

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YEMEKHANE ATIKLARINDAN POLİ (L-LAKTİK ASİT)'in ENZİMATİK
POLİMERİZASYONU VE SENTEZLENEN POLİMERİN
KARAKTERİZASYONU VE BİYOBOZUNDURULMASI**

**DOKTORA TEZİ
Didem OMA Y**

Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği

Programı: Kimya Mühendisliği

ŞUBAT 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YEMEKHANE ATIKLARINDAN POLİ (L- LAKTİK ASİT)'in ENZİMATİK
POLİMERİZASYONU VE SENTEZLENEN POLİMERİN
KARAKTERİZASYONU VE BİYOBOZUNDURULMASI**

DOKTORA TEZİ

Didem OMA Y

(506022005)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24 Eylül 2009

Tezin Savunulduğu Tarih : 19 Şubat 2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yüksel GÜVENİLİR (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Nuran DEVECİ AKSOY (İTÜ)
Prof. Dr. Ayşen ÖNEN (İTÜ)
Prof. Dr. Ersin SERHATLI (İTÜ)
Prof. Dr. Bülent GÜRLER (İÜ)

ŞUBAT 2010

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, İstanbul Teknik Üniversitesi Sağlık, Kültür ve Spor Daire Başkanlığı Yemek İşletmeleri'nden temin edilen yemekhane atıklarından fermantasyon yoluyla elde edilen laktik asitin enzimatik olarak polimerleştirilmesi sonucu sentezlenen polilaktik asitin karakterizasyonu ve biyobozunması incelenmiştir.

Çalışmalarım sırasında bilgi birikimini, tecrübelerini ve dostane desteğini esirgemeyen tez danışmanı hocam Prof. Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince, bilgilerini ve fikirlerini benimle paylaşan ve tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Nuran DEVECİ AKSOY ve Prof. Dr. Ayşen ÖNEN'e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca, Kim. Yük. Müh. Andelip AYDIN ve Kim. Yük. Müh. Çiğdem TAŞDELEN YÜCEDAĞ başta olmak üzere tüm Kimya Mühendisliği Anabilimdalı Araştırma Görevlilerine, Kimya-Metalurji Fakültesindeki çalışma arkadaşlarıma, hocalarıma ve tüm fakülte çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Bütün hayatım boyunca, ellerindeki tüm olanaklarla, verdiğim tüm kararlarda beni destekleyen, sevgilerini esirgemeyen aileme ve eşim Eray OMA Y'a sonsuz teşekkürler ederim.

Şubat 2010

Didem OMA Y
Kimya Yüksek Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Laktik Asit Hakkında Tarihçe	5
2.2 Laktik Asitin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	5
2.3 Laktik Asit Üretimi	8
2.3.1 Kimyasal sentez ile laktik asit üretimi	8
2.3.2 Fermantasyon ile laktik asit üretimi.....	9
2.3.2.1 Laktik asit fermantasyonunda kullanılan mikroorganizmalar.....	10
2.3.2.2 Laktik asit fermantasyonunda substrat seçimi.....	15
2.3.2.3 Laktik asit fermantasyonunun değişkenleri.....	19
2.4 Laktik Asidin Fermantasyon Sonrası Geri Kazanımı ve Saflaştırılması.....	20
2.5 Laktik Asidin Kullanım Alanları.....	23
2.6 Polilaktik Asit.....	25
2.6.1 PLA eldesinde kullanılan polimerizasyon yöntemleri	26
2.6.1.1 Enzimatik polimerizasyon.....	26
2.6.1.2 Düşük molekül ağırlıklı polimerlerin sentezi.....	28
2.6.1.3 Yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin sentezi.....	29
2.6.1.4 Halka açılması polimerizasyonu.....	28
2.6.2 Laktik asit polimerlerinin karakterizasyonu	30
2.6.2.1 Polimer kompozisyonunun belirlenmesi.....	30
2.6.2.2 Molekül ağırlığı tayini.....	31
2.6.2.3 Kristalinite ve erime noktası.....	32
2.6.2.4 Camsı geçiş sıcaklığı ve zincir hareketliliği	32
2.6.2.5 Mekanik Dayanıklılık.....	33
2.6.2.6 Çözünürlük.....	33
2.7 Biyobozunma ve Polimerler.....	34
2.7.1 Polimerlerin biyolojik bozunma mekanizmaları.....	36
2.8 Abiyotik Bozunma	37
2.8.1 Mekanik bozunma.....	37
2.8.2 Foto bozunma.....	37
2.8.3 Termal bozunma	37
2.8.4 Kimyasal bozunma.....	38
2.8.5 Enzimatik hidroliz.....	38

2.8.6 Enzimatik oksidasyon	39
2.8.7 Radikal oluşumuyla gerçekleşen oksidasyon	39
2.9 Enzimler	39
2.9.1 Proteazlar.....	40
2.9.2 Lipazlar.....	41
2.10 PLA'nın Bozunma Mekanizmaları.....	42
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	45
3.1 Materyal.....	45
3.2 Ekipmanlar	45
3.3 Metodlar	46
3.3.1 Laktik asit bakterilerinin hazırlanması	46
3.3.2 Yemekhane atıklarına uygulanan ön işlemler	47
3.3.3 Yemekhane atıklarının içeriklerinin belirlenmesi	48
3.3.3.1 Kuru madde ve yoğunluğu.....	48
3.3.3.2 Kül tayini.....	48
3.3.3.3 Azot tayini.....	48
3.3.3.4 Protein tayini.....	48
3.3.3.5 İndirgen şeker tayini.....	48
3.3.3.6 Toplam şeker tayini.....	49
3.3.4 Laktik asit tayini.....	49
3.3.5 pH ölçümü	49
3.3.6 Laktik asit bakterilerinin sayımı.....	49
3.3.7 Fermantasyonla laktik asit üretimi	49
3.3.8 Laktik asitin saflaştırılması	51
3.3.8.1 Laktik asitin saflaştırılması amacıyla kullanılan iyon değiştiricilerin hazırlanması.....	51
3.3.8.2 Laktik asit çözeltilerinin hazırlanması.....	51
3.3.8.3 Laktik asitin iyon değiştirici reçineler ile saflaştırılması.....	51
3.3.9 Fermantasyonla elde edilen laktik asitten düşük molekül ağırlıklı polilaktik asit sentezi	52
3.3.10 Dimer sentezi.....	52
3.3.11 Dimer ekstraksiyonu	52
3.3.12 Laktitten ve fermantasyonla elde edilen laktik asitten yüksek molekül ağırlıklı polilaktik asit eldesi	52
3.3.13 Biyobozundurma işlemine tabii tutulan PLLA filmlerinin hazırlanması	53
3.3.14 Polilaktik asitin termal olarak bozundurulması.....	53
3.3.15 Polilaktik asitin hidrolitik bozundurulması.....	53
3.3.15.1 Polilaktik asitin enzim katalizli hidrolitik bozundurulması.....	53
3.3.15.2 Polilaktik asitin fosfat tampon çözeltisi ile bozundurulması	54
3.3.16 Verim hesapları	54
4. DENEYSEL ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI VE TARTIŞMA	57
4.1 Hammadde.....	57
4.2 <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile Fermantasyon ile Laktik Asit Üretimi.....	59
4.2.1 Fermantasyon boyunca ortam pH değerinin değişiminin incelenmesi.....	59
4.2.2 <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine CaCO ₃ miktarının etkisi	61
4.2.3 <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum pH değerinin belirlenmesi.....	65
4.2.4 <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	68

4.2.5 <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum karıştırma hızı değerinin belirlenmesi	71
4.2.6 <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine başlangıç substrat konsantrasyonunun laktik asit üretimine etkisi	72
4.2.7 <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine aşı konsantrasyonunun etkisi	76
4.3 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile Fermantasyonla Laktik Asit Üretimi	79
4.3.1 Fermantasyon boyunca ortam pH değerinin değişiminin incelenmesi	79
4.3.2 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine CaCO_3 miktarının etkisi	82
4.3.3 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile fermantasyonla laktik asit üretiminde optimum pH değerinin belirlenmesi	83
4.3.4 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	87
4.3.5 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum karıştırma hızı değerinin belirlenmesi.....	90
4.3.6 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine başlangıç substrat konsantrasyonunun laktik asit üretimine etkisi	92
4.3.7 <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine aşı konsantrasyonunun etkisi	96
4.4 <i>Lactobacillus casei</i> ile Fermantasyonla Laktik Asit Üretimi.....	97
4.4.1 Fermantasyon boyunca ortam pH değerinin değişiminin incelenmesi	97
4.4.2 <i>Lactobacillus casei</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine CaCO_3 miktarının etkisi	100
4.4.3 <i>Lactobacillus casei</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum pH değerinin belirlenmesi	102
4.4.4 <i>Lactobacillus casei</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	104
4.4.5 <i>Lactobacillus casei</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum karıştırma hızı değerinin belirlenmesi.....	107
4.4.6 <i>Lactobacillus casei</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine başlangıç substrat konsantrasyonunun laktik asit üretimine etkisi	109
4.4.7 <i>Lactobacillus casei</i> ile fermantasyonla laktik asit üretimine aşı konsantrasyonunun etkisi	111
4.5 Fermantasyon ile Üretilen Laktik Asitin İyon Değiştirici Reçineler Kullanılarak Saflaştırılması	114
4.5.1 Amberlit IRA-400 kullanılarak fermantasyonla üretilen laktik asitin saflaştırılması	114
4.5.2 Amberlit IRA-400 reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine sıcaklığın etkisinin incelenmesi.....	119
4.5.3 Amberlit IRA-400 reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine pH'ın etkisinin incelenmesi	121
4.5.4 Dowex maraton WBA ile fermantasyon ile üretilen laktik asitin saflaştırılması	122
4.5.5 Dowex maraton WBA reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine sıcaklığın etkisinin incelenmesi.....	125
4.5.6 Dowex maraton WBA reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine pH'ın etkisinin incelenmesi	127

4.6 Düşük Molekül Ağırlıklı PLLA Sentezi ve Karakterizasyonu.....	129
4.6.1 Laktik asitten düşük molekül ağırlıklı polilaktik asit sentez reaksiyonunun kinetiğinin belirlenmesi.....	139
4.7 Dimer Sentezi.....	142
4.8 Enzim Katalizli Polimerizasyon Yöntemleri ile Yüksek Molekül Ağırlıklı PLLA Sentezi ve Karakterizasyonu	144
4.8.1 <i>Candida cylindracea</i> lipaz ile laktitten halka açılımı reaksiyonu ile PLLA sentezi.....	145
4.8.2 <i>Candida antarctica</i> lipaz B ile laktik asitten PLLA sentezi.....	154
4.8.3 <i>Candida antarctica</i> lipaz B ile laktitten halka açılımı reaksiyonu ile PLLA sentezi.....	164
4.8.4 <i>Candida rugosa</i> lipaz ile laktitten halka açılımı reaksiyonu ile PLLA sentezi.....	165
4.8.5 Sentezlenen poli(L-Laktik asit)'in yüzey morfolojisi ve termal geçişlerinin incelenmesi.....	167
4.9 Enzimatik Polimerizasyon Yöntemi ile Sentezlenen Polilaktik Asitin Bozundurulması.....	170
4.9.1 Polilaktik asitin termal olarak bozundurulması.....	170
4.9.2 Polilaktik asitin hidrolitik bozundurulması	177
4.9.2.1 Polilaktik asitin enzim katalizli hidrolitik bozundurulması.....	177
4.9.2.2 Polilaktik asitin enzimsiz olarak fosfat tampon çözeltisi ile bozundurulması.....	200
4.9.2.3 Hidrolitik bozunma kinetiği.....	206
5. GENEL DEĞERLENDİRMELER VE ÖNERİLER.....	209
KAYNAKLAR.....	221
ÖZGEÇMİŞ.....	243

KISALTMALAR

PLA	: Polilaktik asit
PLLA	: Poli(l-laktik asit)
LAB	: Laktik asit bakterileri
NAD	: Nikotinamit-adenindinükleotit
NADP	: Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
FAD	: Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
ATP	: Adenozin tri fosfat
DNS	: Dinitrosalisilik asit
ES	: Enzim substrat kompleks yapısı
LLA	: L-laktik asit
DDLA	: D,L-laktik asit
DLA	: D-laktik asit
CALB	: <i>Candida Antarctica</i> lipaz <i>B</i>
PLGA	: Polilaktik-glikolik asit
SER	: Serin grubu
HIS	: Histidin grubu
GLU	: Glikoz grubu
w/w	: Ağırlık/ağırlık
w/v	: Ağırlık/hacim
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
TGA	: Isıl gravimetrik analiz
XRD	: X-ışınları kırınımı
FTIR	: Fourier- transform kızıl ötesi spektrumu
SEM	: Taramalı electron mikroskobu
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
DTG	: Diferansiyel termogravimetrik analiz
M_n	: Sayıca ortalama molekül ağırlığı
M_w	: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
%ΔW_t	: Molekül ağırlığı kaybı
W₀	: Polimerin başlangıçtaki molekül ağırlığı
W_t	: Bozunma ürününün molekül ağırlığı
A_c	: Kristalin faz alanı
A_a	: Amorf faz alanı

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Laktik asitin fiziksel özellikleri.....	7
Çizelge 2.2 : Lactobacilluslar'ın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	11
Çizelge 2.3 : Enzim aktivitesine çözücü etkisi.....	27
Çizelge 2.4 : Mark- Houwink eşitliğindeki K ve a sabitleri.....	32
Çizelge 2.5 : Bazı laktik asit polimerlerinin Tg, Tm ve kristalinite değerleri.	32
Çizelge 2.6 : Laktik/Glukolik asit polimerleri için çözünürlük parametreleri	33
Çizelge 3.1 : MRS besiyeri içeriği.....	46
Çizelge 3.2 : Laktik asit üretiminde kullanılan ortam kompozisyonu.....	50
Çizelge 4.1 : Fermantasyon ortamlarının kimyasal bileşimi.....	57
Çizelge 4.2 : Doğrudan polikondenzasyonla elde edilen düşük molekül ağırlıklı polilaktik asitin farklı sürelerde, molekül ağırlığı, dispersite, dönüşüm değerleri (180°C).....	134
Çizelge 4.3 : Doğrudan polikondenzasyonla elde edilen düşük molekül ağırlıklı polilaktik asitin farklı süre ve sıcaklıklarda, molekül ağırlığı, dispersite, dönüşüm değerleri (200°C).....	135
Çizelge 4.4 : 180°C'de yapılan doğrudan polikondenzasyon reaksiyonuna ait dönüşüm değerleri.....	139
Çizelge 4.5 : 200°C'de yapılan doğrudan polikondenzasyon reaksiyonuna ait dönüşüm değerleri.....	141
Çizelge 4.6 : Polilaktik asidin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%2 <i>Candida cylindracea</i> lipaz, 80°C).....	149
Çizelge 4.7 : Polilaktik asidin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%2 <i>Candida cylindracea</i> lipaz, 100°C).....	150
Çizelge 4.8 : Polilaktik asidin ortalama molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%4 <i>Candida cylindracea</i> lipaz, 80°C).....	151
Çizelge 4.9 : Polilaktik asidin ortalama molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%4 <i>Candida cylindracea</i> lipaz, 100°C).....	151
Çizelge 4.10: Polilaktik asidin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%10 <i>Candida antarctica</i> lipaz B, 80°C).....	157
Çizelge 4.11: Polilaktik asidin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%30 <i>Candida antarctica</i> lipaz B, 80°C).....	160
Çizelge 4.12: Polilaktik asidin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%40 <i>Candida antarctica</i> lipaz B, 80°C).....	161
Çizelge 4.13: Polilaktik asidin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%30 <i>Candida antarctica</i> lipaz B, 60°C).....	162
Çizelge 4.14: Polilaktik asitin molekül ağırlığı üzerine sürenin etkisi (%3 <i>Candida rugosa</i> lipaz, 70°C).....	166

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Laktik asitin L ve D form optik izomerleri.....	6
Şekil 2.2 : Glikoz disimilasyonu ile Embden Meyerhof fermentasyon yolu.....	12
Şekil 2.3 : Laktik asit fermentasyonu.....	12
Şekil 2.4 : <i>R.oryzae</i> ' de organik asit sentezinin kritik yolu.....	15
Şekil 2.5 : Vion, Kumar ve Kissel tarafından öne sürülen halka açılımı reaksiyon mekanizması.....	29
Şekil 2.6 : Kricheldorf ve Dunsing tarafından öne sürülen halka açılımı reaksiyon mekanizması.....	30
Şekil 2.7 : Laktat stereoizomerleri (a) D-laktat (b) L-laktat (c) mesolaktat (d) D,L-laktat.....	30
Şekil 3.1 : Yemekhane atıklarına uygulanan ön işlemler.....	47
Şekil 4.1 : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile makarna-süt karışımından laktik asiteldesinde ortam pH'ının değişimi.....	59
Şekil 4.2 : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile pilav-bezelye-salata karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'ının değişimi.....	60
Şekil 4.3 : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile farklı ortamlarda fermentasyonla laktik asit üretimine CaCO ₃ miktarının etkisi...	63
Şekil 4.4 : Farklı pH değerlerinde <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile makarna-süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	66
Şekil 4.5 : Farklı pH değerlerinde <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile pilav-bezelye salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	66
Şekil 4.6 : Farklı sıcaklıklarda <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile makana- süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	68
Şekil 4.7 : Farklı sıcaklıklarda <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile pilav-bezelye- salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	70
Şekil 4.8 : Farklı karıştırma hızlarında <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile makarna süt ve pilav- bezelye- salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	71
Şekil 4.9 : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile makana- süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.....	73
Şekil 4.10 : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> pilav-bezelye-salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.....	74
Şekil 4.11 : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ile farklı fermentasyon ortamlarında laktik asit üretiminde değişik aşı konsantrasyonlarının etkisi.....	77

Şekil 4.12	: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile makarna-süt karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'ının değişimi.....	80
Şekil 4.13	: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile pilav-bezelye-salata karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'ının değişimi.....	80
Şekil 4.14	: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile farklı ortamlarda fermentasyonla laktik asit üretimine CaCO ₃ miktarının etkisi.....	82
Şekil 4.15	: Farklı pH değerlerinde <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile makarna-süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	83
Şekil 4.16	: Farklı pH değerlerinde <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile pilav-bezelye salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	85
Şekil 4.17	: Farklı sıcaklıklarda <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile makana-süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	87
Şekil 4.18	: Farklı sıcaklıklarda <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile pilav-bezelye-salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	89
Şekil 4.19	: Farklı karıştırma hızlarında <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile makarna süt ve pilav- bezelye- salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	91
Şekil 4.20	: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile makana- süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.....	93
Şekil 4.21	: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile pilav-bezelye-salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.....	94
Şekil 4.22	: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ile farklı fermentasyon ortamlarında laktik asit üretiminde değişik aşı konsantrasyonlarının etkisi....	96
Şekil 4.23	: <i>Lactobacillus casei</i> ile makarna-süt karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'ının değişimi.....	98
Şekil 4.24	: <i>Lactobacillus casei</i> ile pilav-bezelye-salata karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'ının değişimi.....	99
Şekil 4.25	: <i>Lactobacillus casei</i> ile farklı ortamlarda fermentasyonla laktik asit üretimine CaCO ₃ miktarının etkisi.....	100
Şekil 4.26	: Farklı pH değerlerinde <i>Lactobacillus casei</i> ile makarna-süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	102
Şekil 4.27	: Değişik pH değerlerinde <i>Lactobacillus casei</i> ile pilav-bezelye salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.	103
Şekil 4.28	: Farklı sıcaklıklarda <i>Lactobacillus casei</i> ile makana- süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	105
Şekil 4.29	: Farklı sıcaklıklarda <i>Lactobacillus casei</i> ile pilav- bezelye-salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	106
Şekil 4.30	: Farklı karıştırma hızlarında <i>Lactobacillus casei</i> ile makarna süt ve pilav- bezelye- salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.....	107
Şekil 4.31	: <i>Lactobacillus casei</i> ile makana- süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.....	110
Şekil 4.32	: <i>Lactobacillus casei</i> pilav-bezelye-salata fermentasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.....	111
Şekil 4.33	: <i>Lactobacillus casei</i> ile farklı fermentasyon ortamlarında laktik asit üretiminde değişik aşı konsantrasyonlarının etkisi....	112

Şekil 4.34	: Standart laktik asit çözeltisinden Amberlit IRA-400 ile saflaştırılan laktik asit miktarları.....	115
Şekil 4.35	: Fermantasyon ile üretilen laktik asit çözeltisinden Amberlit IRA-400 ile saflaştırılan laktik asit miktarları.....	116
Şekil 4.36	: Belirli sürede Amberlit IRA-400 ile saflaştırılan laktik asit miktarlarının karşılaştırılması.....	118
Şekil 4.37	: Amberlit IRA-400 reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine sıcaklığın etkisinin incelenmesi (30°C).....	120
Şekil 4.38	: Amberlit IRA-400 reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine sıcaklığın etkisinin incelenmesi (40°C).....	120
Şekil 4.39	: Amberlit IRA-400 reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine pH etkisinin incelenmesi.....	122
Şekil 4.40	: Standart laktik asit çözeltisinden Dowex maraton WBA ile saflaştırılan laktik asit miktarları.....	123
Şekil 4.41	: Fermantasyon ile üretilen laktik asit çözeltisinden Dowex maraton WBA ile saflaştırılan laktik asit miktarları.....	124
Şekil 4.42	: Belirli sürede Dowex maraton WBA ile saflaştırılan laktik asit miktarlarının karşılaştırılması.....	124
Şekil 4.43	: Dowex maraton WBA reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine sıcaklığın etkisinin incelenmesi (30°C).....	126
Şekil 4.44	: Dowex maraton WBA reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine sıcaklığın etkisinin incelenmesi (40°C).....	127
Şekil 4.45	: Dowex maraton WBA reçinesi kullanılarak laktik asitin saflaştırılması işlemine pH'nın etkisinin incelenmesi.....	128
Şekil 4.46	: Laktik asitten düşük molekül ağırlıklı PLA sentez adımları.....	129
Şekil 4.47	: Düşük molekül ağırlıklı PLLA'ya ait FTIR spektrumları.....	130
Şekil 4.48	: PLLA'ya ait ¹³ C NMR spektrumları.....	131
Şekil 4.49	: Doğrudan polikondenzasyon reaksiyonu ile PLLA eldesine sıcaklık ve sürenin etkisi.....	132
Şekil 4.50	: Farklı reaksiyon sıcaklık ve sürelerinde sentezlenen PLLA'nın GPC eğileri.....	136
Şekil 4.51	: Poliesterleştirme tepkimesi için t ile $1/(1-p)^2$ ilişkisi (180°C)....	141
Şekil 4.52	: Poliesterleştirme tepkimesi için t ile $1/(1-p)^2$ ilişkisi (200°C)....	142
Şekil 4.53	: Laktite ait FTIR spektrumu.....	143
Şekil 4.54	: Halka açılımı polimerizasyon yöntemi ile PLLA sentez adımları.....	145
Şekil 4.55	: Yüksek molekül ağırlıklı PLLA'ya ait FTIR spektrumları.....	146
Şekil 4.56	: PLLA'ya ait ¹ H NMR spektrumları.....	148
Şekil 4.57	: Yüksek molekül ağırlıklı PLLA'ya ait FTIR spektrumları.....	155
Şekil 4.58	: PLLA'ya ait ¹ H NMR spektrumları.....	156
Şekil 4.59	: Sentezlenen PLLA'ya ait DSC termogramı.....	168
Şekil 4.60	: Sentezlenen PLLA'ya ait XRD desenleri.....	169
Şekil 4.61	: PLLA'ya ait termogravimetrik analiz sonucu.....	171
Şekil 4.62	: PLLA'nın termal bozunmasına ait Friedman grafiği.....	172
Şekil 4.63	: PLLA'nın zamana bağlı olarak termal bozunma grafiği.....	173

Şekil 4.64	: PLLA'nın %20 molekül ağırlığı kaybı için $\ln t$ değerine 1000/T grafiği.....	174
Şekil 4.65	: PLLA'nın % 40 molekül ağırlığı kaybı için $\ln t$ değerine 1000/T grafiği.....	175
Şekil 4.66	: PLLA'nın % 60 molekül ağırlığı kaybı için $\ln t$ değerine 1000/T grafiği.....	175
Şekil 4.67	: Proteaz DSM- Polilaktik asit bozunma mekanizması.....	178
Şekil 4.68	: PLLA ile Proteaz DSM ile bozunma ürününe ait FTIR analiz sonucunun karşılaştırılması.....	179
Şekil 4.69	: Proteaz DSM ile gerçekleştirilen bozunma süreci boyunca meydana gelen molekül ağırlığı kaybı grafiği.....	181
Şekil 4.70	: PLA ile Proteaz DSM bozundurma ürününe ait karşılaştırmalı XRD desenleri.....	183
Şekil 4.71	: Proteaz DSM ile gerçekleştirilen bozunma işleminde DSC desenleri.....	185
Şekil 4.72	: SEM analizi a) 350 kat büyütme b) 1000 kat büyütme.....	186
Şekil 4.73	: PLA ile Pellucit FS proteaz ile bozunma ürününe ait FTIR analiz sonucunun karşılaştırılması.....	188
Şekil 4.74	: Pellucit FS Proteaz ile gerçekleştirilen bozunma süreci boyunca meydana gelen molekül ağırlığı kaybı sonucu.....	190
Şekil 4.75	: PLA ile Pellucit FS Proteaz bozundurma ürününe ait karşılaştırmalı XRD desenleri.....	191
Şekil 4.76	: Proteaz Pellucit FS ile gerçekleştirilen bozunma işleminde DSC desenleri.....	192
Şekil 4.77	: SEM analizi a) 350 kat büyütme b) 1000 kat büyütme.....	192
Şekil 4.78	: Lipaz PLA bozunma mekanizması.....	193
Şekil 4.79	: McIlvaine tampon çözeltisi numunesi ile bozunma sonucu oluşan pikin, PLA piki ile karşılaştırılması.....	194
Şekil 4.80	: McIlvane çözeltisi ile gerçekleştirilen bozunma süreci boyunca meydana gelen molekül ağırlığı kaybı sonucu.....	195
Şekil 4.81	: Mc Ilvaine çözeltisi ile yapılan bozunurma işlemine ait XRD desenleri.....	196
Şekli 4.82	: Mc Ilvane çözeltisi ile gerçekleştirilen bozunma işlemine ait DSC desenleri.....	197
Şekil 4.83	: Proteaz DSM ile gerçekleştirilen bozundurma işlemine ait kinetik çalışma.....	199
Şekil 4.84	: Proteaz FS ile gerçekleştirilen bozundurma işlemine ait kinetik çalışma.....	199
Şekil 4.85	: PLA'nın hidrolitik bozunma adımı.....	200
Şekil 4.86	: PLA ile hidrolitik bozunma ürününe ait FTIR analiz sonucunu	201
Şekil 4.87	: Hidrolitik bozunma süreci boyunca meydana gelen molekül ağırlığı kaybı sonucu.....	202
Şekil 4.88	: PLA'nın hidrolitik bozunma ürününe ait karşılaştırmalı XRD desenleri.....	203
Şekil 4.89	: Hidrolitik bozunma ürününe ait DSC desenleri.....	205
Şekil 4.90	: SEM analizi a) 350 kat büyütme b) 1000 kat büyütme.....	205
Şekil 4.91	: Hidrolitik bozundurma işlemine ait $\ln(Mn)$ süre grafiği.....	207

YEMEKHANE ATIKLARINDAN POLİ (L(+)) LAKTİK ASİT'in ENZİMATİK POLİMERİZASYONU VE SENTEZLENEN POLİMERİN KARAKTERİZASYONU VE BİYOBOZUNDURULMASI

ÖZET

Sunulan tez çalışmasında, yemekhane atıklarından fermantasyon yoluyla L(+) laktik asit üretilmiş ve laktoferment prosesi optimize edilerek en yüksek konsantrasyonda laktik asit üretimine imkan veren koşullar tespit edilmiştir. L(+) laktik asit çözeltisi, Amberlit IRA 400 ve Dowex maraton WBA reçineleri kullanılarak iyon değişimi yöntemi ile fermantasyon ortamından saflaştırılmış ve optimum koşullar belirlenmiştir. Elde edilen L(+) laktik asitten katalizör kullanmaksızın doğrudan polikondenzasyon yöntemi ile düşük molekül ağırlıklı poli (L(+)) laktik asit sentezlenmiştir. Laktik asit, oligomer zincirinin katalitik olarak kırılması ve orijinal yapısındaki asit katalizörlüğünde siklik bir hal alması prensiplerine dayanarak dimer haline dönüştürülmüştür. Sentezlenen dimer ve fermantasyon sonucunda elde edilen laktik asit kullanılarak enzimatik polimerizasyon yöntemi ile yüksek molekül ağırlıklı poli(L(+)) laktik asit üretilmiştir. Bu yöntemde, *Candida cylindracea* lipaz, *Candida antarctica* lipaz ve *Candida rugosa* lipaz enzimleri kullanılmış ve enzim konsantrasyonu, sıcaklık ve süre gibi parametrelerin polimerizasyon mekanizmalarına etkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Üretilen yüksek molekül ağırlıklı polimer farklı koşullar altında bozundurulmuş bozunma mekanizmaları irdelenmiştir.

Bu tezde ön işlem uygulanmış makarna-süt ve pilav-bezelye-salata besiyerlerinden *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus casei* bakterileri ile laktik asit üretiminde kesikli sistem için bazı proses değişkenleri optimize edilmiştir. *Lactococcus lactis* kültürü ile yapılan fermantasyonda kullanılan her iki besiyeri için de, pH değerinin 6.0, sıcaklığın 37°C, karıştırma hızının 120 rpm ve aşı konsantrasyonunun %4 olduğu durumda, en yüksek laktik asit verimi elde edilirken, *Lactobacillus bulgaricus* için bu değerler pH 6.0, sıcaklık 45°C, karıştırma hızı 120 rpm ve aşı konsantrasyonu %4 olarak saptanmıştır. *Lactobacillus casei* kültürü ile laktik asit fermantasyonuna ilişkin optimizasyon çalışmaları verilerinden, pH değeri 6.0, fermantasyon sıcaklığı 45°C, karıştırma hızı 160 rpm ve aşı konsantrasyonu %10 olduğu durumda maksimum miktarda laktik asit elde edilmiştir.

Fermantasyon ortamlarından saflaştırılan L(+) laktik asit monomerinden, doğrudan polikondenzasyon yöntemi ile 200°C'de yapılan 24 saatlik polimerizasyon sonunda 3550 g.mol⁻¹ molekül ağırlıklı polimer elde edilerek, polimerizasyon reaksiyonu optimize edilmiş ve sistemin kinetik parametreleri belirlenmiştir.

