

66129

Aspergillus foetidus İLE GLUKONİK ASİT
ÜRETİMİ

GLUCONIC ACID PRODUCTION BY
Aspergillus foetidus

AYSUN KARA

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ
KURULUŞ MÜHÜRÜ

1997

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı'nda YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
Doç. Dr. Zümriye Aksu

Üye :
Doç. Dr. Abdurrezak Öncü

Üye :
Doç. Dr. Tijen Bozdemir

Üye :
Doç. Dr. Yeşim Sağ

ONAY

Bu tez/...../1997 tarihinde Enstitü Yönetim Kuruluca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

12/09/1997

Prof. Dr. Gültekin GÜNAY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ailleme

ÖZET

Bu çalışmada bir küf olan *Aspergillus foetidus* ile çalkalamalı su banyolarında ve bir karıştırıcı, havalandırıcı ve sıcaklık kontrollü fermentörde çeşitli substratların fermentasyon yoluyla glukonik aside dönüşümü incelenmiştir.

Mikroorganizmanın üremesi ve glukonik asit üretimi için en uygun sıcaklık 30-33°C ve besin ortamı başlangıç pH değeri 5-6 aralıklarında bulunmuştur. *Aspergillus foetidus* ile glukonik asit fermentasyonunda substrat türlerinin ve başlangıç derişim değerlerinin etkilerinin incelendiği çalışmalarda; glukoz, sakkaroz ve melas kullanılmıştır. Bu substratlara ait optimum derişim değerleri sırasıyla; 57, 75 ve 150 g/L olarak bulunmuştur. Bu derişimlerdeki glukonik asit verim değerleri; glukoz için % 14.6, sakkaroz için % 23.2 ve melas için ise; % 24.6 olarak elde edilmiştir. Bu verim değerleri teorik verimlerin sırasıyla % 13.3, % 40.4 ve % 86.0'sını oluşturmaktadır. Başlangıç substrat derişimlerinin yüksek olduğu değerlerde ise; inhibisyonun meydana geldiği gözlenmiştir. Glukoz için substrat inhibisyonuna bağlı ayrışma sabiti; $K_1 = 207.872$ (g glukoz/L) olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca glukonik asit üretimine, fermentasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanılan amonyum nitratın başlangıç derişiminin, çalkalama hızının ve aşı derişiminin etkileri de incelenmiştir. Bu parametrelerin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkilerini gösteren eşitlikler Systat® lineer olmayan regresyon programı ve Origin Programı kullanılarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardan; fermentasyon parametrelerinin optimum değerleri; başlangıç azot kaynağı derişimi 1.5 g NH_4NO_3 /L; çalkalama hızı 100 vuru/dk ve aşı derişimi ise; % 0.7 (v/v) olarak hesaplanmıştır.

Fermentörde glukozla yapılan çalışmalarda ise; karıştırma hızının ve hava akış hızının glukonik asit üretimine etkisi incelenmiştir. Optimum değerler; yaklaşık 650 rpm karıştırma ve 48 L/sa hava akış hızında elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glukonik asit, *Aspergillus foetidus*, fermentasyon.

ABSTRACT

In this study; conversion of various substrates to gluconic acid with fermentation by a fungus, *Aspergillus foetidus*, was investigated in the water bath shakers and in an aerated, stirred and temperature controlled fermentor.

Optimum temperature and initial pH value ranges of the nutrient medium for the microorganism growth and gluconic acid production were found to be as 30-33°C and 5-6; respectively. The effects of substrate types and their initial concentrations were determined for the gluconic acid production by *Aspergillus foetidus*. In these runs; glucose, sucrose and molasses were used and their optimum concentrations were found as 57, 75 and 150 g/L; respectively. Calculated gluconic acid yields with these corresponding initial concentrations were as 14.6 % for glucose, 23.2 % for sucrose and 24.6 % for molasses. The yields obtained were 13.3 %, 40.4 % and 86.0 % of theoretical yields; respectively. Inhibition was observed at the high initial substrate concentrations. Dissociation constant for substrate inhibition was calculated as $K_i = 207.872$ (g glucose/L) for glucose.

The effects of initial concentration of ammonium nitrate as a nitrogen source in the fermentation medium, shaking rate, and inoculum concentration on gluconic acid production were also investigated. The relationships representing the effects of these parameters on the specific microorganism growth rate and the specific gluconic acid production rate were determined by nonlinear regression analysis through Systat® and Origin. Optimum values for each parameter were obtained from the experimental results that as initial concentration of the nitrogen source 1.5 g NH_4NO_3 /L; shaking rate 100 spm; and inoculum concentration % 0.7 (v/v).

The effects of stirring and aeration rates on gluconic acid production were also investigated by using glucose in the fermentor runs. Optimum values were determined as approximately as 650 rpm stirring and 48 L/h of aeration rates.

Keywords: Gluconic acid, *Aspergillus foetidus*, fermentation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesinden, yazımına kadar her konuda değerli bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın tez hocam Doç. Dr. Tijen Bozdemir'e,

Çalışmalarımın ilk aşamasında değerli yardımlarını gördüğüm Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yeşim Özbaş'a

Bana her zaman destek verip, yardımcı olan sevgili aileme,

Yakın arkadaşlığı ve yardımları için Araş. Gör. Aydan Çalık'a,

Bana bu çalışmanın yapılması için gerekli imkanı veren, olanaklarından faydalandığım Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümüne ve yardımlarını gördüğüm bölüm öğretim elemanları, araştırma görevlileri ve çalışanlarına,

Her zaman için desteğini ve yardımlarını gördüğüm sevdiklerime,

Teşekkür ederim

Aysun Kara

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Glukonik Asit Üretimi	4
2.1.1. Giriş	4
2.1.2. Fiziksel Özellikleri.....	5
2.1.3. Kimyasal Özellikleri	5
2.1.4. Türevleri.....	6
2.1.5. Kullanım Alanları	8
2.1.5.1. İlaç Endüstrisindeki Kullanım Alanları	8
2.1.5.2. Gıda Endüstrisinde ve Yem Üretimindeki Kullanım Alanları.....	8
2.1.5.3. Diğer Endüstrilerdeki Kullanım Alanları.....	8
2.1.5.4. Toksisitesi	10
2.1.6. Üretim Yöntemleri	10
2.1.6.1. Kimyasal Yükseltgenme ile Üretimi	10
2.1.6.2. Elektrokimyasal Yükseltgenme ile Üretimi	10
2.1.6.3. Katalitik Yükseltgenme ile Üretimi	11
2.1.6.4. Biyokimyasal Yükseltgenme ile Üretimi (Fermentasyon).....	11
2.1.6.4.1. Glukonik Asidin Bakterilerle Üretimi	12

