fermentasyonunda kullanılan keçiboynuzu ekstraktına eklenen maddeler.....	76
Çizelge 3.5.	<i>Lactobacillus casei</i> için gerekli besiyeri bileşimi.....	78
Çizelge 3.6.	Laktik asit fermentasyonunda kullanılan keçiboynuzu ekstraktına eklenen maddeler.....	79
Çizelge 4.1.	Keçiboynuzu ekstraksiyonunun cevap yüzey metodu sonuçları.....	91
Çizelge 4.2.	Cevap yüzey metodu için regresyon katsayıları.....	95
Çizelge 4.3.	Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrolsüz etanol fermentasyonu.....	97
Çizelge 4.4.	Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrollü etanol fermentasyonu.....	100
Çizelge 4.5.	pH kontrollü ve kontrolsüz etanol üretimlerine ait kinetik parametreler	103
Çizelge 4.6.	Keçiboynuzu ekstraktında % 1 inokülasyon oranında etanol fermentasyonu.....	106
Çizelge 4.7.	Keçiboynuzu ekstraktında % 3 inokülasyon oranında etanol fermentasyonu.....	108
Çizelge 4.8.	Keçiboynuzu ekstraktında % 5 inokülasyon oranında etanol	

	fermentasyonu.....	110
Çizelge 4.9.	Farklı inokülasyon oranlarındaki etanol üretimlerine ait kinetik parametreler (pH kontrol (5.5)).....	112
Çizelge 4.10.	Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	116
Çizelge 4.11.	Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	118
Çizelge 4.12.	Keçiboynuzu ekstraktında tüy tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	120
Çizelge 4.13.	Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	122
Çizelge 4.14.	Keçiboynuzu ekstraktında katkı kullanmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	124
Çizelge 4.15.	Farklı azot kaynaklarının etanol üretimlerine ait kinetik parametreler (pH kontrol (5.5)).....	127
Çizelge 4.16.	Keçiboynuzu pulpunda etanol fermentasyonu.....	130
Çizelge 4.17.	Keçiboynuzu posasının pulpunda etanol fermentasyonu.....	131
Çizelge 4.18.	Keçiboynuzu posa ekstraktının etanol fermentasyonu.....	133
Çizelge 4.19.	Keçiboynuzu meyvesinin birinci ve ikinci ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların fermentasyonlarının kinetik parametreleri.....	135
Çizelge 4.20.	Keçiboynuzu ekstraktında 8 g/L maya ekstraktı kullanılması.....	137
Çizelge 4.21.	Keçiboynuzu ekstraktında 10 g/L maya ekstraktı kullanılması.....	139
Çizelge 4.22.	Keçiboynuzu ekstraktının zenginleştirme yapılmadan kullanılması.....	141
Çizelge 4.23.	Keçiboynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde farklı miktardaki maya ekstraktlarına ait kinetik parametreler.....	144
Çizelge 4.24.	Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu.....	148
Çizelge 4.25.	Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu.....	150
Çizelge 4.26.	Keçiboynuzu ekstraktında tüy tozları kullanılarak gerçekleştirilen	

	laktik asit fermentasyonu.....	152
Çizelge 4.27.	Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu.....	154
Çizelge 4.28.	Farklı azot kaynaklarının laktik asit üretimlerine ait kinetik parametreler (pH kontrol (5.0)).....	156
Çizelge 4.29.	Farklı oranlarda invertaz enzimi uygulanmış keçiboynuzu ekstraktındaki monosakkarit miktarı.....	160
Çizelge 4.30.	Keçiboynuzu ekstraktında invertaz enzimi uygulanması.....	162
Çizelge 4.31.	Katkısız keçiboynuzu ekstraktında invertaz enzimi uygulanması.....	164
Çizelge 4.32.	İnvertazlı ve invertazsız örneklere ait kinetik parametreler.....	167
Çizelge 4.33.	Keçiboynuzu pulpunda laktik asit fermentasyonu.....	170
Çizelge 4.34.	Keçiboynuzu posasının pulpunda laktik asit fermentasyonu.....	171
Çizelge 4.35.	Keçiboynuzu posa ekstraktının laktik asit fermentasyonu.....	172
Çizelge 4.36.	Keçiboynuzu meyvesinin birinci ve ikinci ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların fermentasyonlarının kinetik parametreleri.....	174

1. GİRİŞ

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) Leguminosae familyasının Ceasalpinaceae alt familyasına dahil çok yıllık bir bitkidir ve Akdeniz ikliminin hakim olduğu bölgelerde yetişmektedir (Seçmen 1974, Seçmen 1975). Ülkemiz keçiboynuzunun anavatan bölgesi içerisinde yer alması nedeniyle gen kaynakları açısından büyük bir avantaja sahiptir. Bu durum, ülkemiz koşullarında yapılan seleksiyon çalışmaları ile de ortaya konmuş ve ülkemizin özellikle yabani tipler açısından çok zengin olduğu bildirilmiştir (Batlle ve Tous 1997). Dünya’da keçiboynuzu yetiştiriciliği yapılan toplam üretim alanı 103,147 ha civarında olmakla beraber, Avrupa’daki Akdeniz kıyı şeridinde bulunan ülkelerin toplam üretim alanı 100,000 ha dolayındadır. Türkiye’de ise 2,800 ha üretim alanı bulunmaktadır (Anonim 2009). Dünya’da toplam keçiboynuzu üretiminin 186,466 ton/yıl olduğu tahmin edilmektedir. Bu üretimin %42’si İspanya, %16’sı İtalya, %8’i Fas, %6’sı Portekiz, %6.5’i Yunanistan, %5.5 Kıbrıs (özellikle de Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti) ve %4.8’i Türkiye’de gerçekleşmektedir. Türkiye, Kıbrıs ile birlikte yaklaşık 20,000 ton keçiboynuzu üretmektedir (Anonim 2009).

Ülkemizde keçiboynuzunun değerlendirilmesinde meyvenin tohumu açısından herhangi bir sorun bulunmazken, meyvenin oransal olarak yaklaşık %90’ını oluşturan etli kısım ise başlıca pekmez üretimi ve hayvan yemi üretiminde değerlendirilmektedir. Ancak tohum ile karşılaştırıldığında, meyve etinden elde edilen ürünlerin piyasa değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle meyvenin etli kısmının kullanım alanlarının genişletilmesi bu meyvenin piyasa değerini artırmakla birlikte üreticinin de bu bitkiye daha fazla değer vermesini sağlayacaktır. Keçiboynuzu meyvesi ülkemizde Akdeniz bölgesi kıyı şeridinde yaygın olarak yetişmekte ve olgunlaştıktan sonra da yeterince değerlendirilemediğinden dolayı yerlere dökülmekte veya dalında çürümektedir. Bunların içinde hasat edilebilen kısım yerel halk tarafından ilkel metotlarla pekmeze işlenmekte veya yemiş olarak tüketilmektedir. Doğal haliyle preslenmesi mümkün olmayan keçiboynuzu meyvesi sıcak su ile ekstrakte edilerek ülkemizde uzun yıllardan beri pekmez üretiminde değerlendirilmektedir. Bu işlem esnasında meyvedeki ÇKM’nin, özellikle de şekerlerin tamamı ekstrakte edilememekte

ve posada yaklaşık %10–15 ÇKM kalabilmektedir (Turhan ve Karhan 2004, Turhan vd 2006). İkinci bir ekstraksiyon işlemi ile kalan ÇKM'nin büyük bir kısmının alınması mümkün olmasına rağmen bu işlem enerji, işçilik ve kullanılacak ek zamanı karşılamadığı için ekonomik görülmemektedir. Bu işlem sonucunda ülkemizde pekmez üretimi için kullanılan keçiboynuzu meyvesinden her yıl yaklaşık 20,000–25,000 ton posa atılmakta veya bir kısmı hayvan yemi rasyonlarına eklenmektedir. Ancak zengin karbonhidrat, protein, pektin ve mineral madde kaynağı olan keçiboynuzu meyvesinin posası hayvan yemi rasyonlarına katılması dışında değerlendirilmemekte; ürünün yoğun bir aromaya sahip olması nedeniyle de yem rasyonlarına sınırlı miktarlarda katılmakta ve çok büyük bir kısmı atılmaktadır. Bu meyvenin posasının ya da ekstraktının biyoteknolojik yöntemlerle, özellikle de fermentasyonla değerlendirilebilecek niteliklere sahip olduğu da bilinmektedir (Turhan vd 2006). Ancak keçiboynuzu meyvesinden içki ispirtosu üretimi üzerine yürütülmüş çalışmalar ileriye götürülemedi; endüstriye adapte edilebilecek nitelikte sonuçlara ulaşılamamıştır (Yazıcıoğlu vd 1983).

Keçiboynuzunun karbonhidrat içeriğinin yüksek olması biyoteknolojik açıdan değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Dünya'da birçok ülkede yeterince değerlendirilemeyen çoğu tarımsal ürün, gıda işleyen fabrikaların atıkları ve yüksek karbonhidrat ve polisakkaritleri içeren atıklar fermentasyon yoluyla yeni ve değerli ürün üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok organik asit, vitamin, amino asit, alkol, antibiyotik ve antibodi gibi ekonomik değeri yüksek ürün fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Bu ürünlerin üretiminde saf kimyasallar kullanıldığı gibi içeriği uygun tarımsal ürünler veya atıklar da değerlendirilmektedir. Saf kimyasallarla üretimin çok pahalı olması ve ayrıca tarımsal ürünlerin organik atıklarının değerlendirilmesi gibi ekonomik ve çevreci yaklaşımlar alternatif olarak doğal yetişen ürünleri hammadde olarak kullanmaya olan ilgiyi artırmıştır. Bu amaçla şeker pancarı, melas, şeker kamışı ve mısır gibi birçok bitkisel ürün yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ürünlerden çok daha yüksek düzeyde şeker ve mineral madde içeren keçiboynuzu meyvesinin ve atıklarının söz konusu biyoteknolojik üretim amacıyla endüstri hammaddesi olarak değerlendirilmediği ve bilimsel çalışma yapılmadığı anlaşılmaktadır.

Uzun yıllardan beri fermentasyon yoluyla üretilen ürünler arasında **laktik asit ve etanol** geniş bir yer tutmaktadır. Özellikle de enerji kaynaklarının hızla tükenmesi bazı gelişmiş ülkeleri enerji üretiminde alternatif yollar aramaya teşvik etmiştir. Birçok ülke ucuz ve içeriği uygun materyalleri kullanarak etanol üretimine başlamıştır. Gıda endüstrisinden kimya endüstrisine kadar birçok alanda geniş kullanım alanına sahip etanol, son zamanlarda araç yakıtı olarak da belirli oranlarda fuel-oil ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Ayrıca Dünya’da birçok ülke etanolu gıda katkı maddesi, içecek üretimi ve bilimsel amaçlı çalışmalar vb. amaçlarla yüksek miktarlarda tüketmektedir.

Benzer bir şekilde, birçok gıda maddesinde koruyucu olarak kullanılması yanında, kimya endüstrisi, plastik sanayi ve bilimsel amaçlı olmak üzere yüksek miktarlarda tüketilen laktik asit fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Son zamanlarda bakteriler tarafından parçalanabilen polimer yapıya sahip bileşiklere dönüşebilmesi laktik asitten birçok yeni ürün üretilmesini cazip hale getirmiştir. Özellikle polimer yapısından dolayı petrol tabanlı ürünlerin yerine paketleme materyali niteliğindeki polilaktik asit (PLA) yapımında yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Endüstriye aktarılabilir sonuçların elde edilmesi ve elde edilen ürünlerin saflaştırılması ve ayrılması üzerine Dünya’da bazı büyük ticari firmalar ve devlet kurumları birçok araştırma gerçekleştirmekte ve üretilen söz konusu fermentasyon ürünleri saflaştırıldıktan sonra çok yüksek fiyatlarla satılmaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Keçiboynuzu Meyvesinin Özellikleri, Değerlendirme Yöntemleri ve Endüstriyel Olarak Önemi

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) Leguminosae familyasının Ceasalpinaceae alt familyasına dahil çok yıllık bir bitkidir ve Akdeniz ikliminin hakim olduğu bölgelerde yetişmektedir (Seçmen 1974, Seçmen 1975). Bu bitkinin anavatanı sınırları içinde Anadolu ve Kıbrıs'ın olduğu ve özellikle Akdeniz kıyı şeridinin doğu ve güney bölgelerindeki yarı kurak alanlarda geniş yetiştirme alanı bulunduğu bildirilmektedir (Maza vd 1989). Ayrıca Avustralya, Güney Afrika ve Amerika Birleşik Devletleri'nin Kaliforniya eyaletinde de az miktarda yetiştiği görülmüştür (Batlle ve Tous 1997). Ülkemizde ise Urla'dan (İzmir) Samandağ'a (Hatay) kadar olan 1,750 km'lik sahil şeridinde doğal olarak yetişmektedir. Keçiboynuzunun yetiştiği alan genellikle kıyıdan 1–2 km iç kısımlara kadar olan sahil şerididir. Bunun yanında Kozan'da (Çukurova) kıyıdan 90 km ve Mersin dolayında 25 km kadar iç kısımlarda da yetiştirme alanı bulunduğu bilinmektedir (Vardar vd 1980).

Dünya'da keçiboynuzunun yetiştiği toplam üretim alanı 103,147 ha civarında olmakla beraber, Avrupa'daki Akdeniz kıyı şeridinde bulunan ülkelerin toplam üretim alanı 100,000 ha dolayındadır. Türkiye' de ise 2,800 ha üretim alanı bulunmaktadır. Dünya üretiminin ise toplam 186,466 ton/yıl civarında olduğu tahmin edilmektedir. İspanya keçiboynuzu üretimi ve işlenmesi konusunda 72,000 ton/yıl kapasite ile öndedir ve bunu İtalya, Portekiz, Fas, Yunanistan, Kıbrıs, Türkiye, Cezayir ve diğer bazı ülkeler (Hırvatistan, Tunus, Malta, Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri, ve Güney Afrika) takip etmektedir. Keçiboynuzu araştırma-geliştirme ve kültüre alma yönüyle ihmal edilmiş bir üründür (Anonim 2009).

Keçiboynuzu meyvesi tüketim olgunluğuna ulaştığında %91–92 toplam kuru madde ve %62–67 toplam çözünür kuru madde içermekte olup, çözünür kuru maddenin önemli bir bölümünü sakaroz (%34–42), fruktoz (%10–12) ve glukoz (%7–10) oluşturmaktadır (Karkacier ve Artık 1995). Ham selüloz ve toplam mineral madde

miktarı sırasıyla %4.6–6.2 ve %2.23–2.42 arasında değişmekte ve mineral madde içinde potasyum en yüksek düzeyde bulunmaktadır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin kimyasal bileşimi (Ekşi ve Artık 1986, Karkacier ve Artık 1995)

Bileşim Ögesi	%
Toplam Kuru Madde	91–92
Toplam Şeker	62–67
İndirgen Şeker	13–18
Sakaroz	34–42
Fruktoz	10–12
Glukoz	7–10
Protein	4–6
Ham Selüloz	4.6–6.2
Ham Yağ	0.2–0.4
Pektik Madde	0.03–0.05
Toplam Kül	2–3
Toplam Asit (%SSA)	0.5–0.65

Ayrıca keçiboynuzu meyvesinin amino asit dağılımında en fazla Glutamik asit (12.14–12.38 g/100g), Alanin (11.15–11.39 g/100g) ve Aspartik asit (10.76–10.96 g/100g) bulunmaktadır (Artık ve Erbaş 1988).

Keçiboynuzunun yaklaşık %10'unu oluşturan çekirdeği “keçiboynuzu gamı” adı verilen bir katkı maddesi üretiminde kullanılmaktadır (Yazıcıoğlu vd 1983). Ayrıca keçiboynuzu, kakao gibi kullanılmak istenildiğinde meyvenin etli kısmı kavru olarak aroma kazandırıldıktan sonra öğütülmektedir. Elde edilen toz şeklindeki keçiboynuzu unu, kakao gibi şekerleme ve pasta üretiminde kullanılabilir. Ayrıca bu ürünün çikolata endüstrisinde kullanımının kafein ve theobromine içermemesi gibi avantajları olduğu da vurgulanmaktadır (Whiteside 1981, Craig ve Nguyen 1984, Yousif ve Alghzawi 2000). Keçiboynuzu unu %46 şeker, %7 protein ve az miktarlarda da mineral

madde içermektedir (Whiteside 1981). Ayrıca bu ürünün unlu mamuller dışında bazı içeceklerde ve dondurma üretiminde de kullanılabildiği bildirilmektedir (NAS 1979).

Keçiboynuzu gıda endüstrisinde doğrudan veya katkı maddesi olarak insan beslenmesinde kullanılmakla birlikte diğer endüstri kollarında da değerlendirilmektedir. Özellikle fiyatının yüksek olmaması ve yüksek miktarda şeker içermesi nedeniyle Akdeniz ülkelerinde pekmez ve alkollü içki üretiminde kullanılmakta (Merwin 1981) ve kalan posa da hayvan yemi rasyonlarına katılmaktadır (Yurdagel ve Teke 1985, Sahle vd 1992). Doğal haliyle preslenmesi mümkün olmayan keçiboynuzunun pekmeze işlenmesinde en uygun yöntemin su ile ekstraksiyon olduğu bir gerçektir. Keçiboynuzunun yarı mamul ve mamul gıda olarak değerlendirilmesi üzerine geniş araştırmalar yapılmamış olmasına rağmen ekstraksiyon koşulları ve elde edilen ekstraktın berraklaştırılması üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır (Roserio vd 1991, Karkacier ve Artık 1995, Karkacier vd 1995). Keçiboynuzu önemli düzeyde selüloz, mineral madde ve ham protein içermektedir (Karkacier ve Artık 1995).

Tek hücre organizmaları zengin karbonhidrat ve azot kaynağına sahip meyve ve sebzeleri, gıda fabrikaları ve tarımsal ürünlerin atıklarını kullanabilme yeteneğine sahiptir. Keçiboynuzu da uygun bileşiklerle zenginleştirilip fermente edildiğinde yüksek proteinli gıdaların oluşturulmasında kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca *Aspergillus niger* ve *Fusarium moniliforme* gibi kültür mikroorganizmaları için zengin karbonhidrat ve ham protein içeriği ile mükemmel bir substrat niteliğindedir (Imrie 1973, Sekeri-Pataryas vd 1973).

Keçiboynuzu ekstraktı birçok çalışmada etanol, laktik asit, sitrik asit vb. fermentasyon ürünlerinin üretilmesi amacıyla substrat olarak kullanılmıştır. Santos vd (2005) keçiboynuzu ekstraktını kullanarak dekstran ve fruktoz üretimi üzerine gerçekleştirdikleri bir çalışmada *Leuconostoc mesenteroides* mikroorganizmasını kullanmışlardır. Bunun yanında Roukas (1999) keçiboynuzu ekstraktından katı-yüzey fermentasyonu yoluyla sitrik asit üretimi üzerine yaptığı bir çalışmada, meyvenin sitrik asit üretimi için uygun bir substrat olduğunu bildirmiştir.

Bulut vd (2004) farklı karbon kaynakları kullanarak laktik asit üretimi üzerine yaptıkları bir çalışmada, keçiyoynuzu ekstraktını *Rhizopus oryzae* ile fermentasyona bırakmıştır. Çalışma sonuçları keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit üretimi için iyi bir kaynak olduğunu göstermiştir. Ayrıca Mendes vd (2007) keçiyoynuzu pulpunun hekzanoik asit üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

2.2. Fermentasyon Mikrobiyolojisi

Endüstriyel üretim çerçevesinde birçok maddeden biyodönüşümle yeni bileşiklerin oluşturulmasında mikroorganizmaların biyokimyasal reaksiyonlarından faydalanma anlamına da gelen fermentasyon teknolojisi çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadır (King ve Cheetham 1987). Fermentasyonun en önemli uygulama alanları;

- a) Mikrobiyel hücre (biomass) üretimi,
- b) Mikrobiyel enzim üretimi,
- c) Mikrobiyel metabolit üretimi,
- d) Fermentasyona eklenen bileşiklerin değişimi

olarak kabaca sınıflandırılabilir (Stanbury ve Whitaker 1984). Endüstriyel olarak üretilen fermentasyon ürünleri Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Mikroorganizmaları kullanarak metabolit üretme veya hücre gelişimi için kullanılacak olan fermentasyon ortamı uygun formda ve miktardaki tüm bileşikleri içermelidir. Bu amaçla laboratuarda mikroorganizmalar kullanılarak yapılan üretimlerde genellikle saf kimyasallar kullanılırken, ekonomik nedenlerden dolayı endüstriyel fermentasyonlarda ise farklı kompozisyonlardaki gıda atık maddeleri kullanılmaktadır (Brock 1984, Madigan ve Martinko 2006).

Çizelge 2.2. Endüstriyel olarak üretilen fermentasyon ürünleri (Smith 2004)

Sektör	Ürünler
<u>Kimya</u>	
Organik (Dökme)	Etanol, aseton, bütanol, organik asitler (sitrik asit, itakonik asit)
Organik (Saf)	Enzimler, parfümler, polimerler (çoğunlukla polisakkaritler)
İnorganik	Metallerle zenginleştirme, ayrıştırma
<u>Eczacılık</u>	Antibiyotikler Tanımlayıcı kimyasallar (enzimler, antibodiler) Enzim inhibitörleri, steroidler, aşılar
<u>Enerji</u>	Etanol Metan (Biyogaz) Biyokütle
<u>Gıda</u>	Süt ürünleri (peynir, yoğurt) İçecekler (alkollü içecekler, çay ve kahve) Ekmek mayası Gıda katkıları (antioksidanlar, renklendiriciler, lezzet vericiler) Mantar ürünleri, aminoasitler ve vitaminler Nişasta ürünleri, glukoz ve yüksek-fruktozlu şuruplar Proteinlerin fonksiyonel modifikasyonları ve pektinler
<u>Tarım</u>	Hayvan yemleri Veterinerlik aşılar Silaj ve kompost işlemleri Mikrobiyel pestisitler

2.3. Mikroorganizmalar İçin Gerekli Hammaddeler

Fermentasyonda kullanılan kültür ortamlarının hücre maddelerinin sentezi ve metabolik ürünlerin üretimine imkan verecek bütün elementleri içermesi gerekir. Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen laboratuvar çalışmalarında kültür ortamında kullanılan kimyasallar oldukça saf olmasına rağmen, endüstriyel ortamlarda ekonomik olması nedeniyle daha kompleks bileşikleri içeren maliyeti düşük substratlar kullanılmaktadır (Çizelge 2.3) Ancak bu tip ortamlarda mikroorganizma gelişimi ve fermentasyon ortamının kontrol altında tutulabilmesi amacıyla kültür ortamına kritik mineral ve elementlerden katkı yapılmalı, ön denemeler yapılarak biyolojik uyumluluk sağlanmalı ve ortamda ürünün oluşabilmesi yanında ürünün fermentasyon ortamından ayrılması gibi işlemler de göz önünde bulundurulmalıdır (Tunail 2009).

Çizelge 2.3. Fermentasyonda kullanılan yan ürünler (Smith 2004)

Tarımsal Yan Ürünler	Orman Yan Ürünleri	Endüstriyel Yan Ürünler
Saman	Odun atıklarının hidrolizatları	Melas
Küspe	Sülfüt pulp likörü	İçki fabrikası atıkları
Mısır koçanı	Kabuk, talaş, dal ve saplar	Peyniraltı suyu
Kahve, kakao ve hindistan cevizi kabukları	Kağıt atıkları ve selüloz	Gıda endüstrisinin sıvı atıkları (zeytin, palm yağı, patates, turuncgiller)
Meyve kabuk ve yaprakları	Lifler	Yıkama suları (mandıra, konserve fabrikası, meyve suyu fabrikası, fırın, şeker fabrikası)
Çay yaprakları		Balık atık suları ve atıkları
Ayçiçeği tablası		Et yan ürünleri
Pamuk atıkları		Evsel çöpler ve atıklar
Buğday kepeği		Lağım suyu
Pulp (domates, kahve, muz, ananas, turuncgiller, zeytin vb.)		Mezbaha atıkları
Hayvansal atıklar		

Canlı birer varlık olan mikroorganizmaların; canlılıklarını sürdürebilmeleri, istenilen biyodönüşümleri yapabilmeleri ve yeni ürünler oluşturabilmeleri için uygun yetiştirme şartlarına ihtiyaç vardır. Bu şartların başında mikroorganizmaların substrat istekleri gelir. Mikroorganizmalar kendilerini çevreleyen ortamdan besin maddelerini alabilmek ve metabolizma sonucu oluşturdukları primer veya sekonder metabolitlerini hücre dışına çıkarabilmek için de suya gereksinim duyarlar. Suda çözünmüş olarak aldıkları besin maddelerini hem enerji üretiminde hem de hücre organellerini (hücre duvarı, membran, ribozom, genom, sitoplazma) inşa etmek için makro moleküllerin (polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler, fosfolipitler, enzim ve koenzimler) sentezinde kullanırlar (Waites vd 2001, Tunail 2009).

Mikroorganizmalar, bulundukları doğal ortam koşullarına göre hücresel donanımlarını geliştirerek kendi fizyolojilerini yaratmışlar ve bulundukları yerlere adapte olmuşlardır. Dolayısıyla değişik mikroorganizma gruplarının ortamdan talep ettiği besinler ve koşullar farklıdır. Herhangi bir türün izole edilip kültüre alınmasında, türün beslenme tipine bağlı beslenme isteklerinin ve gelişme koşullarının bilinmesi büyük önem taşır. O nedenle öncelikle mikroorganizmalarda besin olarak alınan elementlerin hangi amaçlarla kullanıldığının, gelişme faktörlerinin hangi metabolizmalara hizmet ettiğinin ve temel beslenme tiplerinin incelenmesi gerekir (Ray ve Bhunia 2007, Smith 2004).

2.3.1. Besin olarak alınan elementler

Mikrobiyel beslenme, mikrobiyel fizyoloji yönünden monomerlerin desteği veya sağlanması ile ilgilidir. Hücreler, makromoleküller, su ve makromolekülleri oluşturan monomer adı verilen küçük birimlerden oluşurlar. Tüm bu hücreler için gerekli olan maddeler besin olarak adlandırılmaktadır. Farklı mikroorganizmaların farklı besin gereksinimleri vardır ve birinden diğerine spesifik olarak değişiklik gösterir ve tüm gereksinimleri aynı değildir. Bazı besinler büyük miktarlarda kullanılırken (makromoleküller) bazıları daha az veya eser miktarlarda kullanılır ki bunlar da mikrobeyinler olarak adlandırılırlar (Brock 1984, Madigan ve Martinko 2006). Hücre yapısı analiz edildiğinde; hücre kuru ağırlığının %95'in üzerinde az sayıda temel

elementlerden oluştuğu görülmüştür. Bunlar; karbon, oksijen, hidrojen, azot, kükürt, fosfor, potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, demir elementleridir ve bütün mikroorganizmalarda bulunur (Tunail 2009, El-Mansi 2007, Heritage 1999).

Çizelge 2.4. Bazı mikro elementlerin biyolojik işlevleri (Madigan ve Martinko 2006)

Element	Biyolojik işlevler
Cu	Mitokondriyal oksidaz'ın bileşeni
Co	Kobalaminin (Vitamin B ₁₂ 'nin) bileşeni
Mo	N ₂ fiksasyonunu gerçekleştiren Nitrogenaz'ın bileşeni
Se	Glutasyon peroksidaz'ın bileşenidir
Zn	Dehidrogenaz'ların kofaktörüdür
Mn	Arjinaz'ın, özellikle fosfat grubu taşıyan enzimlerin kofaktörüdür
Mg	Fotosentezde Su dehidrogenaz enziminin, fotosentezin kofaktörüdür
V	Nitrat redüktaz enziminin kofaktörüdür
Ni	Üreaz enziminin kofaktörüdür
Fe	Sitokromlarda ve Fe-S proteinlerinde elektron taşıyıcısıdır

Makro elementler olarak adlandırılan gruptan ilk dördü (C, O, H, ve N) tüm organizmalarda, diğer elementlerle kıyaslandığında daha büyük bir orana sahip olduğu görülmektedir (C: %50-60, O: %25-30, H: %8-10, N: %3-4). Bu dört element S ve P ile beraber karbonhidratları, lipidleri, proteinleri ve nükleik asitleri oluşturur. Makro elementlerden geri kalanlar mikroorganizma hücrelerinde katyonlar (K⁺, Na⁺, Ca⁺², Mg⁺², Fe⁺² ve Fe⁺³) halinde bulunurlar. Birçok enzimin katalitik etkisini maksimum düzeyde gösterebilmesi ortamdaki K⁺ iyonlarının varlığına bağlıdır. Ca⁺² iyonları spor oluşumu sırasında Ca-dipikolonat oluşturur ve sporların ısıya karşı dirençli olmalarında rol oynar. Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonları, elektron transport sisteminde (ETS) bulunan Fe-S proteinlerinin ve sitokrom enzimlerinin bileşenleridir ve oksidasyon ve redüksiyon olaylarında önemli görev üstlenirler. Mg⁺² iyonları Cyanobacter'lerin ve fototrofik bakterilerin anten pigmentlerinde ve fotoreaksiyon merkezlerinde bulunan klorofil a ve diğer bakteriyoklorofillerin yapısında yer alır, ayrıca ribozomların ve hücre membranının stabilizasyonunda rol oynar (Tunail 2009). Makro elementlerden ilk altısı (C, O, H,

N, S ve P) çoğu durumda besiyerine organik bileşikler (şeker, pepton, tripton vb.), fosfatlar, sülfatlar ve amonyum tuzları halinde katılır ve gram/litre (g/L) düzeyinde belirtilir. Majör elementler de denilen bu temel elementlere karşılık, diğer makro elementler miligram/litre (mg/L) düzeyinde gereksinilen elementler olduğundan minör elementler olarak adlandırılır. Birçok bakteri makro elementlerden sodyuma (Na^+) fazlaca ihtiyaç göstermez. Buna karşılık başta halofiller olmak üzere tuzlalarda, tuz göllerinde ve okyanuslarda yaşayan bakteriler, Na^+ iyonlarını yüksek konsantrasyonda talep eder (Madigan ve Martinko 2006, Glazer ve Nikaido 2007).

Bütün mikroorganizmalar mikro elementlerden (eser elementler) birkaçına veya daha fazlasına ihtiyaç duyarlar (Çizelge 2.4). Farklı metabolik olaylarda farklı mikro elementler önem kazanır. Mangan, molibden, çinko, bakır, kobalt, nikel, vanadyum, bor, klor, selenit, silisyum, volfram olarak sıralanabilecek mikro elementlerden; ilk altısı daha fazla sayıda mikroorganizma tarafından talep edilir. Mikro elementlerin çoğu, enzimlerin bileşenleri veya kofaktörleri olarak iş görür, enzimatik reaksiyonlarda katalitik aktivitenin üst düzeyde sürmesine yardımcı olur veya enzim protein yapılarının korunmasını sağlar. Makro elementlerin aksine eser elementler gelişme ortamında mikrogram/litre ($\mu\text{g/L}$) düzeyinde gereklidir. Birçok mikro elementin $\mu\text{g/L}$ düzeyindeki konsantrasyonları dahi toksik etkilidir (Tunail 2009, Madigan ve Martinko 2006).

2.3.2. Karbon, hidrojen ve oksijen kaynakları

Besin maddeleri olarak karbonun, hidrojenin ve oksijenin bir arada bulunduğu, bir diğer ifade ile karbonun indirgenmiş formda yer aldığı organik bileşikler (selüloz, nişasta, şekerler, organik asitler) birçok mikroorganizmanın tercih ettiği karbon kaynaklarıdır. Mikroorganizma karbonu, yapısındaki makro moleküllerin (murein, diğer polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler) iskeletlerinde kullanır. Organik moleküller doğal ortamlarda diğer ölü organizmaların degradasyonu sonucu oluşur. Karbon ihtiyacını böyle organik bileşiklerden sağlayan mikroorganizmalar C-heterotrof olarak adlandırılır. C-heterotrof mikroorganizmaların birçoğu organik bileşikleri aynı zamanda enerji kaynağı olarak da kullanır. Buna karşılık bazı mikroorganizmalar ihtiyaçları olan

karbonu yalnızca havanın CO₂'ini redükte ederek sağlar. CO₂'in indirgenerek kullanılabilmesi çok fazla enerjiye ihtiyaç gösteren ribuloz-bi-fosfat (RuBP) yolu (Calvin-Bassham döngüsü) üzerinden gerçekleşir. Bu döngüyü kullanarak karbon gereksinimi için yalnızca CO₂'ten yararlanan mikroorganizmalar C-ototrof olarak tanımlanır. Karbonhidratların parçalanma ürünleri olan şekerler, özellikle de glukoz çok sayıda mikroorganizmanın öncelikli tercihidir (Madigan ve Martinko 2006, Brown 2003, Heritage 1996).

Mikroorganizmaların en çok kullandıkları karbon kaynakları karbonhidratlardır. Ekonomik sebeplerden dolayı saf glukoz ve sakaroz endüstriyel fermentasyonlarda kontrol örneği olarak kullanılması dışında tercih edilmez. Bu amaçla mısır veya patatesten elde edilen nişasta, şeker endüstrisinin yan ürünü melas, çeşitli gıda ve tarımsal ürünlerin atıkları karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2.3) (Brown 2003).

Birçok maya, küf mantarı ve *Actinomycetes* cinsi için malt ekstraktları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında sülfite likörleri, selüloz (saman, mısır sap ve koçanları, şekerpancarı ve şeker kaçı kışpeleri), bitkisel yağlar, metil alkol, etil alkol, alkanlar ve fermentasyon ürünlerinin ortamdan alınmasından sonra geriye kalan pentozlar, organik asitler ve ölü hücreleri içeren medya da karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Tunail 2009, Brown 2003).

Organik birçok bileşimin, suyun ve CO₂'in içinde her zaman oksijen bulunur ve mikroorganizma tarafından kullanılır. Ancak mikroorganizmaların büyük bir bölümü molekül haldeki O₂'ye ihtiyaç duyarlar. Oksijene olan ihtiyacı mikroorganizmanın enerji kazanma şeklini belirler. Enerjilerini oksidatif fosforilasyonla (aerobik solunumla) kazananlar O₂'ye şiddetle gereksinirken, fermentasyon yolu ile enerji kazanan fermentatifler veya anaerobik solunum yapan mikroorganizmalar O₂'siz olarak yaşamlarını sürdürürler (Ratledge ve Kristiansen 2006, Nelson ve Cox 2008).

2.3.3. Azot, kükürt ve fosfor kaynakları

Hücrelerdeki karbondan sonra en çok bulunan element azotdur. Bütün mikroorganizmalarda hücre içindeki önemli moleküllerde N, S ve P bulunur. Bunlara genellikle, azot (nitrojen) ve kükürtte (sülfür) olduğu gibi, indirgenmiş formda rastlanır. Amino ve imino grupları ile sülfidril grupları birçok molekülde yer alır. P ise genellikle fosfat formunda moleküle dahil olur. Bu elementler, hücreyi çevreleyen ortamda birçok karbon bileşiği içinde yer alsa da hücre genellikle bu elementleri anorganik kaynaklardan sağlar, yalnızca azotu amonyum halinde almayı tercih eder. Bunun yanında azot gazı (N₂) sadece azot fiske edici bakteriler tarafından kullanılmaktadır (Brock 1984, Madigan ve Martinko 2006). Fermentasyon işlemlerinde azot kaynağı olarak amonyum tuzları, üre ve gaz halindeki amonyak kullanılır. Yine bunun yanında mısır nişastasından elde edilen likör, maya ekskraktları, protein hidrolizatları ve soya unu azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarda azot; aminoasitlerde, pürin ve pirimidin bazlarında, bazı karbonhidratlarda (N-asetilglukozamin, N-asetilmuramik asit), fosfolipitlerde (lesitin, kefalın) ve diğer moleküllerde bulunur. Amonyumun bulunmadığı durumlarda nitrat veya nitritlerin dönüştürülmesi çoğu mikroorganizma tarafından gerçekleştirilir.

Sülfür organizmada birçok formda bulunur ve doğadaki birçok kimyasal değişimlerde rol alır. Ayrıca sistein ve metiyonin amino asidinin yapısındaki rolü açısından önemli bir moleküldür. Bunun yanında tiamin, biyotin ve lipoik asit gibi vitaminler, Koenzim A ve Fe-S proteinlerinde de bulunur. Hücredeki sülfürün çoğu sülfat ve sülfitin yanında inorganik kaynaklardan gelir (Madigan ve Martinko 2006, Nelson ve Cox 2008). Hemen hemen bütün bakteriler ve funguslar sülfatı kükürt kaynağı olarak kullanabilirler.

Fosfor doğada organik ve inorganik fosfat durumunda bulunur ve hücrede öncelikli olarak nükleik asitler ve fosfolipidlerin sentezi için gereklidir. Mikroorganizmalar fosfor ihtiyaçları için daima anorganik fosfattan yararlanırlar (Madigan ve Martinko 2006).

2.3.4. Diğer besin kaynakları (K, Mg, Ca, Na, Fe)

Potasyum tüm organizmalar için gerekli bir elementtir ve enzimlerin bazılarında özellikle protein sentezine katılanların enzim aktivitesinde rol almaktadır. Magnezyum ribozomun, membranların ve nükleik asitlerin fonksiyonlarını düzenler ve birçok enzimin aktivitesi için gereklidir (Madigan ve Martinko 2006, Nelson ve Cox 2008).

Kalsiyum birçok organizma için esansiyel değildir ancak hücre duvarının stabilize olmasına yardım eder ve endosporların sıcaklık stabilitesinde anahtar rol oynar (Tunail 2009).

Sodyum bazı mikroorganizmalar için gerekli bir elementtir. Örneğin, deniz suyu yüksek sodyum içeriğine sahiptir ve denize ait mikroorganizmalar genellikle gelişim için sodyumu kullanır. Temiz sulardaki türlerde sodyum olmadığı zaman da gelişim gerçekleşir (Madigan ve Martinko 2006, Nelson ve Cox 2008).

Demir hücresel solunumda başlıca role sahiptir ve elektron taşınmasına katılan demir-sülfür proteinleri ve sitokromların anahtar bileşiği olarak rol oynar (Brock 1984).

2.3.5. Gelişme faktörleri

Birçok mikroorganizmanın gelişimi için mineral madde, karbon ve enerji kaynaklarının dışında bazı tamamlayıcı maddeler veya gelişme faktörleri gerekir. Vitaminler, aminoasitler, pürin ve pirimidinler alınması zorunlu maddeler olabilir. Vitaminler, enzimlerin katalitik etkilerinde rol oynayan koenzim veya prostetik grupların yapılarında yer alır. Aminoasitler proteinlerin, pürin ve pirimidin bazıları ise nükleik asitlerin biyosentezinde kullanılır. Ancak tüm mikroorganizmaların bu maddelere (bir veya birkaçına) mutlak ihtiyaç duyduğu düşünülmemelidir (Tunail 2009).

Molekül büyüklükleri oldukça küçük olan vitaminlerin çok az miktarları mikroorganizmaların iyi bir gelişim göstermesi için yeterli olmaktadır. Vitamin

çözeltileri de eser element çözeltileri gibi derişik ana çözeltili halinde hazırlanır (Tunail 2009).

2.4. Mikroorganizmalarda Beslenme Tipleri

Bütün mikroorganizmalar gelişmeleri ve üremeleri için başlıca; enerji kaynağına, hidrojen veya elektron vericilerine (donörlerine) ve C asimilasyonu için karbon kaynağına gereksinirler. Mikroorganizmaların beslenme tipleri de bu üç temel ihtiyaç dikkate alınarak belirlenmiştir. Tüm mikroorganizmalar enerjilerini iki temel yolla kazanabilir. *Cyanobacter*'ler ve diğer fotosentez yapmaya donanımlı bakteriler güneş ışığını kullanarak enerji sağlarlar ve **fotoğraf** olarak tanımlanırlar. Bunun dışında kalan diğer mikroorganizmalar enerjilerini kimyasal maddelerin oksidasyonu ile kazanırlar. Kimyasal enerjiden yararlanan bu grup **kemotroftur** (Madigan ve Martinko 2006, Heritage vd 1999, Tunail 2009).

Mikroorganizmanın karbon kaynağı da organik moleküller veya anorganik CO₂ olabilir. Eğer prensip olarak biyosentez yollarında (anabolizmada) karbon kaynağı yalnızca CO₂ ise organizma **ototrof** özelliktedir. Aksine organik bileşiklerdeki karbondan yararlanılıyorsa organizma **heterotrof**'tur. Ayrıca her mikroorganizma başlıca beslenme tiplerinden birine dâhil olsa da içlerinden bazıları fevkalade bir esnekliğe sahiptir. Değişen çevre koşullarında farklı bir metabolizmaya uyum sağlayabilir. Bazı beslenme tiplerine mikroorganizmaların bir kısmı zorunlu bağlı oldukları halde (**obligat**) kimisi de olumsuz koşulda bir başka beslenme tipine geçme kabiliyetindedir (**fakültatif**) (Madigan ve Martinko 2006, Heritage vd 1999).

2.5. Fermentasyon Yöntemleri

2.5.1. Kesikli fermentasyon

Bu sistemde ortamda belirli miktar besin kaynağı vardır ve sistem sadece bunu kullanarak fermentasyonu tamamlar. Bu nedenle kapalı kültür olarak da tanımlanır. Fermentasyon başlangıç basamağı olan inokülasyon safhasından sonra belli bir süre mikroorganizmanın büyümesinde bariz bir gelişme gözlenmez. Günümüzde alkol fermentasyonu halen yaygın olarak klasik kesikli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Karbonhidratlardan etil alkol üretimi bu amaçla en çok kullanılan metottur. Kesikli proseslerin düşük yatırım maliyetine ilave olarak proses kontrolünün de basit olması bu prosesin avantajıdır. Kesikli fermentasyon kullanılan endüstriyel operasyonlarda pH 4.5, sıcaklık 20-30°C arasındadır. Fermentasyon ortamında diğer mikroorganizmaların oluşumu, pH düşmesi ve en önemli olarak da etil alkolün oluşumuyla üretim engellenir (Doran 1995, Shuler ve Kargi 2008, Stanbury vd 1995).

2.5.2. Sürekli fermentasyon

Statik (durgun) kültürde besiyerinde; giderek daha fazla değişimlerin olduğu, substrat konsantrasyonunda düşüş meydana gelirken, mikrobiyel metabolitlerin de ortamda birikerek gelişmeyi sınırlandırdığı bilinmektedir. Oysa hem fizyolojik araştırmalarda hem de endüstriyel çalışmalarda kültür popülasyonunun hep logaritmik gelişme döneminde tutularak sabit bir hız ile gelişme göstermesi arzullanır. Statik kültürde, kültür ortamına taze, steril besiyeri ilave edilmediği gibi zararlı metabolik atıkların da ortamdan uzaklaştırılması söz konusu değildir. Bu nedenle eksponensiyel gelişme fazı mikroorganizmanın generasyon süresine bağlı olarak birkaç generasyon devam ettikten sonra durma fazına geçer. Burada en fazla yapılabilecek işlem, basit bir şekilde eksponensiyel fazdaki kültürün tekrar taze steril aynı besiyerine inoküle edilmesidir. Kısa süreli tekrarlanan inokülasyonlar, sürekli kültür koşullarına yaklaşmak amacıyla, her laboratuarda sıkça kullanılır. Oysa mikroorganizmaların; kapalı bir sistemde üretilmeleri (durgun kültür) yerine akan bir sistemde, hücrelerin sürekli logaritmik gelişme fazında tutularak, sabit bir gelişme hızıyla geliştirilmeleri

mümkündür (Tunail 2009). **Düzenli üreme durumu** da denen **sürekli sistemde** kültür hacmi ve hücre yoğunluğu sabit tutulur. Kültür kabına bir taraftan kesintisiz olarak taze steril besiyeri beslemesi yapılırken kültür kabından da sürekli şekilde kullanılmış besiyeri, içerdiği hücrelerle birlikte uzaklaştırılır ve bir toplama kabına alınır. Kültür kabında kültür hacminin ve hücre yoğunluğunun değişmeden kalması, besiyerinin verilmiş hızı ile kullanılmış besiyerinin ayrışma hızının aynı olmasıyla sağlanır. Kültür kabında belli bir hızla eksponensiyel gelişen hücreler ile kültür kabından kullanılmış besiyeri içinde uzaklaştırılan hücrelerin (hücre kaybının) dengede tutulması şarttır (Doran 1995, Shuler ve Kargi 2008, Stanbury vd 1995).

2.5.3. Kesikli reaktör kinetiği

Bir miktar mikroorganizma uygun şekilde tasarımı yapılan bir besi ortamına eklenince ürer. Üreme, biyokütlenin ağırlığı, hacmi, sayısı ve azot içeriği vb. gibi ölçülebilen bir özelliği ile izlenir. Besi ortamında bulunan ve üremeyi sınırlayan besinlere “substrat” denir. Fermentasyonda üreme, substrat tüketimi ve ürün oluşum kinetiklerinin matematiksel modellenmesi veri analizlerini kolaylaştırır ve endüstriyel fermentasyon proseslerinde karşılaşılabilecek problemlerin çözümüne temel teşkil eder. Kinetik modellemeyle sağlanacak değişken ve parametreler reaktör tasarımında kullanılır. Besi ortamında gelişmenin ve üremenin gerçekleştiği tepkime kaplarına genel olarak “biyolojik reaktörler” veya “biyoreaktörler”; biyokütle ve ürün üretiminde kullanılanlara da “fermentör” denir (Doran 1995, Shuler ve Kargi 2008, Stanbury vd 1995).

Günümüzde gelişmiş ülkelerde bilgisayar aracılığı ile kontrol edilen çok iyi geliştirilmiş fermentörlerden yararlanılarak fermentasyon araştırmaları yürütülmekte ve bu çalışmalar teknolojiye aktarılmaktadır (Schügerl 1997). Fermentörler;

- Kesikli
- Sürekli-beslemeli
- Sürekli karıştırılmalı
- Borusal akım reaktörleri, tipinde olabilir.

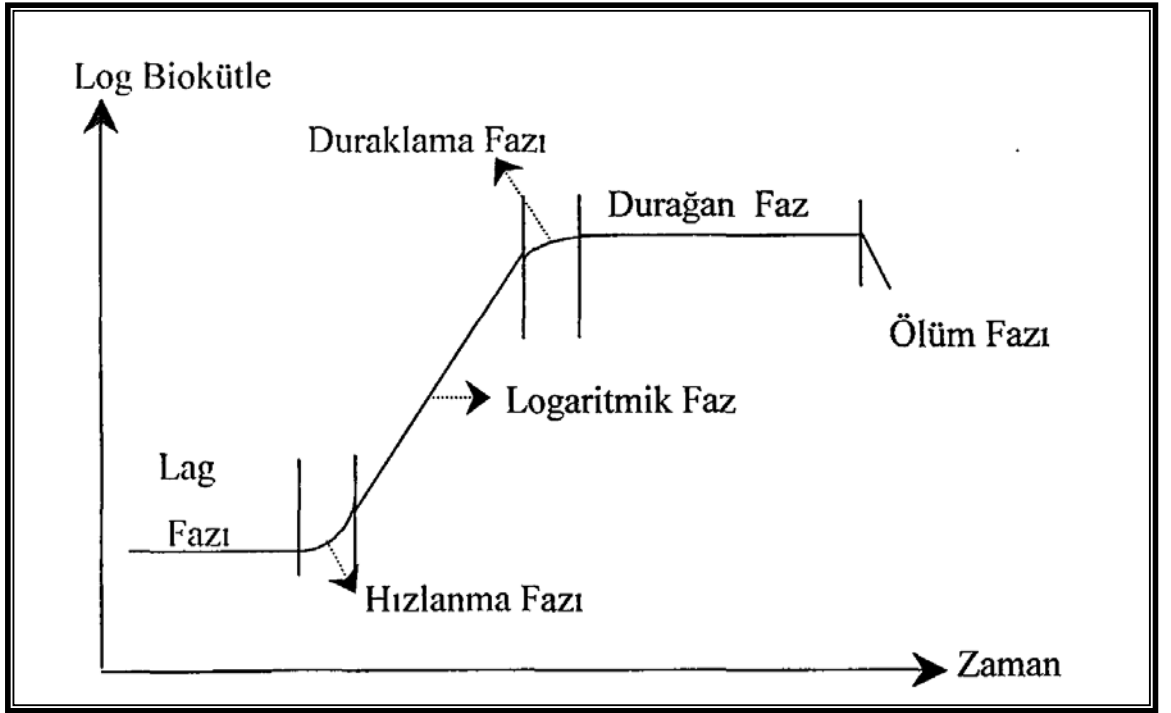
2.6. Mikroorganizmaların Yaşama Evreleri ve Üreme Kinetiği

Mikroorganizmaların gerekli besin ve uygun koşulları içeren besi ortamında gelişme ve üremelerine kültürlenme denir. Kesikli kültür sistemlerinde üreme kapalı bir sistem veya kapalı bir çevrede gerçekleşir. Kesikli kültür sistemleri uygun üreme ortamı içeren bir kap veya fermentör olup optimum pH ve sıcaklık koşullarında çalıştırılırlar. Üreme, ortamdaki gerekli bileşenlerin tükenmesi veya toksik ürünlerin birikimi, pH değişimi gibi değişiklikler gözlenene kadar devam eder (Blanch ve Clark 1997).

Tek bir mikroorganizmanın gelişmesi söz konusu olduğunda, canlı hücrenin kütle artışı anlaşılır. Bu kavram, tek bir mikroorganizma hücresi için büyüme ile de tanımlanabilir. Mikrobiyolojide gelişme (growth) denildiğinde ise kültürün (popülasyonun) sayıya ya da kütlece artışı anlaşılır. İkiye bölünerek çoğalan bakterilerde normal boyuttaki bir hücre ikiye bölünmeden önce kütlesini iki katına çıkarır, bölünmenin ardından iki adet yaklaşık aynı büyüklükte iki genç kardeş hücre oluşur. Genç hücreler çok kısa bir süre sonra ata hücrenin bölünmeden önceki boyutu ile aynı büyüklüğe gelirler. Buradan anlaşılacağı üzere bir hücrede kütle artışı iki katına ulaştığında, bir anlamda hücre sayısı da ikiye katlanmıştır. O halde bakteriler gibi ikiye bölünerek çoğalan mikroorganizmalarda gelişmeyi hücre sayısının artışıyla ifade etmek, kütle artışıyla ifade etmekle aynı anlama gelmektedir. Maya ve küflerde ise tomurcuklanma, sporlanma gibi farklı çoğalma şekilleri vardır. Bu çoğalma şekillerinde kütle artışı ile sayısal artış orantılı değildir. Örneğin; funguslar gibi hücre veya hif sitoplazmalarında birden fazla çekirdek (nükleus) içeren **senositik** karakterli mikroorganizmalarda, tekrarlanan çekirdek bölünmelerine hücre bölünmeleri eşlik etmez. Dolayısıyla kütle artışı ile hücre sayısı artışını ilişkilendirmek olanaksızdır. Fungus gelişmesinden anlaşılan hücrelerin (misellerin) kütle artışıdır. Tek hücreli mikroorganizmaların boyutları çok küçük olduğundan tek bir hücrenin büyümesinin saptanması çok zordur. O nedenle gelişme (ölçülebilecek değer) olarak, popülasyondaki sayısal veya kütle artışı dikkate alınır (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

2.6.1. Gelişme eğrisi (kurvesi)

Kapalı bir sistemde; örneğin sıvı besiyeri içeren erlenmayer kabına inoküle edilen bir bakteri kültüründe, yeterli koşullar sağlanması durumunda, hücreler gelişmelerini sürdürürler. Ortama yeni besin maddeleri verilmeksizin ve zamanla biriken bakteriyel metabolitler uzaklaştırılmaksızın gelişmesini sürdüren kültüre **durgun (statik veya batch) kültür** adı verilir. İlerleyen zamanla birlikte birçok faktör gelişmeyi sınırlandırıp durma noktasına getirir. Mikroorganizma gelişmesi için hazırlanan şartların bozulması sonucunda hücreler ölmeye başlar. Hepsini ölmese de bakteri sayısı önemli düzeyde azalır. İkiye bölünerek üreyen bakteri popülasyonunda (statik kültürde) inkübasyon süresince belli saat aralıkları ile alınan örneklerde hücre sayıları belirlenir, bu sayıların logaritmaları alınır ve zamana karşı grafik haline getirilirse sigmoid forma yakın bir gelişme eğrisi (kurvesi) elde edilir. Eğri üzerinde sırasıyla, lag fazı (latent veya gizil dönem, adaptasyon dönemi), log fazı (logaritmik veya eksponensiyel üreme dönemi), durma fazı ve ölme fazı olmak üzere dört farklı evre ayırt edilir (Şekil 2.1) (Madigan ve Martinko 2006, Waites vd 2001).



Şekil 2.1. Sıvı kültür fermentasyonunda büyüme eğrisi (Shuler ve Kargi 2008)

Mikroorganizmaların üreme hızı genel olarak **Monod eşitliği** ile ifade edilir:

$$dx/dt = \mu x \quad (2.1)$$

μ : Spesifik üreme hızı

x : Mikroorganizma konsantrasyonu

dx/dt : Üreme hızı

2.6.2. Latent veya gizil dönem (Lag fazı)

Mikrobiyel bir popülasyon yeni bir ortama inoküle edildiği zaman, gelişme genellikle sadece lag fazı adı verilen bir zaman periyodundan sonra başlar. Diğer bir ifadeyle hücre kütlesinin ve sayısının artışı belli bir dönemden sonra başlar. Hücrelerin ortama adaptasyonu için gerekli olan bu periyoda **lag fazı** denir. Lag fazının süresi gelişme şartları ve kültürün geçmişine, mikroorganizmanın fizyolojik kondisyonuna ve inoküle edildiği besiyerinin doğasına bağlı olarak değişir. Mikroorganizmanın yaşı, hasarlı olup olmaması, daha önce geliştirildiği ortam veya saklandığı sıcaklık derecesi (dondurulmuş kültür) lag fazı süresine etken faktörlerdir. Bakteri durgun metabolizmaya geçerken ATP'lerini tüketmiş, ribozomlarını kaybetmiş, gerekli enzimleri henüz sentezleyememiş durumda olabilir. Hücreler tüm eksikliklerini tamamlayıp DNA'larını replike edebilir duruma geldiklerinde lag fazı da sona erer. Lag fazının süresini kısaltmak ve hatta tamamen ortadan kaldırmak araştırmacının elindedir. İnokülasyon öncesi, inokülüm olarak kullanılacak kültür birkaç kez aynı besiyerinde aktifleştirilir ve inokülasyon eksponensiyel fazdaki hücrelerle yapılırsa lag fazına ihtiyaç kalmadan veya kısa sürede logaritmik faza geçilir (Madigan ve Martinko 2006, Waites vd 2001, Tunail 2009).

Lag fazında üreme gerçekleşmediği için;

$$\mu = 0 ; dx/dt = 0 \quad (2.2)$$

olarak ifade edilir.

2.6.3.Ekspansiyonel dönem (Log fazı)

Bu dönemde hücreler maksimal hız ile çoğalır ve gelişirler. Toplam popülasyonda canlı hücrelerdeki maddeler hızla artış gösterdiğinden mikrobiyel gelişme çeşitli yöntemlerle izlenebilir. Mikrobiyel gelişme denilince bakteri hücre sayısının veya bakteri hücre kütlelerinin (bakteri sayısı + absorpsiyon) artışı anlaşılır. Ekspansiyonel gelişme döneminde bakterilerin bölünme (hücre sayısını ikiye katlama) hızı ve gelişme (hücre kütlelerini ikiye katlama) hızı sabittir. Aslında inokülasyondan sonra bazı bakteriler çok hızlı bölünürler, çok hızlı bölünen hücreler çok küçüktür ve de kültürün bölünme hızı, kütleleri iki katına çıkarma hızının önüne geçebilir. Ancak gelişmenin ilerleyen evrelerinde hücre kütle artışının hızı, hücre sayısındaki artışın önüne geçer. Bu anlamda hücre sayısı ile hücre kütlesi arasında fark olduğu söylenebilir. Ancak, gelişme fazı topluca incelendiğinde hücre sayısındaki artış ile kütledeki artışın ispatlanabilir şekilde aynı olduğu görülür. Ekspansiyonel dönemde; genelde kültürün “**standart hücreler**” den oluştuğu, popülasyonunun “**dengeli gelişme**” (bölünme ve kütleli artış) gösterdiği kabul edilir, dolayısıyla sayısal artış ile kütleli artışın aynı olduğu varsayılır. Denemeler ekspansiyonel fazda; hücre sayısında, hücredeki protein miktarında ve kuru maddedeki artışın aynı hızla olduğunu göstermiştir. O nedenle popülasyondaki gelişim, hücre sayısı belirlenerek veya protein miktarı ve kuru maddedeki artış tayin edilerek de izlenebilir. Ayrıca bu fazda gelişmenin takibi, artan bakteri yoğunluğunun (optik dansite, OD) fotometrede izlenmesi ve ekstinksiyon (absorbans) değerlerinin ölçülmesiyle de mümkündür (Madigan ve Martinko 2006, Waites vd 2001, Tunail 2009).

Ekspansiyonel gelişme döneminde inkübasyon zamanına karşı taşınan hücre sayılarının logaritmik değerleri düz bir çizgi halinde yükseliş gösterir. Statik kültürde logaritmik fazda substrat konsantrasyonu giderek azalmakta, hücre yoğunluğu artmakta ve metabolik son ürünler yavaş yavaş birikmektedir. Bununla beraber gelişme kısmen sabit bir hızla seyredir. O nedenle hücrelerin fizyolojik ve kimyasal özelliklerinin aynı olduğu, generasyon süresinin sabit bulunduğu bu evre, kültürün gelişme hızının hesaplanması için en uygun evredir. Ayrıca pH, redoks potansiyeli, sıcaklık, havalandırma gibi ortam faktörlerinin incelenmesinde veya değişik substratların

mikroorganizma tarafından kullanılabilirliğinin araştırılmasında, ya da metabolik yolların aydınlatılması ve enzim kinetiği çalışmalarında gerekli enzimlerin izolasyonları için ekponensiyel evreden ve bu evre sonunda hasat edilen hücre miktarından yararlanılır (Madigan ve Martinko 2006, Waites vd 2001, Tunail 2009, Shuler ve Kargi 2008).

Logaritmik evrede biyokütle artış hızı dx/dt , mikroorganizma konsantrasyonu x ile orantılıdır. Buna göre logaritmik üreme hızı;

$$dx/dt = \mu x \quad (2.3)$$

eşitliği ile gösterilirken birinci dereceden bir reaksiyon eşitliği oluşturur. μ ; spesifik üreme hızı olup eşitlik 2.3'den çözülürse

$$\mu = 1/x (dx/dt) \quad (2.4)$$

2.4 nolu eşitlikte görüldüğü gibi, birim konsantrasyondaki biyokütle fraksiyonel artış hızını verir. Birimi zaman⁻¹ dir. Eşitlik 2.1'in

$$t = 0 \text{ için } x=x_0 \text{ ve } t=t \text{ için } x=x$$

sınır şartları kullanılarak integrali alınırsa;

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \mu \int_0^t dt \quad (2.5)$$

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (2.6)$$

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (2.7)$$

2.6 nolu eşitlik elde edilir. Burada x_0 , başlangıçta ($t=0$ anında) kültür ortamına aşılanan mikroorganizma konsantrasyonu, x ise herhangi bir t ($t=t$) anındaki mikroorganizma konsantrasyonudur. 2.6 nolu eşitlik bir doğru denklemi olup ordinatı kesme noktası x_0 , eğim ise μ 'yü verir. Logaritmik fazda besin maddeleri azalırken biyokütlede artış görülür, dolayısıyla ürün miktarında da artış olur.