Candida cylindracea lipaz, *Candida antarctica* lipaz B ve *Candida rugosa* lipaz katalizörlüğünde 168 saatlik enzimatik polimerizasyon işlemi ile, sırasıyla, 69800, 76000 ve 4260 g.mol⁻¹ molekül ağırlıklarına sahip yüksek molekül ağırlıklı poli(L(+)) laktik asit) üretilmiştir.

Sunulan tezin degradasyon kısmında, poli(L(+)) laktik asit) farklı koşullar altında bozundurulmuştur. Polimerin termal olarak bozundurulması 303 ve 386°C olmak

üzere iki farklı sıcaklık değeriinde meydana gelmektedir ve bu bozunmaya ait aktivasyon enerjisi 26 kJ.mol^{-1} olarak tespit edilmiştir. Proteaz DSM, proteaz pellucit FS, *Candida rugosa* lipaz katalizörlüğünde ve enzimsiz olarak fosfat tamponda yapılan hidrolitik bozundurma proseslerinde belirgin molekül ağırlığı kayıpları tespit edilmiş ve yapılan tüm bozundurma işlemlerinin kinetik parametreleri belirlenmiştir.

CHARACTERIZATION AND ENZYMATIC POLYMERIZATION OF POLY(L(+)) LACTIC ACID) FROM REFECTORY WASTE AND ITS BIODEGRADATION

SUMMARY

In this thesis, L(+) lactic acid was produced from refectory wastes through fermentation process. Convenient conditions were optimized for the production of the highest lactic acid yield. L(+) lactic acid solution was purified from fermentation medium by ion exchange method using the Amberlit IRA 400 and Dowex maraton WBA resins. Optimum process conditions were also determined. Low molecular weight poly(L(+) lactic acid) was synthesized by uncatalyzed direct polycondensation reaction. Lactic acid was converted to cyclic dimer according to the principles of the catalytic cleavage of oligomer chains. High molecular weight poly(L(+) lactic acid) was synthesized by enzymatic polymerization using the lactide and lactic acid obtained from the fermentation. Enzymatic polymerization was performed with *Candida cylindracea* lipase, *Candida antarctica* lipase and *Candida rugosa* lipase enzymes and the effect of enzyme concentration, temperature and time parameters on polymerization mechanisms were investigated in detail. High molecular weight polymer was degraded under different conditions. Then degradation mechanisms were examined.

Process variables for batch system were optimized for the production of lactic acid from pretreated macaroni-milk and rice-green pea-salad broths by *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* cultures.

For the fermentation performed with *Lactococcus lactis* culture, the highest lactic acid yield was obtained when medium pH was set to 6.0, temperature was held at 37°C, agitated at 120 rpm and with 4% (v/v) inoculation ratio. Additionally, for *Lactobacillus bulgaricus*, the maximum lactic acid yield was obtained when medium pH was 6.0, temperature was 45°C, agitation rate was 120 rpm and with 4% (v/v) inoculation ratio. Moreover, for *Lactobacillus casei*, the highest lactic acid yield was achieved at the process conditions: pH 6.0, 45°C temperature, 160 rpm agitation rate and 10% (v/v) inoculation ratio.

The maximum poly(L(+) lactic acid) molecular weight was 3550 g.mol⁻¹ at 200°C after 24 hours under vacuum through direct polycondensation by using L(+) lactic acid monomer purified from fermentation medium.

The highest molecular weight of the polymers were obtained as 69800, 76000 and 4260 g.mol⁻¹ via lipase catalyzed polymerizations of L-lactide and lactic acid with *Candida cylindracea* lipase, *Candida antarctica* lipase and *Candida rugosa* lipase enzymes respectively after 168 hours.

At the last stage of this thesis, synthesized poly(L(+) lactic acid) was degraded under different conditions. Thermal degradation of the polymer occurred at the temperatures of 303 and 386°C, and the activation energy of the degradation process was 26

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Hydrolytic degradation in protease DSM, protease pellicit FS and *Candida rugosa* lipase enzymes as well as phosphate buffer without enzyme caused significant molecular weight loss. Following this, kinetic parameters of all the degradation processes were investigated.

1. GİRİŞ

Biyoteknolojinin gelişimine paralel olarak fermentasyon ile organik ve biyokimyasal maddelerin üretimi çağımız teknolojisinin en güncel konuları arasında yer almaktadır. Çeşitli sanayi dallarında geniş kullanım alanları bulunan organik çözücüler, antibiyotikler ve enzimler gibi pekçok kimyasal madde, mikroorganizmaların kullanıldığı fermentasyon işlemleriyle üretilir. Sitrik asit, laktik asit, fumarik asit, malik asit ve salisilik asit gibi besin, ilaç, kimya, tekstil, plastik, kozmetik ve kağıt endüstrilerinde kullanılan birçok organik asit de fermentasyon yolu ile üretilmektedir.

Günümüzde biyoteknolojinin sürekli yeni arayışlar ve mevcut prosesleri geliştirme çabası içersinde olması nedeniyle fermentasyon yoluyla yapılan üretimler de hızlanmıştır. Endüstriyel üretimde, fermentasyonda seçilecek besiyeri ve bileşenleri, üretimi önemli ölçüde etkilemektedir. Melas, pirinç kabuğu, buğday kepeği, sebze ve meyve atıkları gibi ekonomik değeri düşük ancak mikroorganizmalar için karbon kaynağı bakımından zengin olan maddeler fermentasyon prosesleri için çok avantajlıdır. Bunların yanında karbon kaynağı olarak kullanılan birçok ham ve atık madde mikroorganizmaların yaşamaları için gerekli enerji ve besini sağlarken, çeşitli kentsel, tarımsal ve endüstriyel atıkların bu amaçla kullanılması ile bir yandan da çevre kirliliğinin önlenmesine yardımcı olacaktır.

Dünyadaki toplam laktik asit üretiminin %90'ı bakteriyel fermentasyonla, geri kalan %10'luk oranı ise sentetik olarak laktonitrilin hidrolizinden üretilmektedir. Fermentatif üretimde, izomerlerden sadece birini üreten laktik asit bakteri nesli seçildiğinde optikçe saf ürün elde edilebilirken, sentetik üretimde ise her zaman laktik asidin rasemik karışımının elde edilmesi önemli bir dezavantajdır.

Fermentasyon kaynağı olarak ucuz karbonhidratların seçilmesi, fermentasyon proseslerinin kimyasal sentez prosesleriyle rekabetinde bir adım daha öne geçmesini sağlayacaktır.

Süt ürünleri ve yağlı tohumlar, alkollü ve alkolsüz içecekler, sebze ve meyveler, et ve balık ürünleri, hububat bazlı ürünler fermentasyon işlemlerinde kullanılabilen hammaddelerden bazılarıdır. Dünya çapında son derece yaygın olan bu ürün yelpazesi dünya gıda tüketiminin 1/3'ünü oluşturmaktadır. Fermentasyonun, toksik maddelerin azaltılması, istenmeyen bileşiklerin yok edilmesi, biyolojik olarak gıdanın amino asit, yağ ve vitaminle zenginleştirilerek besin değerinin artırılması, gıdalara yapı ve aroma kazandırılması, görünümünün iyileştirilmesi ve daha güvenli bir ürün oluşturulması gibi avantajları da bulunmaktadır.

Son yıllarda çevre duyarlılığının artması nedeniyle biyolojik olarak parçalanabilen materyallerin üretimi önem kazanmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilir plastiğin (polilaktik asit) başlangıç maddesini oluşturan laktik asidin, düşük maliyetli üretim proseslerinin bulunması, bu polimerin daha yaygın olarak kullanımına imkan sağlamaktadır (Vaidya ve diğ., 2005).

Günümüzde büyük ilerlemelerin kaydedildiği bilim dallarından biri olan biyomalzeme biliminde, biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilecek yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. Biyopolimerler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerdir. Polilaktik asit vücuda mükemmel uyumluluk, yüksek mekanik dayanıklılık ve iyi işlenebilirlik gibi özellikleri nedeniyle günümüzde tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıp ve ilaç sektörünün yanı sıra polilaktik asidin, günümüzde ambalaj sanayinde de yaygın bir kullanım sahası bulunmaktadır. Özellikle poşet, plastik çatal, kaşık, bıçak....vb. yapımında petrol türevli polimerlere alternatif olan bir hammadde halini almıştır. Öte yandan tekstil endüstrisinde iç giyim ve hijyenik malzemelerde kullanımı artmaktadır. Ayrıca perde, halı, duvar kaplama malzemeleri gibi ürünlerde de yaygın kullanım sahasına sahiptir.

Sürekli artan bir problem olan atık sorununa çözüm olarak son yıllarda, biyobozundurma ile plastik atıkların yok edilmesi, hem ekonomik olması hem de kolay uygulanabilir olması nedeniyle, iyi bir alternatif çözüm yoludur. Biyobozunma, genellikle mikroorganizmalar ve enzimlerin varlığında gerçekleşen katabolizma reaksiyonlarıyla, organik maddelerin bozunmaya uğraması olayıdır.

Doğada meydana gelen bozunma ise, termal aktivasyon, hidroliz, biyolojik aktivite, oksidasyon, fotoliz ve radyoliz yollarıyla meydana gelir. Bozunma olayları, maddenin kimyasal yapısında önemli değişikliklere sebep olur ve reaksiyon sonucu oluşan son ürünler, aerobik ortamda karbon dioksit, yeni biyokütle ve su; anaerobik ortamda ise metan halinde açığa çıkar. Biyobozunma, polimerlerin difüzivite, porozite, morfoloji, saflık, çapraz bağlanma, kimyasal reaktiflik, mekanik dayanım, ısı tolerans ve elektromanyetik radyasyona olan dayanımlılık gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerine de bağlıdır.

Polilaktik asidin günümüzde ülkemizde endüstriyel ölçekte üretimi bulunmamaktadır ve bu konuda yurt dışına bağımlılığımız kaçınılmazdır. Dolayısıyla bu açığı kapatmak amacıyla, çalışmamızın ana hedefi, yemekhane atıklarından fermentasyonla laktik asit üretimi, elde edilen bu laktik asitten enzimatik polimerizasyon yöntemini kullanarak polilaktik asidin sentezlenmesi ve elde edilen polimerin çeşitli şartlar altında bozundurulmasıdır.

Sunulan bu tez çalışması üç ana adımda gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, polilaktik asit üretiminde monomer olarak kullanılan laktik asit, İstanbul Teknik Üniversitesi Sağlık, Kültür ve Spor Daire Başkanlığı Yemek İşletmeleri'nden temin edilen yemekhane atıklarından fermentasyon yoluyla elde edilmiştir. Farklı kültürler ve farklı besiyerleri ile gerçekleştirilen fermentasyon işleminin proses şartları optimize edilmiştir. İkinci adımda, üretilen laktik asit monomeri kullanılarak enzimatik polimerizasyon yöntemi ile polilaktik asit sentezlenmiştir. Farklı enzimler ve farklı sentez koşulları uygulanarak yapılan polimerizasyonun mekanizması modellenmiş ve her adımın kinetik parametreleri incelenmiştir. Elde edilen polilaktik asidin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve polimere ait belirleyici özellikler saptanmıştır. Son olarak, sentezlenen polilaktik asidin çeşitli şartlar altında bozundurulması incelenmiştir. Termal, hidrolitik ve enzim katalizli olarak gerçekleştirilen bozundurma işlemlerinde her adımın kinetik davranımları tespit edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Laktik Asit Hakkında Tarihçe

Laktik asit ilk kez 1780 yılında İsveç’li kimyager Scheele tarafından ekşi sütte bulunmuştur. Diğer bazı bilim adamları Scheele’nin asidin saf olmadığını ve asetik asidin başka bir yapı ile birleşmiş ve modifiye olmuş hali olduğunu iddia etmişlerdir. Berzelius ise Scheele’nin deneylerini tekrarlamış ve laktik asidin saf bir asit olduğunu 1808 yılında doğrulamıştır. Braconnat ise, laktik asidin varlığını 1813 yılında tekrar ispatlamış ancak Scheele’ninkinden farklı olduğunu iddia etmiştir. Laktik asit fermantasyonu ise ilk olarak 1839 yılında, Fremy tarafından, şeker pancarı, süt şekeri, nişasta ve dekstrin gibi maddeleri kullanarak gerçekleştirilmiştir. Laktik asidin varlığı en son 1833 yılında Gay-Lussac tarafından ispat edilmiştir (Holten ve diğ., 1971).

Laktik asidin ilk ticari üretimi ise 1881 yılında Charles Avery tarafından yapılmıştır. İlk başarılı endüstriyel kullanım alanı deri ve tekstil sektörlerinde 1894 yılında başlamış ve üretim yıllık hacmi 5 ton civarında olmuştur (Vick Roy, 1985).

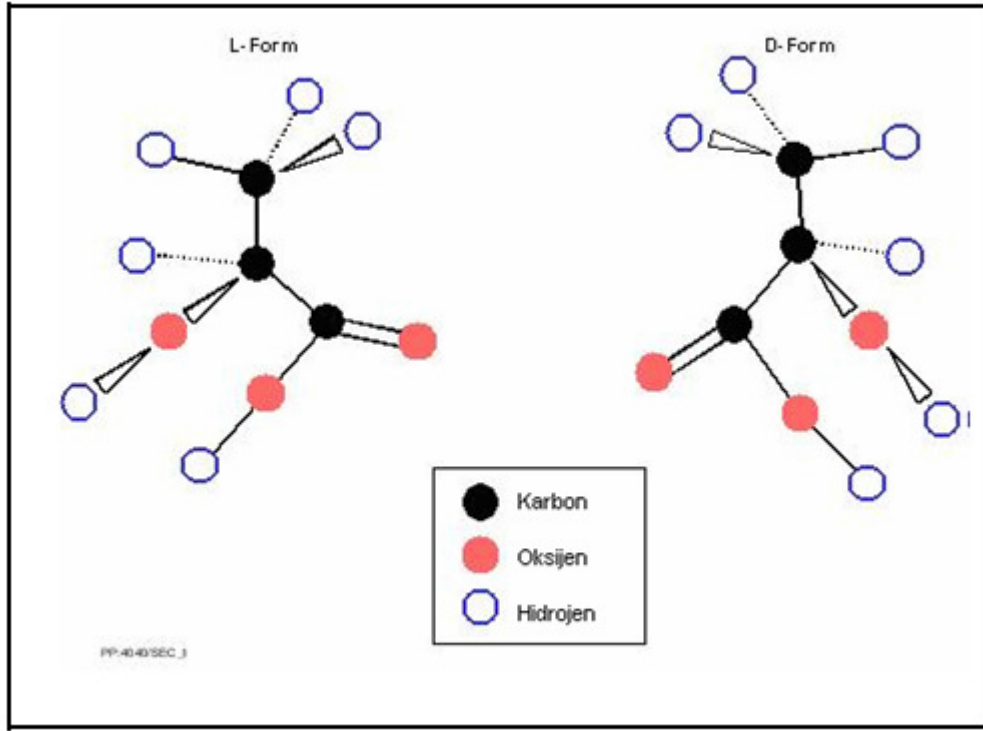
2.2 Laktik Asidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Laktik asidin (2-hidroksipropiyonik asit, 2-hidroksipropanoik asit) saf ve susuz formu beyaz kristal yapıdadır ve erime noktası düşüktür. Ancak saf haldeki asiti elde etmekteki güçlükler nedeniyle genellikle konsantre sıvı çözelti veya şurup halinde bulunmaktadır (Holten ve diğ., 1971).

Her oranda su ile karışabilen laktik asit, konsantrasyonu %20 ve daha fazla olan çözeltilerde içerdiği hidroksil ve karboksil fonksiyonel grupları nedeniyle ısının da etkisiyle esterifikasyona uğrar.

Esterifikasyon sonucunda $H[OCH(CH_3)CO]_nOH$ genel formülü ile gösterilebilen siklik dimerler veya lineer polimerler (laktoillaktik asit) oluşur (Vick Roy,1985).

Laktik asit molekülünde $-COOH$, $-H$, $-OH$ ve $-CH_3$ olmak üzere 4 değişik grup taşıyan bir karbon atomu vardır. Bu gruplar asimetrik karbon atomunun etrafında iki değişik durumda yer alırlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Laktik asidin L ve D form optik izomerleri (Chem systems reports, 2002).

Eğer üç boyutlu sistemde karboksil grubunun yukarıya doğru olduğu kabul edildiğinde, hidroksil grubu ya sola (L(+)-laktik asit), ya da sağa dönüktür (D(-)-laktik asit). Birbirinin optik izomeri olan bu yapılardan L(+)-laktik asit polarize ışığı sağa döndürürken, D(-)-laktik asit sola döndürür ve bu iki optik izomer arasında fiziksel ve kimyasal özellikler açısından önemli farklılık yoktur (Hunger, 1984).

Sarkolaktik asit ve paralaktik asit de denilen L(+)-laktik asit, insan ve hayvan vücudundaki dokularda glikoz veya glikojenin metabolik dönüşümü sonucunda üretilir. Bu asit kalp ve iskelet kasları, karaciğer, böbrek ve beyin için önemli bir enerji kaynağıdır. D(-)-laktik asit ise insan vücudunda metabolize edilemez. (Hunger, 1984).

İnsanlarda laktik asiti metabolize edebilecek sadece L-laktat dehidrogenaz enzimi olması nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisinde L(+) laktik asit izomeri tercih edilmektedir ve yüksek seviyedeki D(-) laktik asit oranları zararlı olmaktadır (Akerberg ve diğ., 1998; Hofvendahl ve Hagerdal, 2000). Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) günlük D(-)-laktik asit alımının 100 mg/kg vücut ağırlığının üzerine çıkmamasını tavsiye ederken L(+)-laktik asit için ise herhangi bir sınırlama getirmemiştir (Hunger, 1984).

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

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

Çizelge 2.1: Laktik asidin fiziksel özellikleri.

Molekül ağırlığı	90.08 g.mol ⁻¹
Erime noktası	289.8 K
Kaynama noktası	66.7 Pa'da 355 K, 1733.2 Pa'da 395 K
Ayrışma sabiti, 298 K'de K _a	1.37x10 ⁻⁴
Yanma ısısı	1361 kJ mol ⁻¹
Özgül ısı, 293 K'de C _p	190 J.mol ⁻¹ K

Laktik asit suda ve suyla karışabilen organik çözücülerde çözünebilmektedir ve çok düşük bir uçuculuğa sahiptir (Kaynama noktası: 0.5 mm Hg' da 82°C; 14 mm Hg' da 122°C).

Laktik asit gıda maddelerinde asitliği düzenleyici, aroma artırıcı ve antimikrobiyal olarak kullanılmaktadır. Diğer organik asitlerden farklı olarak çok hafif bir ekşi tada sahiptir. Uçucu olmaması ve kokusuz olması nedeniyle ABD’de FDA tarafından GRAS (generally regarded as safe) maddesi olarak kabul edilmektedir (Narayanan ve diğ., 2004).

Laktik asit yaklaşık olarak 54°C’de eriyen saf kristal formda elde edilebilmektedir. Bu kristal yapının elde edilebilmesi için özel metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Laktik asit hem karboksil grubu hem de hidroksil grubu içerdiği için kendisiyle laktoil-laktik asit ve dilaktid gibi esterleri oluşturmak üzere reaksiyona girip kondanse olabilmektedir. Laktik asit çözeltisi buharlaştırıldığında laktik asidin bir kısmı bu bileşenlere ve en az iki laktik asit birimi içeren polimerlere dönüşmekte, böylece viskoz kristalize olmayan bir şurup elde edilmektedir (King ve Cheetham, 1987).

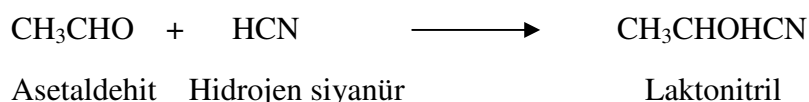
2.3 Laktik Asit Üretimi

Laktik asit, ticari olarak kimyasal sentez ve fermantasyon üretilmektedir.

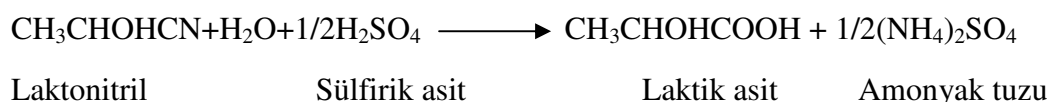
2.3.1 Kimyasal sentez ile laktik asit üretimi

Ticari olarak kimyasal sentez laktonitrile dayanır. Laktonitril oluşturmak üzere bir bazın varlığında hidrojen siyanür asetaldehite eklenir. Ham laktonitril distilasyonla geri alınır ve saflaştırılır. Daha sonra konsantre HCl veya H₂SO₄ ile hidrolize edilerek laktik asit ve amonyum tuzu elde edilir. Laktik asit daha sonra metil asetat üretmek üzere metanol ile esterleştirme reaksiyonunu gerçekleştirir. En sonunda laktik asit üretmek için distilasyona tabi tutulur ve asit katalizörüyle birlikte su ile hidrolize edilir (Vick Roy, 1985). Bu proses aşağıdaki reaksiyonlar ile gösterilir;

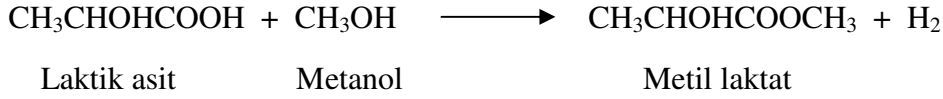
- Hidrojen siyanürün eklenmesi



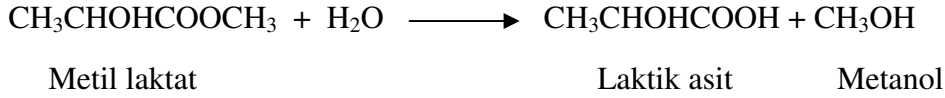
- H_2SO_4 ile hidroliz



- Esterleşme



- H₂O ile hidroliz



2.3.2 Fermantasyon ile laktik asit üretimi

Fermantasyon özellikle gıda üretimi ve korunmasında kullanılan en eski ve en güvenilir yöntemlerden birisidir. Süt ürünleri ve yağlı tohumlar, alkollü ve alkolsüz içecekler, sebze ve meyveler, et ve balık ürünleri, hububat bazlı ürünler fermantasyon substratları olarak kullanılabilirler (Bayram, 2005).

Fermantatif üretimde, laktik asit bakteri neslinin seçilmesiyle izomerlerden birinin, optikçe saf ürün olarak elde edilmesi sağlanır. Sentetik üretim ise her zaman laktik asidin rasemik karışımıyla sonuçlanır. Ayrıca fermantatif üretim, substrat olarak nişasta ve selüloz gibi yenilenebilir kaynakların kullanılmasını da mümkün kılmıştır. Yenilenebilir kaynaklar, atmosfere sınırlı yağ ve fosil yakıt esaslı kaynakların sağladığı gibi net bir karbondioksit katkısı sağlamamaktadır. Selüloz, hemiselüloz ve nişasta dünyadaki en bol bileşiklerdir ve glikoza hidroliz olduklarında çok sayıda mikroorganizma tarafından fermente edilebilirler. Nişasta ve selüloza karşın hemiselüloz, asetat ve etanol gibi yan ürünleri arttıran, laktik asit verimini düşüren pentoz içermektedir.

Fermantasyonun sağladığı en önemli avantajlar toksik maddelerin azaltılması, istenmeyen bileşiklerin yok edilmesi, gıdaların amino asit, yağ ve vitaminle zenginleştirilerek besin değerinin artırılması, yapı ve aroma kazandırılması, görünümün iyileştirilmesi ve daha güvenli bir ürün oluşturulması şeklinde sıralanabilir (Bayram, 2005). Fermantasyon işleminde, ucuz hammaddelerin kullanımı, biyolojik reaksiyonların düşük sıcaklıkta gerçekleşme özelliğine bağlı az enerji ihtiyacı, teknik uygulamalardaki kolaylıklar önemli avantajlardır.

Fermantatif laktik asit üretiminin kimyasal sentez ile rekabetindeki en önemli üstünlüğü, ucuz karbonhidrat kullanımının mümkün olmasıdır (Çelen, 1986).

2.3.2.1 Laktik asit fermentasyonunda kullanılan mikroorganizmalar

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

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

Laktik asit bakterileri morfolojilerine, sıcaklıkla orantılı gelişimlerdeki farka, ürettikleri laktik asit konfigürasyonuna, asit veya alkali toleranslarına ve fermentasyon yöntemlerine göre sınıflandırılmaktadırlar (Narayanan ve diğ., 2004).

Laktik asit üreten mikroorganizmalar oksijen kullanımlarına göre anaerobik, aerotolerant veya mikroaerofiliktirler. Spor oluşturmeyen, hareketsiz ve asite toleranslı, çubuk ve kok şeklindeki laktik asit bakterileri gram-pozitif, katalaz negatif ve oksidaz negatiftir (Bayram, 2005). Mikroorganizmanın seçimi öncelikle fermente edeceği karbonhidratın türüne göre yapılır. *Lactobacillus delbreuckii* sukrozu fermente edebilen bakteridir. *Lactobacillus bulgaricus* laktozu kullanabilmektedir. *Lactobacillus helveticus* hem laktozu hem galaktozu kullanabilmektedir. *Lactobacillus amylophylus* ve *Lactobacillus amylovirus* nişastayı fermente edebilmektedirler.

Lactobacillus lactis glikozu, sukrozu ve galaktozu fermente edebilmektedir. *Lactobacillus pentosus* sülfid atık likörü fermente etmek için kullanılmaktadır.

Lactobacillus'un kompleks bir besin ihtiyacı vardır. Sadece karbon kaynaklarında ve inorganik nitrojen tuzlarında yetişemezler.

Lactobacillusa ait morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler Çizelge 2.2’de verilmiştir (Wang ve diğ., 2005a).

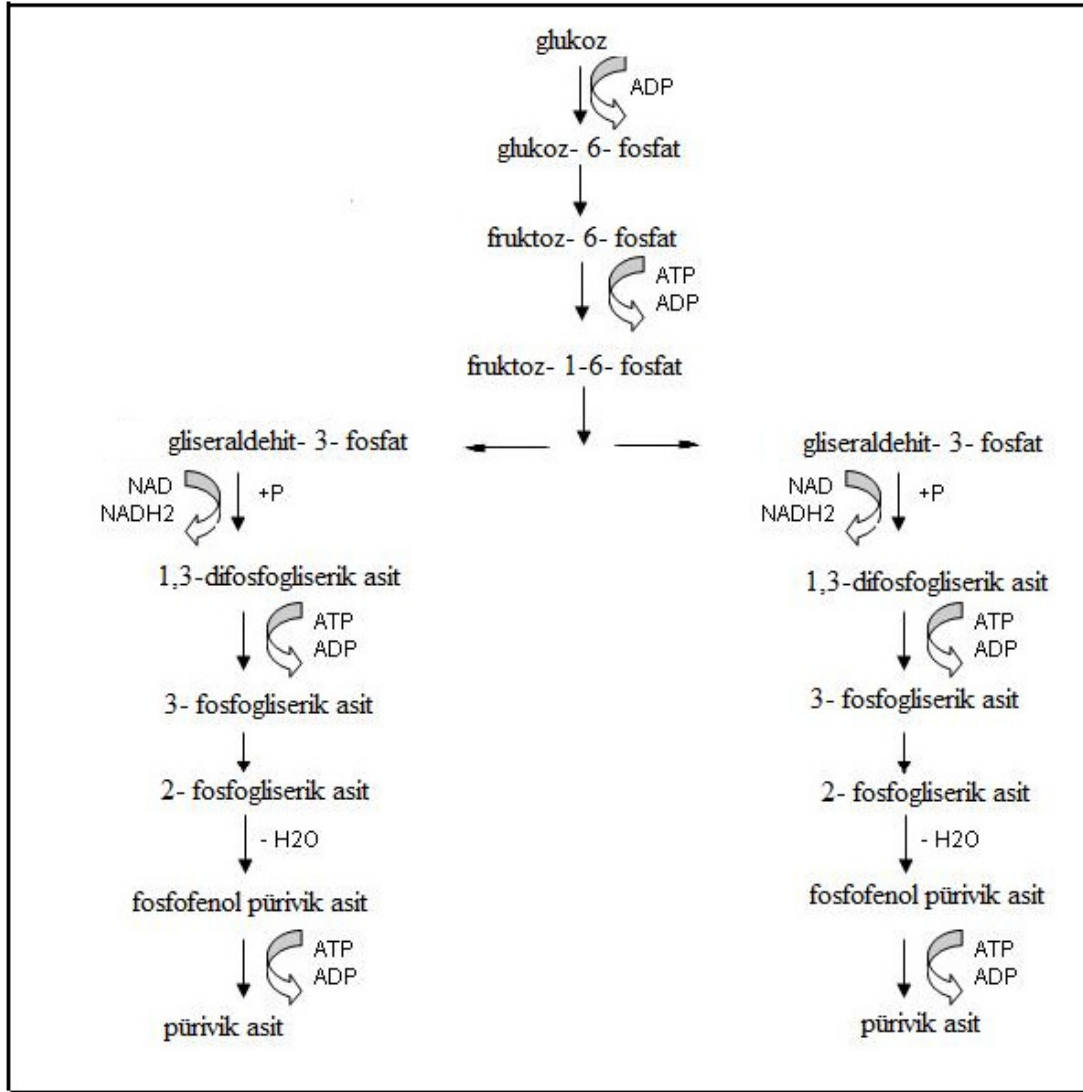
Çizelge 2.2: Lactobacilluslar’ın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.

Cins	Lactobacillus
Homolaktik	+
Gram boyası	+
Katalaz	-
Hücre şekli	Kısa çubuk
Spor	-
Mobilite	-
H ₂ S üretimi	-
Nişasta hidrolizi	+
Optimum sıcaklık	37°C
15°C’de büyüme	+
45°C’de büyüme	+
4.5 pH’ta büyüme	+

Laktik asit bakterileri iyi tanımlanan Embden-Mayerhof glikoz yol izini kullanarak ana son ürün olarak laktik asit üretebildikleri gibi (homofermentatif), laktik asidin yanında asetik asit, etanol ve CO₂ açığa çıkan pentoz yol izini de kullanabilmektedirler (heterofermentatif) (Vaidya ve diğ., 2005). Heksozlar, Embden Mayerhof yol izi takip edildiğinde önce piruvata, oluşan piruvat da laktat dehidrojenaz enzimi ile laktik asite dönüştürülür (Şekil 2.2).