2.1.6.4.2. Glukonik Asidin Küflerle Üretimi	13
2.2. Ürün Kazanımı, Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri.....	18
2.2.1. Mikroorganizmanın Metabolizması.....	18
2.2.2. Glukonik Asidin Ayrılması ve Saflaştırılması	19
2.2.3. Glukonik Asidin Analiz Yöntemleri.....	20
3. SİSTEMİN MATEMATİKSEL MODELLEMESİ	21
3.1. Mikroorganizmanın Üreme Kinetiği.....	21
3.2. Substrat İnhibisyonunun Olduğu Durumda Mikroorganizma Özgül Üreme Hızının Hesaplanması	22
3.3. Üreme Verimi	24
3.4. Ürün Verimi	25
3.5. Özgül Ürün Oluşum Hızı	25
3.6. Havalandırma Sayısı	26
4. DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ	27
4.1. Kullanılan Mikroorganizma.....	27
4.2. Üretim Yöntemleri	27
4.3. Deney Düzenekleri.....	28
4.4. Analiz Yöntemleri.....	30
4.4.1. Glukonik Asit Analizi	30
4.4.2. Glukoz Analizi	30
4.4.3. Mikroorganizma Analizi	31
5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32
5.1. Üretim Yöntemleri	32
5.1.1. Başlangıç Glukoz Derişiminin Etkisi.....	33
5.1.2. Glukozlu Besin Ortamında Genel Çalışmalar.....	36
5.1.2. Sıcaklığın Etkisi.....	38
5.1.3. Başlangıç pH'ının Etkisi	40
5.1.5. Diğer Substratların Glukonik Asit Fermentasyonuna Etkisi.....	43

5.1.5.1. Başlangıç Sakkaroz Derişiminin Etkisi	43
5.1.5.2. Başlangıç Melas Derişiminin Etkisi.....	46
5.1.6. Başlangıç Amonyum Nitrat Derişiminin Etkisi	49
5.1.7. Aşı Derişiminin Etkisi	51
5.1.8. Çalkalama Hızının Etkisi	53
5.2. Fermentör Çalışmaları	55
5.2.1. Karıştırma Hızının Etkisi	55
5.2.2. Havalandırma Hızının Etkisi	60
5.2.3. Substrat Olarak Melasın Etkisi	64
 6. SONUÇLAR.....	 66
 7. KAYNAKLAR DİZİNİ	 70
 EKLER.....	
Ek1. Glukonik Asit Analizi Yöntemi	
Ek 2. Glukoz Tayini	
Toplam İndirgenmiş Şeker Analiz Yöntemi	
Ek 3. Mikroorganizmanın Özgöl Üreme Hızının Hesaplanması	
Ek 4. Mikroorganizma Veriminin Hesaplanması	
Ek 5. Özgöl Ürün Oluşum Hızının Hesaplanması	
Ek 6. Havalandırma Sayısının Hesaplanması	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER

A	Başlangıç amonyum nitrat derişimi (g amonyum nitrat/L)
α	Stokiyometrik sabit
β	Orantı katsayısı
C	Mikroorganizmanın aşılama yüzdesi [(v/v).100]
D	Karıştırıcının çapı (cm)
I	İnhibitör derişimi (g/L)
K	Çalkalamalı su banyosunun çalkalama hızı (vuru/dk)
K_I	Substrat inhibisyonunda ayrışma sabiti (g substrat/L)
K_S	Monod sabiti (g substrat/L)
μ	Mikroorganizmanın özgül üreme hızı (sa ⁻¹)
μ_{max}	Maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı (sa ⁻¹)
$\mu_{max,i}$	Substrat inhibisyonunda maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı (sa ⁻¹)
N	Karıştırıcı hızı (rps)
N_a	Havalandırma sayısı
v	Özgül glukonik asit oluşum hızı [g glukonik asit/(g m.org.sağ)]
P	Havasız ortamda karıştırma için gerekli güç (W)
P_a	Havalandırılan ve karıştırılan sistemlerde gerekli güç (W)
Q	Havanın hacimsel akış hızı (L/sağ)
S	Substrat derişimi (g/L)

S_{Go}	Başlangıç glukoz derişimi (g glukoz/L)
S_{Mo}	Başlangıç melas derişimi (g melas/L)
S_o	Başlangıç substrat derişimi (g/L)
S_{So}	Başlangıç sakkaroz derişimi (g sakkaroz/L)
t	Zaman (saat)
T	Sıcaklık ($^{\circ}C$)
$\ddot{U}$	Glukonik asit derişimi (g glukonik asit/L)
$\ddot{U}_m$	Elde edilen maksimum glukonik asit derişimi (g glukonik asit/L)
X	Kuru ağırlık olarak mikroorganizma derişimi (g m.org./L)
X_m	Kuru ağırlık olarak maksimum mikroorganizma derişimi (g m.org./L)
X_o	Kuru ağırlık olarak başlangıçtaki mikroorganizma derişimi (g m.org./L)
$Y_{\ddot{U}/S_o}$	Başlangıç substrat derişimine göre hesaplanan glukonik asit verimi [(g glukonik asit)/ (g substrat)]
Y_{X/S_o}	Başlangıç substrat derişimlerine göre hesaplanan mikroorganizma verimi [(g m.org.)/(g substrat)].100

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Glukonik asidin yapısal formülü.....	4
2.2. Glukozdan glukonik asit oluşum tepkimesi.....	13
2.3. <i>Aspergillus niger</i> ile glukonik asit üretiminin biyokimyası.....	18
3.1. Mikroorganizma Özgül Üreme Hızının substrat derişimi ile değişimi.....	23
4.1. Fermentasyon çalışmalarında kullanılan deney düzeneği.....	29
5.1. <i>Aspergillus foetidus</i> için başlangıç glukoz derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi (Başlangıç pH'ı=6.5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	33
5.2. Bağıl glukoz tüketim hızı yüzdesinin glukoz başlangıç derişimi ile değişimi.....	36
5.3. <i>Aspergillus foetidus</i> için glukozlu besin ortamında glukonik asit, glukoz ve mikroorganizma derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri ($S_{G_0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 6.5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	38
5.4. <i>Aspergillus foetidus</i> için glukozlu besin ortamında sıcaklığın mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{G_0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 6.5; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	39
5.5. <i>Aspergillus foetidus</i> için glukozlu besin ortamında başlangıç pH'ının mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{G_0} = 57$ g/L; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	41
5.6. <i>Aspergillus foetidus</i> ile glukonik asit üretiminde fermentasyon ortamının pH değerinin zamanla değişimi ($S_{G_0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	42
5.7. <i>Aspergillus foetidus</i> için başlangıç sakkaroz derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	44