2.6.4. Durma fazı

Eksponensiyel gelişme fazının sonunda bakteri kültürlerinin ulaştığı maksimal sayı genellikle 10^9 hücre/mL'dir. *Protozoa* ve algler ise bu sayıya ulaşamazlar ve genel olarak 10^6 hücre/mL düzeyine kadar gelişirler. Bu maksimal değerlerden sonra artık hücrelerin sayısal veya kütsel artışları durur. Mikrobiyel popülasyonun durma fazına girmesi ve durma fazının sürmesi gelişme eğrisinde yatay ve oldukça düz seyreden bir çizgi ile anlaşılır. Gelişmenin duraklamasına çeşitli faktörler etki eder. Öncelikle besiyerinde besin maddelerinin derişimi azalmıştır. Bu durum popülasyonun gelişmesinin iyice yavaşlamasına neden olur. Aerobik mikroorganizmalar oksijen yetersizliği ile ağır ve sınırlı bir gelişme gösterirler. Çünkü çözünürlüğü fazla olmayan oksijenin besiyerinde hızla tükenmesi gelişmeyi yavaşlatır. Statik kültürde sadece besiyerinin yüzeyindeki oksijen miktarı hâlâ yüzeydeki mikroorganizmaların gelişmesine olanak sağlayacak düzeydedir (Tunail 2009, Shuler ve Kargi 2008).

Diğer taraftan metabolitler gelişmeyi engeller. En yaygın örneklerden birisi; *Lactococcus*'lerin karbonhidrat kaynaklarını fermente ederek laktik asit ve diğer organik asitleri oluşturmaları ve geliştirdikleri asitlikle kendi gelişimlerini inhibe etmeleridir. Diğer birçok fermentasyon yapan anaerob bakteri de çeşitli toksik maddeleri oluşturur. Statik kültürlerde metabolitlerin uzaklaştırılması mümkün olmadığından, duyarlı hücreler ölürler. Ancak durma fazında hâlâ popülasyonun bir kısmı tarafından depo maddeleri kullanılarak, ribozomların bir bölümü parçalanmış olsa da, enzimler sentezlenmeye devam eder. Bu fazda olumsuz koşullara duyarlı hücreler hızla ölürken, daha dayanıklı olanlar depo maddelerini ve proteinleri kullanarak **endogen solunum** yaparlar ve yaşamlarını sürdürebilecek kadar az bir enerji sağlayıp canlı kalırlar. Bu

fazda hücrelerin bölünmesi ile hücre ölümü arasında öyle bir denge kurulmuştur ki toplam mikroorganizma sayısı uzunca bir süre değişmeden sabit kalır (Madigan ve Martinko 2006).

Mikroorganizmaların sentezlendiği sekonder metabolitler endüstriyel açıdan önem taşır. Bu metabolitler özellikle küllerde beslenme ve gelişme fazı olan **tropofazın** sonuna doğru veya metabolit üretim fazı (durma fazı) olan **idiofaz**'ın başlangıcında birikmektedir. Bu metabolitlerden antibiyotikler; gerek fungusların gerekse bakterilerin oluşturduğu, sağlık üzerinde olumlu etkiye sahip tıp ve veterinerlikte hastalıkların tedavisinde kullanılan çok önemli bir madde grubudur. İdiofazda mikroorganizmalar artık gelişmeseler de ilave edilen substratları katabolize ederek, biyosentez yollarının ön kademelerinde sentezlemiş oldukları ara metabolitleri son ürüne çevirebilir. Biyoteknolojik çalışmalarda sekonder metabolitlerin araştırılmasında idiofaz gelişme fazından daha fazla önem taşımaktadır (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009, Shuler ve Kargi 2008).

Durma fazında ulaşılan toplam bakteri kütlesi **mahsul (hasılat, ürün, randıman)** olarak tanımlanır. Mahsul üretilen bakterinin türüne, kullanılan besin maddelerine ve kültür koşullarına bağlı olarak değişik miktarlarda olabilmektedir.

Bu evrede;

$$dx/dt = 0$$

$$\ln (x/x_0) = \text{Sabit}$$

Durağan fazda çoğu zaman $x = x_{\max}$ olduğu kabul edilir.

2.6.5. Ölme fazı

Mikroorganizmanın içinde bulunduğu ortam, artık besin maddelerini içermiyor ve metabolik atıklar da yüksek derişimlere ulaşıyorsa o takdirde besiyeri zararlı bir çevreye dönüşmüştür. Bu fazda canlı hücre sayısında oldukça belirgin bir azalma

meydana gelir. Hücrelerin bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki denge hücre ölümünün lehine bozulur. Eksponensiyel fazdaki gibi ölüm fazında da hücre sayısında logaritmik bir değişim olur. Bu fazda saptanan canlı hücre sayılarının logaritmik değerleri grafiğe taşındığında daha az eğimli bir doğrunun ölüm fazının karakteristiği olarak ortaya çıktığı görülür. Çoğu mikroorganizma logaritmik ölüm gösterse de popülasyonda belirgin bir düşüşten sonra ölüm hızının biraz yavaşladığı dikkat çekmektedir. Bunun nedeni bütün kötü koşullara karşın hâlâ ölümden kurtulabilen dirençli hücrelerin varlığıdır. Ölme fazının sonunda bile buradan taze besiyerine inokülasyon yolu ile kültürü bu dirençli bakteriler sayesinde canlandırmak mümkündür. Ancak hiçbir üreme (gelişme) görülüyorsa popülasyonun tamamı ölmüş demektir (Shuler ve Kargi 2008).

Bu evrede ölüm hızı;

$$-dx/dt = \mu_d x_{\max} \quad (2.8)$$

μ_d = Spesifik ölüm hızı sabiti

$x_{\max}$ = Durağan faz biyokütle konsantrasyonu, şeklinde tanımlanmaktadır.

2.7. Mikrobiyel Gelişmeye Etki Eden Faktörler

Mikrobiyel gelişmeyi etkileyen faktörler; ozmotik basınç, su aktivitesi (a_w), sıcaklık, hidrojen iyonları konsantrasyonu (pH), oksijen konsantrasyonu, CO₂ konsantrasyonu ve basınç olarak sıralanabilir.

2.7.1. Ozmotik basınç ve su aktivitesi

Mikroorganizmaların fermentasyon ortamında optimum faaliyeti ve biyodönüşümü gerçekleştirebilmesi için, ortamın ozmotik basıncı ve iyon konsantrasyonu önemli olup, farklı mikroorganizma suşları için optimum iyon konsantrasyonu ve ozmotik basınç farklıdır. Mikroorganizmaların bulundukları ortamın ozmotik basıncı (değeri) hücre içi ozmotik basınçtan yüksek (hipertonik çözeltiler),

düşük (hipotonik çözeltiler) veya eşdeğer (izotonik çözeltiler) olabilir. Eğer mikroorganizma izotonik ortamda ise, gelişmesini diğer koşulların elverdiği ölçüde sürdürebilir. Ancak hipotonik ortamlarda hücre içine doğru suyun akışı önlenemez ise hücre şişmeye başlar ve sonunda patlayarak dağılır. Aynı şekilde hücre hipertonic ortamda suyun hücreden kaçışını engelleyemiyorsa plazmoliz meydana gelir ve dehidrasyona dayanamayan hücrede membran zarar görebileceği gibi, hücreler de metabolik olarak durma noktasına geldiklerinden gelişme engellenir. Bununla beraber çeşitli mikroorganizmalarda hücreyi ozmotik basınç etkisinden koruyan mekanizmaların varlığı ve gerektiğinde bunların devreye girdiği bilinmektedir. Hipotonik çözeltiler hücre duvarı bulunmayan bakteriler veya protoplastlar için ciddi tehlike oluşturup ozmotik şoka neden olurken, çoğu bakteri, fungus ve alg sağlam hücre duvarı yapısına sahiptir (Tunail 2009).

Bazı mikroorganizmalar ise ozmotik şoktan korunma davranışı olarak katı yüzeylere adsorbsiyonu geliştirmişlerdir, bu yolla içeriye giren suyun miktarını azaltırlar. Bütün mikroorganizmaların suya ihtiyacı olmakla beraber suya olan gereksinimleri farklıdır. Bir çözeltide veya katı ortamda (katı besiyeri, çeşitli substrat veya gıda maddelerinde) bulunan suyun oranı mikroorganizmanın gelişebilmesi açısından genel bir bilgi sunsa da, önemli olan ortamdaki serbest suyun miktarıdır. Ortamdaki bağlı olmayan suyu ifade etmek ve ortamları kıyaslayabilmek için **su aktivitesi (a_w)** değerinden yararlanılır. Su aktivitesini mikroorganizmanın bulunduğu ortamın buhar basıncının aynı sıcaklıktaki saf suyun atmosferindeki su buhar basıncına oranı olarak tarif etmek mümkündür (Ertugay ve Certel 1995).

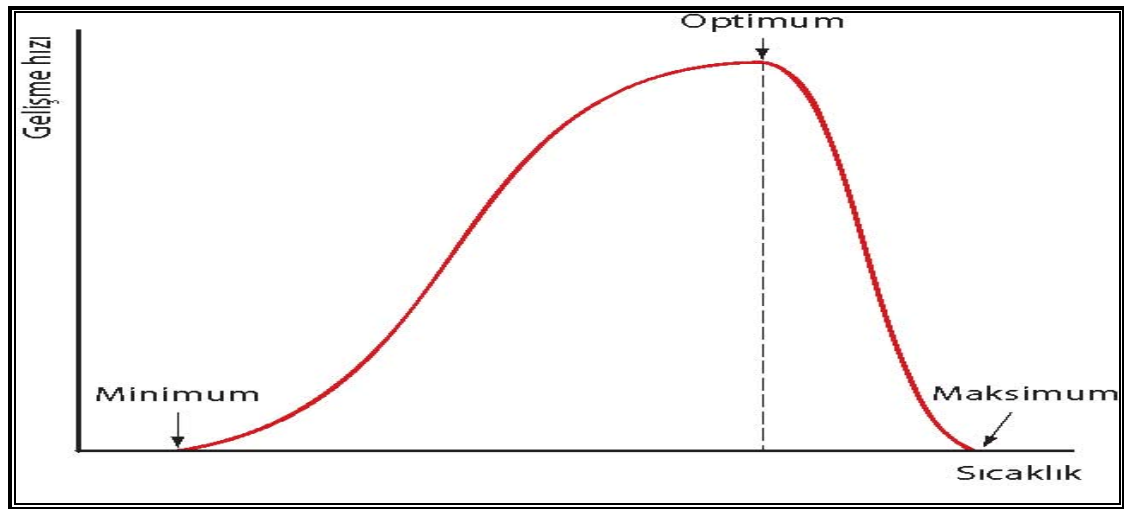
$$a_w = \frac{P_{materyal}}{P_{o\ saf\ su}} \quad (2.9)$$

Genel olarak mikroorganizmalar 0.988-0.600 arasındaki a_w değerlerinde gelişebilirler. Bakterilerin optimum olarak gelişebildikleri su aktivite değerleri ($a_w = 0.98$) oldukça yüksektir.

Funguslar bakterilerle kıyaslandıklarında daha düşük a_w değerlerinde gelişebilirler. Birçok fungus optimum gelişmesi için daha yüksek a_w değerini talep etse de, $a_w = 0.80-0.85$ değerlerinde de rahatlıkla spor çimlenmesi ve gelişme gösterir. Ozmotolerant bir maya olan *Saccharomyces rouxii* şeker konsantrasyonu oldukça yüksek olan çözelti, şurup ve marmelatlarda ($a_w = 0.60$) gelişebilir. Düşük a_w değerine sahip materyalde mikroorganizmanın gelişebilmesi çok fazla efor sarf etmesini gerektirir. Bunun nedeni suyu hücreden kaçırmamak için, içerideki ozmotik basıncı yükseltebilmek amacıyla çeşitli maddeler sentezlemeye mecbur olmasıdır. Bunu başaran mikroorganizmalar **ozmotolerant** olarak tanımlanır. Bunlar a_w sınırları geniş bir aralıkta gelişme yeteneği gösterirler. Bakterilerden de halofil veya ekstrem halofil karakterli olanlar $a_w = 0.75$ değerlerinde rahatlıkla gelişebilirler. Ancak çoğu bakteri bunu başaramaz (Ertugay ve Certel 1995, Tunail 2009).

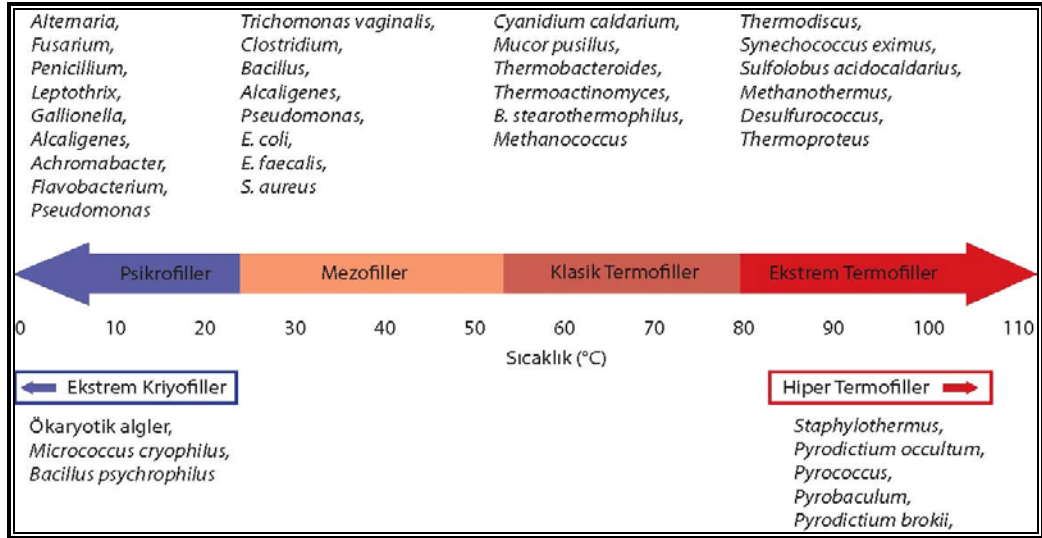
2.7.2. Sıcaklık

Mikroorganizmaların sıcaklık istekleri çok farklıdır. Genel olarak optimum gelişme için $0-55^{\circ}\text{C}$ arasında değişen sıcaklıkları isterler. Onları sıcaklık isteklerine göre **psikrofil** veya **kriyofil**, **mezofil**, **termofil**, **ekstrem termofil**, **hiper termofil** olarak gruplandırmak mümkündür (Şekil 2.3). Genel olarak prokaryotların ökaryotlara oranla daha yüksek sıcaklıklarda gelişebildikleri söylenebilir (Shuler ve Kargi 2008).



Şekil 2.2. Mikroorganizmaların sıcaklığa bağlı olarak gelişme hızı (Tunail 2009)

Mikroorganizmaların minimum ve maksimum sıcaklıkları arasındaki aralığın, kaba bir genelleme ile 30°C civarında olduğu söylenebilir. Bununla beraber bazı türlerin daha dar, bazılarının ise daha geniş aralıkta geliştiği gösterilmiştir (Şekil 2.3). Dar aralığa sahip mikroorganizmalar **stenotermal**, geniş aralığa sahip olanlar ise **öritermal** olarak tanımlanır (Tunail 2009, Ertugay ve Certel 1995).



Şekil 2.3. Çeşitli mikroorganizmaların geliştiği sıcaklık aralıkları (Tunail 2009)

Çoğu *Saccharomyces* türü 0°C ve 40°C arasındaki herhangi bir sıcaklıkta gelişebilir. En uygun sıcaklık ise 28–35°C'dir. Bununla birlikte *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişmesi için limit sıcaklık 40°C'dir. Çünkü fermentasyonda artan sıcaklıklar hücre büyümesi azalmasıyla sonuçlanır. Ayrıca *Lactobacillus casei* için optimum çalışma sıcaklığı 25-37°C civarındadır (Madigan ve Martinko 2006).

2.7.3. pH

Mikroorganizmalar gelişmeleri için farklı pH derecelerini talep ederler. Mikroorganizmalar, geliştikleri pH aralığına bakılarak 3-4 grup içinde toplanır. Optimum gelişmelerini; 1.0-5.5 pH arasında gerçekleştirenler **asidofiller**, pH 5.5-8.0 arasında sürdürenler **nötrofiller** olarak adlandırılır. Yüksek pH derecelerini (pH 8.5-

10.0) tercih edenler **alkalofiller**, gelişmeleri için daha da yüksek pH derecelerini (pH 10.0-11.5) talep edenler ise **ekstrem alkalofiller** olarak tanımlanır (Tunail 2009).

Lactobacillus türlerinin, *Enterobacter*'lerin ve birçok *Pseudomonas*'ın kendi yaşamlarını tehlikeye atacak düzeyde asitlik geliştirdikleri bilinir. Bu nedenle besiyerlerine **tampon maddeler** ilave edilerek aşırı asitliğin veya alkaliliğin önüne geçilmeye çalışılır. Tampon madde olarak en fazla fosfatların zayıf asitleri ve tuzları kullanılır. Yine bunun yanında etanol üretiminde kullanılan pek çok *Saccharomyces* mayası 2.4–8.6 arasındaki pH değerlerinde gelişebilmektedir. Sukroz bir karbon kaynağı olarak kullanıldığında, sistem pH'sına glukozdan daha duyarlıdır. Ayrıca laktik asit üretimi vb. fermentasyon proseslerinde kullanılan *Lactobacillus casei* pH 5-6 arasında optimum çalışma göstermektedirler (Madigan ve Martinko 2006).

2.7.4. Oksijen

Bazı mikroorganizmalar gelişebilmeleri için havanın oksijenine ihtiyaç duyarken (**aerob mikroorganizmalar**), bir kısmı da ortamda oksijenin bulunmamasını ister (**anaerob mikroorganizmalar**). Aerob olanların bir bölümü mutlak olarak O₂'ye gereksinir. **Obligat** veya **zorunlu aerob** olarak tanımlanan bu mikroorganizmalar O₂'nin bulunmaması durumunda yaşamlarını sürdüremezler. Bazı aeroblar ise oksijensiz ortamda üreyebilseler de O₂ varlığında daha iyi bir gelişme gösterirler ve **fakültatif anaerob** olarak tanımlanırlar (Doran 1995, Madigan ve Martinko 2006).

Mikroorganizmaların gelişimlerine oksijenin çok önemli etkisi nedeniyle aerob ve anaerob mikroorganizmalarla çalışılırken onların üretim tekniklerinde farklı uygulamalara dikkat etmek gerekir. Aerob mikroorganizmaların yüksek hacimli kültürlerinde havanın besiyeri içine difüze olabilmesi için kültürün manyetik karıştırıcı ile karıştırılması veya çalkalamalı inkübatörlerde çalkalanarak geliştirilmesi önerilir. Alternatif bir yöntem ise havanın kültür kabına steril bir filtreden geçirilerek verilmesidir. Bu yöntemde içeriye giren havanın besiyerinde homojen dağılımı yine mekanik karıştırıcılar ile sağlanır (Shuler ve Kargi 2008, Glazer ve Nikaido 2007).

Anaerobların geliştirilmesinde ise ortamdan oksijenin uzaklaştırılması gerekir. Eğer üretilcek anaerob kültür az miktarda ise sıvı veya katı besiyerine indirgeyici ajanlar (tiyoglikolat, sistein) katılarak oksijenin uzaklaştırılması sağlanır (Tunail 2009).

2.7.5. Karbondioksit

Bütün mikroorganizmaların az veya çok CO₂'e gereksinimleri vardır. Kültürün bulunduğu gaz atmosferindeki CO₂, KOH ile tutularak ortamdan çekildiği zaman hemen hemen bütün bakterilerin gelişiminde inhibisyon görülür. Ototrof mikroorganizmalar C asimilasyonu için yalnızca havanın CO₂'inden yararlandıkları için CO₂'e çok fazla ihtiyaç duyarlar, CO₂ fiksasyonunu ribuloz-bi-fosfat (RuBP) yolu üzerinden gerçekleştirirler. O nedenle karbondioksitle zenginleştirilmiş hava veya gaz karışımları (hacim olarak % 10 CO₂) gelişme ortamına sürekli verilerek bu bakterilerin gelişimleri sağlanır. Ototrofik bakterilerin besiyerlerine ayrıca sodyum bikarbonat (NaHCO₃) katılır. Besiyerine katılan NaHCO₃'ın yanı sıra besiyerinden bu gaz sürekli geçirilir (Tunail 2009).

2.7.6. Basınç

Mikroorganizmalar yerkürede habitatlarına göre farklı atmosfer basıncı altında bulunurlar. Toprakta veya suyun yüzeyinde yaşayanlar 1 atmosfer basınç altında yaşamlarını sürdürürken okyanusun veya denizlerin derinliklerinde bulunanlar, hem soğukta (2-3°C) hem de su katmanlarının etkisiyle yüksek hidrostatik basınç altında yaşarlar. Derin sularda yaşayan amfipodlar (yengeç vb.) ile denizhiyari gibi omurgasız canlıların sindirim sistemlerinde yerleşik bazı bakteriler gerçek **barofilik bakteriler** olarak tanımlanır ve gelişebilmek için yüksek atmosfer basıncına ihtiyaç duyarlar (Tunail 2009).

2.8. Etanol

Etil alkol en iyi bilinen alkol olup bütün alkollü içeceklerin esas maddesidir. Etil alkol aynı zamanda alkol, etanol, tane (hububat) alkolü, fermentasyon alkolü, etil hidroksit ve metil karbinol olarak da adlandırılır. Derin kültür fermentasyonu ile üretilen ve uzun yıllardan beri gıda ve diğer birçok endüstri dalında kullanılan etanol günümüzde ayrıca çeşitli araçlarda petrol ürünlerine alternatif olarak da kullanılmaktadır. Etanol mikrobiyolojik olarak elde edilebileceği gibi kimyasal yolla da elde edilebilir. Dünya’da azalan enerji kaynaklarına alternatif olarak fermentasyonla üretilen etanol önem kazanmıştır. Birçok ülkede sakaroz ve nişasta gibi karbonhidratlardan etanol üretimi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların en genel amacı etanolü üreterek otomobil yakıtı, etilen ve diğer petrokimyasalları elde etmektir. Dünya’da 2009-2012 yılları arasında tahmini etanol üretimi Çizelge 2.5’ de verilmiştir. Son zamanlarda otomobil üreticileri etanol-benzin karışımının (85:15 v/v) bazı araçlarda kullanıldığını bildirmişlerdir. ABD’nde 1999 yılında 4.54×10^9 litre etanol yıllık olarak bu sektörde kullanılmıştır (Sun ve Cheng 2002, Pimentel ve Patzek 2005, Brown 2003).

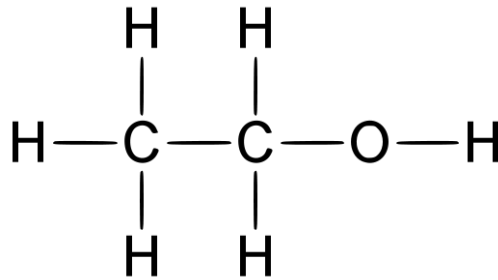
Çizelge 2.5. Dünya’da tahmini etanol üretimi (milyon litre) (Shuler ve Kargi 2007)

Ülkeler	2009	2010	2011	2012
Brezilya	19828	20778	21724	26674
ABD	25960	28458	30957	33455
Çin	4167	4269	4368	4470
Hindistan	2085	2161	2237	2312
Fransa	1139	1199	1260	1321
İspanya	696	779	859	942
Almanya	1442	1680	1915	2153
Kanada	1044	1218	1393	1567
Endonezya	317	348	378	408
İtalya	200	208	219	227
Dünya	66,524	71,672	76,817	81,965

Alkol fermentasyonunun ilk defa ne zaman nerede geliştiği konusunda birçok araştırmacı aynı sonuçlara varmasına karşın alkolün distile edilmesine ilişkin bilgiler çelişkili ve yetersizdir. Bazı araştırmacılar distilasyon işleminin ilk olarak Mısır'da yapıldığını, bazı araştırmacılar ise bu buluşun eski Yunanistan ve İtalya'da yapıldığını öne sürmektedirler.

13. yy.da Avrupa'da damıtma işlemi gelişmiş ve alkol üretimi ticari bir önem kazanmıştır. Asya kıtasında da alkol üretiminin ve distilasyon tekniğinin 13. yy'da bilindiği belgelerle doğrulanmaktadır. Distilasyon aletleri önceleri çok basit olup, daha sonra yüksek dereceli alkol üretebilmek için sürekli rektifikasyon kolunu geliştirilmiştir. 1901 yılında azeotropinin esaslarının belirlenmesi ile saf alkol üretimi mümkün olmuş ve alkol üretimi bugünkü durumuna ulaşmıştır.

Etil alkol, saf halde berrak, renksiz, uçucu bir sıvıdır. Alevlenebilir, toksiktir, karakteristik tat ve kokuya sahiptir. Suda ve eter gibi pek çok organik çözücünde çözünür. 78.4°C 'de kaynar ve -114°C'de erir. Özgül ağırlığı 20°C'de 0.7851gr/ml' dir (Shuler ve Kargi 2008). Şekil 2.4'de etanolün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Etanolün kimyasal yapısı

2.8.1.Etanolun kullanıldığı alanlar

Etil alkol alkollü içkilerin esas bileşeni olma dışında çözücü, ekstrakte edici, antifriz ve pek çok sayıda organik maddenin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılır. Etil alkol çözügenler, ekstrantlar, boyalar, farmosatikler, lubrikantlar, deterjanlar, pestisidler, yüzey kaplama maddeleri, kozmetikler, patlayıcı maddeler, sentetik liflerin yapılmasında kullanılan reçineler gibi diğer organik maddelerin sentezinde bir substrat olarak da kullanılır (Gilson vd 1995).

Alkol kullanımı ülke yönetimlerinin kontrolü altındadır. Kullanış amacına bağlı olarak çeşitli derecelerde etil alkol üretilir. Etanol ayrıca çok büyük miktarlarda bütadien üretimi için kullanılmaktadır ki, stiren ile kopolimerizasyonu sentetik lastiği oluşturmaktadır. Ekonomik olmamakla birlikte Avrupa da ve ABD’de olduğu gibi etil alkol–benzin karışımı motor yakıtı olarak kullanılmaktadır. Almanya’da gıda, alkollü içki ve ilaç gibi insanlar tarafından doğrudan veya dolaylı olarak tüketimi söz konusu olan ürünlerin üretiminde sentetik etil alkolün kullanılmasına izin verilmemektedir (Gilson vd 1995).

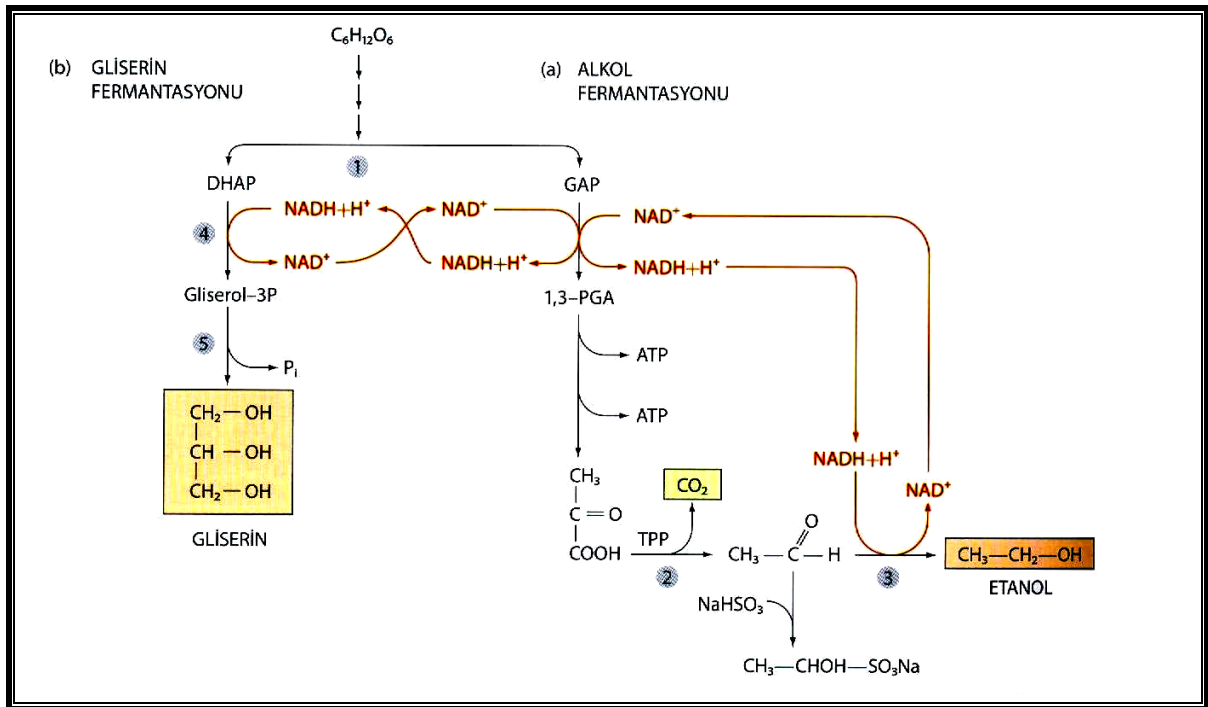
2.8.2.Fermentasyon metodu ile etanol üretimi

Etanol üretiminde hem maya hem de bakteriler kullanılabilir. Bu amaçla *Saccharomyces cerevisiae* (Atiyeh ve Duvnjack 2003) en fazla kullanılan mayadır. Bunun yanında *Kluyveromyces fragilis* de yaygın olarak kullanılabilir. Ayrıca son zamanlarda *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolticum* ve *Zymomonas mobilis* de etanol üretiminde kullanılmaktadır. Hemiselüloz ve selülozlar bu organizmalar tarafından parçalanırlar ve monosakkaritlere dönüştürerek fermentasyon sonucunda etanol üretilirler (Sun ve Cheng 2002). *S. cerevisiae* aerobik şartlarda glukozu pürivata ve onuda katabolik yoldan pürivatdekarboksilaz enzimi ile asetaldehit ve CO₂’e parçalar. Daha sonra alkoldehidrogenazın indirgemesi ile asetaldehitten etanol oluşur (Şekil 2.5) (Madigan ve Martinko 2006).

Etanol üretimi için kesikli sistemler kullanıldığında maksimum miktarda biyokütle elde etmek için çalışma aerobik şartlarda başlar. Çünkü aneorobik şartlar sistemde erken oluşmakta bu da iyi dönüşüm oranı elde etmek için yeterli gelmemektedir. Bu nedenle verim kaybından kaçmak için kısa bir süre sisteme hava verilmesi gerekebilir. Sürekli proseslerde optimal küf gelişimi ve etanol üretimi belirli şeker konsantrasyonu sınırlarında gerçekleşmektedir (Brock 1984).

Fermentasyon yoluyla etanol üretimi başlıca 3 aşamada gerçekleştirilir.

1. Substratın hazırlanması
2. Fermentasyon
3. Etanolün distilasyonu



Şekil 2.5. Glukozdan etil alkol üretim reaksiyonu (Tunail 2009)

Fermentasyon; alkol, yoğurt, sirke, boza, turşu, ekmek, peynir gibi adı hemen akla gelen, gerçekte türü bunlarla sınırlı olmayan birçok gıda maddesi üretiminde uygulanması zorunlu bir işlemdir. Halk dilinde karşılığı “mayalanma” ve “ihtimar”dır. Genel anlamda fermentasyon; üretimi amaçlanan ürünün elde edilmesi için maya, bakteri veya mantar gibi mikroorganizmaların faaliyetine olanak sağlayan temel bir üretim aşamasıdır. Fermentasyon koşulları, üretilcek gıda maddesinin türüne göre seçilmiş olan, mikroorganizma talebine bağlı kalınarak oluşturulur. Örneğin: alkol üretiminde “alkol mayasının”, sirke üretiminde “sirke bakterisinin” faaliyeti istenir ve fermentasyon ortamı bu mikroorganizmaların talebine uygun hale getirilir. Fermentasyon üretilcek ürüne veya fermentasyonu yapan mikroorganizma türüne göre adlandırılır.

Fermentasyon ortamında çalışan mikroorganizma, üremesi ve beslenmesi için ortamda bulunan ve kendisi için gıda maddesi olan maddeyi tüketir ve bu esnada da, fermentasyondan beklenen ürünü, yan ürün olarak meydana getirir. Örneğin: alkol fermentasyonunda maya, ortamda bulunan şekeri tüketirken, yan ürün olarak alkol meydana getirmektedir.

Etanol üretiminde substratın hazırlanmasında nişasta içeren kökler, taneler, şeker kamışı, şeker pancarı, pirinç, işlenmiş ağaç ürünleri, atık kağıtlar, ayçiçeği atık gıda ürünleri vb. (Çizelge 2.6) karbonhidrat kaynakları kullanılabilir (Badger 2002, Sun ve Cheng 2002, Pimentel ve Patzek 2005, Karimi vd 2006). Ayrıca peynir altı suyundan da etanol üretimi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ancak endüstriyel kullanımı pek fazla yaygın değildir.

Çizelge 2.6. Etanol üretiminde kullanılan substratlar ve özellikleri (Sun ve Cheng 2002)

Karbonhidrat	Hammadde	Hidroliz ürünleri
Selüloz	Tarımsal atıklar	Glukoz
	Şehirsel atıklar	Mannoz
	Odun	Galaktoz
	Odun atıkları	Arabinoz, Ksiloz
Laktoz	Peynir altı suyu	Glukoz, Galaktoz
Nişasta	Kassava	Glukoz
	Mısır	Maltoz
	Patates	Dekstrin
	Sago	
Sakkaroz	Şeker pancarı	Glukoz
	Şeker kamışı	Fruktoz
	Melas	

Roukas (1993) tarafından inkübatörlerde yapılan bir çalışmada; keçiboynuzu meyvesinin sadece ekstraktından *S. cerevisiae* kullanarak etanol üretimi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla farklı inokülasyon miktarı, başlangıç şeker oranı ve pH gibi parametreleri değiştirerek etanol üretimlerini izlemişlerdir. Yine Roukas (1996a) tarafından yapılan bir çalışmada iki aşamalı fermentasyon sistemi kullanılarak sterilize edilmemiş keçiboynuzu ekstraktlarından immobilize enzim kullanarak etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde 200 g/L başlangıç şeker oranında maksimum 64 g/L etanol üretilebilmiştir.

Keçiboynuzu meyvesinden immobilize *S. cerevisiae* kullanılarak küçük ölçekli gerçekleştirilen bir çalışmada maksimum etanol miktarı 50 g/L olarak tespit edilmiştir. (Roukas 1994a). Yine Roukas (1994b) immobilize *S. cerevisiae* kullanarak dolgulu yatak reaktöründe gerçekleştirdiği bir fermentasyonda 48-52 g/L etanol üretebilmiştir.

Roukas vd (1991) tarafından yapılan başka bir çalışmada kalsiyum alginat üzerinde immobilize edilen *S. cerevisiae*'nın peyniraltı suyunda kullanıldığı bir

fermentasyon işleminde 150 g/L şekerden 61 g/L etanol üretmişlerdir. Yine benzer bir çalışmada immobilize *S. cerevisiae* kullanılarak keçiyoynuzu meyvesi ekstraktından etanol üretimi üzerine küçük ölçekle yapılan bir çalışmada 250 g/L başlangıç konsantrasyonunda 64,5 g/L etanol üretilerek verim %28.3 olarak bulunmuştur (Roukas 1995). Keçiyoynuzu posasının etanol üretiminde değerlendirilmesi üzerine ise herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Demirci vd (1997) biyofilm reaktörü kullanarak etanol üretimi üzerine yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* kullanmışlardır. Bu amaçla katı destek materyalleri kullanarak maya hücreleri immobilize edilerek sürekli ve kesikli fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Kesikli fermentasyon kullanılan sistemde *S. cerevisiae* 30 g/L etanol üretmiştir. Benzer şekilde şeker pancarı melasının sterilize edilmeden *S. cerevisiae* kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonunda maksimum etanol miktarı 43.5 g/L olmuştur. Bunun yanında biyokütle miktarı 4.0×10^8 hücre/ml olarak belirlenmiştir (Roukas 1996b). Alegre vd (2003) kirosotil üzerine immobilize ettikleri hücrelerle substrat olarak melas kullanarak etanol üretmişlerdir.

Carvalho vd (2003) şeker kamışından şeker üretimindeki artık olan melasa kesikli-beslemeli fermentasyon uygulayarak etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak gerçekleştirilen etanol üretimi cevap yüzey metodu ile optimize edilmiştir. Bu amaçla reaktör dolum zamanı, başlangıç maya miktarı ve logaritmik faz hızı hesaplanmıştır. En yüksek etanol verimliliği fermentasyonun 3. saatinde 16.9 g/l/h olarak hesaplanmıştır. Bunun yanında Roukas (1994c) sterilize edilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında serbest *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kullanarak gerçekleştirdiği beslemeli-kesikli etanol fermentasyonunda maksimum etanol verimliliğini 4.4 g/l/h bulmuştur.

Talebniya vd (2005) ladin ağacı atıklarını kullanarak gerçekleştirdiği etanol üretimine kapsüllendirilmiş *S. cerevisiae* kullanmışlardır. Bunun sonucunda etanol verimliliği 5.15 g/l/h olurken etanol verimi hücre miktarı üzerinden 0.464 g/g bulunmuştur. Benzer bir şekilde Taherzadeh vd (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ormanlık alanlardaki selülozik materyaller immobilize *S. cerevisiae* ile etanol

fermentasyonuna bırakılmıştır. Sürekli sistemde gerçekleştirilen etanol üretiminde verim şeker tüketimi üzerinden 0.45 g/g ile 0.48 g/g arasında olmuştur.

Tatlı sorgum suyundan *S. cerevisiae* TISTR 5048 kullanılarak fermentasyon yoluyla bir diğer etanol üretimde kesikli sistem uygulanmıştır. Bu yöntemde kinetik parametreler üzerine başlangıç mikroorganizma miktarı ve şeker konsantrasyonu etkili olmuştur. Bunun sonucunda optimum mikroorganizma miktarı 1×10^8 hücre/ml, başlangıç şeker konsantrasyonu ise 24°Bx olarak belirlenmiştir. Bu şartlar altında 100 g/l etanol üretilirken, verim 0.42 g/g ve verimlilik ise 1.67 g/l/h olmuştur (Laopaiboon vd 2007). Benzer bir çalışmada Yu vd (2007) sorgum suyu kullanılarak etanol üretimi gerçekleştirilmiş ve etanol verimi tüketilen şeker üzerinden 0.49 g/g olduğu bildirilmiştir. Atiyeh ve Duvnjak (2003) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, şeker kamışı melasından *S. cerevisiae* (ATCC 36858) kullanılarak etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta 236 g/l şeker içeren medyada biyokütle miktarı 8.62 g/l'ye ulaşırken, etanol miktarı 45 g/l olarak belirlenmiştir.

Veljkovic vd (2006) tarafından ardıcın yumuşak meyvelerinden etanol üretimi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada etanol konsantrasyonu %4.4 (v/v) olarak belirlenirken etanol verimi 0.43 g/g şeker olmuştur.

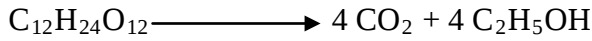
Goksungur ve Zorlu (2001) pancar melası kullanarak dolgulu yatak fermentöründe immobilize hücre kullanarak gerçekleştirdiği fermentasyonda maksimum %4.6 (v/v) etanol üretildiğini bildirmişlerdir.

Biyolojik yolla etanol üretimi, daha çok tarımsal esaslı ürünlerden yapıldığı için atmosferik karbon döngüsünü de arttırmaktadır. Etanol fermentasyonunda Amerika Birleşik Devletleri gibi bazı ülkeler hammadde olarak çoğunlukla nişastalı tarım ürünleri ve selülozlu artıklardan yararlanırken ülkemizde bu amaçla genellikle **melas** ve **kuru üzüm** kullanılmaktadır. Bunların dışında patates, pancar, odun şekeri, sülfite şurubu, çeşitli meyveler ve peynir altı suyu da alkol üretiminde kullanılabilen önemli hammaddeler arasında yer almaktadır. Endüstriyel etanol üretimi açısından **pancar ve kamış melaslarının** bol bulunması ve ucuz hammaddeler olmaları nedeniyle daha

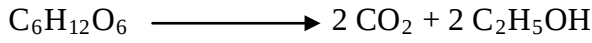
avantajlı olduğu ve bu nedenle yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Sentetik olarak etilenden etanol üretimi mümkün olmasına rağmen özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde fermentasyon ürünü alkol kullanma zorunluluğu vardır. Çünkü sentetik alkolde insan sağlığına zararlı yan ürünler ve reaksiyona girmemiş çıkış maddesi ve içerdıği safsızlıklar bulunabilir.

2.8.3. Etanol fermentasyonu teknolojisi

Milattan önce Mısırlıların bira yapımında kullandıkları fermentasyon işleminin ilk adımları 1789 yılında Lavosier tarafından atılmış, 1815 yılında da Gay Lusac tarafından formüle edilmiştir.



Dums ve Bullay ise daha sonra bu Gay-Lussac formülünü;

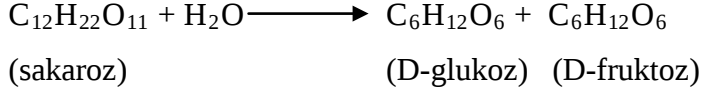


olarak düzenlemişlerdir (Shuler ve Kargi 2008).

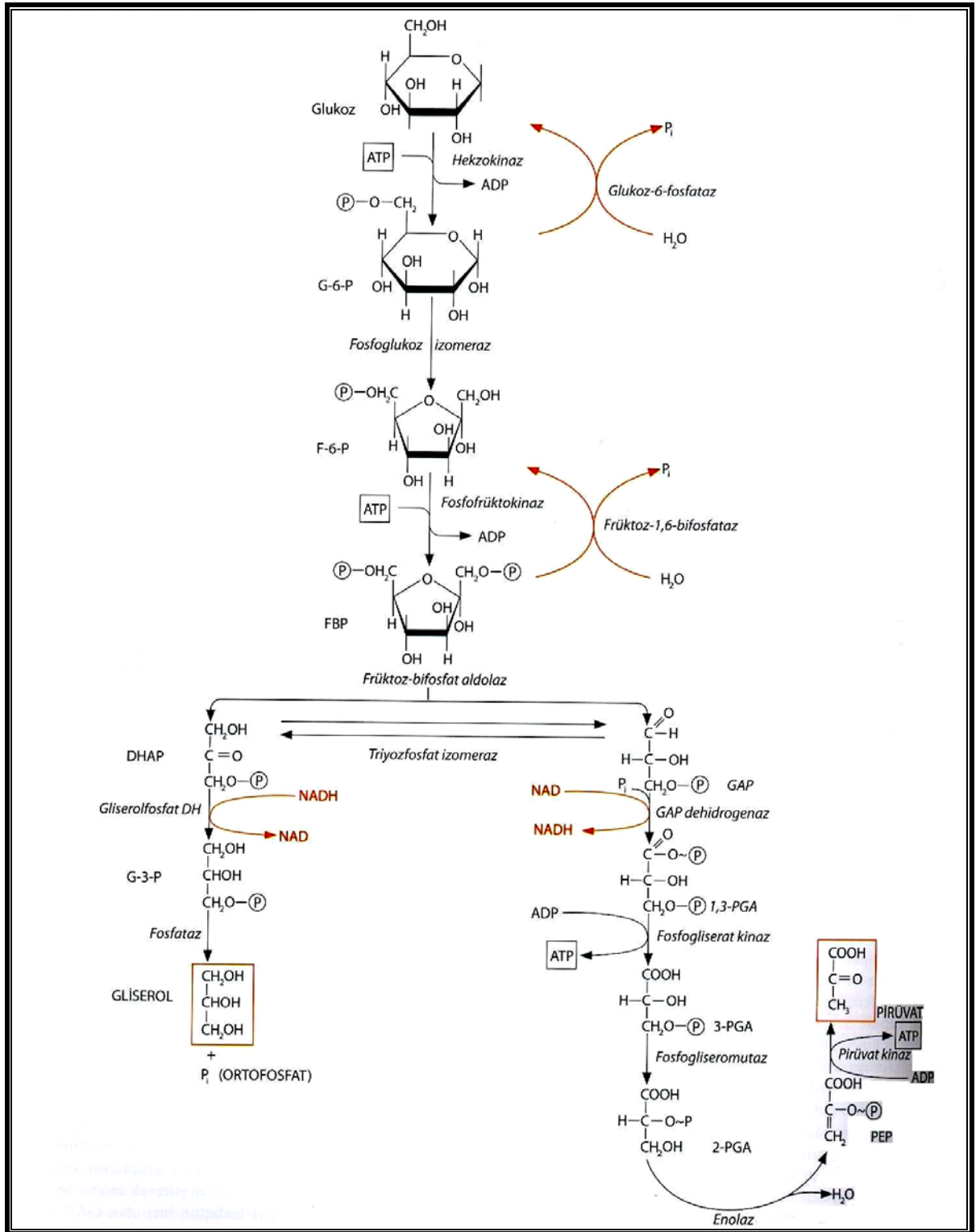
Fermentasyon 1839 yılında da Alman kimyager Liebig tarafından mekanik bir parçalanma olarak tanımlanmıştır. Pasteur ise 1857 yılında fermentasyonun maya tarafından gerçekleştirilen fizyolojik ve biyolojik bir olay olduğunu ortaya koymuştur. Yukarıdaki genel formüle göre **100 kg** glukozdan **51.142 kg**, **100 kg** sakarozdan hidrolizle oluşan 2 molekül glukozdan **53.833 kg** ($\cong 67.834$ litre) ve **100 kg** nişastadan **56.824 kg** ($\cong 71.604$ litre) % 100' lük etanol oluştuğu teorik olarak hesaplanmıştır. Ancak, kullanılan mikroorganizma, hammaddenin bileşimi ve fermentasyon koşullarının, fermentasyon sırasında oluşan yan ürünlerin çeşidi ve miktarı üzerinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Günümüzde bu teknoloji ile antibiyotik, vitamin, amino ve nükleik asitler ve biyogaz, etanol gibi yakıtlar üretilmektedir. Bunların dışında atık suların biyolojik olarak arıtılması gibi işlemler de fermentasyon teknolojisinin başka uygulamalarındandır (Shuler ve Kargi 2008).

2.8.3.1. Glikoliz fermentasyonu

Maya hücreleri salgıladıkları invertaz enzimi yardımıyla ortamdaki sakarozu D-glukoz ve D-fruktoza dönüştürürler.



Hücre içine giren glukozun stoplazmada bir seri tepkimeye girerek Şekil 2.6'da görüldüğü gibi pürivata parçalanması olayına glikoliz denir. Bu reaksiyon dizini enzimlerin (hezokinaz glukokinas, fosfoheksoz isomeras, fosfo frukto kinas-1, aldolas, enolas, pürivat kinas) yardımıyla ve ortamda yeterli enerji var ise başlayabilir. Bu enerji aktivasyon enerjisi olarak kullanılan enerjidir (Madigan ve Martinko 2006).



Şekil 2.6. Glukozun parçalanmasıyla gerçekleşen glikoliz (Tunail 2009)

Glukozun parçalanmaya başlaması için yani glikoliz reaksiyonlarının başlaması için stoplazmada bulunan 2ATP (Adenosin trifosfat)'nin harcanması gerekir. Glukoz molekülü ile tepkimeye giren ATP molekülleri son fosfatlarını glukozla vererek tepkimeden ADP (Adenosin difosfat) olarak ayrılır. Bu arada glukoz da fruktoza dönüşür. Aktifleşmiş molekül fruktoz difosfattır. İkiye ayrılan 6 C'lu 2 P'li molekülden iki tane PGAL (fosfogliser aldehit) oluşur. Bundan sonra reaksiyon iki PGAL üzerinden yani iki koldan devam eder. PGAL ortamda bulunan NAD (Nikotin amid dinukleotid) ile reaksiyona girerek bir çift hidrojenini NAD'ye verir ve NADH₂ oluşur. Bu arada PGAL'in bağlarında bir boşluk oluşur. Bu boşluk ortamda bulunan fosfat ile doldurulur ve 3 C'lu 2 P'li bir molekül oluşur. Bu molekül ortamda bulunan ADP'ler ile reaksiyona girerek sırasıyla 2 ATP oluşur. Geriye kalan molekül ise pürivat olarak adlandırılır. Diğer PGAL'de de aynı gelişmeler olacağı için toplam 4 ATP sentezlenmiş olur (Şekil 2.6) (Damodaran vd 2008).

2.8.3.2. Etanol metabolizması

Fermentasyon ortamında etanol derişimi en yüksek değere ulaştıktan sonra zamanla azalmaya baslar. Bunun anlamı maya hücrelerinin metabolik olarak enerji üretmek için etanolü de kullandığıdır. Ortamda oksijenin varlığında asetil koenzim A'yı meydana getirecek enzimler vardır ve sitrik asit çevrimi meydana gelir. Maya hücreleri etanolü kullanarak ATP sentezler. Etanol metabolizması Şekil 2.5.'de verilmiştir (Ertugay ve Certel 1995).

2.8.4. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizmalar

Birçok organik maddenin elde edilmesinde olduğu gibi etil alkolün elde edilmesinde de mayaların büyük önemi vardır. Diğer yöntemlerle elde edilmesi zor olan organik maddeler, mayalar kullanılarak fermentasyon yolu ile kolayca üretebilirler. Bu nedenle etil alkol üreten fabrikalarda maya üretim üniteleri de bulunmaktadır (Ertugay ve Certel 1995).

Fermentasyon teknolojisinde daha yüksek verim elde edilmesi, fermentasyonun daha ekonomik olması ve çevre kirliliğine neden olmaması açısından fermentasyon için kullanılacak mikroorganizmaların belli özelliklere sahip olması gereklidir. Çok sayıda substratla kullanılabilme özelliğine sahip olması, kontaminasyondan arınmış olması, fermentasyon ortamından kolayca ayrılabilmesi, genetik değişikliğe dirençli olması, yüksek karbon-biyokütle dönüşümü sağlaması, geniş pH aralığında üreyebilmesi, son ürünün toksik olmaması, yüksek oranda sindirilebilmesi, bitki, hayvan ve insanlar üzerinde patojen etkisinin olmaması gibi özelliklere sahip olmalıdır (Brown 2003).

Etanol üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalar mayalardır ve bunların başında *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalar gelmektedir. Bununla beraber, *Schizosaccharomyces torulopsis* ve bazı *Candida* türlerinin de belirli koşullar altında, teknikte etanol üretiminde kullanıldığı belirtilmiştir. *Mucor*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* cinslerine ait küf mantarı türlerinin de etanol fermentasyonu yapabildikleri, ancak küf mantarlarının mayalar ve bakteriler kadar hızlı gelişemedikleri, bu nedenle bunların endüstriyel etanol üretimi için uygun olmadıkları, ayrıca etanol üretimleri üzerinde fazla çalışma yapılmadığı bildirilmiştir. En iyi etanol üreticisi bakterinin *Zymomonas mobilis* olduğu, bunların yüksek konsantrasyonlardaki glukozu hem kesikli hem de sürekli fermentasyonla etanole dönüştürebildikleri açıklanmıştır. *Z. mobilis*' in, sadece glukoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildiği, etanolün yanında düşük oranlarda gliserin, süksinat, laktat, asetoin ve bütandiol de ürettiği belirlenmiştir (Brown 2003, Smith 2004, Ratledge ve Kristiansen 2006).

Son yıllarda termofilik, etanolojenik, sakkarolitik, bakterilerin endüstriyel etanol üretimleri üzerindeki çalışmalar, bu bakterilerin çeşitli şekerleri kullanabilmelerinden dolayı, yoğunlaşmıştır. Bu grup içerisinde *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacteroides* ve *Clostridium* cinslerine ait türler bulunmaktadır. Son 20 yılda, özellikle *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* ve *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ile etanol üretimi üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Waite vd 2001). Ayrıca genetik olarak modifiye edilerek üretilmiş bir suş olan *Lactobacillus*

plantarum double Idh etanol üretiminde kullanılan mikroorganizmalar arasındadır (Liu vd 2006).

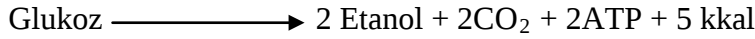
Alkolik fermentasyonda en büyük rolü üstlenen mayalar; tek hücreli, spor yaparak veya tomurcuklanarak çoğalan 8-10 mikron (μ) büyüklüğünde canlılardır. Mayalar doğada çok yaygındır. Toprakta özellikle de seker ve karbonhidrat bakımından zengin olan besin maddelerinde bulunurlar. Üzüm ve diğer meyveler üzerinde yabani olarak yaşarlar, meyvelerin sıkılması ile öz suya geçerler, uygun şartlarda ürerler, ısıl yolla ölürler. Tomurcuklanma ile çoğalmada, maya hücresinin uç tarafında bir şişkinlik meydana gelir. Bu şişkinlik giderek büyür ve bir tomurcuk şeklini alır. Uygun büyüklüğe gelince ana hücreden kopar. Bu hücre de aynı şekilde çoğalmaya devam eder. Maya hücrelerini morfolojik olarak ayırt etmek zor olmasına rağmen kural olarak *Saccharomyces cerevisiae* genellikle yuvarlak veya eliptik bir sekil gösterir. *Saccharomyces cerevisiae* yumurta şeklinde, tek hücreli, uzun çapı 0.01 mm olan bir mayadır. Azot ve tuzlara (P_2O_5 , SO_2 , K_2O , MgO) ihtiyacı vardır. Bu nedenle saf seker çözeltilerinde fermentasyon başlayabilir fakat devam etmez. Maya hücreleri mikroskop altında incelendiğinde farklı şekillerde görülürler (Gürel 1996).

- a. *Genç maya*: Sitoplazma içerisinde vakuol ya çok küçük veya hiç yoksa bu tip mayalara genç maya denir.
- b. *Olgun maya*: Hücreleri tek tek veya yumrulu gruplar halinde, vakuoller orta büyüklükte ve sitoplazma içerisindeki tanecikleri fazla olan mayalara denir.
- c. *Yaşlı maya*: Hücreleri ayrı ayrı yani gelişigüzel, vakuolleri çok büyümüş, sitoplazma içerisindeki tanecik sayısı çok artmış olan mayalardır.
- d. *Ölü maya*: Hücreleri büzülmüş ve küçülmüş, vakuolleri çok büyük ve gelişigüzel olan ve oval olmayan sitoplazmadaki tanecik sayısı azalmış olan mayalardır (Gürel 1996).

Maya mantar (fungi) tipi tek hücreli mikroorganizmadır, gelişmesi için besin kaynaklarına gereksinimi vardır. Mayalar çekirdek zarıyla sarılmış bir çekirdeğe sahiptirler. Bütün mayaların büyümeleri çeşitli organik bileşiklere ve birçok mineral maddeye bağlıdır. Bu mikroorganizmalar hem havanın yokluğunda hem de varlığında

büyüme yeteneğine sahiptirler. Maya hücreleri amonyak, amonyum tuzları, fosfor, düşük miktarlarda potasyum, magnezyum ve kalsiyum tuzlarına ihtiyaç duyar. Mineralleri ve vitaminleri içeren besinlerin en iyi kaynağı genellikle yeast extract (maya özütü) tır. Bu besin kaynağı yaygın olarak büyüme ortamı için kullanılır (Gürel 1996).

Anaerobik durum altında etanol ve karbondioksit üreten maya hücreleri daha hızlı büyür. Mevcut fermentasyon şekeri miktarına bağlı olan maya ürünü etil alkol düşük oranda ve genellikle %10'dan fazla değildir. Fermentasyon genellikle anaerobiktir ve karbonhidrat serbest enerjiye dönüşür. Pek çok tür maya tarafından yerine getirilen fermentasyon, heksoz şekerlerinin bir dönüşümüdür. Temel olarak glukoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz havanın yokluğunda dört ana son ürüne dönüşümle sonuçlanır (Gürel 1996).



Serbest enerjinin yaklaşık % 70'i ısı olarak serbest bırakılır. Maya tarafından katabolize edilen glukozun %95'i Embden-Meyerholf yoluyla karbondioksit ve etil alkole dönüşür. Fermentasyon sırasında azot sınırlandırıldığında mayanın büyümesi yavaşlamaya başlar. Şekerin etil alkole dönüşmeyen kısmı yedek glikojen olarak depolanır. Şeker anaerobik durum altında, aerobik duruma göre daha hızlı fermente edilir. Buna da Pasteur etkisi denir (Shuler ve Kargi 2008).

Mikroorganizmaların büyük bir kısmını oluşturan mayalar, birçok fermentasyon proseslerinde kullanılmaktadır.

Lodder ve Kreger Van Rij'e göre mayalar 3 familya ile gruplandırılmışlardır.

- a. Sacharomycetaceae
- b. Sporobolomycetaceae
- c. Cryptococcaceae

Teknikte en fazla kullanılan mayalar, Sacharomycetaceae familyasının alt familyasından olan endomycetoidelları den ascosporengus mayaları ve Cryptococcaceae

familyasından olan asporogenous mayalarındır. Bunların birincisine *Saccharomyces cerevisiae* örnek gösterilebilir (Wümpelman 1984). Mayaların kimyasal bileşimi, cinslerine ve kültür şartlarına göre değişebilmekle birlikte yaklaşık olarak %46–47 protein, %1–2 yağ, %35–36 karbonhidrat ve %16–17 kül, selüloz vb. içermektedir.

Mayalar 2 şekilde çoğalmaktadırlar;

- a. Sıcaklık uygun, yeterli gıda ve hava olursa tomurcuklanma ile bir hücreden bir veya daha fazla çıkıntı meydana gelir. Bunlar yeni hücreler halinde gelişir ve sonunda ana hücreden ayrılırlar.
- b. Sporlanmada ise mayalar uygun olmayan şartlarda ikiye veya dörde bölünerek çoğalırlar.

Mikroorganizmaların çeşitli gruplarından olan mayalar endüstriyel alanlarda önemli bir rol oynamaktadırlar. Endüstride kullanım alanı en fazla olan maya türü *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Hızlı ve etkili olarak şekerli alkol ve karbondioksit çevirebilme yeteneğine sahip olan bu mayanın süt, tahıl, meyve suyu gibi şekerli sıvıların fermentasyonunda etkili olduğu bilinmektedir. *Saccharomyces* büyük miktarlardaki mevcudiyetinin yanında, çok yüksek bir metabolik hıza, daha hızlı büyüme oranına ve çok hızlı kimyasal değişiklikler meydana getirebilme yeteneğine sahiptir (Ejiofor 1994). Mayalar diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında etil alkole oldukça dayanıklıdır. Fermentasyon hızı, şeker tüketimi, büyüme hızı ve hücre mevcudiyeti, etil alkolün maya yapısına zehirleyici etkisinde belirleyici olarak kullanılır (Ejiofor 1994).