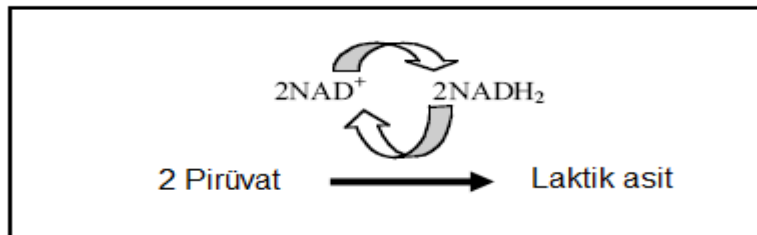
Embden Meyerhof mekanizmasında görülen ilk üç adım (fosforlama) glikozu 2 adet gliseraldehit fosfata (2 triod) parçalar. Fruktoz 1,6 difosfat aldolaz enzimi Embden Meyerhof mekanizmasındaki parçalanmayı sağlayan anahtar enzimdir.

Her bir triod molekülü oksitlenerek ve fosforlanarak mekanizme içersindeki net ATP kazancı 4 olmak üzere pirüvik asit oluşturur.



Şekil 2.2: Glikoz disimilasyonu ile Embden Meyerhof fermantasyon yolu.

Laktik asit bakterileri pirüvatı laktik asite aşağıdaki mekanizma boyunca indirger (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Laktik asit fermantasyonu.

Diğer mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen fermantasyon Embden Meyerhof mekanizmasının değişik modifikasyonlarıdır. Bu yöntemler oluşturulan son ürünün farklılığıyla belirlenebilir. ATP/glikoz kazancı genel olarak bütün oluşumlarda aynı kalır ve pirüvat veya pirüvatın değişik formları terminal elektron akseptörü olarak çalışır (San ve diğ., 1988; Altaf ve diğ., 2005).

Homofermentatif bakteriler fruktoz difosfatı trioz fosfata parçalayan aldolaz enzimine sahipken, heterofermentatif bakterilerde bu enzim olmadığı için alternatif bir yol izi takip ederler. Homofermentatif yol izinde 1 molekül glikozdan 2 molekül laktik asit elde edilirken, heterofermentatif yol izinde 1 mol laktik asit, etil alkol ve CO₂ elde edilir. Ancak diğer yol izlerinden asetik asit, formik asit, gliserol gibi ikincil ürünlerde gelebilir (Brock ve Madigan, 1991).

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

Laktik asidin endüstriyel üretiminde çoğunlukla homofermentatif bakteriler kullanılmaktadır, fakat üremeyi kısıtlayıcı karbon kaynağı seviyelerinde bazı suşların homofermentatif davranışları, heterofermentatife dönebilmektedir (De Vries ve diğ., 1970). Mezofilik asit bakterileri için en uygun büyüyebildikleri sıcaklık aralığı 28-45°C iken termofilik laktik asit bakterileri için bu aralık 45-62°C'dir. Kontaminasyon riskini azaltmak için yüksek sıcaklıkta üreyebilen mikroorganizmalar tercih edilmektedir fakat mikrobiyal suşların çoğu pH' a hassastır (Garvie, 1980; Teuber, 1992).

Buchta (1983)'ya göre bakteriyel laktik asit fermantasyonu pH 5.0 ve daha aşağı pH değerlerinde inhibe olmaktadır, 4.5' in altında ise tamamen durmaktadır.

Laktobasiller doğada süt ürünleri, tahıllar, et ve balık ürünleri, su, bira, şarap, meyveler ve meyve sulan, turşular ve daha birçok kaynakta doğal olarak bulunurlar. Gelişebildikleri sıcaklık aralığı oldukça geniştir (2 -53°C), ancak optimum 30-40°C arasındadır. Diğer laktik asit bakterileri gibi laktobasiller de, asite dayanıklı bakteriler değildirler ve nötral veya alkali pH değerlerinde üreme hızları azalır.

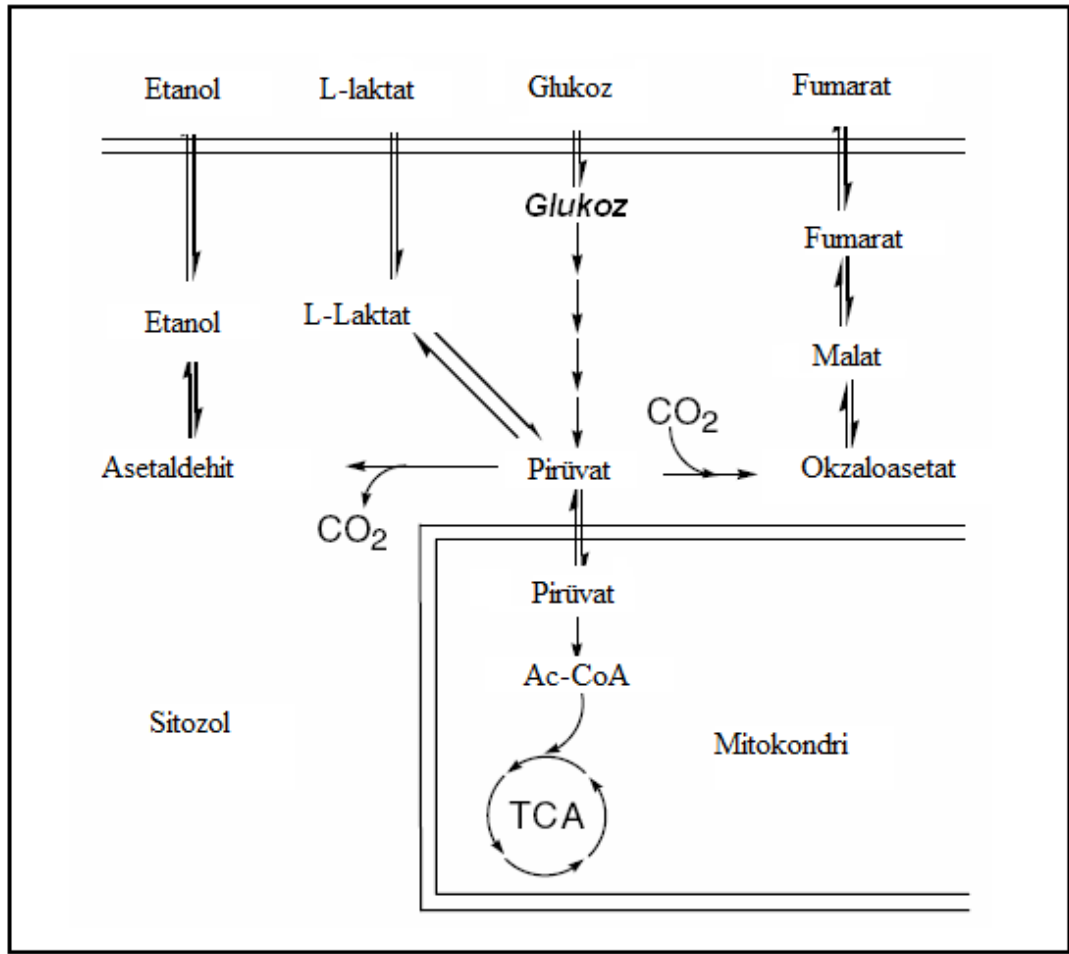
En iyi gelişme gösterdikleri başlangıç pH'ı hafif asidik olan 4.5 - 6.4 aralığıdır (Teuber ve diğ., 1992).

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

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

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

Laktik asit bakterileri, laktat dehidrogenaz ve rasemazlarının varlığına bağlı olarak D(-), L(+) ve DL-laktik asit üretenler şeklinde ayrılırlar (Garvie, 1980; Teuber, 1993). LAB' ların aksine laktik asit üreten *Rhizopus* suşları, tek laktik asit izomeri olarak L(+) laktik asit üretmektedirler (Şekil 2.4) (Zhang ve diğ., 2007).



Şekil 2.4: *R.oryzae*' de organik asit sentezinin kritik yolu.

2.3.2.2 Laktik asit fermantasyonunda substrat seçimi

Uzun yıllardan beri laktik asit üretimi için çok sayıda karbonhidrat ve azotlu maddeler incelenmiştir. Araştırmalar, yüksek laktik asit verimi, optimum biyokütle üretimi, ihmal edilebilir yan ürün oluşumu, yüksek fermantasyon hızı, daha az ön muamele, düşük maliyet, kolay elde edilebilirlik gibi özellikler temel alınarak substrat seçiminin yapıldığını bildirmektedir. Buna göre laktik asit fermantasyonunda substrat seçimi; substratın fiyatına, ön işlem gerektirip gerektirmediğine, kolay fermente olup olamayacağına, kullanılacak mikroorganizmaya ve istenilen ürüne bağlı olarak yapılmaktadır (Narayanan ve diğ., 2004).

Karbonhidrat içeren birçok hammadde laktik asit üretimi için endüstriyel olarak kullanılmış veya kullanımı önerilmiştir.

Endüstriyel olarak kullanılacak bir hammaddede; düşük maliyetli olması, az miktarda kontaminant madde içermesi, fermantasyon sonucunda yüksek laktik asit verimi ve verimliliğini sağlaması, az yan ürün oluşumunu desteklemesi, bütün yıl boyunca temin edilebilme imkanının olması, mümkün olduğunca az ön işleme ihtiyaç duyması ve ürünün saflaştırılmasında çıkabilecek safsızlıkların az olması gibi bazı özellikler istenmektedir (Vick Roy, 1985). Laktik asit fermantasyonunda substrat, uygun mineral ve proteinli gıdalar ile karbonhidratlardan oluşur (Eyal, 2003). Yaygın olarak kullanılan substratlar rafine şekerlerdir. Ancak pahalı olmaları dolayısıyla, nişasta gibi daha ucuz substratların kullanılması tercih edilir (Altaf ve diğ, 2006).

Patates nişastası substratının fermente edilebilir bir karbonhidrat kaynağı olmasıyla birlikte bir ön hidrolize ihtiyacı bulunmaktadır. Ham karbon substratlarındaki kirliliklerin, fermantasyondan sonra laktik asidin kazanılması ve saflaştırılması aşamasında zorluk çıkarmasından ötürü fermantasyonla ticari laktik asit üretiminde daha ekonomik olan melas, peynir altı suyu ve yarı rafine mısır şekeri, maltoz, sukroz, laktoz, sakkaroz, dekstroz gibi substratlar kullanılmaktadır (Çelen, 1986).

Melaslar ucuz fakat laktik asit verimleri düşük ve saflaştırma prosedürleri zahmetli hammaddelerdir. Peynir altı suyu da ucuzdur ve kolay bulunabilir ancak melaslar gibi saflaştırma prosesleri pahalıdır. Nişasta içeren endüstriyel yemek atıkları, bakterilerle ayrışabilen plastiklerin dönüşümü için uygun olan laktik asite biyolojik olarak dönüşmektedirler (Tsai, 1995).

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

Peynir altı suyu, peynir üretimi sırasında ortaya çıkan bir atık maddedir. Üretilen peynir tipine bağlı olmakla beraber 100 kg süttten ortalama 80 - 90 kg peynir altı suyu oluşmaktadır. Önemli oranda laktoz ve protein içeren peynir altı suyunun atılması yüksek biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) nedeniyle hem çevre kirlenmesine neden olmakta, hem de ekonomik olmamaktadır (Beyatlı ve Aslım, 1990).

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

Peynir altı suyundan laktik asit üretimi üzerine çok sayıda bilimsel çalışma vardır. Aeschlimann and Stockar (1989), peynir altı suyu ultrafiltratından *L. helveticus* kullanarak 95 g.L⁻¹ maksimum konsantrasyonda laktik asit üretmiştir.

Chiarini ve diğ. (1992), peynir altı suyu ultrafiltratından laktik asit üretiminde azot kaynağı olarak maya ekstraktı kullandıklarında yüksek verim değerleri elde etmişler, ancak pancar melası ile de başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Lund ve diğ. (1992), önceden proteaz enzimi ile hidroliz ettikleri peynir altı suyundan laktik asit üretmişlerdir.

Nişasta içerikli maddeler, mısır, patates, buğday, cassava ve diğer bitkilerden sağlanmaktadır. Nişasta, *Lactobacillus amylophilus* ve *L. amylovorus* dışında bilinen laktik asit bakterileri tarafından kullanılmamaktadır. Nişasta hidrolizi, kimyasal ve enzimatik yollarla gerçekleştirilebilmekle beraber, kimyasal yöntemde bazen işlem yarıda kalmaktadır. Enzimatik hidrolizin ana ürünü maltoz olduğu durumda, sınırlı sayıda mikroorganizma fermentasyon için uygun olmaktadır. Günümüzde nişastanın sıvılaştırılması ve sakkarifikasyonu (şekere çevrilmesi), bakteriyel α -amilazlar ve fungal glukoamilazların beraber kullanımları ile gerçekleştirilebilmektedir (Vaidya ve diğ., 2005).

Cheng ve diğ. (1991), bakteriyel α -amilaz ile parçaladıkları mısır nişastasından *L. amylovorus* ile laktik asit üretmişlerdir. Bu işlemde nişastanın sakkarifikasyonu laktik asit fermentasyonu sırasında gerçekleştirilmiştir.

Bai ve diğ. (2003), *Rhizopus oryzae* R1021 kullanarak 120 g.L⁻¹ mısır nişastasından 60 saat sonra 79.4 g.L⁻¹ laktik asit üretmişlerdir.

Zhang ve Cheryan (1991), ham ve enzimatik olarak parçalanmış nişastadan *L. amylovornis* kullanarak 96.2 g.L⁻¹ konsantrasyona kadar laktik asit üretmişlerdir.

Abdel-Naby ve diğ. (1992), enzimatik nişasta hidrolizatından kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Lactococcus lactis* hücreleri ile sürekli ve kesikli fermantasyon sistemlerinde laktik asit üretmişlerdir.

Klasik olarak kullanılanlar dışında mısır koçanı, mısır sapı, buğday kepeği, saman gibi selülozik maddeler, kağıt fabrikası yan ürünü olan sülfat şurubu, hidrolize odun, yer elması, soya melası, keçiyoynuzu gibi bazı hammaddelerle de laktik asit üretimi için çalışmalar yapılmıştır.

Bai ve diğ. (2003), *Rhizopus oryzae* için uygun suş seçiminde; *Rhizopus oryzae* R1021 kullanarak 34 saat sonunda 88 g.L⁻¹ glikozun tamamını tüketmiş ve 69.3 g.L⁻¹ laktik asit üretmiştir.

Bulut ve diğ. (2001), keçiyoynuzu ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, öncelikle %10 keçiyoynuzu içeren ortamda 23 g.L⁻¹ laktik asit elde etmişlerdir. Daha sonra kolay metabolize olabilen şekerlerin ortama eklenmesinin laktik asit üretimini artıracak düşünülerek %10 keçiyoynuzuna %5 glikoz eklenerek üretim gerçekleştirilmiştir. Bu koşulda önemli bir laktik asit artışı gözlenmemiştir. Bu da göstermektedir ki her ne kadar keçiyoynuzu %40-50 şeker içerse de hücreler şekeri bu formda kullanamamaktadırlar. Bu nedenle keçiyoynuzundaki şekerler ekstrakte edilerek üretim ortamı hazırlanmış ve bu durumda maksimum laktik asit konsantrasyonu 58 g.L⁻¹ ile elde edilmiştir.

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

Melasta %4-11 arasında inorganik bileşikler bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum, demir, sülfat, klorür ve fosfatlardır. Pancar melasında genellikle potasyum oranı daha yüksektir. Melasın endüstriyel fermantasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır ancak kompleks bir substrat olduğu için bazı toksik maddeler de içerir. Kükürt dioksit, hidroksimetil furfurol, potasyum imidodisulfonat, fenoller ve diğer bazı uçucu bileşikler bu tip maddelerdendir. Bu maddeler dışında bazı mineral maddelerin yüksek konsantrasyonları da inhibitör etki yapmaktadır (Burrows, 1970).

Bulut ve diğ. (2004), melaslı besi ortamını, normal melas ve pastörize melaslı olmak üzere iki farklı şekilde hazırlanmışlardır. Pastörize melaslı ortamda laktik asit üretim hızı, işlenmemiş melasa oranla biraz daha fazla olsa da toplam laktik asit üretimi önemli bir farklılık göstermemiştir ($\sim 40 \text{ g.L}^{-1}$). Bunun nedeni olarak pastörize melastaki şekerin *R. oryzae* hücreleri tarafından daha kolay metabolize edilebilmesi belirtilmiştir. Sonuçta her iki durumda da laktik asit üretim miktarı glikoz ve sukrozdan daha düşük gerçekleşmiştir.

2.3.2.3 Laktik asit fermantasyonunun değişkenleri

Fermantasyon sırasında ortam pH'sinde değişim, sıcaklık değişimi, mikroorganizma hücrelerinde çoğalma, ürün konsantrasyonunda artış, substrat yapılarında değişim ve konsantrasyonlarda azalma gözlenebilir (Çelen, 1986).

- Laktik asit fermantasyonuna pH değerinin etkisi

Fermantasyonun hızını ve verimini arttıran en önemli parametrelerden birisi olduğu için pH kontrolü gerekli ve önemlidir. Fermantasyonun verimini ve hızını etkileyen pH değeri, kullanılan mikroorganizma ve karbonhidrat kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Birçok mikroorganizma, metabolizmanın en verimli şekilde gerçekleştiği pH aralığına sahiptir. Bu nedenle fermantasyon pH'ı mikroorganizma hücrelerinin üretkenliğini büyük ölçüde etkileyen bir değişkendir (Eyal, 2001).

Kuvvetli asidik ortamda, laktik asit üreten bakteriler inhibisyona uğradıklarından, fermantasyonun 3.8- 4.5 pH aralığında gerçekleşmesine rağmen, optimum pH genel olarak 5.0-6.0 arasında seyrederek. Fermantasyon süresince karışımın nötralize edilerek, pH'ın sabit tutulması amacıyla ortama, asit üreten mikroorganizmalar zehirli olmayan, suda çözünebilen kalsiyum karbonat, kalsiyum hidroksit, amonyak, amonyum karbonat ya da sodyum, potasyum veya amonyum karbonat karışımı ilave edilebilir (Erickson, 1988; Eyal, 2003).

Yapılan deneysel çalışmalar incelendiğinde, nötrleştirici olarak alkali metallerin kullanımının problemli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bazik toprak metalleri, tercihen kalsiyum bazları kullanılmaktadır. Böylece laktat tuzu, ayıraç tüketimi ve yan ürün oluşumu olmaksızın suda çözünebilen alkali metal laktata dönüşebilmektedir (Eyal, 2003).

pH'nın fermentasyon üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, pH'nın kontrol edilmesi yerine, başlangıçta ayarlanıp, asit üretimi nedeniyle düşmesi de izlenebilir (Hofvendahl ve Hagerdahl, 2000). Başarılı bir fermentasyonun anahtarı pH'nın ani düşüşüdür. Bu düşüş, istenmeyen mikroorganizmaların azalmasına neden olur ve fermentasyonun ilk aşamalarına bağlıdır (Norrdahl, 2001; Rita, 2003). pH kontrolünün gerçekleştirildiği durumlarda laktik asit verimin ve konsantrasyonunun, kontrolsüz duruma kıyasla daha yüksek olması kaçınılmazdır (Hofvendahl ve Hagerdahl, 2000). pH'nın sabit tutulması için yapılan, genellikle gaz halindeki amonyak ilavesinin NaOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ veya CaCO_3 'e göre tercih edilmesinin nedeni olarak NaOH gibi diğer bazlardan daha ucuz olması, daha iyi büyüme sağlayan bir azot kaynağı olması ve örneğin kalsiyum iyonlarının fermentasyon sıvısında istenmiyor olması gibi faktörler gösterilebilir (Norrdahl, 2001).

- Laktik asit fermentasyonuna sıcaklığın etkisi

Laktik asit fermentasyonu yüksek sıcaklıkta gerçekleşen bir işlemdir. Anaerobik fermentasyon proseslerinin tasarımında sıcaklık, dikkate alınması gereken önemli bir parametredir. Fermentasyon tipine göre optimum sıcaklık değişiklik göstermektedir. Bu sebeple her fermentasyon işlemi için optimum sıcaklık deneysel olarak belirlenmelidir. Örneğin *Lactobacillus bulgaricus* için bu değer 45-50°C arasında, *Lactobacillus delbrueckii* ve 15°C'de büyüyen *Lactobacillus amylophilus* için 45°C'dir. *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei* ve ya *Streptococcus Lactis* ile gerçekleştirilen fermentasyon işlemlerinde ise optimum sıcaklık 30°C'dir (Çelen, 1986).

- Laktik asit fermentasyonuna sürenin etkisi

Laktik asit fermentasyonunun süresi, kullanılan mikroorganizmaya, ortam bileşimine ve miktarına göre 1 ile 6 gün arasında değişir ve sistem kontrol altında tutulduğu takdirde % 85-90 arasında verim elde etmek mümkündür (Çelen, 1986).

2.4 Laktik Asidin Fermentasyon Sonrası Geri Kazanımı ve Saflaştırılması

Fermentasyon ürünlerinin saflaştırılması oldukça zor ve maliyetli bir işlemdir. Bu işlemin amacı, yüksek kaliteli ürünün, mümkün olan en kısa sürede uygun kazanım hızında minimum maliyet ve işletme yatırımı ile elde edilmesidir.

Kazanım maliyetleri toplam üretim maliyetlerinden %15 düşük ya da %70 yüksek olabilmektedir. Fermantasyon ürünün kazanımının ilk aşamasında amaç, büyük katı partiküllerin ve mikrobik hücrelerin genellikle filtrasyon veya santrifüj ile uzaklaştırılmasıdır. Bir sonraki aşamada fermantasyon ortamı, ultrafiltrasyon, adsorpsiyon/iyon değişimi/jel filtrasyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, iki fazlı sulu ekstraksiyon kullanılarak ekstraksiyon ve fraksiyonlama gibi prosesler ile daha çok fraksiyonlara ayrılmalıdır. Ürün içeren fraksiyon, yüksek konsantrasyonun elde edilmesi ve safsızlıklardan arındırılması için kromatografik teknikler ve kristalizasyon ile saflaştırılmalıdır (Stanbury, 1995).

Laktik asidin son yıllarda yeni uygulama alanları bulması, arz edilen kalitedeki yetersizlik ve düşük üretim maliyetleri gereksinimi nedeniyle verimli ve ucuz saflaştırma tekniklerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır (Van Gansberghe, 2002). Membran esaslı ayırma ve saflaştırma işlemlerindeki son gelişmeler, tuz veya jips yan ürünlerinin oluşumu olmadan laktik asit üretimini mümkün kılmaktadır (Narayanan, 2001).

Fermantasyon sonunda ortam ya saf laktik asit ya da onun tuzu veya ikisinin karışımını içerir. Laktik asit, metalik laktatlar halinde çökerek ve bunu izleyen sülfürik asitle nötrleştirme prosesi ile saflaştırılabilir. Laktik asidin saflaştırılması amacıyla geliştirilmiş yöntemlerden birinde; peynir altı suyundan laktik asit eldesinde, kalsiyum laktatın kristalizasyonu ve sülfürik asit ile muamelesinden yararlanılmaktadır. Ancak sözü edilen proses, elde edilen ürünün kalitesinin yetersiz olması ve büyük laktik asit kayıpları yüzünden tercih edilmemektedir (Van Gansberghe, 2002).

Bir diğer yöntem ise, kalsiyum laktatın çinko laktata dönüştürülmesidir. Laktik asit, diğer laktatlara göre daha çabuk kristalleşen çinko laktatın, hidrojen sülfid ilave edilerek çinko sülfid olarak çöktürülmesiyle saf olarak elde edilmektedir. Bu yöntemlere ek olarak alkolle esterleştirilerek, distile edilerek ve esterin hidroliz edilmesi ile de saflaştırma gerçekleştirilebilmektedir (Van Gansberghe, 2002). Sodyum veya kalsiyum laktata 1/10 oranında metanol eklenir ve çözünmeyen safsızlıklar filtrasyon ile ortamdan uzaklaştırılır. Laktik asidin serbest hale geçmesi ve bir sonraki esterleşme reaksiyonunu katalizlemesi için sülfürik asit ilave edilerek, esterleşmenin gidişatına bağlı olarak 4-8 saat süreyle ısıtılır.

Çöken maddeler filtrasyonla uzaklaştırılırken, distilasyonla metanolün fazlası uzaklaştırılır. Metil laktat düşük sıcaklıkta vakum distilasyonuna tabi tutulur ve distilat 1/3 oranında distile su ilavesiyle seyreltilir ve fraksiyonlarına ayrılır. Metanol, metil laktatın hidroliziyle geri kazanılır ve serbest haldeki laktik asit vakum evaporasyonla derişikleştirilir (Çelen, 1986).

Esterleşme ile laktik asit ekstraksiyonu en pahalı yöntemdir. Esterleşme, plastiklerin üretiminde kullanılmak üzere yüksek seviye laktik asidin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Rakın ve diğ., 2004).

Laktik asidin kazanımı amacıyla fermantasyon ortamından laktat tuzunun ayrılması; kristalizasyon, solvent ekstraksiyonu, iyon değışimi ile ayırma, adsorbsiyon ile ayırma, vakum distilasyon ve direk distilasyon gibi geliştirilmiş çok sayıda prosten gerçekleştirilecek olan prosesin seçimi, ekstraktların verimli ve ekonomik kullanımı baz alınarak yapılmalıdır. Bu proseslerden kristalizasyon metodunda, atık üretimi ve kimyasal kullanımı için yüksek maliyet ve düşük verim ortaya çıkarken, solvent ekstraksiyonda kullanılan tehlikeli ve toksik solventler çevresel problemlerin ortaya çıkmasına neden olur. Doğrudan distilasyon ise yüksek enerji tüketimi gerektirmektedir (Wang ve diğ., 2005a).

Son zamanlarda, yukarıda sayılan saflaştırma proseslerinin arasında elektrodializ, fermantasyon besiyerinden laktik asidin ayrılması ve saflaştırılması için uygun bir alternatif olarak görülmekte ve yoğun olarak uygulanmaktadır. Elektrodializ, iyonik parçacıkların sulu çözeltilerden ve diğ er yüksüz bileşenlerden ayrılması için elektrik yüklü membranlar ve elektriksel potansiyel farkının kullanıldığı elektrokimyasal bir prostedir. Elektrodializ ürünü yaklaşık %35 oranında, 60-70°C’de vakum evaporasyon ile derişikleştirilebilmektedir (Tsai, 1995). Elektrodializ, son ürün inhibisyonunu azaltmakta ve fermantasyon ortamının pH’sini ayarlamak için nötrleştirici ilavesi olmaksızın, laktik asidin doğrudan geri dönüşümünü sağlamaktadır (Wang ve diğ., 2005a). Laktik asidin fermantasyon ortamından elektrodializ ile kazanımı verimliliğ in artmasına sebep olmakta ve yüksek laktik asit konsantrasyonu ile sonuçlanmaktadır (Kadam ve diğ., 2006).

Fermantasyon ortamından laktik asidin ekstrakte edilebilmesi için, ortamın asitleştirilmesi gerekmektedir. Bu da sülfürik asit gibi bir mineral asit eklemesi ile veya iyon-değişimi ile gerçekleştirilebilir. İki durumda da büyük hacimlerde tuz çözeltisi oluşmakta ve ürünün kirlenmesine neden olmaktadır. Elektrodializ ise bu problemler olmaksızın, fermantasyon ortamını asitleştirebilmektedir. Elektrodializ, bir çok safsızlığı uzaklaştırır ve böylece faz ayırma problemleri de elimine edilmiş olur (Tsai, 1995).

Laktik asidin, fermantasyon ortamından ekstraksiyonu oldukça zor bir operasyondur. Fermantasyon ürününün “in situ” uzaklaştırılarak son ürün inhibisyonun azaltılması için kullanılan alternatif yöntemlerden biridir. Düşük erime noktası (18⁰C) ve konsantre çözeltinin düşük basınç altında distilasyonun laktik asit kayıplarına sebep olması, asidin sulu çözeltiden kristalizasyonunu imkansız kılmaktadır. Asidin ekstraksiyonu için tuz oluşumu dahil çeşitli prosesler kullanılmıştır. İkincil ve üçüncül alkilaminli tuzlar, isopropil eter gibi çeşitli solventler kullanılarak sulu çözeltilerden ekstrakte edilir, solvent buharlaştırılır ve tuz serbest laktik asite ayırır (Norddhal, 2005). Basit ve büyük ölçekli fermantasyon sistemlerinde kolayca uygulanabilse de maliyetli ve pahalı olduğundan uygulaması yaygın değildir.

2.5 Laktik Asidin Kullanım Alanları

Laktik asit fermantasyonunun patojenik bakteriler ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etkisi, laktik asit bakterilerinin hızlı gelişimi ve hızlı asit üretiminden ve buna bağlı olarak oluşan sürekli pH düşüşü, laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriosinler, hidrojen peroksit, etanol, diasetil gibi antimikrobiyal maddelerin oluşumundan kaynaklanmaktadır. Gelişimi inhibe edilen patojenlerin miktarı söz konusu mikroorganizmaya, sıcaklığa, üretilen laktik asidin miktarına ve gıdanın özelliklerine bağlıdır (tamponlama özelliği gibi). Kimi gelişmekte olan ülkelerde gıdaların sıcakta ya da soğukta güvenilir koşullarda depolanması ülkelerin sosyoekonomik durumuna bağlı olarak gerçekleştirilmesinde sorun yaşanan bir durumdur. Bu nedenle fermantasyon prosesi, özellikle bu ülkelerde halk sağlığı açısından büyük önem teşkil etmektedir (Adams ve Nout, 2001).

Laktik asit antimikrobiyal özelliği dolayısıyla tavuk ve balık ürünlerinin ambalaj materyaline ilave edilmekte ve böylece ürünlerin raf ömrünün uzatılması sağlanmaktadır. Laktik asidin esterleri emülsifiye edici ajan olarak mayalı ürünlerde kullanılmaktadır. Emülsifiye edici ajanların üretimi sıcaklığa dayanıklı laktik asite ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle ancak sentetik olarak ya da ısıya dayanıklı olarak fermentasyon yoluyla üretilen laktik asit kullanılabilir (Narayanan ve diğ., 2004).

Teknik kalitedeki laktik asit, asitliyi düzenleyici olarak sebze ve deri endüstrisinde kullanılmaktadır. Tekstilde ve gıda alanında ucuz inorganik asitlerle yarışabilmek için düşük maliyette teknik laktik asite ihtiyaç duyulmaktadır (Narayanan ve diğ., 2004).