5.8.	<i>Aspergillus foetidus</i> için sakkarozlu besin ortamında glukonik asit ve mikroorganizma derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri ($S_{S0} = 75$ g/L; başlangıç pH'ı = 6.5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	46
5.9.	<i>Aspergillus foetidus</i> için başlangıç melas derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	47
5.10.	<i>Aspergillus foetidus</i> için melas içeren besin ortamında glukonik asit ve mikroorganizma derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri ($S_{M0} = 150$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	49
5.11.	<i>Aspergillus foetidus</i> için başlangıç amonyum nitrat derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	50
5.12.	<i>Aspergillus foetidus</i> için aşı derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	52
5.13.	<i>Aspergillus foetidus</i> için çalkalama hızının mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; aşı derişimi % 0.5).....	53
5.14.	Fermentörde farklı karıştırma hızlarında elde edilen glukonik asit derişimlerinin zamanla değişimi.....	55
5.15.	Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen maksimum glukonik asit derişimlerinin karıştırma hızı ile değişimi.....	56
5.16.	Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen maksimum glukonik asit derişimlerinin (P_a/P) oranı ile değişimi.....	58
5.17.	Fermentörde farklı karıştırma hızlarında glukoz tüketiminin zamanla değişimi.....	59
5.18.	Fermentörde bağlı glukoz tüketim hızı yüzdesinin karıştırma hızı ile değişimi.....	59
5.19.	Fermentörde farklı hava akış hızlarında elde edilen glukonik asit derişimlerinin zamanla değişimi.....	60

5.20.	Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen glukonik asit derişimlerinin hava akış hızı ile değişimi	61
5.21.	Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen maksimum glukonik asit derişimlerinin havalandırma sayısı (N_a) ile değişimi	62
5.22.	Fermentörde farklı hava akış hızlarında glukoz tüketiminin zamanla değişimi.....	63
5.23.	Fermentörde bağlı glukoz tüketim hızı yüzdesinin hava akış hızı ile değişimi.....	63
5.24.	Fermentörde melas içeren besin ortamında glukonik asit derişiminin zamanla değişimi	64
Ek.1.1.	Glukonik asit derişimi tayini için kalibrasyon doğrusu.....	75
Ek.2.1.	Glukoz tayini için çalışma doğrusu	77
Ek.3.1.	<i>Aspergillus foetidus</i> için mikroorganizma özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan örnek grafik ($S_{G0} = 57$ g/L; 28°C ; başlangıç pH'ı = 5; 84 vuru/dk çalkalama hızı; aşı derişimi % 0.5).....	78
Ek.4.1.	Glukozun substrat olarak kullanıldığı deneylerde ($X_m - X_0$) değerlerinin başlangıç glukoz derişimi ile değişimi ($S_{G0} = 57$ g/L; 28°C ; başlangıç pH'ı = 6.5; 84 vuru/dk çalkalama hızı; aşı derişimi % 0.5).....	79
Ek.5.1.	Özgül glukonik asit oluşum hızının zamanla değişimi ($S_{G0} = 57$ g/L; 28°C ; başlangıç pH'ı = 6.5; 84 vuru/dk çalkalama hızı; aşı derişimi % 0.5).....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sodyum glukonatın sudaki çözünürlüğü.....	7
2.2. Glukonik asit ve bazı tuzlarının üretim yöntemleri	17
4.1. <i>Aspergillus foetidus</i> 'un üretilmesinde kullanılan katı besin ortamının bileşimi.....	27
4.2. <i>Aspergillus foetidus</i> ile yapılan çalışmalarda kullanılan glukozlu sıvı besin ortamının bileşimi.....	28
5.1. <i>Aspergillus foetidus</i> için glukoz başlangıç derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ve glukonik asit verimine etkileri (Başlangıç pH'ı = 6.5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)	35
5.2. <i>Aspergillus foetidus</i> için çeşitli glukoz başlangıç derişimlerinde ve fermentasyonun beşinci gününde hesaplanan glukoz tüketim hızları.....	35
5.3. <i>Aspergillus foetidus</i> için sıcaklığın gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimlerine etkileri ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı=6.5; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5).....	40
5.4. <i>Aspergillus foetidus</i> için besin ortamı başlangıç pH değerinin gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimlerine etkileri ($S_{G0} = 57$ g/L; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)	42
5.5. <i>Aspergillus foetidus</i> için sakkaroz başlangıç derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ve glukonik asit verimine etkileri (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)	45
5.6. <i>Aspergillus foetidus</i> için başlangıç melas derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimlerine etkileri (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)	48
5.7. <i>Aspergillus foetidus</i> için başlangıç amonyum nitrat derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık	

	derişimleri ile glukonik asit verimine etkileri ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)	51
5.8.	<i>Aspergillus foetidus</i> için aşılama yüzdesinin gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimine etkileri ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)	53
5.9.	<i>Aspergillus foetidus</i> için çalkalama hızının gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimine etkileri ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; aşı derişimi % 0.5).....	54
5.10.	Karıştırma hızının glukonik asit derişimi, havalandırma sayısı (N_a) ve (P_a/P) oranına etkisi [Hava akış hızı = 2.78×10^{-6} m ³ /sn $\equiv$ 10 L/sa]	57
5.11.	Hava akış hızının glukonik asit derişimi, havalandırma sayısı (N_a) ve (P_a/P) oranına etkisi (Karıştırma hızı = 1000 rpm)	61
6.1.	<i>Aspergillus foetidus</i> için, maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı, Monod sabiti, substrat inhibisyonuna bağlı ayrışma sabiti ve mikroorganizma verimi değerlerinin substrat türü ile değişimleri	67

1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI

D-Glukonik asit, D-glukozun kimyasal, elektrokimyasal, katalitik veya biyokimyasal yükseltgenmesi ile elde edilen bir üründür. Gıda, ilaç ve tekstil endüstrileri içerisinde geniş bir kullanım alanı bulunması nedeniyle ticari önemi büyüktür.

Glukonik asit veya önemli bir tuzu olan sodyum glukonat sert sulardaki kalsiyum ve magnezyum tuzlarının çökmesini önlemek amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu amaçla; süt ve bira endüstrilerinde şişe yıkama aletlerinin temizliğinde kullanılırlar. Sodyum glukonat ayrıca tekstil endüstrisinde de aynı amaç için kullanılmaktadır. Kalsiyum, potasyum, demir (+2) ve magnezyum glukonatlar ilaç endüstrisinde; kalsiyum, potasyum, demir ve magnezyum eksikliklerinin giderilmesinde kullanılmaktadırlar. Titanyum glukonat deri imalatında, özellikle beyaz deri imalatında ve gluklono- δ -laktonun yağ asitlerinin aminleri ile tepkimesi sonucu elde edilen sülfolanmış glukonamidler ise; deterjan endüstrisinde kullanılmaktadırlar.

Glukonik asit ve tuzları ticari olarak genellikle glukoz veya glukoz içeren hammaddelerin yükseltgenmesiyle üretilmektedir. Kimyasal yükseltgenme metodlarının; çok iyi kontrol edilen sistemlerde ve optimum tepkime koşullarında dahi elde edilen verimlerin düşük olması (% 60-80) ve istenmeyen yan ürünlerin oluşması nedeniyle bazı dezavantajları vardır. Bu metodlarda ürünün geri kazanılması ve saflaştırılması oldukça zordur.