Pek çok *Saccharomyces* mayası 2.4–8.6 arasındaki pH değerlerinde gelişebilmektedir. Sukroz bir karbon kaynağı olarak kullanıldığında, sistem pH'sına glukozdan daha duyarlıdır. Çoğu *Saccharomyces* türü 0°C ve 40°C arasındaki herhangi bir sıcaklıkta gelişebilir. En uygun sıcaklık ise 28–35°C'dir. Bununla birlikte *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişmesi için limit sıcaklık 40°C'dir. Çünkü fermentasyonda artan sıcaklıklar hücre büyümesi azalmasıyla sonuçlanır (Lievense ve Lim 1982).

2.8.5. Etanolün saflaştırılması

Fermentasyon sonunda içinde yaklaşık % 10 etil alkol bulunan bir çözelti elde edilir. Bu çözeltinin fraksiyonlu destilasyon cihazlarında destilasyonu ile %95-96 lık alkol elde edilir. Destilasyon ile fermentasyonda oluşan aldehit, furfurol, esterler, fuzel yağı (n-propil alkol, izobutil alkol ve izomer alkoller karışımı) gibi sağlığa zararlı yan ürünler de uzaklaştırılır. Destilasyonda elde edilen alkol ağırlıkça %95.57 alkol, %4.43 su bulunan ve 78.2°C kaynayan alkol-su azeotrop karışımıdır. Mutlak alkol denilen saf alkol iki ayrı yöntemle elde edilir (Strube 2007, Chisti 2007).

- a. %95.97 lik alkole sönmemiş kireç (CaO) ilave edilir ve destile edilir, kireç su ile reaksiyona girerek saf alkolün destile edilmesi sağlanır
- b. Alkol içindeki su yüzdesine göre uygun miktar benzen ile karıştırılarak destile edilir. İlk destilat 64.8°C de geçer ve benzen (%74.1), etanol (%18.5) ve suyun (%7.4) azeotrop karışımıdır. İkinci destilat 68.2°C de geçer ve benzen (%67.6) ve etanolün (%32.4) azeotrop karışımıdır, bütün benzen uzaklaşana kadar devam eder. Üçüncü destilat 78.3°C de kaynayan mutlak alkol (%99.5) dür. Mutlak alkoldeki %0.5 su metalik kalsiyum ve magnezyum yardımıyla uzaklaştırılabilir.

Bunun yanında fermentasyon ortamından etanolün ayrıştırılmasında, daha ekonomik olması, enerji maliyetinin düşük olması ve daha konsantre ürün elde edilebilmesi nedeniyle pervaporasyon yöntemi de yaygın olarak kullanılmaktadır (Wasewar and Pangarkar 2006).

2.9. Laktik asit

Gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılan sitrik asit, malik asit, laktik asit, tartarik asit ve glukonik asit gibi alifatik hidroksi asitler bir veya daha fazla karboksil grubuna sahiptir. Tüm bu asitler bitki ve hayvanlar aleminde doğal olarak oluşmaktadır. Sitrik asit ve malik asit, sitrik asit döngüsünde asetatın oksidasyonu ile çoğu canlı hücrenin metabolik sistemlerinde meydana gelmektedir. Laktik asit kaslarda glukozun oksidasyonu ile oluşan bir üründür. Bunun yanında *Streptococcus lactis* ve *Lactobacillus bulgaricus* gibi kültürler tarafından üretilerek gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kimyasal yöntemlerle veya atık maddelerden fermentasyon yoluyla üretilen ve gıda, kimya, kozmetik ve eczacılık da dahil olmak üzere birçok endüstri dallarında kullanılan **laktik asit** çoğu canlı organizmada doğal olarak oluşan genel bir metabolik ürün olup fakültatif aneorobik prokaryotların metabolik faaliyetleri sonucunda oluşmaktadır (Datta ve Henry 2006). Laktik asit ilk olarak 1780 yılında ticari bir firma tarafından ekşi sütten izole edilmiş olup (Hofvendahl ve Hagerdal 2000) bu yüzden süt asidi olarak da adlandırılmaktadır. Sütte bulunan laktoz, laktik maya denilen bakteriler tarafından laktik aside dönüştürülmektedir. Laktik asit her insanın vücudunda oluşan doğal bir organik bileşiktir; kas, kan ve vücudun değişik organlarında bulunur. Laktat ile aynı anlamda kullanılır. Laktat, laktik asidin tuz formuna verilen addır. Laktik asidin insan ve hayvan vücudundaki temel kaynağı, glikojenin yıkımıdır. Anaerobik glikoliz sonucu pirüvat üretildiği zaman, kas hücresi onu aerobik olarak enerji üretimine katmayı dener. Şayet, kas hücresi üretilen tüm pirüvatı kullanma kapasitesine (aerobik olarak) sahip değilse, pirüvat laktata dönüşür. Laktat, laktik asidin Na, K tuzudur, çoğu kez laktik asit ile aynı anlamda kullanılır.

Dünyada laktik asit tüketimi 2002 yılı verilerine göre 380,000 ton/yıl olarak gerçekleşmiştir. Global pazar payı ise 700 milyon USD dir. Üretilen laktik asidin yaklaşık yarısı fermentasyon yolu ile, diğer yarısı ise kimyasal sentez yolu ile elde edilmektedir. Günümüzde sanayide kullanılan ve endüstriyel olarak önem taşıyan laktik asit bakterilerinin büyük kısmı homofermentatif *Lactobacillus* cinsindendir. Ancak

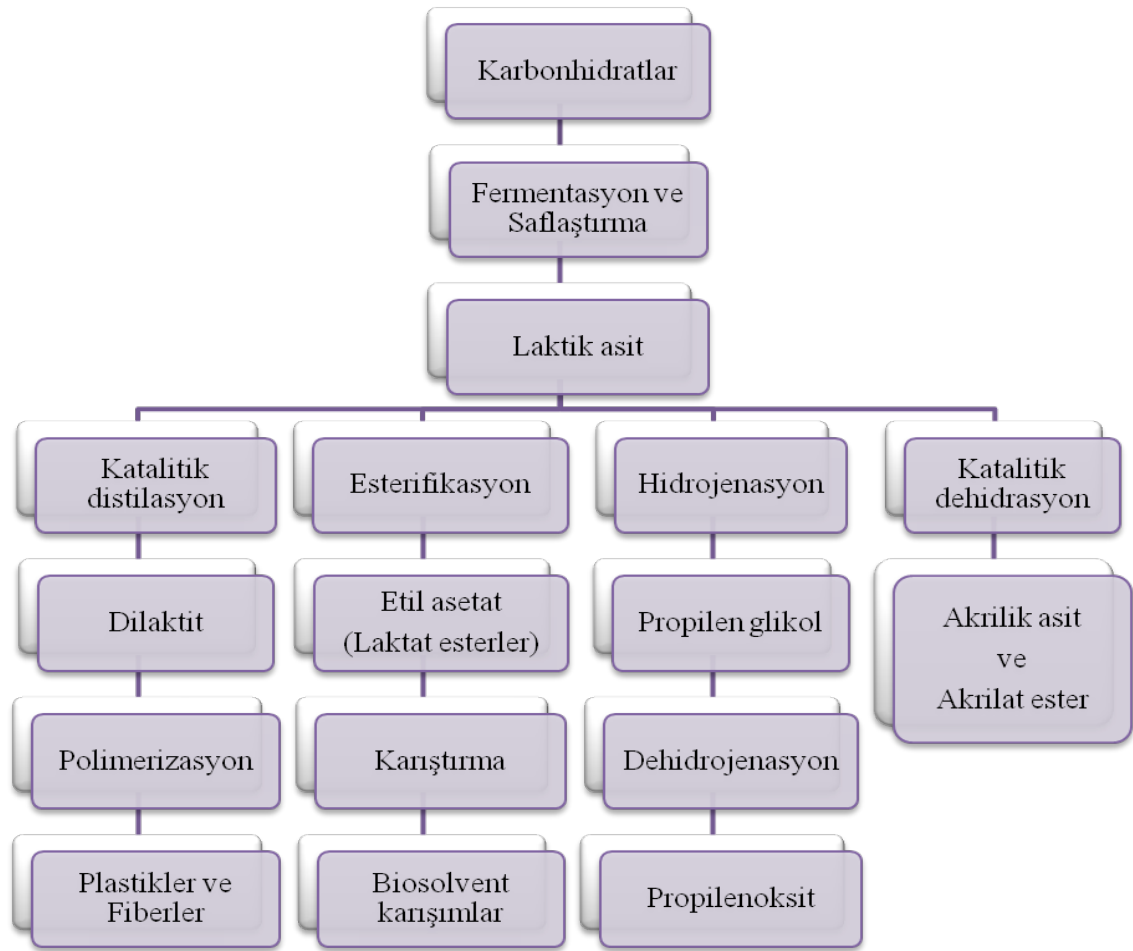
Rhizopus cinsi bazı küfler, özellikle *Rhizopus oryzae* L(+)-laktik asit üretiminde kullanılabilir (Tay ve Yang 2002). Ülkemizde domates konservesi, margariner, et ürünleri, reçel, jöle ve marmelatlar, şekerlemeler, turşu ve zeytin salamuraları, deniz ürünleri ve bira sanayinde kullanılan laktik asidin tümü ithalatla karşılanmaktadır. Yıllar önce keşfedilmiş olan bu asit gıdaların korunmasında, işlenmesinde ve diğer endüstri dallarında kullanılmak üzere yıllık 380,000 ton civarında üretilmektedir. 1990'lı yıllarda dünyada yıllık üretim hacmi 40,000 ton olup üretim 2 firma tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunlardan Hollanda'da CCA Biochem çeşitli karbonhidrat kaynakları kullanarak fermentasyon işlemi ile laktik asit üretirken, ABD'de Sterling Chemicals kimyasal teknolojiyi kullanarak üretim yapmaktadır. 2005'li yıllara doğru Natureworks LLC firması laktik asit üretiminde Dünya'da ilk sıraya yerleşmiştir. Doğu ülkelerinde ise Musashino firması Çinli partnerleriyle üretimlerini gerçekleştirmektedir. Kimyasal market raporlarına göre laktik asit 1.5 USD/kg civarında değer bulmaktadır (Datta ve Henry 2006).

Laktik asidin kimyasal adı 2-hidroksipropanoyik asittir. Kimyasal formülü $C_3H_6O_3$ 'tür. Hem alkol, hem asit özelliği gösterir. Moleküler ağırlığı 90.08 g/mol dir. Yoğunluğu yaklaşık 1.2 g/cm³ tür. pH'sı 25°C'de 2'nin altındadır. Erime noktası 18°C dir. Kaynama noktası oluşturduğu çözeltinin derişimine bağlı olarak değişmektedir (110°C-130°C). Molekülde hidroksi grubuyla birlikte karboksi grubu da yer alır ve birlikte alfa hidroksi asit oluşturur. Çözeltide asidik gruptan bir proton kaybeder ve laktat iyonunu ($CH_3CH(OH)COO^-$) oluşturur. Bu iyon suda ve etanolde kolaylıkla çözünür ve hidroskopiktir. Laktik asit enantiyomerik bir bileşiktir yani asimetrik karbon atomuna sahiptir ve bundan dolayı çözeltisi optikçe aktiftir. İki optik izomeri vardır. Biri D-(-)-laktik asit, (Dekstrorotari) olan, sarkolaktik asit; kasların işleyişi sonrasında glikojen yakılmasından dolayı elde edilir. Diğerisi ise L-(+)-laktik asittir (Levotari). L-(+)-laktik asit biyolojik olarak çok önemli bir izomerdir. L-laktat hayvan vücudunda egzersiz ve metabolizma sırasında pirüvattan fermentasyon sonucu LDH enziminin yardımıyla üretilir (Shuler ve Kargi 2008). Laktik asit fermentasyonu doğada *Lactobacillus* bakterileri tarafından gerçekleştirilir. Bu bakteriler ağızda ürettikleri asitle dişlerin tahrip olmasına sebep olurlar. Endüstriyel katkı maddesi olarak E 270 kodu ile tanımlanmaktadır.

2.9.1. Laktik asidin kullanım alanları

Laktik asit başlıca gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda biyopolimerlerin ticarileşmesi ve gelişmesiyle laktik asit kullanımı %20–30 oranında bu alana kaymıştır. Gelecekte laktik asidin, bakteriler tarafından ayrışabilen polimerler için bir hammadde olacağı; çevre dostu çözücülerin üretilmesi ve oksijene olmuş kimyasal olarak da kullanılmasıyla yüksek hacimli üretimlerinin gerçekleşeceği düşünülmektedir. Laktik asit uçucu değildir ve gıda asitlendiricisi olarak kullanımında diğer asitlere göre daha lezzetli ve hafif bir tada sahip olduğu için avantajlıdır. FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (generally recognized as safe) listesinde kabul edilmektedir. Gıdalarda asitlendirici, emülsifiye edici ve tatlandırıcı olarak kullanılmasının yanında lahana ve hıyar turşularında ve sofralık yeşil zeytin üretiminde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Ayrıca birçok şekerli üründe, ekmek ve fırıncılık ürünlerinde, içecekler, sabunlar, süt ürünleri, bira, reçel, jöle, mayonez ve işlenmiş yumurta gibi ürünlerde bakteriyel bozulmaları engelleyici olarak diğer asitlendiricilerle bir arada kullanılmaktadır. Son zamanlarda özellikle balık ve kümes hayvanlarının karkaslarının paketlenmesi ve dezenfekte edilmesinde laktik asit ve tuzlarının çözeltileri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu uygulama ürünlerin işlenmesi boyunca raf ömrünü artırmakta ve *Clostridium botulinum* gibi aneorobik bozulma yapan mikroorganizmaların gelişimini azaltmaktadır (Datta ve Henry 2006). Bunun yanında laktik asit tekstil ve deri endüstrisinde, özellikle derilerin asitlendirilmesi ve yünün asitle boyanması gibi işlemlerde kullanılması açısından geniş bir kullanım alanına sahiptir. Laktik asidin yüksek su tutma kapasitesine sahip olması kozmetik formülasyonlarında nemlendirici olarak kullanılmasına uygundur. Canlılar tarafından parçalanabilir polimer yapılarının olması cerrahide kullanılan ipler, protezler ve ilaç gibi birçok medikal uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır (Sheth 1997, Wee vd 2006). Ayrıca önceden kullanılan kimyasalların atıklarının sorun oluşturması, artan çevresel atık sınırlamaları ve laktik asit kullanımının maliyetinin daha düşük olması laktik asidin gelecekte daha geniş kullanım ve pazar payına sahip olacağını göstermektedir.

Laktik asidin iki fonksiyonel gruba sahip olması birçok kimyasal reaksiyonlara girmesine izin vermektedir. Bu reaksiyonlara örnek olarak kondensasyon, esterifikasyon, indirgeme ve alkol grubunun yer değiştirmesi verilebilir. Bu reaksiyonların ürünleri plastik ve fiberler için polimerler ve bazı kimyasalların formülasyonu için çözücülerdir. Şekil 2.7’de laktik asit kaynaklı potansiyel ürünler ve bunların kullanımı gösterilmiştir (Gupta vd 2007, Datta ve Henry 2006). Özellikle de laktik asidin katalitik distilasyonu sonucu oluşan dilaktit genel olarak laktite dönüşür. Bu bileşik laktik asidin yüksek molekül ağırlıklı polimerlerini yapmak için polimerizasyonda kullanılan ilk hammadde. Laktik asit polimerleri canlılar tarafından parçalanabilen, ısı yolla şekil alabilen özelliktedir. Ayrıca geçirgen olmaları paketleme materyali üretiminde son derece önemlidir. İyi bir raf ömrü sağlamaları yanında kolaylıkla hidrolize olabilmekte ve kompozisyonu kontrol edilebilmektedir.



Şekil 2.7. Laktik asit kaynaklı ürünler ve kullanım alanları (Datta ve Henry 2006)

Laktik asit polimerlerinin özellikleri polistiren, elastik polivinilklorid (PVC) ve vinil klorid gibi petrolden üretilen polimerlerin yapısına benzediğinden dolayı son yıllarda bunlara alternatif olarak kullanılmaya başlamıştır. Sentetik polimerlerin yerine canlılar tarafından parçalanabilir olanlarının kullanılması atıkların ortadan kaldırılması problemini de ciddi bir şekilde azaltmıştır. Laktik asit, çevre dostu adını verebileceğimiz çözücülerin özellikle de etil, propil ve bütillaktat gibi düşük molekül ağırlıklı alkollerin laktat esterlerinin ve propilen glikol, propilen oksit ve akrilik asit gibi oksijenlenmiş kimyasalların üretilmesinde hammadde olarak kullanılabilir (Gupta vd 2007, Datta ve Henry 2006, Datta vd 1995). Çizelge 2.7’de laktik asidin potansiyel ürünlerinin, market hacimleri ve ekonomik değerleri verilmiştir. Laktik asidin dünyadaki market hacmi ABD market hacminin yaklaşık 2 katıdır.

Çizelge 2.7. Laktik asit ürünlerinin market hacmi ve değerleri (Datta ve Henry 2006)

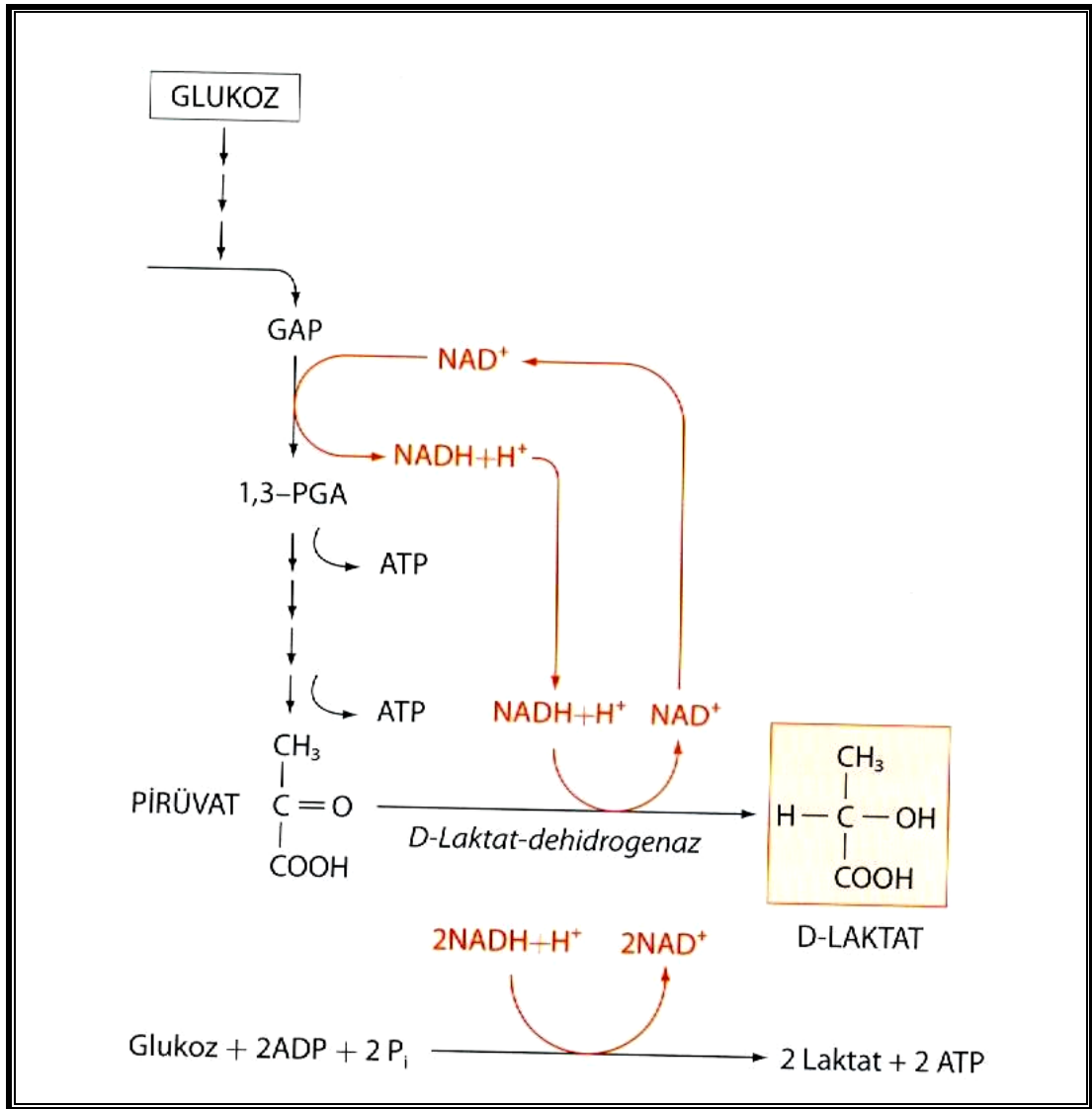
Ürünler	Kullanım Alanları	Dünya Market Hacmi (milyar kg/yıl)	Toplam Değeri (milyon dolar/yıl)
Polimer plastikler	Parçalanabilir ambalajlar, filmler	6.0	3,300
Polimer fiberler	Tekstil	2.0	2,200
Çevre dostu çözücüler	Özel formülasyonlar, temizlik maddeleri	2.0	1,100
Propilen glikol	Humektanlar, gıda endüstrisi	6.0	3,300
Propilen oksit	Poliüretan, plastik	16.0	8,000
Akrilatlar	Polimerler, plastik filmler, kumaşlar	7.2	4,000
	Toplam	39.2	21,900

Sentetik laktik asit, gıda işleme ve gazlı içeceklerde aroma maddesi ve koruyucu olarak kullanılmaktadır. Turşularda ve diğer uygulamalarda asetik asitle birlikte kullanılan laktik asit, mikrobiyel stabiliteyi artırırken ılımlı bir aroma vermektedir. Laktik asit ve asetik asit kombinasyonlarının, salata ve soslar için de etkili bir koruyucu olduğu belirlenmiştir. Bira ve şarapların mikrobiyel stabilite için asidifikasyonu da laktik asidin önemli bir fonksiyonu olup laktik asit bu ürünlerdeki asit indirgeyen bakterilerden etkilenmektedir. Laktik asidin toz formu ise, şekerleme yapımında kendine oldukça geniş yer bulmaktadır. Zira şekerlemelerde, kullanılan aromanın cinsine bağlı olmakla beraber hissedilen meyve tadını arttırıcı ve ağızda daha ferah bir tat bırakıcı etkisi vardır. Laktik asit, eczacılıkta, damla veya şurup şeklinde kullanılır. Sentetik laktik asit, bu sektörlerin dışında, ticari olarak deri tabaklanması ve yünlerin boyanmasında; plastik, solvent, mürekkep ve lak üretiminde hammadde olarak ve sayısız kimyasal proseste katalizör olarak görev yapmaktadır. Laktik asidin L formu inşaat sanayinde betonun asitlik derecesini ayarlama da sitrik aside göre daha etkilidir (Perepelkin 2002, Datta ve Henry 2006, Datta vd 1995).

2.9.2. Laktik asidin üretim teknolojisi

Laktik asit hem kimyasal olarak hem de karbonhidrat fermentasyonu ile üretilmektedir. Laktik asidin biyoteknolojik olarak üretimi kimyasal olarak üretime göre daha düşük maliyetli substrat eldesi, düşük üretim sıcaklığı, düşük enerji tüketimi, yüksek nitelikte ürün eldesi ve istenen L ve D-laktik asit izomerlerini üretebilme gibi avantajlara sahiptir (Singh vd 2006). Laktik asit bakterileri ve bazı mantarlar laktik asidin başlıca mikrobiyel kaynağıdır (Litchfield 1996) ve glukozu önce pürivik aside ve en son olarak da laktik aside dönüştürürler (Şekil 2.8). Ayrıca laktik asit üretimi üzerine yapılan çalışmaların %90'ı bakteriyel fermentasyona odaklanmıştır. Bu bakteriyel türler genellikle *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* (Naveena 2004) familyasına ait olup *Mucor*, *Monilia* ve *Rhizopus* kaynaklı olanları da kullanılmaktadır (John vd 2007, Zhang vd 2007). Laktik asit doğal kaynaklardan elde edildiği gibi yapay olarak da aşağıdaki yollarla elde edilebilir.

Laktik asit bakterileri ve bazı mantarlar laktik asidin başlıca mikrobiyel kaynağıdır (Litchfield 1996) ve glukozu önce pürivik aside ve en son olarak da laktik aside dönüştürürler (Şekil 2). Ayrıca laktik asit üretimi üzerine yapılan çalışmaların %90'ı bakteriyel fermentasyona odaklanmıştır. Bu bakteriyel türler genellikle *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* (Naveena 2004) familyasına ait olup *Mucor*, *Monilia* ve *Rhizopus* gibi fungal kaynaklı olanları da kullanılmaktadır (John vd 2007, Zhang vd 2007).



Şekil 2.8. Glukozdan laktik asit üretim reaksiyonu (Tunail 2009)

Laktik asit bakterileri Gram (+) çubuk ve koklar olup fermentasyon ürünü olarak da laktik asit üretirler. Bu grubun üyeleri fosforilasyon için elektron taşıyıcılar ve enerjiyi sadece substrat düzeyinde fosforilasyon (substrat level fosforilation) yoluyla elde ederler. Tüm laktik asit bakterileri aneorobik olarak çalışırlar. Birçok aneorobların aksine laktik asit bakterileri oksijene hassas değildir ve oksijen varlığında da gelişebilirler. Çoğu laktik asit bakterileri enerjiyi yalnızca şekerin parçalanmasından elde ederler ve yaşama çevreleri de şekerlerin varlığında sınırlandırılmıştır. Laktik asit bakterilerinin alt gruplarının arasındaki önemli fark şekerlerin fermentasyonundan oluşan ürünlerin niteliğine bağlıdır. Birinci grup homofermentatifler olarak bilinir ve sadece fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretir. Diğer grup olan heterofermentatifler ise etanol ve CO₂ gibi ürünleri de üretmektedir (Brock 1984, Davidson vd 1995).

Lactobacillus casei homofermentatif bir bakteri olup genellikle de laktozu fermente eder. *L. casei* tarafından genellikle L(+) formundaki laktik asit üretilir. Bu nedenle *L. casei* laktik asit üretimi için en yaygın kullanılan mikroorganizmalardan birisidir. *L. casei* gelişim için K⁺ ve Mn²⁺ ye ihtiyaç duymaktadır. Yine bunun yanında folik asit, pantotenik asit, riboflavin ve bazı amino asitler *L. casei*'nin gelişimi için önemlidir (Tunail 2009, Madigan ve Martinko 2006).

2.9.3. Laktik asit üretiminde kullanılan hammaddeler

Bu amaçla melas, mısır şurubu, peynir altı suyu proteini, şeker kamışı, şeker pancarı, elma posası ve çeşitli gıdaların işlenmesi sonucunda oluşan atıklar ve glukoz, sakaroz ve laktoz gibi saf şekerler substrat olarak kullanılmaktadır (Panesar vd 2007, Datta ve Henry 2006, John vd 2007). Bunun dışında spesifik karbonhidrat kaynaklarının kullanımı onların ucuzluğu ve saflığına bağlıdır (Nolasco-Hipolito vd 2002). Ayrıca saf şekerlerin kullanımı oldukça pahalı olurken şeker içeren atıkların kullanımı daha avantajlı olmaktadır. Bu atıklar içeriklerine göre asit veya enzimatik hidrolize tabi tutulmaktadır. Yaklaşık olarak aynı etkiye sahip olmalarına rağmen asit hidrolizi ekonomik açıdan uygun olması nedeniyle en çok tercih edilendir (Woiciechowski 2002). Ayrıca bazı durumlarda protein ve protein benzeri diğer kompleks besinlerde organizmalar için gereklidir. Yenilebilir kaynaklardan laktik asit üretimi için

fermentasyon basamakları; şekerleri hidroliz etmek için subsrata ön işlem uygulanması, fermentasyon, bakterilerin ve katı partiküllerin fermentasyon ortamından ayrılması ve laktik asidin saflaştırılması olarak sıralanabilir. Çalışma ortamının pH'sı 5-6 civarında tutulmakta ve nötralizasyon amacıyla kalsiyum hidroksit/karbonat da kullanılabilir. Fermentasyon yaklaşık olarak 2-4 gün arasında tamamlanmaktadır. Optimum çalışma sıcaklığı, kullanılacak mikroorganizma türüne bağlı olmakla birlikte 25-35°C civarındadır. Keçiyoynuzu posası zengin şeker içeriği, azotlu bileşik ve mineral madde varlığı ile iyi bir substrat niteliğinde olup, zenginleştirmek için diğer substratlara göre daha az isteklere sahiptir.

Laktik asit üretiminde glukoz, sakaroz ve laktoz gibi saf hammaddeler kullanılması yanında ticari üretimlerinde hidrokarbonlar, nişasta içeren ürünler ve melas gibi farklı hammaddeler de kullanılmaktadır (Hofvendahl ve Hagerdal 2000) (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.8. Laktik asit üretiminde kullanılan bazı hammadde ve mikroorganizmalar (Hofvendahl ve Hagerdal 2000)

Hammadde	Mikroorganizma
Glukoz	<i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i>
Sorgum	<i>L. plantarum</i>
Melas	<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>
Laktoz	<i>L. rhamnosus</i>
Mısır nişastası	<i>L. amylovorus</i>
Patates nişastası	<i>L. amylovorus</i>
Arpa unu	<i>L. casei</i>
Mannoz	<i>L. pentosus</i>
Tatlı sorgum	<i>L. paracasei</i>

Demirci ve Pometto (1995) tarafından çeşitli ve saf kültürlerde laktik asit üretilen bir çalışmada yulaf kabuğu ve zein bulunan kültürde yapılan üretimde

maksimum laktik asit konsantrasyonu 60 g/L olarak bulunmuştur. Fermentasyonla laktik asit üretimi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ancak keçiyoynuzu meyvesinin laktik asit üretimi üzerine kapsamlı olarak kullanıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Ruengruglikit ve Hang (2003) mısır koçanından *Rhizopus oryzae* NRRL-395 kullanarak laktik asit üretmişlerdir. Bu amaçla mısır koçanlarına enzim uygulanarak polisakkaritlerin parçalanması sağlanmaktadır. Bunun yanında bazı deniz ürünleri atıkları da laktik asit üretiminde kullanılabilir. Bu amaçla Gao vd (2006) balık atıklarına asit-baz hidrolizi uygulayarak elde ettiği besiyerinden laktik asit üretmiştir.

Göksungur ve Güvenç (1997) şeker pancarı melasını laktik asit üretiminde kullanmış ve maksimum verimi şeker tüketimi üzerinden %95.4 olarak bildirmişlerdir. Bunun yanında farklı azot kaynaklarının L-laktik asit üzerine etkisini incelemişler ve maya ekstraktı ile gerçekleşen sürekli fermentasyondan en iyi sonucu almışlardır.

Nişasta ve gıda atıklarından laktik asit üretilen bir çalışmada, Ohkouchi ve Inoue (2006) *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011 kullanarak 19.5 g/l L-laktik asit üretmişlerdir. Bunun yanında fermentasyonu etkileyen pH, enzim uygulaması ve mineral kompozisyonun laktik asit üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Ayrıca genetik olarak geliştirilmiş *Saccharomyces cerevisiae* D-laktik asit üretiminde kullanılmış ve %53 oranında verim elde edilmiştir (Ishida vd 2006). Tarımsal atıklar ve ucuz hammaddeler (arpa unu, beyaz un gibi) kullanılarak laktik asit üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, Oh vd (2005) maksimum 38 g/l laktik asit, 2.3 g/l biyokütle ve 0.88 g/l/h laktik asit verimliliği elde ettiklerini bildirmişlerdir. Soya fasulyesi ve baklagil lifleri, mısır koçanı ve buğday sapı gibi tarımsal atıklar *Lactobacillus delbrueckii* ve *Lactobacillus plantarum* kullanılarak laktik asit üretimlerinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, Sreenath vd (2001) maksimum laktik asit miktarını (44 g/100 g fiber), *Lactobacillus plantarum*'un kullanıldığı ve baklagil liflerini içeren fermentasyon ortamından elde etmişlerdir. Benzer bir çalışmada besiyeri olarak mısır koçanı kullanılan bir çalışmada, immobilize *L. delbrueckii* ile laktik asit

üretimleri gerçekleştirilmiş ve maksimum 48.7 g/l laktik asit üretilebilmiştir (Shen ve Xia 2006).

Berry vd (1999) laboratuarda hazırladıkları özel besiyerinde *Lactobacillus rhamnosus* kullanarak kesikli sistemde laktik asit üretmişlerdir. Yeni geliştirilmiş besiyeri kullanarak gerçekleşen fermentasyonda biyokütle miktarı 10.5 g/l, laktik asit konsantrasyonu 67 g/l ve verim ($Y_{P/S}$) 0.84 olarak bildirilmiştir.

Sürekli sistem kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde çeşitli karbon kaynakları, mikroorganizma tipleri ve fermentasyon şartları uygulanarak laktik asit üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bruno-Barcena vd (1999) *Lactobacillus casei* kullanarak azot kaynaklarının laktik asit üretimi üzerine etkisini ikili fermentasyon sisteminde çalışmışlardır. Bunun sonucunda maksimum laktik asit miktarı olarak 48 g/l elde etmişlerdir. Benzer bir sistem kullanılan bir çalışmada, Ohashi vd (1999) melastan *L. lactis* kullanarak laktik asit üretmişlerdir. Maksimum laktik asit miktarı 46 g/l olurken, laktik asit verimliliğinin 10.6 g/l/h olduğunu bildirilmiştir.

Laktik asit genellikle glukoz, sakkaroz ve laktozun fermentasyonu ile elde edilir. Bu nedenle nişasta enzimatik yolla veya asitlerle maltoz ve glukozu hidrolize olur. Pentozlardan ksiloz ise *L. pentoacidicus* tarafından fermente edilir ve başlıca laktik asit ve asetik asit oluşturur. Laktik asit üretiminde karbonhidrat kaynağı olarak hammaddenin seçiminde materyalin ekonomik olması göz önünde bulundurulur (Brown 2003).

Peynir altı suyu protein, vitamin ve minerallerin yanı sıra yaklaşık olarak süt laktozunun %50 sini de içermektedir. İçinde bulunan protein genellikle saflaştırılarak marketlerde peynir altı suyu proteini olarak satılmaktadır. Süt endüstrisinden kaynaklanan atık sularda en büyük kirlilik kaynağını, peynir üretimi sonucu oluşan ve kirletici vasfı yüksek olan peyniraltı suları oluşturmaktadır. Özetle, peynir için işlenen 100 kg süttten, yaklaşık 90 kg peyniraltı suyu oluşmaktadır (Brown 2003).

2.9.4. Laktik asit fermentasyonu

Laktik asit fermentasyonu, oksijen yokluğunda bazı bakteri ve hayvan hücrelerinde görülen bir fermentasyon biçimidir. Normalde, glukoz glikoliz yoluyla parçalanır, iki molekül ATP, iki molekül NADH ve iki molekül pirüvat elde edilir. Ancak, NADH moleküllerinde bulunan hidrojen atomunun başka bir moleküle aktarılarak NAD^+ 'nın tekrar oluşturulması yeni glukoz moleküllerinin parçalanmaya devam edebilmesi için gereklidir. Ortamda yeterli oksijen olduğu zaman NADH molekülünde bulunan hidrojen bir takım ara moleküller aracılığıyla sonunda oksijene aktarılır ve glikolizin ilk aşamalarında ortaya çıkan bir hidrojen iyonu da kullanılarak bir molekül su meydana gelir. Bu süreç sırasında hücreye enerji sağlayan ek ATP molekülleri açığa çıkar. Ortamda oksijen bulunmadığı zaman pirüvatın laktik aside dönüşmesi NADH'den tekrar NAD^+ elde edilmesini sağlar. Laktat daha fazla parçalanamasa dahi NAD^+ yenilendiği için yeni glukoz moleküllerinin parçalanmasında kullanılabilir, az miktarda ATP üretimi sağlanır. Laktat hücreden dışarı difüzyonla çıkar (Madigan ve Martinko 2006).

Laktik asit fermentasyonu neolitik çağdan beri kullanılmıştır. Laktik asitin etkisiyle gıda asitlenir, bu da bozulmaya neden olacak mikroorganizmaların büyümesini engeller, hatta öldürebilir. Sütün ekşimesinden elde edilen yoğurt, tuzsuz beyaz peynir ve birçok turşu bunun örnekleri arasında sayılabilir. Hayvancılıkta yem rasyonlarına katılması amacıyla bazı yem bitkileri laktik asit fermentasyonu yoluyla silaja dönüştürülür. Bu şekilde yeşil yemin bozulmadan uzun süre saklanması sağlanmış olur.

2.9.5. Laktik asit geri kazanımı (recovery)

Fermentasyon ile üretilen laktik asit, fermentasyon ortamından ayrılarak saflaştırılabilir. Geri kazanım işleminin ilk basamağında fermentasyon ortamının sıcaklığı, mikroorganizmaları öldürmek, proteinleri koagüle etmek, kalsiyum laktatı çözündürmek ve bazı şekerlerin degrade olmasını sağlamak amacıyla 80–100°C'ye, pH'sı ise 10-11'e yükseltilir. Sıvı içinde askıda kalmış katı parçacıklar ve

mikroorganizmalar filtrasyon yoluyla fermentasyon ortamından ayrılır. Tuzu laktik aside dönüştürmek ve çözünmez kalsiyum sülfatı filtrasyonla ayırmak için, kalsiyum laktat içeren fermente olmuş sıvı karbon ile muamele etmek gerekmektedir. Bu aşamadan sonra evapore edilen karışım çoğunlukla sülfürik asit ile asitlendirme işlemine tabi tutulmaktadır. Laktik asit solüsyonu karbonla muamele edilip iyon değiştiriciden geçirildikten sonra evapore edilerek arzu edilen saflıkta laktik asit elde edilir. Buna alternatif olarak da, sülfürik asitle dekompose edilip filtrasyonla ayırdıktan sonra kalsiyum laktat evoparasyonla fermentasyon ortamından geri kazanılabilir (Datta vd 1995, Lydersen 1994, Harrison 2003). Bunun yanında iyon değiştiriciler de kullanılarak laktik asidin geri kazanımı yaygın olarak kullanılmaktadır (Choi vd 2002).

Fermentasyon işlemi için kullanılan hammaddeler birçok safsızlık içerdiğinden dolayı kompleks ayırma tekniklerine ihtiyaç duyulmakta, dolayısıyla fermentasyonla laktik asit üretiminin toplam maliyetinin büyük bir kısmı geri kazanım işleminden kaynaklanmaktadır (Wasewar 2005, Datta vd 1995, Basmadjian 2007).

2.10. Deneysel Tasarım Yöntemleri

Birçok deneysel araştırma programlarında, çok sayıda faktörün olası etkilerini belirlemek için faktörleri birbirleriyle karşılaştırmak gerekmektedir. Tasarım yöntemlerinde deneysel değişkenler “faktör”, değişkenin özel değeri de “faktör seviyesi” olarak adlandırılır. Deneysel tasarım yöntemlerinde belirlenmesi gereken aşamalar şunlardır;

- Problem tanımlanır
- Faktörler, seviye ve aralık seçilir
- Cevap değişkeni seçilir
- Deneysel tasarım deseni yapılır
- Deneyler yapılır
- Regresyon analizi ile regresyon katsayıları belirlenerek değişkenlerin verim üzerine etkisi belirlenir.
- Verilerin istatistiksel analizi yapılır
- Sonuçlar değerlendirilir

2.10.1. Cevap yüzey metodu

Gıda endüstrisinde uygulanması planlanan çeşitli faktörlerin, matematiksel olarak modellenmesi son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Matematiksel modelleme, yapılan araştırmalarda; çok fazla sayıda tekerrür gerektiren durumlarda veya ilgili deneysel çalışmaları yapma imkanının sınırlı olduğu hallerde, büyük fayda sağlamaktadır (Devres ve Pala 1993). Cevap yüzey metodu proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli bir takım istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Genel olarak cevap yüzeyi metodu uygulamalarının doğasını bir dizi istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birbiri ardına uygulanması ve her bir aşamada elde edilen verilerin bir sonraki aşamada kullanılması oluşturmaktadır. Bunun yanında gıda endüstrisinde bu işlem özellikle ürün geliştirme ve diğer alanlarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Çok az sayıdaki deneysel veriler bu metodun

kullanılmasıyla gerçekte test edilmesi zor veya olanaksız olan değerler ve bunların kombinasyonlarıyla ilgili geçerli sayılabilecek tahminlerin yürütülmesine olanak sağlamaktadır. Günümüzde bilinen klasik metotların kullanımının yetersiz kaldığı alanlarda maksimum sayıda sonucun elde edilmesini sağlayan cevap yüzey metodunun geçerliliği, araştırmalara ve uygulamalara olan katkısı her geçen gün artmaktadır (Tekin 2009, Eren 2004, Myers ve Montgomery 1995).

Bu yöntemde ilk olarak regresyon analizi yardımıyla bir model oluşturulur. Öncelikle sistemi karakterize edebilecek performans ölçütleri (cevaplar) ve bunlar üzerinde etkili olabilecek faktörlerin veya değişkenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu aşamada araştırmacının proses hakkında teknolojik bilgiye sahip olması, bu faktörlerin belirlenmesi ve işletme bölgesi (operating region) üzerinde bir deneme bölgesinin (region of interest) seçilmesi açısından büyük bir kolaylık sağlamaktadır. Oluşturulacak deneme düzenlerinde, regresyon modelleri meydana getirilirken bu iki kriter baz alınarak oluşturulur. Önemli değişkenler ve deneme bölgesi belirlendikten sonra bağımsız değişkenlerin deneme bölgesi içerisinde belirlenen seviyelerinin sisteminde cevabında oluşturdukları değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlenmektedir. Optimum noktaya yaklaştıkça, oluşturulan cevap yüzeyindeki eğrilik doğal olarak daha belirgin hale gelmektedir (Tekin 2009, Eren 2004, Myers ve Montgomery 1995).

Deneysel çalışmalarda farklı düzeylerde farklı deneme desenleri oluşturulabilir. İki düzeyli faktörlerde deneme deseni 2^k faktöriyel deneme düzenleri şeklinde adlandırılır. Oluşturulan model genellikle ana etkileri ve birinci dereceden interaksiyon etkilerini gösterir. Bu şekilde oluşturulan modeller birinci dereceden modeller olarak adlandırılır ve bu model aşağıdaki eşitlik 2.10'da verilmiştir.

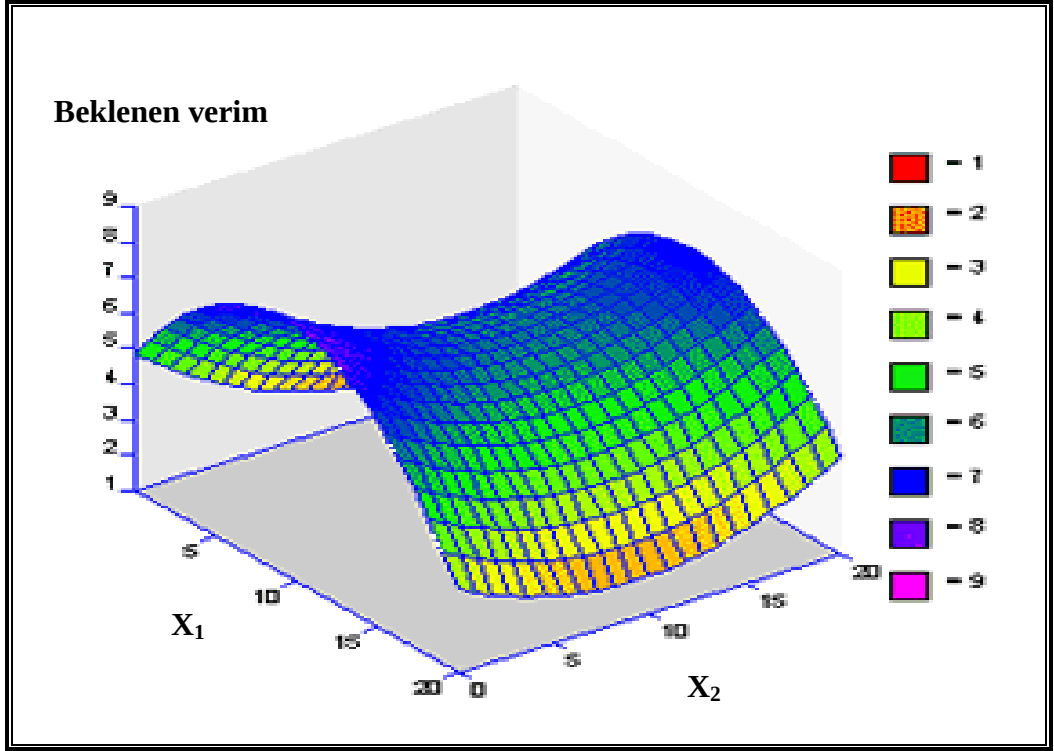
$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad (2.10)$$

Üç faktör düzeyi olan deneme düzenleri karesel yapıda olup ikinci dereceden interaksyon terimleri ile karesel ilişkileri de içerebilir. Bu şekilde meydana getirilen modeller ikinci dereceden bir model olarak eşitlik 2.11’de verilmiştir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \epsilon \quad (2.11)$$

Üç düzeyli faktörlerden oluşan deneme düzenlerine “Central Composit ve Box-Behnken deneme düzenleri” adı verilir. Bu tip deneme düzenlerinde ikinci dereceden bir modelin optimum noktası “ridge analiz” yardımıyla sağlanır. Cevap Yüzey Metodunun uygulanması esnasında; ne kadar tekrar gerektiği, optimum noktanın bulunduğu bölgenin yeri, fonksiyonun yaklaşım tipi, uygun deney tasarımının seçimi ve süreç değişkenleri (cevaplar) üzerinde transformasyonların gerekip gerekmediği hakkında bilgi edinilebileceği bildirilmiştir (Myers ve Montgomery 1995). Birçok farklı deneme düzeni içermesi sebebiyle cevap yüzey metotlarının kullanımı oldukça yaygındır. Bu yöntem özellikle endüstriyel uygulamalarda oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olmasına karşın ülkemizde yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır. Özellikle gıda endüstrisinde kullanılabilirliği ve faydası oldukça yüksek bir yöntemdir (Tekin 2009).

Cevap yüzey metodundan faydalanılarak, az sayıda deneysel çalışmalar kullanılarak gerçekte test edilemeyen faktör değerleri ve bunlardan sağlanan kombinasyon değerleri hakkında tahminler yapılabilmektedir. Cevap yüzey metodunu daha rahat görmek üzere, sabit bağımlı değişkenin doğruları X_1 , X_2 ekseninde çizilir ve buna kontur plot (contour plot) adı verilir (Şekil 2.9). Böylelikle X_1 ve X_2 ’nin cevap yüzeyinde meydana getirdiği değişiklik kolaylıkla anlaşılabilir. Bir ya da daha fazla ölçülebilen değişkenle, girdi değişkenleri arasındaki regresyon modelinin deneysel olarak tanımlanması ve bu modele göre bağımsız değişkenin maksimum ve minimum seviyeleri arasında bağımlı değişkenin cevap yüzey incelenmesine dayanır (Kuehl 2000).



Şekil 2.9. Cevap yüzey metodu kontur plot grafiği

2.10.2. Box-Behnken yöntemi

Box ve Behnken tarafından 1980 yılında ortaya konan bu deneme düzenleri ikinci dereceden cevap yüzeylerinin modelini oluşturmak için etkili bir yöntemdir. Modelde yer alacak faktörlerin en az üç düzeyli olması gerekir. Box-Behnken deneme düzeninde faktörlerden birinin değeri merkez değerinde sabitlenirken diğer faktörlerin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanır. Çizelge 2.9’da görüleceği gibi ilke önce A faktörünün düzeyi sabitlenmiş B ve C faktörlerinin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanmış ve daha sonra aynı işlemler sırasıyla B ve A faktörlerinin düzeyleri merkezde sabitlenerek uygulanmıştır. Düzen matrisinin en son sütunlarında is merkez nokta değerleri yer almaktadır (Kul 2004).

Box-Behnken tasarım yönteminde deney sonuçları bir model eşitliği ile ifade edilir. Bu yöntemin faydalı yanı endüstriyel boyuttaki uygulamalarda da kullanılabilmesidir (Box and Behnken 1960). Bir ya da daha fazla ölçülebilen

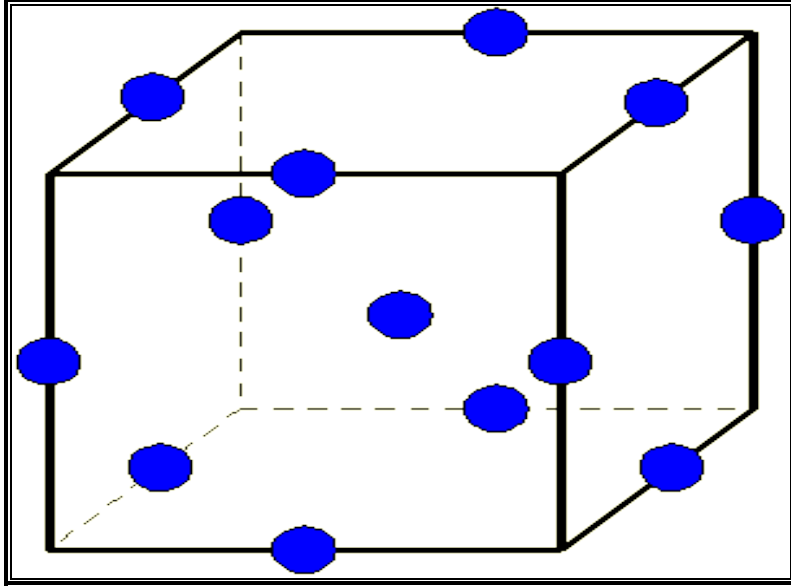
değişkenle, girdi değişkenleri arasındaki regresyon modelinin deneysel olarak tanımlanması ve bu modele göre bağımsız değişkenin maksimum ve minimum seviyeleri arasında bağımlı değişkenin cevap yüzeyinin incelenmesine dayanır (Kuehl 2000).

Çizelge 2.9. Üç faktörlü Box-Behnken deneme düzenleri (Kuehl 2000)

Sıralama	Box-Behnken Deneme Düzeni		
	A	B	C
1	-1.00	-1.00	0.00
2	1.00	-1.00	0.00
3	-1.00	1.00	0.00
4	1.00	1.00	0.00
5	-1.00	0.00	-1.00
6	1.00	0.00	-1.00
7	-1.00	0.00	1.00
8	1.00	0.00	1.00
9	0.00	-1.00	-1.00
10	0.00	1.00	-1.00
11	0.00	-1.00	1.00
12	0.00	1.00	1.00
13	0.00	0.00	0.00
14	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0,00

Bu metodun, örnek sayısı ve tekerrürlerin sayısını azaltma gibi avantajları vardır. Buna göre kenarların (maksimum ve minimum değerler) orta noktalarındaki denemeleri (3 seviyeli 3 faktör için 12 kenar; 12 veri noktası) ve faktör alanının merkezinin analizini tavsiye etmektedir. Burada merkez noktası 3 defa tekrarlanarak elde edilen data sayısı 15 olur. Faktöriyel dizayn denemelerinde bu gibi durumlarda 27 veri noktası (3 faktör*3 parametre*3 tekerrür) bulunurken Box-Behnken metodunda 3

faktörlü bir deneme için 15 veri noktası bulunmaktadır (Şekil 2.10). Box-Behnken metodu genellikle her bir faktör için özel olan minimum (-1.00), maksimum (+1.00) ve orta değerlerin (0.00) kombinasyonuna sahiptir (Çizelge 2.9). Bu metot kullanılarak en az veri noktalarıyla sistem daha etkili olarak modellenebilmektedir (Sablani vd 2006).



Şekil 2.10. Box-Behnken model tanımı (Sablani vd 2006)

Cevap yüzey metotları bir veya daha fazla değişkeni ve faktörleri veya kantitatif deneysel değişkenlerin hazırlanması arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılmaktadır. Bu metot önceden tanımlanabilen çalışma için gerekli olan ve kontrol edilen faktörleri ve sonra da elde edilen verilerin optimize edilmesinde sık sık kullanılmaktadır. Bu tip dizaynlar özellikle çalışmalarda elde edilen eğimlerin doğruluğundan şüphe edildiği zaman kullanılır.

Görüldüğü gibi cevap yüzey metotları, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin cevabını ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin cevabında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir.

Dolayısıyla, denemelerin dizayn edilmesi, model geliştirilmesi (regresyon analizi), varyans analizi (ANOVA) ve optimizasyon cevap yüzey metodunun başlıca kısımlarını oluşturmaktadır (Eren 2004). Bunların yanında;

Cevap yüzey metotları;

- a) Faktörlerin kurulumunda (işlem şartları) en iyi sonuçları belirlemek için
- b) Faktör kurulumundaki memnun edici işlem veya proses şartlarını bulmak için
- c) Mevcut şartlardaki kalitenin üzerinde sonuçlar elde edebilmek için yeni işlem şartlarının belirlenmesinde
- d) Kantitatif faktörler ve sonuçlar arasındaki ilişkili modeli ortaya koymak için

genel olarak kullanılmaktadır (Sablani vd 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Proje kapsamında kullanılan kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış 5-7 mm kalınlığında keçiboynuzu meyvesi, Antalya’da keçiboynuzu meyvesini ve işlenmiş ürünleri ihraç eden bir firmadan sağlanmıştır. Kırılmış keçiboynuzu meyvesi analiz anına kadar 4°C’lik soğuk depolarda saklanmıştır. Ayrıca fermentasyon ortamına eklenen maya ekstraktı yerine alternatif olarak kullanılan azot kaynakları; tavuk eti tozu (Poultry Meal), kabuk ve tırnak karışım tozları (Hull and Fines Mix), tüy tozları (Feather Meal) ve et ve kemik tozları (Meat-Bone Meal) Griffin Şirketi (Butler, KY, USA)’nden sağlanmıştır. Ek-1’de fermentasyon ortamında kullanılan alternatif azot kaynakları ve kimyasal bileşimleri (Anonim 2007) görülmektedir.

3.2. Ekstraksiyon ve Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Method)

Keçiboynuzu meyvesinden çözünür kuru madde miktarı yüksek ekstrakt elde etmek amacıyla kullanılan ekstraksiyon işleminin şartlarını optimize etmek ve değişken parametrelerden bir veya daha fazlasının aralarındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Bu metodun faktöriyel düzendeki deneme desenine karşı (3 faktör*3 seviye*3 Tekerrür=27), örnek ve tekerrür sayısının azalması (3 faktörlü 3 seviye=12 köşe ve 3 merkez nokta tekrarı olmak üzere toplam 15) gibi avantajları vardır. Minitab (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) istatistik programı ile keçiboynuzu için literatürde (Turhan vd 2006) belirlenmiş olan maksimum ve minimum noktaları verilen parametrelerin kullanılmasıyla bu meyve için en iyi ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Cevap yüzey metodunda kullanılmak üzere ekstraksiyonu etkileyen parametrelerin maksimum ve minimum noktaları belirlendikten sonra, denemelerin gerçekleştirileceği şartlar program tarafından oluşturulmuştur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. Cevap yüzey metodu için ekstraksiyon parametreleri (Turhan vd 2006)

Değişken	Minimum	Orta Nokta	Maksimum
Sıcaklık	70°C	80°C	90°C
Süre	1 saat	2 saat	3 saat
Meyve:su oranı	1:4	1:6.5	1:9

3.3. Keçiboynuzu Meyvesinden Ekstrakt Üretimi

Keçiboynuzu meyvesinden fermentasyonla etanol ve laktik asit üretiminde kullanılacak ekstraktın üretiminde, literatürden (Turhan vd 2006) belirlenmiş olan parametrelere göre cevap yüzey metodu (Response Surface Method)'nun oluşturduğu şartlarda (Çizelge 3.2) üretimler yapıldıktan sonra ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Cevap Yüzey Metodu için maksimum ve minimum noktalar girildikten sonra, orta noktalar program tarafından oluşturulmaktadır. Bunun yanında tüm parametrelerin orta noktaları (center point) 3 kez tekrarlanarak tekerrür işlemi gerçekleştirilmektedir. Buradaki önemli husus orta noktada 3 kez tekrarlanan ekstraksiyon işleminden elde edilen ekstraktlara ait şeker içeriklerinin arasında istatistiksel olarak fark olmamasıdır. Bu tez çalışmasındaki ekstraksiyon işlemleri Amerika Birleşik Devletleri Pennsylvania State Üniversitesi University Park Kampüsü'nde Prof.Dr. Ali DEMİRCİ'nin laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Keçiboynuzu meyvesinin optimum ekstraksiyon şartlarını belirlemek için sıcaklığı ayarlanabilir su banyosu kullanılmıştır. Bu amaçla her üretimde 100 g keçiboynuzu meyvesi kullanılırken tüm üretimler üç kez gerçekleştirilmiştir. Her bir sıcaklık için (70°C, 80°C ve 90°C) su banyosu ayrı ayrı ayarlandıktan sonra, meyve:su oranlarına uygun olarak beherlere istenilen sıcaklıkta su doldurulmuş ve su banyosuna bırakılmıştır. Beher içerisindeki su ve su banyosunun sıcaklığı dengeye geldikten sonra (buradaki bir miktar su buharlaşması ihmal edilmiştir) meyveler beherlerin içerisine boşaltılarak ekstraksiyon işlemi başlatılmıştır. Ekstraksiyon işlemi başlatıldıktan sonra 15 dakika aralıklarla beherin içi, çökmeyi engellemek için bir miktar karıştırılmıştır. Ekstraksiyon süresi tamamlanan örnek su banyosundan alınarak katı partiküllerin (5-7

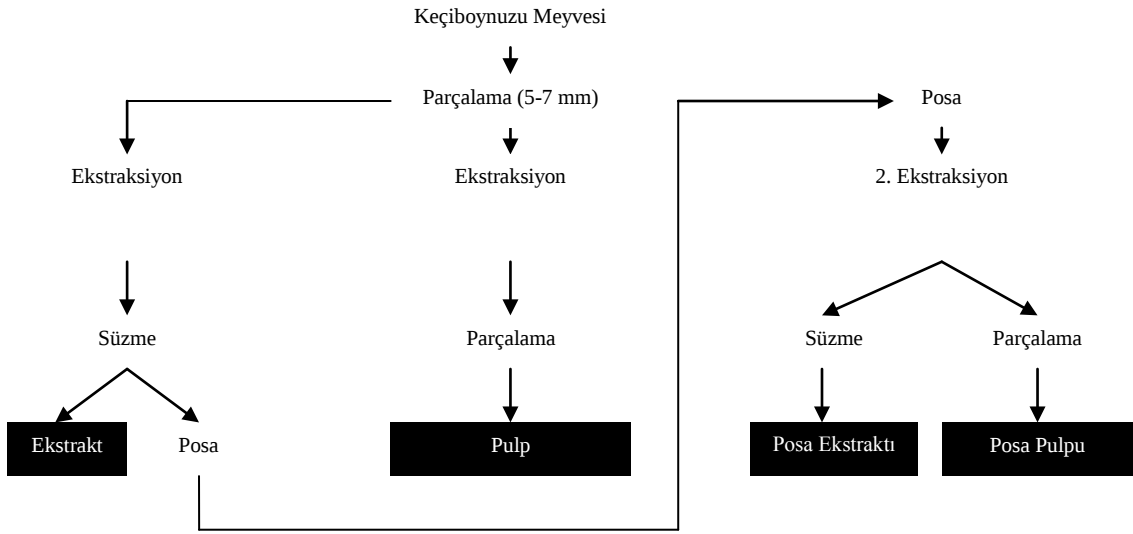
mm) geçmeyeceği bir süzgeçten süzülerek analiz anına kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir. Elde edilen ekstraktta şeker analizleri yapılarak, veriler Cevap Yüzey Metodu’nda ilgili yerlere optimum şartları belirlemek amacıyla yazılmıştır. Aynı sıcaklık denemelerine ait örnekler su banyosunda bir seferde ekstrakte edilmiştir. Örneğin 70°C’de gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinde tüm denemeler (Örnek No 1, 2, 3 ve 4) aynı anda yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Cevap yüzey metodu’nun ekstraksiyon için belirlediği şartlar

Örnek No	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Meyve:su oranı
1	70	1	1:6.5
2	70	2	1:4.0
3	70	2	1:9.0
4	70	3	1:6.5
5	90	1	1:6.5
6	90	2	1:4.0
7	90	2	1:9.0
8	90	3	1:6.5
9	80	1	1:4.0
10	80	1	1:9.0
11	80	3	1:4.0
12	80	3	1:9.0
13	80	2	1:6.5
14	80	2	1:6.5
15	80	2	1:6.5

Cevap yüzey metodunun belirlediği şartlarda ekstraksiyon işlemleri yapıldıktan sonra, ekstraktların şeker içeriği analiz edilmiştir. Bunun sonucunda program tüm verileri değerlendirmiş ve fermentasyon işleminde kullanılmak üzere optimum ekstraksiyon koşullarını (80°C, 2 saat ve 1:4 meyve:su oranında) belirlemiştir.