Laktik asidin kullanıldığı diğ er alanlar ise eczacılık ve kozmetiktir. Pek çok losyonun, anti akne çözeltilerinin, nemlendiricilerin formülasyonlarında, diyaliz uygulamalarında kullanılmaktadır. Kalsiyum laktat diş çürümelerinde ve kalsiyum destekli tedavilerde kullanılmaktadır. Laktik asidin biyoparçalanabilir polimeri polilaktik asit ise medikal alanında ortopedik implant ve kontrollü ilaç salınım uygulamalarında kullanılmaktadır. Polilaktik asit molekül ağırlığı ve kimyasal kompozisyonundaki değişikliklerle parçalanabilme özelliği değiştirilebilen, transparan bir maddedir. Düşük seviyedeki polimerizasyon ile elde edilen polimerler kontrollü salınım uygulamalarında ve parçalanabilir film üretiminde kullanılmaktadır. Polilaktik asidin tüm bu özellikleri nedeniyle petrol türevi plastiklerin yerini alabileceği düşünülmektedir (Narayanan ve diğ., 2004).

Laktik asit fermentasyonu bitkisel ürünlerde doğal olarak bulunan siyanojenik glikozitler gibi kimi toksik maddelerin yıkımına da neden olmaktadır. Ayrıca laktik asit fermentasyonu hububatlardaki tanin içeriğinin de azalmasını sağlamaktadır. Bu şekilde hububatların protein içeriğinin sindirilebilirliği ve mineral absorblama özellikleri artırılmaktadır (Adams ve Nout, 2001).

2.6 Polilaktik Asit

Polilaktik asit laktik asit türevi olan bir biyobozunabilen polimerdir. Mısır, şeker ve un gibi nişasta içeriği fazla kaynaklardan elde edilebilir. Polilaktik asit petrol kaynaklı plastiklerden daha iyi özelliklere sahip olduğu için günümüzde çok tercih edilen bir biyopolimer halini almıştır.

PLA son 25 yıldır tıbbi kullanım açısından oldukça geniş bir yere sahiptir. PLA biyobozunabilir ve biyoabsorblanabilir bir polimerdir yani biyolojik sistemlere son derece uyumludur. PLA'nın vücut içersine de uyum göstermesi nedeniyle kontrollü ilaç salan sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kontrollü ilaç salan sistemler ilacın gerekli miktarda ve sabit salınım hızında vücuda verilmesini sağlamaktadır. Mekanik özellikleri ve absorpsiyon kabiliyeti, PLA'nın yumuşak doku ve kemik dokularında implante edilebilen bir materyal olmasını sağlamaktadır. Bazı implante edilebilir cihazlar sürekli kullanılmak üzere (kalça ve dizkapağı bağlantı cihazları, kalp kapakçıkları), bazıları ise geçici kullanılmak üzere (kırık sabitleyici cihazlar ve kontrollü ilaç salan cihazlar gibi) vücuda yerleştirilir (Lin ve diğ., 1996).

Laktik asit polimerleri termoplastik davranış gösterdiklerinden, çok çeşitli metodlarla işlenebilirler. Bu metodlar arasında fiber çekme, ekstrüzyon ve kalıplama en çok kullanılan yöntemlerdir. Sonuç olarak bu polimerler yara örtü materyali, implante edilebilir cihazlarda kullanılmak üzere fiber, film, çubuk, vida şekline getirilebilirler (Agrawal ve diğ.,1996).

Tıbbi kullanım alanının yanısıra PLA ambalaj sanayinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. İşlem kolaylığı, istenilen şartlara kolaylıkla getirilebilmesi, kristallenebilme özelliğinin istenilen ürün yapısına uygun olarak şartlandırılabilmesi, kıvrılıp bükülme özelliklerinin yüksek olması, düşük sıcaklıklarda işleme tabi tutulabilmesi gibi özellikleri nedeniyle tercih edilen bir malzemedir. Laktik asit kopolimeri kullanılan laktatın optikçe iki izomeri olduğundan oldukça çeşitlilik göstermektedir. Polimerin yapısı bileşimine bağlı olarak amorf veya kristalin olabilir. Bu da polimerin mekanik dayanıklılığını istenilen biçimde değiştirebilme olanağının olduğunu gösterir (Biela ve diğ., 2003).

2.6.1 PLA eldesinde kullanılan polimerizasyon yöntemleri

2.6.1.1 Enzimatik polimerizasyon

Vink ve diğ. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada, dünyanın en büyük PLA üreten şirketi olan Cargill'in PLA üretim şartları ve tekniklerini incelemişlerdir. Cargill'in nişasta moleküllerinden nötral pH'a yakın noktalarda fermantasyon yoluyla laktik asit ürettiği belirlenmiş ve mısır, patates, şeker pancarı gibi nişasta içeriği yüksek maddelerden PLA üretimi için iki farklı polimerizasyon mekanizmasından, (birincisi doğrudan kondenzasyon, diğeri ise halka açılması polimerizasyon yöntemidir), kondenzasyon yönteminin bazı sorunlu yönlerinin olması nedeniyle, halka açılması polimerizasyon yöntemini kullandığı belirtmişlerdir.

Organik çözücüler içersinde enzim katalizli reaksiyonlar son birkaç yıldır sentez çalışmaları içersinde önemli bir yere sahip olmuştur. Son zamanlarda enzim katalizli polimerizasyon yöntemleri, polimer sentezi konusunda yeni bir metod halini almıştır. Enzim katalizli polimerizasyon, konvansiyonel polimerizasyon yöntemlerine göre daha zor bir yöntem olarak görülmektedir. Hidrolazlar sınıfına ait olan enzimler doğal ve/veya sentetik polisakkaritlerin sentezi için uygundur. Bunun yanısıra, son yıllarda, uygun kaynaklardan izole edilmiş lipaz kullanılarak biyosentetik olmayan proseslerin sentez uygulamaları geniş araştırmalar kapsamındadır. Lipaz yağ asitlerini canlı sistemlerde hidrolize eden bir enzimdir. Bununla beraber lipaz esterleşme ve trans-esterleşme reaksiyonlarını da katalizler. Lipazın katalitik özellikleri nedeniyle poliester sentezi, çeşitli polimerizasyon modelleriyle gerçekleştirilebilir: oksikarbosiklik asit türevlerinin polikondenzasyonu ve dikarboksilik asit türevlerinin kombinasyonu (Namekawa ve diğ.,1988).

Lipaz katalizli halka açılımı polimerizasyon yöntemi *Candida cylindracea* lipaz, *Pseudomonas fluorescens* lipaz ve porcine pankreas lipaz kullanılarak yapılabilir. Lipaz katalizli polimerizasyonda *Pseudomonas fluorescens* lipaz kullanıldığında 75°C ve 480 saatlik bir polimerizasyon ortamında molekül ağırlığı 10000 g.mol⁻¹'den fazla olan polimerler elde edilmiştir. Ayrıca 60°C'de reaksiyon gerçekleştirildiğinde %95 dönüşüm olduğu ve molekül ağırlığının sabit kaldığı anlaşılmıştır. *Pseudomonas fluorescens* lipaz kullanılarak polimerizasyon sıcaklık aralığı 30°C'den 75°C'ye arttırıldığında molekül ağırlığının da arttığı gözlemlenmiştir.

Porcine pankreatic lipaz ile yapılan polimerizasyonda 75°C için 120 ya da 240 saatlik bir reaksiyon süresinde molekül ağırlığı 10000 g.mol⁻¹ civarında olan polimerler elde edilmiştir. Polimerin terminal yapısı ¹H and ¹³C NMR spektroskopisi ile tespit edilmiştir (Kobayashi ve diğ.,1988).

Celite üzerine immobilize edilmiş olan lipaz kullanılarak yapılan polimerizasyon işleminde ağırlıkça %1'lik immobilize enzim, immobilize olmamış enzim ile aynı aktiviteyi göstermiştir (Namekawa ve diğ, 1988).

Polilaktik asidin enzimatik sentezinin, laktatların enzimatik halka açılması polimerizasyonu (Matsumura ve diğ., 1997) ve laktik asidin enzimatik polikondenzasyonu ile mümkün olduğu saptanmıştır (Schmidt ve diğ., 1999; Sonwalkar ve diğ., 2003).

Ohya ve diğ. (1995) yaptıkları bir çalışmada, PEG ile modifiye edilmiş esteraz ve lipaz enzimlerini kullanarak hidroksi asit içeren grupların polikondenzasyonunu incelemiştir. Enzimatik polikondenzasyon reaksiyonları hem asit hem de ester monomerleri ile yürütülmektedir. PLA'nın enzimatik olarak sentezlenmesinde pekçok çözücü kullanılmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3: Enzim aktivitesine çözücü etkisi.

Çözücü	Novo 435	Doğal proleather	Modifiye proleather
Kloroform	0.25	0.20	1.32
Piridin	0.24	0.17	0.95
Aseton	0.16	0.14	0.35
THF	0.23	0.17	1.27
THF-CCL ₃	0.20	0.19	0.92

Sonwalkar ve diğ. (2003) yaptıkları bir çalışmada, Novozym 435 enzimi kullanılarak yapılan laktik asidin transesterifikasyon reaksiyonunun, enzimatik polikondenzasyon mekanizmasına göre çok daha hızlı olduğu ve bu reaksiyona ait hızın 0.009 mM.saatt⁻¹.mg enzim⁻¹ olarak saptandığını belirtilmektedir.

Çalışmada, polimerizasyon mekanizmasına çeşitli çözücülerin ve reaksiyon sürelerinin etkisi incelenmiştir. Ayrıca Michealis-Menten sabitleri çıkartılmıştır. MALDITOF analizi kullanılarak, PLA'nın molekül ağırlığının 2000 Da olduğu ve yapının 72 Da'luk tekrarlayan ünitelerden oluştuğu saptanmıştır.

Ohya ve diğ. (1995); Szakacs-Schmidt ve diğ. (1999) yaptıkları çalışmada da Sonwalkar'ın çalışmasıyla aynı molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Polimerin yapısı NMR analizi ile saptanmıştır.

Laktik asidin enzimatik polikondenzasyonu ile ilgili bir başka çalışmada, lipaz, laktik asit (substrat olarak) ve silika jel (ortamda bulunan suyu çekmek amacıyla) kullanılmıştır. Bu çalışmada polimerizasyon reaksiyonu şu şekilde tarif edilmiştir:

Lipaz, silika jel, laktik asit ve çözücü 37°C'de yağ banyosunda 150 rpm'de karıştırılmış ve piridin ilavesi ile çözünmeyen monomer ve oligomerlerin çözünmesi sağlanmıştır. Reaksiyona girmeyen enzim ve substrat, santrifüj ile çöktürüldükten sonra, supernatant alınarak saf suda çözünmüş ve bu çözelti karboksilik asit grubun titrasyonu ile analiz edilmiştir. Çalışmada değişik reaksiyon süreleri incelenmiş ve en yüksek dönüşümün %93'lük bir oranla 120 saatlik reaksiyon süresinde gerçekleştiği gözlenmiştir (Chen ve diğ., 2006).

2.6.1.2 Düşük molekül ağırlıklı polimerlerin sentezi

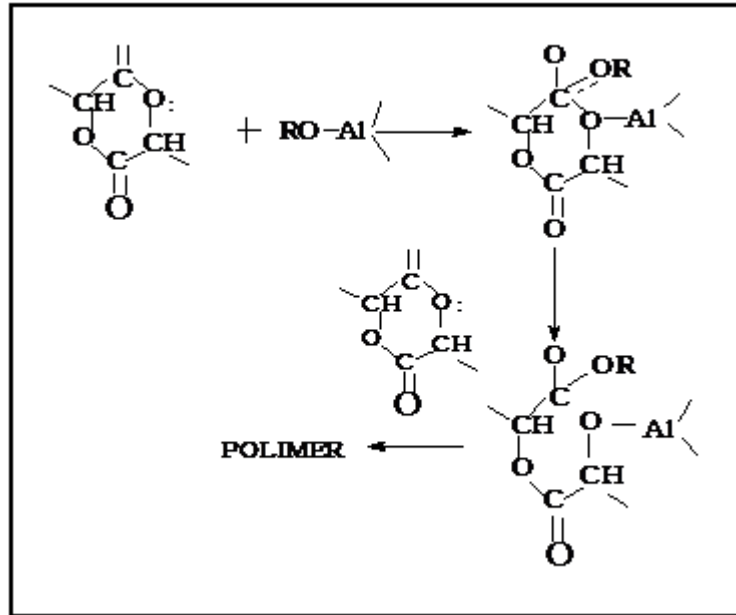
Düşük molekül ağırlıklı polimerler laktik asidin kondenzasyonu ile hazırlanabilir. (Kulkarni ve diğ., 1971). Bu proses katalizörsüz bir ortamda gerçekleşebileceği gibi organik ve inorganik tuzların metal oksitleri (kurşun, antimon oksit) ve Lewis asitleri gibi katalizörlerin olduğu ortamlarda da gerçekleştirilebilir. Düşük molekül ağırlıklı polimerlerin mekanik dayanıklılıkları olmadığından ve bozunmaları hızlı olduğundan biyomedikal uygulamalarda kullanımları limitlidir. Daha çok ilaç salım sistemleri ile ilgili uygulamalarda kullanımları mevcuttur (Wada ve diğ., 1991).

2.6.1.3 Yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin sentezi

Yüksek molekül ağırlıklı polimerler laktik asidin halkasal dimerleri olan laktatların halka açılması polimerizasyonu ile uygun bir katalizör eşliğinde gerçekleşir. Halka açılması polimerizasyonunun birçok avantajı vardır. Öncelikle sistemde suyun uzaklaştırılması için çaba göstermeye gerek yoktur. Halkasal dimerlerin ve lineer polimerin fiziksel özellikleri oldukça farklı olduğundan saflaştırma işlemleri problemli değildir (Rak ve diğ., 1985).

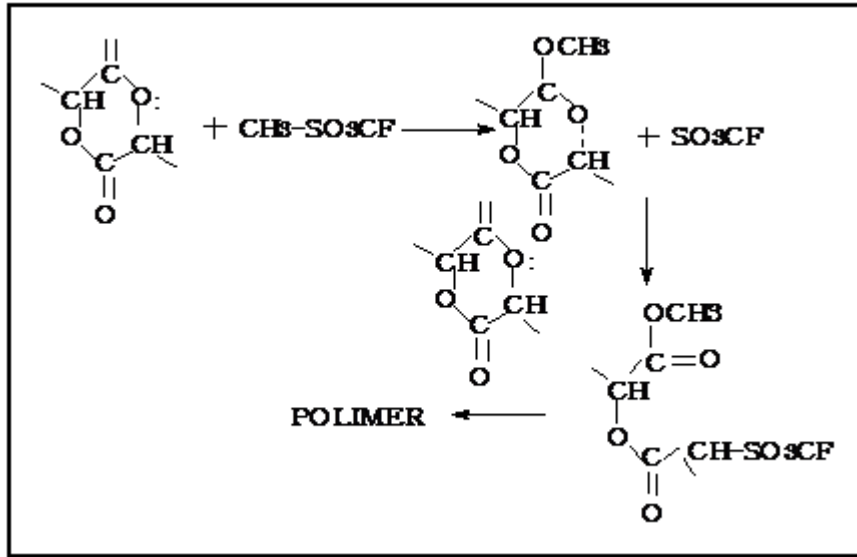
2.6.1.4 Halka açılması polimerizasyonu

Laktatın halka açılması polimerizasyonunun mekanizması ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Genel olarak polimerizasyonun, laktatın ester grubundaki oksijenlerden birisine elektrofilik bir etki ile başlatıldığı öne sürülmektedir. Polimerizasyon mekanizmasını açıklayan iki alternatif çalışma vardır. Birincisi, Vion, Kumar ve Kissel tarafından öne sürülmüştür. Buna göre polimerizasyon mekanizması Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5: Vion, Kumar ve Kissel tarafından öne sürülen halka açılımı reaksiyon mekanizması.

Benzer şekilde ikinci hipotetik mekanizma çalışması Kricheldorf ve Dunsing tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tezin öne sürdüğü polimerizasyon mekanizması ise Şekil 2.6'da verilmiştir.

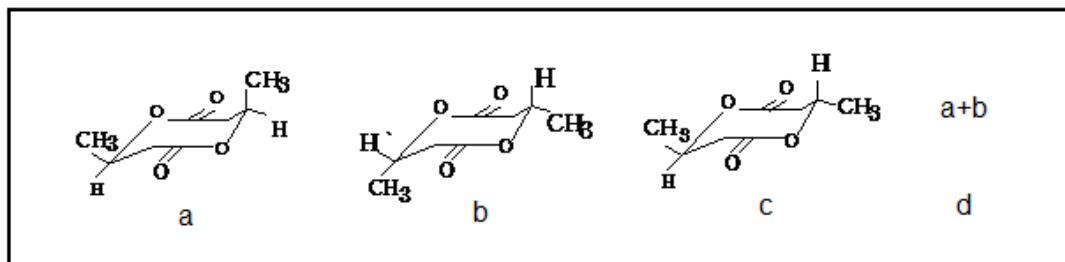


Şekil 2.6: Kricheldorf ve Dunsing tarafından öne sürülen halka açılımı reaksiyon mekanizması.

2.6.2 Laktik asit polimerlerinin karakterizasyonu

2.6.2.1 Polimer kompozisyonunun belirlenmesi

Laktik asidin, yapısında bir asimetrik karbon atomu bulunduğundan, iki optik izomeri vardır. İki laktik asit molekülü laktat oluşturmak üzere biraraya geldiklerinde farklı ürün ortaya çıkabilir. Bu stereoizomerler D-laktat (iki D-laktik asit monomerinden oluşur), L-laktat (iki L-laktik asit monomerinden oluşur) ve mesolaktat (her ikisinin de eşit miktarlarda ortamda bulunması ile oluşur) (Şekil 2.7) (Benicewicz ve Hoppler, 1991).



Şekil 2.7: Laktat stereoizomerleri (a) D-laktat (b) L-laktat (c) mesolaktat (d) D,L-laktat.

Laktat izomerleri birbirinden morfolojik olarak farklı 4 çeşit polimer oluşturabilir. Optikçe aktif olan poli(D-laktik asit) ve poli(L-laktik asit) iki stereoregular polimerlerdir. Optikçe aktif olmayan poli(meso-laktik asit) ve poli(D,L laktik asit) iki rasemik polimerdir.

Biyomateryal olarak genellikle L(+) laktik asit polimerleri tercih edilir. Çünkü bozunma ürünü olan L(+) laktik asit vücutta varolan bir maddedir ve kolayca metabolize edilir (Holland ve diğ., 1986).

2.6.2.2 Molekül ağırlığı tayini

Molekül ağırlığı polimerlerin mekanik dayanıklılığını, eriyerek şekillenebilmesini etkileyen en önemli faktördür. Bunun yanı sıra, bozunma hızı da molekül ağırlığına bağlıdır. Polimerin molekül ağırlığını monomer saflığı, polimerizasyon sıcaklığı, polimerizasyon süresi, katalizör konsantrasyonu ve zincir kontrol ajanlarının varlığı etkiler.

Leenslang ve diğ. (1987), poli(L-laktat) için katalizör konsantrasyonun molekül ağırlığına etkisini incelemişler ve sonuçta polimerizasyonun başlayabilmesi için en düşük miktarda katalizöre ihtiyaç olduğunu ancak artan katalizör konsantrasyonunun molekül ağırlığını düşürdüğünü göstermişlerdir.

Polimerlerin molekül ağırlığı GPC veya viskozimetre kullanılarak tayin edilir. GPC ile molekül ağırlığı 400-3000000 g.mol⁻¹ arasında değişen monodispers polistren partiküller standart kabul edilerek molekül ağırlığı tayin edilir. Viskozimetrik tayinler için Ubbelohde viskozimetresi kullanılır. Laktik asit polimerlerinin karakterizasyonunda en çok kullanılan değer molekül ağırlığının göstergesi olan görünür viskozite değerleridir.

Görünür viskoziteyi molekül ağırlığına bağlayan eşitlik Mark- Houwink eşitliği olarak bilinir:

$$(\eta)=K.M_v^a$$

şeklinde ifade edilir. Bu eşitlikte M_v viskozite ortalama molekül ağırlığını, η sayıca viskoziteyi, K ve a'da sabit sayıları göstermektedir. Bu sabitler için yaygın olarak kullanılan değerler Çizelge 2.4'de verilmiştir (Leenslang ve Pennings, 1977).

Çizelge 2.4: Mark- Houwink eşitliğindeki K ve a sabitleri.

Polimer	Çözücü	Kx100	a
Poli(L-Laktik asit)	CHCl ₃ ^a	0.00246	1.49
	CHCl ₃ ^b	0.00302	0.94
Poli(D,L-Laktik asit)	CHCl ₃ ^a	0.0660	0.67
	CHCl ₃ ^b	0.0606	0.64
	Etil asetat ^a	0.0158	0.78
	Etil asetat ^b	0.0163	0.73

2.6.2.3 Kristalinite ve erime noktası

Kristalinite fiziksel özelliklerin en önemli göstergesidir. Polimerlerin kristalinite yüzdesi hiçbir zaman %100'e ulaşmaz. Yarıkristalin polimerlerin kristalin ve amorf bölgeleri mevcuttur. Kristalin bölgeler daha düzenli yerleştiğinden bu bölgelerin yoğunluğu amorf bölgelerin yoğunluğundan daha yüksektir. L-PLA'nın amorf ve kristalin bölgeleri için yoğunluk değerleri 1.29-1.248 g.cm⁻³ olarak verilir. Kristalinite yüzdesi polimer matriksin mekanik dayanıklılığını ifade ettiği için, polimer ürünün kullanım alanını da belirler (Kohn ve Langer, 1987).

2.6.2.4 Camsı geçiş sıcaklığı ve zincir hareketliliği

Laktik asit polimerlerinin camsı geçiş sıcaklığı 37°C'den daha yüksektir. Camsı geçiş sıcaklığı polimerin yapısındaki laktik asit içeriği arttıkça artar (Linhardt, 1989). Farklı kompozisyonlardaki laktik asit polimerlerinin Camsı geçiş sıcaklıkları Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5: Bazı laktik asit polimerlerinin Tg, Tm ve kristalinite değerleri.

Polimer	Tg(°C)	Tm(°C)	Kristalinite(%)
Poli(Laktik asit)	60-67	172-180	37
Poli(D,L-Laktik Asit)	55-60	-	-

2.6.2.5 Mekanik Dayanıklılık

Mekanik dayanıklılık vücut içersine yerleştirilen makrocihazlar ile gerilim altında kalacak malzemeler için önemlidir. Polimer kompozisyonu, zincir düzenliliği, kristalinite, molekül ağırlığı, mekanik dayanıklılığı etkileyen parametrelerdir. Polimer içersinde L-Laktik asit miktarı arttıkça mekanik dayanıklılık artar (Vert ve diğ., 1981).

2.6.2.6 Çözünürlük

Laktik asit polimerleri doğrusal ve hidrofobik poliestерlerdir. Bu polimerler birçok organik çözücüde çözünebilirler. Etilasetat ve metilen klorür diğerlerine göre daha az toksik olduğundan tercih edilen çözücülerdir (Çizelge 2.6) (Linhardt, 1989).

Laktik asit polimerlerinin çözünürlüğünü etkileyen pekçok parametre vardır. Polimerin kompozisyonu ve kristalinitesi çözünürlük üzerinde çok önemli bir rol oynar. Laktik asidin kristalin yapıdaki homopolimerleri birçok organik çözücü içersinde çok iyi çözünmez. Bunun yanında amorf yapıdaki D,L-laktik asit homo ve kopolimerleri birçok organik çözücüde kolaylıkla çözünür.

Çizelge 2.6: Laktik/Glukolik asit polimerleri için çözünürlük parametreleri

Çözücü Türü	$\delta(\text{J.m}^{-3})^{0.5}$
Etil asetat	18.6
Tetrahidrofuran	18.6
Benzen	18.8
Kloroform	19.0
Metilen klorür	19.8
Etilen diklorür	20.1
Aseton	20.3
Dioksan	20.5
Hekzafloroisopropanol	-
Asetnitril	24.3
Dimetil formamid	24.8
Su	47.9
Metanol	29.9

2.7 Biyobozunma ve Polimerler

Biyobozunma, polimerlerin karbon dioksit, metan, su, inorganik bileşikler ya da mikroorganizmalarla meydana getirdikleri enzimatik reaksiyonları sonucunda oluşan biyolojik kütlelere ayrışabilme yeteneği olarak tanımlanabilir. Biyobozunma, genellikle mikroorganizmalar ve enzimlerin varlığında gerçekleşen katabolizma reaksiyonlarıyla organik maddelerin bozunmaya uğraması olayıdır. Doğada meydana gelen bozunma ise, termal aktivasyon, hidroliz, biyolojik aktivite, oksidasyon, fotoliz ve radyoliz yollarıyla meydana gelir. Bozunma olayları, maddenin kimyasal yapısında önemli değişikliklere sebep olur. Bozunma sonucu oluşan son ürünler, aerobik ortamda karbon dioksit, yeni biyokütle ve su; anaerobik ortamda ise metan halinde meydana gelir. Bozunma analizinde aktiviteyi etkileyen sıcaklık, pH, nem gibi koşulların kontrol altında tutulması önemli bir faktördür. Biyobozunma, polimerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine de bağlıdır. Bu özellikler, difüzyon, porozite, morfoloji, saflık, çapraz bağlanma, kimyasal reaktivite, mekanik dayanım, ısı tolerans ve elektromanyetik radyasyona olan dayanımdır. Ayrıca, hidrofobik karakter, makromoleküler ağırlık, kristalinite gibi parametrelerdeki artış, biyobozunma oranını düşürürken, bozunma ortamında polisakkaritlerin varlığı, biyobozunmayı kolaylaştırır (Shimao, 2001).

Biyobozunabilen polimerler, insan ve hayvan vücudu gibi canlı hücrelerde ve mikroorganizmaların bulunduğu toprak, atık, deniz, ırmak, göl gibi ortamlarda, enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla hidroliz olabilen polimerlerdir. Polimer bozunması genellikle, makromoleküllerin ana zincirinin belirli bölgelerinde ya da yan zincirlerinde meydana gelir. Bir polimerin bozunması, kimyasal, fiziksel ve biyolojik bir çok mekanizma tarafından gerçekleştirilen kompleks bir süreçtir. Bozunmanın bazı evrelerinde bu mekanizmalar eş zamanlı olarak da gerçekleşebilir (Tomita ve diğ., 2004; Jukka, 2003).

Çok sayıda biyobozunur polimer yapay olarak sentezlenebilir ya da organizmaların yaşam çevrimleri sürecinde doğal olarak oluşabilir. Sentez proseslerine göre biyobozunur polimerler dört farklı sınıfa ayrılmıştır. Aşağıda gösterilen kategorilerden ilk üçü yenilenebilir enerji kaynaklarından elde edilen polimerleri gösterirken, son üç kategori de biyobozunmaya uğrayabilen polimerleri ifade eder (Averous, 2004).

- Biyokütleden oluşan polimerler, örneğin toprak kaynaklı agro-polimerler (nişasta, selüloz)
- Mikrobiyal üretimle elde edilen polimerler (polihidroksialkanoat-PHA)
- Toprak bazlı kaynaklardan elde edilen monomerlere, kimyasal ve ticari olarak sentezlenebilen polimerler (PLA)
- Monomeri de kendisi de ticari olarak kimyasal sentezle elde edilen polimerler.

Biyobozunur polimerler belirli zaman aralıklarında bozunmaya uğrarlar fakat, bu süreç boyunca oluşan küçük moleküllerin çeşitlerinin bilinmesi önemlidir. Oksitlenebilen polimerlerin bozunma ürünleri çok kompleks olmakla birlikte, hidroliz olabilen polimerler en fazla 3 ya da 4 bozunma ürünü oluşturur (Shyamroy, 2003).

Biyobozunabilen polimerler, kağıt kaplama, paketlenme, fiber, film ve diğer tek kullanımlık malzemelerin üretiminde kullanıldıkları gibi, çürüyebilen cerrahi dikiş ipleri üretimi, protez üretimi, ve kontrollü ilaç salımı gibi biyomedikal uygulamalarda da günden güne artan bir oranla kullanılmaktadır. Bu gibi uygulama alanları, kullanılacak polimer ve monomer özellikleri açısından birçok gereklilik getirmektedir. Bu gibi polimerler, biyobozunabilen, toksik olmayan, ya da biyomedikal uygulamalar için, eriyip çürüyebilen ve vücutla uyumlu olan polimerler olmalıdırlar. Ayrıca, kimyasal, mekanik ve termal özelliklerinin de iyi olması gereklidir. Buna ek olarak, fosil kaynakların kullanımının azaltılması açısından paketlenme sektöründe kullanılacak olan polimerler, yenilenebilir enerji kaynaklarından elde edilmeli ve çürüyebilme özelliğine sahip olmalıdırlar. Bunun dışında, hammadde ve son ürünler, düşük maliyetli olmalı ve endüstriyel ölçekli üretim prosesleri de ekonomik, verimli ve çevre dostu olmalıdır (Jukka, 2003).

Polimerlerin paketlenme uygulamalarında kullanılması, oluşan atık ürünlerin özellikleri sebebiyle, çevre açısından önemli etkilere sahiptir. Paketlenme uygulamalarında kullanılan plastik atıkların yok edilmesi, mekanik geri dönüşüm işlemleriyle gerçekleştirilebilir.

Ancak bu gibi işlemler, bazı uygulamalar açısından yüksek enerji gerektirmekte, pratik ve ekonomik olmamaktadır. Bu gibi uygulamalarda biyobozunabilen polimerlerin kullanımı, plastik kullanımına kıyasla büyük oranda avantaj sağlamaktadır (Jukka, 2003). Biyobozunabilen polimerlerin kullanımının diğer bir avantajı da, yenilenemeyen kaynaklardan elde edilen petrol bazlı kimyasallara iyi bir alternatif oluşturmalarıdır.

2.7.1 Polimerlerin biyolojik bozunma mekanizmaları

Polimerlerin biyolojik olarak bozunması birkaç basamaktan meydana gelmektedir. Ayrıca bozunma işlemi istenen herhangi bir basamakta durdurulabilmektedir.

- Mikroorganizmaların, diğer bozucu etkiye sahip organizmaların ve abiyotik faktörlerin etkisiyle, bozunabilen malzemelerin küçük parçalara ayrılmasına biyodeterirasyon denir.
- Mikroorganizmalar enzim ya da serbest radikaller gibi katalitik ajanlar salgılayarak polimer moleküllerini parçalayabilmekte ve polimer moleküllerinin molekül ağırlığını azaltabilmektedirler. Bu işlem sonucunda oligomerler, dimerler ve monomerler oluşmaktadırlar. Bu parçalanmanın gerçekleştiği basamağa depolimerizasyon denir.
- Bazı moleküller ise mikroorganizma tarafından tanınıp hücre içine alınırken bazı moleküller hücre dışında kalarak çeşitli değişimlere maruz kalmaktadırlar.
- Hücre içine alınan molekül enerji, biyokütle ve birçok birincil ve ikincil yapıyı üretmek amacıyla, sitoplazmada mikroorganizmayla bütünleşir. Bu basamağa asimilasyon denir.
- Asimilasyon sonucunda açığa çıkan N_2 , CH_4 , H_2O gibi basit moleküller hücre zarından geçerek çevreye salınabilmektedir. Bu basamağa ise mineralizasyon denmektedir (Lucas ve diğ., 2008).