Elektrokimyasal yükseltgenme halojenlerin potansiyometrik olarak yükseltgenmesine dayanmaktadır. Bu metotta ürün maliyeti fazla olup verim % 80-90 arasındadır.

Katalitik yükseltgenmede; tepkime kullanılan katalistin ömrüne, aktivitesine ve seçiciliğine bağlıdır. Bu yöntemin ayrıca ürün saflaştırma işlemlerinin zorluğu ve enerji gereksiniminin fazla olması nedeniyle biyokimyasal yükseltgenmeye göre bazı dezavantajları vardır. Ayrıca glukozun glukonik asite fotokimyasal olarak yükseltgenmesi de önerilmiş ancak başarılı olunamamıştır (Ullmann, 1989).

Biyokimyasal yükseltgenme ile glukonik asit üretiminde çeşitli mikroorganizmalar

kullanılabilmektedir. Bakteri ve küfler gibi bir çok mikroorganizma türü glukonik asit, sitrik asit, laktik asit gibi maddelerin birini ya da aynı anda birkaçını üretebilmektedir.

Genel olarak glukonik asit üretiminde kullanılan bakteriler, *Acetobacter*, *Pseudomonas* ve *Gluconobacter* türlerine ait suşlardır. Glukonik asit üretiminde kullanılan küfler ise *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerine ait suşlardır. Biyokimyasal yükseltgenme yüzey ve derin fermentasyon metodlarıyla çeşitli fermentörlerde yapılmaktadır.

Biyokimyasal yükseltgenme metodlarında ürünün miktarı ve saflığı, kullanılan mikroorganizma türüne göre değişmektedir. Söz konusu yöntemlerin elde edilen glukonik asidin maliyetinin düşük oluşu ve kolay uygulanabilirliği açısından diğer yöntemlere göre bazı avantajları vardır.

Tez çalışmasında, *Aspergillus foetidus* NRRL 337 ile glukonik asit üretimi incelenecektir. Kullanılan mikroorganizma bir küftür.

Literatürde *Aspergillus foetidus*'un sadece glukonik asit ürettiği belirtilmektedir (Miroslav et al.,1989). Deneyler süresince glukonik asit üretimi için gerekli optimum şartlar; substrat türü, substrat derişimi, pH, sıcaklık, azot kaynağı, aşı derişimi, karıştırma hızı ve havalandırma hızı için belirlenmiştir.

Deneyssel çalışmalar 250 ml hacim kapasiteli erlenlerde 100 ml'lik çalışma hacmiyle bir çalkalamalı su banyosunda ve 500 ml hacim kapasiteli bir sıcaklık kontrollü, havalandırılmalı ve karıştırılmalı fermentörde yapılmıştır. Elde edilen deneyssel sonuçlardan mikroorganizma özgül üreme ve özgül glukonik asit üretim hızları, mikroorganizma ve glukonik asit üretim verimleri hesaplanmıştır.

Deneyssel çalışmalar süresince ortamda üretilen glukonik asit, sodyum hidroksitle titre edilerek sodyum glukonata dönüştürülmüş ve analizi yapılmıştır. Araştırmada substrat türü olarak glukoz, sakkaroz ve melas incelenmiş, diğer fermentasyon parametrelerinin optimum değerlerinin saptanmasında ise substrat olarak glukoz

kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca bir azot kaynağı olarak amonyum nitratın glukonik asit üretimi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Fermentörde yapılan deneylerde ise; karıştırma ve havalandırma hızlarının glukonik asit üretim hızı ve verimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

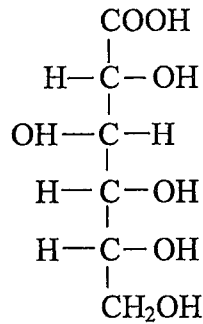
2.1. Glukonik Asit Üretimi

2.1.1. Giriş

Glukonik asit, diğer adıyla 1,2,3,4,5 pentahidroksi pentan-1-karboksilik asidin, yapısal formülü Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Kapalı formülü $C_6H_{12}O_7$ olup, molekül ağırlığı 196.16 g/gmol’dür (Ullmann, 1989).

Glukonik asit, 1870 yılında Hlasivetz ve Habermann tarafından glukozun klor ile yükseltgenmesi sırasında keşfedilmiştir. Boutroux ilk mikrobiyal yükseltgenme ile glukonik asit üretimini, 1878’de bir bakteri kullanarak denemiştir. Deneyde kullanılan *Acetobacter aceti* (Boutroux tarafından *Mycoderma aceti* olarak tanımlanmıştır) kültürü, glukozdan uçucu olmayan bir asit üretmiştir. Bu asit sonraki çalışmalarda glukonik asit olarak tanımlanmıştır.

Küflerle glukonik asit üretimi ise; ilk kez 1922’de Molliard tarafından *Aspergillus niger* (Molliard tarafından *Sterigmatocystis nigra* olarak tanımlanmıştır) ile sakkarozlu besin ortamında gerçekleştirmiştir (Underkofler, 1954).



Şekil 2.1. Glukonik asidin yapısal formülü

Daha sonraki pek çok araştırmada ise; glukonik asidin çeşitli mono, di ve polisakkaridlerle ve çeşitli oksitleme ajanlarıyla [bakır (II) veya hegzosiyonoferrat (III) tuzları veya civa (II) oksit] eldesi incelenmiştir (Ullmann, 1989).

2.1.2. Fiziksel Özellikleri

Susuz glukonik asit beyaz, kokusuz bir kristaldir. Erime sıcaklığı 120-131°C aralığındadır. Susuz glukonik asit 30°C'ın altındaki sıcaklıklarda; monohidrat şekli ise; 0-3°C'da kristallenir. Glukonik asidin monohidrat kristallerinin erime noktası yaklaşık 85°C'dır. Susuz glukonik asidin özgül dönme açısı $[\alpha]_D^{20}$ -6.7°, $[\alpha]_D^{25}$ -5.4° ve çözünme sabiti ise 25°C'da $K_a=1.99 \times 10^{-4}$ 'dür.

Glukonik asit kristali suda kolay çözünen, alkolde az çözünen, diğer organik çözücülerde ise çözünmeyen bir maddedir. Glukonik asidin iki laktonu vardır [γ (gamma) ve δ (delta) lakton]. Her ikisi de katı halde veya sulu çözelti içerisinde bulunabilirler, birbirleri ile ve serbest haldeki asitle dengededirler (Prescott, et al., 1953).

Glukonik asidi katı olarak hazırlamak mümkündür, ancak; işlemler sırasındaki zorluklar ve ürün maliyetinin yüksek oluşu nedeniyle ticari glukonik asidin % 50'lik sulu çözeltisi halinde hazırlanması tercih edilmektedir. % 50'lik çözeltinin 20°C'da pH'ı 1.82 ve yoğunluğu 1.23 g/cm³'dür. Glukonik asidin derişiminin artmasıyla çözeltinin yoğunluğu da artmaktadır. Glukonik asit oda sıcaklığında bir desikatör içerisinde iken veya 50°C'ın üzerinde ısıtıldığında laktonları oluşur. Pirolyzi 200°C'ın üzerinde olur (Peppler, 1967).