Keçiboynuzu meyvesinden etanol ve laktik asit üretiminde fermentasyon ortamında kullanılacak ekstraktın üretimi için uygulanan metotlar aşağıda gösterilmiştir. Üretimler tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her fermentasyon işlemi için 1.5L substrat hazırlanmıştır. Ekstraksiyon sonucu hazırlanan substrat fermentasyon anına kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Keçiboynuzu meyvesinin fermentasyonunda kullanılacak ürünler

Fermentasyon ortamında kullanılan keçiboynuzu meyvesinin farklı ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanmış farklı kombinasyonları yukarıda görülmektedir. Bu amaçla 5-7 mm kalınlığındaki keçiboynuzu parçaları cevap yüzey metodu ile belirlenen optimum şartlarda (80°C, 2 saat ve 1:4 meyve:su oranında) ekstrakte edilmiştir. Her bir üretim işlemi 1.5 kg keçiboynuzu meyvesi 80°C’deki 6 litre su kullanılarak 2 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra **ekstrakt (E)** süzme yoluyla katı partiküllerinden ayrıldıktan sonra doğrudan fermentasyonda kullanılmıştır. Buna ilave olarak pulp denemeleri için, ekstraksiyondan sonra keçiboynuzu parçaları ekstrakttan ayrılmadan meyve parçalayıcıda parçalanarak elde edilen **pulp (P)** da fermentasyon amacıyla kullanılmıştır.

Ayrıca ekstraksiyondan arta kalan ve yüksek miktarda şeker içeren posa ilk üretimde olduğu gibi ikinci kez ekstraksiyona bırakılmış ve meyve parçalarından ayrılarak **posa ekstraktı (PE)** elde edilmiştir. Bunun yanında posa ekstraktı ikinci kez ekstraksiyona bırakıldıktan sonra meyve ayrılmadan, birlikte parçalanarak **posa pulpu (PP)** üretilmiştir (Şekil 3.1). Hem posa ekstraktı hem de posa pulpu ayrı ayrı doğrudan ve zenginleştirilerek fermentasyona bırakılmıştır.

3.4. Fermentasyonda Kullanılan Reaktör

Etanol ve laktik asit üretimlerini gerçekleştirmek amacıyla laboratuvar tipi; pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen kontrolü ve köpük kontrolü yapabilen, karıştırma özelliğine sahip ikili biyoreaktör (Sartorius Biostat B Plus Twin, Allentown, PA, USA) kullanılmıştır (Ek-2). Ayrıca karıştırma esnasında girdap oluşumunu engellemek amacıyla reaktör içerisine dalga kıran (baffle) yerleştirilmiştir. Reaktör 121.1°C’de 20 dakika sterilize edilerek pH ayarlanması 4N NaOH ile gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işleminden önce reaktör içerisindeki pH değerinin doğru kontrol edilebilmesi için pH ölçüm probu kalibre edilmiştir. Çalışma sıcaklığı etanol fermentasyonu için 30°C, laktik asit fermentasyonu için ise 37°C’de sabit tutulmuştur. Proje kapsamındaki bütün denemeler 1.5L çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Liyofilize kültürün alınmasından örneklerin analizine kadar gerçekleştirilen işlemler Ek-3’de verilmiştir. Keçiboynuzu meyvesinden laktik asit ve etanol üretiminde ekstraksiyon işlemlerinin yanı sıra tüm fermentasyon denemeleri de Amerika Birleşik Devletleri Pennsylvania State Üniversitesi University Park Kampüsü’nde Prof. Dr. Ali DEMİRCİ’nin laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.5. Fermentasyonla etanol üretimi

3.5.1. Mikroorganizma

Bu çalışmada keçiboynuzu meyvesinden etanol üretiminde kullanılan *S. cerevisiae* (ATTC 24859) mayası Pennsylvania State Üniversitesi Tarım ve Biyoloji Mühendisliği (Agricultural and Biological Engineering) Bölümü'nde öğretim üyesi Prof.Dr. Ali Demirci'nin laboratuvarından alınmıştır. Fermentasyonda kullanılabilir duruma getirilmesi gerektiği için liyofilize halinden aktif hale geçirilen mikroorganizmanın, uygun besiyerine (Çizelge 3.3) ekilerek üremesi ve daha sonra üreme ortamında sayısal olarak çoğalması sağlanmıştır. Üreme ortamından, eksponensiyel bölgenin zaman diliminde alınan mikroorganizmalar, keçiboynuzu ekstraktına inoküle edilmiştir.

3.5.2. Kültürleme ve mikroorganizmanın hazırlanışı

Mikroorganizmaların bulundukları ortamdan belirli tekniklerle alınarak uygun bir besiyerine aktarılmasına (Çizelge 3.3) ve burada gelişmelerinin sağlanmasına "kültürleme" denir. Kültürler genellikle buzdolabında (0-5°C) muhafaza edilmektedir. Ayrıca kültürleri dondurarak (derin dondurucuda -20°C, sıvı azot içinde -196°C) donmuş halde veya liyofilize stok kültürlerini hazırlayarak kuru formda, canlılık ve aktivitelerini yitirmeden uzun süre saklamak mümkündür. Reaktörde canlı, genç, dinamik ve gelişimi devam ettiği kabul edilen daha doğrusu logaritmik olarak çoğalmanın ve özgül gelişme hızının maksimum olduğu mayaların kullanılması amacıyla *S. cerevisiae* mayasının öncelikle tüplerde gelişimi sağlanmıştır. Bu amaçla içeriği Çizelge 3.3.'deki gibi hazırlanan 9 ml medya içeren tüplere 1 ml maya kültürü eklendikten sonra 48 saat 30°C'de bekletilerek gelişme sağlanmıştır. Elde edilen stoklar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Reaktöre inokülasyon yapılacağı zaman miktarı çoğaltmak amacıyla 100 ml aynı içerikteki medya içine 1 ml stok kültür eklenerek 30°C'de 24 saat gelişimi beklenmiş ve sterilize edilmiş reaktöre %1 oranında inokülasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.3. *Saccharomyces cerevisiae* için gerekli besiyeri bileşimi (Demirci vd 1997)

Medya İçeriği	Miktar (g/L)
Glukoz	50
Maya Ekstraktı	6
Kalsiyumklorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.3
Amonyumsülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	4
Magnezyumsülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1
Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4)	1.5

Saccharomyces cerevisiae gelişimi için Çizelge 3.3'deki bileşikler 1 litre saf su içerisinde çözündürülerek besiyeri hazırlanmıştır. Daha sonra 25 ml'lik 10 adet tüpe, her birine 9 ml hazırlanan besiyerlerinden aktarılmıştır. Bunun yanında 250 ml'lik 9 tane erlenmayere 100 ml aynı besiyerinden eklenerek, otoklav tepsisine yerleştirilmiş 121.1°C 'de 20 dakika sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri soğutularak kullanım anına kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Reaktöre inokülasyon yapılması amacıyla 30°C 'de 24 saat bekletilmiş stok kültürden reaktöre aşılama yapıldıktan sonra kalan kısım %20'lik gliserolde saklanmak üzere ayrılmıştır. Bu amaçla 1L'lik besiyeri içeren ortama %1 (10 ml stok kültür) inokülasyon gerçekleştirilerek 30°C 'de 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra 30,000 d/d'da 15 dakika santrifüj edilmiş ve berrak kısım ayrılmıştır. Mikroorganizma içeren katı kısım %20'lik gliserol ile karıştırılarak 1 ml'lik kültür viallerine aktararak kullanım anına kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.5.3.Etanol fermentasyonu

Etanol üretiminde keçiboynuzundan elde edilen ekstrakt (E), pulp (P), posa ekstraktı (PE) ve posa pulpu (PP) doğrudan ve mikroorganizma gelişimi için yapılacak zenginleştirme olmak üzere 2 şekilde fermentasyona bırakılmıştır. Daha sonra ortamın pH değeri kontrol edilerek üretimler karşılaştırılmıştır. Tüm denemeler tekerrürlü gerçekleştirilmiş ve reaktöre 1.5L fermentasyon ortamı hazırlanmıştır. Fermentasyon ortamının zenginleştirildiği denemelerde Çizelge 3.4'deki bileşikler kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Etanol fermentasyonunda kullanılan keçiboynuzu ekstraktına eklenen maddeler (Demirci vd 1997)

Medya İçeriği	Miktar (g/1.5L)
E, P, PE ve PP*	1500
Maya Ekstraktı	9
Kalsiyumklorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.45
Amonyumsülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	6
Magnezyumsülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.5
Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4)	2.25

* E: Ekstrakt, P: Pulp, PE: Posa ekstraktı, PP: Posa pulpu (E, P, PE, ve PP her bir üretim için ayrı ayrı kullanılmışlardır.)

Reaktör içeriği hazırlandıktan sonra 121.1°C'de 20 dakika sterilize edilmiş ve soğutulmuştur. Daha sonra içeriği tespit edilmek üzere örnek alınarak 24 saat inokülasyonu tamamlanmış stoktan steril şartlarda %1 alınmış ve reaktöre aktarılmıştır. Böylece "0" zamanı örneği de alınarak fermentasyon başlatılmıştır. Tüm fermentasyon denemeleri 30°C sıcaklıkta, pH 5.5 ve 150 d/d gerçekleştirilmiştir (Demirci vd 1997).

3.5.3.1. Etanol üretiminde deneme deseni

Keçiboynuzu ekstraktından *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak etanol üretiminde 5 farklı profil denenmiştir.

1. Etanol fermentasyonu öncelikli olarak mikroorganizmanın adaptasyonu, kinetik değerlerinin hesaplanmasını ve fermentasyon süresi hakkında bilgi sahibi olunması amacıyla Çizelge 3.3.'deki içerikli bir medyada temel fermentasyon adıyla %1 inokülasyon oranında, pH 5.5, 150 d/d ve 30°C'de gerçekleştirilmiştir.
2. Zenginleştirilmiş keçiboynuzu ekstraktından etanol üretiminde fermentasyon işlemi pH kontrolü yapılarak ve yapılmaksızın gerçekleştirilerek pH'nın fermentasyon üzerine etkisi belirlenmiştir. Bu aşamadan sonraki tüm işlemlerde pH kontrolü gerçekleştirilmiştir.
3. Zenginleştirilmiş keçiboynuzu ekstraktından etanol üretiminde inokülasyon oranının etkisini belirlemek üzere %1, %3 ve %5 olmak üzere 3 farklı inokülasyon oranı denenmiştir.
4. Etanol üretiminde kontrol örneği olarak da en iyi inokülasyon oranında (%3) herhangi bir zenginleştirme yapılmamış keçiboynuzu ekstraktı direkt olarak kullanılmıştır.
5. Yine zenginleştirme işleminde kullanılan pahalı maya ekstraktı (yeast extract) yerine en iyi inokülasyon oranında (%3) 4 farklı azot kaynağı kullanılarak alternatif azot kaynakları denenmiştir. Bu amaçla tavuk eti tozu, kabuk ve tırnak karışım tozları, tüy tozları ve et ve kemik tozları kullanılmıştır.

Fermentasyon başladıktan sonra başlangıç ve sıfır zamanı örneklerine ek olarak 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18, 24, 36, 48. saatlerde örnek alınarak bunlarda canlı hücre, etanol ve şeker analizleri yapılmıştır. pH kontrolü yapılmayan üretimlerde pH değerleri de örnek alınırken not edilerek takip edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında fermentasyon süresinin bir miktar kısılmasına gerek duyulup duyulmadığına da karar verilmiştir. Tüm örnekler analiz anına kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.6. Fermentasyonla Laktik Asit Üretimi

3.6.1. Mikroorganizma

Bu çalışmadan keçiboynuzu meyvesinden laktik asit üretiminde kullanılan *L. casei* (ATCC 11443) mikroorganizması Pennsylvania State Üniversitesi Tarım ve Biyoloji Mühendisliği (Agricultural and Biological Engineering) Bölümü'nde öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Demirci'nin laboratuvarından alınmıştır. *Lactobacillus casei*'nin fermentasyonda kullanılabilir duruma getirilmesi için *Saccharomyces cerevisiae* mayasına uygulanan işlemlerin aynısı uygulanmıştır.

3.6.2. Mikroorganizma hazırlanışı

Logaritmik olarak çoğalmanın ve özgül gelişme hızının maksimum olduğu mikroorganizmaların kullanılması amacıyla *L. casei*'nin öncelikle tüplerde gelişimi sağlanmıştır. MRS Broth kullanılarak hazırlanan 9 ml medya içeren tüplere 1 ml maya eklendikten sonra 37°C'de 48 saat bekletilerek gelişme sağlanmıştır. Elde edilen stoklar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Reaktöre inokülasyon yapılacağı zaman 100 ml Çizelge 3.5.'deki gibi hazırlanan medya içine 1 ml stoktan eklenerek 37°C'de 24 saat gelişimi beklenmiş ve sterilize edilmiş reaktöre 10 ml inokülasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.5. *Lactobacillus casei* için gerekli besiyeri bileşimi

Medya İçeriği	Miktar (g/L)
Glukoz	50
Maya Ekstraktı	8
Dipotasyumhidrojenfosfat (K_2HPO_4)	0.5
Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4)	0.5
Sodyumasetat	1
Manganezsülfat ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.03
Magnezyumsülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.6

3.6.3. Laktik asit fermentasyonu

Fermentasyonla laktik asit üretiminde, etanol üretiminde olduğu gibi 2 şekilde fermentasyon uygulanmıştır. Reaktöre 1.5 L fermentasyon ortamı hazırlanmış ve tüm denemeler 2 tekerrür halinde gerçekleştirilmiştir. Denemelerde Çizelge 3.6.'daki gibi zenginleştirmeler uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. Laktik asit fermentasyonunda kullanılan keçiboynuzu ekstraktına eklenen maddeler (Demirci ve Pometto 1995)

Medya İçeriği	Miktar (g/1.5L)
E, P, PE ve PP	1500
Maya Ekstraktı	12
Dipotasyumhidrojenfosfat (K_2HPO_4)	0.75
Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4)	0.75
Sodyumasetat	1.5
Manganezsülfat ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.045
Magnezyumsülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.9

* E: Ekstrakt, P: Pulp, PE: Posa ekstraktı, PP: Posa pulpu (E, P, PE, ve PP her bir üretim için ayrı ayrı kullanılmışlardır.)

Reaktör içeriği hazırlandıktan sonra 121.1°C'de 20 dakika sterilize edilmiş ve soğuduktan sonra içeriği tespit edilmek üzere örnek alınarak 37°C'de 24 saat inokülasyonu tamamlanmış stoktan steril şartlarda 10 ml alınmış ve reaktöre aktarılmıştır. Böylece "0" zamanı örneği de alınarak fermentasyon başlatılmıştır. Tüm fermentasyon üretimleri 37°C sıcaklıkta, pH 5.0 ve 200 d/d gerçekleştirilmiştir (Demirci ve Pometto 1995).

3.6.3.1. Keçiboynuzu ekstraktına İnvvertaz uygulanması

Keçiboynuzu ekstraktındaki baskın eker olan sakarozun parçalanması amacıyla MP Biomedicals Firmasına ait Invertase Yeast (EC 3.2.1.26) enzimi kullanılmıştır. Sistematik ismi “beta-fructofuranosidase” olan küflerden izole edilen bu enzim (K değeri 0,3) sakarozu glukoz ve fruktoza parçalamaktadır. Bu amaçla 1.5L ekstrakt için 4 farklı oranda (%1, %2, %5 ve %10) enzim 37°C’de kullanılarak 12, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde örnek alınmış ve eker analizleri yapılarak en uygun enzim oranı ve süre hesaplanmıştır. En kısa sürede ve en yüksek miktarda sakarozu parçalayan kombinasyon kabul edilmiştir (%1 ve 12 saat). Ekstrakt içindeki sakaroz, *L. casei* tarafından kullanılamadığından dolayı inversiyona bırakılmıştır. Ancak etanol üretimlerinde *S. cerevisiae* disakkaritleri de kullanabildiğinden inversiyona gerek duyulmamıştır.

3.6.3.2. Laktik asit üretiminde deneme deseni

Keçiboynuzu ekstraktından *Lactobacillus casei* kullanarak laktik asit üretiminde 5 farklı profil denenmiştir.

1. Laktik asit fermentasyonu izelge 3.5.’deki içerikli bir medyada temel fermentasyon adıyla %1 inokülasyon oranında, pH 5.0’de, 200 d/d hızda ve 37°C’de gerçekleştirilmiştir.
2. Laktik asit üretiminde kontrol rneği olarak da %1 inokülasyon oranında zenginleştirme yapılmış ve herhangi bir zenginleştirme yapılmamış keçiboynuzu ekstraktı kullanılmıştır.
3. Zenginleştirmede pahalı maya ekstraktı (yeast extract) yerine %1 inokülasyon oranında 4 farklı azot kaynağı denenmiştir. Tavuk eti tozu, kabuk ve tırnak karışım tozları, tüy tozları ve et ve kemik tozları zenginleştirmede kullanılmıştır.
4. *Lactobacillus casei*, keçiboynuzu bileşimindeki monosakkaritleri parçalamış ancak ekstraktın büyük çoğunluğunu olan sakarozu metabolize edememiştir.

Bu nedenle inokülasyon işleminden önce invertaz enzimi uygulanarak sakarozun parçalanması sağlanmış ve ekstrakt zenginleştirilerek fermentasyona bırakılmıştır.

5. Bunun yanında karşılaştırma yapmak amacıyla invertaz enzimi uygulanmış ekstrakt herhangi bir zenginleştirme yapılmadan doğrudan fermente edilmiştir.

Fermentasyon başladıktan sonra başlangıç ve sıfır zamanı örneklerine ek olarak 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18, 24, 36, 48. saatlerde örnek alınarak bunlarda canlı hücre, laktik asit ve şeker analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler ışığında fermentasyon süresinin bir miktar azaltılmasına gerek duyulup duyulmadığına da karar verilmiştir. Tüm örnekler analiz anına kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.7. Analiz Yöntemleri

3.7.1. Hücre kütle (Biyokütle) miktarı

Reaktörden belirtilen zaman aralıklarında alınan örneklerde canlı gelişimini takip etmek için canlı hücre miktarı analiz edilmiştir. Bu amaçla örneklerden 0.5 ml alınarak üzerine 4.5 ml saf su eklenip 10 kat seyrelttikten sonra kör olarak inoküle edilmemiş örnek kullanılarak spektrofotometrede (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 620 nm’de elde edilen absorbands değerine göre aşağıdaki eşitlikler kullanılarak *S. cerevisiae* ve *L. casei* canlı miktarı hesaplanmıştır.

Optik yoğunluk yöntemiyle biyokütle miktarının belirlenmesi için öncelikle her mikroorganizma için uygun olan eşitliğin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla reaktörden 2 tane örnek alınır. Birinci örnek filtre kâğıtlarından süzülerek ağırlığı ölçülür. İkinci örnekte de ise fermentasyon başlangıcındaki besiyeri kör olarak kullanılarak optik yoğunluk ölçülür. Fermentasyon süresince alınan tüm örneklerde bu işlem gerçekleştirilir. Filtre edildikten sonra tartılan ağırlık miktarlarına karşı aynı zamanlara ait optik yoğunluk değerleri için grafik çizilirse her mikroorganizma için bir denklem elde edilir. Bu denklem mikroorganizma için spesifiktir ve fermentasyon denemelerinde biyokütle miktarının belirlenmesinde kullanılabilir. Bu amaçla daha önce tartımları gerçekleştirilerek oluşturulan aşağıdaki denklemler biyokütle miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Demirci ve Pometto 1995, Demirci vd 1997).

S. cerevisiae için;

$$\text{Canlı hücre (g/L)} = 0.10634 + 0.666019 \cdot \text{Absorbans}_{620 \text{ nm}}$$

L. casei için;

$$\text{Canlı hücre (g/L)} = 0.0647 + 0.5583 \cdot \text{Absorbans}_{620 \text{ nm}}$$

Elde edilen değerler zamana karşı grafik edilerek şeker tüketimi ve etanol veya laktik asit üretimi miktarları arasındaki ilişki açıklanmıştır.

3.7.2.Etanol ve laktik asit miktarının HPLC ile belirlenmesi

Reaktörden alınan örneklerde etanol ve laktik asit analizi HPLC (Waters, Milford, MA, USA) ile yapılmıştır. Örneklerden 1.5 ml alınarak 2000 d/d'da 2 dakika santrifüj ettikten sonra berrak kısımdan 1 ml alınarak üzerine 2 ml saf su eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 0,22 µm filtreden geçirilerek viallere doldurulmuş ve analiz anına kadar -18°C'de saklanmıştır. Analiz edilen bileşiklerin çıkış noktalarının ve konsantrasyonlarının belirlenmesinde eksternal standart yöntemi kullanılmıştır (Demirci ve Pometto 1995).

Kromatografi koşulları

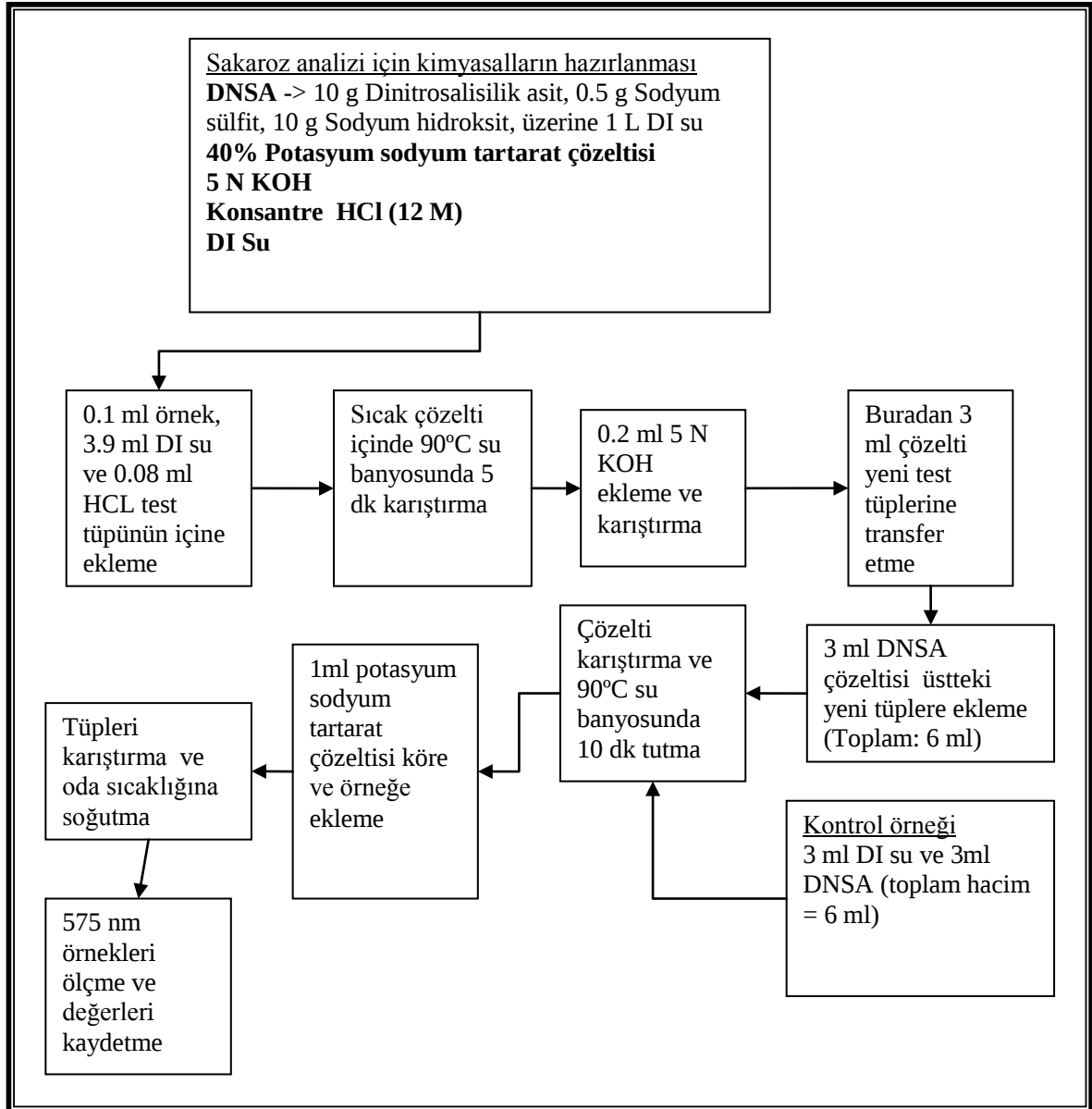
- Kolon: Bio-Rad Aminex HPX-87H kolon (300x7.8 mm)
- Kolon sıcaklığı: 65°C
- Mobil faz: 0.012N sülfirik asit izokratik
- Hareketli faz akışı: 0.8 ml/dakika
- Dedektör: Refraktif indeks
- Enjeksiyon: 20 µL

3.7.3.Şeker analizi

Reaktörden alınan örneklerdeki şeker miktarı 3,5 dinitrosalisilik asit kullanılarak DNSA metodu ile belirlenmiştir (Miller 1959). Bu amaçla 0.1 ml örnek üzerine 3.9 ml saf su eklenmiştir. 0.08 ml 12M HCl asit eklenerek karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilip hidroliz edilmiştir. Bu noktada tüp içerisindeki örneklerin hidroliz sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir. Sıcaklığı kontrol etmek amacıyla termometre yerleştirilmiş bir tüp kontrol olarak kullanılmıştır. Metotta belirtilen sıcaklığa ulaştıktan sonra süre başlatılmıştır. Daha sonra hidrolizat üzerine 0.2 ml 5N KOH eklenerek karıştırıldıktan sonra, karışımdan yeni bir tüpe 3 ml alınarak üzerine 3 ml DNSA solüsyonu eklenmiştir. Solüsyon karıştırılarak 90°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilip üzerine 1 ml %40 potasyum sodyum tartarat eklenerek soğutulmuş ve 575 nm dalga boyunda okuma yapıp standart sakaroz çözeltisi ile hazırlanmış kurveden şeker miktarı hesaplamıştır (Ek-4).

DNSA metodu ile şeker analizinde kullanılan DNSA çözeltisi; 10 g NaOH, 10 g DNSA (Sigma D-1510) ve 0.5 g sodyum sülfid demineralize suda çözülüp 1 litreye tamamlanarak Rachelle tuz çözeltisi (potasyum-sodyum tartarat çözeltisi) ise 400 g potasyum-sodyum tartarat 1 L demineralize suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

Fermentasyon ortamından alınan örneklerde yapılan şeker analizlerinde izlenen yol Şekil 3.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 3.2. DNSA metodu ile şeker analizleri

3.7.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Mikroorganizmaların gelişme kurvelerinden yararlanılarak kinetik parametreler hesaplanmıştır. Reaktörden alınan örneklerde şeker, canlı miktarı, etanol ve laktik asit miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- Şeker tüketimi (g/L)
- Etanol üretimi (g/L)
- Laktik asit üretimi (g/L)
- Verim (%)
- Maksimum tüketim oranı (g/L/saat)
- Maksimum üretim oranı (g/L/saat)
- Spesifik gelişim oranı (1/saat)
- Canlı hücrelerin iki katına çıkma süresi (Doubling time) (saat) belirlenmiştir.

Statik bir kültürde belli bir miktarda substrat (S) kullanılarak inokülasyon ile besiyerine dahil olan X_0 hücre kütlesi gelişmenin sonunda (durma fazında) en yüksek değer olan X_{max} hücre kütlesine, bununda yanında başlangıçtaki substrat miktarı en düşük değere ve mikroorganizma faaliyeti ile üretilen ürün (product) en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bunun sonucunda,

Gelişmenin sonunda popülasyonun artan kütlesi;

$x = x_{max} - x_0$ olup gram kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Şeker tüketimi, gelişmenin sonunda;

$S = S_1 - S_0$ olup g/L olarak ifade edilmiştir.

Ürün miktarı, gelişmenin sonunda;

$$P = P_1 - P_0 \text{ olup g/L olarak hesaplanmıştır.}$$

Bunun yanında mikroorganizma kütle verimi ve ürün verimi;

$$\text{Verim (Y}_{P/S}\text{) (\%)} = [\text{Laktik asit miktarı (g/L)} / \text{Glikoz tüketimi (g/l)}] * 100$$

$$\text{Verim (Y}_{X/S}\text{) (\%)} = [\text{Biyokütle miktarı (g/L)} / \text{Glikoz tüketimi (g/l)}] * 100$$

eşitliklerinden faydalanılarak saptanmıştır.

Ayrıca maksimum üretim, maksimum tüketim, spesifik gelişme ve gelişme oranı da;

$$\text{Gelişme oranı (g/L/h)} = \text{Biyokütle kurvesinin en dik kısmının eğimi,}$$

$$\text{Üretim oranı (g/L/h)} = \text{Laktik asit kurvesinin en dik kısmının eğimi,}$$

$$\text{Tüketme oranı (g/L/h)} = \text{Glikoz kurvesinin en dik kısmının eğimi,}$$

$$\text{Spesifik gelişme oranı (h}^{-1}\text{)} = \ln x \text{'e karşı zaman grafiğinin eğimi}$$

kullanılarak hesaplanmıştır. Bunun dışında aşağıdaki kinetik parametreler hesaplanarak üretimlerin optimizasyonu sağlanmıştır (Shuler ve Kargi 2008).

Bir bakteri popülasyonda sabit zaman aralıklarıyla bölünür veya sabit bir bölünme hızıyla çoğalır. Bakteri kütlesinin (x) gelişme hızı da gelişme katsayısına (μ) bağlı olarak artar. Gelişme kinetiği çalışmalarında bakteri kütlesi denilince hücre sayısı ile absorbe edilen besinlerle sağlanan hücre materyali toplamı anlaşılır. x büyüklüğündeki değişim hızı, x'in her anındaki büyüklüğü ile orantılıdır.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

μ : gelişme hızı katsayısı

x : hücre kütlesi olarak ifade edilmektedir.

Burada;

$x = x_0 e^{\mu t}$, yani x'in iki katına ulaşması için,

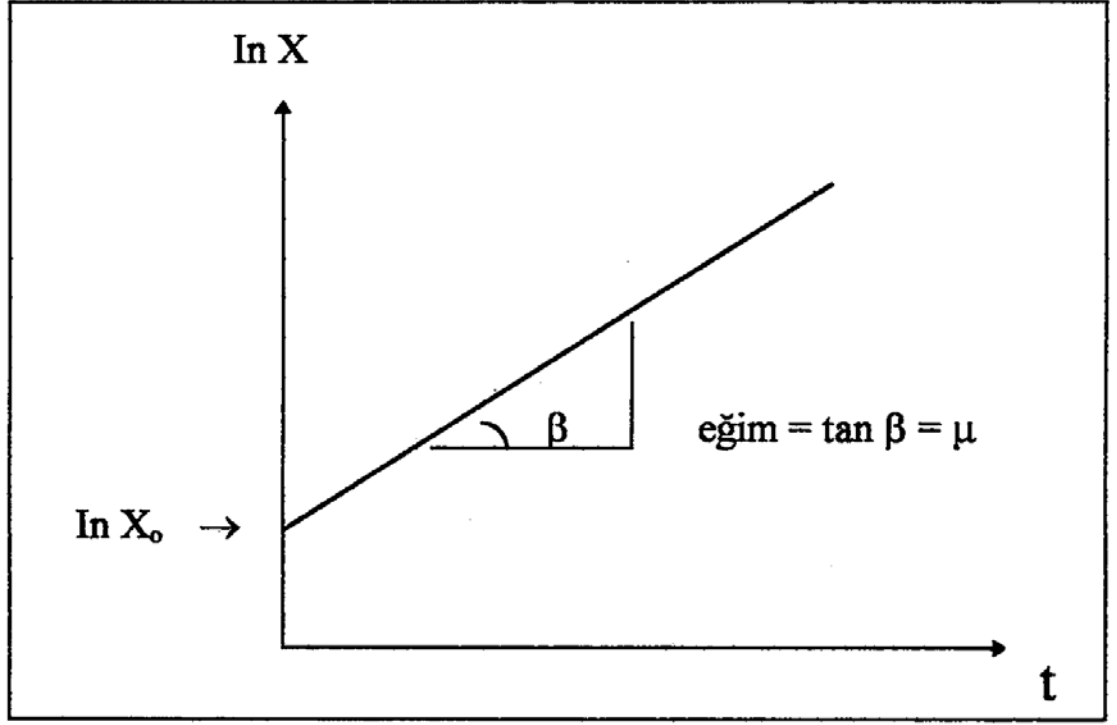
$2x_0 = x_0 e^{\mu t_d}$ olur, eşitlik sadeleştirildiğinde;

$$2 = e^{\mu t_d}$$

$\ln 2 = \mu t_d$ elde edilmektedir.

Buradan kütlenin **iki katına çıkma süresi (t_d)** hesaplanmıştır.

Besiyeri ortamındaki mikroorganizma miktarına ait değerlerin (X) doğal logaritması alındıktan sonra zamana karşı grafik oluşturulduğunda elde edilen denklemin eğimi mikroorganizmanın spesifik gelişme hızının hesaplanmasını sağlamaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Spesifik gelişme hızının hesaplanması (Shuler ve Kargi 2008)

3.7.5. İstatistiksel analizler

Araştırma tesadüf parselleri deneme deseninin faktöriyel düzenlenmesi şeklinde planlanmış, araştırmadan elde edilen sonuçlar varyans analizine ve önemli bulunan ana varyasyon kaynakları ortalamaları Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine tabi tutulmuştur. Faktör sayısının ikiye aşmaması durumunda, faktör ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olup olmadığını bulmak için varyans analizi yöntemine başvurulmuştur. Duncan, çoklu karşılaştırma testlerinden biri olup, faktör ortalamaları arasındaki farkı test etmek için kullanılmıştır (Düzgüneş vd 1987, Anonim 1999). Varyans analizlerinde güven sınırı asgari %99 olarak, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testlerinde ise asgari güven sınırı %95 olarak alınmıştır. Ayrıca keçi boynuzu meyvesinin ekstraksiyon şartlarının optimize edilmesinde Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Keçiboynuzu Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyon şartlarını optimize etmek amacıyla Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu (CYM) kullanılmıştır. Bu amaçla keçiboynuzu meyvesi 3-5 cm uzunlukta parçalar halinde CYM ile belirlenen sıcaklık, süre ve meyve:su oranı kombinasyonlarında ekstraksiyona bırakılmıştır. Denemeler sonucunda elde edilen örneklerde şeker analizi yapılarak ekstraksiyon için en iyi şartlar belirlenmiştir. CYM'nin belirlediği şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucu elde edilen şeker sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Ayrıca ekstraksiyon sonucunda oluşturulan kontur plot grafikleri Ek-5' de verilmiştir. Elde edilen şeker analiz sonuçlarına göre CYM ile ekstraksiyon şartları optimize edilmiş ve belirlenen optimum koşullarda üretilen ekstraktlar, tüm fermentasyon denemelerine ortam hazırlamak için kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Keçiboynuzu ekstraksiyonunun Cevap Yüzey Metodu Sonuçları

Örnek No	Sıcaklık (°C)	Süre (h)	Meyve:Su Oranı	Ekstraktın Şeker İçeriği (g/L)
1	70	1	1:6.5	46.2 ± 3.54
2	70	3	1:6.5	100.2 ± 3.16
3	70	2	1:9.0	63.7 ± 1.58
4	70	2	1:4.0	101.1 ± 4.52
5	90	2	1:4.0	103.1 ± 3.16
6	90	3	1:6.5	62.5 ± 4.02
7	90	2	1:9.0	54.7 ± 3.23
8	90	1	1:6.5	83.2 ± 3.15
9	80	3	1:9.0	54.9 ± 5.12
10	80	3	1:4.0	110.2 ± 7.90
11	80	1	1:4.0	115.3 ± 9.64
12	80	1	1:9.0	42.6 ± 2.65
13	80	2	1:6.5	78.2 ± 4.31
14	80	2	1:6.5	86.8 ± 2.51
15	80	2	1:6.5	75.0 ± 2.93

4.1.1. Sıcaklığın ekstraksiyon üzerine etkisi

Box-Behken Cevap Yüzey Metodu kullanılarak keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyon şartlarının optimize edilmesinde maksimum ve minimum olmak üzere iki (70°C ve 90°C) ve bir de CYM metodunun belirlediği değer (80°C) olmak üzere 3 farklı sıcaklık kullanılmıştır. Maksimum ve minimum sıcaklık noktalarını kullanarak sistem, bir tane de orta noktadaki sıcaklık değerini ekleyerek ekstraksiyon yapılacak sıcaklık şartlarını belirlemiştir (Çizelge 4.1).

Ekstraksiyon sisteminin sıcaklığı artırıldığı zaman ekstrakttaki şeker konsantrasyonunu da önemli derecede arttığı görülmüştür (Şekil 4.1). Keçiboynuzu meyvesinin 1:6.5 meyve:su oranında ve 70°C ve 90°C’de 1 saat boyunca gerçekleştirilen ekstraksiyonunda, ekstraksiyon sıcaklıkları karşılaştırıldığında 90°C’de gerçekleştirilen ekstraksiyondan difüze olan şeker miktarı (83 g/L) 70°C’deki şeker miktarından (46 g/L) yaklaşık 2 kat daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, ekstraksiyon sıcaklığının yanında meyve:su oranının da değişmesi difüze olan şeker miktarını etkilemiştir. 1:4 meyve:su oranında 2 saat boyunca 90°C’de gerçekleştirilen ekstraksiyondan elden edilen şeker miktarı 103 g/L olurken, aynı süre ve meyve:su oranında 70°C’de gerçekleştirilen ekstraksiyondan elde edilen şeker miktarından çok az derecede farklılık göstererek 101 g/L olarak bulunmuştur. Bundan dolayı, ekstraksiyon sıcaklığı*ekstraksiyon süresi arasındaki interaksiyon istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

4.1.2. Sürenin ekstraksiyon üzerine etkisi

Ekstraksiyon bir temas-denge prosesidir. Ekstrakt içindeki çözünür kuru madde miktarı dengeye geldiği zaman, meyve içinden ekstrakta doğru çözünebilir bileşiklerin geçişi durmaktadır. Ekstraksiyon süresinin yanında ekstraksiyon sıcaklığı ve meyve:su oranı da ekstraksiyonu doğrudan etkilemektedir. Ekstraksiyon sıcaklığı artırıldığı zaman ekstraksiyon süresi düşmektedir (Karkacier vd 2000). Meyve içerisinden çözünür bileşiklerin difüzyonu sıcaklıkla hızlandığından dolayı ekstraksiyon süresi de kısalmaktadır (Turhan vd 2006). Ekstraksiyon süresi sıcaklığa bağlı olarak değiştiğinden dolayı ekstrakt içinde elde edilen şeker konsantrasyonu genel olarak sıcaklık arttıkça yüksek olmaktadır (110 g/L). Elde edilen sonuçlara göre; ekstraksiyon süresi, istatistiksel olarak önemli bulunmuş ($P<0.05$) ve meyve:su oranı*ekstraksiyon süresi interaksiyonunun da bu işlem üzerine etkili olduğu belirlenmiştir.

4.1.3. Meyve:su oranının ekstraksiyon üzerine etkisi

Ekstraksiyon işlemi için kullanılan tüm ekstraksiyon parametrelerine göre, ekstraksiyon süresi*ekstraksiyon sıcaklığı arasındaki interaksiyon ekstraksiyon için önemlidir ($P<0.05$). Yüksek meyve:su oranlarının (1:9) kullanıldığı ekstraksiyonlarda ekstrakttaki şeker oranları düşük bulunmuştur (Çizelge 4.1). Bunun yanında şeker konsantrasyonu ekstraksiyon sıcaklığı ve süresine bağlı olarak dengeye gelmiştir. Diğer bir ifadeyle, ekstraksiyon için düşük meyve:su oranları kullanıldığı zaman ekstrakttaki şeker konsantrasyonunun dengeye gelmesi daha kısa sürede gerçekleşmiştir (Çizelge 4.1). En düşük şeker konsantrasyonu 1:9 meyve:su oranında, 80°C’de, 1 saat sürede gerçekleştirilen ekstraksiyondan elde edilmiştir. Bunun aksine en yüksek şeker konsantrasyonuna 1:4 meyve:su oranında, 80°C’de, 1 saat sürede gerçekleştirilen ekstraksiyonda ulaşılmıştır. Dolayısıyla, meyve:su oranının ekstraksiyon işlemi için en önemli parametrelerden birisi olduğu görülmüştür.

4.1.4. Cevap yüzey metodu modellemesi

Bu çalışmada “Full Quadratic” cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Kullanılan modeldeki değişkenler ekstraksiyon için sıcaklık (°C), süre (saat) ve meyve:su oranı (ağırlık/hacim) olarak belirlenmiştir. “Minitab” programındaki Cevap Yüzey Metodu kullanılarak geliştirilen regresyon eşitliği aşağıdaki gibidir;

$$\text{Keçiboynuzu ekstraktındaki şeker konsantrasyonu} = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 t + \beta_3 D + \beta_{22} t^2 + \beta_{12} Tt + \beta_{13} TD + \beta_{23} tD + \varepsilon.$$

Yukarıdaki eşitlikte;

ε : Hata

D : Meyve:su oranı

T : Sıcaklık

t : Süre

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{22}, \beta_{12}, \beta_{13}$ ve β_{23} katsayılar (Çizelge 4.2).

T^2, t^2 ve D^2 modeldeki eşitlikten istatistiksel olarak önemli olmadıkları için çıkarılmıştır. Bu modelin R^2 değeri 0.95 olarak elde edilmiştir. Bu da; örnek varyasyonlarının %95’inin model tarafından tam temsil edildiği anlamına gelmektedir. Ayrıca ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklık*ekstraksiyon süresi arasındaki interaksiyon istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Cevap Yüzey Metodu için regresyon katsayıları

Semboller	Katsayılar	P değeri
β_0	-399.340	0.268
β_1	10.034	0.238
β_2	157.052	0.013*
β_3	-14.014	0.458
β_{22}	-3.435	0.488
β_{12}	-1.868	0.008*
β_{13}	-0.110	0.560
β_{23}	1.728	0.372

* $P < 0.05$ istatistiksel olarak önemlidir.

Cevap Yüzey Metodu kullanılarak belirlenen şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinden elde edilen sonuçlar, Minitab İstatik Programı kullanılarak ekstraksiyon şartları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlara göre keçiboynuzu meyvesinin 80°C’de, 1:4 meyve:su oranında ve 2 saat süreyle ekstraksiyonu optimum koşul olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar daha önce keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonu üzerine yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, meyve:su oranı hariç diğer tüm parametrelerin genel olarak benzer olduğu görülmüştür (Turhan vd 2006). Belirlenen şartlarda su oranı arttığı zaman, ekstraktın dengeye ulaşma süresi de uzamaktadır. Yine daha önce keçiboynuzundan çözünür kuru madde elde edilmesi üzerine kesikli sistemde gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde ekstraksiyon sıcaklık ve süresinin önemli olduğu belirlenmiştir (Karkacıer vd 1995).

Bu çalışmada 100 g/L şeker içeriğine sahip ekstrakt, 80°C’de 2 saat içinde elde edilmiştir. Yüksek sıcaklık uygulaması ekstrakta çözünür kuru maddenin geçişini hızlandırarak yüksek miktarda şeker elde edilmesini sağlamıştır. Dolayısıyla yüksek şeker konsantrasyonu elde etmek için ekstraksiyon sıcaklığının 80-90°C olması uygun görülmektedir. Aksi halde yüksek ekstraksiyon sıcaklığı, uzun ekstraksiyon süresi ve yüksek su oranları süre, enerji ve hammadde kaybına neden olabilecektir.

4.2. Etanol Fermentasyonu

Cevap Yüzey Metodu'nun belirlediği optimum şartlarda elde edilen ve ortalama 100 g/L şeker içeren 1.5 L keçiboynuzu ekstraktı, etanol fermentasyonu için kullanılarak fermentasyon üzerine pH, inokülasyon oranı ve farklı azot kaynaklarının etkisi incelenmiştir.

4.2.1. pH'nın etanol üretimi üzerine etkisi

Keçiboynuzu ekstraktından fermentasyon yoluyla etanol üretiminde ilk olarak pH'nın maya hücrelerinin gelişimi ve etanol miktarı üzerine etkisi hesaplanmıştır. Bu amaçla reaktörde pH 5.5'da ve pH kontrolü yapılmadan etanol fermentasyonu gerçekleştirilerek maya gelişimi ve etanol miktarındaki değişim incelenmiştir.

4.2.1.1. pH kontrolsüz fermentasyon

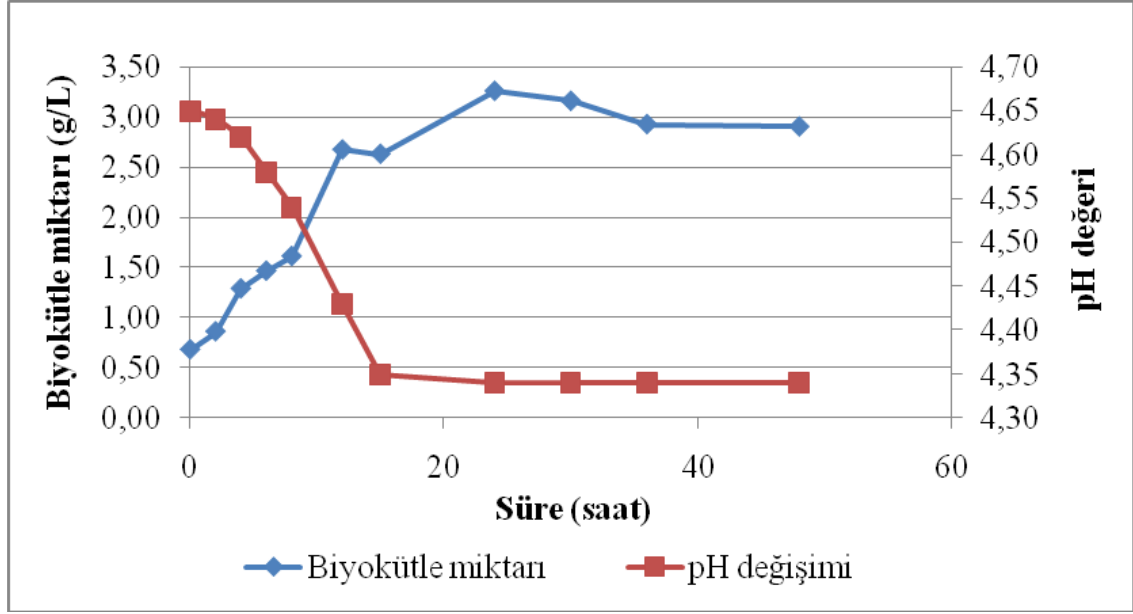
pH kontrolü yapılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, biyokütle miktarı pH kontrolü yapılmayan örneklerde fermentasyon işleminin 24. saatinde maksimum seviyeye (3.26 g/L); fermentasyon sonucu elde edilen etanol ise 30. saatte maksimum seviyeye (45.30 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon işlemi sonucunda besiyerinde bir miktar şeker (12.83 g/L) mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır. Bunun da oluşan etanolün mayaların gelişimini sınırlayıcı etkisinden (product inhibition) kaynaklandığı düşünülmektedir. Fermentasyonun 0 (sıfırıncı) dakika örneğinde biyokütle miktarı 0.68 g/L olarak belirlenmiştir. 0. dakikada yapılan bu analiz mikroorganizma reaktöre inoküle edildikten sonra gerçekleştirilmiştir. Maya hücrelerinin reaktöre eklenmesi amacıyla gerçekleştirilen inkübasyon sırasında biyokütle gelişiminin yanına 5.13 g/L etanol oluşumunun da gerçekleştiği belirlenmiştir. pH kontrolü yapılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonunun 15. saatinden sonraki biyokütle oluşumu, 24. saatinden sonraki şeker tüketimi ve 12. saatinden sonraki etanol üretim miktarlarında istatistiksel olarak bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$).

Çizelge 4.3. Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrolsüz etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^e ±0.00	109.31 ^a ±3.70	0.00 ^f ±0.0
0	0.68 ^e ±0.17	105.89 ^{ab} ±5.61	5.13 ^e ±0.47
2	0.86 ^e ±0.14	103.34 ^{ab} ±4.71	7.89 ^d ±0.99
4	1.29 ^d ±0.54	96.88 ^{ab} ±5.05	15.53 ^c ±0.099
6	1.47 ^c ±0.54	93.82 ^{ab} ±7.13	20.40 ^b ±4.55
8	1.61 ^c ±0.17	88.36 ^c ±4.49	28.27 ^b ±2.45
12	2.68 ^b ±0.04	70.47 ^d ±7.77	43.40 ^a ±3.19
15	2.64 ^a ±0.30	38.21 ^e ±5.01	44.38 ^a ±0.15
24	3.26 ^a ±0.67	16.22 ^f ±6.67	45.19 ^a ±0.21
30	3.16 ^a ±0.04	15.58 ^f ±4.42	45.30 ^a ±0.35
36	2.93 ^a ±0.28	13.67 ^f ±3.06	45.22 ^a ±0.18
48	2.91 ^a ±0.32	12.83 ^f ±1.99	45.26 ^a ±0.41

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

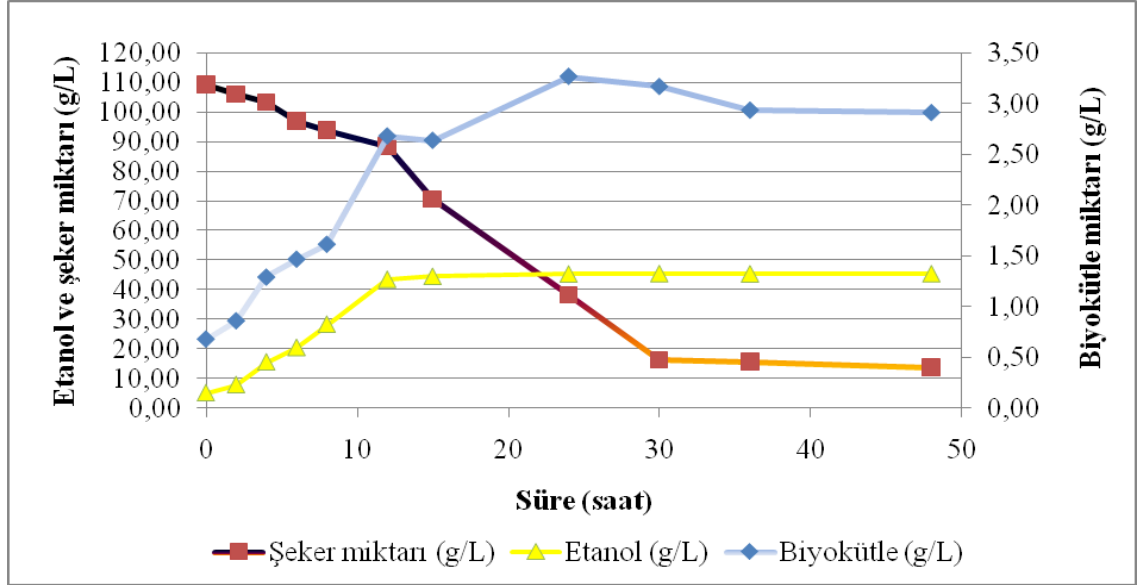
pH kontrolünün yapılmadığı fermentasyon ortamında mikroorganizma gelişiminin de oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.1.'de mikroorganizma faaliyeti sonucu fermentasyon ortamındaki pH değişiminin biyokütle miktarı ile ilişkisi grafik edilmiştir.



Şekil 4.1. pH kontrolü yapılmayan fermentasyon ortamındaki biyokütle miktarı ile pH değişimi

Fermentasyon sırasında pH'nın düşmesi nedeniyle maya gelişiminin çok fazla olmadığı görülmüştür. Ekstraksiyon işlemi ile elde edilen keçiyoynuzu ekstraktı zenginleştirilip sterilize edildikten sonra fermentasyon işlemi öncesinde pH değeri kayıt edilmiştir. Fermentasyonun başlaması ile birlikte başlangıçta 4.65 olan pH değeri fermentasyon süresi boyunca düşüş göstererek 4.34 değerine kadar inmiştir. Fermentasyon süresi boyunca asitliğin artışına paralel olarak maya gelişiminin düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

Şekil 4.2.'de pH kontrolü yapılmayan fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir. Etanol fermentasyonunda biyokütle gelişimi ve etanol oluşumunun grafiği birbirine paralel olarak oluşmaktadır. Yani mikroorganizma gelişimini sürdürürken bir yandan da üretim gerçekleşmektedir. Biyokütle gelişimine paralel olarak ürün oluşumunun da gerçekleştiği bu tip fermentasyonlara "Tip I Fermentasyon" adı verilmektedir.



Şekil 4.2. Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrolsüz etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim

4.2.1.2. pH kontrollü etanol üretimi

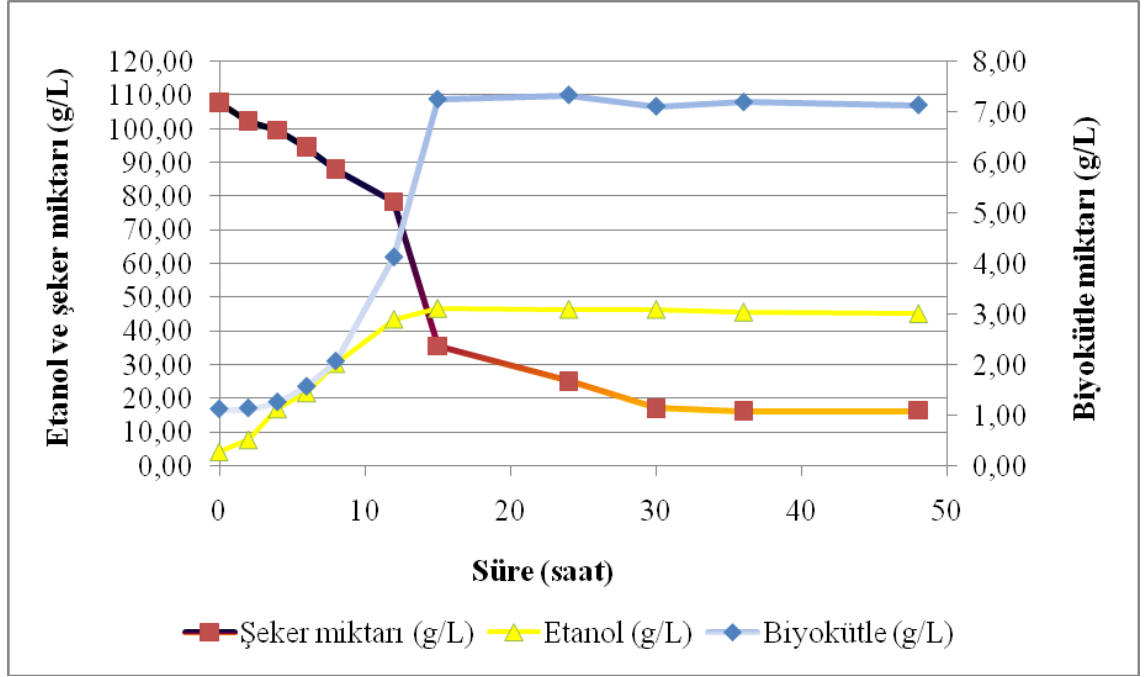
pH kontrolü yapılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir. Biyokütle miktarı pH kontrolünün yapıldığı örneklerde fermentasyon işleminin 24. saatinde maksimum seviyeye (7.35 g/L) ulaşmıştır. Elde edilen etanol ise 30. saatte maksimum seviyeye (46.90 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonunda besiyerinde bir miktar şeker (13.07 g/L) mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır. pH kontrolü yapılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunun 15. saatinden sonraki biyokütle oluşumu, 24. saatinden sonraki şeker tüketimi ve 12. saatinden sonraki etanol üretim miktarlarında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($P>0.05$).