2.8 Abiyotik Bozunma

Polimerler çevre koşullarına maruz kaldıklarında bazı değişimler geçirebilmektedirler. Çevre koşulları polimerlerin biyolojik bozunma kabiliyetlerini etkilemektedir. Abiyotik etkenler polimerin yapısını zayıflatmaktadır. Bazen bu etkenler bozunmayı başlatıcı ya da ilerletici etkiler göstermektedirler (Lucas ve diğ., 2008).

2.8.1 Mekanik bozunma

Mekanik bozunma basınç, gerilim ve çekme gibi kuvvetlerin uygulandığı sistemlerde oluşmaktadır. Genellikle etkisi hemen görülmeyen makroskobik seviyede hasarlar vermektedir, buna ek olarak moleküler seviyede bozunmayı başlatabilmektedir. Mekanik faktörlerin biyolojik bozunma üzerinde büyük bir etkisi olmamakla birlikte verilen hasar bozunmanın başlamasına ya da hızlanmasına neden olabilmektedir (Lucas ve diğ., 2008).

2.8.2 Foto bozunma

Birçok malzeme gibi polimerler de ışığa duyarlıdır. Güneş ışınlarının polimerler üzerindeki etkisi abiyotik bozunma açısından önemli bir etkidir. Foto bozunma polimerin fotoiyonizasyona uğramasıyla gerçekleşmektedir. Ardından zincirin parçalanması gerçekleşmektedir.

Foto bozunmayla parçalanması amaçlanan polimerlere yapım aşamasında ışığa hassas maddeler eklenmektedir. Bu yöntem özellikle plastik kutuların, paket malzemelerinin ve tarımsal malzemelerin bozunmasını arttırmak amaçlı kullanılmaktadır (Lucas ve diğ., 2008).

2.8.3 Termal bozunma

Termal bozunma polimerlerin erime sıcaklığında katıdan sıvıya geçişi sırasında meydana gelmektedir. Bozunabilen polimerler yarı kristal yapıdadırlar. Bu polimerler amorf ve kristal bölümler içermektedirler. Yapısal değişiklikler camı geçiş sıcaklıklarını (T_g) değiştirmektedir. T_g 'nin üzerindeki sıcaklıklarda, zincirlerdeki düzensizlik kimyasal ve biyolojik bozunmaya yardımcı olmaktadır (Lucas ve diğ., 2008).

2.8.4 Kimyasal bozunma

Kimyasal bozunma bir diğer önemli abiyotik bozunma mekanizmasıdır. Biyolojik bozunmaya neden olan en güçlü kimyasal oksijendir. Oksijenin atmosferde bulunan formları (O_2 ve O_3) kovalent bağlara saldırarak serbest radikaller oluşturmaktadır. Oksidatif degradasyon polimerin doymamış bağ sayısı ya da dallanmış zincir içeriği gibi yapısal özelliklerinden etkilenmektedir. Oksidatif degradasyon sonucunda oluşan peroksi radikalleri, çapraz bağlanma ya da zincir bölünmesi reaksiyonlarına neden olabilmektedir.

Hidroliz reaksiyonları bir diğer kimyasal bozunma mekanizmasıdır. Hidroliz reaksiyonları asidik (HCl ve H_2SO_4) ya da bazik ($NaOH$) ortamda gerçekleştirilmektedir. Suyla parçalanmanın gerçekleşebilmesi için polimerin ester, eter, anhidrit, amid, üre, ester amid (üretan) gibi gruplarının hidrolizlenebilen kovalent bağ içermesi gerekmektedir. Hidroliz pH, sıcaklık ve süre gibi etkenlere bağımlıdır (Lucas ve diğ., 2008). Ayrıca yapının hidrofilikliği ve sert kısım içeriği de hidroliz reaksiyonlarını etkilemektedir. Sert kısım içeriği yüksek olan polimerler suyun yapının içine girmesini engelledikleri için bozunmayı zorlaştırmaktadırlar (Umare ve Chandure, 2008).

İyi düzenlenmiş moleküler yapıya sahip polimerler (kristal yapı ağırlıklı) O_2 ve H_2O difüzyonunu engellerler. Bu nedenle bu yapılardaki kimyasal bozunma daha sınırlıdır. İyi düzenlenmemiş yapıya sahip polimerlerde (amorfs yapı ağırlıklı) oksidatif ve hidrolitik bozunma çok daha kolay gerçekleşmektedir (Lucas ve diğ., 2008).

2.8.5 Enzimatik hidroliz

Biyofragmentasyon oksidoredüktaz ve hidrolaz grubu enzimlerle ilgilenmektedir. Selüloz, amilaz ve kütinaz toprakta yaşayan bakteriler tarafından doğal polimerlerin hidrolizini gerçekleştirmek amacıyla sentezlenmektedirler. Lipaz ve esterazlar karboksilik yapının içerdiği bağları kırarken, endopeptidazlar amid grubundaki bağları parçalamaktadırlar (Lucas ve diğ., 2008).

2.8.6 Enzimatik oksidasyon

Eğer parçalanma reaksiyonu tek bir enzim tarafından gerçekleştirilemiyorsa, parçalanma başka enzim ilavesiyle gerçekleştirilir. Örneğin; mono-oksijenaz ve di-oksijenaz birlikte kullanılarak sırasıyla kolay parçalanabilir alkol ve peroksi grupları oluşturlar. Peroksidazlar, peroksi molekülünün, fenol, fenil, amino, karboksil gibi elektron alıcı gruplarla reaksiyonunu katalizler (Lucas ve diğ., 2008).

2.8.7 Radikal oluşumuyla gerçekleşen oksidasyon

Hidroksil fonksiyonuna ek olarak karbonil ve karboksil gruplarının oluşumu molekülün polaritesini arttırmaktadır. Bileşiğin higroskopik karakterinin artması biyolojik saldırıları arttırmaktadır. Bazı oksidasyon reaksiyonları zincir reaksiyonlarına katılan serbest radikaller üreten enzimler tarafından katalizlenmektedir. Kristal yapılu moleküllerde, yapının iç kısmına ulaşmanın zorluğu nedeniyle, enzimatik reaksiyon etkili olamamaktadır. Oksidasyon sırasında oluşan serbest radikaller yapının içine difüze olup polimerin parçalanmasını sağlarlar (Lucas ve diğ., 2008).

2.9 Enzimler

Enzimler kimyasal katalizörlerle aynı etkiyi gösteren biyolojik katalizörlerdir. Kimyasal reaksiyona uygun olmayan ortamlarda, aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırır. Enzimlerin varlığıyla reaksiyon hızında 10^8 - 10^{20} oranında bir artış gözlenir. Birçok enzimin en önemli özelliği, üç boyutlu kompleks bir yapıya sahip olan polipeptit zincirleri olmalarıdır. Enzim aktivitesi konformasyonel yapıyla yakından ilişkilidir. Enzimlerin üç boyutlu yapısı, yüzeye yakın bölgelerde, spesifik aminoasit dizisine sahip olan ve aktif merkez olarak bilinen cep benzeri yapılar oluşturur. Aktif merkezde, enzimle substrat arasında, belirli bir ürün oluşturan kimyasal reaksiyon gerçekleşir. Optimum aktivite göstermek amacıyla, bazı enzimler, sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum ya da çinko gibi metal iyonu olabilen kofaktörlerle etkileşirler. Organik kofaktörler ise, koenzim olarak bilinir ve B vitamini (thiamin, biyotin), NAD⁺, NADP⁺, FAD⁺, ATP gibi farklı yapılarda olabilir. Enzim ve kofaktörün birlikte oluşturdukları yapı, haloenzim olarak bilinirken, kofaktörü olmayan enzim ise apoenzim olarak adlandırılır (Chandra ve Rustgi, 1998). Bütün enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından adlandırılır.

Enzim isimleri, gerçekleştirdikleri kimyasal reaksiyon ve substratlarıyla ilgili bilgi verir. Enzimle substrat arasında gerçekleşen ilk temas, aktif merkezde optimal bir konformasyona sebep olurken, enzim-substrat arasında maksimum bağ oluşabilmesine olanak verir (Chandra ve Rustgi, 1998).

2.9.1 Proteazlar

Aoki ve diğ. (1995) yaptıkları çalışmada açıkladıklarına göre, proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynadıklarını ve böylece besin döngüsünü sağladıklarını ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerine yardımcı olduklarını açıklamışlardır. Proteazlar, enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve oldukça farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz sentezinin hücresel kontrolünden sorumlu mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Mabrouk ve diğ. (1998) ve Kaur ve diğ. (2001), proteaz ile ilgili yaptıkları çalışmada, küçük şekerler ve minerallerin proteaz enziminin sentezlediği reaksiyonları etkilediğini belirtmişlerdir. Potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi ile endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek amaçlanmaktadır. Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık %60'ını oluşturmakta ve çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadırlar.

Proteazlar arasında bakteriyel proteazlar, hayvansal ve fungal proteazlara kıyasla daha etkindirler (Banerjee ve diğ., 1999). Bu nedenle, ticari ilgiden dolayı endüstriyel olarak uygun proteazları üreten mikroplar çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Mehrotra ve diğ., 1998). Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilseler de (Singh ve diğ., 2000) çok çeşitli ortamlardan izolasyonu nispeten daha kolay olmasından dolayı alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır. Bununla birlikte *Bacillus*, hem kompleks hem de sentetik ortamda gelişebilmektedir. Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya dayanmaktadır (Johnvesly ve Naik, 2001; Aunstrup, 1981; Fogarty ve Kelly, 1979). Ayrıca *Bacillus* türleri post-eksponansiyal ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir (Mabrouk ve diğ., 1998).

Mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimler dünya çapında deterjan endüstrilerinde en fazla kullanım alanı bulan enzimlerdir. 30 yıl boyunca deterjanlardaki proteazların önemi küçük bir katkı maddesi olmaktan anahtar bileşenlere kadar değişmiştir. İyi bir deterjan enzimi oksitleme ajanı ve ağartıcılarla beraber kararlılığını koruyabilmelidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı ağartma/oksitleme ajanlarının varlığında kararlılığını koruyamamaktadır.

Bu nedenle enzim bazlı deterjanların kararlılıklarının artırılması için sahip olması için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikrobiyal çeşitliliği derinlemesine inceleyerek ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların bulunma olasılığı daima vardır (Oberoi ve diğ., 2001). Klasik olarak deterjanlar yüksek yıkama sıcaklıklarında kullanılmaktadır.

Diğer taraftan günümüzde deterjan endüstrisinde, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapılmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni alkali proteazlar üzerinde durulmaktadır (Jasvir ve diğ., 1998).

2.9.2 Lipazlar

Abbas ve diğ. (2002), yaptıkları çalışmaya göre, lipazlar, enzim grupları içerisinde çok yönlü işleyişe sahip olan katalizörlerdir. Yağlar ve yağ asidi esterlerini hidroliz ederler. Enzim, emülsiyonun yağ-su geçiş fazında katalizi gerçekleştirir ve enzim reaksiyonunun hızı, oluşan yağ-su yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substrat'ın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. 4-10 C atomlu yağ asitleri daha uzun C zincirli yağ asitlerinden daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler.

Lipaz enzimi, katalizlediği yağ asitlerinin hidroliz reaksiyonunun yanı sıra, esterifikasyon, amidasyon ve esterlerin transesterifikasyonu gibi çeşitli reaksiyonları da uygun koşullarda gerçekleştirirler. Lipazlar regioselektif (yer seçicilik) ve stereoselektif (geometrik izomerin optik izomerlere veya optik izomerlerin geometrik izomerlere dönüşmesi) yapıdaki substratlar ile çalışmaya elverişlidir. Lipazlar organik çözücüler ve yüksek sıcaklık gibi olumsuz koşullara karşı yüksek kararlılık göstermektedirler.

Amino asit dizisi bakımından birbirinden farklı çok sayıda çeşidi vardır, bunlar protein yapıları ve katalitik yapıları bakımından incelendiğinde dahi birkaç tipten oluşurlar. Bunların çoğu alfa/beta hidrolaz katlanmasına sahiptirler. Kullandıkları hidroliz mekanizması kimotripsininkine benzer, bir serin nükleofil, bir asit kalıntı (genelde aspartik asit) ve bir histidinden oluşur. Gram negatif bakteriler tarafından üretilen çoğu lipaz, biyolojik olarak aktif biçimlerine kavuşabilmek için, doğru katlanmalarını sağlayan, kendilerine has bir yardımcı proteine gerek duyarlar. Lipazlar gıdasal trigliseritlerin rutin metabolizmasından, sinyal transdüksiyonu ve enflamasyona kadar çok çeşitli biyolojik süreçlerde yer alırlar. Bazı lipazlar hücre içinde belli bölmeler ile sınırlıdır, diğerleri ise hücre dışı mekanlarda işlev görürler (Hiol ve diğ., 2002).

Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.* Mikroorganizmaları tarafından üretilmektedir. Son yıllarda biyoteknoloji alanında lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle lipazların aşırı üretimini sağlamak amacıyla yönlü mutasyonlar yardımıyla suş geliştirme çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

2.10 PLA'nın Bozunma Mekanizmaları

Polilaktik asidin, kristallliği, yönelimi ve enzimatik bozunabilirliğiyle ilgili pek çok kantitatif korelasyon yapılabilir. Polilaktik asidin enzimatik bozunabilirliği, kristal özellikleri arttıkça azalmaktadır (Scott, 2004).

Safsızlıkların ve artık monomer oranının artışının yanında peroksit modifikasyonlarının da hidroliz oranını artırdığı görülmüştür. Doğada, herhangi bir molekül ağırlığına sahip PLA'yı bozunmaya uğratabilen mikroorganizmaların varlığı hala tartışma ve araştırma konusudur. PLA'nın veya oligomerlerinin, seçilmiş bazı mikroorganizma gruplarına maruz bırakıldığı birkaç çalışma mevcuttur.

Bu çalışmalarda genel olarak, molekül ağırlığının artışının başlangıç olarak hidroliz oranını azalttığı, fakat başlangıç abiyotik bozunmadan sonra biyotik ortama maruz bırakılan örneklerin molekül ağırlıklarının, abiyotik ortama maruz bırakılan örneklerin molekül ağırlıklarından daha hızlı azaldığı tespit edilmiştir. Pronaz, proteaz K gibi enzimlerin varlığının, PLA'nın bozunma oranını arttırdığı görülmekle birlikte, esteraz ve laktat dehidrojenaz gibi enzimlerin bozunmaya olan etkileri halen araştırma konusudur (Scott, 2004).

PLA'nın asit katalizli hidrolizinde, ester omurga bağlarının rastgele bölünmesinin baskın olduğu poly(ϵ -caprolactone) (PCL) hidrolizine tezat olarak, zincir uç bölünmesi baskındır. PLA'nın serbest karboksilik asit fonksiyonunun, esterifikasyon gibi bazı işlemlerle sınırlanması, hidroliz direncini arttırmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır.

PLA'nın hidrolizi, hem hücre içi hem de hücre dışı ortamlarda yaygın olarak çalışılan bir konudur. PLA'nın bozunma mekanizması, polimerin maruz kaldığı biyolojik ortama göre değişir. Memeli metabolizmasında PLA genellikle, ilk olarak hidrolizle bozunmaya uğrar ve oluşan oligomerler, hücreler veya enzimler tarafından metabolize veya mineralize edilirler. Abiyotik hidroliz, doğada, mikrobiyel biyobozunmanın oluşmasından önce, bozunmanın öncül basamaklarında ortaya çıkar. Fakat bozunma oranının, mikrobiyel topluluğun bulunduğu ortamlarda, abiyotik hidrolize göre artış gösterdiği görülmüştür. PLA polimeri pek çok uygulama için uygun özelliklere sahiptir. PLA'nın çevresel ayrışımı iki aşamalı bir prosesten meydana gelir. Bozunmanın öncül fazı sürecinde, yüksek molekül ağırlıklı poliestер zincirleri, daha düşük molekül ağırlıklı oligomerlere hidroliz olur. Bu hidroliz reaksiyonları asit ve bazlar tarafından hızlandırılabilir veya sıcaklık ve nem seviyesi gibi özellikler tarafından etkilenebilir. Ortamda bulunan mikroorganizmalar, düşük molekül ağırlıklı bileşikler karbondioksit, su ve humusa kadar parçalayarak bozunma prosesine devam eder (Khalil, 2006).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Materyal

Çalışmada yemekhane atıkları, İstanbul Teknik Üniversitesi Sağlık, Kültür ve Spor Daire Başkanlığı Yemek İşletmeleri'nden temin edilmiştir. Yemekhane atıkları olarak makarna-süt, pilav-bezelye-salata içeren karışımlar kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus casei* Alman DSMZ firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. MRS broth ve MRS agar Merck firmasından alınmıştır. Bovine serum albumin, maya ekstratı, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve CaCO_3 Sigma'dan temin edilmiştir. Polilaktik asit, enzimatik polimerizasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), Carlo Erba firmasından temin edilmiş olup fosfat tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Merck firmasından temin edilmiştir ve potasyum dihidrojen fosfat çözeltisiyle beraber fosfat tampon çözeltisinin ve sitrik asit ile beraber McIlvaine tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Borik asit, Labkim firmasından temin edilmiştir. Sodyum hidroksit ve sitrik asit Carlo Erba firmasından alınmıştır. Deneylerde, laboratuvar şartlarında üretilen deiyonize su kullanılmıştır. DSM proteaz ve Pellusit FS proteaz enzimleri Cognis Kim. A.Ş. firmasından temin edilmiştir. *Candida antarctica* lipaz, *Candida cylindracea* lipaz ve *Candida antarctica* lipaz B, Novozyme firmasından tedarik edilmiştir. Amberlit IRA 400 ve Dowex maraton WBA BDH'dan temin edilmiştir.

3.2 Ekipmanlar

- Manyetik karıştırıcı, Ikamag*RG
- Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Perkin Elmer FT-IR Spectrum One B spectrometer
- Etüv, Binder

- Su banyosu, YUMATO, *Shaking Bath BW 400*
- pH Metre, İmolab, TWT
- X- Ray diffraksiyon, Pananalyticae, XPERT- PRO
- Diferansiyel taramalı kalorimetri, Perkin Elmer, Diamond DSC
- Taramalı elektron mikroskobu, Jeol, JSM-6390LV
- GPC, Agilent 1100 Serisi
- HPLC, Agilent 1100 Serisi
- Hassas Terazî, And, *Gr-200*

3.3 Metodlar

3.3.1 Laktik asit bakterilerinin hazırlanması

MRS besiyerinin içeriği Çizelge 3.1'deki gibidir.

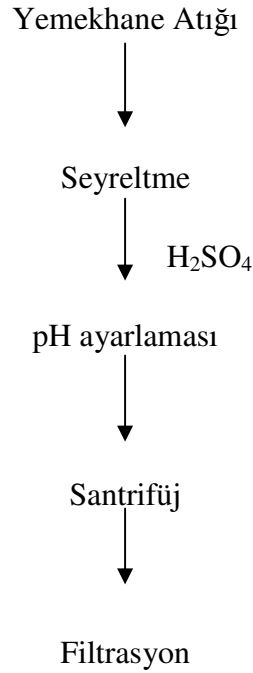
Çizelge 3.1: MRS besiyeri içeriği.

İçerik	Miktar (g)
Pepton kazein	10.0
Et özütü	10.0
Maya özütü	5.0
Glikoz	20.0
Tween 80	1.0
K ₂ HPO ₄	2.0
Sodyum Asetat	5.0
Diamonyum sitrat	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20
MnSO ₄ .H ₂ O	0.05

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar MRS Besiyerinde geliştirilmiştir. Steril koşullarda, liyofilize suş sıvı besiyeriyle seyreltilmiş buradan katı besiyerlerine azaltma yöntemiyle ekilmiştir. Daha sonra 37°C’de anaerob olarak 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda pürüzlü gri beyaz kolonilerin olduğu gözlemlenmiştir. Petriler incelenerek tek olarak düşen koloni belirlenmiş, saf olan bu koloni eğri besiyerlerine tekrar ekim yapılarak çoğaltılmıştır. Eğri besiyerlerinden belirli zaman aralıklarında pasajlar alınarak bakterilerin canlılığı korunmuştur.

3.3.2 Yemekhane atıklarına uygulanan ön işlemler

Deneylerde kullanılan yemekhane atığı numuneleri Şekil 3.1’de gösterilen yönteme göre seyreltikten sonra, 2 N H₂SO₄ ile pH’ları 6 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra 5 dakika boyunca düşük, 15 dakika boyunca yüksek hızda karıştırılan atık numuneleri kaba filtre kağıdı kullanılarak filtrasyon ile ayrılmıştır. Bu işlemle atık numuneleri içerisinde bulunan tortular ve fermantasyon işleminde olumsuz etki yapabilecek olan toksik maddelerin bir kısmı sistemden uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.1: Yemekhane atıklarına uygulanan ön işlemler.

3.3.3 Yemekhane atıklarının içeriklerinin belirlenmesi

3.3.3.1 Kuru madde

Yemekhane atıklarında kuru madde tayini 100°C’de etüvde yapılmıştır.

3.3.3.2 Kül tayini

Kül tayininde kullanılacak porselen krezeler kullanılmadan bir gün önce içerisine nitrik asit (HNO_3) konularak bekletilmiştir. Ertesi gün önce musluk suyu ile iyice çalkalanıp saf sudan geçirilerek kurutulduktan sonra sabit tartıma getirilmiştir. Daha sonra numuneden 3-5 g örnek, krezeye tartılarak alınmış ve krezeler bir gece 110°C’da etüvde bekletilmiştir. Böylece numunenin yavaş yavaş kuruması sağlanmıştır. Daha sonra 520°C’deki kül fırınına koyularak 5-6 saat bekletilmiştir. Fırından çıkarılan krezeler desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiş ve tartım alınmıştır.

3.3.3.3 Azot tayini

Atıklarda bulunan azot, Kjeldahl yöntemine göre tayin edilmiştir.

3.3.3.4 Protein tayini

Numunelerdeki protein içeriği tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemde 10, 20, 50, 100, 200, 500 ve 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ protein içeren Bovine serum Albumin standartları kullanılmış ve ölçümler spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda yapılmıştır. İnterpolasyon uygulanarak örneklerdeki protein oranları tespit edilmiştir.

3.3.3.5 İndirgen şeker tayini

Atıklarda bulunan indirgen şeker DNS (dinitrosalisilik asit) yöntemine göre tayin edilmiştir. Bu yöntemde 0.09, 0.18, 0.27 ve 0.36 mg.L^{-1} glikoz içeren standart çözeltiler kullanılmış ve ölçümler spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. İnterpolasyon uygulanarak örneklerdeki indirgen şeker oranları glikoz cinsinden tespit edilmiştir.

3.3.3.6 Toplam şeker tayini

Fermantasyon ortamlarında ve atıklarda bulunan toplam şeker oranı, Fenol- Sülfirik Asit yöntemine göre tayin edilmiştir. Bu yöntemde 20, 40, 60, 80 ve 100 mg.L⁻¹ sakkaroz içeren standart çözeltiler kullanılmış ve ölçümler spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda yapılmıştır. İnterpolasyon uygulanarak örneklerdeki toplam şeker oranları sakkaroz cinsinden tespit edilmiştir.

3.3.4 Laktik asit tayini

Örneklerdeki laktik asit miktarları HPLC ile ölçülmüştür. Numuneler analiz edilmeden önce santrifüjlenmiş ve mikrofiltreden geçirilmiştir. Agilent 1100 Series HPLC’de, Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 Analytical 4.6x150 mm 5 Micron kolon kullanılarak 1.0 mL.dakika⁻¹ akış hızında 40°C sıcaklıkta ve UV dedektörde 210 nm’de incelenmiştir. Standart olarak 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 ve 100.0 g.L⁻¹ laktik asit içeren çözeltiler kullanılmış ve interpolasyon uygulanarak ile örneklerdeki laktik asit miktarları belirlenmiştir.

3.3.5 pH ölçümü

Örneklerdeki pH değerleri pH metre ile ölçülmüştür.

3.3.6 Laktik asit bakterilerinin sayımı

Fermantasyon ortamından elde edilen hücre süspansiyonunda laktik asit bakterisi sayımı MRS Agar kullanılarak çift tabakalı dökme plaka yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemde hücre süspansiyonunun %0.1’lik peptonlu suda seyreltildikten sonra ekim yapılmış ve besiyeri iki kat halinde dökülmüştür. İkinci kat besiyerinin görevi, ekim yapılan birinci kat besiyerinin üstünü kapatmak ve anaerob koşulları oluşturmaktır. 37°C’de 48 saat inkübasyon sonunda laktik asit bakterileri sayılmış ve sonuç cfu.mL⁻¹ (g) olarak hesaplanmıştır.

3.3.7 Fermantasyonla laktik asit üretimi

Laktik asit üretiminde kullanılan fermantasyon ortamı içeriği Çizelge 3.2’de gösterilmektedir. İTÜ Yemek İşletmeleri’nden elde edilen yemekhane atıkları ön işlem uygulamaları tamamlanarak belirli sakkaroz oranlarına seyreltildikten sonra maya ekstratı ilave edilerek otoklavda 1 atm basınçta, 121°C’de 15 dakika boyunca steril edilmiştir.

Laktik asit üretiminde kullanılan mineral maddeler ve CaCO_3 ayrı olarak steril edilip fermentasyon işlemi esnasında sisteme ilave edilmiştir.

Çizelge 3.2: Laktik asit üretiminde kullanılan ortam kompozisyonu

Belirli oranda sakkaroz içeren yemekhane atığı

10 g.L⁻¹ maya ekstratı

0.5 g.L⁻¹ KH_2PO_4

0.5 g.L⁻¹ K_2HPO_4

0.63 g.L⁻¹ $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

30 g.L⁻¹ CaCO_3

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar MRS Broth veya MRS Agar'da geliştirilmiş ve +4°C'de 1 ay saklanmıştır. Her ay taze ortama ekim yapılarak kültür yenilenmiştir. MRS Broth'da geliştirilen taze kültür, fermentasyon başlangıcında aseptik şartlarda belirli oranlarda üreme ortamına ilave edilmiştir.

Kesikli sistemde gerçekleştirilen fermentasyon işleminde, içlerinde fermentasyon ortamları bulunan ve anaerobik şartlar sağlanmış olan erlenler çalkalamalı su banyosunda 37°C'ye gelinceye kadar bekletilmişlerdir. Sıvı besiyerinde homojen şekilde üremiş bakteri kültüründen, içersinde sıvı atık besiyeri bulunan erlenlere belirli aşı konsantrasyon oranlarında olacak şekilde bakteri ekilmiştir. Fermentasyon, bakteri türüne bağlı olarak farklı sıcaklık değerlerinde, değişik çalkalama hızlarında gerçekleştirilmiştir. 2-36 saat aralığında değişik sürelerde steril koşullarda alınan numuneler tüplere koyulduktan sonra 5000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjle bakterilerin dibe çökmesi sağlanmış ve berrak sıvı elde edilmiştir. Bakteriden arındırılan numune, ölçüm yapılınca dek bekletilmek üzere buzdolabında saklanmıştır.

3.3.8 Laktik asidin saflaştırılması

3.3.8.1 Laktik asidin saflaştırılması amacıyla kullanılan iyon değıştircilerin hazırlanması

Laktik asidin saflaştırılması prosesinde, Amberlit IRA 400 ve Dowex maraton WBA olmak üzere iki farklı iyon değıştirici reçine kullanılmıştır. İyon değıştircileri kapasitelerinin arttırılması amacıyla, reçineler 500 mL 1.25 N NaOH çözeltisi ile 1 gece muamele edilmiş ve daha sonra distile su ile yıkanmıştır.

3.3.8.2 Laktik asit çözeltilerinin hazırlanması

Standart laktik asit çözeltisi: %40'lık L-laktik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Fermantasyondan elde edilen laktik asit çözeltisi: Laktik asit içeren fermantasyon ortamları 6000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar toplanarak saflaştırma ünitesi için 10°C'de saklanmıştır.

3.3.8.3 Laktik asidin iyon değıştirici reçineler ile saflaştırılması

10-40 g.L⁻¹ konsantrasyonundaki standart laktik asit çözeltisi ve fermantasyondan elde edilen santrifüjlenmiş laktik asit çözeltileri (süpernatantlar), 5.0 g iyon değıştirici reçine üzerine ilave edilmiş ve 30°C'de, 180 rpm'de homojen bir dispersiyon oluşturacak şekilde, 6 saat boyunca sürekli olarak karıştırılmıştır. Alınan numuneler santrifüjlenmiş ve süpernatantta kalan laktik asit konsantrasyonları analiz edilmiştir.

İyon değıştirici reçine tarafından tutulan laktik asit miktarı, başlangıç ve son laktik asit konsantrasyonlarından hesaplanmıştır.

- Laktik asidin iyon değıştirici reçineler ile saflaştırılması işlemine pH ve sıcaklığın etkisinin incelenmesi

Sıcaklık ve pH'nın laktik asit/iyon değıştirici sisteminin kinetiği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. pH'nın Dowex maraton WBA ve Amberlit IRA-400 iyon değıştirici reçineler üzerine etkisi, 1 M H₂SO₄ çözeltisi kullanılarak, 2.0, 5.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 pH değerleri için incelenmiştir. Benzer şekilde sıcaklığın etkisinin incelenmesi için 20, 30 ve 40°C'lerde çalışılmıştır. 40°C'nin üzerinde reçinelerin yapısı bozulduğundan daha yüksek sıcaklık değerleri ile çalışılamamıştır.

3.3.9 Fermantasyonla elde edilen laktik asitten düşük molekül ağırlıklı polilaktik asit sentezi

Doğrudan polimerizasyon yöntemi ile düşük molekül ağırlıklı polilaktik asit sentezlenmiştir. Polimerizasyon aşaması iki ana adımdan oluşmaktadır. İlk adımda, atmosferik basınçta, fermantasyonla elde edilen laktik asit çözeltisi 150°C’de 2 saat ısıtılmıştır. Isıtma işleminden sonra, sistemde bulunan vakum pompası ile basınç 10 mmHg’ya düşürülmüş ve bu koşullar altında 2 saat boyunca laktik asit çözeltisi muamele edilmiştir. Böylece jelimsi ve viskoz oligomer elde edilmiştir. İkinci adım olan polimerizasyon işleminde ise, sistem aynı basınç değerinde sabit tutularak, banyo sıcaklığı 100°C’den 200°C’ye kadar değiştirilmek suretiyle, 4 ile 20 saat arasında değişik sürelerde polimerizasyon yapılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, ürün kloroformda çözülmüş, faz ayrımı sağlanmış ve dietil eter ile yıkandıktan sonra vakum etüvünde kurutulmuştur.