2.1.3. Kimyasal Özellikleri

Glukonik asidin çok çeşitli kullanım alanlarının bulunmasına rağmen kimyasal uygulamalarda, organik maddelerin sentezindeki kullanımı azdır. Kararsız türevleriyle kimyasal ara madde olarak kullanılır. Örneğin etil glukonat, düşük sıcaklıkta hazırlanmasına rağmen biraz ısıtıldığında etil alkol ve laktone bozunur. Glukonik asidin laktonlarıyla veya kalsiyum glukonatla, nitrik asit ya da hidrojen peroksit gibi yükseltgeme ajanlarının tepkimesi sonucu bir oksoglukonik asit katalist karışımı elde edilir. Glukonik asidin sulu çözeltisinin bir platin oksit katalisti varlığında hidrojenlendirilmesiyle D-glukoz elde edilir. Aynı reaksiyon (1,5) glukono- δ -lakton ile daha yüksek verimde gerçekleştirilmektedir.

Glukonik asidin fosforilizasyonu sonucu asidin kararlı fosforik asit esterleri; asetilasyonu sonucu ise; çeşitli türevleri elde edilebilir. Bunlar; pentaasetil glukonik asit, etil pentaasetil glukonat, penta asetil glukonil fenil hidroksit ve pentaasetil D-glukon amiddir. Glukonik asidin doymamış alkali amidleri ve üreidleri, örneğin, β -monoallilamid, monometil allilamid ve mono allilüreidler, glukonik asitten hazırlanmaktadır. Glukonik asidin altı fonksiyonel grubu alkollerle ve asitlerle tepkimeye girebilir (Ullmann, 1989). Glukonik asidin kararlı aromatik amidleri de hazırlanabilir. Bu asitle tersiyer alifatik aminler, efidrin ve naftilamin kolaylıkla tepkimeye girmektedirler.

Ticari olarak üretilen glukonik asit metal tuzları; kalsiyum, antimon, demir, alüminyum, krom, bakır, nikel, kurşun, vanadyum, titanyum, sodyum, magnezyum, mangan ve potasyum glukonatlarıdır (Prescott et al., 1953).

2.1.4. Türevleri

D-Glukono- δ -Lakton: Ticari önemi olan bir başka ürün de D-glukono- δ -laktonudur. Glukonik asidin sulu çözeltisinin kristallendirilmesiyle elde edilir. Kristal, beyaz, kokusuz, tatlı ve toz halindedir. Molekül ağırlığı 178.14 g/gmol'dür. Erime sıcaklığı 153°C, özgül dönme açısı $[\alpha]_D^{20} +61.7^\circ$ 'dir. Suda 59 g/100 ml, alkolde 1g/100 ml olacak şekilde çözünür, diğer çözücülerde ise çözünmez.

Amonyum Glukonat, $\text{NH}_4\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$: Beyaz renkli, iğne şeklindeki bir kristal yapıdadır. Kristalin erime sıcaklığı, 154°C'dır ve bu sıcaklıkta bozunur. Amonyum glukonat; 25°C'da, 100 ml suda 31.6 g çözünür; alkolde az çözünür; diğer organik çözücülerde ise çözünmez.

Kalsiyum Glukonat, $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)$: Beyaz renkli, kokusuz, tatsız ve iğne şeklindeki bir kristal yapıdadır. Derişik glukonik asit çözeltisinin kalsiyum karbonat ile nötralizasyonu sonucu elde edilir.

Kalsiyum glukonat, 25°C'da 100 ml suda 3.5 g çözünür; alkolde ya da diğer organik çözücülerde ise çözünmez (Peppler, 1967).

Bakır Glukonat, $\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2$: Glukonik asidin bakır tuzu hafif yeşil renkte kokusuz, hafif metalik tatta, kristal haldedir. 25°C'da, 100 ml suda 30 g çözünür; organik çözücülerde çözünmez.

Demir Glukonat, $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: Diğer demir tuzları gibidir, sarı-yeşil renkte, hafif yanık şeker kokusunda, toz kristal haldedir. Havada kararlıdır. Ancak, demir glukonatın sulu çözeltisi ışığa karşı duyarlıdır, fotokimyasal olarak indirgenir, 100°C'da 100 ml suda 8.5 g çözünür. Alkolde az çözünür; eterde ise çözünmez.

Magnezyum Glukonat, $\text{Mg}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7) \cdot \text{H}_2\text{O}$: Beyaz renkli, kokusuz ve tatsız olup kristal yapıdadır. Havada kararlıdır, ancak 200°C'da bozunur. 25°C'da, 100 ml suda 16 g çözünür, alkolde çok az çözünür, diğer organik çözücülerde ise çözünmez.

Mangan Glukonat, $\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: Kokusuz, iğne şeklinde kristal yapıdadır. Havada kararlıdır. 25°C'da, 100 ml suda 10.6 g çözünür, diğer organik çözücülerde ise çözünmez.

Potasyum Glukonat, $\text{KC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$: Beyaz renkli ve kristal yapıdadır. Susuz kristali havada kararlı olup, 180°C'da bozunur. Suda iyi çözünür. Sulu çözeltileri alkalidir.

Sodyum Glukonat, $\text{NaC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$: Kokusuz, renksiz ve kristal yapıdadır. Sıcaklığa bağlı olarak sudaki çözünürlüğü Çizelge 2.1'de verilmiştir. Organik çözücülerde çözünmez. Sulu çözeltisi nötraldir ve 100°C'da kararlıdır (Prescott, et al., 1953).

Çizelge 2.1. Sodyum glukonatın sudaki çözünürlüğü

Sıcaklık (°C)	Sodyum Glukonatın doymuş çözeltisi (Ağırlıkça %)
15	34.6
20	36.7
30	39.6
50	45.9
60	49.9
70	53.0
80	56.9

2.1.5. Kullanım Alanları

2.1.5.1. İlaç Endüstrisindeki Kullanım Alanları

Glukonik asit ve türevlerinin ilaç endüstrisinde geniş bir kullanım alanı vardır. Glukonik asit ve tuzları diyetler için gerekli iz elementlerin sağlanmasında kullanılmaktadır. Demir glukonat, beslenmeye bağlı anemi tedavisinde kullanılmaktadır ve demir eksikliğinin giderilmesinde bir tedavi ajanıdır. Demirfosfoglukonat ise ikincil anemi tedavisinde kullanılmaktadır. Literatürde, demir glukonatların üretimleri ve ilaç endüstrisindeki kullanımları ile ilgili olarak pek çok araştırma bulunmaktadır (Prescott et al., 1953).