Çizelge 4.4. Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrollü etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^e ±0.00	108.04 ^a ±3.92	0.00 ^f ±0.00
0	1.12 ^e ±0.01	102.54 ^{ab} ±2.50	4.30 ^e ±0.14
2	1.14 ^e ±0.01	99.77 ^{ab} ±6.25	7.90 ^d ±0.71
4	1.26 ^d ±0.11	94.85 ^{ab} ±2.90	17.07 ^c ±2.09
6	1.57 ^c ±0.18	88.24 ^{ab} ±2.63	21.82 ^c ±3.82
8	2.07 ^c ±0.27	78.52 ^c ±0.31	30.48 ^b ±2.52
12	4.13 ^b ±0.14	35.77 ^d ±0.43	43.65 ^a ±2.84
15	7.26 ^a ±0.72	25.30 ^e ±5.00	46.90 ^a ±1.24
24	7.35 ^a ±0.73	17.26 ^f ±6.33	46.57 ^a ±0.58
30	7.12 ^a ±0.11	16.42 ^f ±7.29	46.59 ^a ±0.57
36	7.21 ^a ±0.09	16.70 ^f ±5.99	45.79 ^a ±0.95
48	7.15 ^a ±0.04	13.07 ^f ±1.66	45.32 ^a ±0.43

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

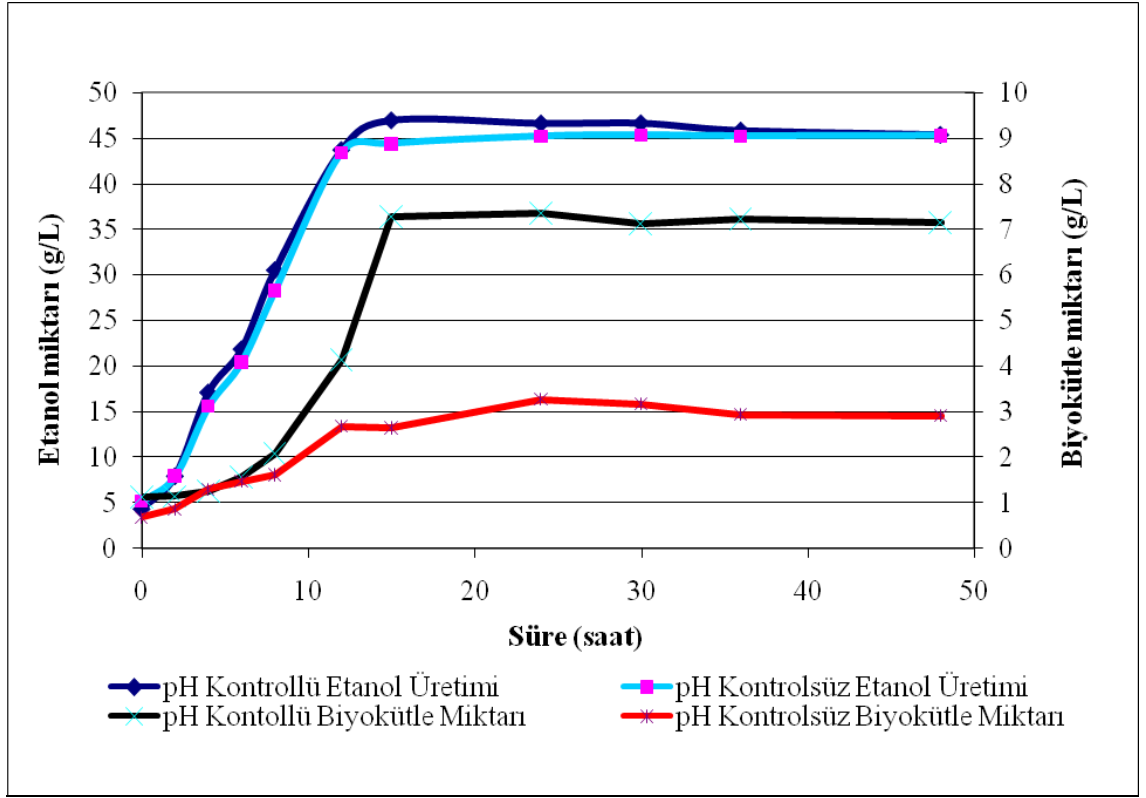
Şekil 4.3.'de pH kontrolü yapılmış fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir. Etanol fermentasyonunda biyokütle gelişimi ve etanol oluşumunun grafiği birbirine benzerlik göstermiştir. Yani mikroorganizma gelişimini sürdürürken bir yandan da etanol üretmektedir.



Şekil 4.3. Keçiboynuzu ekstraktında pH kontrollü etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim

Fermentasyon sırasında pH'nın kontrol altında tutulması nedeniyle maya gelişiminin yeterli düzeyde olduğu görülmüştür. Ortam pH'sı 4N NaOH ile 5.5'de sabit tutulmuştur. Fermentasyon süresi boyunca sabit asitlikte maya gelişiminin pH'nın kontrol edilmediği örneklerle göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Şekil 4.4'de pH 5.5'da kontrol edilmiş ve pH kontrolü yapılmamış sıvı fermentasyon besiyerindeki, biyokütle ve etanol miktarı gösterilmiştir.



Şekil 4.4. pH kontrolü gerçekleştirilmiş ve pH kontrolü yapılmamış örneklerin etanol ve biyokütle miktarlarının karşılaştırılması

pH değeri 5.5’de kontrol edilen fermentasyon örneklerindeki biyokütle miktarının, pH kontrolü yapılmayan örneklerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. pH kontrolünün yapıldığı örneklerdeki maksimum hücre miktarı 7.35 g/L olarak belirlenirken, diğerinde 3.26 g/L olarak bulunmuştur.

4.2.1.3. pH kontrollü ve pH kontrolsüz etanol üretimlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.5’de keçiyoynuzu ekstraktından etanol üretiminde, fermentasyon ortamında asitliğinin kontrol edilmesinin kinetik parametreler üzerine etkisi ve kinetik değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmiştir. Biyokütle ve etanol miktarlarının yanı sıra fermentasyona ait kinetik parametreler de fermentasyonun başarısını gösteren önemli etkenlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, fermentasyon ortamındaki pH kontrolünün etanol üretiminde istatistiksel olarak önemli bir etken olduğunu belirlemiştir ($P<0.05$). pH kontrolü yapılarak gerçekleştirilen fermentasyonda üretilen etanol miktarı (44.60 g/L) ile pH kontrolü gerçekleştirilmeden elde edilen etanol miktarı (40.17 g/L) birbirine çok yakın olmasına rağmen, pH kontrolü ile gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik değerlerin tamamı pH kontrolsüz üretime göre istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.5). Kontrollü fermentasyon için üretim hızı 3.37 g/L/h iken, kontrolsüz örneklerde 3.26 g/L/h olmuştur. Yine bunun yanında, hücre gelişiminin bir göstergesi olan maksimum gelişme hızları karşılaştırıldığında kontrollü üretimdeki değer (0.54 g/L/h), kontrolsüz üretimden (0.12 g/L/h) yaklaşık 6 kat daha hızlı bulunmuştur. Tüm kinetik parametreler arasında karşılaştırma testi yapıldığında pH kontrolünün yapıldığı denemelerin sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.5. pH kontrollü ve kontrolsüz etanol üretimlerine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	pH Uygulaması	
	pH kontrollü	pH kontrolsüz
Şeker tüketimi (g/L)	94.97 ^a	96.48 ^a
Etanol üretimi (g/L)	42.60 ^a	40.17 ^b
Verim (Y_p/s) (%)	44.86 ^a	41.63 ^b
Max. Tüketim hızı, $(-ds/dt)_{max}$ (g/L/h)	5.35 ^a	4.07 ^b
Max. Üretim hızı, $(dp/dt)_{max}$ (g/L/h)	3.37 ^a	3.26 ^b
Max. Gelişme hızı, $(dx/dt)_{max}$ (g/L/h)	0.54 ^a	0.12 ^b
Spesifik gelişme hızı (h^{-1})	0.16 ^a	0.10 ^b
İkiye katlanma süresi (t_d) (h)	4.29 ^b	6.88 ^a

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Fermentasyonda substrat gram veya mol olarak verilmektedir. Gram olarak ifade edilen verim; kullanılan birim substrattan ne kadar ürün elde edildiğini göstermektedir. Her iki üretime ait verimler incelendiğinde pH kontrolünün yapıldığı reaktördeki substratın ürüne çevrilme miktarı (Verim, Yp/s) % 44.86 bulunmuştur. Bunun yanında pH kontrolü gerçekleşmeyen reaktördeki verim % 41.63 olarak belirlenmiştir. Bir bakteri popülasyonunda bakteriler sabit zaman aralıklarıyla bölünür veya sabit bir bölünme hızıyla çoğalırlar. Bakteri kütlelerinin gelişme hızı da gelişme hızı katsayısına (μ) bağlı olarak artar. Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi pH kontrolünün gerçekleştiği reaktördeki spesifik gelişme hızı (0.16 h^{-1}), pH kontrolünün yapılmadığı fermentasyondaki spesifik gelişme hızından (0.10 h^{-1}) yüksek çıkmıştır. Kütlelerin iki katına çıkma süresinin (t_d), gelişme hızı (μ) ile olan ilişkisi ters orantılıdır. Bu nedenle gelişme katsayısı az olan popülasyonun ikiye katlanma süresi uzun olacağından dolayı pH kontrolünün yapılmadığı üretimlerdeki t_d değeri (6.88 h), pH kontrolü yapılan reaktördeki t_d değerinden (4.29 h) büyük olmuştur.

Etanol üretimi için optimum pH genellikle 5.0-5.5 arasındadır. Fermentasyon ortamındaki pH seviyesi 4.0’ın altına düştüğü zaman etanol üretimi tamamen durmaktadır (Graves vd 2006). Etanol fermentasyonunda pH kontrol edilmediği zaman organik asit oluşumu nedeniyle pH’nın optimum seviyenin altına düşmesi, etanol üretiminin düşük miktarlarda olması ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla fermentasyon ortamının pH’sı etanol üretimi için oldukça önemlidir. Narendranath vd (2005)’nin gerçekleştirdiği bir çalışmada birçok farklı konsantrasyonda fermentasyon ortamından etanol üretimde en yüksek değerlere pH 5.5’da kontrol edilen örneklerde ulaşılmıştır.

Elde edilen sonuçlar kinetik parametreler ışığında değerlendirildiğinde, keçiyoynuzu ekstraktından fermentasyon yoluyla etanol üretiminde fermentasyon ortamında pH kontrolünün yapıldığı üretime ait kinetik parametrelerin, reaktörde pH kontrolü yapılmadan gerçekleştirilen üretimlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple, çalışmanın bundan sonraki tüm etanol fermentasyonu denemeleri pH kontrolü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. İnokülasyon oranının etanol üretimi üzerine etkisi

Keçiboynuzu ekstraktının fermentasyonunda pH kontrolünün etanol üretimi üzerine etkisi incelendikten sonra ortama inoküle edilecek maya miktarının (inoculum size) etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla 3 farklı inokülasyon oranında (% 1, % 3 ve % 5) pH kontrollü denemeler gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1. % 1 İnokülasyon oranı

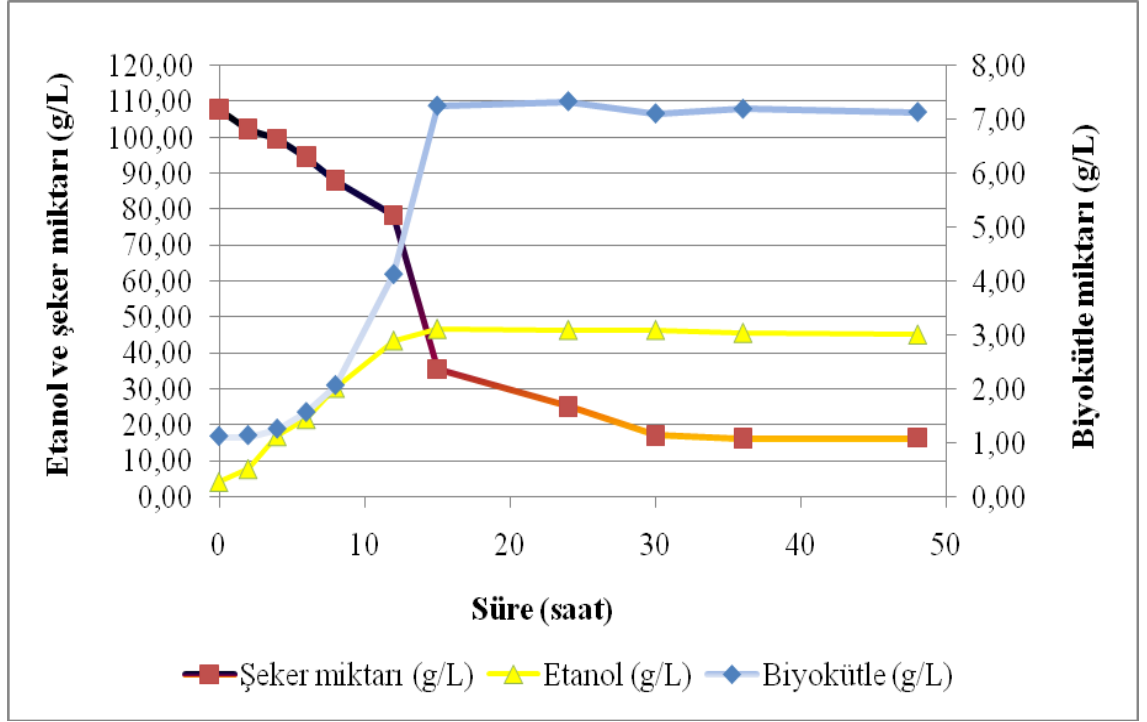
Etanol üretiminde fermentasyon ortamına eklenecek mikroorganizma miktarı verim, maksimum gelişen maya miktarı ve etanol miktarını doğrudan etkilemektedir. % 1 inokülasyon oranı ile pH kontrolü yapılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, biyokütle miktarı pH kontrolünün yapıldığı örneklerde fermentasyon işleminin 24. saatinde maksimum seviyeye (7.35 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen etanol ise 30. saatte maksimum seviyeye (46.90 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucunda besiyerinde bir miktar şeker (13.07 g/L) mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır. Fermentasyonun sıfıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 1.12 g/L olarak belirlenmiştir. Sıfıncı dakikada yapılan bu analiz mikroorganizma reaktöre inoküle edildikten sonra gerçekleştirilmiştir. Maya hücrelerinin reaktöre eklenmesi amacıyla gerçekleştirilen inkübasyon sırasında biyokütle gelişiminin yanına 4.30 g/L düzeyinde etanol oluştuğu da belirlenmiştir. % 1 inokülasyon oranında gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda 15. saatten sonra biyokütle oluşumu ile 12. saatten sonraki şeker tüketimi ve etanol oluşumu istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.6. Keçiboynuzu ekstraktında % 1 inokülasyon oranında etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	108.04 ^a ±3.92	0.00 ^f ±0.00
0	1.12 ^f ±0.01	102.54 ^{ab} ±2.50	4.30 ^e ±0.14
2	1.14 ^{ef} ±0.01	99.77 ^b ±6.25	7.90 ^d ±0.71
4	1.26 ^{ef} ±0.10	94.85 ^c ±2.90	17.07 ^c ±2.09
6	1.57 ^{ef} ±0.18	88.24 ^d ±2.63	21.82 ^c ±3.82
8	2.07 ^d ±0.27	78.52 ^e ±0.31	30.48 ^b ±2.52
12	4.13 ^c ±0.13	35.77 ^f ±0.43	43.65 ^a ±2.84
15	7.26 ^a ±0.72	25.30 ^f ±5.00	46.90 ^a ±1.24
24	7.35 ^a ±0.73	17.26 ^f ±6.33	46.57 ^a ±0.58
30	7.12 ^a ±0.11	16.42 ^f ±7.29	46.59 ^a ±0.57
36	7.21 ^a ±0.09	16.70 ^f ±5.99	45.79 ^a ±0.95
48	7.15 ^a ±0.05	13.07 ^f ±1.66	45.32 ^a ±0.43

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

% 1 inokülasyon oranında gerçekleştirilmiş fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarındaki değişim Şekil 4.5.'de verilmiştir. Etanol fermentasyonunda, biyokütle gelişimi ve etanol doğru orantılı olarak gelişmiştir. Yani mikroorganizma gelişimini sürdürürken bir yandan da ürün üretimi gerçekleşmektedir.



Şekil 4.5. Keçiboynuzu ekstraktında % 1 inokülasyon oranında etanol fermentasyonunda biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim

4.2.2.2. % 3 İnokülasyon oranı

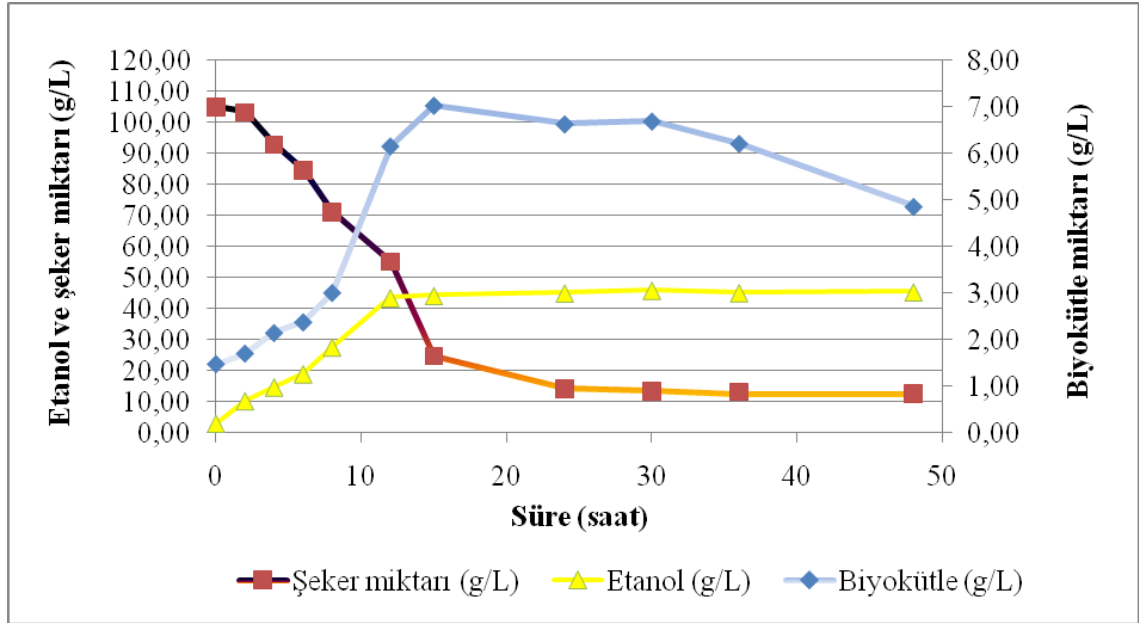
Çizelge 4.7’de, % 3 inokülasyon oranı ile pH kontrolü yapılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Fermentasyon sonucunda besiyerinde yine bir miktar şeker (11.60 g/L) mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır. Fermentasyonun sıfıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 1.47 g/L olarak belirlenmiştir. Maya hücrelerinin reaktöre eklenmesi amacıyla gerçekleştirilen inkübasyon sırasında biyokütle gelişiminin yanında 3.00 g/L etanol oluşmuştur. % 3 inokülasyon oranındaki fermentasyonda 15. saatten sonraki biyokütle oluşumu ve şeker tüketimi 12. saatten sonra ise etanol oluşumu miktarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Biyokütle miktarı ise fermentasyon işleminin 15. saatinde maksimum seviyeye (7.03 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen etanol de 30. saatte maksimum düzeye (45.90 g/L) ulaşmıştır.

Çizelge 4.7. Keçiboynuzu ekstraktında % 3 inokülasyon oranında etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	105.07 ^a ±6.48	0.00 ^f ±0.00
0	1.47 ^f ±0.08	103.21 ^{ab} ±6.55	3.00 ^e ±0.14
2	1.70 ^{ef} ±0.52	92.83 ^b ±3.28	10.31 ^d ±0.86
4	2.14 ^{ef} ±0.44	84.54 ^c ±2.68	14.72 ^c ±3.78
6	2.37 ^{ef} ±0.02	71.02 ^c ±6.13	18.96 ^c ±4.28
8	3.00 ^d ±0.20	55.03 ^d ±3.37	27.62 ^b ±1.32
12	6.15 ^c ±0.49	24.61 ^e ±4.67	43.52 ^a ±2.03
15	7.03 ^a ±0.59	14.05 ^f ±2.76	44.20 ^a ±1.07
24	6.63 ^a ±0.23	13.32 ^f ±2.05	45.04 ^a ±1.04
30	6.69 ^a ±0.03	13.04 ^f ±1.83	45.90 ^a ±0.33
36	6.21 ^a ±0.09	12.41 ^f ±1.88	45.09 ^a ±0.07
48	4.85 ^a ±1.10	11.60 ^f ±2.62	45.35 ^a ±0.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Şekil 4.6.'da % 3 maya inokülasyonu yapılmış fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir. Etanol fermentasyonunda, biyokütle gelişimi ve etanol oluşumu yine doğrusal ilişki göstermiştir. Yani mikroorganizma gelişimini sürdürürken bir yandan da etanol üretimi devam etmiştir.



Şekil 4.6. Keçiboynuzu ekstraktında % 3 inokülasyon oranında etanol fermentasyonunda biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim

4.2.2.3. % 5 İnokülasyon oranı

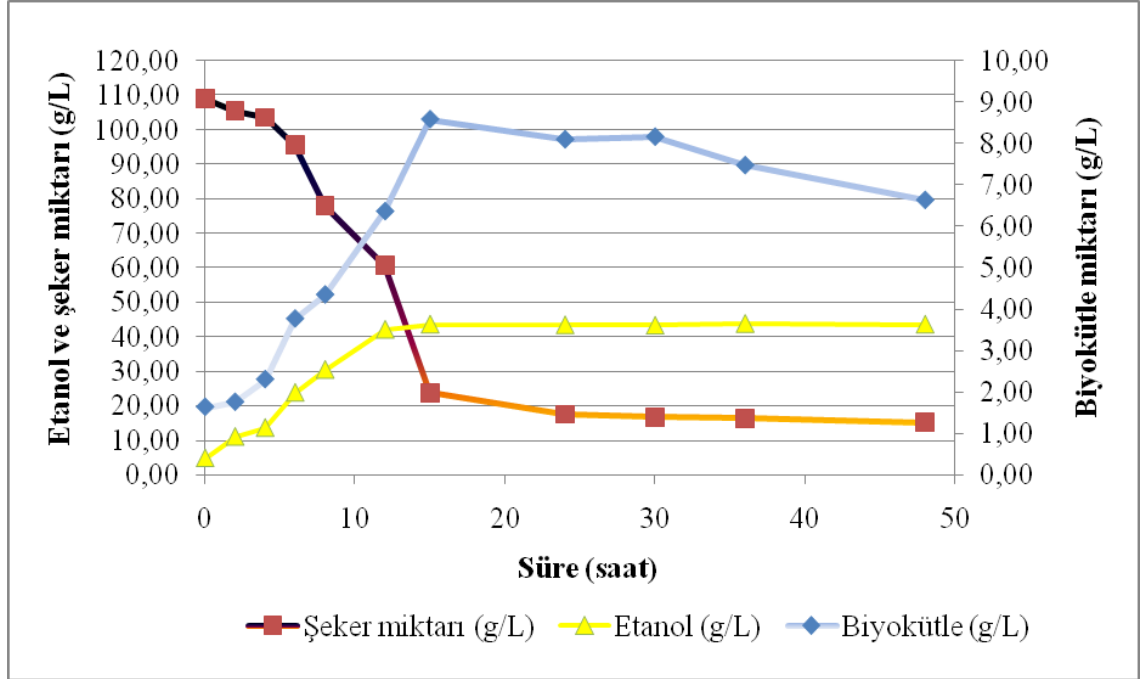
% 5 inokülasyon ile pH kontrolü yapılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle miktarı fermentasyonun işleminin 15. maksimum seviyeye (8.59 g/L) ulaşırken biyokütle gelişiminin yanına 4.79 g/L etanol oluştuğu da belirlenmiştir. Fermentasyonda 36. saatte etanol miktarı maksimum seviyeye (43.84 g/L) ulaşmıştır. Bunun yanında besiyerinde bir miktar şeker (14.81 g/L) daha önceki inokülasyonlarda olduğu gibi mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır. Fermentasyonun sıfırıncı dakika örneğinde biyokütle miktarı 1.64 g/L olarak belirlenmiştir. Biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Bu fermentasyonda 15. saatten sonraki biyokütle oluşumu ve 12. saatten sonraki şeker tüketimi ve etanol miktarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.8. Keçiboynuzu ekstraktında % 5 inokülasyon oranında etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	108.99 ^a ±4.09	0.00 ^f ±0.00
0	1.64 ^f ±0.13	105.35 ^{ab} ±5.48	4.79 ^e ±0.92
2	1.76 ^{ef} ±0.12	103.50 ^b ±6.70	11.01 ^d ±0.60
4	2.31 ^{ef} ±0.14	95.50 ^c ±2.14	13.61 ^c ±0.21
6	3.77 ^d ±0.31	77.93 ^d ±1.07	23.84 ^b ±3.26
8	4.35 ^d ±1.18	60.64 ^d ±3.24	30.50 ^b ±3.85
12	6.37 ^c ±1.33	23.69 ^e ±1.52	42.12 ^a ±2.35
15	8.59 ^a ±0.92	17.64 ^e ±3.66	43.65 ^a ±0.98
24	8.11 ^a ±1.06	16.82 ^e ±3.18	43.47 ^a ±0.75
30	8.17 ^a ±0.93	16.32 ^e ±3.26	43.34 ^a ±0.50
36	7.48 ^a ±1.46	15.25 ^e ±2.87	43.84 ^a ±0.52
48	6.64 ^a ±1.06	14.81 ^e ±2.76	43.66 ^a ±0.92

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

% 5 maya inokülasyonu yapılmış fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarındaki değişim Şekil 4.7.'de görülmektedir. Etanol fermentasyonunda, biyokütle gelişimi ve etanol oluşumu daha önceki denemelerde olduğu gibi doğrusal ilişki göstermiştir. Yani mikroorganizma gelişimini sürdürürken bir yandan da ürün üretimi devam etmiştir.



Şekil 4.7. Keçiboynuzu ekstraktında % 5 inokülasyon oranındaki etanol fermentasyonunda biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim

4.2.2.4. Etanol üretiminde inokülasyon oranlarının karşılaştırılması

Keçiboynuzu ekstraktından etanol üretiminde, fermentasyon ortamına inoküle edilen maya miktarının kinetik parametreler üzerine etkisi ve kinetik değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.9’da gösterilmiştir. Biyokütle ve etanol miktarlarının yanı sıra fermentasyona ait kinetik parametreler de fermentasyonun başarısını gösteren önemli etkenlerdir. Fermentasyon işlemlerinin başlangıcında inokülasyon oranının etanol üretiminde önemli bir etken olduğu belirlenmiştir. % 1 ve % 5 maya inokülasyonu yapılarak gerçekleştirilen fermentasyonda üretilen etanol miktarı 42.60 ve 38.55 g/L olarak belirlenirken, % 3 maya inokülasyonu yapılarak gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilen etanol miktarları 42.90 g/L bulunmuştur. Benzer şekilde etanol üretim ve şeker tüketimlerinden hesap edilen verim miktarı, % 3 maya inokülasyonunun yapıldığı üretimlerde % 45.90 belirlenirken, % 1 ve % 5 maya inokülasyonu yapılan üretimlerde % 44.86 ve % 40.84 olarak bulunmuştur. 3 farklı inokülasyon oranı kullanılan denemelerden elde edilen etanol miktarları birbirine yakın olmasına rağmen, % 3 maya

inokülasyonu yapılan reaktörde gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi, etanol üretimi, verim ve maksimum üretim hızı gibi kinetik parametreler diğer üretimlere göre istatistiksel olarak daha önemli çıkmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.9). % 3 maya inokülasyonunun yapıldığı fermentasyon için üretim hızı 3.70 g/L/h iken, % 1 ve % 5 maya inokülasyonu yapılan örneklerde sırasıyla 3.37 ve 3.19 g/L/h olmuştur. Ancak bunun yanında, hücre gelişiminin bir göstergesi olan maksimum gelişme hızları karşılaştırıldığında % 5 maya inokülasyonunun yapıldığı üretimdeki değer 0.73 g/L/h olurken, % 1 ve % 3 maya inokülasyonu yapılan üretimlerde 0.54 ve 0.65 g/L/h olarak belirlenmiştir. % 5 maya inokülasyonu yapılan reaktördeki gelişme hızının diğer üretimlere göre yüksek olması başlangıçta eklenen miktarının yüksek olmasında kaynaklanmaktadır.

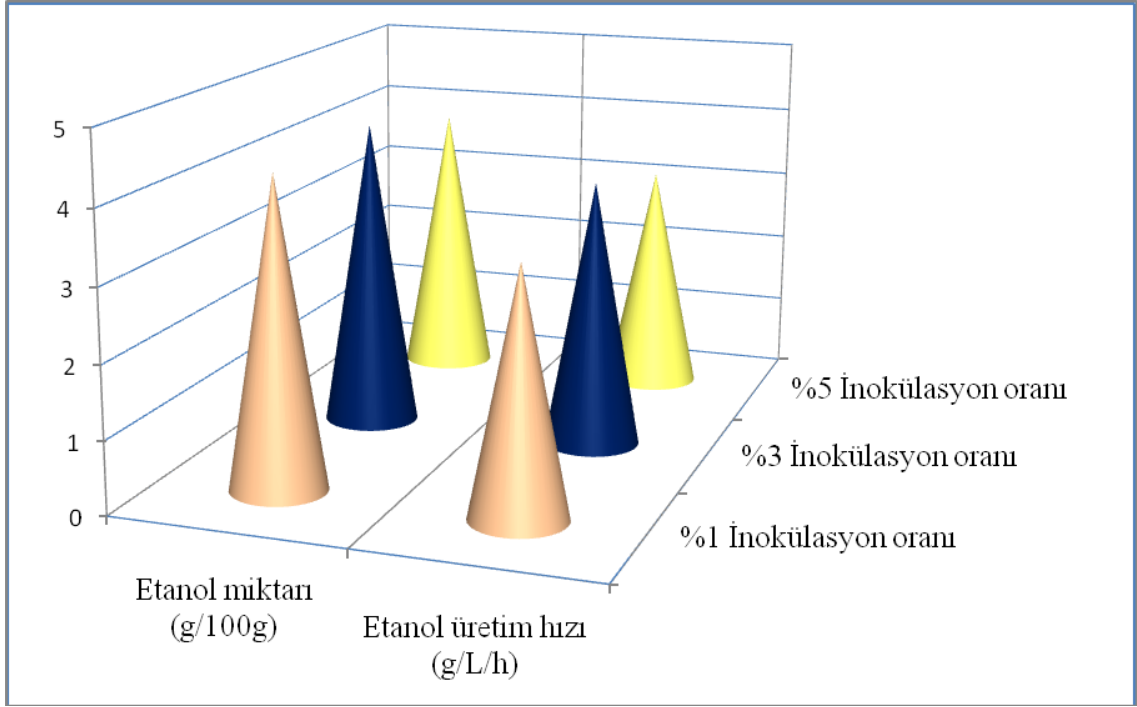
Çizelge 4.9. Farklı inokülasyon oranlarındaki etanol üretimlerine ait kinetik parametreler (pH kontrol 5.5).

Kinetik parametreler	İnokülasyon oranı		
	% 1	% 3	% 5
Şeker tüketimi (g/L)	94.97 ^a	93.47 ^a	94.18 ^a
Etanol üretimi (g/L)	42.60 ^b	42.90 ^a	38.55 ^c
Verim (Yp/s) (%)	44.86 ^b	45.90 ^a	40.94 ^c
Max. Tüketim hızı, (-ds/dt) _{max} (g/L/h)	5.35 ^b	5.91 ^c	7.10 ^a
Max. Üretim hızı, (dp/dt) _{max} (g/L/h)	3.37 ^b	3.70 ^a	3.19 ^c
Max. Gelişme hızı, (dx/dt) _{max} (g/L/h)	0.54 ^c	0.65 ^b	0.73 ^a
Spesifik gelişme hızı (h ⁻¹)	0.16 ^b	0.16 ^b	0.19 ^a
İkiye katlanma süresi (t _d) (h)	4.29 ^a	4.29 ^a	3.63 ^b

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Çizelge 4.9.'da görüldüğü gibi, farklı maya inokülasyon oranlarına ait tüketim hızları; % 5 maya inokülasyonu yapılan üretimde 7.10 g/L/h belirlenirken, % 1 ve % 3 maya inokülasyonunun yapıldığı üretimlerde 5.35 ve 5.91 g/L/h olarak saptanmıştır. % 5 maya inokülasyonu yapılan reaktördeki tüketim hızının diğer üretimlere göre yüksek olması da başlangıçtaki mikroorganizma popülasyonunun yüksek olmasından

kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde % 5 maya inokülasyonu yapılan üretimlerdeki ikiye katlanma süresi (3.63 g/L/h) % 1 ve % 3 maya inokülasyonunun yapıldığı reaktördeki ikiye katlanma sürelerinden (4.29 ve 4.28 g/L/h) daha kısa olmuştur.



Şekil 4.8. Keçiyoynuzu ekstraktında 3 farklı inokülasyon oranındaki, etanol miktarı ve üretim hızları

Şekil 4.8.'de, fermentasyon ortamına 3 farklı inokülasyon oranında eklenen maya hücrelerinin oluşturduğu etanol miktarları ve etanol üretme hızlarının karşılaştırıldığı grafik gösterilmiştir. Etanol miktarı ve etanol üretme hızlarının karşılaştırılması fermentasyon ortamının daha iyi anlaşılmasına olanak vermektedir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi, % 3 inokülasyon oranının kullanıldığı fermentasyona ait etanol üretim hızı ve etanol miktarı, diğer üretimlerden daha yüksek değerlere sahiptir. Farklı inokülasyon oranlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait etanol üretim hızı ve etanol miktarının grafik üzerinde karşılaştırılması sonucunda da en iyi sonuçların % 3 inokülasyon oranına sahip fermentasyondan alındığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.8). Kinetik değerlerin tümü göz önünde tutularak, bundan sonra gerçekleştirilecek tüm fermentasyonlarda % 3 maya inokülasyon oranının kullanılmasına karar verilmiştir.

Sharma vd (2002) ay çiçeği tablasını kullanarak enzimatik olarak monosakkaritlerine parçalayarak elde ettikleri ekstraktı etanol fermentasyonu işlemi için kullandıkları bir çalışmada, farklı inokülasyon oranları arasında gerçekleştirdikleri denemelerde en yüksek sonuçlara % 3 inokülasyon oranı kullandıkları fermentasyonda ulaşmışlardır. Yine El-Diwany vd (1992) melas kullanarak % 3 inokülasyon oranı ile gerçekleştirdikleri etanol fermentasyonuna ait kinetik parametreler, diğer inokülasyon oranlarına göre olumlu sonuçlar vermiştir. Etanol üretimi üzerine yapılan diğer çalışmalarda Gibbons ve Westby (1986) en uygun inokülasyon oranının yine % 3 olduğunu belirtmişler; Laopaiboon vd (2009) da tatlı sorgum suyu kullanarak etanol üretimi gerçekleştirdikleri çalışmada % 3 inokülasyon oranı kullanarak 280 g/L başlangıç şeker miktarında 120 g/L etanol üretebilmişlerdir. Bunun yanında yine % 3 maya inokülasyon oranı kullanarak aynı şartlar altında melasdan 109 g/L etanol üretmişlerdir.

4.2.3. Farklı azot kaynaklarının etanol üretimi üzerine etkisi

Keçiboynuzu ekstraktından etanol üretiminde pH'nın ve maya inokülasyon miktarının fermentasyon üzerine etkisi incelendikten sonra, farklı azot kaynaklarının pahalı bir kaynak olan maya ekstraktına (yeast extract) alternatif olarak kullanılması üzerine de denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tavuk eti tozu (Poultry Meal), kabuk ve tırnak karışım tozları (Hull and Fines Mix), tüy tozları (Feather Meal) ve et ve kemik tozları (Meat-Bone Meal) kullanılmıştır. Alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretimleri maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretimleri ile karşılaştırılmıştır. Bu denemelerde de daha önce en iyi sonuçlar alınan pH kontrollü ve % 3 inokülasyon oranı koşulları uygulanmıştır.

4.2.3.1. Tavuk eti tozu (Poultry Meal) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

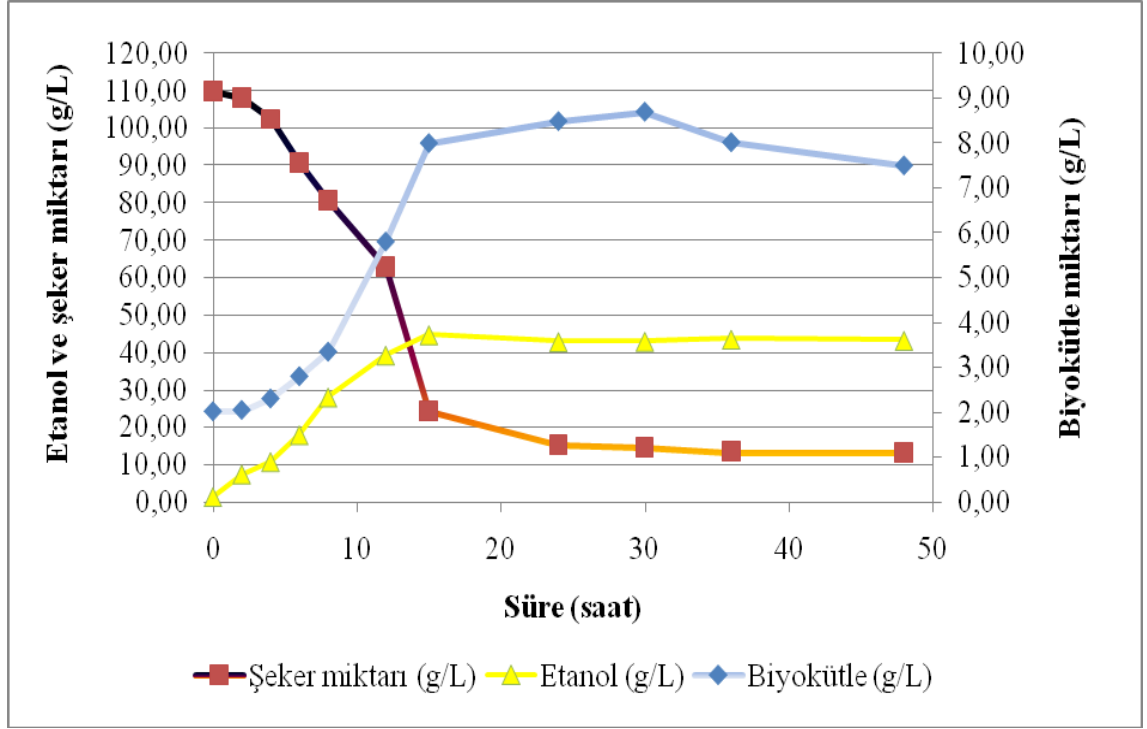
Etanol üretiminde fermentasyon ortamının bileşimi, verim, maksimum maya miktarı ve etanol miktarını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle fermentasyon ortamına Çizelge 3.4'de belirtilen 9 g/1.5 L maya ekstraktı (yeast extract) yerine aynı konsantrasyonda tavuk eti tozu (Poultry Meal, Griffin Industries, Inc. Butler, KY, USA) kullanılmıştır. Tavuk eti tozu kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, biyokütle miktarı maya ekstraktı yerine tavuk eti tozu kullanılan örneklerde fermentasyon işleminin 30. saatinde maksimum seviyeye (8.70 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen etanol 15. saatte maksimum seviyeye (44.71 g/L) çıkmıştır. Deneme sonucunda besiyerinde 11.62 g/L şeker mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır. Fermentasyonun sıfırıncı dakika örneğinde biyokütle miktarının 2.02 g/L olduğu saptanmıştır. Maya hücrelerinin reaktöre eklenmesi amacıyla gerçekleştirilen inkübasyon sırasında biyokütle gelişiminin yanın da 1.26 g/L düzeyinde etanol oluşmuştur. Bu fermentasyonda 15. saatten sonraki zamanlara ait biyokütle gelişimi ve etanol oluşumu ve 12. saatten sonraki şeker tüketim miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$).

Çizelge 4.10. Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	109.92 ^a ±2.02	0.00 ^g ±0.00
0	2.02 ^{ef} ±0.87	108.17 ^a ±3.80	1.26 ^f ±0.35
2	2.06 ^{ef} ±0.88	102.32 ^b ±3.30	7.34 ^e ±1.35
4	2.31 ^{ed} ±0.58	90.69 ^c ±3.80	10.65 ^d ±2.23
6	2.81 ^{ed} ±0.30	80.68 ^d ±3.11	17.85 ^d ±0.66
8	3.35 ^d ±0.33	62.86 ^e ±3.44	27.98 ^c ±2.35
12	5.81 ^c ±1.63	24.24 ^f ±3.72	39.25 ^b ±2.06
15	8.00 ^{ba} ±1.12	15.32 ^f ±0.85	44.71 ^a ±1.70
24	8.49 ^a ±0.09	14.61 ^f ±1.31	42.86 ^a ±1.03
30	8.70 ^a ±0.25	13.64 ^f ±0.54	42.94 ^a ±0.89
36	8.02 ^{ba} ±0.28	13.14 ^f ±0.73	43.50 ^a ±0.50
48	7.51 ^{ba} ±0.83	11.62 ^f ±0.62	43.20 ^a ±1.02

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Maya ekstraktı yerine tavuk eti tozu katkılanarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı Şekil 4.9.'da görülmektedir. Etanol fermentasyonunda, biyokütle gelişimi ve etanol oluşumunun grafiği birbirine paralellik göstermektedir.



Şekil 4.9. Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti tozu katkılanarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarındaki değişim

4.2.3.2. Kabuk ve tırnak karışım tozları (Hull and Fines Mix) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Daha önce de belirtildiği gibi mikroorganizmaların fermentasyon ortamında gelişmeleri ve çoğalmaları üzerine azot kaynağı önemli bir role sahiptir. Bu fermentasyonda ortama maya ekstraktı (yeast extract) yerine aynı konsantrasyonda kabuk ve tırnak karışım tozları (Hull and Fines Mix, Griffin Industries, Inc. Butler, KY, USA) ilave edilmiştir. Çizelge 4.11’de kabuk ve tırnak karışım tozları katkılanarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Deneme sonuçlarına göre, maya ekstraktı yerine kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılan uygulamalarda maksimum biyokütle miktarı fermentasyon işleminin 30. saatinde 7.79 g/L olarak saptanmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen etanol de 30. saatte maksimum seviyeye (46.62 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon işlemi sonucunda besiyerinde bir miktar şeker (13.24 g/L) mayalar tarafından tüketilmeden

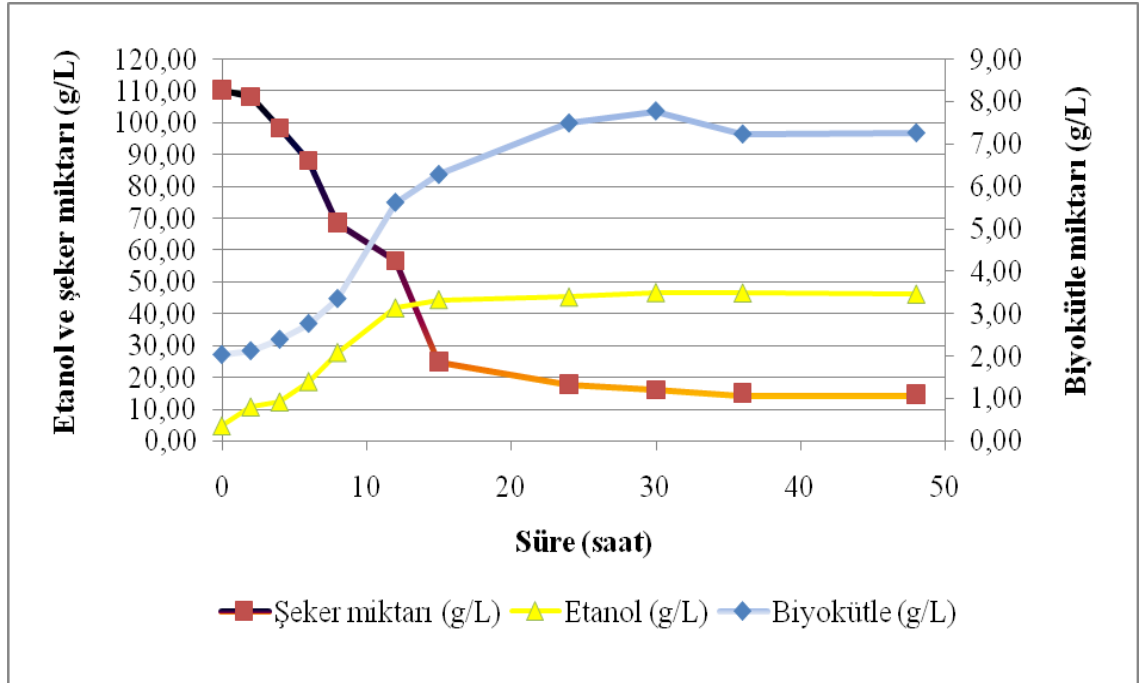
kalmıştır. Fermentasyonun sıfıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 2.03 g/L olarak belirlenmiştir. Fermentöre maya inokülasyonu için gerçekleştirilen ön zenginleştirme sırasında biyokütle gelişiminin yanına 4.73 g/L etanol oluştuğu da belirlenmiştir. Kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda 24. saatten sonraki zamanlara ait biyokütle oluşumu ve 15. saatten sonraki şeker tüketimi ve etanol oluşumu miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.11. Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	110.40 ^a ±2.70	0.00 ^g ±0.00
0	2.03 ^{ef} ±0.89	108.09 ^a ±2.39	4.73 ^f ±0.39
2	2.12 ^{ef} ±0.94	98.25 ^b ±2.90	10.64 ^e ±1.11
4	2.39 ^{ed} ±0.92	88.01 ^b ±2.48	12.22 ^d ±1.88
6	2.77 ^{ed} ±0.59	68.65 ^c ±2.06	18.65 ^d ±2.11
8	3.36 ^d ±0.43	56.56 ^c ±3.58	27.77 ^c ±2.13
12	5.63 ^c ±1.38	24.80 ^e ±2.01	41.78 ^b ±2.99
15	6.29 ^{ab} ±1.19	17.74 ^f ±0.87	44.39 ^a ±0.35
24	7.51 ^a ±0.63	16.01 ^f ±0.96	45.24 ^a ±0.70
30	7.79 ^a ±1.09	14.91 ^f ±0.82	46.62 ^a ±1.55
36	7.25 ^a ±0.82	14.51 ^f ±0.99	46.46 ^a ±1.57
48	7.28 ^a ±0.60	13.24 ^f ±0.03	46.13 ^a ±0.86

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Şekil 4.10.'da maya ekstraktı yerine kabuk ve tırnak karışım tozları katkılanarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu denemelerinden alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir.



Şekil 4.10. Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozu kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim

4.2.3.3. Tüy tozları (Feather Meal) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Farklı azot kaynaklarının maya ekstraktına alternatif olarak kullanıldığı etanol fermentasyonu denemelerinde verim, maksimum maya miktarı ve etanol miktarı kullanılan azot kaynağına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Fermentasyon ortamına maya ekstraktı (yeast extract) yerine aynı konsantrasyonda tüy tozları (Feather Meal, Griffin Industries, Inc. Butler, KY, USA) eklenmiştir. Tüy tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Maksimum biyokütle miktarı maya ekstraktı yerine tüy tozları kullanılan örneklerde fermentasyon işleminin 30. saatinde 9.35 g/L olarak belirlenmiştir. Bunun yanında fermentasyon sonucu elde edilen etanol 36. saatte maksimum seviyeye (40.81 g/L) ulaşmıştır. Bu fermentasyonda da daha önce olduğu gibi besiyerinde bir miktar şeker (9.85 g/L) mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır.

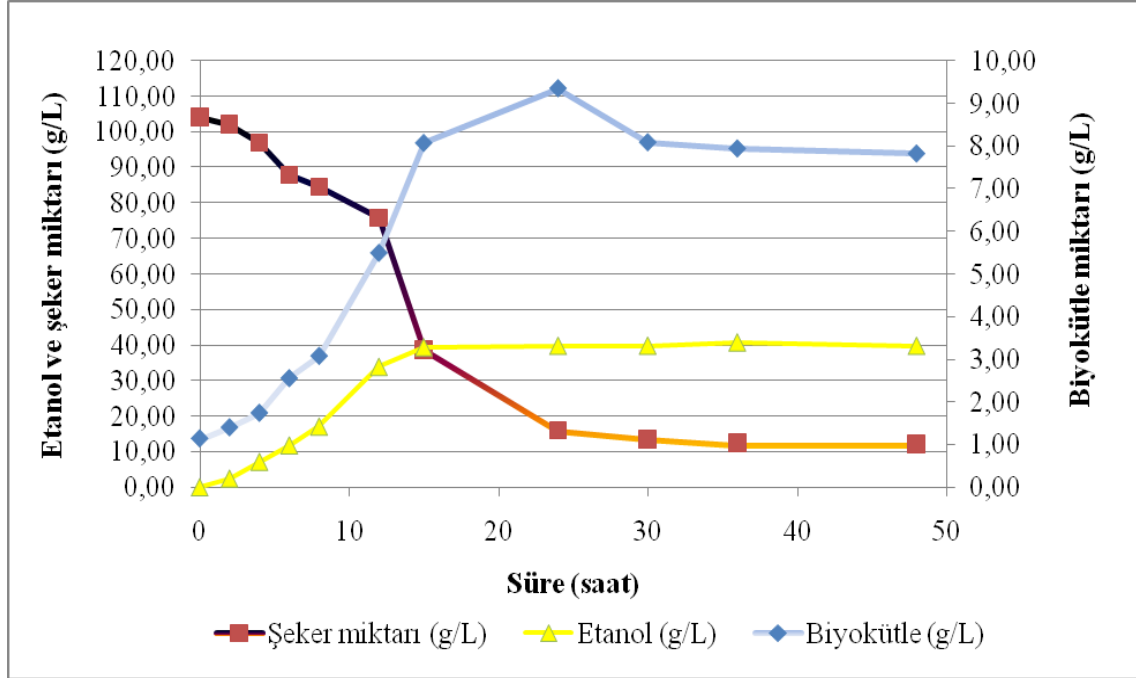
Mikroorganizmanın fermentöre inoküle edilmesinden hemen sonra fermentasyonun sıfıncı zaman örneği alınarak biyokütle miktarı 1.14 g/L olarak belirlenmiştir. Tüy tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda 15. saatten sonraki biyokütle oluşumu, şeker tüketimi ve etanol oluşumu miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.12. Keçiboynuzu ekstraktında tüy tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	104.29 ^a ±1.73	0.00 ^g ±0.00
0	1.14 ^{ef} ±0.06	102.11 ^a ±2.70	0.00 ^g ±0.00
2	1.40 ^{ef} ±0.13	97.01 ^b ±2.59	2.44 ^f ±0.78
4	1.74 ^{de} ±0.12	87.93 ^c ±2.19	7.16 ^e ±2.64
6	2.55 ^{de} ±0.07	84.51 ^c ±2.20	11.77 ^d ±3.30
8	3.07 ^e ±0.24	75.84 ^d ±1.31	17.08 ^c ±1.81
12	5.49 ^c ±0.67	38.70 ^e ±3.74	33.93 ^b ±1.71
15	8.07 ^{ab} ±0.06	15.89 ^f ±3.22	39.46 ^a ±1.37
24	9.35 ^a ±1.40	13.42 ^f ±0.11	39.84 ^a ±0.24
30	8.09 ^{ab} ±0.45	12.44 ^f ±0.87	39.88 ^a ±0.06
36	7.94 ^{ab} ±0.36	11.98 ^f ±1.07	40.81 ^a ±0.95
48	7.82 ^{ab} ±0.46	9.85 ^f ±1.27	39.83 ^a ±0.59

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Şekil 4.11.'de maya ekstraktı yerine tütün tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir.



Şekil 4.11. Keçiboynuzu ekstraktında tütün tozu kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişim

4.2.3.4. Et ve kemik tozları (Meat-Bone Meal) kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Endüstriyel olarak etanol üretiminde fermentasyon ortamında kullanılan azot kaynağının ekonomik olarak önemi büyüktür. Bu nedenle fermentasyon ortamına maya ekstraktı (yeast extract) yerine aynı konsantrasyonda et ve kemik tozları (Meat-Bone Meal Griffin Industries, Inc. Butler, KY, USA) da katılmıştır. Çizelge 4.13'de et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Deneme sonuçları, maya ekstraktı yerine et ve kemik tozları kullanılan örneklerde fermentasyon işleminin 24. saatinde biyokütle

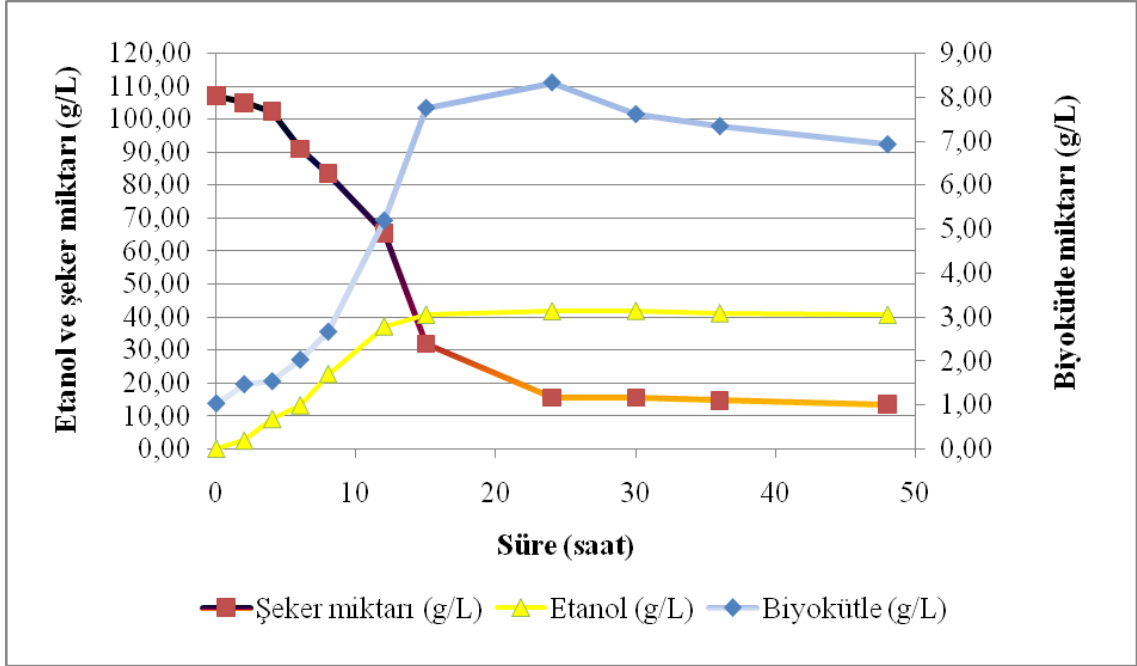
miktarının maksimum seviyeye (8.34 g/L) ulaştığını göstermiştir. Fermentasyon sonucu elde edilen etanol 30. saatte maksimum seviyeye (41.79 g/L) ulaşırken önceki denemelerde olduğu gibi besiyerinde bir miktar şeker (13.18 g/L) mayalar tarafından tüketilmeden kalmıştır. Fermentasyonun sıfıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 1.05 g/L olarak belirlenmiştir. Et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda 15. saatten sonra zamanlara ait biyokütle oluşumu, şeker tüketimi ve etanol oluşumu miktarında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Çizelge 4.13. Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	107.05 ^a ±2.63	0.00 ^g ±0.00
0	1.05 ^{ef} ±0.06	104.90 ^a ±2.64	0.00 ^g ±0.00
2	1.48 ^{ef} ±0.11	102.30 ^b ±2.36	2.48 ^f ±0.92
4	1.55 ^{de} ±0.08	90.92 ^c ±2.42	9.00 ^e ±2.52
6	2.04 ^{de} ±0.01	83.47 ^c ±2.46	13.19 ^d ±2.80
8	2.68 ^d ±0.49	65.39 ^d ±2.86	22.65 ^c ±2.90
12	5.20 ^c ±1.12	31.79 ^e ±2.17	37.10 ^b ±2.80
15	7.76 ^{ba} ±0.31	15.54 ^f ±0.75	40.62 ^a ±0.40
24	8.34 ^a ±2.42	15.47 ^f ±0.77	41.72 ^a ±1.70
30	7.62 ^{ba} ±1.66	14.67 ^f ±1.27	41.79 ^a ±2.04
36	7.35 ^{ba} ±1.49	13.42 ^f ±1.13	41.07 ^a ±0.79
48	6.93 ^b ±1.35	13.18 ^f ±0.90	40.58 ^a ±0.22

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Maya ekstraktı yerine et ve kemik tozları katkılanarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik Şekil 4.12.'de görülmektedir.



Şekil 4.12. Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarındaki değişim

4.2.3.5. Etanol üretiminde katkısız keçiboynuzu ekstraktının kullanılması

Etanol üretiminde ortama eklenen mineral madde ve azot kaynaklarının etkisini saptamak amacıyla keçiboynuzu ekstraktı hiçbir katkı yapılmaksızın fermentasyona bırakılmıştır. Bu fermentasyona ait biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir. Katkısız keçiboynuzu ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda 15. saatten sonra biyokütle oluşumu, şeker tüketimi ve etanol oluşumu miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

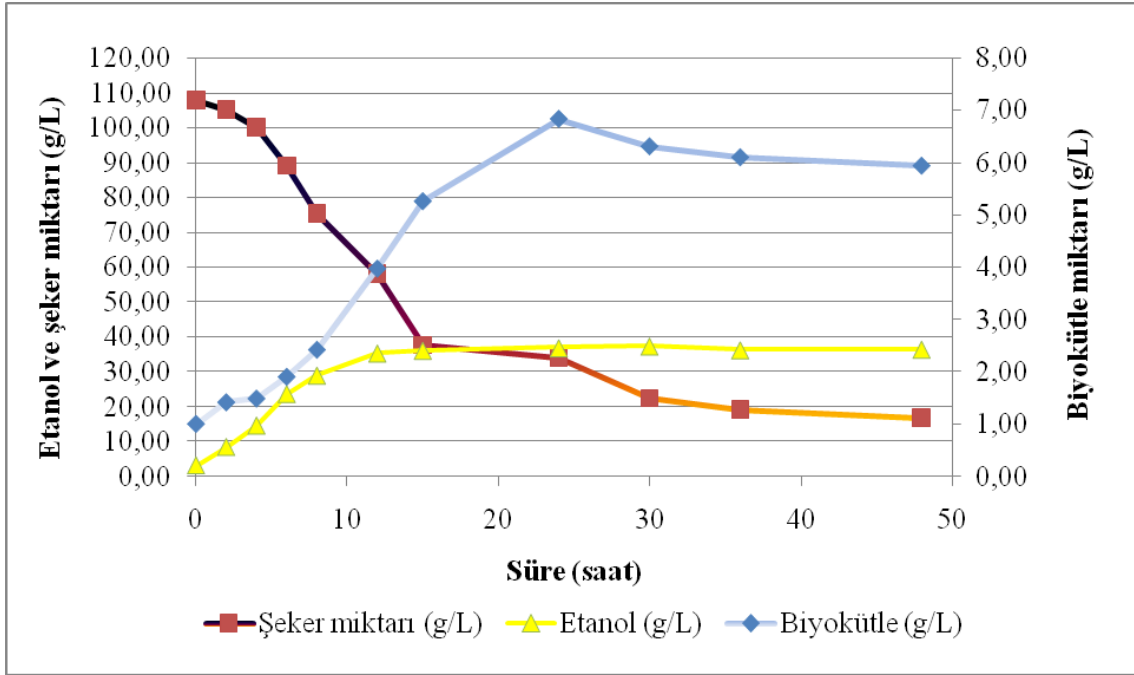
Çizelge 4.14. Keçiboynuzu ekstraktında katkı kullanmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^g ±0.00	107.93 ^a ±1.94	0.00 ^g ±0.00
0	1.01 ^g ±0.01	105.22 ^b ±1.59	3.07 ^f ±.121
2	1.42 ^{fg} ±0.01	100.07 ^c ±0.41	8.35 ^e ±1.15
4	1.49 ^{ef} ±0.06	89.08 ^d ±1.30	14.50 ^d ±0.28
6	1.91 ^{ef} ±0.25	75.34 ^d ±1.31	23.60 ^c ±1.70
8	2.43 ^e ±0.49	58.12 ^e ±1.48	28.90 ^c ±1.55
12	3.97 ^d ±0.09	37.69 ^f ±0.94	35.30 ^b ±0.99
15	5.26 ^{bc} ±0.33	34.15 ^g ±1.33	36.10 ^a ±0.42
24	6.83 ^a ±0.04	22.49 ^{hg} ±1.45	36.80 ^a ±0.57
30	6.31 ^{ab} ±0.17	19.26 ^{hg} ±2.52	37.30 ^a ±1.27
36	6.10 ^{bc} ±0.43	16.90 ^{hg} ±1.50	36.20 ^a ±0.85
48	5.94 ^c ±0.30	13.56 ^h ±0.43	36.40 ^a ±1.13

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Biyokütle miktarı hiçbir katkı kullanmadan doğrudan keçiboynuzu ekstraktının kullanıldığı örneklerde fermentasyon işleminin 24. saatinde maksimum seviyeye (6.83 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen etanol 30. saatte maksimum seviyeye (37.30 g/L) ulaşırken besiyerinde bir miktar şeker (13.56 g/L) mayalar tarafından

tüketilmeden kalmıştır. Fermentasyonun sıfırıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 1.01 g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Yine benzer şekilde fermentasyon ortamına eklenen mikroorganizma ile birlikte bir miktar etanol (3.07 g/L) de sıfırıncı zaman örneğinde belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Keçiboynuzu ekstraktında herhangi bir katkı kullanılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve etanol miktarlarındaki değişimi

Şekil 4.13.'de keçiboynuzu ekstraktına hiçbir katkı yapılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonu ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir. Etanol fermentasyonunda, biyokütle gelişimi ve etanol oluşumunun birbirine paralel olduğu görülmektedir. Yani mikroorganizma gelişimini sürdürürken bir yandan da üretim gerçekleşmektedir.