3.3.10 Dimer sentezi

Sentezlenen düşük molekül ağırlıklı polimerin depolimerizasyonu ile dimer sentezi yapılmıştır. Bunun için polimer, ağırlıkça %1’lik kalay klorür ile iyice karıştırılmıştır. Reaksiyon kabına alınan karışım, azot girişi ve distilasyon çıkışları tamamen kapatılıp sıcaklık 240°C’ye çıkarıldıktan sonra, 3 saat bu sıcaklıkta reaksiyona tabi tutulmuştur. Parçalanma tamamlandıktan sonra ürün çekme ağzından laktat dimeri alınmıştır.

3.3.11 Dimer ekstraksiyonu

Saflaştırılmamış dimer, oda sıcaklığında diklorometan içersinde 1 dakika karıştırılmış ve karışıma 150 mL suda çözülmüş 40 g NaCl ilave edilmiştir. Çözelti sodyum hidrojen karbonat ilavesinden sonra 2 dakika daha karıştırılmıştır. Diklorometanın oluşturduğu ayrı faz süzgeç kâğıdından süzülmüştür. Diklorometanın kalanı sıcaklık 25°C’yi geçmeyecek şekilde uçurulmuştur.

3.3.12 Laktitten ve fermantasyonla elde edilen laktik asitten enzimatik olarak yüksek molekül ağırlıklı polilaktik asit eldesi

Düşük molekül ağırlıklı laktik asit oligomeri kullanılarak elde edilen laktit dimeri ve fermantasyonla elde edilen l-laktik asit çözeltisi, farklı lipaz enzimleri katalizörlüğünde polimerleştirme işlemine tabi tutulmuştur.

2.5 mmol laktit dimeri ve 450 mg laktik asit, sırasıyla 0.72 mL ve 10 mL tolüenle karıştırılmış ve farklı kaynaklardan izole edilmiş ve ağırlıkça monomer miktarlarına bağlı olarak hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki (%2-40) lipaz enzimleri ile değişik sıcaklık (80-100°C) ve sürelerde (1-7 gün arasında) azot atmosferinde muamele edilmiştir.

Reaksiyon süresi tamamlandığında reaksiyona girmeyen enzimin alınması için bir miktar kloroform ilave edilmiş ve bundan sonra çözelti bir süzgeç kağıdından süzülmüştür. Kalan çözeltideki kloroform tamamen uçurulduktan sonra elde edilen polimer gerekli analizlere tabi tutularak karakterize edilmiştir.

3.3.13 Biyobozundurma işlemine tabii tutulan PLLA filmlerinin hazırlanması

PLLA filmleri ‘solvent casting’ yöntemi ile hazırlanmıştır. 1.0 g PLLA 20 mL kloroform içerisinde oda sıcaklığında (yaklaşık 23°C) karıştırılarak çözülmüştür. Bu karışım 24 x 30 cm büyüklüğünde üzeri teflonla kaplanmış cam yüzeye yayılmış ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Oluşan PLLA filmi yüzeyden kazınmıştır.

3.3.14 Polilaktik asidin termal olarak bozundurulması

Termal bozundurma azot atmosferinde, 10°C.dakika⁻¹ ısıtma hızında TGA cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.3.15 Polilaktik asidin hidrolitik bozundurulması

Hidrolitik bozundurma işlemleri enzim çözeltileri ve fosfat tampon (enzimsiz) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.15.1 Polilaktik asidin enzim katalizli hidrolitik bozundurulması

Enzim katalizli hidrolitik bozundurma işlemleri değişik proteaz enzimleri ve lipaz enzimi katalizörlüğünde yapılmıştır.

- Polilaktik asidin DSM proteaz enzimi ile biyobozundurulması

‘Solvent casting’ metoduna göre hazırlanan PLLA filmleri belirli büyüklüklerde kesildikten sonra proteaz DSM enzim çözeltisi içerisinde bekletilerek enzimatik bozundurma sağlanmıştır. Kullanılan proteaz DSM enziminin aktivitesi, Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.6) kullanılarak 40 unit/mL değerine ayarlanmıştır.

Enzim çözeltileri 48 saatte bir yenilenerek enzim aktivitesi sabitlenmiştir. 37°C’de çalkalamalı su banyosunda PLLA filmi, enzim çözeltisiyle muamele edilmiştir. Polimer filmleri analiz edilmek amacıyla, 4°C’de distile su ile yıkanarak bozundurma işlemi durdurulmuştur ve etüvde 70°C’de 2 saat kurutulduktan sonra gerekli analizleri yapılmıştır.

- Polilaktik asidin Pellucit FS proteaz enzimi ile biyobozundurulması

Proteaz pellucit FS enzimi kullanarak biyobozundurma işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Polilaktik asidin McIlvaine tampon çözeltisi ile biyobozundurulması

Kullanılan bu yöntemde, McIlvaine tampon çözeltisi, hacimsel oranları 3.53:16.47 olacak şekilde sitrik asit ve Na₂HPO₄ karıştırılarak hazırlanır. Bu amaçla, 19.69 mL sitrik asit ile 91.875 mL Na₂HPO₄ karıştırılarak 110 ml’lik tampon çözelti hazırlanmıştır. 1.1 g *Candida rugosa* lipaz enzimi tartılarak, hazırlanan bu tampon çözeltide çözülmüştür. PLA numuneleri enzim çözeltisi içersinde bekletilmiştir. Farklı sürelerde alınan numuneler belirli işlemlerden geçirildikten sonra 70°C’de etüvde kurutulmuş ve analiz edilmiştir.

3.3.15.2 Polilaktik asidin fosfat tampon çözeltisi ile bozundurulması

Bu metotta, 2.35 g KH₂PO₄ ile 9.89 g Na₂HPO₄ tartılıp 500 mL deiyonize suda çözülerek fosfat tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra pH 7.4’e ayarlanmıştır. Polimer filmler, hazırlanan tampon çözelti içersinde bekletilerek bozundurulmuştur. Fosfat tampon çözeltisi 15 günde bir yenilenerek bozunma işleminin verimliliği arttırılmıştır. Polimer filmler analize hazırlanmak için distile su ile yıkandıktan sonra etüvde 70°C’de yaklaşık 2 saat kurutulmuş ve analiz edilmiştir.

3.3.16 Verim Hesapları

Efektif Verim, fermentasyon sonunda oluşan laktik asidin, ortamda başlangıçtaki sakkaroz konsantrasyonuna yüzdesel oranı olarak tanımlanmaktadır.

$$\text{efektif verim, \%} = \frac{P}{S_o} \dots \dots \dots (3.1)$$

P: Fermantasyon sonunda oluşan laktik asit, g.L⁻¹

So: Başlangıçta ortamda bulunan sakkaroz, g.L⁻¹

Hacimsel Verimlilik, birim zamanda oluşan laktik asit miktarı olarak tanımlanmaktadır, laktik asit üretim hızını göstermektedir.

$$\text{verimlilik} \left(\frac{\frac{\text{g}}{\text{l}}}{\text{h}} \right) = \frac{P_t}{t} \dots \dots \dots (3.2)$$

Pt: belirli bir saatte ortamda bulunan laktik asit konsantrasyonu

t: süre (saat)

4. DENEYSEL ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1 Hammadde

Çalışmalarda kullanılan yemekhane atıklarının kimyasal bileşimi Çizelge 4.1’de verilmiştir. Fermantasyon işleminde kullanılan makarna-süt ortamının kuru madde içeriği %85.48, pilav-bezelye-salata içerikli fermantasyon ortamının kuru madde içeriği ise %88.29 olarak bulunmuştur.

Fermantasyon ortamlarının pH değerleri laktik asit bakterilerinin çalışmasına imkan verecek düzeye getirilmiş ve başlangıç aşamasında 6.0 olarak ayarlanmıştır.

Toplam şeker miktarları ise sırasıyla %56.37 ve %61.38 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1: Fermantasyon ortamlarının kimyasal bileşimi.

	Makarna-süt	Pilav-bezelye-salata
Kuru madde, %	85.48	88.29
Nem, %	15.38	7.50
Toplam şeker, %	56.37	61.38
İndirgen şeker, %	0.33	0.47
Kül, %	5.12	5.68
Azot, %	1.78	2.85
Protein, %	6.50	10.41

Denemelerde kullanılan yemekhane atıklarının indirgen şeker miktarları makarna-süt ve pilav-bezelye-salata fermantasyon ortamları için sırasıyla 0.33 ve 0.47 olarak saptanmıştır.

Toplam şeker (invert şeker + sakkaroz) miktarlarından numunelerdeki sakkaroz miktarlarına geçilirken, 1 mol sakkarozun inversiyon sırasında 1 mol su alması ve 95 g sakkarozdan 100 g invert şeker oluşmasından dolayı, toplam şeker miktarı ile indirgen şeker miktarı arasındaki fark 0.95 ile çarpılmıştır.

Makarna süt ortamına ait sakkaroz miktarı 53 g.L^{-1} ve pilav-bezelye-salata ortamına ait sakkaroz miktarı ise, 58 g.L^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Protein içerikleri sırasıyla, makarna süt ortamı için 6.50, pilav- bezelye-salata ortamı için ise 10.41 olarak tespit edilmiştir.

Literatür çalışmaları takip edildiğinde, birçok karbonhidrat içeren hammaddenin laktik asit üretimi için kullanıldığı tespit edilmiştir. Endüstriyel ya da laboratuvar bazlı olarak kullanılacak bir hammaddede; düşük maliyetli olması, az miktarda safsızlık ve kirletici madde içermesi, fermentasyon sonucunda yüksek laktik asit verimliliği sağlaması ve az yan ürün oluşturması gibi özellikler istenmektedir.

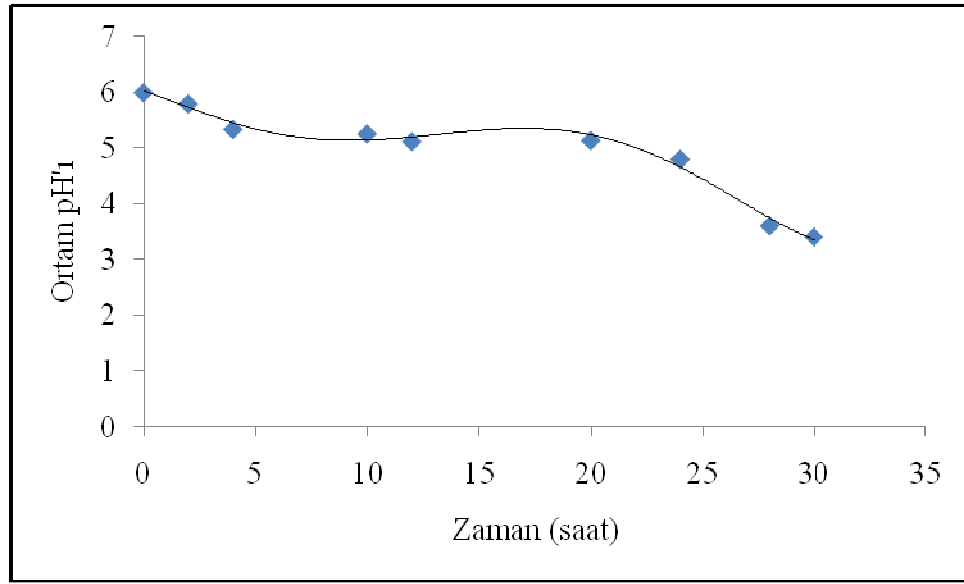
Günümüzde laktik asit üretiminde en çok sakkaroz içeren sentetik ortam, hidrolize nişastadan elde edilen maltoz ve dekstroz, laktoz içeren peynir suyu, sakkaroz içeren pancar ve kamış melası gibi klasik olarak kullanılan fermentasyon ortamlarının dışında, mısır koçanı, mısır sapı, saman gibi selülozik maddeler, kağıt fabrikası yan ürünü olan sülfite şurubu, odun gibi hammaddeler de iyi bir laktik asit kaynağı olarak literatür çalışmalarında izlenmiştir (Çelen, 1986).

Sunulan tez çalışmasında laktik asit üretiminde fermentasyon ortamı olarak kullanılan yemek atıklarıyla ilgili bir bilgi literatür çalışmalarında görülmemiştir. Yapılan deneysel işlemlerde seçilen fermentasyon ortamları, literatürde çalışılan fermentasyon ortamlarından farklılık göstermektedir ve bu farklılıktan ötürü yapılan çalışma bilimsel anlamda bir yenilik taşımaktadır. Ayrıca, yemek atıklarının doğrudan atık muamelesi görmesi dışında, bu sistemle geri dönüşüme katkıda bulunması hem endüstriyel hem de çevresel ve ekonomik açılarından bir yenilik teşkil etmektedir. Dolayısıyla, nişasta içerikli yemek atıklarını kullanarak fermentasyonla laktik asit üretimi fikrinin, endüstriyel ölçekli çalışmalara ışık tutarak, hem bilimsel hem de ekonomik arenaya yeni bir bakış getirmesi öngörülmektedir.

4.2 *Lactococcus lactis subsp lactis* ile Fermantasyon ile Laktik Asit Üretimi

4.2.1 Fermantasyon boyunca ortam pH değerinin değişiminin incelenmesi

Laktik asit üretilmesi amacıyla iki farklı yemek atığında gerçekleştirilen fermantasyon işlemlerinde, *Lactococcus lactis subsp lactis* kültürü kullanılmış ve 37°C’de 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilen proseste ortamın pH değişimi takip edilmiştir. Başlangıç sakkaroz miktarı 53 g.L⁻¹ olan makarna- süt ortamında, belirtilen koşullarda denenen fermantasyon çalışması boyunca meydana gelen pH değişikliği Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



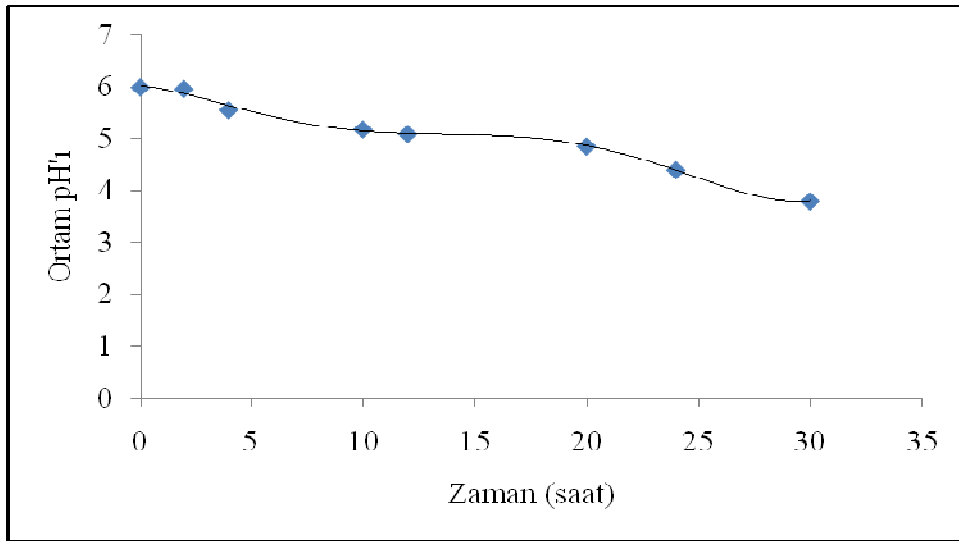
Şekil 4.1: *Lactococcus lactis subsp lactis* ile makarna-süt karışımından laktik asit eldeinde ortam pH’sının değişimi.

Fermantasyon işleminde, pH değerinin, laktik asit üretimi boyunca değişimi incelendiğinde, ilk 20 saatte ortam pH’sının 5 civarına kadar düştüğü saptanmış ve en yüksek verimle laktik asit üretiminin gerçekleştiği 20. saatte ortamın pH değeri 5.14 olarak ölçülmüştür. Bu süreden sonra ortam pH’ında belirgin bir azalma saptanmış, 28. saatte pH değerinin 4’ün altına indiği tespit edilmiş ve bu zamandan sonra laktik asit üretim hızında bir azalma meydana geldiği görülmüştür. Fermantasyon işlemi 30 saat boyunca devam ettirildiğinde, pH değerinin 3.4’e kadar düşmesi, kültürün çalışmasına elverişsiz bir ortam meydana getirdiğinden, laktik asit üretiminin durduğu tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarını fermante etmeleri sonucu, laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler üretilmektedir. Birçok mikroorganizma üretilen organik asitlere hassasiyet gösterir.

Fermantasyon süresi uzadıkça azalan pH değerlerine sahip ortamı tolere edemediklerinden dolayı, belirli pH değerlerinden sonra asit üretimi durmaktadır. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından fermantasyon esnasında üretilen H_2O_2 'de inhibitör etkisi yaparak laktik asit üretimini durdurmaktadır.

Güvenç ve Harsa (1986), peynir suyundan, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* ve *L. leichmannii*'yi karşılaştırmış ve mikroorganizmaların tümünde ilk 12 saatte ortam pH'sının 5'in altına düştüğünü saptamış ve daha sonraki sürelerde pH değeri 4'ün altına düştüğünde laktik asit üretiminin tamamen durduğunu belirtmişlerdir.

Lactococcus lactis subsp lactis ile pilav-bezelye-salata ortamında gerçekleştirilen fermantasyon işleminde, ortam pH'sının değişimi Şekil 4.2'de gösterilmektedir. İlk 24 saatte ortam pH'sının 4'ün altına düşmediği saptanmıştır. Bu pH değeri, kültürün işlevini yerine getirmesine imkan verdiği için, laktik asit üretiminin devamının söz konusu olduğu düşünülmektedir. Fermantasyonun 30. saatinde pH değeri 3.8'e kadar inmiştir ve dolayısıyla laktik asit üretimi söz konusu olamayacağı için ortama pH'sı tamponlaması amacıyla yardımcı komponentlerin eklenmesi gereklidir.



Şekil 4.2: *Lactococcus lactis subsp lactis* ile pilav-bezelye-salata karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'sının değişimi.

Organik asitlerin mikroorganizmalar üzerine inhibitor ajan olarak etki etmeleri, asitlerin sahip oldukları farklı iki önemli potansiyel etkiye bağlanmaktadır. Kuvvetli asitler düşük eksternal pH değerlerine sahiptirler. Fakat kendi kendilerine hücre membranlarından geçememektedirler. Bu asitler düşük pH'ları nedeniyle hücre yüzeyindeki enzimleri denatürasyona uğratarak inhibitör etkisi gösterebilirler.

Ayrıca hücre içi ve hücre dışı pH gradyeni çok yüksek olduğunda hücre zarının proton geçirgenliğinin artmasıyla sitoplazmik pH'nın düşüşüne sebep olabilirler.

Zayıf asitler ise hücre membran duvarından kolaylıkla geçebilmektedirler. Bu asitlerin ilk etkisi sitoplazmik pH'sı düşürmeleridir. Fakat doğrudan disosiyasyon olamamış formları da metabolizma üzerine spesifik inhibitör etkisindedir.

Laktik asidin zayıf bir asit olması ve fermentasyon esnasında yan ürün olarak açığa çıkan farklı zayıf asitlerin (fumarik asit, malik asit vb.), kültürün metabolik yapısını bozması nedeniyle inhibisyon etkisi görülür. Bu nedenlerden dolayı, pH kontrolü fermentasyon işlemlerinde büyük önem taşımaktadır.

Guoqiang ve diğ. (1991), kalsiyum aljinat üzerine immobilize ettikleri *L.lactis* ile glikoz içeren sentetik ortamdan laktik asit üretiminde pH kontrolü yapılmadığı zaman asit oluşumuna bağlı olarak pH değerinin 3.5'in altına düşerek fermentasyonu durdurduğunu belirtmişlerdir.

Laktik asit fermentasyonu boyunca, ortam pH değerlerinin azalması ve ilerleyen fermentasyon sürelerinde kültürlerin yaşamasına imkan vermeyecek kadar düşük seviyelere inmesi literatür çalışmalarıyla örtüşmektedir. Ancak *L.lactis* kültürü ile laktik asit fermentasyonunda kullanılan her iki fermentasyon ortamı için de ortam pH değerinin kritik 4.0 değerinin altına inmesi literatür çalışmalarına kıyasla daha uzun sürmektedir. İlk 24 saatte her iki ortamda da pH'nın kültürün çalışmasını engelleyecek şekilde azalmaması, seçilen ortamların diğer kullanılan ortamlara göre bir avantajı olarak karşımıza çıkmaktadır. Öte yandan ortam pH'sını tamponlamak amacıyla sisteme hiçbir katkı maddesi ilave edilmese bile belirtilen sürede oluşan laktik asit miktarı, gerek laboratuvar gerekse endüstriyel ölçekli çalışmalar için yeterli miktardadır.

4.2.2 *Lactococcus lactis subsp lactis* ile fermentasyonla laktik asit üretimine CaCO₃ miktarının etkisi

Literatür çalışmaları takip edildiğinde, laktik asidin fermentasyonunda NaOH ve CaCO₃ ile asitliğin nötralize edilerek pH'nın kontrol edildiği denemeler arasında laktik asit oluşumu ve verim değerleri açısından küçük farklılıklar olduğu saptanmıştır (Göksungur, 1998).

Fermantasyon sırasında NaOH çözeltisinin sürekli olarak ortama ilave edilmesine bağlı olarak fermantasyon sıvısının hacminde önemli oranda bir artış olduğu ve ürünlerdeki laktik asit yüzdesinde de buna bağlı olarak bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

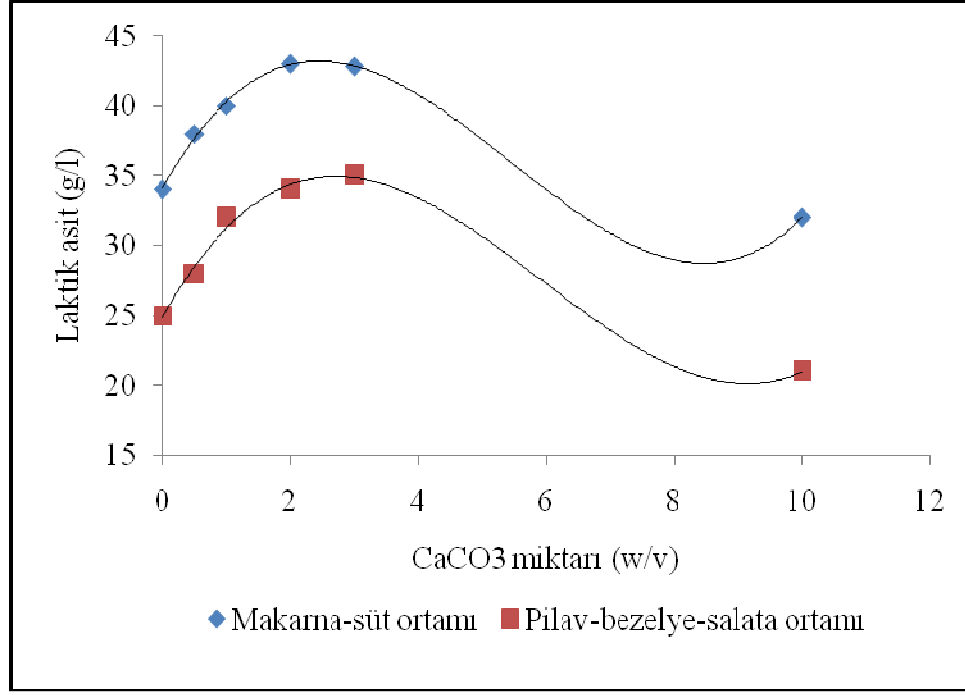
Bu hacimdeki artış oranının endüstriyel saflaştırma ve buharlaştırma aşamalarında zamana ve enerji kaybına yol açacağı açıktır.

Bu olumsuz etkiler göz önüne alındığında ve literatür çalışmaları takip edildiğinde, laktik asit fermantasyonunda pH tamponlayıcı olarak NaOH yerine CaCO_3 kullanılmasının daha etkili olduğu görülmüştür.

Kalsiyum karbonatın kullanıldığı denemelerde, substrat konsantrasyonuna bağlı olarak hesaplanan CaCO_3 miktarı, ortamdan ayrı olarak sterilize edilerek fermantasyonun başlangıcında ortama ilave edilmiştir. Kullanılan CaCO_3 oluşan laktik asiti kalsiyum laktat halinde tutarak pH'nın 4 değerinin altına düşmesini engellemiştir.

Literatüre göre, kullanılan substratın cinsine ve kültürün çeşidine bağlı olarak değişen pH değerlerini tamponlamak amacıyla miktar olarak geniş bir aralıkta CaCO_3 'ın, farklı sürelerde fermantasyon ortamlarına ilave edildiği görülür. *Lactobasillus* türleri için kullanılan CaCO_3 miktarı %1-10 (w/v) aralığındadır (Göksungur, 1998).

Yapılan bu çalışmada, makarna-süt ve pilav-bezelye-salata besiyerlerine tampon vazifesi görmesi amacıyla ilave edilecek CaCO_3 'ın optimum miktarı Şekil 4.3'de gösterilmektedir.



Şekil 4.3: *Lactococcus lactis subsp lactis* ile farklı ortamlarda fermantasyonla laktik asit üretimine CaCO₃ miktarının etkisi.

Şekilde görüldüğü gibi makarna-süt fermantasyon ortamına ilave edilen %2 (w/v) değerindeki CaCO₃ miktarı maksimum laktik asit oluşumuna imkan verirken, pilav-bezelye-salata ile hazırlanan fermantasyon ortamında bu değer %3 (w/v) olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi CaCO₃ oranındaki artış belli bir değere kadar (%2 (w/v)) laktik asit üretimini olumlu etkilemiş, daha yüksek değerlerde ise üretilen laktik asit miktarlarında belirgin bir düşüşe sebep olmuştur.

CaCO₃ miktarı %0.5 (w/v) iken makarna- süt ortamı için, oluşan laktik asit miktarı 38 g.L⁻¹ iken, tampon miktarı %2 (w/v)’ye çıktığında 42 g.L⁻¹ laktik asit üretilmiştir. Pilav-bezelye-salata besiyeri için de aynı durum söz konusudur. %0.5 (w/v) CaCO₃ için oluşan laktik asit miktarı 28 g.L⁻¹ iken %3 (w/v) CaCO₃ için oluşan laktik asit 36 g.L⁻¹ olarak saptanmıştır.

CaCO₃ miktarı %10 (w/v) olarak sisteme ilave edildiğinde oluşan laktik asit miktarında belirgin azalma görülmüştür. Üretilen laktik asit miktarları makarna- süt ve pilav-bezelye-salata besiyerleri için sırasıyla, 32 g.L⁻¹ ve 21 g.L⁻¹ değerlerindedir. Bu değerler %60 ve %36 dönüşüm verimleriyle tespit edilmiştir.

Ortamdaki tampon miktarının az oluşu, üretilen laktik asidin tamamının kalsiyum laktata dönüşümünün sağlanamamasına ve böylece fermantasyon ortamındaki laktik asit üretiminden kaynaklı asitliğin artmasına neden olmaktadır.

Ortama fazla miktarda CaCO_3 konulduğunda ise besiyerinin pH'sı mikroorganizma için uygun olan pH değerinin üzerine çıkmaktadır. Ayrıca, laktik asit fermantasyon çalışmalarında, proses boyunca laktik asidin yanı sıra malik asit ve fumarik asit gibi yan ürünlerin de oluşumu sözkonusudur. Artan CaCO_3 miktarlarında malik asit üretiminin de arttığı literatür çalışmalarında tespit edilmiştir. Bunun nedeni ise malik asit ve fumarik asit oluşumunu sağlayan enzim piruvat karboksilazın aktivitesinin CaCO_3 varlığında artış göstermesidir (Tkacz ve Lange, 2004). Bunun sonucunda piruvat, malik asit ve fumarik asit oluşumu için kullanılmakta ve laktik asit üretimi azalmaktadır.

Domínguez ve diğ. (1999), *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 ile sentetik ortamda laktik asit üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarında, ilave edilen CaCO_3 oranının ve ilave edilme zamanının laktik asit üretimine etkisini incelemişler, en yüksek hacimsel verimliliği fermantasyonun başlangıcında CaCO_3 'ın %5 oranında ve 24, 36, 48 ve 60. saatlerde %3 oranında tekrar ilave edildiği koşulda elde etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, ortama CaCO_3 ilave edilmediği durumda, laktik asit oluşumuna bağlı olarak azalan pH değeriyle birlikte, mikroorganizmanın glikoz tüketiminin azaldığını ifade etmişlerdir.

Bai ve diğ. (2003), *Rhizopus oryzae* R1021 ile yaptıkları çalışmada CaCO_3 'ın besiyerine ilave edildiği zamanın laktik asit oluşumu üzerine etkisini araştırmışlar, 8. saat ve sonrasında ortama ilave edilen CaCO_3 'ın pelet yapı oluşumuna neden olduğunu tespit etmişlerdir. CaCO_3 'ın ortama ilave edilme zamanının, o andaki ortamın pH'sını belirlemesi sebebiyle mikroorganizmanın gelişimini de pH'ya bağlı olarak etkileyeceğini belirtmişlerdir. Pelet yapı, mikroorganizmanın fermantasyon ortamında daha geniş yüzey alana sahip olmasına olanak sağlamaktadır. Buna bağlı olarak mikroorganizma ortamdaki oksijenden ve substrat kaynağından daha fazla faydalanabilmekte ve daha fazla laktik asit üretebilmektedir.

Huang ve diğ. (2005), *R.oryzae* ve *R.arrhizus* ile yaptıkları çalışmada farklı dozlarda ortama farklı miktarlarda ilave edilen CaCO_3 'ın laktik asit üretimine etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda CaCO_3 miktarları arttıkça laktik asit üretiminin arttığını, çok yüksek değerlere çıkıldığında ise üretimde azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir. En yüksek verim değerine ortama %1 (w/v) CaCO_3 ilave edildiği koşulda ulaşılmıştır. %1 (w/v) oranında ilave edilen CaCO_3 'ın hücresel gelişim için gerekli pH değerinin sağlanmasında yeterli olacağı ifade edilmiştir.