Kalsiyum glukonat, vücutta çeşitli hastalıkların sebep olduğu kalsiyum eksikliğinin giderilmesinde kullanılan iyi bir kalsiyum kaynağıdır. Ayrıca; bu tuzla bir kas içi madde olan d-tubokurinin suda çözünen bir tuzu oluşturularak, elde edilen ürün spastik çocukların tedavisinde kullanılmaktadır. Kalsiyum glukonat ve magnezyum glukonatin dismoneria tedavisinde etkili oldukları bilinmektedir. Son yıllarda potasyum glukonat da hipotassemia tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca; glukonik asidin monoallil üreidi diüretik olarak kullanılmaktadır (Ullmann, 1989).

2.1.5.2. Gıda Endüstrisinde ve Yem Üretimindeki Kullanım Alanları

Hidrojenlenmiş bitkisel yağlar ve diğer bitkisel yağlar ile hayvansal yağlar gibi yağların içerisine konan az miktardaki glukonik asit, ekşimeyi engellemektedir. Glukono- δ -lakton; tartarik asit ve tuzlarından CO₂'in ayrılmasında etkili bir ayırma ajanı olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum glukonat; buzağuların hastalıklardan korunmasında ve tedavilerinde, ayrıca; kümes hayvanlarında kaliteli yumurta üretiminde ve kalsiyum eksikliğinin giderilmesinde yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Prescott et al., 1953).

2.1.5.3. Diğer Endüstrilerdeki Kullanım Alanları

Glukonik asit ve türevlerinin değişik endüstriler içerisinde çeşitli kullanım alanları vardır. Tekstil endüstrisinde; glukonik asit, glukono- δ -lakton ve amonyum glukonat

nontoksik ve az korozyon olmaları nedeniyle asit katalistleri olarak kullanılmaktadırlar. Glukonik asit ve amonyum glukonat; ayrıca tekstil ürünlerinin boyanmasında boya hammaddelerini güçlendirmek amacı ile de kullanılmaktadırlar. Tekstil makinelerinde pas ve kirecin giderilmesinde ise sodyum glukonat kullanılmaktadır.

Pek çok alkali temizleyici; özellikle cam alet ve malzeme temizliğinde kullanılan maddeler fazla miktarda sodyum hidroksit içermektedirler. Bir çok endüstride; kullanılan su sert su olduğu takdirde ekipmanlarda fazla miktarda kireç oluşumu gözlenmektedir. Bu kireçlenme problemi ortama eklenecek çok az miktardaki glukonik asit veya sodyum glukonatla kontrol edilebilmektedir. Bu nedenle; glukonik asit süt endüstrisinde süt taşlarının, bira endüstrisinde ise; bira taşlarının giderilmesinde ve metal yüzeylerin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Kullanılacak sodyum glukonatın miktarı; suyun sertliğine göre değişmektedir. Sodyum glukonat genellikle ortama % 5-10 oranında eklenmektedir (Underkofler, 1954).

Sodyum glukonat ve glukonik asit deri endüstrisinde; derinin tabaklanmasında kullanılmaktadırlar. Demir ve alüminyum hidroksitlerin derinin izoelektrik noktasından önce çökmesi ortama glukonik asit ilave edilerek engellenmektedir. Ayrıca bir glukonik asit tuzu olan titanyum glukonat beyaz deri imalatında kullanılmaktadır.

Sodyum glukonat ve glukono- δ -lakton fotoğraf endüstrisinde, atmosferik şartlarda kararlı olan kimyasal karışımların hazırlanmasında kullanılmaktadırlar. Glukonik asit ve bazı tuzları ayrıca taş baskı boyamada da kullanılmaktadırlar.

Glukonik asit ve tuzları; özellikle; sodyum glukonat suda çözünen boyalara parlamanın ve renk değişiminin engellenmesi amacıyla da katılmaktadırlar.

Yağ aminleriyle glukono- δ -laktonun reaksiyonu sonucu elde edilen sulfolanmış glukonamidler etkili birer deterjan malzemeleridir (Prescott et al., 1953).

2.1.5.4. Toksisitesi

Glukonik asit toksik bir madde değildir. İnsan böbreğindeki fosfat taşlarının çözeltisiyle yapılan çalışmalarda, serbest glukonik asidin, gıdalarda insan ve hayvanlara herhangi bir yan etki ya da zarar verdiği gözlenmemiştir. Bu düşük toksisite derecesi ile amonyum glukonat ve glukonik asidin insanlarda üre pH'nın azaltılmasında aynı etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur.

Diğer bir araştırmada da glukonik asit ve laktonunun herhangi bir gastrik zarar oluşturacak toksisiteye sahip olmadıkları bulunmuştur (Prescott et al., 1953).

2.1.6. Üretim Yöntemleri

Glukonik asit ve tuzlarının ticari amaçlı üretimi, glukoz ve glukoz içeren hammaddelerin yükseltgenmesi ile yapılmaktadır. Yükseltgenme metodları kimyasal, elektrokimyasal, katalitik veya biyokimyasaldır.

2.1.6.1. Kimyasal Yükseltgenme ile Üretimi

Glukonik asidin kimyasal yükseltgenme metodu ile üretimi; elde edilen ürünün saflığının sınırlı olması, tepkime şartlarının kontrolünün ve optimizasyonunun zorluğu, düşük verim elde edilmesi ve istenmeyen yan ürünlerin oluşması nedeniyle bazı dezavantajlara sahiptir. Son yıllarda kimyasal yükseltgenme ile glukonik asit üretimi üzerine yapılan çalışmalarda, yükseltgeyici madde olarak, hidrojen peroksit, ozon ve oksijen kullanılmaktadır.

2.1.6.2. Elektrokimyasal Yükseltgenme ile Üretimi

Elektrokimyasal yöntemlerde de özellikle halojenlerin yükseltgenmesinde kimyasal yükseltgenme metodlarındaki problemlerle karşılaşılmaktadır. En çok kullanılan yöntemlerde glukozu göre molce yaklaşık %10 bromür içeren bir glukoz çözeltisi 1-20 A/dm³ akım yoğunluğunda elektroliz edilir. Oluşan asidin nötralizasyonu için ortama karbonat (CaCO₃) veya hidroksitler eklenir. Glukozu göre ürün verimi % 80-97'dir. Elektrolitik proseslerin glukonik asit üretimindeki önemi son yıllarda giderek artmıştır.

2.1.6.3. Katalitik Yükseltgenme ile Üretimi

Glukozun oksijen veya hava ile yükseltgenme tekniklerinde meydana gelen gelişmelerin, endüstriyel ölçeğe aktarılması ile ilgili araştırmalar halen devam etmektedir. Yükseltgenme işlemlerinde derişimi 1-2 mol/L aralığında değişen bir glukoz çözeltisi ve uygun bir katalizör kullanılarak ortamın pH'ı alkali çözelti ilave edilerek 8-11 (tercihen 9-10) aralığında sabit tutulur. Kullanılan katalizörler alüminyum oksit veya başka bir taşıyıcı üzerine tutturulmuş platin grubu metallere aittir.