4.2.3.6. Etanol üretiminde farklı azot kaynaklarının kullanılması ile gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması

Fermentasyon ortamında bulunan azotun mikroorganizmalar tarafından kolayca kullanılabilir olması gerekir. Çizelge 4.15’de keçiboynuzu ekstraktından etanol üretiminde, fermentasyon ortamına eklenen azot kaynaklarından olan maya ekstraktı yerine kullanılan 4 farklı alternatif azot kaynağının kinetik parametreler üzerine etkisi ve kinetik değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmiştir. Biyokütle ve etanol miktarlarının yanı sıra fermentasyona ait kinetik parametreler de fermentasyonun başarısını gösteren önemli etkenlerdir. Denemelerden elde edilen analiz sonuçlarına göre, fermentasyon ortamına eklenen azot kaynağının etanol üretiminde önemli bir etken olduğu belirlenmiştir. Üretilen maksimum etanol miktarı (41.90 g/L) ve maksimum tüketim hızı (7.46 g/L/h) kabuk ve tırnak karışım tozlarının kullanıldığı etanol fermentasyonundan elde edilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Kabuk ve tırnak karışım tozlarının azot kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyonlarda etanol üretimi yüksek olmasına rağmen maksimum üretim hızı (3.09 g/L/h) düşük kalmıştır. Maksimum üretim hızı (3.48 g/L/h) ve en yüksek etanol verimi (%44.51) et ve kemik tozlarının azot kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyonlardan elde edilmiştir.

Alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonlarında en yüksek spesifik gelişme hızı (0.15 g/L/h) et ve kemik tozlarının kullanıldığı fermentasyonlarda saptanmıştır. Et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonda belirlenen etanol konsantrasyonu (44.51 g/L) ve etanol üretim hızı (3.48 g/L/h), diğer alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen üretilere ait etanol konsantrasyonu ve üretim hızlarından yüksek olmuştur.

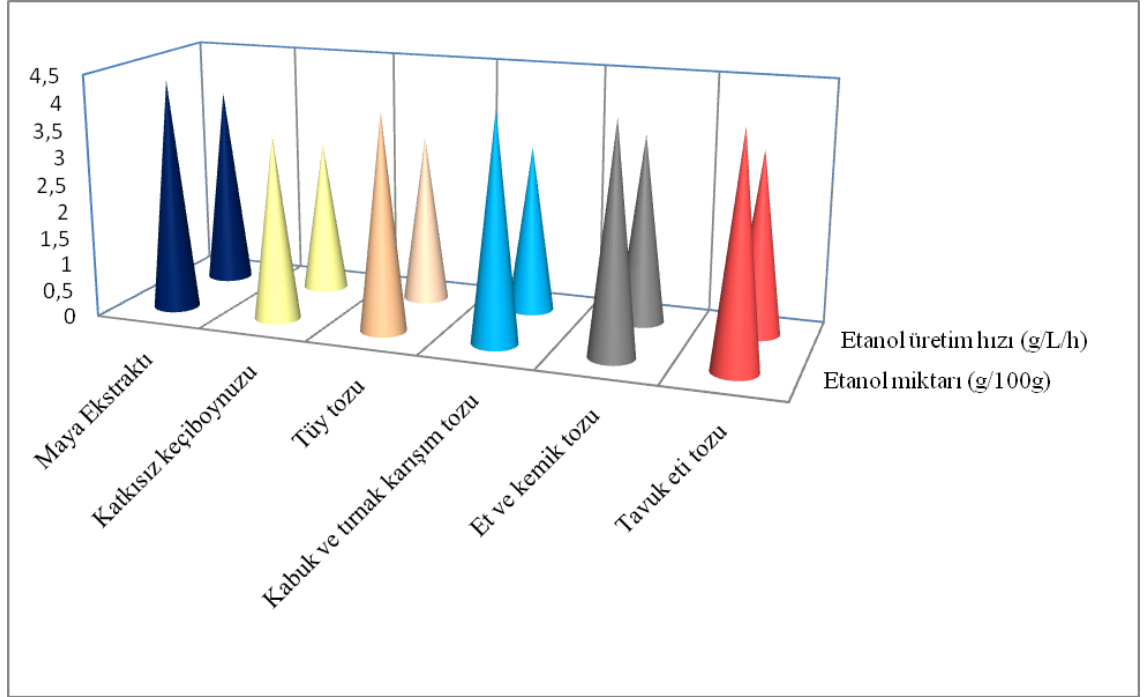
Çizelge 4.15. Farklı azot kaynaklarının etanol üretimlerine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	Azot Kaynakları					
	YE*	MB*	FM*	HM*	PM*	NA*
Şeker tüketimi (g/L)	93.47 ^b	93.87 ^b	94.44 ^b	97.16 ^a	98.29 ^a	94.36 ^b
Etanol üretimi (g/L)	42.90 ^a	41.79 ^b	39.88 ^c	41.90 ^b	41.68 ^b	34.24 ^d
Verim (Yp/s) (%)	45.90 ^a	44.51 ^b	42.23 ^d	43.12 ^c	42.41 ^d	36.28 ^e
Max. Tüketim hızı, (-ds/dt) _{max} (g/L/h)	5.91 ^d	7.08 ^b	5.02 ^e	7.46 ^a	7.03 ^b	6.42 ^b
Max. Üretim hızı, (dp/dt) _{max} (g/L/h)	3.70 ^a	3.48 ^b	3.12 ^c	3.09 ^c	3.37 ^b	2.84 ^d
Max. Gelişme hızı, (dx/dt) _{max} (g/L/h)	0.65 ^a	0.57 ^b	0.57 ^b	0.41 ^c	0.53 ^b	0.35 ^d
Spesifik gelişme hızı (h ⁻¹)	0.16 ^a	0.15 ^b	0.14 ^c	0.11 ^d	0.12 ^d	0.12 ^d
İkiye katlanma süresi (t _d) (h)	4.28 ^e	4.65 ^d	5.07 ^c	6.38 ^a	5.98 ^b	5.98 ^b

* YE; Maya ekstraktlı keçiyoynuzu ekstraktı, MB; Et ve kemik tozları, FM; Tüy tozları, HM; Kabuk ve tırnak karışım tozları, PM; Tavuk eti tozu ve NA; katkısız keçiyoynuzu

** Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0.05$)

Alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretimlerinden elde edilen sonuçlara göre tüm üretimlerde elde edilen kinetik parametreler içerisinde en yüksek değerler azot kaynağı olarak maya ekstraktının (yeast extract) kullanıldığı üretimlerden elde edilmiştir (Çizelge 4.15). Daha önce de belirtildiği gibi fermentasyon ortamında bulunan azotun mikroorganizmalar tarafından kolayca kullanılabilir olması önemlidir. Bu nedenle ekonomik olarak değerlendirilmesi mümkün olan alternatif azot kaynaklarının aynı zamanda canlı hücre tarafından kullanılabilir olması da gerekmektedir. Denemelerde kullanılan alternatif azot kaynakları her ne kadar olumlu sonuçlar vermişse de mikroorganizmalar açısından en uygun kaynak maya ekstraktı olmuştur.



Şekil 4.14. Keçiboynuzu ekstraktında farklı azot kaynaklarının ve fermentasyon içeriğinin etanol miktarı ve üretim hızları açısından karşılaştırılması

Elde edilen kinetik parametrelerin değerlendirilmesinden sonra, etanol miktarı ve etanol üretme hızlarının karşılaştırılması fermentasyon ortamının daha iyi anlaşılmasına olanak vermektedir. Şekil 4.14’de görüldüğü gibi, azot kaynağı olarak maya ekstraktının kullanıldığı fermentasyona ait etanol üretim hızı ve etanol miktarları, diğer üretimlere daha yüksek değerlere sahiptir. Kinetik parametrelerin yanında, bunların birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda da en iyi sonuçlar maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyondan alınmıştır.

Etanol üretiminin kinetiği açısından en iyi sonuçların maya ekstraktının azot olarak kullanıldığı fermentasyondan alınmasına rağmen, kullanılan 4 farklı ucuz azot kaynağının da pahalı olan maya ekstraktına alternatif olabileceği görülmüştür. Yine keçiboynuzu ekstraktının herhangi bir katkı kullanmaksızın etanol üretiminde kullanılabileceği de belirlenmiştir. Ancak elde edilen kinetik parametreler diğer üretimlerden daha düşük değerlere sahiptir (Çizelge 4.14). Katkısız keçiboynuzu ekstraktının kullanılması sonucunda etanol miktarı 34.24 g/L, şeker tüketimi 94.36 g/L ve verim de 36.28 g/L olarak belirlenmiştir. Bundan dolayı keçiboynuzu ekstraktının

etanol üretiminde kullanılmasında fermentasyon ortamına mayaların besin ihtiyacını karşılayacak bileşikleri eklemek gerekmektedir. Maya ekstraktının kullanıldığı fermentasyon denemelerine ait etanol üretim miktarı, verim, maksimum üretim hızı, maksimum gelişme hızı ve spesifik gelişme hızı gibi kinetik parametreler, alternatif azot kaynağı kullanılarak gerçekleştirilen denemelere ait değerlerden daha yüksek belirlenmiştir.

4.2.4. Etanol üretiminde keçiboynuzu pulpu, posanın pulpu ve posanın ekstraktının kullanılması

Keçiboynuzu ekstraktının etanol üretiminde kullanılmasının yanında meyvenin pulpu, ekstraksiyondan sonra elde edilen posası, posanın parçalanması ile elde edilen pulpu ve posanın ikinci ekstraksiyonu sonucu elde edilen posa ekstraktı da etanol fermentasyonunda denenmiştir. Meyvenin parçalanması ile elde edilen pulp zenginleştirilerek kullanılmıştır. Çizelge 4.16'da keçiboynuzu meyvesi pulpunun fermentasyonuna ait etanol ve şeker miktarı (g/L) değerleri ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmektedir.

Çizelge 4.16. Keçiboynuzu pulpunda etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	*	99.02 ^a ±1.24	0.00 ^f ±0.00
0	*	97.59 ^a ±1.34	3.19 ^e ±1.12
2	*	85.32 ^b ±0.46	8.87 ^d ±1.22
4	*	41.54 ^c ±1.14	17.00 ^c ±0.22
6	*	30.71 ^d ±1.27	23.10 ^b ±1.49
8	*	25.12 ^e ±1.36	27.20 ^b ±1.22
12	*	23.35 ^e ±0.76	30.47 ^a ±0.22
15	*	22.28 ^e ±1.56	33.03 ^a ±0.52
24	*	20.30 ^e ±1.22	33.59 ^a ±0.34
30	*	19.17 ^e ±2.48	32.31 ^a ±1.34
36	*	12.26 ^f ±1.21	32.45 ^a ±0.67
48	*	7.60 ^g ±0.35	32.20 ^a ±1.22

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Etanol fermentasyonunda kullanılmak üzere meyvenin homojenize edilmesi ile üretilen meyve pulpunda karıştırma hızı normal ekstrakta göre daha yüksek tutulmuştur. Daha iri parçacıklar ve viskoz bir yapıya sahip pulp 500 d/d hızında karıştırılmıştır. Ancak yine de fermentasyon ortamının iri partikülleri içermesi hem karıştırmayı hem de

sistemden örnek almayı zorlaştırmıştır. Ayrıca bulanıklık esasına göre belirlenen biyokütle miktarının hesaplanması mümkün olmamış ve etanol miktarı verimi oldukça düşük düzeyde kalmıştır. Alınan örneklerdeki parçacık iriliğinin büyüklüğü ölçümleri olumsuz etkilemiştir. Keçiboynuzu pulpu kullanılarak elde edilen etanol miktarı 30.40 g/L, tüketilen şeker miktarı 86.76 g/L olurken verim % 35.03 olarak kalmıştır.

Yine keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonundan sonra geriye kalan posanın homojenize edilmesi ile üretilen posa pulpunun etanol miktarı ve verimi, doğrudan meyvenin pulpunun kullanılması ile elde edilen fermentasyona ait değerlerle benzerlik göstermiştir. Çizelge 4.17’de keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonundan sonra elde edilen posanın homojenize edilip pulp haline dönüştürülerek fermentasyona bırakılması sonucu elde edilen etanol ve şeker miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Keçiboynuzu posasının pulpunda etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	*	55.12 ^a ±1.41	0.00 ^d ±0.00
0	*	43.34 ^b ±1.74	4.19 ^c ±1.32
2	*	40.42 ^b ±0.27	9.24 ^{bc} ±1.41
4	*	35.27 ^{bc} ±1.11	10.21 ^b ±0.12
6	*	30.45 ^c ±1.32	12.13 ^b ±1.23
8	*	28.67 ^{cd} ±1.92	14.17 ^a ±1.21
12	*	24.39 ^d ±0.42	14.35 ^a ±0.12
15	*	23.81 ^d ±1.52	14.68 ^a ±0.53
24	*	22.94 ^d ±1.21	15.12 ^a ±0.21
30	*	20.27 ^d ±2.31	15.25 ^a ±1.56
36	*	15.78 ^e ±1.61	15.19 ^a ±0.42
48	*	9.52 ^f ±0.31	15.10 ^a ±1.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Etanol fermentasyonunda kullanılmak üzere meyvenin ekstraksiyondan sonraki posasının homojenize edilmesi ile üretilen posa pulpunda karıştırma hızı normal ekstrakta göre daha yüksek tutulmuştur. Daha iri parçacıklar ve viskoz bir yapıya sahip posa pulpu 500 d/d'da karıştırılmıştır. Ancak yine de fermentasyon ortamının iri partikülleri içermesi hem karıştırmayı hem de sistemden örnek almayı zorlaştırmıştır. Her ne kadar üretim gerçekleştirilmeye çalışılsa da elde edilen etanol miktarı ve verim düşük seviyede kalmıştır. Ayrıca biyokütle miktarının hesaplanması bulanıklık nedeniyle yine mümkün olamamıştır. Alınan örneklerin iri partiküller içermesi ve çok bulanık olması nedeniyle ölçümlerin hesaplanması mümkün olmamıştır. Keçiboynuzu posasının pulpu kullanılarak elde edilen etanol miktarı 11.06 g/L, tüketilen şeker miktarı 45.60 g/L olurken verim %24.25 olmuştur.

Keçiboynuzu meyvesinin doğrudan homojenize edilerek pulp haline getirilip fermentasyonda kullanılması sonucu elde edilen etanol miktarı (30.40 g/L) ve verim (% 35.03) değerleri, meyvenin ekstraksiyonundan sonra elde edilen posanın homojenize edilmesi ile oluşan posa pulpuna ait etanol miktarı (11.06 g/L) ve verim (% 24.25) değerlerinden yüksek olmuştur. Bunun sebebi posa pulpunda kalan şeker miktarının meyve pulpunda bulunan şeker miktarından daha az olmasıdır.

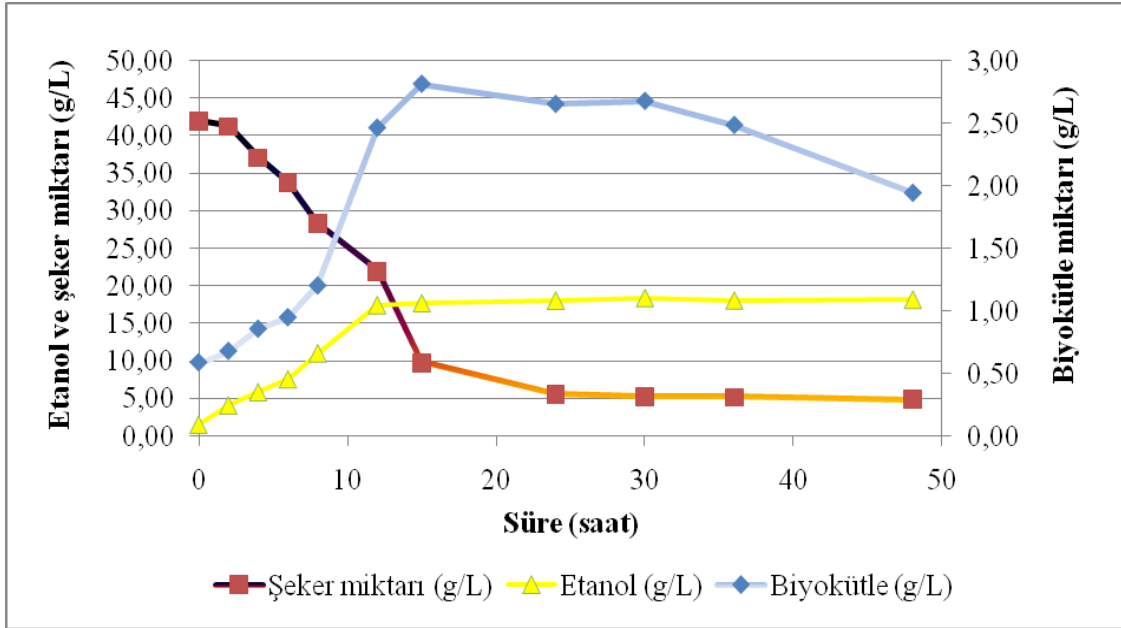
Keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonundan geriye kalan posanın, ikinci defa ekstraksiyonu sonucu elde edilen posa ekstraktına ait değerler ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Keçiboynuzu posa ekstraktının etanol fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	42.03 ^a ±6.48	0.00 ^g ±0.00
0	0.59 ^d ±0.08	41.28 ^a ±6.55	1.56 ^f ±0.14
2	0.68 ^d ±0.52	37.13 ^{ab} ±3.28	4.12 ^e ±0.86
4	0.86 ^{cd} ±0.44	33.81 ^{ab} ±2.68	5.89 ^e ±3.78
6	0.95 ^c ±0.02	28.41 ^b ±6.13	7.58 ^d ±4.28
8	1.20 ^b ±0.20	22.01 ^b ±3.37	11.05 ^c ±1.32
12	2.46 ^a ±0.49	9.84 ^c ±4.67	17.41 ^b ±2.03
15	2.81 ^a ±0.59	5.62 ^d ±2.76	17.68 ^{ab} ±1.07
24	2.65 ^a ±0.23	5.33 ^d ±2.05	18.01 ^a ±1.04
30	2.68 ^a ±0.03	5.22 ^d ±1.83	18.36 ^a ±0.33
36	2.48 ^a ±0.09	4.96 ^d ±1.88	18.04 ^a ±0.07
48	1.94 ^{ab} ±1.10	4.64 ^d ±2.62	18.14 ^a ±0.01

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Şekil 4.15.'de keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakta % 3 maya inokülasyonu yapılarak fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir.



Şekil 4.15. Keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraksiyonu elde edilen posa ekstraktında etanol miktarı, şeker tüketimi ve biyokütle oluşum grafiği

Keçiboynuzu posasının ikinci ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ortamın şeker konsantrasyonu ilk ekstraksiyona göre oldukça düşük bulunmuştur (Çizelge 4.19). Dolayısıyla bu denemede ulaşılan etanol üretimi de düşük düzeyde kalmıştır. Ancak verim, ikiye katlanma süresi ve spesifik gelişme hızı gibi parametreler yaklaşık aynı seviyede bulunmuştur. Buna rağmen maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve maksimum gelişme hızı gibi kinetik parametreler birinci ekstraksiyondan elde edilen ekstraktın kullanıldığı fermentasyonda daha yüksek çıkmıştır. Yukarıda bahsedilen parametrelerin yüksek olması fermentasyon ortamında kullanılan şeker miktarının fazla olmasının bir sonucudur.

Çizelge 4.19. Keçiboynuzu meyvesinin birinci ve ikinci ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların fermentasyonlarının kinetik parametreleri

Kinetik parametreler	Ekstraktlar	
	1.Ekstraksiyon	2.Ekstraksiyon
Şeker tüketimi (g/L)	93.47	37.39
Etanol üretimi (g/L)	42.90	16.80
Verim (Yp/s) (%)	45.90	44.94
Max. Tüketim hızı, $(-ds/dt)_{max}$ (g/L/h)	5.91	2.36
Max. Üretim hızı, $(dp/dt)_{max}$ (g/L/h)	3.70	1.48
Max. Gelişme hızı, $(dx/dt)_{max}$ (g/L/h)	0.65	0.26
Spesifik gelişme hızı (h^{-1})	0.16	0.16
İkiye katlanma süresi (t_d) (h)	4.29	4.29

Şeker tüketimi, etanol üretimi, tüketim hızı, üretim hızı ve gelişme hızı değerleri başlangıçtaki şeker miktarı ve buna bağlı olarak etanol üretimine bağlı değerler olduğundan birinci ekstraksiyona göre düşük çıkmıştır. Ancak ekstraktın içerdiği şeker miktarına göre tüketilen şeker (37.39 g/L) karşı üretilen etanol miktarının (16.80 g/L) bir sonucu olan verim (%44.94) birinci ekstraksiyona oldukça yakın belirlenmiştir. Yine spesifik gelişme hızları ($0.16 h^{-1}$) ve mikroorganizmanın ikiye katlanma süresi (4.29 h) her iki üretimde de aynı düzeyde saptanmıştır. Bu sonuçlara göre keçiboynuzu meyvesinin birinci ekstraksiyonundan geriye kalan posanın, tekrar ekstrakte edilmesi ile oluşan posa ekstraktının fermentasyonda kullanılabildiği görülmüştür. Ancak elde edilen posa ekstraktının düşük şeker içeriğine sahip olması etanol üretiminin de düşük değerlere sahip olmasına neden olmaktadır.

4.3. Laktik Asit Fermentasyonu

Cevap Yüzey Metodu ile belirlenen optimum şartlarda elde edilen ve ortalama 100 g/L şeker içeren 1.5 L keçiyoynuzu ekstraktı, laktik asit fermentasyonu için kullanılarak fermentasyon üzerine zenginleştirme işlemi, farklı azot kaynakları ve ekstrakta invertaz enziminin eklenmesinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla tüm laktik asit fermentasyonları %1 bakteri inokülasyon oranında, pH 5.0'da 37°C'de ve 200 d/d karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Zenginleştirme işleminin laktik asit üretimi üzerine etkisi

Laktik asit üretiminde ilk olarak ekstrakt içeriğinin biyokütle ve laktik asit miktarı üzerine etkisi hesaplanmıştır. Bu amaçla reaktördeki fermentasyon ortamına eklenen maya ekstraktı miktarının laktik asit fermentasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Mineral maddeler eklenerek zenginleştirilen fermentasyon ortamında 2 farklı miktarda (8 ve 10 g/L) maya ekstraktı kullanılmıştır. Ayrıca karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla ekstrakta hiçbir zenginleştirme yapılmayarak kontrol örneğinde de laktik asit fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.3.1.1. Fermentasyon ortamında 8 g/L Maya ekstraktı kullanılması

Keçiyoynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde fermentasyon ortamına 8 g/L maya ekstraktı eklenmiştir. Fermentasyon sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir. Biyokütle miktarı, 8 g/L maya ekstraktının kullanıldığı örneklerde fermentasyon işleminin 30. saatinde maksimum seviyeye (4.80 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen laktik asit ise 48. saatte maksimum seviyeye (31.96 g/L) ulaşırken besiyerinde başlangıçtaki şeker miktarının yaklaşık yarısı (48.57 g/L) *L. casei* tarafından tüketilmeden kalmıştır. Mikroorganizmalar tarafından besiyerindeki şekerin büyük çoğunluğunun tüketilememesinin keçiyoynuzu ekstraktının şeker profilinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Keçiyoynuzu ekstraktı başta sakaroz olmak üzere (toplam şekerin yaklaşık yarısı), glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritleri içermektedir. *L. casei* ilk

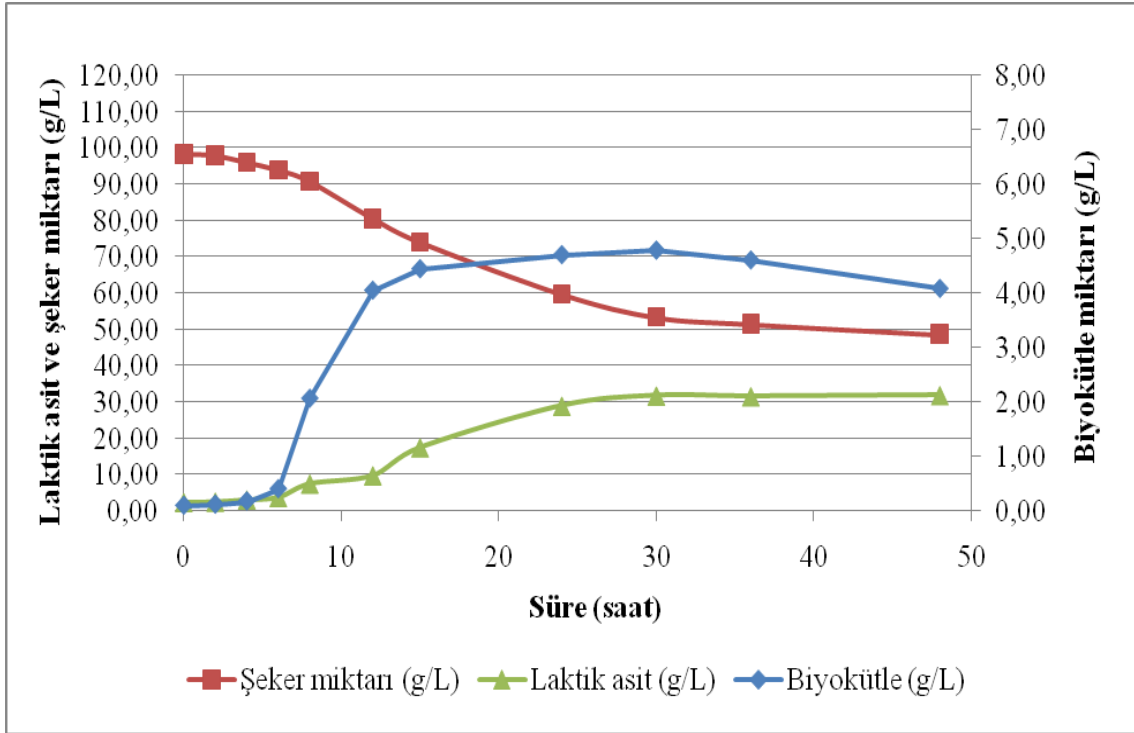
olarak fermentasyon ortamında monosakkaritleri parçalamaktadır. Bu nedenle sakaroz parçalanmadan fermentasyon ortamında kalmaktadır. 8 g/L maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda 24. saatten sonraki zamanlara ait biyokütle oluşumu, şeker tüketimi ve laktik asit oluşumu miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$).

Çizelge 4.20. Keçiboynuzu ekstraktında 8 g/L maya ekstraktı kullanılması

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	100.68 ^a ±0.22	0.00 ^f ±0.00
0	0.10 ^{fe} ±0.03	98.44 ^a ±1.12	2.28 ^e ±0.09
2	0.12 ^{fe} ±0.02	97.97 ^{ba} ±0.90	2.45 ^e ±0.07
4	0.18 ^{fe} ±0.01	96.05 ^{bc} ±0.12	3.02 ^e ±0.19
6	0.41 ^e ±0.01	93.98 ^{bc} ±0.67	3.71 ^e ±1.51
8	2.07 ^d ±0.02	90.80 ^c ±0.67	7.45 ^d ±1.93
12	4.06 ^c ±0.09	80.60 ^d ±1.18	9.73 ^c ±1.07
15	4.45 ^{ba} ±0.12	74.06 ^d ±1.56	17.48 ^b ±1.06
24	4.71 ^a ±0.24	59.72 ^e ±2.21	29.03 ^a ±1.06
30	4.80 ^a ±0.30	53.35 ^{fe} ±1.80	31.84 ^a ±1.68
36	4.61 ^{bc} ±0.21	51.44 ^{fg} ±0.90	31.65 ^a ±1.52
48	4.09 ^c ±0.22	48.57 ^g ±0.45	31.96 ^a ±1.96

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

8 g/L maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen denemelerden alınan örneklerde biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları Şekil 4.16.'da görülmektedir. Laktik asit fermentasyonunda biyokütle gelişimi ve laktik asit oluşumunun grafiği Tip 1 Fermentasyonu'ndan tamamen farklıdır. Mikroorganizma gelişimi durağan faza (stationary phase) ulaştığı zaman ürün üretimi gerçekleşmektedir. Bu tip fermentasyonlara “Karışık Tip Fermentasyon” (Mixed Fermentation) adı verilmektedir. Laktik asit fermentasyonu sonucunda oluşan laktik asit, hücrenin ikincil ürettiği ürün olarak bilinmektedir.



Şekil 4.16. Keçiyoynuzu ekstraktından 8 g/L maya ekstraktı kullanılmasıyla elde edilen laktik asit, biyokütle ve şeker tüketimi miktarındaki değişim

4.3.1.2. Fermentasyon ortamında 10 g/L maya ekstraktı kullanılması

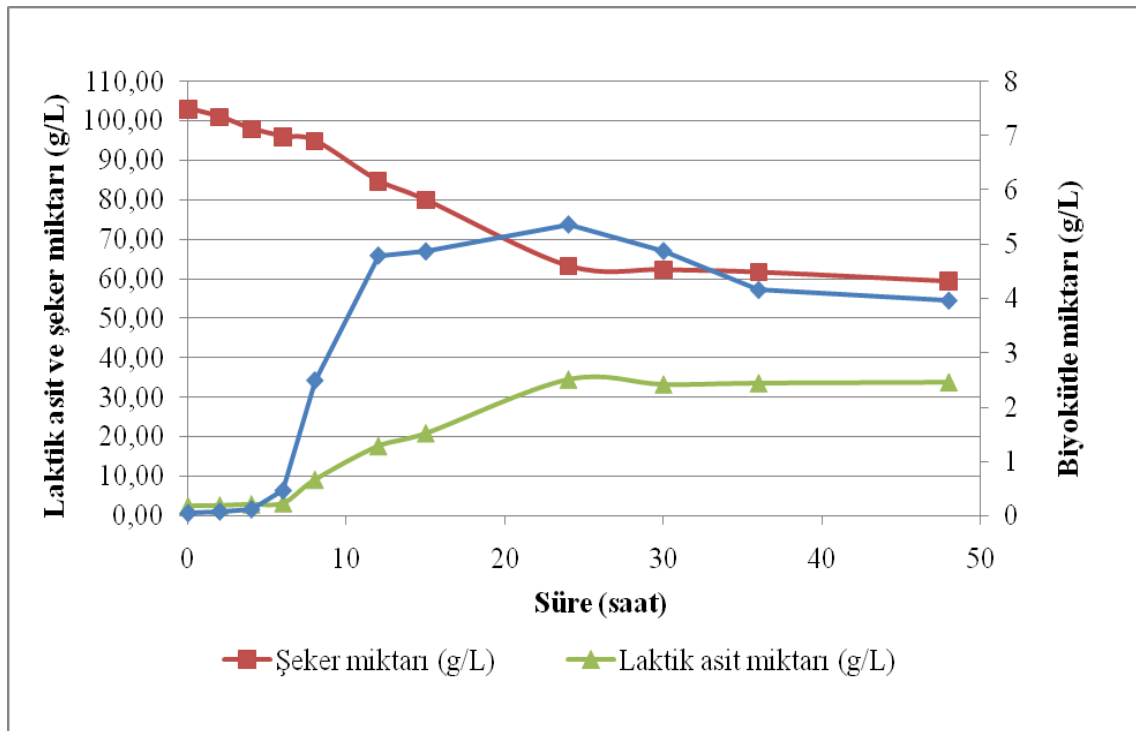
Fermentasyon ortamında mikroorganizmaların gelişiminde önemli bir rol oynayan azot kaynağının laktik asit fermentasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla keçiyoynuzu ekstraktına 10 g/L maya ekstraktı eklenmiştir. Çizelge 4.21’de fermentasyon denemelerinden elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. 10 g/L maya ekstraktının kullanıldığı örneklerde maksimum biyokütle miktarına (5.37 g/L) fermentasyon işleminin 24. saatinde ulaşılmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen laktik asit ise 48. saatte maksimum seviyeye (33.87 g/L) ulaşırken besiyerinde başlangıçtaki şeker miktarının yaklaşık yarısı (59.40 g/L) *L. casei* tarafından tüketilmeden kalmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, *L. casei* keçiyoynuzu ekstraktındaki monosakkaritler hariç diğer şekerleri (özellikle sakaroz) metabolize edememektedir. 10 g/L maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonunda 24. saatten sonraki biyokütle oluşumu, şeker tüketimi ve laktik asit oluşumu miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$).

Çizelge 4.21. Keçiyoynuzu ekstraktında 10 g/L maya ekstraktı kullanılması

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	104.98 ^a ±0.90	0.00 ^e ±0.00
0	0.05 ^{fe} ±0.02	103.07 ^a ±1.35	2.52 ^e ±0.08
2	0.08 ^{fe} ±0.01	100.99 ^{ba} ±1.47	2.64 ^e ±0.06
4	0.12 ^{fe} ±0.01	97.97 ^{bc} ±0.50	2.94 ^e ±0.24
6	0.47 ^e ±0.05	96.05 ^{bc} ±1.25	3.27 ^{ed} ±0.61
8	2.50 ^d ±0.22	94.94 ^c ±1.57	9.19 ^d ±1.15
12	4.80 ^c ±0.10	84.82 ^d ±1.18	17.72 ^c ±1.00
15	4.87 ^{ba} ±0.05	79.96 ^e ±1.04	20.95 ^b ±1.97
24	5.37 ^a ±0.50	63.31 ^{fe} ±2.14	34.61 ^a ±0.45
30	4.88 ^a ±0.05	62.35 ^{fe} ±2.50	33.35 ^a ±1.19
36	4.16 ^{ba} ±0.05	61.71 ^{fg} ±0.45	33.65 ^a ±0.98
48	3.97 ^c ±0.20	59.40 ^g ±0.55	33.87 ^a ±0.82

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Keçiboynuzu ekstraktına 10 g/L düzeyinde maya ekstraktı katılarak yapılan fermentasyon sonunda biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları Şekil 4.17.'de görülmektedir. “Karışık Tip Fermentasyon” tanımına uygun olarak mikroorganizma gelişiminin durağan faza ulaştığı fermentasyon zamanından sonra laktik asit üretiminin arttığı görülmektedir. Fermentasyonun 10. saatinden sonra *L. casei* gelişiminin durağan faz başlangıcına ulaşması ile birlikte, ikincil bir ürün (secondary metabolite) olan laktik asit miktarındaki artış grafikte görülmektedir.



Şekil 4.17. Keçiboynuzu ekstraktından 10 g/L maya ekstraktı kullanılmasıyla elde edilen laktik asit, biyokütle ve şeker tüketimi miktarındaki değişim

4.3.1.3. Fermentasyon ortamında katkısız keçiboynuzu ekstraktı kullanılması

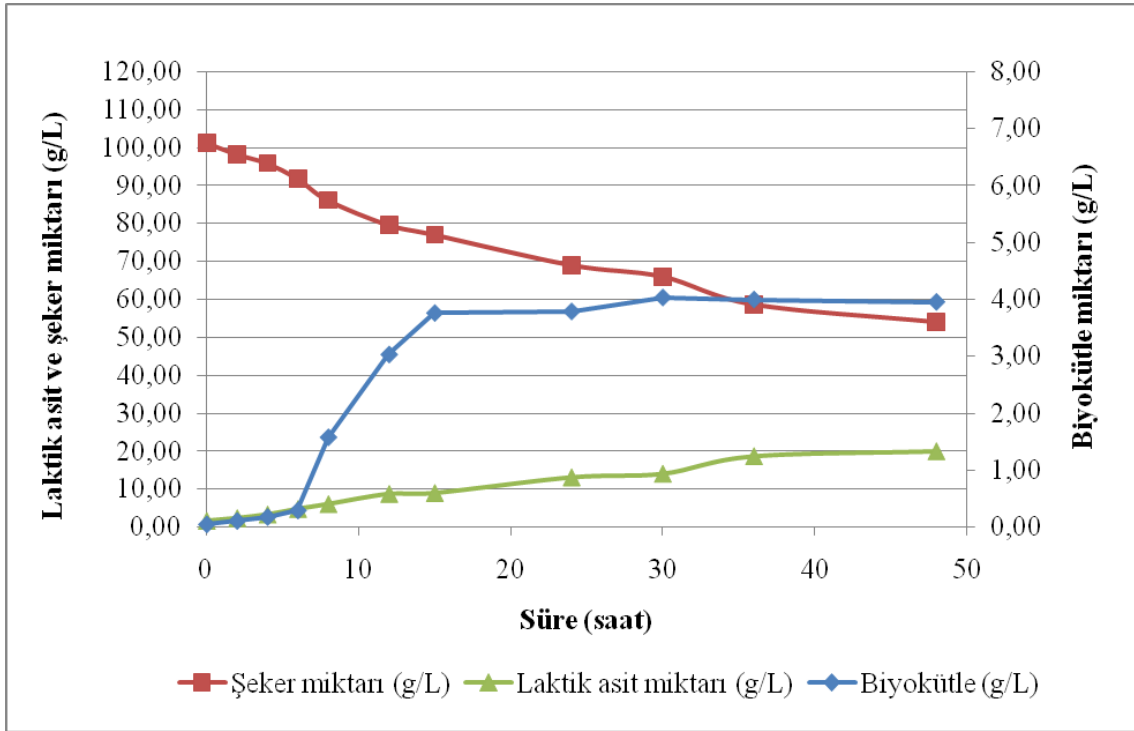
Fermentasyon ortamına eklenen azot kaynağı miktarının etkisini belirlemek amacıyla zenginleştirilmemiş keçiboynuzu ekstraktında da laktik asit fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucunda biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.22’de verilmiştir. Zenginleştirme yapılmadan gerçekleştirilen fermentasyonda 30. saat sonunda biyokütle miktarı maksimum seviyeye (4.03 g/L) ulaşırken, laktik asit miktarı ise 48. saatte maksimum seviyeye (19.81 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucunda besiyerinde başlangıçtaki şeker miktarının yaklaşık yarısı (53.99 g/L) *L. casei* tarafından tüketilmeden kalmıştır. Bu fermentasyonda 15. saatten sonraki biyokütle oluşumu, 24. saatten sonraki şeker tüketimi ve 30. saatten sonraki laktik asit oluşumu miktarında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$). Fermentöre inoküle edilen mikroorganizma ile birlikte bir miktar laktik asit (1.49 g/L) de fermentasyon ortamında sıfıncı zaman örneklerinde belirlenmiştir.

Çizelge 4.22. Keçiboynuzu ekstraktının zenginleştirme yapılmadan kullanılması

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^f ±0.00	102.27 ^a ±1.12	0.00 ^f ±0.00
0	0.05 ^{fe} ±0.01	101.15 ^a ±0.90	1.49 ^e ±0.39
2	0.11 ^{fe} ±0.01	98.13 ^{ba} ±0.67	2.21 ^e ±0.14
4	0.18 ^{fe} ±0.01	95.74 ^{bc} ±0.53	3.16 ^e ±0.11
6	0.29 ^e ±0.01	91.75 ^{bc} ±0.67	4.64 ^{ed} ±0.16
8	1.58 ^d ±0.02	86.02 ^c ±2.93	5.91 ^d ±0.16
12	3.03 ^c ±0.05	79.48 ^d ±1.80	8.60 ^c ±0.03
15	3.76 ^{ba} ±0.19	76.93 ^d ±0.56	8.82 ^c ±0.16
24	3.78 ^{ba} ±0.09	68.96 ^e ±1.35	12.94 ^b ±0.29
30	4.03 ^a ±0.01	65.94 ^{ef} ±0.67	13.89 ^a ±0.55
36	3.99 ^a ±0.03	58.61 ^{fg} ±1.28	18.50 ^a ±1.12
48	3.95 ^a ±0.02	53.99 ^g ±1.35	19.81 ^a ±0.39

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Zenginleştirme yapılmadan fermentasyona bırakılan keçiboynuzu ekstraktında denemelerden alınan örneklerde biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları Şekil 4.18.'de görülmektedir. Fermentasyon ortamında üretilen laktik asit miktarı, zenginleştirme yapılarak kullanılan keçiboynuzu ekstraktından elde edilen laktik asit miktarı değerlerinden düşük olduğu grafikten açıkça görülmektedir.



Şekil 4.18. Keçiboynuzu ekstraktından zenginleştirme yapılmadan kullanılmasından elde edilen laktik asit, biyokütle ve şeker tüketimi miktarındaki değişim

4.3.1.4. Keçiboynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde farklı miktarlarda kullanılan maya ekstraktlarının karşılaştırılması

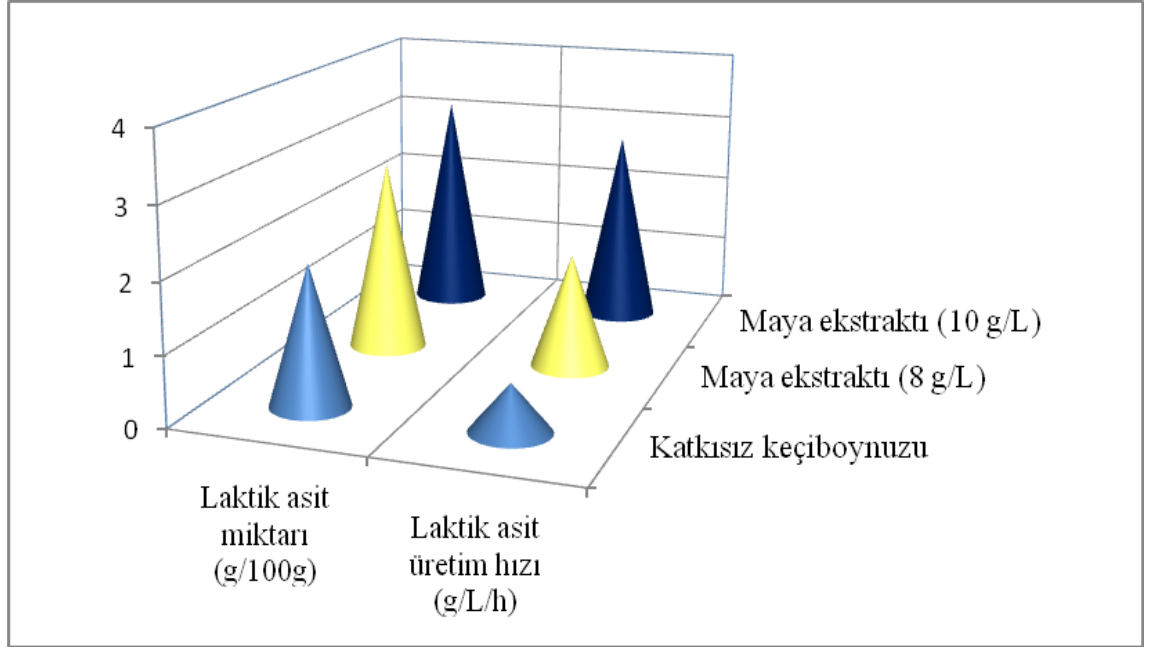
Çizelge 4.23’de keçiboynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde, fermentasyon ortamına eklenen maya ekstraktı miktarının parametreler üzerine etkisi ve kinetik değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmiştir. Biyokütle ve laktik asit miktarlarının yanı sıra fermentasyona ait kinetik parametreler de fermentasyonun başarısını gösteren önemli etkenlerdir. Tüm analiz sonuçlarına göre, fermentasyon ortamına maya ekstraktı miktarının laktik asit üretiminde önemli bir etken olduğu belirlenmiştir. Maksimum laktik asit üretimi (31.35 g/L), maksimum üretim hızı (1.97 g/L/h), maksimum tüketim hızı (2.16 g/L/h), maksimum gelişme hızı (0.56 g/L/h) ve spesifik gelişme hızı (0.36 g/L/h) 10 g/L maya ekstraktının kullanıldığı laktik asit fermentasyonundan elde edilmiş olup, bu değerler, 8 g/L maya ekstraktı ve zenginleştirme yapılmadan kullanılan keçiboynuzu ekstraktına ait denemelerden elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak önemli görülmüştür ($P<0.05$). Bunun yanında spesifik gelişme hızına bağlı olarak değişen mikroorganizmanın ikiye katlanma süresi zenginleştirme yapılmayan keçiboynuzu ekstraktının kullanıldığı örneklerde 3.44 saat olarak belirlenmiştir. Zenginleştirme yapılan örneklerde bu sürenin daha düşük olduğu görülmektedir. Katkısız keçiboynuzu kullanılan laktik asit fermentasyonuna ait laktik asit üretimi, verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı, maksimum gelişme hızı ve spesifik gelişme hızı gibi kinetik parametreler en düşük değerlere sahiptir. Katkısız keçiboynuzu ekstraktının kullanıldığı laktik fermentasyonunda *L. casei*’nin gelişme hızı (0.34 g/L/h)’nin düşük olması nedeniyle, fermentasyona ait tüketim hızı (1.20 g/L/h) ve üretim hızı (0.68 g/L/h) diğer üretimlere göre düşük değerlere sahip olmuştur. Kinetik parametreler arasında karşılaştırma testi yapıldığında 10 g/L maya ekstraktı kullanılan denemelere ait sonuçların yüksek olduğu ve istatistiksel olarak da önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.23. Keçiboynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde farklı miktardaki maya ekstraktlarına ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Katkısız Keçiboynuzu	Maya Ekstraktı (8 g/L)	Maya Ekstraktı (10 g/L)
Şeker tüketimi (g/L)	48.44 ^b	52.11 ^a	45.58 ^c
Laktik asit üretimi (g/L)	20.09 ^c	29.68 ^b	31.35 ^a
Verim (Yp/s) (%)	41.46 ^c	56.96 ^b	68.79 ^a
Max. Tüketim hızı, (-ds/dt) _{max} (g/L/h)	1.20 ^c	1.50 ^b	2.16 ^a
Max. Üretim hızı, (dp/dt) _{max} (g/L/h)	0.68 ^c	0.90 ^b	1.97 ^a
Max. Gelişme hızı, (dx/dt) _{max} (g/L/h)	0.34 ^c	0.42 ^b	0.56 ^a
Spesifik gelişme hızı (h ⁻¹)	0.20 ^b	0.35 ^a	0.36 ^a
İkiye katlanma süresi (t _d) (h)	3.44 ^b	1.96 ^a	1.95 ^a

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0.05$)

Şekil 4.19.'da, fermentasyon ortamına eklenen, maya ekstraktının 2 farklı miktarının keçiboynuzu ekstraktında kullanılmasının laktik asit miktarı ve üretim hızı üzerine etkisini gösteren bir grafik sunulmuştur. Laktik asit miktarı ve laktik asit üretme hızlarının karşılaştırılması fermentasyon ortamının daha iyi anlaşılmasına olanak vermektedir. Besiyeri ortamında azot kaynağı olarak maya ekstraktının 10 g/L düzeyinde kullanıldığı fermentasyona ait laktik asit üretim hızı ve laktik asit miktarının diğer üretimlere göre daha yüksek sonuçlar verdiği Şekil 4.19'da görülmektedir. Tüm kinetik parametrelerin karşılaştırılması yanında, üretim hızı ve üretim miktarının aynı grafik üzerinde karşılaştırılması fermentasyonun başarısının anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır.



Şekil 4.19. Farklı miktarlardaki maya ekstraktının laktik asit üretim hızları ve laktik asit miktarlarının karşılaştırılması

Katkısız keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit fermentasyonunda kullanılması sonucu elde edilen laktik asit üretim hızına karşı laktik asit miktarı grafik edildiği zaman kolaylıkla görülmektedir ki bu üretime ait değerler grafikte en düşük bölgede kalmaktadır. Ayrıca üretimlerden hesaplanan şeker tüketimi, laktik asit üretimi ve biyokütle miktarı diğer üretimlere göre oldukça düşük ve zaman açısından da yavaş ilerlemektedir. Katkısız keçiyoynuzu ekstraktı kullanılan denemenin 24. saatinde elde edilen laktik asit miktarı (12.94 g/L), diğer denemelerin ilk 12. saatinde elde edilmektedir.

Fermentasyon ortamına eklenen maya ekstraktı miktarının laktik asit üretimi üzerine etkisinin önemli olduğu açıkça görülmektedir. Farklı miktarlarda (8 g/L ve 10 g/L) eklenen maya ekstraktlarına ait kinetik parametreler incelenmiştir. 10 g/L maya ekstraktının kullanıldığı fermentasyondan elde edilen sonuçların yüksek olduğu saptanmıştır. Laktik asit fermentasyonun değerlendirilmesinde önemli rol oynayan kinetik parametreler içinde de istatistiksel olarak farklı en yüksek değerler yine bu miktara ait üretimin gerçekleştiği fermentasyondan elde edilmiştir ($P<0.05$). Bu nedenle bu aşamadan sonra gerçekleştirilecek tüm laktik asit fermentasyonlarında maya

ekstraktı miktarı 10 g/L olmuştur. Ancak üretimler sonucunda görülmektedir ki keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit fermentasyonunda ortamdaki şekerin yaklaşık olarak yarısı tüketilmeden kalmaktadır. Bunun sebebi de *L. casei* bakterisinin, daha önce de ifade edildiği gibi keçiyoynuzu ekstraktı içerisindeki sakarozu substrat olarak kullanamamasıdır.

4.3.2. Farklı azot kaynaklarının laktik asit üretimi üzerine etkisi

Fermentasyon ortamında mikroorganizmanın gelişimi için önemli bir azot kaynağı olan maya ekstraktının, keçiyoynuzu ekstraktından laktik asit üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı miktarları katkılanarak kullanılmıştır. Ancak maya ekstraktının pahalı bir azot kaynağı olması sebebiyle laktik asit üretiminde de alternatif azot kaynakları fermentasyon ortamına eklenmiştir. Bu amaçla tavuk eti tozu, kabuk ve tırnak karışım tozları, tüy tozları ve et ve kemik tozları kullanılmıştır. Alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit üretimleri, maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit üretimleri ile karşılaştırılmıştır. Tüm fermentasyon denemeleri en iyi sonuçlar alınan 10 g/L maya ekstraktı miktarında gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1. Tavuk eti tozu katkılanarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Azot kaynağı olarak kullanılan maya ekstraktının endüstriyel üretimler için oldukça pahalı bir materyal olmasından dolayı fermentasyon ortamına 12 g/1.5 L maya ekstraktı yerine aynı konsantrasyonda tavuk eti tozu kullanılmıştır. Çizelge 4.24’de tavuk eti tozu katkılanarak yapılan laktik asit fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve etanol miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Biyokütle miktarı, tavuk eti tozu kullanılan örneklerde fermentasyonun 36. saatinde maksimum seviyeye (4.04 g/L) ulaşırken laktik asit ise 48. saatte maksimum seviyeye (21.22 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucunda besiyerinde yine bir miktar şeker (51.75 g/L) *L. casei* tarafından tüketilmeden kalmıştır. Fermentasyonun sıfırıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 0.06 g/L, laktik asit miktarı ise 1.50 g/L olarak belirlenmiştir. Sıfırıncı zaman örneklerinde belirlenen biyokütle ve laktik asit, bakteri hücrelerinin reaktöre eklenmesi amacıyla gerçekleştirilen inkübasyon sırasında oluşmuştur.

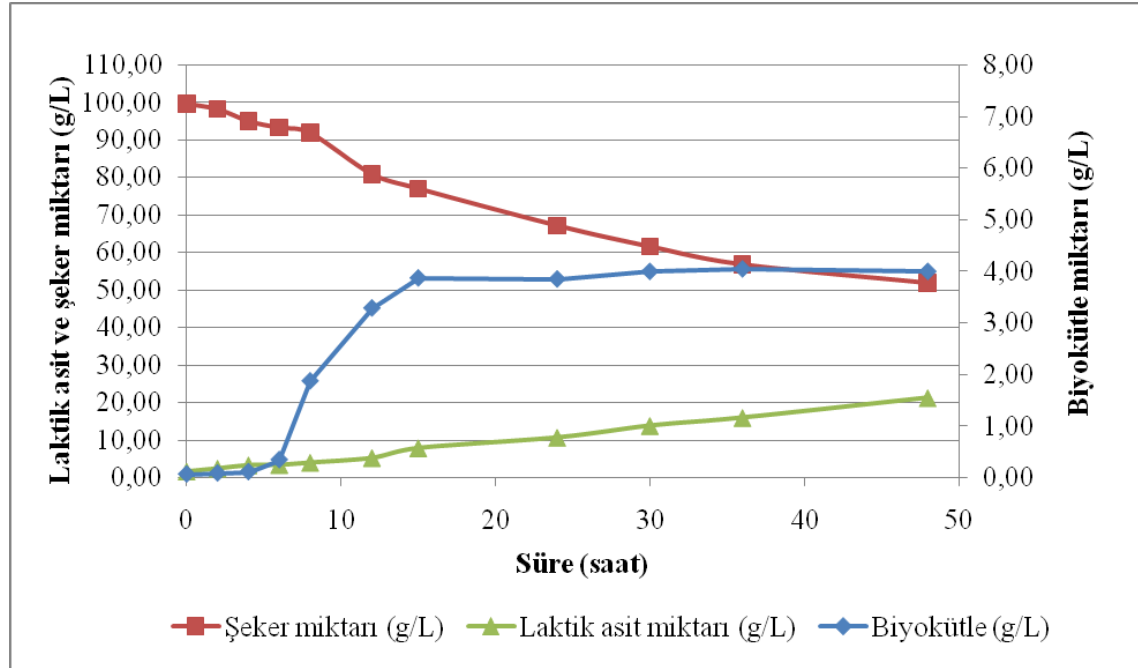
Çizelge 4.24. Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^h ±0.00	100.52 ^a ±0.45	0.00 ^j ±0.00
0	0.06 ^{hg} ±0.01	99.56 ^b ±0.45	1.50 ⁱ ±0.02
2	0.08 ^{hg} ±0.01	98.13 ^c ±0.68	2.32 ^h ±0.02
4	0.11 ^{hg} ±0.01	94.94 ^d ±0.68	3.19 ^g ±0.02
6	0.34 ^g ±0.02	93.19 ^e ±0.45	3.27 ^g ±0.02
8	1.87 ^{ef} ±0.01	91.75 ^e ±0.68	3.88 ^g ±0.14
12	3.28 ^d ±0.07	80.76 ^f ±0.90	5.13 ^f ±0.02
15	3.86 ^c ±0.01	76.93 ^g ±0.52	7.76 ^e ±0.03
24	3.84 ^c ±0.05	67.05 ^h ±0.45	10.60 ^d ±0.03
30	3.99 ^b ±0.02	61.47 ⁱ ±0.22	13.75 ^c ±0.06
36	4.04 ^a ±0.01	56.69 ^j ±0.67	15.91 ^b ±0.05
48	3.99 ^a ±0.01	51.75 ^k ±0.45	21.22 ^a ±0.10

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Keçiboynuzu ekstraktına tavuk eti tozu katkılандığında biyokütle gelişimi 12. saatten sonra durağan faza girmiştir. Bu sırada mikroorganizma tarafından kullanılan şeker ve üretilen laktik asit miktarı çok düşük (67.05 g/L ve 10.60 g/L) seviyelerde kalmıştır. Her ne kadar şeker tüketiminde az miktarda düşüş ve laktik asit üretiminde artış görülmekte ise de, mikroorganizma durağan faza girdiğinden dolayı fermentasyonun ilerleyen zamanlarında istenilen değerlere ulaşamamıştır. Mikroorganizma gelişiminin durağan faza ulaştığı fermentasyon zamanından sonra laktik asit üretiminin arttığı görülmektedir. Laktik asit üretimlerinde verimin en az % 65 seviyesinden olduğu düşünüldüğünde tüketilen şeker miktarına göre üretilen laktik asit miktarının düşük olduğu açıkça fark edilmektedir.

Maya ekstraktı yerine tavuk eti tozu kullanılarak yapılan laktik asit fermentasyonu ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve laktik asit miktarı gelişimi Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20. Keçiboynuzu ekstraktında tavuk eti tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit gelişimi

4.3.2.2. Kabuk ve Tırnak Karışım Tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Kabuk ve tırnak karışım tozlarının azot kaynağı olarak laktik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla fermentasyon ortamına 9 g/1.5L maya ekstraktı yerine kabuk ve tırnak karışım tozları katılmıştır. Çizelge 4.25’de laktik asit fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Maya ekstraktı yerine kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılan örneklerdeki laktik asit miktarı 48. saatte maksimum seviyeye (24.45 g/L) ulaşırken, biyokütle miktarı fermentasyon işleminin 30. saatinde maksimum seviyeye (4.93 g/L) ulaşmıştır. Bunun

yanında fermentasyon işlemi sonucunda bir miktar şeker (53.67 g/L) besiyerinde tüketilmeden kalmıştır. Sıfıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 0.10 g/L olarak belirlenirken laktik asit miktarı da 1.20 g/L olmuştur.