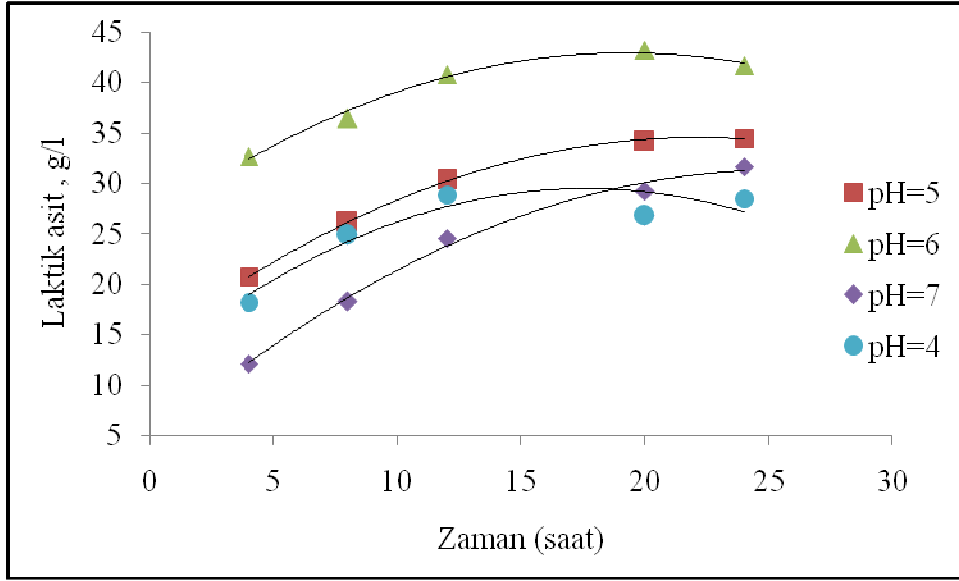
pH değerlerinin fermantasyon boyunca sabit kalması amacıyla optimize edilerek tespit edilen miktarlarda CaCO_3 fermantasyon ortamlarına ilave edilmiştir. Her iki sistem için %2 (w/v) CaCO_3 ortam pH'sını ayarlamak için yeterli düzey olarak belirlenmiştir. CaCO_3 miktarının düşük seviyede olması fermantasyon ortamına ilave edildiğinde çok fazla hacim ve yabancı iyon artışına sebep olmayacağından, saflaştırma işlemlerinde zaman ve enerji kaybı da az olacaktır ki bu durum fermantasyon işlemlerinden sonra gerçekleştirilen adımlarda büyük bir avantaj olarak değerlendirilmektedir.

4.2.3 *Lactococcus lactis subsp lactis* ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum pH değerinin belirlenmesi

Lactococcus lactis subsp lactis ile makarna-süt içerikli fermantasyon ortamında laktik asit üretimi için optimum pH'nın bulunması amacıyla, fermentörde 37°C sıcaklıkta, 53 g.L⁻¹ sakkaroz konsantrasyonunda, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 pH değerlerinde deneyler yapılmıştır. Laktik asit bakterileri belirli düzeyin üzerindeki asitliği tolere edemediklerinden dolayı laktik asit üretimi sonlandığı için oluşan laktik asit, %2 (w/v) CaCO_3 kullanılarak fermantasyon boyunca nötralize edilmiş ve pH'nın belirlenen aralıkta sabit kalması sağlanmıştır.

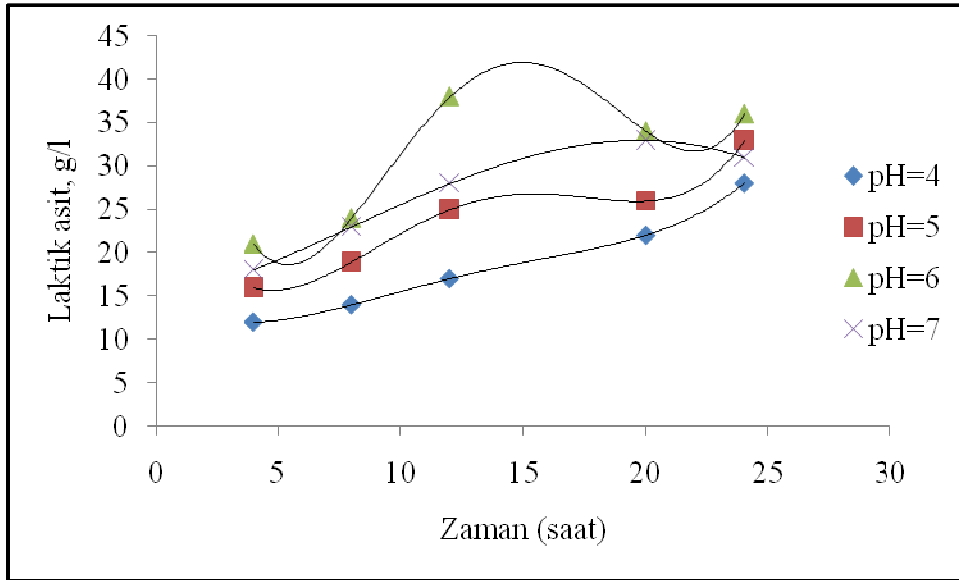
Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, en yüksek verimle laktik asit üretimi (43.22 g.L⁻¹) pH 6'da elde edilirken, bu değere tekabül eden efektif verim değeri %81.5, hacimsel verimlilik değeri ise 2.16 g.L⁻¹.saat⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

pH 5 değeri için, 20. saatte 34.12 g.L⁻¹ değerinde laktik asit elde edilirken, pH değeri 7 olduğunda, 30 g.L⁻¹ değerine inmektedir. 20. saatte laktik asidin üretim verimi ve hacimsel verimliliği pH 5 için, sırasıyla %64 ve 1.70 g.L⁻¹.saat⁻¹, pH 7 için ise sırasıyla, %56 ve 1.5 g.L⁻¹.saat⁻¹ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4: Farklı pH değerlerinde *Lactococcus lactis subsp. lactis* ile makarna-süt fermantasyon ortamında laktik asit üretimi.

Benzer şekilde pilav-bezelye-salata içeriği kullanarak hazırlanan besiyerinde başlangıçtaki sakkaroz miktarı 58 g.L^{-1} olarak belirlenmiş olup bu ortamın da pH değerleri benzer şekilde ayarlandıktan sonra, fermantasyon yapılmış ve laktik asit miktarları süreye bağlı olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5: Farklı pH değerlerinde *Lactococcus lactis subsp. lactis* ile pilav-bezelye salata fermantasyon ortamında laktik asit üretimi.

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi, maksimum miktarda laktik asit üretimi pH 6’da 12. saatte meydana gelmiştir.

Lactococcus lactis subsp lactis kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon işleminde pH 6 değerinde 38 g.L^{-1} miktarında laktik asit üretimi sağlanmış ve bu değerden yola çıkılarak, efektif verim değeri, %66, ve hacimsel verimlilik değeri ise $1.9 \text{ g.L}^{-1}.\text{saat}^{-1}$ olarak elde edilmiştir.

pH 7 değerinde ise 24 saatlik çalışma sonucunda oluşan laktik asit miktarı 31 g.L^{-1} , efektif verim %53.44 ve hacimsel verimlilik değeri ise, $1.29 \text{ g.L}^{-1}.\text{saat}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir.

Lactococcus lactis subsp lactis ile farklı iki besiyeri kullanarak fermantasyonla laktik asit üretiminde maksimum verimle ürün elde edilen pH değeri 6 olarak tespit edilmiş olup, bu değer yapılan literatür çalışmalarıyla paralellik göstermektedir (Cock, 2006).

Göksungur (2004), *L. delbrueckii* IFO 3202 ile melastan laktik asit üretimi yaptığı çalışmada, 45°C ’de gerçekleştirilen fermantasyon işleminde en fazla laktik asit üretimi 43.2 g.L^{-1} olup pH 6 değerinde tespit edilmiştir. Bu değerde efektif verim ise %82.8 olarak belirlenmiştir.

El-Sherbiny ve diğ. (1986), pancar melasından *L. delbrueckii* kullanarak laktik asit üretmişler ve araştırmalarında maksimum efektif verimi %61.2 olarak pH 6’da elde etmişlerdir.

Monteaguda ve diğ. (1994), aynı mikroorganizma ile melastan laktik asit üretiminde en yüksek hacimsel verimliliği pH 5.92 iken saptamışlardır.

L.amylovorus ile laktik asit üretiminde, 4.0 ile 6.5 arasındaki pH değerlerinde nişastadan laktik asit üretimi yapılmış ve bu aralıkta sadece pH 5.0 ve pH 6.0 değerlerinde maksimum verim elde edilmiş, pH değeri 6.5 olduğunda laktik asit üretiminin hızla düştüğü gözlenmiştir (Cheng ve diğ., 1991).

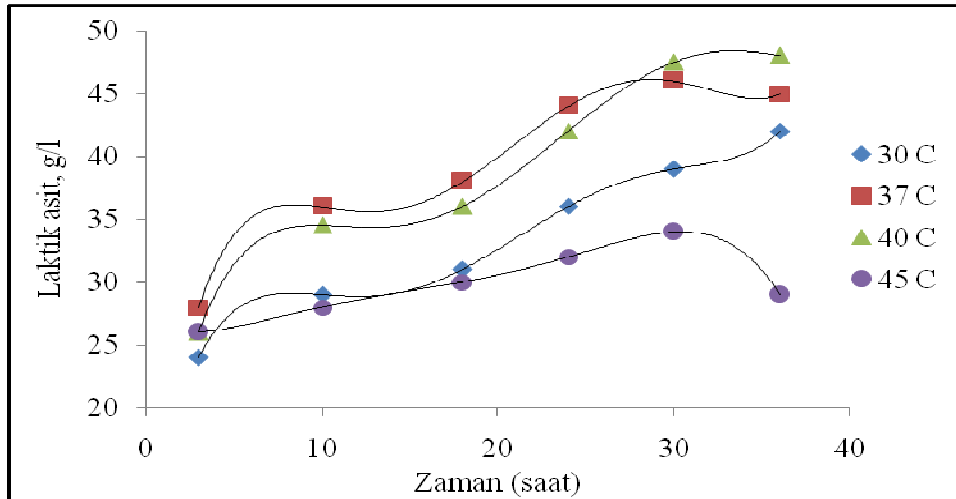
Montelongo ve diğ. (1993), soya melasından *L. salivarius* kullanarak en yüksek laktik asit üretiminin pH 6.0’da olduğunu saptamışlardır.

Dominguez ve diğ. (1999), *R. oryzae* ATCC 52311 ile laktik asit üretimine fermentasyon koşullarının etkisini inceledikleri çalışmalarında, farklı pH değerlerinin etkisini araştırmışlar ve pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0' da sırasıyla 70.9 g.L⁻¹, 72.1 g.L⁻¹, 69.6 g.L⁻¹, 71.7 g.L⁻¹, 69.9 g.L⁻¹ ve 70.6 g.L⁻¹ laktik asit üretildiğini belirlemişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda farklı pH değerlerinin laktik asit üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir.

Yapılan pH optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında ve literatürde yer alan benzer çalışmalarda kullanılan ortam pH'sının sıklıkla 6.0-6.5 (Liu ve diğ. (2005); Bai ve diğ. (2003) olması nedeniyle, çalışma pH'sı 6.0 olarak belirlenmiş ve ilerleyen aşamalarda yapılan fermentasyon optimizasyon çalışmaları saptanan bu değerde gerçekleştirilmiştir.

4.2.4 *Lactococcus lactis subsp lactis* ile fermentasyonla laktik asit üretiminde optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Makarna- süt ve pilav-bezelye-salata besiyerlerinden fermentasyonla laktik asit üretiminde optimum sıcaklığın bulunması için çalkalamalı inkübatörde 30, 37, 40 ve 45°C'de, pH 6.0 değerinde ve CaCO₃ miktarları her iki ortam için de optimize edilen miktarlarda ilave edilerek, 36 saat süresince laktik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Makarna-süt besiyerinde optimum sıcaklığın belirlenmesine ait deneysel sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Farklı sıcaklıklarda *Lactococcus lactis subsp lactis* ile makarna- süt fermentasyon ortamında laktik asit üretimi.

Şekil 4.6'dan izlenebildiği gibi, 37 ve 40°C'lerde yapılan laktik asit fermantasyonunda elde edilen ürün konsantrasyon değerleri ile 30 ve 45°C'ler için elde edilen değerler birbiriyle paralel bir skala içersinde bulunmaktadır. *Lactococcus lactis subsp lactis* kültürü ile makarna-süt besiyerinden fermantasyonla laktik asit üretimi için maksimum verimle ürün eldesinin gerçekleştiği sıcaklık değeri 40°C'dir. 36 saatte elde edilen laktik asit miktarı 48 g.L⁻¹, bu değerden yola çıkılarak hesaplanan efektif verim değeri %86 ve hacimsel verimlilik değeri ise 1.33 g.L⁻¹.saat⁻¹'dir. 37°C'deki laktik asit fermantasyonunda ise, ilk 24 saatte bu değerler, 44 g.L⁻¹ laktik asit, %82 efektif verim ve 1.83 g.L⁻¹.saat⁻¹ değerinde hacimsel verimlilik olarak bulunmuştur. Sıcaklık değerinin 45°C'ye çıkmasıyla laktik asit üretiminde belirgin bir azalma saptanmıştır. Bu sıcaklıkta fermantasyon ortamındaki mikroorganizmanın verimliliği azaldığı için laktik asit üretiminde bir düşüş meydana gelmiştir.

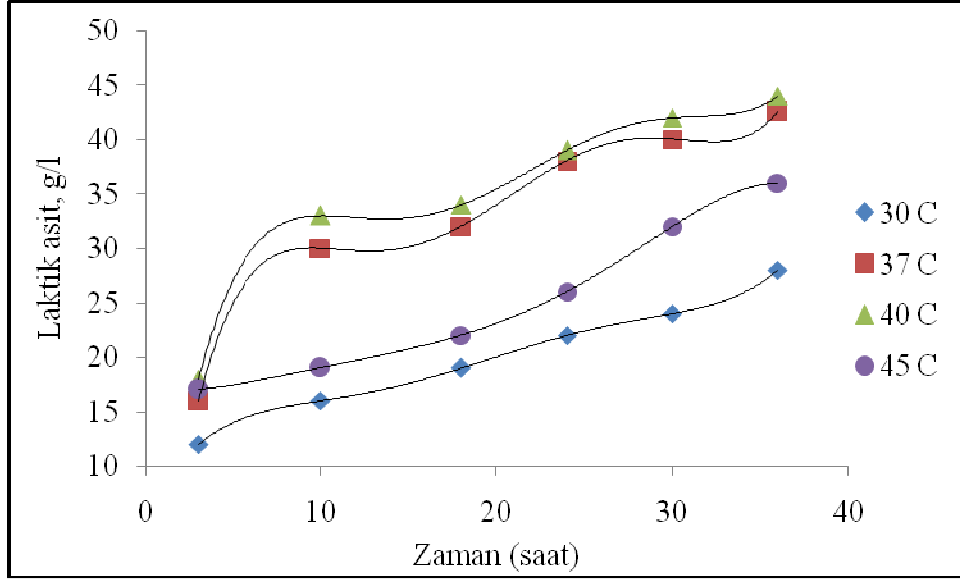
Optimum fermantasyon sıcaklığının 5-10°C üstündeki sıcaklık değerleri, kültürün canlılığını koruyarak ürün oluşumunu desteklemesi için maksimum sıcaklık değeri olarak bilinmektedir. Ancak optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklık değerlerine doğru gidildikçe mikroorganizmanın canlılığı ve üremesi, dolayısıyla da ürün oluşturma kapasitesi etkilenmektedir. Çok yüksek sıcaklık değerlerinde ise sadece kültürün üremesinde durma meydana gelmemekte, beraberinde az veya çok oranda ölümler de görülmektedir. Yapılan çalışmada optimum sıcaklık değeri olarak belirlenen 40°C'den sapmalar gerçekleştiğinde laktik asit oluşum hızında ve veriminde meydana gelen azalmalar yukarıdaki şekilde açıklanabilir.

L.delbrueckii ile melastan laktik asit üretiminde sıcaklığın etkisi üzerinde yapılan çalışmalarda, El Sherbiny ve diğ. (1986), en yüksek efektif verim ve dönüşüm verimi değerlerini 45°C sıcaklıkta bulmuşlardır.

Cheng ve diğ. (1991), nişastayı substrat olarak kullanarak, *L. amylovorus* için optimum sıcaklık değerinin 40-45°C arasında olduğunu göstermişlerdir.

Göksungur (1998), *L. delbrueckii* IFO 3202 ile melastan laktik asit üretiminde 45°C'de yapılan fermantasyon işleminde en fazla laktik asit üretiminin sağlandığını ifade etmiş ve artan sıcaklık değeriyle laktik asit üretiminin azaldığını belirtmiştir.

Makarna-süt besiyeri için gerçekleştirilen işlemlere benzer şekilde pilav-bezelye-salata besiyeri için de optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmaları uygulanmış ve sonuçlar Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Farklı sıcaklıklarda *Lactococcus lactis subsp. lactis* ile pilav- bezelye-salata fermantasyon ortamında laktik asit üretimi.

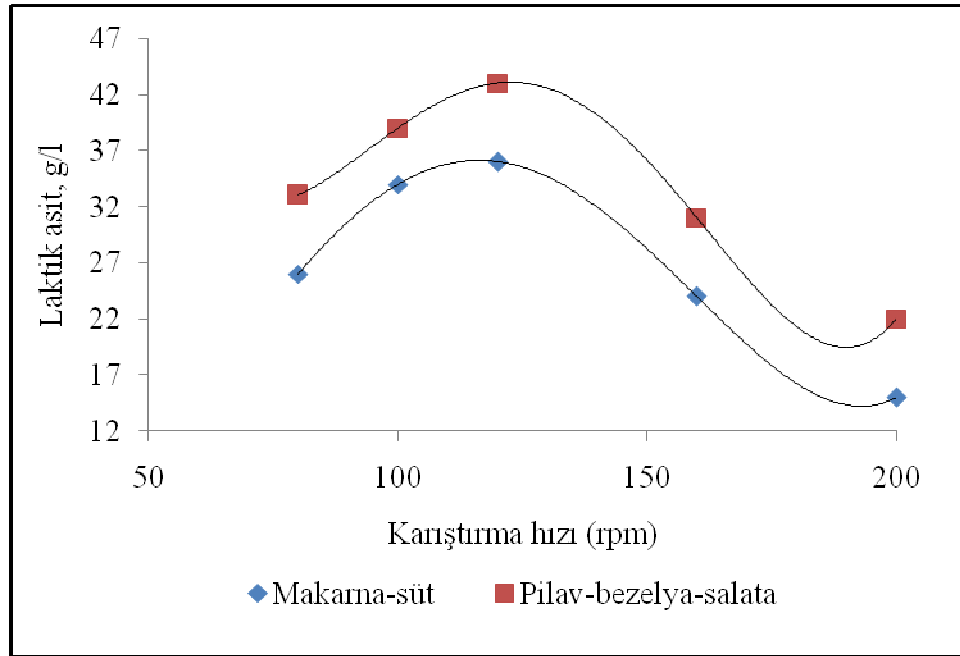
Şekilden de görüldüğü gibi 37 ve 40°C’lerde elde edilen laktik asit üretim miktarları birbirine son derece yakındır. En yüksek laktik asit üretiminin gerçekleştiği süre 36 saat olarak saptanmıştır. Bu süre içerisinde 40°C’de elde edilen laktik asit miktarı 44 g.L⁻¹, efektif verim değeri %76 ve hacimsel verimlilik değeri ise, 1.22 g.L⁻¹.saat⁻¹ olarak bulunmuştur.

37°C’de de yakın sonuçlar elde edilmiş ve laktik asit miktarı 42.5 g.L⁻¹, efektif verim değeri %73 ve hacimsel verimlilik ise 1.18 g.L⁻¹.saat⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

İncelenen optimizasyon çalışmaları neticesinde, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ile yapılan her iki besiyerindeki fermantasyon işlemine ait maksimum ürün eldesine imkan veren sıcaklık değeri 40°C olarak belirlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ile, *Lactobacillus* türlerine ait optimum sıcaklık değeri olan 40-45°C aralığı desteklenmiştir.

4.2.5 *Lactococcus lactis subsp lactis* ile fermantasyonla laktik asit üretimine optimum karıştırma hızı değerinin belirlenmesi

Lactococcus lactis subsp lactis ile iki farklı besiyerinde laktik asit üretiminde optimum karıştırma hızının bulunması için sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta, 53 g.L⁻¹ (makarna-süt) ve 58 g.L⁻¹ (pilav- bezelye- salata) sakkaroz içeren besiyerleri ile pH 6.0'da, 24 saat süreyle 80, 100, 120, 160 ve 200 rpm karıştırma hızlarında denemeler yapılmıştır. *Lactococcus lactis subsp lactis*, belirli düzeyin üzerindeki asitliği tolere edemediği ve laktik asit üretimi kesildiği için oluşan laktik asit, fermantasyonun 8. saatinde besiyerlerine optimize edilen miktarlarda CaCO₃ ilave edilerek nötralize edilmiştir.



Şekil 4.8: Farklı karıştırma hızlarında *Lactococcus lactis subsp lactis* ile makarna süt ve pilav- bezelye- salata fermantasyon ortamında laktik asit üretimi.

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi makarna- süt ve pilav- bezelye- salata besiyerleri için 120 rpm'de elde edilen laktik asit miktarları sırasıyla 36 ve 43 g.L⁻¹ olup en yüksek laktik asit üretimi bu karıştırma hızında elde edilmiştir. Çalışılan karıştırma hızlarında elde edilen efektif verim ve hacimsel verimlilik değerleri ise, makarna-süt besiyeri için, sırasıyla %69 ve 1.5 g.L⁻¹.saat⁻¹ ve pilav-bezelye-salata besiyeri için ise, sırasıyla, %74 ve 1.79 g.L⁻¹.saat⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

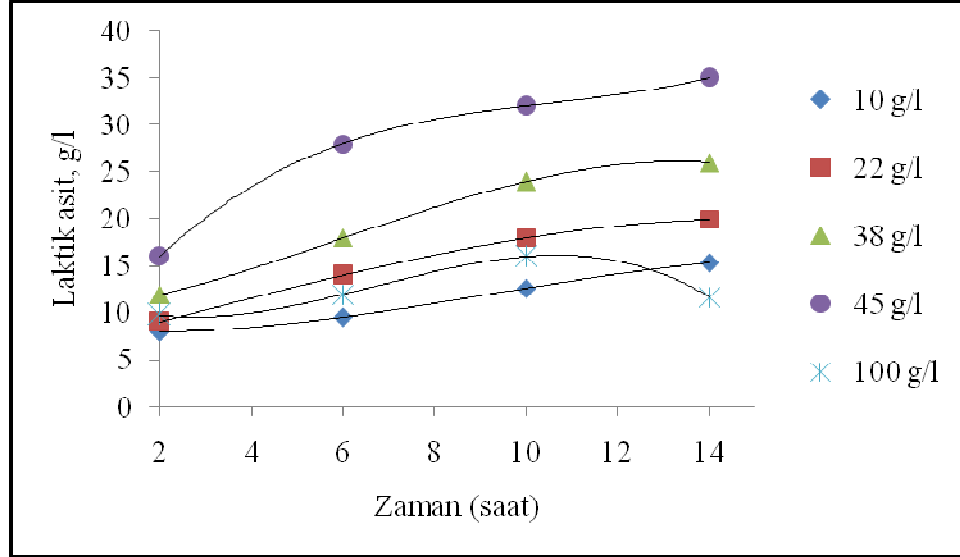
Karıştırma hızının artmasına bağlı olarak fermantasyon ortamında çözünmüş oksijen miktarı yükselmekte ve buna bağlı olarak mikroorganizmanın oksijenden faydalanımı artmaktadır. Ancak çok yüksek oksijen değerlerinde malik asit ve fumarik asit oluşumu arttığı için laktik asit üretiminde azalma meydana gelmektedir (Tkacz ve Lange, 2004). Bu tespit yapılan bu çalışmada da desteklenmektedir. Karıştırma hızını çok arttırdığımızda (160 ve 200 rpm) elde edilen laktik asit üretiminde belirgin bir düşüş tespit edilmiştir.

Liu ve diğ. (2005), çalışmalarında atık patateslerden *R.oryzae* ile laktik asit üretimini optimize etmişler ve bu amaçla karıştırma hızının laktik asit üretime etkisini incelemişlerdir. Yapılan denemeler sonucunda artan karıştırma hızlarında laktik asit (14 g.L^{-1} , 26 g.L^{-1} , 32 g.L^{-1}) üretiminin arttığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada oluşan laktik asit miktarıyla beraber fermantasyon ortamındaki çözünmüş oksijen miktarları da ölçülmüş ve artan karıştırma hızları için ortamda %6, %29 ve %60 çözünmüş oksijen bulunduğu tespit edilmiştir.

Optimizasyon işlemlerinden elde edilen veriler incelendiğinde, fermantasyon ortamının kompozisyonu ve fermantasyonda kullanılan kültürün cinsine bağlı olarak ortamda bulunan oksijenin tolere edilebilmesi, ya da yan ürün oluşumunun desteklemesine bağlı olarak fermantasyon işlemleri çeşitlendikçe optimize edilen karıştırma hızı da değişiklik göstermektedir.

4.2.6 *Lactococcus lactis subsp lactis* ile fermantasyonla laktik asit üretime başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi

Her iki besiyerinde de yapılan fermantasyon işlemlerine başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda fermantasyon ortamları hazırlanmış ve önceki bölümlerde tespit edilen optimum şartlarda fermantasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Makarna- süt ortamı için; 10, 22, 38, 45 ve 100 g.L^{-1} sakkaroz içeren ön işlem uygulanmış ortamlar hazırlanarak, 37°C 'de, 120 rpm'de ve pH 6'da fermantasyon yapılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: *Lactococcus lactis subsp lactis* ile makana- süt fermantasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.

Yapılan deneyler sonucunda başlangıç substrat konsantrasyonu arttıkça oluşan laktik asit miktarının da arttığı görülmüştür.

İlk 14 saatlik fermantasyon süresinde, 45 g.L^{-1} sakkaroz içeren makarna- süt besiyerinde, maksimum laktik asit oluşumu 35 g.L^{-1} , efektif verim değeri %77 ve hacimsel verimlilik değeri ise $2.5 \text{ g.L}^{-1}.\text{saat}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir.

Düşük başlangıç konsantrasyonlarında oluşan laktik asit miktarlarının yaklaşık olarak aynı değerde olduğu görülmüştür.

Artan substrat konsantrasyonlarında oluşan laktik asit miktarlarını tespit etmek amacıyla, 100 g.L^{-1} sakkaroz içeren fermantasyon ortamı ile deneyler yapıldığında, laktik asit oluşum miktarının çok az olduğu ve 10. saatten sonra oluşan laktik asit miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Bu durum yüksek sakkaroz konsantrasyonunun bastırıcı (represör) etki yaptığını göstermektedir. Ayrıca, yüksek sakkaroz konsantrasyonlarında, kullanılan mikroorganizmanın lag fazı uzamış ve spesifik üreme hızı düşmüştür.

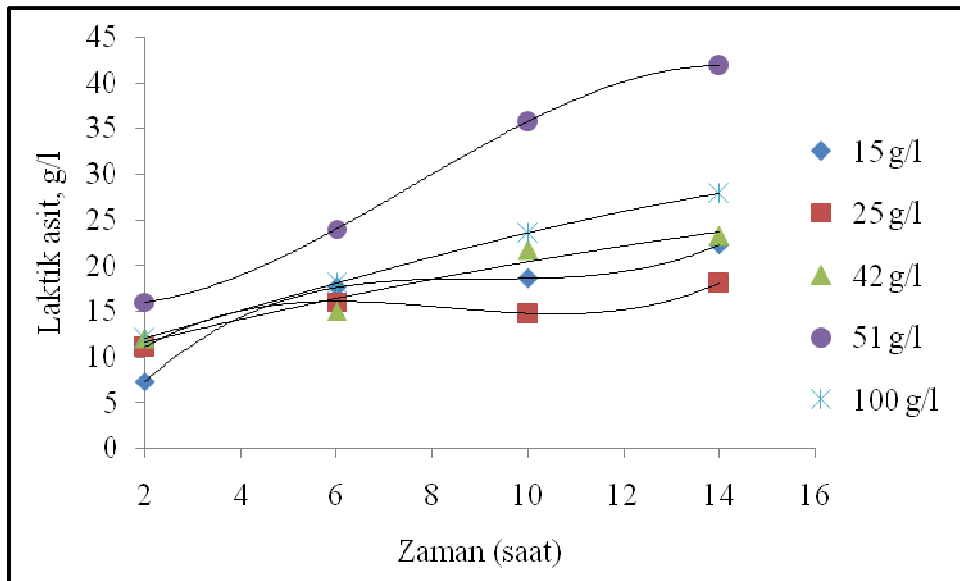
Sakkarozun represyon etkisi bir çok fermantasyon prosesinde gözlenmektedir (Gürsoy, 1991, Ünsaçar, 1998).

Laktik asit üretiminde substrat inhibisyonu pekçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Mehaia ve Cheryang (1987), *L. bulgaricus* ile peynir suyundan laktik asit üretmişler ve yüksek substrat konsantrasyonlarında laktozun kullanılmadığını tespit etmişlerdir.

Goncalves ve diğ. (1991), *L. delbrueckii* ile laktik asit üretimindeki kinetik mekanizmayı incelemişler ve yüksek substrat konsantrasyonlarında substrat inhibisyonu meydana geldiğini saptamışlardır.

Ruengruglikit ve Hang (2003), *R.oryzae* ile mısır koçanından laktik asit üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarında, farklı miktarlarda mısır koçanı kullanmışlar ve artan substrat miktarlarında laktik asit üretiminin azaldığını belirtmişlerdir. Bu azalmanın nedeninin, substrat konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak fermantasyon ortamındaki su miktarında meydana gelen azalmadan kaynaklı olabileceğini ifade etmişlerdir. Substrat inhibisyonunun diğer bir nedenin ise ortamda oluşan glikoz ve sellobiyoz olabileceği belirtilmiştir.

Lactococcus lactis subsp lactis ile pilav-bezelye- salata fermantasyon ortamından laktik asit üretiminde değişik substrat konsantrasyonlarının etkisinin incelenmesi için 15, 25, 42, 51 ve 100 g.L⁻¹ sakkaroz içeren ortamlar hazırlanmış ve bu ortamlarda pH 6 değerinde, 120 rpm’de, 15 saatlik fermantasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.10: *Lactococcus lactis subsp lactis* pilav-bezelye-salata fermantasyon ortamında laktik asit üretimine başlangıç konsantrasyonunun etkisi.

Şekil 4.10'dan da görüldüğü gibi, maksimum verimle laktik asit üretiminin gerçekleştiği başlangıç sakkaroz konsantrasyonu, 51 g.L^{-1} değeridir. 15 saatlik fermantasyon işlemi sonucunda, 42 g.L^{-1} değerinde laktik asit elde edilmiş, efektif verim değeri %82, hacimsel verimlilik değeri ise, $3.4 \text{ g.L}^{-1}.\text{saat}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir.

Diğer fermantasyon ortamına benzer şekilde, başlangıç substrat konsantrasyonu çok arttırıldığında, oluşan laktik asit miktarı da buna paralel olarak bir azalma eğilimindedir. Bu durum yukarıda yapılan açıklamalara benzer olarak ürün inhibisyonundan ileri gelmektedir.