Yükseltgen madde olarak ozonun kullanıldığı bir yöntemde; D-glukoz ve O₃'ün alkali şartlarda, bir metal (kurşun ya da platin) oksit katalizörün varlığında tepkimesiyle glukonik asidin bir tuzu elde edilir. Tepkime sonunda 40 g sodyum hidroksit ile 192 g sodyum glukonat elde edilmektedir (Nakagawa et al., 1974).

Bu yöntemlerde en önemli dezavantaj katalizörün aktivitesini hızla kaybetmesidir. Bu nedenle oldukça saf çözeltilerin kullanılması ve tepkime koşullarının optimize edilerek istenmeyen çeşitli yan tepkimelerle ortaya çıkacak yan ürünlerin oluşmasının önlenmesi gereklidir.

Bu metodlarla elde edilecek ürünün saflığı % 99.5'un üzerindedir. Yöntemlerin ekonomikliği büyük ölçüde kullanılacak katalizörün aktivitesine, seçiciliğine, ömrüne ve maliyetine, ayrıca; enerji giderleriyle ürün ayırma işlemlerinin maliyetine bağlıdır (Ullmann, 1989).

2.1.6.4. Biyokimyasal Yükseltgenme ile Üretimi (Fermentasyon)

Glukonik asit, glukozlu besin ortamında küf ya da bakteri kullanılarak fermentasyonla üretilmektedir. Farklı mikroorganizmaların ticari uygulamalara adapte edilebilirliği açısından aralarında büyük farklılıklar bulunmaktadır. Bazı mikroorganizmalar düşük verimle glukonik asit üretirken, bazıları glukozu yavaş fermente etmekte, bazılarında ise karakteristik kültür oluşumu geç olmaktadır (Prescott and Dunn, 1959).

Glukonik asit fermentasyonunda pek çok mikroorganizma kullanılmaktadır.

Glukonik asit ve glukonatların ticari olarak üretimi *Gluconobacter*, *Acetobacter* ve *Pseudomonas* ile glukozlu besin ortamında yüksek atmosferik basınçta ve karıştırılmalı ve havalandırılmalı derin üretim fermentörlerinde ve *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri ile yine glukozlu besin ortamında yüzey ve derin üretim fermentörlerinde yapılmaktadır.

2.1.6.4.1. Glukonik Asidin Bakterilerle Üretimi

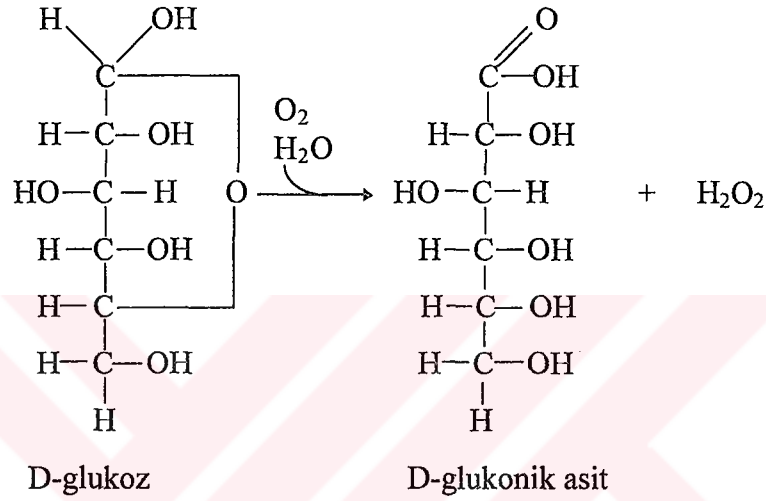
Asetik asit bakterileri ile glukonik asit üretiminin Boutroux tarafından bulunmasından sonra günümüze kadar diğer bakteri türleri de kullanılarak pek çok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların pek çoğunda *Acetobacter* türü mikroorganizmalar kullanılmıştır. Ancak bu türe ait çalışmalar sonucunda, oksidasyon ilerledikçe üretimin ketoglukonik asitler şeklinde olduğu görülmüştür. *Pseudomonas* türlerinde de ürün 2-ketoglukonik asit formundadır.

Günümüze kadar yapılmış glukonik asit fermentasyonlarında kullanılan asetik asit bakterileri; *A. aceti*, *A. acetosum*, *A. ascenders*, *A. gluconicum*, *A. Hushigaki* var. *rosea*, *A. industrialium* var. *Hoshigaki*, *A. kutzingianum*, *A. orleanense*, *A. pasteurianum*, *A. rancens*, *A. suboxydans*, *A. xylinoides*, *A. xylinum*, *A. suboxydans muciparum* ve *A. melanogenum*, ve diğer bakteriler ise; *Gluconobacter suboxydans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır (Underkofler, 1954; Prescott and Dunn, 1959; Atkinson and Mavituna, 1983; Matthey, 1992).

Baldan *Acetobacter* ve *Gluconobacter* türü bakterilerin izolasyonu ve bu bakterilerle glukonik asit üretimi Argüeso ve Navarro tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada Gram-negatif bakterilerin glukozlu besin ortamında büyük miktarda glukonik asit ürettikleri bulunmuştur (Argüeso and Navarro, 1973). Attwood ve arkadaşları ise; bir Gram-negatif bakteri olan *Acetobacter diazotrophicus* ile glukonik asit üretimini ve glukoz metabolizmasını incelemişlerdir (Attwood et al., 1991).

Literatürde asetik asit bakterileri ile yapılmış glukonik asit üretimi çalışmalarına ait pek çok patent bulunmaktadır. Currie ve Carter, *A. oxydans* ile glukoz çözeltisini

ince bir film halinde hava ile temas ettirerek glukonik asit üretmişlerdir. Daha sonraları Currie ve Finlay *A. gluconicum* ile, Takahashi *A. Hushigaki var. rosea* ile, Lockwood ise; *Pseudomonas* türleriyle glukonik asit üretimini denemişlerdir (Lockwood and Berry, 1975). Yapılan çalışmalar sonucunda bakterilerle yükseltgenme ile glukonik asit üretimi endüstriyel açıdan kullanışlı bulunmamıştır (Underkofler, 1954). Glukozdan glukonik asit oluşum tepkimesi Şekil 2.2’de verilmiştir (Casida, 1964).



Şekil 2.2. Glukozdan glukonik asit oluşum tepkimesi

2.1.6.4.2. Glukonik Asidin Küflerle Üretimi

Yüzey Fermentasyonu ile Üretimi: May ve arkadaşları ilk olarak 1927 yılında bir küf olan *Penicillium lutemum purpurogenum* ile glukonik asit üretimini gerçekleştirmişlerdir. Herick ve May, yüzey fermentasyonu için tavaları kullanmışlardır (May et al., 1929). Bu yöntemde steril bir glukozlu besin ortamı küfle aşılanır ve inkübasyona bırakılır. Gelişen misel glukonik asit üretiminin yapılacağı ortama steril olarak aktarılır.