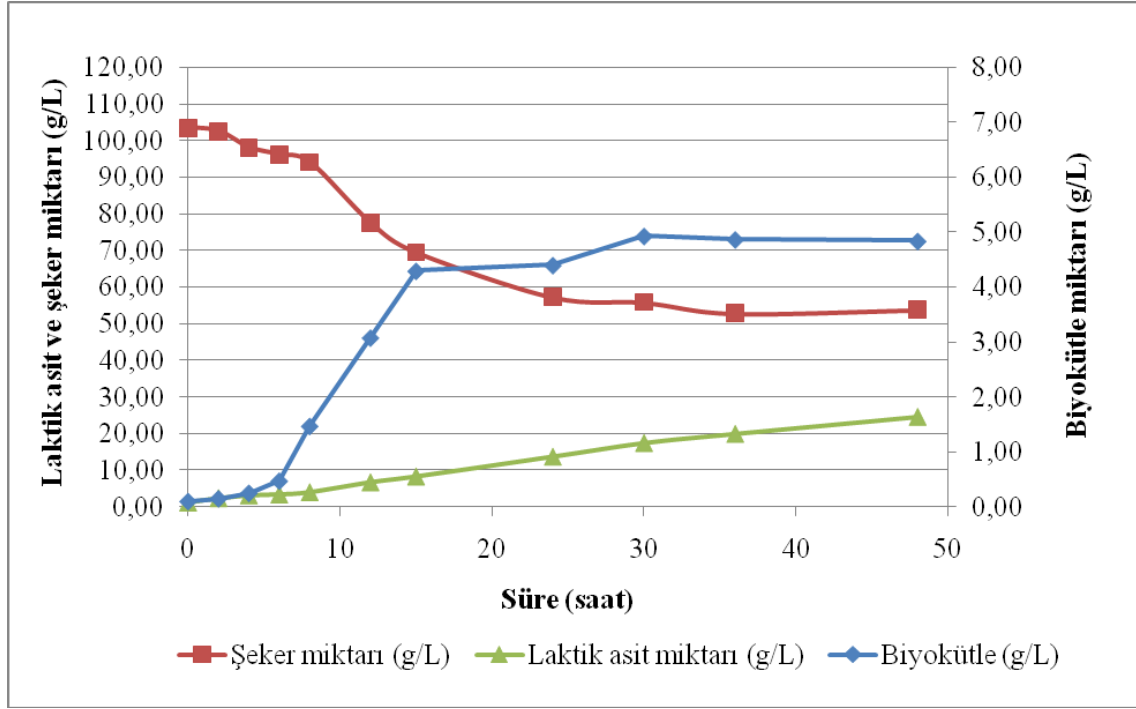
Çizelge 4.25. Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^h ±0.00	104.34 ^a ±0.45	0.00 ^j ±0.00
0	0.10 ^{hg} ±0.01	103.54 ^b ±0.67	1.20 ⁱ ±0.02
2	0.15 ^{hg} ±0.01	102.59 ^c ±0.22	2.41 ^h ±0.04
4	0.25 ^f ±0.01	98.13 ^d ±0.67	3.17 ^h ±0.02
6	0.47 ^f ±0.01	96.21 ^d ±0.22	3.41 ^h ±0.01
8	1.47 ^e ±0.03	94.14 ^e ±0.45	4.04 ^g ±0.04
12	3.08 ^d ±0.06	77.57 ^f ±0.90	6.72 ^f ±0.01
15	4.29 ^c ±0.02	69.44 ^g ±0.67	8.30 ^e ±0.01
24	4.40 ^b ±0.01	57.17 ^h ±0.45	13.67 ^d ±0.77
30	4.93 ^a ±0.01	55.74 ⁱ ±0.67	17.35 ^c ±0.17
36	4.87 ^a ±0.06	54.71 ^j ±0.90	19.84 ^b ±0.01
48	4.84 ^a ±0.04	53.67 ^k ±0.90	24.45 ^a ±0.28

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Keçiboynuzu ekstraktına kabuk ve tırnak karışım tozları katkılıandığında biyokütle gelişimi 30. saatten sonra istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P<0.05$). Mikroorganizmanın 30. saatten sonra durağan faza girmesiyle şeker tüketimindeki ve laktik asit üretimindeki miktarlar düşük kalmıştır. Bunun en önemli sebeplerinden bir tanesi daha önce de belirtildiği gibi, *L. casei*'nin keçiboynuzu ekstraktındaki sakarozu tamamen metabolize edememesidir. Ayrıca fermentasyon işleminin 15. saatinden sonra durağan fazın başlamış olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak da durağan faz süresince üretilen laktik asit miktarında artış görülmektedir.

Kabuk ve tırnak karışım tozları kullanılarak yapılan laktik asit fermentasyonunda biyokütle, şeker ve laktik asit miktarı değişimi Şekil 4.21.'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Keçiboynuzu ekstraktında kabuk ve tırnak karışım tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim

4.3.2.3. Tüy tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Kullanılan azot kaynağının mikroorganizma tarafından kullanılabilmesi ve ekonomik olması oldukça önemlidir. Bu nedenle fermentasyon ortamına 9 g/1.5 L maya ekstraktı yerine aynı konsantrasyonda en ucuz kaynaklardan birisi olan tüy tozları kullanılmıştır. Bu fermentasyon sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.26'da verilmiştir. Elde edilen laktik asit miktarı 48. saatte maksimum seviyeye (26.48 g/L) ulaşmıştır. Biyokütle miktarı fermentasyon işleminin 36. saatinde maksimum seviyeye (4.85 g/L) ulaşırken fermentasyon sonucunda besiyerinde kalan şeker miktarı ise 50.96 g/L düzeyinde kalmıştır. Fermentasyonun sıfıncı zaman

örneğinde biyokütle miktarı 0.08 g/L olarak belirlenirken laktik asit miktarı da 1.92 g/L olmuştur.

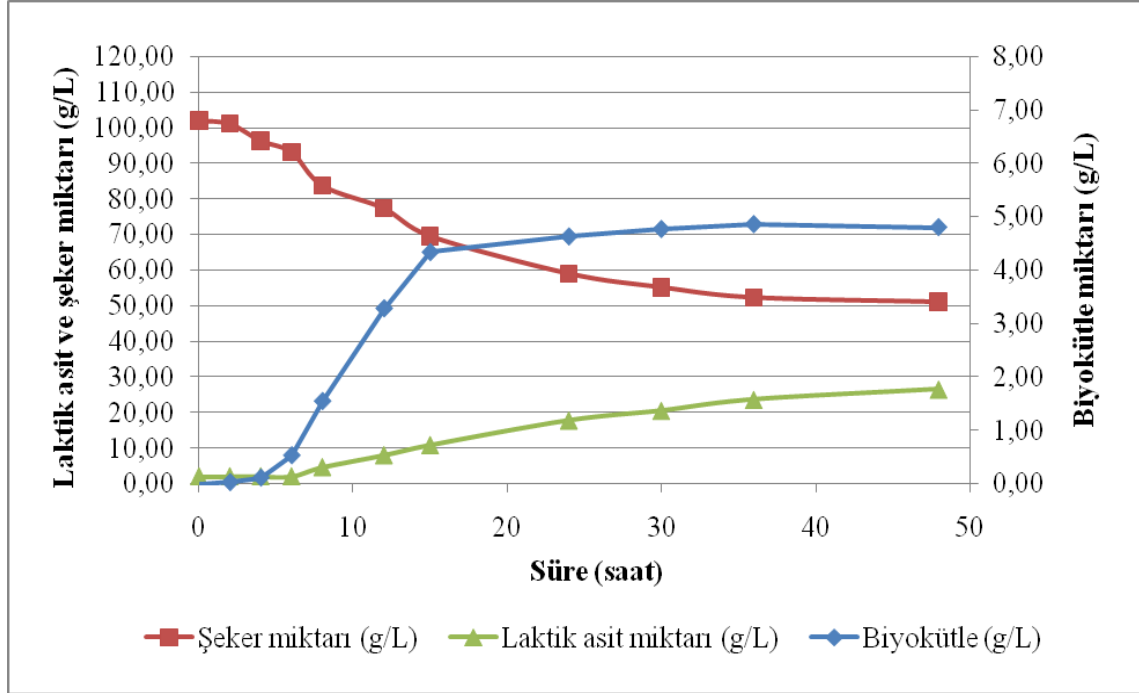
Çizelge 4.26. Keçiboynuzu ekstraktında tüy tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^h ±0.00	102.75 ^a ±0.45	0.00 ⁱ ±0.00
0	0.08 ^{hg} ±0.01	101.95 ^b ±0.22	1.92 ^h ±0.01
2	0.10 ^{hg} ±0.01	100.99 ^c ±0.22	1.92 ^h ±0.01
4	0.20 ^g ±0.01	96.21 ^d ±0.22	1.93 ^h ±0.01
6	0.53 ^f ±0.01	93.03 ^d ±0.22	1.94 ^h ±0.01
8	1.55 ^e ±0.01	83.63 ^e ±0.45	4.53 ^g ±0.01
12	3.28 ^d ±0.07	77.25 ^f ±0.45	7.92 ^f ±0.02
15	4.33 ^c ±0.01	69.44 ^g ±0.67	10.78 ^e ±0.01
24	4.62 ^b ±0.05	58.93 ^h ±0.67	17.73 ^d ±0.10
30	4.76 ^a ±0.03	55.10 ⁱ ±0.67	20.45 ^c ±0.03
36	4.85 ^a ±0.02	52.23 ^j ±0.22	23.59 ^b ±0.72
48	4.80 ^a ±0.01	50.96 ^k ±0.22	26.48 ^a ±0.02

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Tüy tozları katkılanan keçiboynuzu ekstraktındaki biyokütle gelişimi 15. saatten sonra durağan faza girmiştir. Bu sırada mikroorganizma tarafından kullanılan şeker ve üretilen laktik asit miktarı çok düşük (69.44 g/L ve 10.78 g/L) seviyelerde kalmıştır. Mikroorganizma gelişiminin durağan faza ulaştığı andan sonra laktik asit üretiminin arttığı görülmektedir. Bu da Karışık tip fermentasyon tanımına uymaktadır. Durağan fazın başlangıcı olan 15. saatte laktik asit miktarı 10.78 g/L iken, fermentasyonun sonunda yaklaşık 2,5 kat artarak 26.48 g/L olmuştur. Benzer şekilde fermentasyonun 15. saatine kadar 33.31 g/L şeker tüketilirken, bu zamandan fermentasyon sonuna kadar sadece 18.44 g/L şeker tüketilebilmiştir. İlk 15 saat içerisinde laktik asit miktarı 10.78 g/L'e ulaşmış olup bu zamandan fermentasyon sonuna kadar 15.70 g/L laktik asit üretilmiştir.

Maya ekstraktı yerine tüy tozları katkılanarak yapılan laktik asit fermentasyonu ortamından alınan örneklerde biyokütle,  eker ve laktik asit miktarı gelişimi  ekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. Keçiboynuzu ekstraktında tüy tozu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle,  eker ve laktik asit miktarları değişimi

4.3.2.4. Et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Keçiboynuzu ekstraktında eklenen alternatif azot kaynaklarının laktik asit üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla fermentasyon ortamına  izelge 3.6’da belirtilen 9 g/1.5 L maya ekstraktı (yeast extract) yerine aynı miktarda et ve kemik tozları eklenmiştir. Et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu sonucunda elde edilen örneklerdeki biyokütle,  eker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan  oklu karşılaştırma testi sonuçları  izelge 4.27’de verilmiştir. Biyokütle miktarı fermentasyon işleminin 30. saatinde maksimum seviyeye (4.71 g/L) ulaşırken laktik asit ise 48. saatte maksimum seviyeye (23.53 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon işlemi sonucunda besiyerinde 53.19 g/L  eker kalmıştır.

Fermentasyonun sıfıncı zaman örneğinde biyokütle miktarı 0.05 g/L olarak belirlenmiştir. Bakteri hücrelerinin reaktöre eklenmesi amacıyla gerçekleştirilen inkübasyon sırasında biyokütle gelişimi yanına 1.84 g/L laktik asit oluşumunun da gerçekleştiği belirlenmiştir.

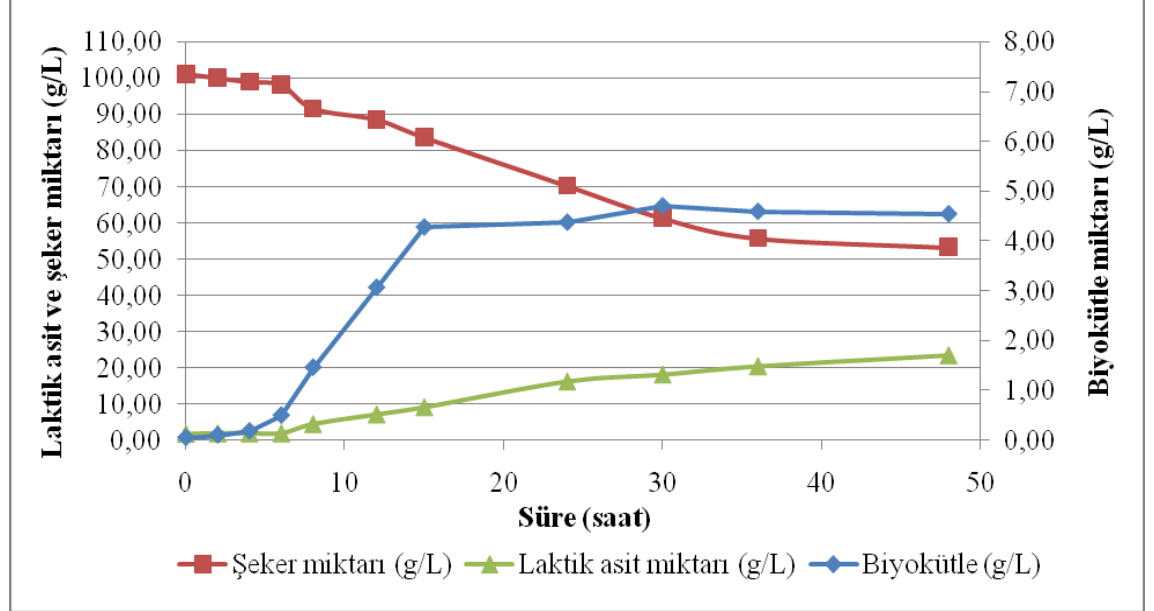
Çizelge 4.27. Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^h ±0.00	101.95 ^a ±0.67	0.00 ⁱ ±0.00
0	0.05 ^{hg} ±0.01	101.15 ^b ±0.45	1.84 ^h ±0.05
2	0.10 ^{hg} ±0.01	100.04 ^c ±0.22	1.97 ^h ±0.01
4	0.18 ^g ±0.01	98.92 ^d ±0.45	1.99 ^h ±0.01
6	0.50 ^f ±0.08	98.13 ^d ±0.67	1.99 ^h ±0.01
8	1.46 ^e ±0.01	91.59 ^e ±0.45	4.55 ^g ±0.07
12	3.07 ^d ±0.07	88.57 ^f ±0.67	7.20 ^f ±0.10
15	4.28 ^c ±0.04	83.63 ^g ±0.45	9.18 ^e ±0.01
24	4.38 ^b ±0.14	70.24 ^h ±0.45	16.30 ^d ±0.10
30	4.71 ^a ±0.05	61.32 ⁱ ±0.45	18.21 ^c ±0.01
36	4.59 ^a ±0.09	55.74 ^j ±0.67	20.50 ^b ±0.26
48	4.54 ^a ±0.12	53.19 ^k ±0.22	23.53 ^a ±0.06

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Et ve kemik tozlarının katkılacağı keçiboynuzu ekstraktında yapılan laktik asit fermentasyonunun 30. saatinden sonraki zamanlarda biyokütle artışının istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Fermentasyon işleminin 15. saatinden sonra durağan fazın başlamış olduğu görülmektedir. Durağan faz boyunca 30.44 g/L şeker tüketilirken 14.35 g/L laktik asit üretilmiştir. Bunun yanında durağan faza kadar 18.32 g/L şeker tüketilirken 9.18 g/L de laktik asit üretilmiştir.

Şekil 4.23.'de maya ekstraktı yerine et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve laktik asit miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen grafik görülmektedir.



Şekil 4.23. Keçiboynuzu ekstraktında et ve kemik tozları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları değişimi

4.3.2.5. Laktik asit üretiminde farklı azot kaynaklarının kullanılması ile gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması

Çizelge 4.28'de keçiboynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde, fermentasyon ortamına eklenen azot kaynaklarından olan maya ekstraktı yerine kullanılan 4 farklı alternatif azot kaynağının kinetik parametreler üzerine etkisi ve kinetik değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmiştir. Fermentasyon ortamına eklenen azot kaynağının laktik asit üretiminde istatistiksel olarak önemli bir etken olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Ayrıca, biyokütle ve laktik asit miktarlarının yanı sıra fermentasyona ait kinetik parametreler de fermentasyonun başarısını gösteren önemli etkenlerdir. Maksimum laktik asit üretimi

(26.28 g/L) ve maksimum şeker tüketim hızı (2.43 g/L/h) tüy tozlarının kullanıldığı laktik asit fermentasyonundan elde edilmiştir. Tüy tozlarının azot kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyonlarda laktik asit üretiminin yüksek olması yanında maksimum üretim hızı (0.81 g/L/h) ve laktik asit verim değerlerinin de yüksek olması (%51.13) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonlarında istatistiksel olarak en yüksek spesifik gelişme hızı (0.32 g/L/h) tavuk eti tozunun kullanıldığı fermentasyonlardan elde edilmiştir.

Çizelge 4.28. Farklı azot kaynaklarının laktik asit üretimlerine ait kinetik parametreler (pH kontrol 5.0).

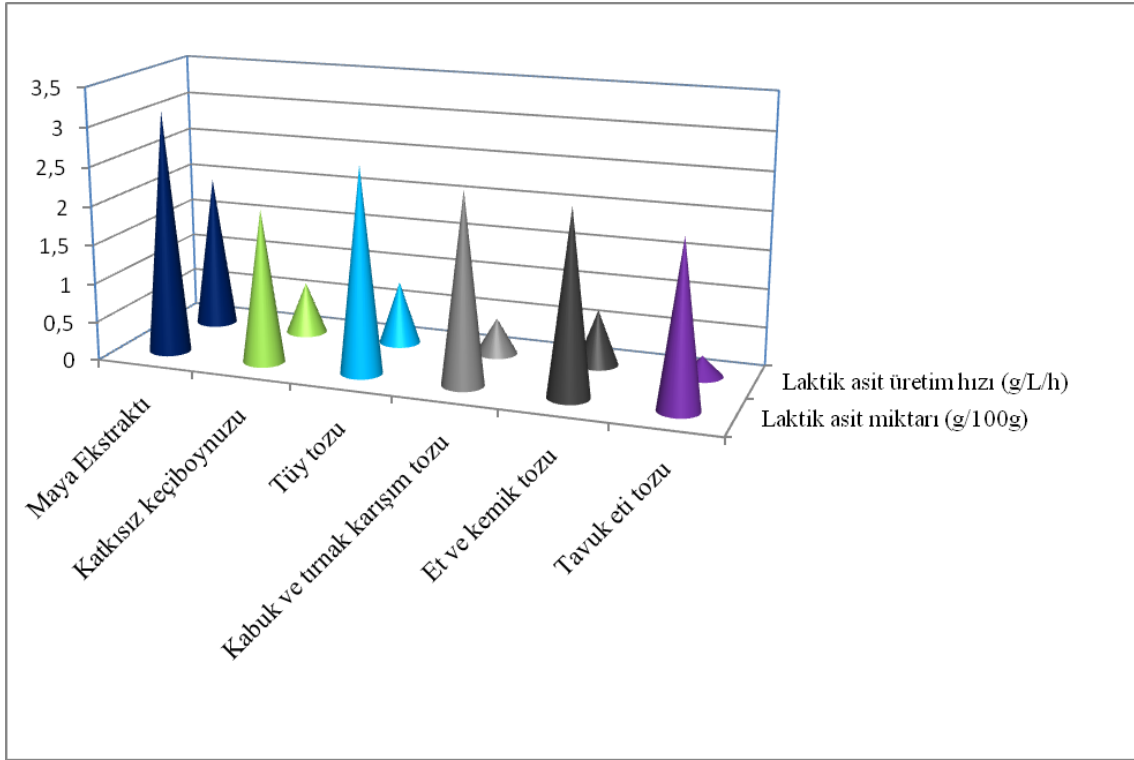
Kinetik parametreler	Azot Kaynakları					
	YE*	MB*	FM*	HM*	PM*	NA*
şeker tüketimi (g/L)	45.58 ^d	48.76 ^c	51.79 ^a	50.67 ^b	48.76 ^c	48.44 ^c
Laktik asit �retilimi (g/L)	31.35 ^a	23.53 ^c	26.48 ^b	24.45 ^c	21.22 ^d	20.09 ^d
Verim (Yp/s) (%)	68.79 ^a	48.26 ^c	51.13 ^b	48.24 ^c	43.52 ^d	41.46 ^e
Max. Tüketim hızı, (-ds/dt)max (g/L/h)	2.16 ^b	1.38 ^c	2.43 ^a	2.18 ^b	1.46 ^c	1.20 ^d
Max. Üretim hızı, (dp/dt)max (g/L/h)	1.97 ^a	0.71 ^b	0.81 ^b	0.46 ^c	0.26 ^d	0.68 ^b
Max. Gelişme hızı, (dx/dt)max (g/L/h)	0.56 ^a	0.33 ^b	0.35 ^b	0.33 ^b	0.36 ^b	0.34 ^b
Spesifik gelişme hızı (h ⁻¹)	0.36 ^a	0.18 ^b	0.19 ^b	0.18 ^b	0.32 ^a	0.20 ^b
İkiye katlanma süresi (t _d) (h)	1.95 ^b	3.86 ^a	3.73 ^a	3.80 ^a	1.60 ^b	3.44 ^a

* YE; Maya ekstraktlı keçiboynuzu, MB; Et ve kemik tozları , FM; Tüy tozları, HM; Kabuk ve tırnak karışım tozları, PM; Tavuk eti tozu ve NA; katkısız keçiboynuzu

** Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Çizelge 4.28’de alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit üretimlerinden elde edilen sonuçlara göre tüm üretimlerde elde edilen kinetik parametreler içerisinde en yüksek değerler azot kaynağı olarak maya ekstraktının kullanıldığı üretimlerden elde edilmiştir. Endüstriyel laktik asit fermentasyonunda ortama eklenen azot kaynağının ucuz olması yanında mikroorganizma tarafından kullanılabilir olması da önemlidir. Keçiboynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde

maya ekstraktına alternatif olarak katkılanan farklı azot kaynaklarının kullanıldığı denemelere ait sonuçlarda da mikroorganizmanın gelişim değerlerinin düşük olduğu görülmektedir. Dört farklı azot kaynağının kullanıldığı denemelerde maksimum gelişme hızı 0.33g/L/h ve 0.36 g/L/h arasında belirlenirken, maya ekstraktının kullanıldığı denemelerde bu değer 0.56 g/L/h olarak belirlenmiştir. Ayrıca maya ekstraktına ait spesifik gelişme hızı en yüksek değere (0.36 g/L/h) sahip olmuştur. Bu sonuçlar; maya ekstraktı kullanılmasının mikroorganizma gelişimi için en etkili kaynak olduğunu göstermektedir.

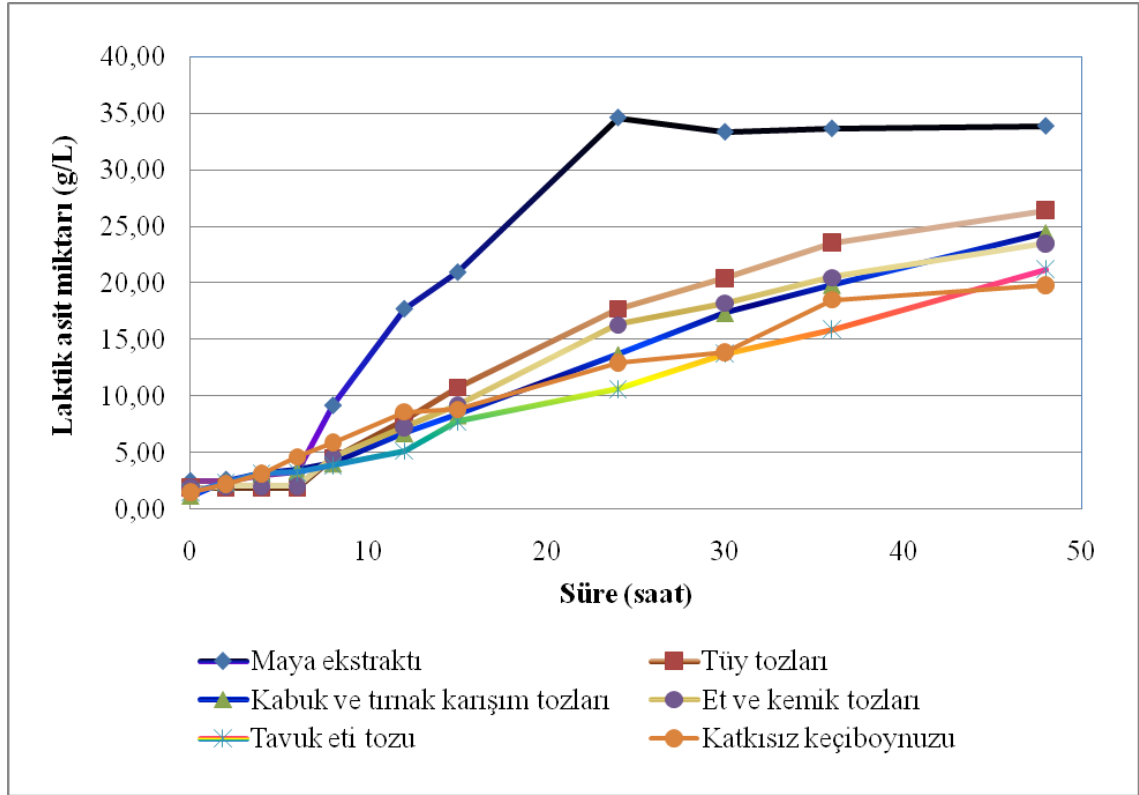


Şekil 4.24. Keçiboynuzu ekstraktında farklı azot kaynaklarının ve fermentasyon içeriğinin laktik asit miktarı ve üretim hızları açısından karşılaştırılması

Şekil 4.24.'de fermentasyon ortamına eklenen, maya ekstraktına alternatif 4 farklı azot kaynağı ve katkı maddesi olmaksızın hazırlanmış keçiboynuzu ekstraktının kullanılmasının laktik asit miktarı ve üretim hızı üzerine etkisini gösteren bir grafik hazırlanmıştır. Elde edilen kinetik parametrelerin değerlendirilmesinden sonra, laktik asit miktarı ve laktik asit üretme hızlarının karşılaştırılması fermentasyon ortamının

daha iyi anlaşılmasına olanak vermektedir. Azot kaynağı olarak maya ekstraktının kullanıldığı fermentasyona ait laktik asit üretim hızı ve laktik asit miktarının diğer üretimlere daha yüksek olduğu Şekil 4.24’de görülmektedir. Kinetik parametrelerin yanında, bunların birbirleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda da en iyi sonuçlar maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyondan alınmıştır ($P<0.05$).

Keçiyoynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde mikroorganizmanın gelişimi, şeker tüketimi, verim, laktik asit miktarı ve maksimum üretim hızları gibi kinetik parametreler incelendiğinde en iyi sonuçların maya ekstraktının azot kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyondan alındığı görülmüştür. Bunun yanında maya ekstraktına yerine 4 farklı alternatif azot kaynağının da laktik asit üretimlerinde kullanılabileceği ve ekonomik açıdan da alternatif olabileceği görülmüştür. Ayrıca keçiyoynuzu ekstraktının herhangi bir katkıya gerek duymadan laktik asit üretiminde kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak bu durumda elde edilen kinetik parametreler diğer üretimlerden istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük değerlere sahiptir (Çizelge 4.27) ($P<0.05$). Katkısız keçiyoynuzu ekstraktının kullanılması sonucunda laktik asit miktarı 20.09 g/L, şeker tüketimi 48.44 g/L ve verim de 41.46 g/L olarak belirlenmiştir. Keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit üretiminde kullanılabilmesi için fermentasyon ortamının mikroorganizmaların besin ihtiyacını karşılayacak bileşiklerle zenginleştirilmesi iyi sonuçlar vermektedir.



Şekil 4.25. Keçiyoynuzu ekstraktında farklı azot kaynaklarının ve fermentasyon içeriğinin laktik asit miktarının zamana karşı değişimi

Şekil 4.25’de görüldüğü gibi laktik asit miktarı, maya ekstraktının kullanıldığı fermentasyonun 8. saatinden sonra en yüksek değerlere ulaşmaya başlamıştır. Örneklerdeki laktik asit miktarının ilk 8 saat içerisinde birbirine oldukça yakın olması, bu zaman diliminde mikroorganizmaların lag fazında bulunmalarından kaynaklanmaktadır. Ortama uyum sağlayıp logaritmik çoğalma fazına geçtikten sonra buna paralel olarak laktik asit miktarında artış görülmektedir.

4.3.3. İnvvertaz enziminin laktik asit üretimi üzerine etkisi

Keçiboynuzu ekstraktı başta sakaroz olmak üzere glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritleri de içermektedir. Önceki bölümlerde de belirtildiği gibi sakaroz toplam şekerin yaklaşık olarak yarısını oluşturmaktadır. *L. casei* ilk olarak fermentasyon ortamında monosakkaritleri kullanmaktadır. Dolayısıyla sakaroz parçalanmadan fermentasyon ortamında kalmaktadır. Bunun sonucunda da üretilen laktik asit miktarı ile tüketilen şeker miktarı beklenenden düşük düzeyde kalmaktadır. Buna bağlı olarak değişen verim, üretim ve tüketim hızı gibi parametrelerde de istenilen düzeye ulaşamamaktadır. Bu nedenle, keçiboynuzu ekstraktı reaktör içinde sterilize edildikten sonra invertaz enzimi eklenmiştir. İnversiyon 12 saat süre ile devam etmiş ve ekstraktta sakarozun parçalanması sağlandıktan sonra fermentasyon başlatılmıştır. İnvvertaz enziminin etkisini incelemek amacıyla katkısız keçiboynuzu ekstraktı (mineral, maya ekstraktı katkısı olmadan) da aynı koşullarda enzim etkisine bırakıldıktan sonra fermente edilmiştir.

Çizelge 4.29. Farklı oranlarda invertaz enzimi uygulanmış keçiboynuzu ekstraktındaki monosakkarit miktarı

Süre	Monosakkarit miktarı (g/L)			
	IN1	IN2	IN5	IN10
0	51,45	51,45	51,45	51,45
12	136,96	136,24	135,04	122,56
24	131,84	131,84	128,25	120,76
36	138,88	134,97	129,92	126,72
48	136,32	140,16	133,12	127,16
72	136,32	138,24	131,2	126,65

*IN1, %1 invertaz uygulaması, IN2, %2 invertaz uygulaması, IN5, %5 invertaz uygulaması, IN10, %10 invertaz uygulaması

Çizelge 4.29’da farklı oranlarda invertaz enzimi eklenmiş keçiboynuzu ekstraktlarındaki monosakkarit içeriği gösterilmiştir. Keçiboynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde ekstraksiyon sonucu hedeflenen şeker miktarı 100 g/L olmuştur. Tüm fermentasyonlarda şeker içeriği aynı miktarda belirlenmiştir. Bu nedenle de uygulanan

inversiyondan sonra ekstraktta 100 g/L'ye en kısa Süre ve en düşük invertaz enzimi uygulamasında ulaşan kombinasyon seçilmiştir. IN1 (%1 invertaz uygulaması, ml) uygulaması sonucunda 12. saatte elde edilen şeker miktarı (136.96 g/L), diğer enzim oranlarından (IN2, IN5 ve IN10) elde edilen miktarlara göre yüksek çıkmıştır. Daha yüksek sonuçlar veren enzim oranı bilinmesine rağmen en kısa Süre ve en küçük invertaz kullanım oranındaki uygulama seçilmiştir. IN1 36. saatte daha yüksek şeker miktarına (138.88 g/L) ulaşmasına rağmen sürenin elde edilen sonuç istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Benzer şekilde IN2 kullanımının 48. saatinde şeker miktarı 140.16 g/L bulunmuştur. Ancak hem kullanılan enzim miktarının fazla olması hem de uygulama süresinin uzunluğu sebebiyle elde edilen sonuç istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Bu nedenle invertaz uygulamasının gerçekleştirildiği tüm fermentasyonlarda kullanılacak 1.5L keçiyoynuzu ekstraktı için IN1 (%1 invertaz uygulaması, ml) uygulaması kullanılmıştır.

4.3.3.1. İvertaz enzimi uygulanmış keçiyoynuzu ekstraktı

Keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit fermentasyonunda kullanılmasında, fermentasyon ortamına eklenen invertaz enzimi ile sakarozun parçalanmasından sonra fermentasyona bırakılması ile elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.30'da verilmiştir. Biyokütle miktarı invertaz enziminin eklendiği ekstraktın kullanıldığı örneklerde fermentasyon işleminin 48. saatinde maksimum seviyeye (6.29 g/L) ulaşırken üretilen laktik asit ise 48. saatte maksimum seviyeye (59.26 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucunda besiyerinde kalan şeker miktarı (16.05 g/L) önceki laktik asit fermentasyonları ile karşılaştırıldığında şeker miktarlarına göre istatistiksel olarak düşük kalmıştır ($P<0.05$). Fermentasyon ortamındaki sakarozun parçalanması ile oluşan monosakkaritler *L. casei* tarafından kolaylıkla fermente edilmiştir.

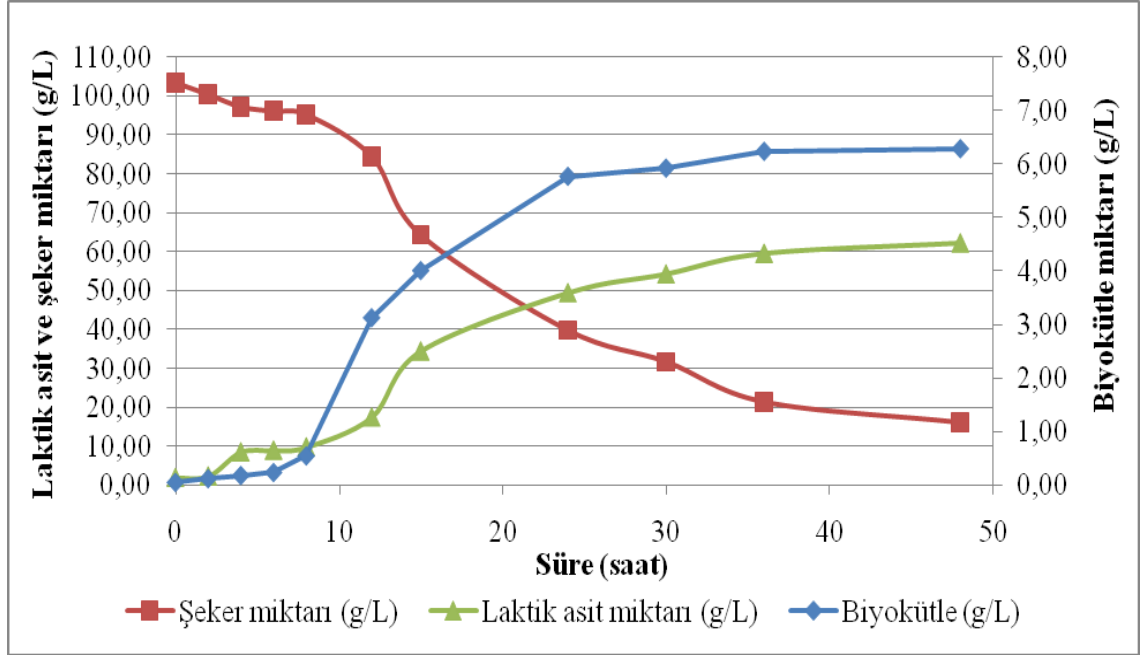
Çizelge 4.30. Keçiboynuzu ekstraktında invertaz enzimi uygulanması

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^e ±0.00	104.90 ^a ±0.01	0.00 ^g ±0.00
0	0.05 ^e ±0.01	103.54 ^{ab} ±0.01	1.99 ^f ±0.02
2	0.12 ^e ±0.01	100.52 ^{bc} ±0.01	2.40 ^f ±0.07
4	0.18 ^e ±0.01	97.33 ^{bc} ±0.01	8.39 ^e ±0.28
6	0.24 ^d ±0.01	96.21 ^{dc} ±0.01	8.92 ^e ±0.12
8	0.54 ^d ±0.01	95.34 ^d ±0.01	9.61 ^e ±0.32
12	3.13 ^c ±0.01	84.58 ^e ±0.02	15.42 ^d ±1.99
15	4.01 ^b ±0.04	64.34 ^f ±0.01	31.63 ^c ±2.11
24	5.77 ^a ±0.02	39.80 ^g ±0.03	46.03 ^b ±2.95
30	5.93 ^a ±0.03	31.70 ^g ±0.09	50.49 ^b ±2.50
36	6.24 ^a ±0.01	21.34 ^h ±0.01	58.51 ^a ±1.64
48	6.29 ^a ±0.01	16.05 ^h ±0.03	59.26 ^a ±2.38

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

İnvertaz uygulaması gerçekleştirilen keçiboynuzu ekstraktında yapılan laktik asit fermentasyonunun 24. saatinden sonraki biyokütle artışının istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($P>0.05$). Bunun yanında şeker tüketim ve laktik asit üretim miktarlarında 15. saatten sonraki zamanlardan istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$).

Şekil 4.26.'da invertaz eklenmiş fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim görülmektedir. Logaritmik çoğalma fazında biyokütle oluşumuna paralel olarak laktik asit miktarındaki artış açıkça görülmektedir.



Şekil 4.26. Keçiyoynuzu ekstraktında invertaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları grafiği

4.3.3.2. İnvvertaz enzimi kullanılmış katkısız keçiyoynuzu ekstraktı

İnvvertaz uygulamasının keçiyoynuzu ekstraktından laktik asit üretimi üzerine etkisini daha iyi anlamak amacıyla katkısız keçiyoynuzu ekstraktına invertaz eklenmiştir. Çizelge 4.31’de fermentasyon ortamına eklenen invertaz ile sakarozun parçalanmasından sonra fermentasyona tabi tutulması ile elde edilen örneklerdeki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, biyokütle miktarı invertaz enziminin eklendiği katkısız keçiyoynuzu ekstraktının kullanıldığı örneklerde fermentasyonun 30. saatinde maksimum seviyeye (3.83 g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen laktik asit ise 48. saatte maksimum seviyeye (18.83 g/L) ulaşırken, fermentasyon işlemi sonucunda besiyerinde bir miktar şeker (51.44 g/L) kullanılmadan kalmıştır. Mikroorganizma için fermentasyon ortamında bulunması gerekli olan maya ekstraktı, mineraller ve tuzlar olmadığı zaman, karbon kaynağı mikroorganizma için uygun olsa bile üretilen laktik asit ve oluşan biyokütle miktarı oldukça düşük kalmıştır.

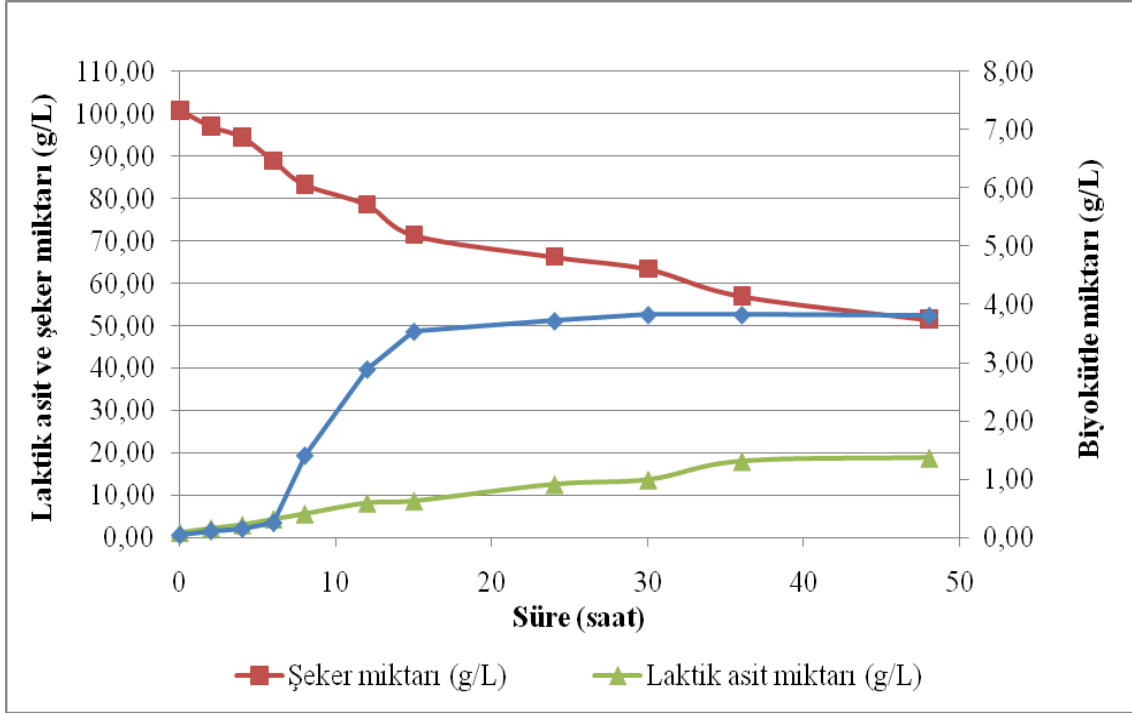
Katkısız ke iboyunu ekstraktında invertaz uygulamasından sonra yapılan laktik asit fermentasyonunun 24. saatinden sonraki zamanlarda biyokütle artışının 15. saatten sonra ise şeker tüketim ve laktik asit üretim miktarlarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).

Çizelge 4.31. Katkısız ke iboyunu ekstraktında invertaz enzimi uygulanması

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^e ±0.00	101.79 ^a ±1.35	0.00 ^g ±0.00
0	0.05 ^e ±0.01	100.84 ^{ab} ±0.90	1.16 ^f ±0.07
2	0.12 ^e ±0.01	97.01 ^{bc} ±1.35	2.17 ^f ±0.09
4	0.16 ^e ±0.01	94.46 ^{dc} ±0.01	3.02 ^e ±0.01
6	0.26 ^{ed} ±0.01	88.88 ^d ±1.12	4.34 ^e ±0.30
8	1.41 ^d ±0.15	83.31 ^d ±2.25	5.59 ^e ±0.23
12	2.89 ^c ±0.20	78.53 ^e ±2.25	8.16 ^d ±0.29
15	3.54 ^b ±0.38	71.35 ^f ±2.38	8.63 ^c ±0.17
24	3.72 ^a ±0.14	66.26 ^g ±0.67	12.54 ^b ±0.48
30	3.83 ^a ±0.09	63.39 ^g ±1.12	13.63 ^b ±0.81
36	3.83 ^a ±0.19	57.01 ^h ±2.63	17.99 ^a ±1.88
48	3.81 ^a ±0.19	51.44 ^h ±2.50	18.83 ^a ±0.88

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

İnvertaz enzimi eklenmiş katkısız keçiyoynuzu ekstraktının fermentasyon ortamından alınan örneklerde biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişimi Şekil 4.27.'de verilmiştir. Fermentasyon ortamının mikroorganizma gelişimi için yeterli besin maddelerine sahip olmaması nedeniyle şekerin tamamı tüketilememiş ve bunun sonucu olarak laktik asit üretimi düşük olmuştur.



Şekil 4.27. Katkısız keçiyoynuzu ekstraktında invertaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonundaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarlarındaki değişim

4.3.3.3. İnvvertaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması

Çizelge 4.32’de keçiyoynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde, fermentasyon ortamına eklenen invertaz enziminin kinetik parametreler üzerine etkisi ve kinetik değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmiştir. Biyokütle ve laktik asit miktarlarının yanı sıra fermentasyona ait kinetik parametreler de fermentasyonun başarısını gösteren önemli etkenlerdir. Maksimum laktik asit üretimi (59.27 g/L) ve maksimum tüketim hızı (2.51 g/L/h) invertaz enziminin kullanıldığı katkılı keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit fermentasyonundan elde edilmiştir. İnvvertaz enzimli katkılı keçiyoynuzu ekstraktının kullanıldığı fermentasyonlarda laktik asit üretiminin yüksek olması yanında maksimum üretim hızı da (2.41 g/L/h) bu fermentasyondan elde edilmiştir. Çizelge 4.32’den de görüldüğü gibi laktik asit üretimi ve şeker tüketimi diğer fermentasyonlardaki örneklerle istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iki katı daha yüksek değerler almıştır ($P<0.05$). Bu durum açıkça göstermektedir ki; fermentasyon ortamındaki sakarozun parçalanması sonucu monosakkaritler *L. casei* tarafından kolaylıkla substrat olarak kullanılmıştır. İnvvertaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonlarında en yüksek spesifik gelişme hızı (0.43 g/L/h) olarak belirlenmiştir.

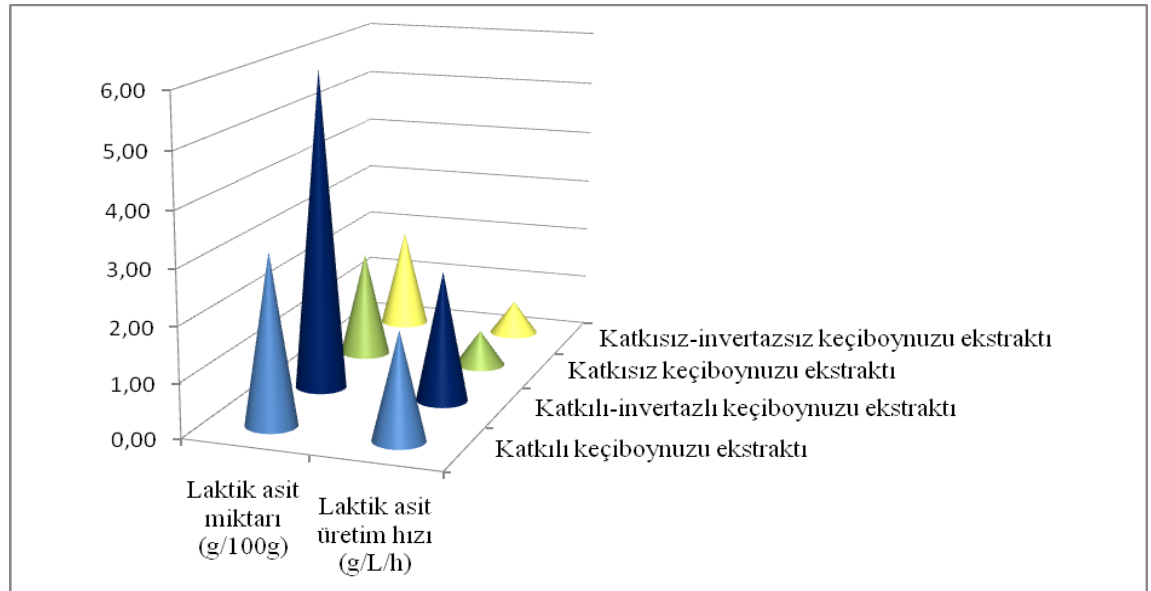
Çizelge 4.32. İnvertazlı ve invertazsız örneklerle ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	Fermentasyon ortamı			
	YE	YEI	NA	NAI
Şeker tüketimi (g/L)	45.58 ^d	88.85 ^a	48.44 ^c	50.36 ^b
Laktik asit üretimi (g/L)	31.35 ^b	59.27 ^a	20.09 ^c	18.83 ^c
Verim (Yp/s) (%)	68.79	66.70	41.46	37.38
Max. Tüketim hızı, (-ds/dt) _{max} (g/L/h)	2.16 ^b	2.51 ^a	1.20 ^c	1.19 ^c
Max. Üretim hızı, (dp/dt) _{max} (g/L/h)	1.97 ^b	2.41 ^a	0.68 ^c	0.64 ^c
Max. Gelişme hızı, (dx/dt) _{max} (g/L/h)	0.56 ^a	0.51 ^a	0.34 ^b	0.32 ^b
Spesifik gelişme hızı (h ⁻¹)	0.36 ^b	0.43 ^a	0.20 ^c	0.20 ^c
İkiye katlanma süresi (t _d) (h)	1.95 ^b	1.60 ^c	3.44 ^a	3.48 ^a

* YE; Maya ekstraktlı keçiyoynuzu, YEI; İnvertaz enzimli-katkılı ekstrakt, NA; katkısız keçiyoynuzu ekstraktı ve NAI; invertaz enzimli katkısız keçiyoynuzu ekstraktı

** Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0.05$)

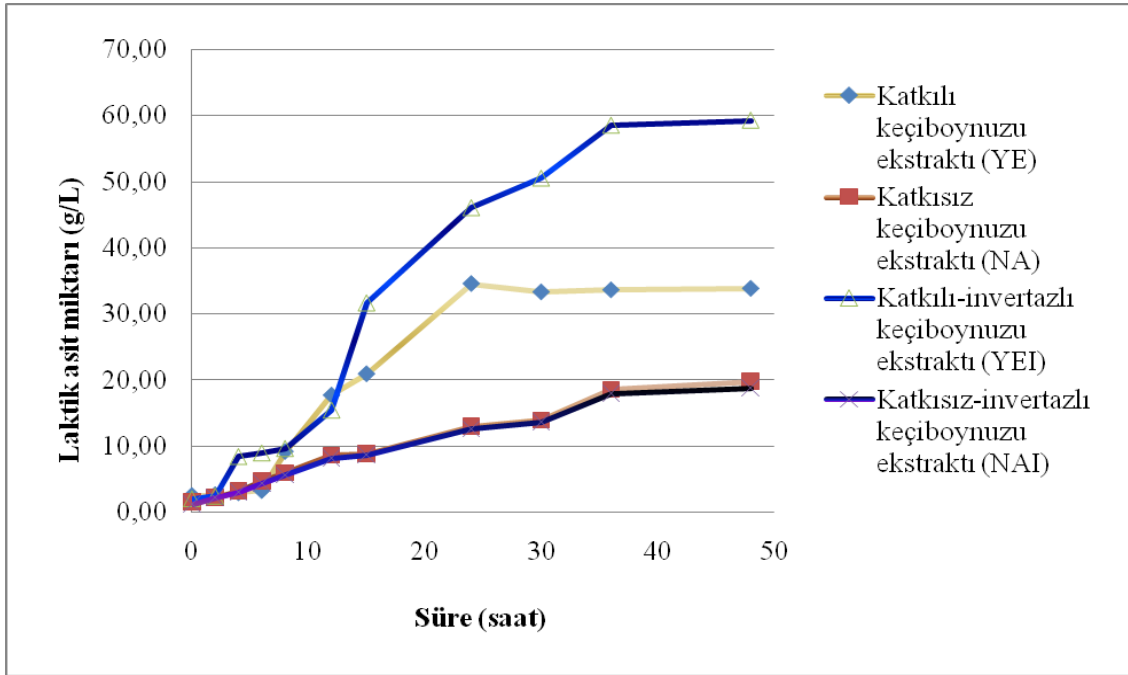
İnversiyonlu ve inversiyonsuz yapılan laktik asit üretimlerinden elde edilen sonuçlara göre tüm üretimlerde elde edilen kinetik parametreler içerisinde istatistiksel olarak en yüksek değerler invertazlı-katkılı ekstraktın kullanıldığı üretimlerden elde edilmiştir (Çizelge 4.32) ($P < 0.05$).



Şekil 4.28. Keçiyoynuzu ekstraktında invertazlı ve invertazsız fermentasyon içeriğinin laktik asit miktarı ve üretim hızları açısından karşılaştırılması

Fermentasyon ortamına eklenen, invertaz enzimi ve zenginleştirme katkılarının laktik asit miktarı ve üretim hızı üzerine etkisi Şekil 4.28’de görülmektedir. Kinetik parametrelerin değerlendirilmesinden sonra, laktik asit miktarı ve laktik asit üretme hızlarının karşılaştırılması fermentasyon ortamının daha iyi anlaşılmasına olanak vermektedir. Şekil 4.28’de, invertaz eklenmiş- katkılı keçiyoynuzu ekstraktının kullanıldığı fermentasyona ait laktik asit üretim hızı ve laktik asit miktarı diğer üretimlere ait değerlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Beklendiği gibi kinetik açıdan en iyi sonuçlar invertaz enzimi uygulanmış katkılı keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon sonunda alınmıştır.

Herhangi bir katkı kullanmadan keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit üretiminde kullanılmasından elde edilen tüm kinetik parametreler diğer üretimlere göre daha düşük değerlere sahiptir (Çizelge 4.32). Katkısız keçiyoynuzu ekstraktının kullanılması sonucunda laktik asit miktarı 20.09 g/L, şeker tüketimi 48.44 g/L ve verim de 41.46 g/L olarak belirlenmiştir. Bundan dolayı keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit üretiminde kullanılmasında fermentasyon ortamına mayaların besin ihtiyacını karşılayacak bileşikler eklemek gerekmektedir.



Şekil 4.29. Keçiyoynuzu ekstraktında invertaz enzimi uygulanmasıyla elde edilen laktik asit gelişimi

Laktik asit miktarı, katkılı-invertazlı ke iboyunu ekstraktının kullanıldığı fermentasyonda en yüksek değerlere sahip olmuştur ( ekil 4.29). Katkı yapılmadan kullanılan ke iboyunu ekstraktının  eker içeriği *L. casei*'nin kullanması için uygun olsa bile fermentasyon ortamında mikroorganizma için gerekli gelişme şartlarına ait mineral, azot ve tuzların yeterli miktarda olmaması fermentasyonun başarısız olmasına neden olmuştur.

4.3.4. Laktik asit üretiminde ke iboyunu pulpu, posanın pulpu ve posanın ekstraktının kullanılması

Ke iboyunu ekstraktının laktik üretiminde kullanılmasının yanında meyvenin pulpu, ekstraksiyondan sonra elde edilen posası, posanın parçalanması ile elde edilen pulpu ve posanın ikinci ekstraksiyonu sonucu elde edilen posa ekstraktı etanol fermentasyonunda olduğu gibi laktik asit fermentasyonunda da kullanılmıştır. Meyvenin parçalanması ile elde edilen pulp zenginle tirilerek laktik asit fermentasyonuna bırakılmıştır. Çizelge 4.33'de ke iboyunu meyvesi pulpunun fermentasyonuna ait laktik asit ve  eker miktarı değerleri ve ortalamalarına ait Duncan  oklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.33. Keçiboynuzu pulpunda laktik asit fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	*	100.16 ^a ±1.32	0.00 ^h ±0.00
0	*	98.22 ^a ±0.75	1.34 ^g ±0.43
2	*	96.67 ^a ±0.45	2.35 ^f ±0.12
4	*	93.37 ^b ±0.79	3.73 ^e ±0.13
6	*	89.85 ^{bc} ±0.79	4.33 ^d ±0.24
8	*	84.22 ^c ±1.98	5.78 ^d ±0.27
12	*	75.57 ^d ±1.75	8.45 ^c ±0.02
15	*	73.45 ^d ±0.72	12.56 ^b ±0.32
24	*	70.42 ^{de} ±1.22	13.44 ^b ±0.21
30	*	68.35 ^e ±0.72	15.78 ^b ±0.54
36	*	65.23 ^e ±1.13	19.34 ^a ±1.01
48	*	60.92 ^f ±1.44	22.90 ^a ±0.34

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Meyvenin homojenize edilmesi ile üretilen meyve pulpunda karıştırma hızı normal ekstrakta göre daha yüksek tutulmuştur. Daha iri parçacıklar ve viskoz bir yapıya sahip pulp 500 d/d hızında karıştırılmıştır. Yüksek karıştırma hızı kullanılmasına rağmen fermentasyon ortamının iri partikülleri içermesi hem karıştırmayı hem de sistemden örnek almayı zorlaştırmıştır. Her ne kadar üretim gerçekleştirmeye çalışılsa da elde edilen laktik asit miktarı ve verim yüksek olmamıştır. Ayrıca ortam aşırı bulanık olduğu ve biyokütle miktarı bulanıklık esasına göre belirlendiği için biyokütle miktarının hesaplanması mümkün olmamıştır. Alınan örneklerdeki parçacık iriliğinin büyüklüğü ölçümleri olumsuz etkilemiştir. Keçiboynuzu pulpu kullanılarak elde edilen laktik asit miktarı 21.56 g/L, tüketilen şeker miktarı 39.24 g/L olurken verim %54.94 olmuştur.

Yine keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonundan sonra geriye kalan posanın homojenize edilmesi ile üretilen posa pulpuna ait laktik asit değerleri, direkt olarak meyvenin pulpunun kullanılması ile elde edilen fermentasyona ait değerlerle benzer çıkmıştır. Çizelge 4.34’de keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonundan sonra elde edilen

posanın homojenize edilip pulp haline dönüştürülerek fermentasyona bırakılması sonucu belirlenen laktik asit ve şeker miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.34. Keçiboynuzu posasının pulpunda laktik asit fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	*	53.21 ^a ±1.21	0.00 ^h ±0.00
0	*	52.24 ^a ±0.34	1.22 ^g ±0.21
2	*	50.67 ^{ab} ±0.78	2.34 ^f ±0.22
4	*	48.34 ^b ±0.45	3.56 ^e ±0.45
6	*	47.78 ^b ±0.45	4.85 ^{ed} ±0.87
8	*	45.67 ^{bc} ±1.62	5.76 ^d ±0.13
12	*	40.32 ^c ±1.76	8.32 ^c ±0.01
15	*	35.93 ^d ±0.23	11.12 ^b ±0.34
24	*	32.86 ^{de} ±1.21	12.32 ^b ±0.56
30	*	30.51 ^e ±0.72	13.17 ^b ±0.31
36	*	25.90 ^f ±1.21	14.34 ^a ±1.32
48	*	20.21 ^g ±1.09	16.78 ^a ±0.21

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Meyvenin ekstraksiyondan sonraki posasının homojenize edilmesi ile üretilen posa pulpunda karıştırma hızı normal ekstrakta göre daha yüksek tutulmuştur. Daha iri parçacıklar ve viskoz bir yapıya sahip posa pulpu 500 d/d hızında karıştırılmıştır. Daha önceki denemelerde olduğu gibi fermentasyon ortamının iri partikülleri içermesi hem karıştırmayı hem de sistemden örnek almayı zorlaştırmıştır. Bu nedenle laktik asit fermentasyonunu gerçekleştirmek mümkün olsa bile elde edilen laktik asit miktarı ve verim yüksek olmamıştır. Mikroorganizma miktarının belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik yöntem, biyokütle miktarını optik yoğunluğa göre belirlediği için alınan örneklerdeki parçacık iriliğinin fazlalığı nedeniyle ölçümleri gerçekleştirememiştir. Katı partiküllerin varlığı biyokütle miktarının doğru ölçülmesini engellemiştir. Keçiboynuzu posasının pulpu kullanılarak elde edilen laktik asit miktarı 15.56 g/L, tüketilen şeker miktarı 30.00 g/L olurken verim % 51.87 olmuştur.

Keçiboynuzu meyvesinin doğrudan homojenize edilip pulp haline getirilerek fermentasyonda kullanılması sonucu elde edilen laktik asit miktarı (21.56 g/L) ve verim (% 54.94) değerleri, meyvenin ekstraksiyonundan sonra elde edilen posanın homojenize edilmesi ile oluşan posa pulpuna ait laktik asit miktarı (15.56 g/L) ve verim (% 51.87) değerlerinden istatistiksel olarak yüksek olmuştur ($P<0.05$). Bunun sebebi posa pulpunda kalan şeker miktarının meyve pulpunda bulunan şeker miktarından daha az olmasıdır. Fermentasyon gerçekleşmesine rağmen, harcanan enerji ve zaman gibi masraflar göz önüne alındığında elde edilen ürünün değerinden daha fazla olması da söz konusudur. Ancak maliyet hesabı endüstriyel koşullarda yapılabileceği için bu konuda daha fazla yorum yapılmamıştır.