Huang ve diğ. (2005), *R. oryzae* 2062 ve *R. arrhizus* 36017 kullanarak patates nişastası atık suyundan laktik asit ürettikleri çalışmalarında, başlangıç nişasta konsantrasyonunun laktik asit üretimine etkisini incelemişler ve artan nişasta konsantrasyonunda laktik asit üretiminin arttığını, daha yüksek değerlere çıkıldığında ise üretimin azaldığını ifade etmişlerdir. *R. oryzae* 2062'yi kullandıkları denemelerinde nişasta konsantrasyonunun 12.5 g.L^{-1} 'den 18.6 g.L^{-1} 'e çıkarılması durumunda, laktik asit üretiminin 5.02 g.L^{-1} 'den 13.62 g.L^{-1} 'e çıktığını, nişasta konsantrasyonunun 37.5 g.L^{-1} olduğu durumda ise laktik asit üretiminin 5.34 g.L^{-1} 'e düştüğünü belirtmişlerdir. Azalmanın nedenini, mikroorganizmanın sahip olduğu amilaz enziminin aktivitesinin, nişasta içeren karbon kaynaklarını hidroliz etmek için yeterli olmaması, şeklinde açıklamışlardır. Aynı zamanda, fermantasyonun ileri aşamalarında yüksek miktarlarda ürün oluşumuna bağlı olarak gerçekleşen ürün inhibisyonundan kaynaklanmış olabileceğini de ifade etmişlerdir. *R. arrhizus* 36017 ile karşılaştırıldığında *R. oryzae* 2062'nin aynı substrat konsantrasyonunda daha az laktik asit ürettiğini, ancak biyokütle oluşumunun daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bunun nedenini, biyokütle oluşumu ve laktik asit üretimi prosesleri arasında meydana gelen karbon kaynağı yarışı olarak açıklamaktadırlar.

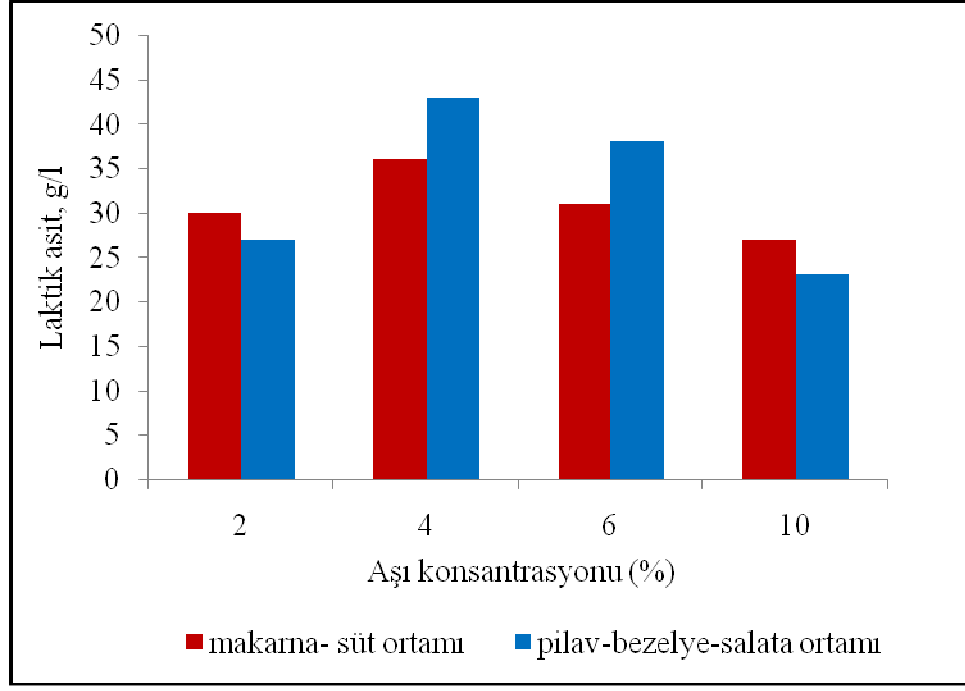
Bulut ve diğ. (2004), farklı karbon kaynaklarının, *R.oryzae* NRRL 395 suşu kullanılarak gerçekleştirilen laktik asit üretimine etkisini incelemişlerdir. Glikozun kullanıldığı çalışmada başlangıç substrat konsantrasyonun 25 g.L^{-1} 'den 150 g.L^{-1} 'e çıkması sonucunda laktik asit üretiminin arttığı, 150 g.L^{-1} 'nin üzerindeki değerlere çıkıldığında ise laktik asit üretiminin azaldığı ifade edilmiştir.

Yüksek glikoz konsantrasyonlarında ortamda bulunan glikozun tamamen tüketilemediği, başlangıç glikoz konsantrasyonunun yaklaşık %40-50'sinin kullanılmadan fermentasyon ortamında kaldığı tespit edilmiştir. Bunun nedenini, ortamda biriken laktik asit miktarının artması olarak ifade etmişlerdir. Ayrıca ürün inhibisyonunun, fermentasyonun ileri aşamalarında ortamın ihtiyaç duyulan besin öğelerince zenginleştirilmesi yoluyla önlenebileceğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanılmış ve başlangıç konsantrasyonunun 5 g.L⁻¹'den 50 g.L⁻¹'e çıkarılması sonucunda laktik asit üretiminin arttığı, 100 g.L⁻¹ sakkaroz konsantrasyonunda ise üretimin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Azalmanın nedeni, yüksek konsantrasyondaki sakkarozla bağlı olarak ortam viskozitesinin artması şeklinde ifade edilmiştir.

Laktik asit fermentasyonunda substrat konsantrasyonunun optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler göstermektedir ki, yüksek substrat konsantrasyonlarında çalışıldığında ortamda bulunan kültürün sahip olduğu HIALactose enziminin, her iki besiyerinde de bulunan karbon kaynaklarını hidroliz edememesinden dolayı, ürün inhibisyonu meydana gelmekte ve laktik asit verimi düşmektedir. Dolayısıyla, optimum koşul olarak tespit edilen, makarna-süt ve pilav-bezelye-salata besiyerleri için, sırasıyla 45 ve 51 g.L⁻¹ substrat konsantrasyonları, fermentasyonda kullanılan yemekhane atıklarının substrat konsantrasyonlarına yakın değerlerde olduklarından, seçilen fermentasyon ortamlarının doğrudan kullanılması gerek laboratuvar ölçekli çalışmalarda gerekse endüstriyel üretimde uygunluk teşkil etmektedir.

4.2.7 *Lactococcus lactis subsp lactis* ile fermentasyonla laktik asit üretimine aşı konsantrasyonunun etkisi

Makarna- süt ve pilav- bezelye- salata içeren içeren fermentasyon ortamlarından *Lactococcus lactis subsp lactis* ile laktik asit üretimine kullanılan spor sayısının etkisini incelemek amacıyla, 3x10⁸ cfu.mL⁻¹ hücre içeren kültürden, gerekli seyreltmeler yapılarak, 6x10⁶, 1.2x10⁷, 1.8x10⁷, 3x10⁷ cfu.mL⁻¹ spor içeren dilüsyonlar oluşturulmuştur. Denenen aşılama oranları olan %2.0, 4.0, 6.0 ve 10'a karşılık gelen başlangıç hücre sayıları fermentasyon ortamlarına ilave edilerek 120 rpm, 24 saat, 37°C ve pH 6.0'da deneyler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.11: *Lactococcus lactis subsp. lactis* ile farklı fermantasyon ortamlarında laktik asit üretiminde değişik aşı konsantrasyonlarının etkisi.

Şekil 4.11’de görüldüğü gibi, her iki besiyeri için de, artan aşı konsantrasyonlarında elde edilen laktik asit miktarları artmış, 1.2×10^7 cfu.mL⁻¹ spor konsantrasyonunda makarna- süt besiyeri için en yüksek laktik asit miktarı 36 g.L⁻¹, pilav- bezelye-salata besiyeri için ise 43 g.L⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Makarna süt ortamı için efektif verim %70 iken, pilav- bezelye-salata ortamı için, bu değer %74 civarındadır.

Bu değerlerin üzerindeki spor konsantrasyonlarında, elde edilen laktik asit miktarı azalmıştır. Bunun nedeni ortamdaki hücre sayısı arttıkça besin elementlerinin yetersiz kalması olarak düşünülmektedir.

Soccol ve diğ. (1993), *R.oryzae* NRRL 395 ile katı kültür ortamında laktik asit üretimini araştırdıkları çalışmalarında, inokülasyon miktarının laktik asit üretimine etkisini incelemişler ve 180 g.L⁻¹ glikoz içeren üretim ortamında en yüksek laktik asit miktarını 120 g.L⁻¹ olarak, 2×10^6 spor.g glikoz⁻¹ inokülasyon hızında elde etmişlerdir.

Yin ve diğ. (1997), *R.oryzae* NRRL 395 kullanarak biyoreaktörde mısır nişastasından laktik asit üretimine, inoküle edilen spor konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır.

Spor konsantrasyonları sırasıyla 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 ve 2×10^7 spor.mL⁻¹ olacak şekilde üretim ortamlarına ekim yapıldığında, en yüksek laktik asit miktarı olan 98.2 g.L⁻¹ değerinin, 2×10^6 spor.mL⁻¹ konsantrasyonuyla elde edildiğini belirtmişlerdir. Bu üretim ortamında küçük peletler oluştuğunu, 2×10^3 ve 2×10^5 spor.mL⁻¹ aralığında yapılan denemelerde ise misel yapının oluştuğunu, bu yapının reaktör içerisinde koagüle olduğunu, dolayısıyla ortamdaki glikozun yeterince kullanılmadığını ve laktik asit üretiminin düşük olduğunu ifade etmişlerdir. 2×10^7 spor.mL⁻¹ düzeyinde spor ekimi yapılan üretim ortamında ise pek çok sporun gelişemediğini ve bunun nedeninin de besin elementlerinin yetersiz kalması olduğunu söylemişlerdir.

Dominguez ve Vázquez (1999), *R.oryzae* ATCC 52311 ile laktik asit üretimine fermantasyon koşullarının etkisini inceleyerek spor konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar spor konsantrasyonu ve havalandırmanın birbiriyle ilişkili olduğunu gözlemlemişler ve düşük spor konsantrasyonlarında havalandırma miktarındaki değişime bağlı olarak laktik asit üretiminin çok fazla değişmediğini (düşük havalandırma: 0.51 g/g laktik asit; yüksek havalandırma: 0.57 g/g laktik asit) fakat; yüksek spor konsantrasyonlarında yüksek havalandırma uygulandığında düşük laktik asit üretimi, düşük havalandırma hızı uygulandığında ise yüksek laktik asit üretimi olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek spor konsantrasyonlarında gerçekleştirilen deneylerde, yüksek havalandırma hızı uygulanan koşullarda elde edilen laktik asit miktarını 46.1 g.L⁻¹, düşük havalandırma hızı uygulanan koşullarda ise elde edilen laktik asit miktarını 70.8 g.L⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.

Bai ve diğ. (2003), karıştırmalı tip fermentörde *R.oryzae* R1021 pelet formu kullanarak yaptıkları fermantasyonda, spor konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar üretim ortamına 1×10^3 ve 1×10^7 spor.mL⁻¹ aralığında değişen konsantrasyonlarda spor inoküle etmişler ve en yüksek laktik asit miktarı olan 63.25 g.L⁻¹ değerini, 1×10^6 spor.mL⁻¹ seviyesinde ekim yapılan üretim ortamında tespit etmişlerdir. İnoküle edilen spor konsantrasyonunun 1×10^3 ve 1×10^5 spor.mL⁻¹ aralığında olduğu denemelerde misel yapının oluştuğunu ve buna bağlı olarak laktik asit miktarının azaldığını ve fermantasyon süresinin uzadığını ifade etmişlerdir.

İnoküle edilen spor konsantrasyonunun 1×10^7 spor.mL⁻¹ olduğu denemelerde ise mikroorganizmanın yığın şeklinde gelişim gösterdiğini ve yığın içerisine besin elementlerinin geçişinin ve buna bağlı olarak laktik asit üretiminin artan kütle aktarım transferi nedeniyle azaldığını söylemişlerdir.

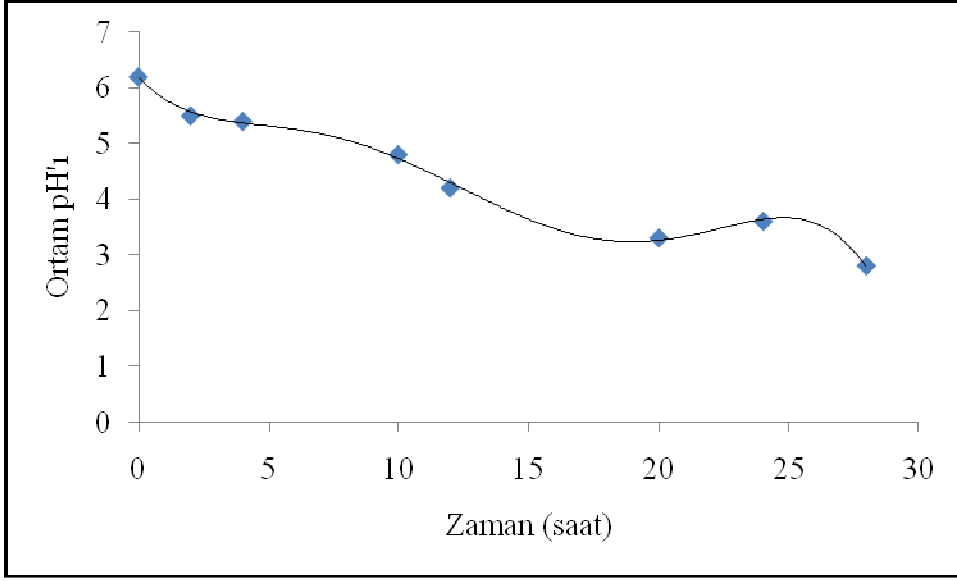
Sunulan tezin bu bölümünde yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, aşı konsantrasyonunun optimizasyonu ile elde edilen verilere göre, %4 aşı konsantrasyonunda, her iki ortam için de maksimum miktarda laktik asit üretiminin gerçekleştirildiği saptanmıştır. Bu değerin üzerindeki konsantrasyonlarda ise, ortamda bulunan karbon kaynaklarının yetersiz kalmasından dolayı laktik asit üretim veriminde düşüş gözlenmiştir ki bu sonuç literatür çalışmaları ile uyumludur (Yin ve diğ., 1997).

Bölüm 4.2’de yapılan tüm çalışmalar sonucunda, *Lactococcus lactis* kültürü ile laktik asit fermantasyon koşulları optimize edilmiş ve fermantasyonda kullanılan her iki besiyeri için de, pH değerinin 6.0, sıcaklığın 37°C, karıştırma hızının 120 rpm ve aşı konsantrasyonunun %4 olduğu durumda, maksimum laktik asit üretimi elde edilmiştir.

4.3 *Lactobacillus bulgaricus* ile Fermantasyonla Laktik Asit Üretimi

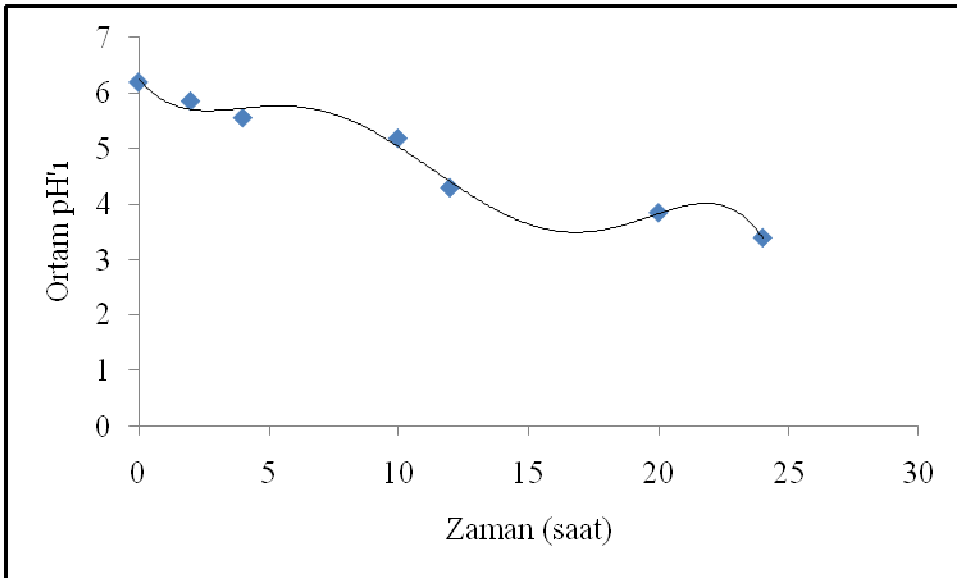
4.3.1 Fermantasyon boyunca ortam pH değerinin değişiminin incelenmesi

Lactobacillus bulgaricus ile makarna-süt besiyerinden oluşan fermantasyon ortamında 40°C’de 120 rpm karıştırma hızında, laktik asit üretiminde başlangıç sakkaroz miktarı 53 g.L⁻¹ olduğu durumda ortam pH’sındaki değişim Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12: *Lactobacillus bulgaricus* ile makarna-süt karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'sının değişimi.

Makarna- süt besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon boyunca sürekli olarak azalan pH değişimi izlenmektedir. İlk 12 saatte pH değerinin 4'ün üstünde olduğu ancak bu süreden sonra pH'nın daha da azaldığı saptanmıştır. Fermentasyon işleminin 10. saatinde pH değeri 4.8 olarak ölçülmüş ancak bu süreden sonra pH'nın 4'ün altına azalması bakterinin asidik şartlarda çalışmıyor olmasından dolayı, laktik asit oluşumunun meydana gelemeyeceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.13: *Lactobacillus bulgaricus* ile pilav-bezelye-salata karışımından laktik asit eldesinde ortam pH'sının değişimi.

Benzer şekilde pilav-bezelye-salata ortamı için fermentasyon boyunca pH değişimi incelendiğinde yakın sonuçlar elde edilmiştir. Fermentasyonun 2. ile 10. saatleri arasında pH değerinin mikroorganizmanın çalışmasına imkan verecek değerler arasında olduğu ancak bu süreden sonra hızlı bir şekilde pH'nın azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.13). 12. saatten sonra pH değerinin 4'ün altına indiği tespit edilmiştir dolayısıyla ortama ilave edilecek olan CaCO_3 'ın bu süreden önce sisteme konulması gerektiği düşünülmektedir.

Güvenç ve Harsa (1986), yaptıkları çalışmada sakkaroz içeren ortamdan *L. delbrueckii* ile laktik asit üretiminde pH kontrol edilmediği zaman fermentasyonun ilk 10-12 saatinde pH'nın hızlı bir şekilde 5'in altına düştüğünü, daha sonra 28. saatte pH değerinin 4.0'ün altına ulaştığını ve kültürün çalışmaması nedeniyle laktik asit üretiminin tamamen durduğunu belirlemişlerdir.

Banwart (1989), fermentasyon sırasında sentezlenen ya da yan ürün olarak açığa çıkan lipofilik asitler nedeniyle meydana gelen bakteri gelişimi ve üretim veriminin inhibisyonunu, amino ve keton gruplarının etkisine bağlamaktadır. Hücre içersine giren ve hücre içersinde disosiyasyon alan asitler veya asidik ortamda proteinlerin pasif olarak hücre içine girişi vasıtasıyla azalan sitoplazmik pH'nın kültürün DNA'sında hasarlara neden olabileceğini belirtmiştir.

Ayrıca, *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir araştırmada, benzoik asit ilavesi ile sitoplazmik pH'nın düşürülmesi ile, pH düşüşüne hassas olan 6- fosfofruktokinazın inhibe olduğu ve dolayısıyla glikolizis yoluyla enerji üretiminin durması ile inhibisyonun gerçekleştiği rapor edilmiştir (Brooth ve Kroll, 1989).

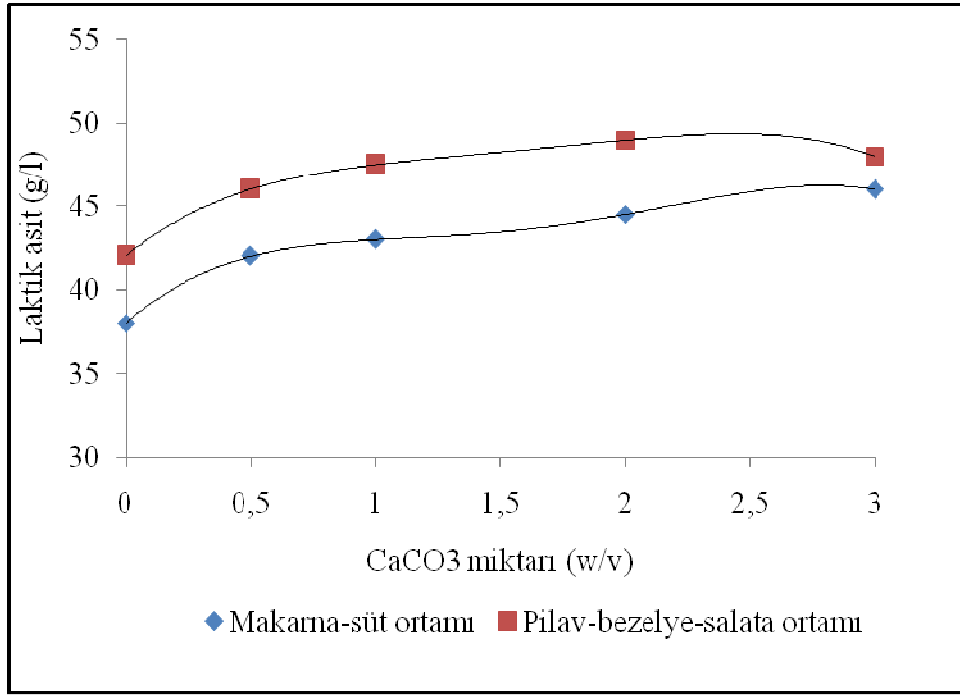
Huang ve diğ. (2005), sitoplazmik pH'sı asetik asit ile düşürülmüş bakterilerde görülen aktivite kaybının, hücre içi proteinlerin denatürasyonundan ileri geldiğini ifade etmektedirler.

Lactobacillus bulgaricus ile laktik asit fermentasyonunda ortam pH değerinin fermentasyon boyunca değişimi, *Lactococcus lactis* kültürü ile yapılan çalışmalara eşdeğer nitelik taşımaktadır. Her iki kültürde de fermentasyonun belirli bir süresinden sonra pH, kritik 4.0 değerinin altına düşmektedir. Bu durum laktik asit ve yan ürün olarak açığa çıkan malik asit ve fumarik asit gibi maddelerin ortamın asitliğini arttırmasından kaynaklanmaktadır.

Buna bağılı olarak, artan asitlik derecesiyle birlikte, kültürlerin yapısındaki dihydroorotate dehydrogenase ve IIAlactose enzimlerinin denatürasyonu oluşmakta ve laktik asit dönüşümü verimli bir şekilde meydana gelememektedir.

4.3.2 *Lactobacillus bulgaricus* ile fermantasyonla laktik asit üretimine CaCO_3 miktarının etkisi

L. bulgaricus ile laktik asit üretiminde fermantasyon ortamına ilave edilen optimum CaCO_3 oranının bulunması için, sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatörde 53 ve 58 g.L^{-1} sakkaroz içeren besiyerlerinde 40°C sıcaklıkta, pH 6.0'da, %2 aşı konsantrasyonu kullanılarak, ortamdaki toplam substrat miktarının %0.5, %1, %2, %3 (w/v) oranlarında CaCO_3 ilave edilerek 24 saat boyunca fermantasyon yapılmıştır.



Şekil 4.14: *Lactobacillus bulgaricus* ile farklı ortamlarda fermantasyonla laktik asit üretimine CaCO_3 miktarının etkisi.

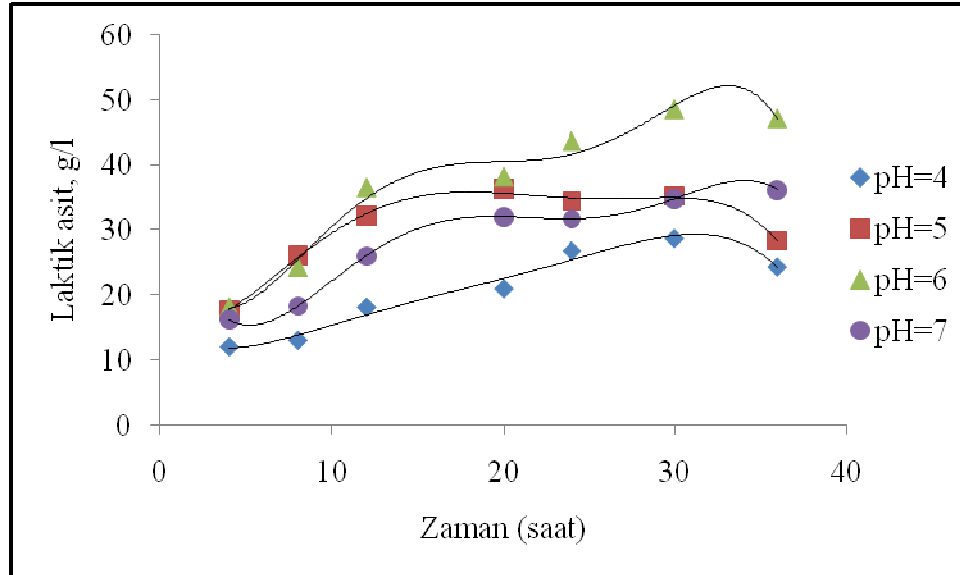
Makarna-süt ve pilav-bezelye-salata besiyerlerindeki fermantasyonlarda, en yüksek laktik asit üretimi %2 (w/v) CaCO_3 kullanıldığında sırasıyla 44.5 g.L^{-1} ve 49 g.L^{-1} olarak elde edilmiştir. Deneysel sonuçlardan da görüldüğü gibi CaCO_3 oranındaki artış laktik asit üretiminde belli bir değere kadar yükselmeye neden olmuş, daha yüksek değerlerde ise üretim çok az azalmıştır (Şekil 4.14).

Ortamdaki tampon miktarının az oluşu, üretilen laktik asidin tamamının kalsiyum laktata dönüşümünün engellenmesine ve bunun sonucunda fermantasyon ortamında laktik asit üretiminden kaynaklı asitliğin artmasına neden olmaktadır.

Ruengruglikit ve Hang (2003), *R.oryzae* NRRL 395 ile mısır koçanından laktik asit üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarında, 100 mL'lik besiyerlerine 0.2 g CaCO_3 ilave edildiği durumda fermantasyonun 48. saatinde en yüksek laktik asit üretiminin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. CaCO_3 ilave edilmediği koşulda ve belirtilen CaCO_3 miktarının üzerinde çalışıldığında, laktik asit oluşumunun azaldığını bildirmişlerdir.

4.3.3 *Lactobacillus bulgaricus* ile fermantasyonla laktik asit üretiminde optimum pH değerinin belirlenmesi

L. bulgaricus kültürü ile makarna-süt içerikli fermantasyon ortamında laktik asit üretiminde optimum pH'nın bulunması amacıyla, 40°C sıcaklıkta, 53 g.L⁻¹ sakkoroz içeren ortamın pH değerleri 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 olacak şekilde ayarlanarak fermantasyon işlemleri yapılmıştır. Fermantasyonun 6. saatinden itibaren ilave edilen %2 (w/v) CaCO_3 ile ortam nötralize edilmiş ve pH'nın belirlenen aralıklarda sabit kalması sağlanmıştır.



Şekil 4.15: Farklı pH değerlerinde *Lactobacillus bulgaricus* ile makarna-süt fermantasyon ortamında laktik asit üretimi.

Şekil 4.15'den görüldüğü gibi 30 saat sonunda pH= 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 için sırasıyla 28.77 g.L⁻¹, 35.21 g.L⁻¹, 48.51 g.L⁻¹ ve 34.75 g.L⁻¹ laktik asit elde edilmiştir. Her bir pH değerinde elde edilen efektif verim değerleri, sırasıyla %54, %66, %91 ve %71'dir. Bu değerlere karşılık gelen hacimsel verimlilik değerleri, 0.96 g.L⁻¹.saat⁻¹, 1.17 g.L⁻¹.saat⁻¹, 1.61 g.L⁻¹.saat⁻¹ ve 1.16 g.L⁻¹.saat⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Laktik asit bakterilerinin canlılıklarını pH 7.0 değeri civarında sürdürebildikleri düşünülürse, pH 6.0 değerinde en yüksek laktik asit oluşumunun izlenmesi literatür çalışmaları ile paralellik taşımaktadır.

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* (strain RR) ile şeker pancarından farklı sıcaklık ve pH değerlerinde yapılan fermentasyon işleminde, pH değerinin 6.2, ve sıcaklığın 44°C olduğu durumda 72 saatlik fermentasyon süresince, elde edilen laktik asidin maksimum verimde olduğu bulunmuştur (Gassem ve diğ., 2006).

Huang ve diğ. (2005), *Rhizopus oryzae* kullanarak, atık sulardan laktik asit üretiminin optimum şartlarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalarında, pH değerinin 5.0-6.0 arasında, CaCO₃ miktarının 10 g.L⁻¹ olduğu durumda 20 saatlik fermentasyon süresince elde edilen maksimum laktik asit miktarının 21 g.L⁻¹ olduğunu belirtmişlerdir.

Ching-Yu ve diğ. (2007), substrat olarak 125 g.L⁻¹ konsantrasyonundaki glikozu kullanarak *Rhizopus oryzae* ile pH değerinin 4.3-4.5 arasında tutulduğu fermentasyon ortamında, efektif verimi %87 olan bir prosesle 109 g.L⁻¹ laktik asit elde etmişlerdir.

Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus* suşları arasında en yüksek 10,1 mg.mL⁻¹ laktik asit üretimi G12 suşunda %1 melas konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Kültür ortamının pH'sı 4.23 olarak belirlenmiştir. *S. thermophilus* W22 suşunda en yüksek laktik asit üretimi 48. saat sonunda %1 melas konsantrasyonunda 8.8 mg.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu kültür ortamının pH'sı 4.27 olarak bulunmuştur (Yüksekdağ ve diğ., 2008).

Lactobacillus plantarum kullanılarak sentetik laktoz ortamından, kesikli sistemde aerobik ve anaerobik şartlarda gerçekleştirilen fermentasyonda, pH'nın 5.0-6.0 arasında olduğu durumda %95 dönüşüm oranı ile maksimum miktarda laktik asit üretilmiştir (Agraval ve diğ., 2007).