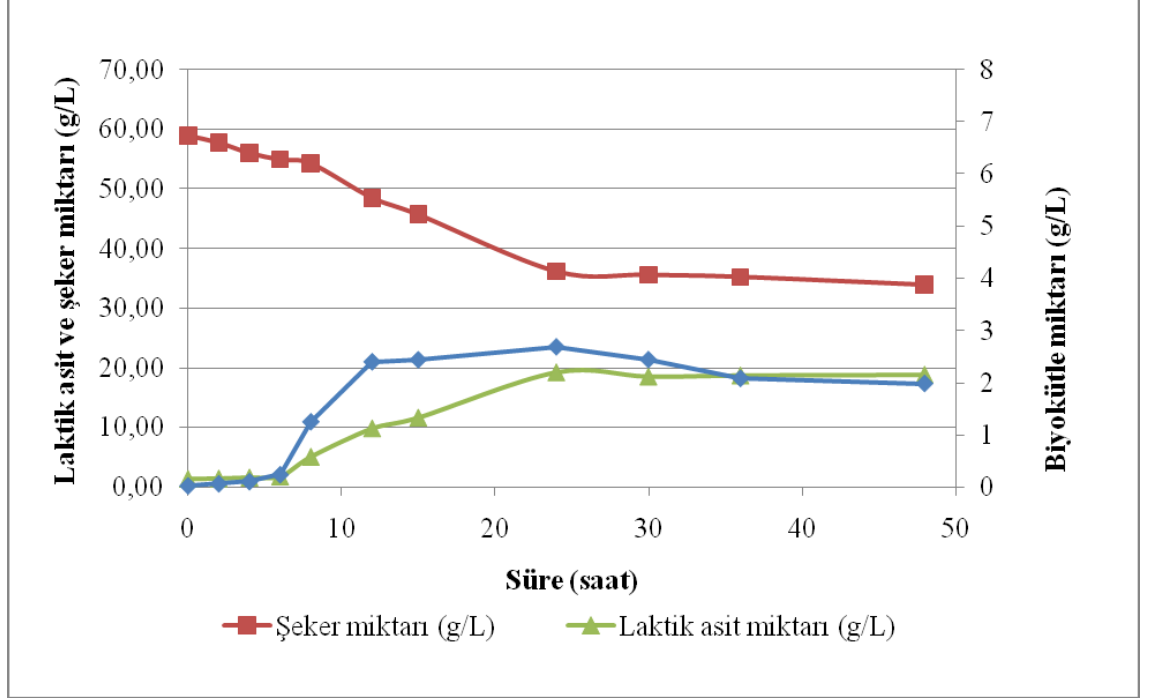
Keçiboynuzu meyvesinin ikinci kez ekstrakte edilmesi sonucu elde edilen ekstrakta ait biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları ve ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.35’de verilmiştir.

Çizelge 4.35. Keçiboynuzu posa ekstraktının laktik asit fermentasyonu

Süre (saat)	Biyokütle (g/L)	Şeker miktarı (g/L)	Laktik asit (g/L)
B	0.00 ^e ±0.00	59.99 ^a ±0.89	0.00 ^f ±0.00
0	0.02 ^d ±0.58	58.89 ^a ±0.25	1.40 ^e ±0.89
2	0.06 ^d ±0.89	57.71 ^a ±0.47	1.47 ^e ±0.12
4	0.10 ^d ±1.23	55.98 ^b ±0.69	1.64 ^e ±0.47
6	0.23 ^c ±1.58	54.89 ^b ±0.95	1.82 ^e ±1.25
8	1.25 ^b ±0.25	54.25 ^b ±1.23	5.11 ^d ±1.47
12	2.40 ^a ±0.58	48.47 ^c ±0.58	9.84 ^c ±0.12
15	2.44 ^a ±0.69	45.69 ^c ±0.68	11.64 ^b ±0.12
24	2.68 ^a ±0.89	36.18 ^d ±0.47	19.23 ^a ±0.14
30	2.44 ^a ±0.12	35.63 ^d ±0.47	18.53 ^a ±0.15
36	2.08 ^{ab} ±0.01	35.27 ^d ±0.68	18.70 ^a ±0.01
48	2.02 ^{ab} ±0.25	33.94 ^d ±0.89	18.82 ^a ±0.59

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$)

Şekil 4.30.'da keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakttaki biyokütle, şeker ve laktik asit miktarları verilmiştir.



Şekil 4.30. Keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraksiyonu elde edilen posa ekstraktında laktik asit miktarı, şeker tüketimi ve biyokütle oluşum grafiği

Keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraktında fermentasyon sonucu elde edilen laktik asit miktarı, ekstraktın şeker miktarı düşük olduğu için 17.42 g/L düzeyinde kalmıştır (Çizelge 4.36).

Çizelge 4.36. Keçiboynuzu meyvesinin birinci ve ikinci ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların fermentasyonlarının kinetik parametreleri

Kinetik parametreler	Ekstraktlar	
	1. Ekstraksiyon	2. Ekstraksiyon
Şeker tüketimi (g/L)	45.58	26.04
Laktik asit üretimi (g/L)	31.35	17.42
Verim (Yp/s) (%)	68.79	66.88
Max. Tüketim hızı, $(-ds/dt)_{max}$ (g/L/h)	2.16	1.23
Max. Üretim hızı, $(dp/dt)_{max}$ (g/L/h)	1.97	1.10
Max. Gelişme hızı, $(dx/dt)_{max}$ (g/L/h)	0.56	0.25
Spesifik gelişme hızı (h^{-1})	0.36	0.36
İkiye katlanma süresi (t_d) (h)	1.95	1.95

Keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakta ait kinetik değerler, aynı şartlar altında fermentasyona bırakılan birinci ekstraksiyona ait değerlere verim ve mikroorganizma gelişimi açısından yakın çıkmıştır. Şeker tüketimi, laktik asit üretimi, tüketim hızı, üretim hızı ve gelişme hızı değerleri başlangıçtaki şeker miktarı ve buna bağlı olarak şeker tüketimi ve laktik asit üretimine bağlı değerler olduğundan birinci ekstraksiyona göre düşük çıkmıştır. Ancak ekstraktın içerdiği şeker miktarına göre tüketilen şekere (26.04 g/L) karşı üretilen laktik asit miktarının (17.42 g/L) bir sonucu olan verim (% 66.88) birinci ekstraksiyona oldukça yakın belirlenmiştir. Yine spesifik gelişme hızları ($0.36 h^{-1}$) ve mikroorganizmanın ikiye katlanma süresi (1.95 h) her iki üretimde de aynı çıkmıştır. Bu sonuçlara göre keçiboynuzu meyvesinin birinci ekstraksiyonundan geriye kalan posanın, tekrar ekstrakte edilmesi ile oluşan posa ekstraktının fermentasyonda kullanılabildiği görülmüştür. Ancak elde edilen posa ekstraktının düşük şeker içeriğine sahip olması laktik asit üretiminin de düşük değerlere sahip olmasına neden olmaktadır.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında keçiboynuzu meyvesinin en iyi ekstraksiyon şartları cevap yüzey metodu ile belirlenerek, meyveden elde edilen ekstrakt, pulp, posa ve posanın ekstraktı derin kültür fermentasyonuna bırakılarak laktik asit ve etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında fermentasyon ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının etanol ve laktik asit üretimi üzerine etkisi de incelenmiştir. Ayrıca etanol üretiminde pH ve inokülasyon oranının etanol üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Laktik asit üretimi sırasında mikroorganizma tarafından tüketilemeyen ve fermentasyon ortamında kalan sakaroz, invertaz enzimi ile parçalanarak laktik asit üretimi artırılmaya çalışılmıştır.

Ekstraksiyonda kullanılacak olan keçiboynuzu meyvesi 3-5 cm uzunlukta parçalar halinde Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu ile belirlenen sıcaklık, süre ve meyve:su oranı kombinasyonlarında ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Cevap Yüzey Metodu kullanılarak belirlenen şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinden elde edilen sonuçlar, Minitab İstatik Programı kullanılarak ekstraksiyon şartları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlara göre keçiboynuzu meyvesinin 80°C’de, 1:4 meyve:su oranında ve 2 saat süreyle ekstraksiyonu en iyi ekstraksiyon şartları olarak belirlenmiştir.

Cevap Yüzey Metodu’nun belirlediği optimum şartlarda elde edilen ve ortalama 100 g/L şeker içeren 1.5 L keçiboynuzu ekstraktı, etanol fermentasyonu için kullanılarak fermentasyon üzerine pH, inokülasyon oranı ve farklı azot kaynaklarının etkisi incelenmiştir.

Tüm analiz sonuçlarına göre, fermentasyon ortamındaki pH kontrolünün etanol üretiminde önemli bir etken olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kinetik parametreler ışığında değerlendirildiğinde, keçiboynuzu ekstraktından fermentasyon yoluyla etanol üretiminde fermentasyon ortamında pH kontrolünün yapıldığı üretime ait parametrelerin, reaktörde pH kontrolü yapılmadan gerçekleştirilen üretimlerden daha

yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sebeple, çalışmanın tüm etanol fermentasyonu denemeleri pH kontrollü olarak yapılmıştır.

Keçiboynuzu ekstraktının fermentasyonunda etanol üretimi üzerine pH kontrolünün etkisi incelendikten sonra, inoküle edilecek maya miktarının (inoculum size) etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla 3 farklı inokülasyon oranı (% 1, % 3 ve % 5) kullanılarak pH kontrollü üretimler gerçekleştirilmiştir.

Kinetik parametrelerin değerlendirilmesinden sonra en iyi sonuçlar % 3 inokülasyon miktarında gerçekleştirilen fermentasyondan alınmıştır.

Keçiboynuzu ekstraktından etanol üretiminde pH'nın ve inokülasyon oranının fermentasyon üzerine etkisi incelendikten sonra, farklı azot kaynaklarının pahalı bir kaynak olan maya ekstraktına (yeast extract) alternatif olarak kullanılması üzerine de fermentasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tavuk eti tozu (Poultry Meal), kabuk ve tırnak karışım tozları (Hull and Fines Mix), tüy tozları (Feather Meal) ve et ve kemik tozları (Meat-Bone Meal) kullanılmıştır. Alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretimleri maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretimleri ile karşılaştırılmıştır.

Tüm iyi sonuçların maya ekstraktının azot olarak kullanıldığı fermentasyondan alınmasına rağmen, kullanılan 4 farklı alternatif azot kaynağının da pahalı olan maya ekstraktına ekonomik açıdan alternatif olabileceği görülmüştür. Yine keçiboynuzu ekstraktının herhangi bir katkı kullanmaksızın etanol üretiminde kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak herhangi bir katkı kullanmadan keçiboynuzu ekstraktının etanol üretiminde kullanılmasından elde edilen kinetik parametreler diğer üretimlerden daha düşük değerlerde olduğu görülmüştür.

Keçiboynuzu ekstraktının etanol üretiminde kullanılmasının yanında meyvenin pulpu, ekstraksiyondan sonra elde edilen posası, posanın parçalanması ile elde edilen pulpu ve posanın ikinci ekstraksiyonu sonucu elde edilen posa ekstraktı da fermentasyon amacıyla kullanılmaya çalışılmıştır.

Etanol fermentasyonunda kullanılmak üzere meyvenin homojenize edilmesi ile üretilen meyve pulpunda her ne kadar üretim gerçekleştirmeye çalışılsa da elde edilen etanol miktarı ve verim yüksek olmamıştır. Yine keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonundan sonra geriye kalan posanın homojenize edilmesi ile üretilen posa pulpuna ait etanol fermentasyonu değerleri, doğrudan meyve pulpunun kullanılması ile elde edilen fermentasyona ait değerlerle benzer çıkmıştır. Ancak her ne kadar üretim gerçekleştirilmeye çalışılsa da elde edilen etanol miktarı ve verim yüksek olmamıştır.

Keçiboynuzu meyvesinin ekstraksiyonundan sonra geriye kalan posanın ikinci ekstraktı da etanol fermentasyonuna bırakılmıştır. Bu ekstraksiyona ait kinetik değerler, aynı şartlar altında fermentasyona bırakılan birinci ekstraksiyona ait değerlere verim ve mikroorganizma gelişimi açısından yakın çıkmıştır. Şeker tüketimi, etanol üretimi, tüketim hızı, üretim hızı ve gelişme hızı değerleri başlangıçtaki şeker miktarı ve buna bağlı olarak şeker tüketimi ve etanol üretimine bağlı değerler olduğundan birinci ekstraksiyona göre düşük çıkmıştır. Bu sonuçlara göre keçiboynuzu meyvesinin birinci ekstraksiyonundan geriye kalan posanın, tekrar ekstrakte edilmesi ile oluşan posa ekstraktının fermentasyonda kullanılabildiği görülmüştür. Ancak elde edilen posa ekstraktının düşük şeker içeriğine sahip olması etanol üretiminin de düşük değerlere sahip olmasına neden olmaktadır.

Cevap Yüzey Metodu'nun belirlediği optimum şartlarda elde edilen ve ortalama 100 g/L şeker içeren 1.5 L keçiboynuzu ekstraktı, laktik asit fermentasyonu için kullanılarak fermentasyon üzerine zenginleştirme işlemi, farklı azot kaynakları ve ekstrakta invertaz enziminin eklenmesinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla tüm laktik asit fermentasyonları %1 bakteri inokülasyon oranında, pH 5.0'da 37°C'de ve 200 d/d'da gerçekleştirilmiştir.

Keçiboynuzu ekstraktından fermentasyon yoluyla laktik asit üretiminde ilk olarak ekstrakt içeriğinin biyokütle ve laktik asit miktarı üzerine etkisi hesaplanmıştır. Bu amaçla reaktördeki fermentasyon ortamına eklenen mineral maddelerin dışında maya ekstraktı miktarının laktik asit fermentasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu

amaçla mineral maddeler eklenerek zenginleştirilen fermentasyon ortamında 2 farklı miktarda (8 ve 10 g/L) maya ekstraktı kullanılmıştır. Ayrıca karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla ekstraktta hiçbir zenginleştirme yapılmayarak kontrol örneğinde de laktik asit fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kinetik parametreler arasında karşılaştırma testi yapıldığında 10 g/L maya ekstraktı kullanılan denemelerin daha yüksek sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bunun yanında katkısız keçiyoynuzu kullanılan laktik asit fermentasyonuna ait kinetik parametreler en düşük değerlere sahiptir.

Keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit üretimi üzerine fermentasyon ortamına eklenen maya ekstraktı miktarının etkisinin önemli olduğu görülmüştür. Bu amaçla 2 farklı miktarda (8 g/L ve 10 g/L) eklenen maya ekstraktlarına ait kinetik parametreler incelendiğinde tüm yüksek sonuçlar 10 g/L maya ekstraktının kullanıldığı fermentasyondan elde edilmiştir. Dolayısıyla tüm laktik asit fermentasyonlarında maya ekstraktı miktarı 10 g/L olmuştur. Ancak üretimler sonucunda görülmektedir ki keçiyoynuzu ekstraktının laktik asit fermentasyonunda fermentasyon ortamındaki şekerin yaklaşık olarak yarısı tüketilmeden kalmaktadır. Bunun sebebi de *L. casei* bakterisinin keçiyoynuzu ekstraktı içerisindeki sakarozu substrat olarak kullanamamasıdır.

Keçiyoynuzu ekstraktından laktik asit üretiminde maya ekstraktı miktarının fermentasyon üzerine etkisi incelendikten sonra, farklı azot kaynaklarının pahalı bir kaynak olan maya ekstraktına alternatif olarak kullanılması üzerine de fermentasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla etanol fermentasyonunda da kullanılan tavuk eti tozu, kabuk ve tırnak karışım tozları, tüy tozları ve et ve kemik tozları kullanılmıştır. Alternatif azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit üretimleri, maya ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit üretimleri ile karşılaştırılmıştır.

Tüm iyi sonuçlar maya ekstraktının azot olarak kullanıldığı fermentasyondan alınmasına rağmen, kullanılan 4 farklı alternatif azot kaynağının da maya ekstraktına ekonomik açıdan alternatif olabileceği görülmüştür. Yine keçiyoynuzu ekstraktının

herhangi bir katkı kullanmaksızın laktik asit üretiminde kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak herhangi bir katkı kullanmadan keçiboynuzu ekstraktının laktik asit üretiminde kullanılmasından elde edilen kinetik parametreler diğer üretimlerden daha düşük değerlere sahiptir.

Keçiboynuzu ekstraktı başta toplam şekerin yaklaşık yarısını oluşturan sakaroz olmak üzere glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritleri içermektedir. *L. casei* ilk olarak fermentasyon ortamında monosakkaritleri parçalamaktadır. Bu nedenle sakaroz parçalanmadan fermentasyon ortamında kalmaktadır. Bunun sonucunda da üretilen laktik asit miktarı ile tüketilen şeker miktarı düşük olmaktadır. Bunlara bağlı olarak değişen verim, üretim ve tüketim hızı gibi kinetik parametreler de istenilen düzeyde olmamaktadır. 12 saat süre ile inversiyona bırakılan ekstraktta sakarozun parçalanması sağlandıktan sonra fermentasyon başlatılmıştır. İvertaz enziminin etkisini incelemek amacıyla katkısız keçiboynuzu ekstraktı (mineral, maya ekstraktı katkısı olmadan) da invertaz enzimiyle muamele edildikten sonra fermente edilmiştir.

İvertaz enzimli ve enzimsiz gerçekleştirilen laktik asit üretimlerinden elde edilen sonuçlara göre, tüm üretimlerde hesaplanan kinetik parametreler içerisinde en yüksek değerler invertazlı-katkılı ekstraktın kullanıldığı üretimlerden elde edilmiştir. Kinetik parametrelerin yanında, bunların birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda da en iyi sonuçlar invertaz enzimi uygulanmış katkılı keçiboynuzu ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyondan alınmıştır. Herhangi bir katkı kullanmadan keçiboynuzu ekstraktının laktik asit üretiminde kullanılmasından elde edilen kinetik parametreler diğer üretimlerden daha düşük değerlere sahiptir.

Keçiboynuzu ekstraktının laktik üretiminde kullanılmasının yanında meyvenin pulpu, ekstraksiyondan sonra elde edilen posası, posanın parçalanması ile elde edilen pulpu ve posanın ikinci ekstraksiyonu sonucu elde edilen posa ekstraktı da fermentasyon amacıyla kullanılmaya çalışılmıştır. Bu fermentasyonda da etanol fermentasyonunda olduğu gibi düşük üretim ve verim elde edilmiştir.

Keçiboynuzu meyvesinin ikinci ekstraktı da laktik asit fermentasyonu için denenmiştir. Birinci ekstraksiyondan geriye kalan posanın, tekrar ekstrakte edilmesi ile oluşan posa ekstraktının fermentasyonda kullanılabildiği görülmüştür. Ancak elde edilen posa ekstraktının düşük şeker içeriğine sahip olması laktik asit üretiminin de düşük değerlere sahip olmasına neden olmuştur.

Keçiboynuzu meyvesinden fermentasyon yoluyla etanol ve laktik asit üretimi sonucunda elde edilen veriler, bu meyvenin fermentasyon teknolojisi açısından iyi bir substrat olduğunu göstermiştir. Bunun yanında meyvenin zengin karbonhidrat ve azot içeriğine sahip olması bu alanda diğer yeni üretimler için de kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen verilerin endüstriye aktarılabilir nitelikte ve gelecek çalışmalara da ışık tutacak özellikte olduğu düşünülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- ALEGRE, R.M., RIGO, M. and JOEKES, I. 2003. Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chrysotile. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*. 46(4):751-757.
- ANONİM, 1999. The SAS System. Version 8. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- ANONİM, 2007. Finished products of Griffin Industries; Proteins, Fats and Specialty Blends. <http://www.griffinind.com/PFS.php> Sayfa giriş tarihi: 12.01.2007.
- ANONİM, 2009. FAO. Production of carob fruit annual. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> Sayfa giriş tarihi: 23.06.2009.
- ARTIK, N. ve ERBAŞ, S. 1988. Das Aminosäureprofil von Johannisbrot. Die Industrielle Obst-und Gemüsewervertung. Maerz, 83-86.
- ATIYEH, H. and DUVNJACK, Z.2003. Production of fructose and ethanol from cane molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. *Acta Biotechnol.* 23(1),37-48.
- BADGER, P.C. 2002. Ethanol from cellulose: A Generale Review. Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA.
- BASMADJIAN, D. 2007. Mass Transfer and Separation Processes: Principles and Applications. CRC Pres, New York, pp 479.
- BATTLE, I. and TOUS, J. 1997. Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.).International Plant Genetic Resources Institute. Via delle Sette Chiese 142 00145 Rome, Italy. 97ss.

- BERRY, A.R., FRANCO, C.M.M., ZHANG, W. and MIDDELBERG, A.P.J. 1999. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. *Biotechnology Letters*. 21:163-167.
- BLANCH, H.W. and CLARK, D.S. 1997. Biochemical Engineering. CRC Press, New York, pp 702.
- BOX, G.E.P. and BEHNKEN, D.W. 1960. Some new three level designs for the study of quantative variables. *Technometrics*, 2, 455-475
- BROCK, T.D. 1984. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Sinauer Associates Incorporated. 308 pp.
- BROWN, R.C. 2003. Biorenewable Resources: engineering new products from agriculture. Blackwell Publishing, Ames, pp 269.
- BRUNO-BARCENA, J.M., RAGOUT, A.L., CORDOBA, P.R. and SINERIZ, F. 1999. Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51:316-324.
- BULUT, Ş., ELIBOL, M. and OZER, D. 2004. Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*. 21:33-37.
- CARVALHO, J.C.M., VITOLO, M., SATO, S. and AQUARONE, E. 2003. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* Grown in Sugarcane Blackstrap Molasses Through a Fed-Batch Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 110: 151-164.
- CHISTI, Y. 2007. In Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook, vol. 2, Subramanian, G., editor, Wiley-VCH, New York, pp. 29–58. Strategies in downstream processing.
- CHOI, J.H., KIM, S.H. and MOON, S.H. 2002. Recovery of lactic acid from sodium lactate by ion substitution using ion-exchange mebrane. *Separation and Purification Technology*. 28:69-79.

- CRAIG, W.J. and NGUYEN, T.T.1984. Caffeine and Theobromine Levels in Cocoa and Carob Products. *J. of Food Sci.*, 49:302-305.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K.L. and FENNEMA, O.R. 2008. Fennema's Food Chemistry. CRC Pres, New York, pp 1119.
- DATTA, R., TSAI, S.P., BONSIGNOR, P., MOON, S. and FRANK, J.1995. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivates. *FEMS Microbiol Rev.* 16:221-231.
- DATTA, R. and HENRY, M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies- a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 81:1119-1129.
- DAVIDSON, B.E., LLANOS, R.M., CANCELLA, M.R., REDMAN, N.C. and HILLIER, A.J. 1995. Current Research on the Genetics of Lactic Acid Production in Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy Journal.* 5:763-784.
- DEMIRCI, A. and POMETTO III, A.L. 1995. Repeated-batch fermentation in biofilm reactors with plastic-composite supports for lactic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 585-589.
- DEMIRCI, A., POMETTO III, A.L. and HO, K-LG. 1997. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *Journal of Industrial Microbiology &Biotechnology.* 19, 299-304.
- DEVRES, Y.O. ve PALA, M., 1993. Gıda sanayinde matematiksel modellemenin önemi ve uygulama alanları. *Gıda*, 18,3:173-181.
- DORAN, P. 1995. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press, San Diego, pp 497.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, T., KAVUNCU, O. ve GÜRBÜZ, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistiksel Metotlar II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No: 1021, Ankara, 381ss.

- EJIOFOR, A.O., SOLOMON, B.O., POSTEN, C., DECKWER, W.D. 1994. Analysis of the Respiro-Fermentative Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Glucose in a Fed-Batch Fermentation Strategy for Accurate Parameter Estimation. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 41:664-669.
- EKŞİ, A. ve ARTIK, N.1986. Harnup (Keçiboynuzu) Meyvesi ve Pekmezinin Kimyasal Bileşimi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt 36. Fasikül 1. 77-82.
- EL-MANSI, E.M.T., BRYCE, C.F.A., DEMAİN, A.L. and ALLMAN, A.R. 2007. Fermentation Microbiology and Biotechnology. CRC Pres, New York, pp 525.
- EL-DIWANY, A.I., EL-REFAI, A.H., SALLAM, L.A. and ALLAM, R. 1992. Effect of Some Fermentation Parameters on Ethanol Production from Beet Molasses by *Saccharomyces cerevisiae* Y-7. *Bioresource Technology.*, 42: 191-195.
- EREN, İ. 2004. Patateslerin Osmotik Dehidrasyonunun “Response Surface” Metodu Kullanılarak Optimizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bil.Ens. (Yüksek Lisans Tezi), 120 sayfa.
- ERTUGAY, Z. ve CERTEL, M. 1995. Biyoteknoloji I. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu Yayın No:135, Erzurum.
- GAO, M.T., HIRATA, M., TOORISAKA, E. and HANO, T. 2006. Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. *Bioresource Technology.* 97:2414-2420.
- GIBBONS, W.R. and WESTBY, C.A. 1986. Effects of inoculums size on solid-phase fermentation of folder beets for ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 960-962.
- GILSON, C. D. and THOMAS, A.1995. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor. *J.Chem. Technol. Biotechnol.* 62: 38-45.
- GLAZER, A.N. and NIKAIDO, H. 2007. Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. Cambridge University Pres, New York, pp 541.

- GOKSUNGUR, Y. and ZORLU, N. 2001. Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor. *Turk J Biol.* 25:265-275.
- GOKSUNGUR, Y. and GUVENC, U. 1997. Batch and Continuous Production of Lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *J.Chem. Tech. Biotechnol.* 69:399-404.
- GRAVES, T., N.V., NARENDRANATH, K., DAWSON, and R., POWER. 2006. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 469-474.
- GUPTA, B., REVAGADE, N. and HILBORN, J. 2007. Poly (lactic acid) fiber: An overview. *Prog.Polym.Sci.* 32:455-482.
- GÜREL, Ö. 1996. Melastan fermentasyon yoluyla etanol elde edilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 11-12.
- HARRISON, R.G., TODD, P., RUDGE, S.R. and PETRIDES, D.P. 2003. Bioseparations science and engineering. Oxford University Pres, New York, pp 395.
- HERITAGE, J., EVANS, E.G.V. and KILLINGTON, R.A. 1999. Microbiology in Action. Cambridge University Pres, New York, pp 281.
- HERITAGE, J., EVANS, E.G.V. and KILLINGTON, R.A. 1996. Introductory Microbiology. Cambridge University Pres, New York, pp 227.
- HOFVENDAHL, K. and HAGERDAL, B.H. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology.* 26: 87-107.
- IMRIE, F.1973. The production of fungal protein from Carob in Cyprus. *J.Sci. Food Agric.*, 24:639.

- ISHIDA, N., SUZUKI, T., TOKUHIRO, K., NAGAMORI, E., ONISHI, T., SAITOH, S., KITAMOTO, K. and TAKANASHI, H. 2006. D-Lactic Acid Production by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2):172-177.
- JOHN, R.P., NAMPOOTHIRI, K.M. and PANDEY, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspective. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 74:524-534.
- KARIMI, K., EMTIAZI, G. and TAHERZADEH, M.J. 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 40:138-144.
- KARKACIER, M. ve ARTIK, N. 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) Fiziksel zellikleri, Kimyasal Bileşimi ve Ekstraksiyon Koşulları. *Gıda* 20(3): 131-136.
- KARKACIER, M., ARTIK, N. and CERTEL, M. 1995. The Conditions for Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Extraction and the Clarification of the Extract. *Fruit Processing*, 12:394-397.
- KARKACIER, M., POYRAZOĞLU, E.S., ARTIK, N. ve VELİOĞLU, S. 2000. Ekxtraction Kinetics of Mulberry (*Morus alba*). *Gıda*, 25(5):343-348.
- KING, R.D. and CHEETHAM, P.S.J. 1987. Food Biotechnology 1. Elsevier Applied Science, London, 321 pp.
- KUEHL, R.O. 2000. Design of experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis. Duxbury Press, California, pp 661.
- KUL, S. 2004. Cevap Yüzey Yöntemleri. Mersin Üniversitesi Sağlık Bil.Ens. (Yüksek Lisans Tezi), 89 sayfa.
- LAOPAIBOON, L., THANONKEO, P., JAISIL, P. and LAOPIBOON, P. 2007. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:1497-1501.

- LIEVENSE, J.C. and LIM, H.C. 1982. The growth and Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae*. Academic Press. 180 pp.
- LITCHFIELD, J.H. 1996. Microbiological production of lactic acid. *Adv.Appl.Microbiol.* 42:45-95.
- LIU, S., NICHOLS, N.N., DIEN, B.S. and COTTA, M.A. 2006. Metabolic engineering of a *Lactobacillus plantarum* double *Idh* knock strain for enhanced ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33:1-7.
- LYDERSEN, B.K., D'ELIA, N.A. and NELSON, K.L. 1994. Bioprocess Engineering: systems, equipment and facilities. A Wiley Interscience Publication, New Jersey, pp 785.
- MADIGAN, M.T. and MARTINKO, J.M. 2006. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall PTR, New Jersey, pp 989.
- MAZA, M.P., ZAMORA, R., ALAIZ, M., HIDALGO, F.J., MILLAN, F. and VIOQUE, E. 1989. Carob Bean Germ Seed (*Ceratonia siliqua* L.): Study of Oil and Proteins. *J.Sci. Food Agric.*, 4: 495-502.
- MENDES, A., GUERRA, P., MADEIRA, V., RUANO, F., DA SILVA, T.L. and REIS, A. 2007. Study of docosaheptaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World J Microbiol Biotechnol.* 23:1209-1215.
- MERVIN, M.L. 1981. The culture of Carob (*Ceratonia siliqua*) for food, fodder and fuel in semiarid environments. International Tree Crops Institute USA Inc., CA.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- MYERS, R.H. and MONTGOMERY, D.C. 1995. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, NY, Wiley.
- NARENDRANATH, N. V. and POWER, R. 2005. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and

- Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2239-43
- NAS. 1979. Tropical Legumes. Resources for the future, pp. 109-116. National Academy of Sciences, Washington DC, USA.
- NAVEENA, B.J. 2004. Amylolytic bacterial L(+) lactic acid production in solid state fermentation and molecular identification of the strain. Ph.D. Thesis, Osmania University, Hyderabad, India.
- NELSON, D.L. and COX, M.M. 2008. Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York, pp 1152.
- NOLASCO-HIPOLITO, C., MATSUNAKA, T., KOBAYASHI, G., SONOMOTO, K. and ISHIZAKI, A. 2002. Synchronised fresh cell bioreactor system for continuous L(+) lactic acid production using *Lactococcus lactis* IQ-1 in hydrolysed sago starch. *J.Biosci.Bioeng.* 93: 281-287.
- OHKOUCHI, Y. and INOUE, Y. 2006. Direct production of L (+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011. *Bioresource Technology*. 97:1554-1562.
- OH, H., WEE, Y.J., YUN, J.S., HAN, S.H., JUNG, S. and RYU, H.W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*. 96:1492-1498.
- OHASHI, R., YAMAMOTO, T. and SUZUKI, T. 1999. Continuous Production of Lactic Acid from Molasses by Perfusion Culture of *Lactobacillus lactis* Using a Stirred Ceramic Membrane Reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87(5):647-654.
- PANESAR, P.S., KENNEDY, J.F., GANDHI, D.H. and BUNKO, K. 2007. Bioutilization of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105:1-14.
- PEREPELKIN, K.E. 2002. Polylactide fibres: Fabrication, Properties, Use, Prospects. *Fibre Chemistry*. 34(2):85-100.

- PIMENTEL, D. and PATZEK, T.W. 2005. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*. 14(1),55-67.
- RAY, B. and BHUNIA, A. 2007. Fundamental Food Microbiology. CRC Press, New York, pp 475.
- RATLEDGE, C. and KRISTIANSEN, B. 2006. Basic Biotechnology. Cambridge University Press, New York, pp 657.
- ROUKAS, T., LAZARIDES, H. and KOTZEKIDOU, P. 1991. Ethanol production from deproteinized whey by *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in different immobilization matrices. *Milchwissenschaft*. 46(7): 438-441.
- ROUKAS, T. 1993. Ethanol production from Carob pods by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Biotechnology*, 7(2), 159-176.
- ROUKAS, T. 1994a. Kinetics of Ethanol Production from Carob Pods Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 44, 49-64.
- ROUKAS, T. 1994b. Continuous Ethanol Production from Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a Packed-Bed Reactor. *J.Chem. Tech. Biotechnol*. 59, 387-393.
- ROUKAS, T. 1996c. Ethanol production from Non-sterilized carob pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using feed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 43: 189-194.
- ROUKAS, T. 1995. Ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on the mineral kissiris. *Food Biotechnology*. 9(3): 175-188.
- ROUKAS, T. 1996a. Continuous Ethanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on Mineral Kissiris using a Two-Reactor System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 59, 299-307.

- ROUKAS, T. 1994b. Ethanol production from Non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using feed-batch culture. *Journal of Food Engineering*. Research Note. 27,87-96.
- ROUKAS, T. 1999. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 24:54-59.
- ROSEIRO JC, GIRIO FM, COLLACO MTA. 1991. Yield improvements in carob sugar extraction. *Process Biochem*. 26(3):179-182.
- RUENGRUGLIKIT, C. and HANG, Y.D. 2003. L (+)-Lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL-395. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*. 36:573-575.
- SABLANI, S.S., RAHMAN, M.S., DATTA, A.K. and MUJUMDAR, A.S. 2006. Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques. CRC Press, NY.
- SAHLE, M., COLEON, J. and HAAS, C.1992. Carob pod (*Ceratonia siliqua*) Meal in Geese Diets. *Brit.Poultry Sci.*, 33:531-541.
- SANTOS, M., RODRIGUES, A. And TEIXEIRA, J.A. 2005. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*. 25: 1-6.
- SEÇMEN, Ö. 1974. *Ceratonia siliqua* L.' nin Ekolojisi. *Bitki* 1 (4): 533-543. İzmir
- SEÇMEN, Ö. 1975. Studies In The Biosystematics of *Ceratonia siliqua* L. Proceedings of The Third MPP Meeting. İzmir. In Turkey.
- SEKERI-PATARYAS, K.H., MITRAKOS, K.A. and GEORGI, M.K.1973. Yields of fungal protein from Carob sugars.*Econ.Bot*. 27: 311-319.
- SINGH, S.K., AHMED, S.U. and PANDEY, A.2006. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry*. 41:991-1000.
- SCHÜGERL, K. 1997. Bioreaction Engineering. John Wiley and Sons, England, Volume 3, pp 463.

- SHARMA, S.K., KALRA, K.L. and GREWAL, H.S. 2002. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. *Bioresource Technology*, 85, 31-33.
- SHEN, X. and XIA, L. 2006. Lactic acid production from cellulosic waste by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii*. 22:1109-1114.
- SHETH, M., KUMAR, R.A., DAVE, V., GROSS, R.A. and MCCARTHY, S.P. 1997. Biodegradable Polymer Blends of Poly (lactic acid) and Poly (ethylene glycol). *Journal of Applied Polymer Science*. 66:1495-1507.
- SHULER, M.L. and KARGI, F. 2008. Bioprocess Engineering, Basic Concepts.. Prentice Hall PTR, New Jersey, pp 535.
- SMITH J.E. 2004. Biotechnology. Cambridge University Pres, New York, pp 284.
- SREENATH, H.K., MOLDES, A.B., KOEGEL, R.G. and STRAUB, R.J. 2001. Lactic acid production from agriculture residues. *Biotechnology Letters*. 23:179-184.
- STANBURY, P.F. and WHITAKER, A. 1984. Principles of Fermentation Technology. Academic Press. 247 pp.
- STANBURY, P. F., WHITAKER, A. And HALL, S.J. 1995. Principles of Fermentation Technology. Butterworth-Heinemann Press, Burlington, MA, pp 351.
- STRUBE, J., SOMMERFELD, S., and LOHRMANN, M. 2007. In Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook, vol. 1, Subramanian, G., editor, Wiley-VCH, New York, pp. 65–97. Processes Development and Optimization for Biotechnology Production.
- SUN, Y. and CHENG, J.2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*.83:1-11.
- TALEBNIA, F., NIKLASSON, C. and TAHERZADEH, M.J. 2005. Ethanol production from glucose and dilute-acid Hydrolyzates by Encapsulated *S.cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 90(3):345-353.

- TAHERZADEH, M.J., MILLATI, R. and NIKLASSON, C. 2001. Continuous Cultivation of dilute-acid Hydrolyzates to ethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 95:45-57.
- TAY, A. and YANG, S.T. 2001. Production of L(+)-Lactic acid from glucose and strach by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 80(1):1-12.
- TEKİN, H. 2009. Köftenin fizikokimyasal özellikleri üzerine buğday kepeği, yağ ve tuzun etkisinin yanıt yüzey yöntemiyle belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bil. Ens. (Yüksek Lisans Tezi), 118 sayfa.
- TUNAİL, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 448 S. ISBN 978-605-603-62-0-0.
- TURHAN, İ. ve KARHAN, M. 2004. Doğal bir ürün; Keçiboynuzu. *Dünya Gıda*. 12,76-79.
- TURHAN, I., TETİK, N., AKSU, M., KARHAN, M. and CERTEL M. 2006. Liquid-solid extraction of soluble solids and total phenolic compounds of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Food Process Engineering*. 29, 498-507.
- VARDAR, Y., SEÇMEN, Ö. ve ÖZTÜRK, M. 1980. Some Distributional Problems and Biological Characteristic of *Ceratonia* In Turkey. *Portuc. Acta Biol.*, (A) XVI (1-4): 75-86.
- VELJKOVIĆ, V.B., LAZIC, M.L. and STANKOVIC, M.Z. 2006. Repeated use of yeast biomass in ethanol fermentation of juniper berry sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(5):519-523.
- WAITES, M.J., MORGAN, N.L., ROCKEY, J.S. and HİGTON, G. 2001. Industrial Microbiology: An Introduction. Blackwell Science, Madlen, MA, pp 265.
- WASEWAR, K.L. 2005. Separation of lactic acid:Recent Advvances. *Chem.Biochem. Eng.* 19(2):159-172.

- WASEWAR, K.L. and PANGARKAR, V.G. 2006. Intensification of Recovery of Ethanol from Fermentation Broth Using Pervaporation: Economical Evaluation. *Chem. Bichem. Eng. Q.* 20(2):135-145.
- WEE, Y-J., KIM, J-N. and RYU, H-W.2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol.Biotechnol.* 44:163-172.
- WHITESIDE, L.1981. The carob cook book. Ed.Thorsons Publisher Limited, Wellingborough, Northamptonshire.
- WOICIECHOWSKI, A.L., NITSCHKE, S., PANDEY, A. and SOCOOL, C.R.2002. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. *Braz.Arch.Biol Technol.* 45:393-400.
- WUMPELMANN, M., KJAERGAARD, L., JORGENSEN, B.B. 1984. Ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae* under Aerobic Conditions at Different Potassium Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering.* 26:301-307.
- YAZICIOĞLU, T., ÖMEROĞLU, S. ve CERİTOĞLU, A. 1983. Keçiboynuzundan pekmez ve içki ispiertosu yapılması üzerinde bir araştırma. TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü. Yayın No:67.
- YOUSIF, A.K. and ALGHZAWI, H.M. 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry.* 69, 283–287.
- YU, J., ZHANG, X. and TAN, T. 2007. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol produtction. *Journal of Biotechnology.* 129:415-420.
- YURDAGEL, U. and TEKE, I. 1985. Research on colour changes of carob bean during roasting. *Gıda* 1, 39–42.
- ZHANG, Z.Y., JIN, B. and KELLY, J.M. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal.* 35(3):251-263.

7. EKLER

Ek-1. Alternatif azot kaynağı olarak kullanılan hammaddelerden tavuk eti tozu (a), tüy tozları (b), et ve kemik tozları (c) ve kabuk ve tırnak karışım tozları (d) ve kimyasal bileşimleri



a. Tavuk eti tozu

Ham Protein	: % 60
Yağ	: % 12
Ham lif	: % 2,5
Kül	: % 18
Nem	: % 4,5



b. Tüy tozları

Ham Protein	: % 80
Yağ	: % 6,5
Ham lif	: % 1,5
Kül	: % 4,5
Nem	: % 7,5



c. Et ve kemik tozları

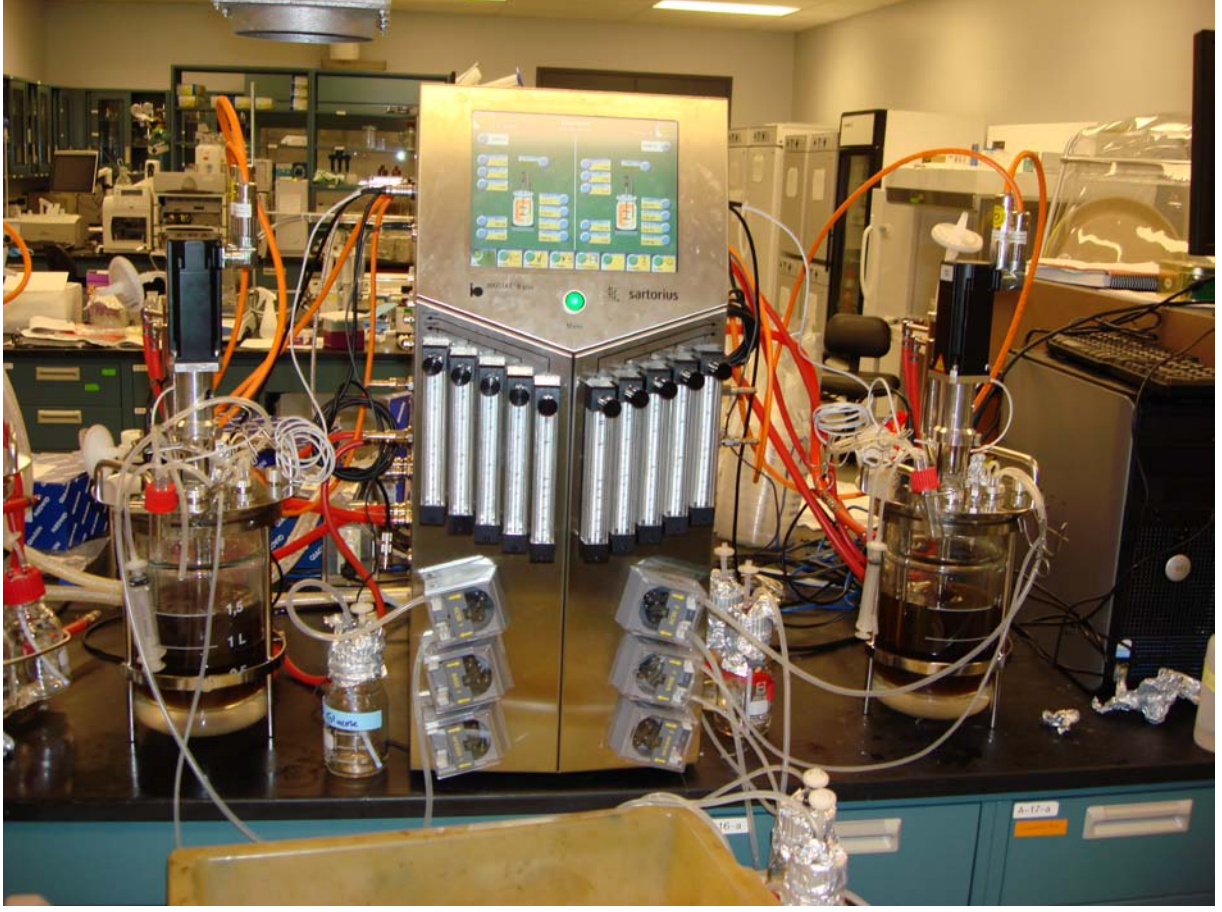
Ham Protein	: % 50
Yağ	: % 11
Ham lif	: % 2,5
Kül	: % 26
Nem	: % 4



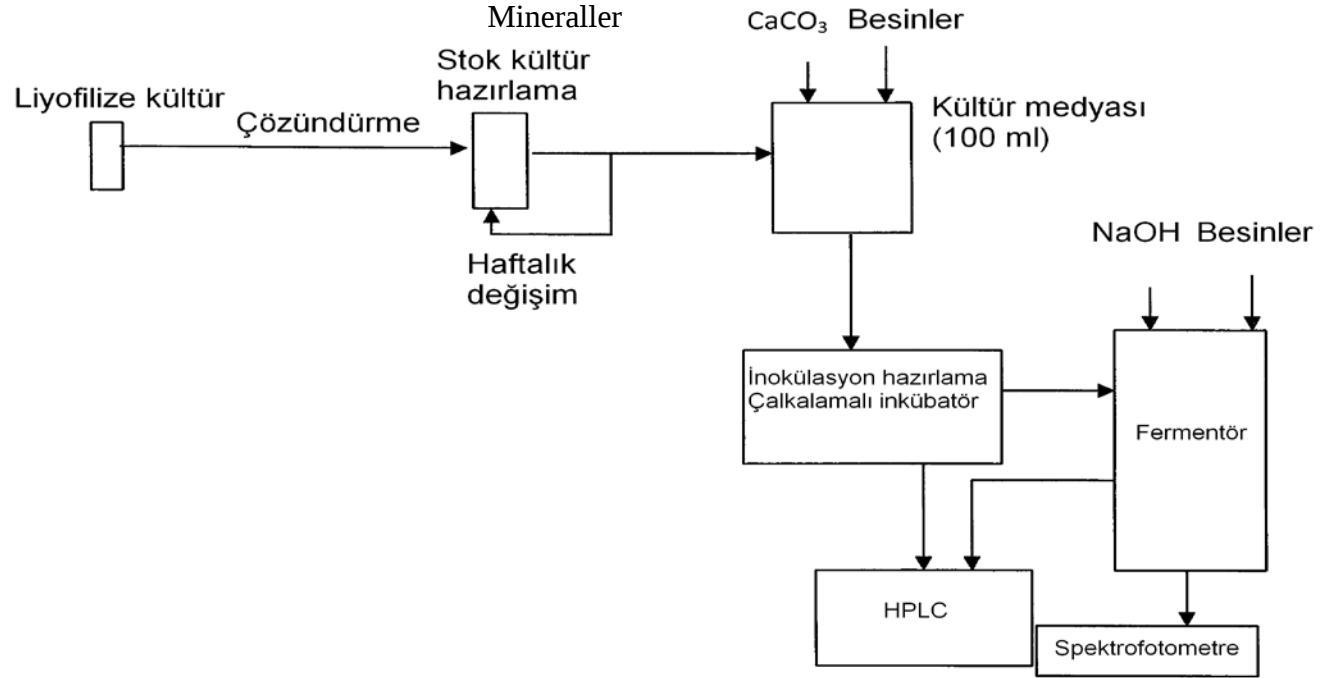
d. Kabuk ve tırnak karışım tozları

Ham Protein	: % 75
Yağ	: % 8
Ham lif	: % 4
Kül	: % 9
Nem	: % 4

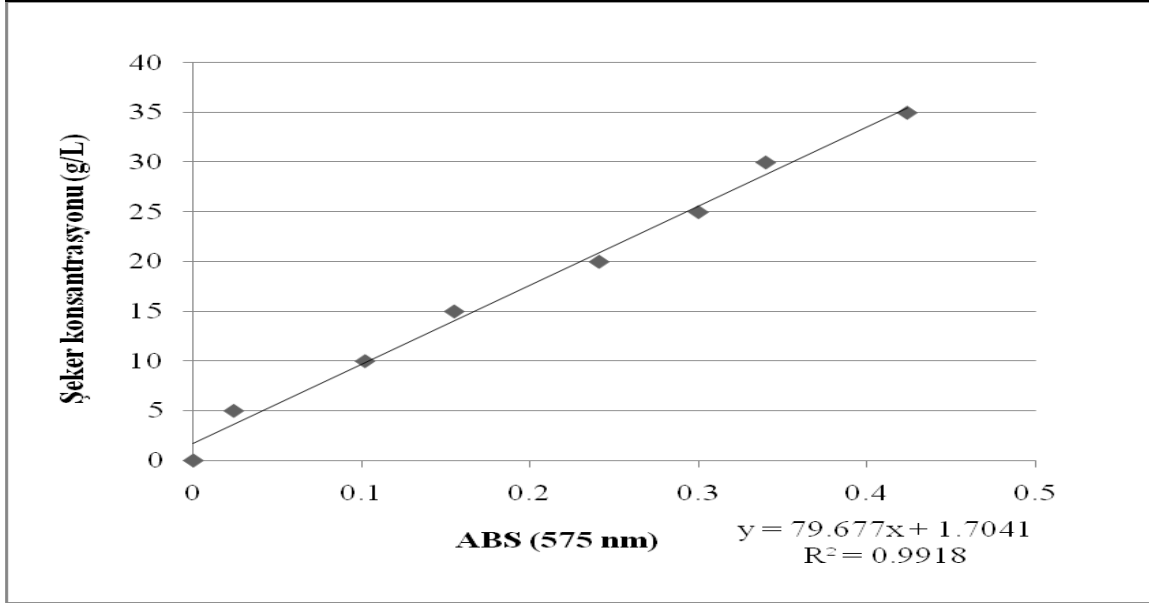
Ek-2. Fermentasyon işleminin gerçekleştiği biyoreaktörler



Ek-3. Etanol ve laktik asit fermentasyonlarında her üretim için gerçekleştirilen işlemler



EK-4. DNSA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen şeker analizlerinin spektrofotometreden alınmış değerlerle oluşturulan standart şeker çözeltilerine ait eğri ve değerleri (a), şeker konsantrasyonunun belirlendiği formül (b)



a. DNSA metodu ile şeker analiz için değerlendirme kurvesi

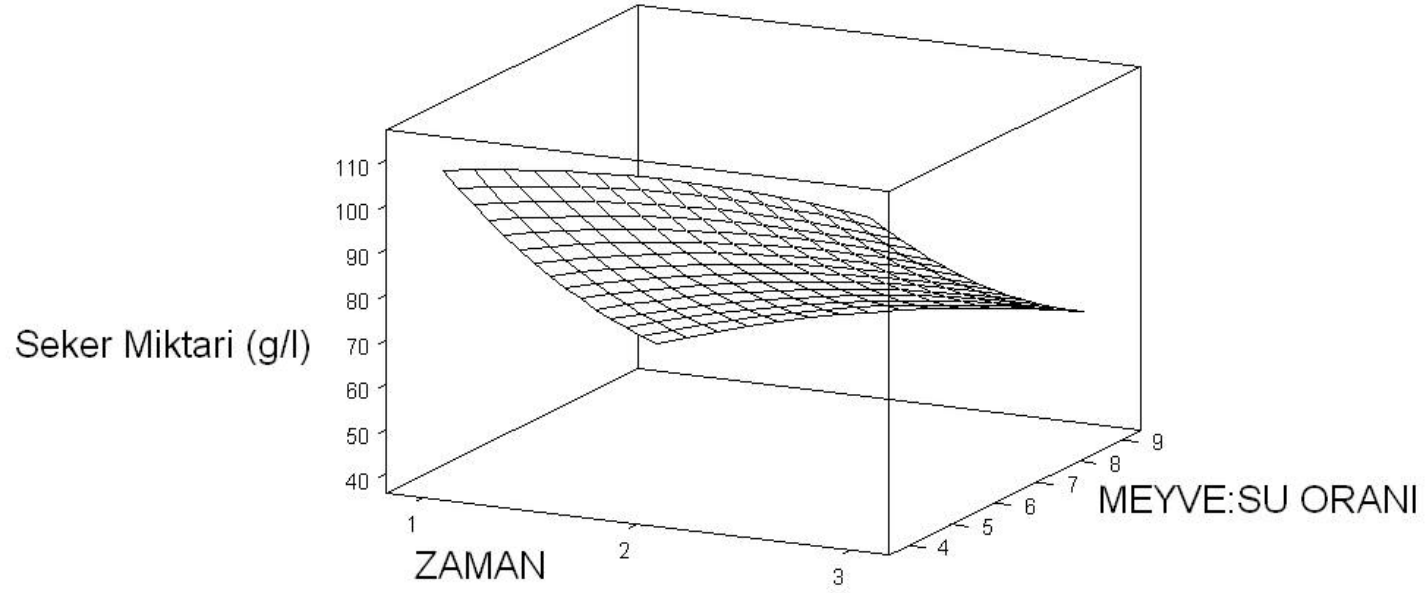
DNSA Kalibrasyon Kurvesi Verileri

Şeker konsantrasyonu (g/L)	ABS (575 nm)
0	0
5	0.024
10	0.102
15	0.155
20	0.241
25	0.300
30	0.340
35	0.424

b. Şeker konsantrasyonu = Hidrolize örneğin ABS(575 nm)*kalibrasyon kurvesinin eğimi

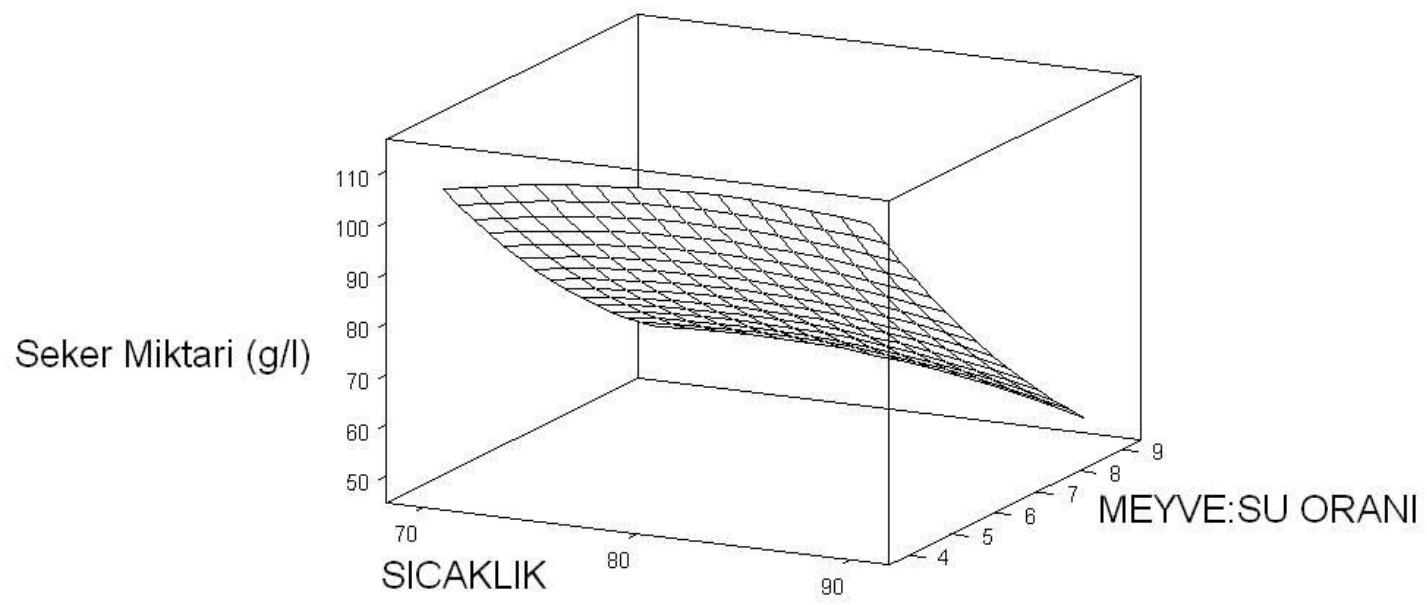
Ek-5. Cevap Yüzey Metodu Kontur Plot Grafikleri

- a. Sıcaklığın orta değerinde şeker konsantrasyonunun Zaman ve Meyve:Su Oranı'nın fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi



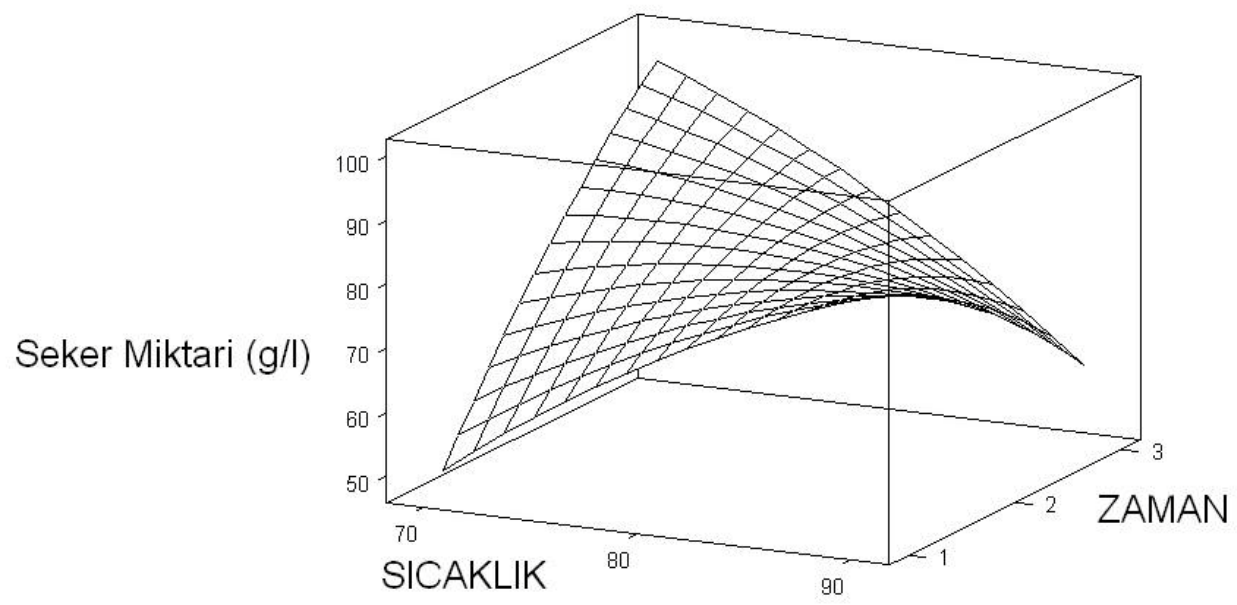
Sabit Deger: SICAKLIK: 80.0

b. Zamanın orta değerinde şeker konsantrasyonunun Sıcaklık ve Meyve:Su Oranı'nın fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi



Sabit Deger: ZAMAN: 2.0

c. Meyve:Su Oranının orta değerinde şeker konsantrasyonun Sıcaklık ve Zaman'ın fonksiyonu olarak üç boyutlu gösterimi



Sabit Deger: MEYVE:SU: 6.5

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İstanbul'da doğmuştur. İlköğrenimini Cağaloğlu Büyük Reşit Paşa İlköğretim Okulu ve İstanbul Ticaret Odası İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini İstanbul Mareşal Fevzi Çakmak İlköğretim Okulu ve Atışalanı Lisesi'nde tamamlamıştır. 2001 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden mezun olmuştur. Mezuniyetten bir yıl sonra Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrencisi olarak çalışmalarına başlamış, 2005 yılında aynı bölümde Doktora eğitime başlayarak, 2009 yılına kadar Araştırma Görevlisi olarak görev yaptığı bölümden aynı yıl Öğretim Görevlisi olarak Finike Meslek Yüksek Okulu'na atanmıştır.