Seçilen tavanın belirli özelliklere sahip olması gerekir. Korozyon ve toksik olmamalı, ucuz olmalıdır. Demir, çinko ve alüminyum asitten etkilenir; nikel, kurşun, bakır toksiktir; cam uygun bir tava yapı malzemesidir ancak çabuk kırılır ve bakalit ise pahalı olması nedeniyle tercih edilmemektedir (Prescott and Dunn, 1959). Moyer, May ve Herrick bu yöntemle *P. crysogenum* kullanarak glukonik asit üretimini

denemişler ve glukozlu besin ortamında optimum sıcaklığı 30°C olarak saptamışlardır. Kullanılan besin ortamı bileşiminde 200-250 g/L derişiminde glukoz ve inorganik tuzlar bulunmaktadır (Underkofler, 1954).

Derin Fermentasyonla Üretimi: Derin fermentasyon yöntemi ilk olarak 1928 yılında Schreyer tarafından *A. fumaricus* ile glukonik asit ve sitrik asit karışımının üretiminde denenmiştir. Yapılan çalışmalarda havalandırma, karıştırma ve ortama kalsiyum karbonatın eklenmesinin ürün oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Kalsiyum karbonatın, glukonik asit üretimini artırdığı; sitrik asit üretimini ise etkilemediği bulunmuştur.

Currie ve arkadaşları 1933 yılında, *A. niger* ve *Penicillium luteum* ile yüksek verimde glukonik asit üretimini yüksek karıştırma hızında besin ortamına fazla miktarda hava göndererek gerçekleştirmişlerdir. 1934 yılında May ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise; *P. chrysogenum* kullanılmış ve ortama gönderilen havanın basıncı 3 atm ve daha yüksek bir değerde olacak şekilde artırılmıştır (May et al., 1934).

Herrick ve arkadaşları glukonik asit fermentasyonunu daha gelişmiş bir fermentörde ve yüksek hava basıncında gerçekleştirmek amacıyla 1935 yılında bir rotary-drum fermentör tasarlamışlardır (Herrick et al., 1935). Tampon levhalar kullanılarak oksijenin fermentör içerisinde homojen olarak dağılımı ve mikroorganizma ile iyi temas ettirilmesi sağlanmıştır.

Rotary-drum fermentörde bir başka çalışma da Moyer ve arkadaşları tarafından *P. chrysogenum* ve *A. niger* 67 ile yapılmıştır (Moyer et al., 1937). *A. niger* 67 ile yapılan laboratuvar ölçekli bir çalışmada glukonik asit üretiminde optimum şartlar, yüksek hava basıncında elde edilmiştir. Ortam bileşiminde 100-150 g/L glukoz, bazı inorganik tuzlar ve CaCO₃ bulunmaktadır. Aynı çalışmaya benzer olarak 1937'de Wells ve arkadaşları pilot ölçekte bir alüminyum-drum fermentör tasarlamışlar ve parametre olarak; farklı ortam bileşimlerindeki kültür gelişiminin, nötralizasyon maddesinin miktarının, karıştırma hızının, hava akış hızının, glukoz derişiminin ve fermentasyon hacminin etkilerini incelemişlerdir (Wells et al., 1937). 1938 yılında Gastrock ve arkadaşları *A. niger* ile glukoz'dan glukonik asit üretimini büyük hacimli

bir fermentörde denemişlerdir (Gastrock et al., 1938). Porges ve arkadaşları ise; endüstriyel ölçekte glukonik asit üretimini *A. niger* 67 ile denemişlerdir (Porges et al., 1940; 1941). 1940 yılında Moyer ve arkadaşları, kalsiyum glukonat fermentasyonunda, % 35 glukoz içeren bir besin çözeltisine bir miktar borlu bileşik ekleyerek, oluşan kalsiyum glukonatin çökmesini engelleyebilmeyi başarmışlar ve besin ortamına aşırı kalsiyum karbonat eklenmesinin mümkün olduğunu bulmuşlardır. Aynı işlemi daha sonra Moyer *A. niger* 67 ve *A. niger* 3 ile denemiş ve *A. niger* 3'ün borlu bileşikten inhibe olmadığını saptamışlardır (Moyer, 1944).

Ortamda oluşan fazla glukonik asit fermentasyonu inhibe etmektedir. Bunu önlemek amacıyla ortama kalsiyum karbonat ilave edilerek, serbest glukonik asitle kalsiyum glukonat oluşturulmaktadır. Moyer'in çalışmalarına göre % 20, 25, 30 ve 35 glukoz içeren besin çözeltileri için kalsiyum glukonatin çökmesini engelleyecek borlu bileşik derişimleri 500, 1000, 1500, 2500 ppm olarak saptanmıştır (Moyer, 1944). Ancak mikroorganizmanın inkübasyon döneminde ortama eklenen borlu bileşik fermentasyonu inhibe etmektedir. Fermentasyon süresince kalsiyum boroglukonat kompleksi oluşmaktadır. Ortamdan ayrılması güç olan bu kompleksin hayvanlara zarar verdiği saptanmış ve bu ürünün satışına kısıtlama getirilmiştir (Peppler and Perlman, 1979).

Glukonik asit üretiminde substrat olarak melas kullanıldığında fermentasyona potasyum ferrosiyanürün etkisi Clark ve arkadaşları tarafından incelenmiştir (Clark et al., 1965). Roukas ve Harvey ise; *A. niger*'le şeker pancarı melasını kullanarak sitrik asit ve glukonik asit üretiminde pH'ın etkisini incelemişlerdir (Roukas and Harvey, 1988). *A. niger*'le glukonik asit üretiminde glukozlu besin ortamında azotlu bileşiklerin etkisi ise; Hatcher tarafından incelenmiştir (Hatcher, 1972). Novak ve Fencl; *A. niger*'le kesikli ve sürekli sistemlerde, glukozlu besin ortamında glukonik asit üretimini incelemişler ve üretime etki eden parametreleri araştırmışlardır (Novak and Fencl, 1973).

1989 yılında Sakurai ve arkadaşları dokunmamış elyaf üzerine *A. niger*'i immobilize ederek glukonik asit üretimini incelemişler ve 30°C'da glukonik asidi sodyum

glukonat türevi şeklinde elde etmişlerdir (Sakurai et al., 1989). Trager ve arkadaşları çözünmüş oksijen derişimini artıran bir fermentörle *A. niger* kullanarak glukonik asit üretimini incelemişlerdir (Trager et al., 1991). Benzer bir çalışmayı ise Moressi ve arkadaşları immobilize *A. niger*'le yapmışlardır (Moressi et al., 1991). 1992 yılında Rosenberg ve arkadaşları *A. niger*'le sakkarozlu besin ortamında glukonik asit üretimini ve invertaz aktivitesinin önemini araştırmışlardır (Rosenberg et al., 1992).

Kalsiyum Glukonat Fermentasyonu: Derin üretim yöntemlerinin kullanılması ve fermentasyon ortamında oluşan asidin CaCO_3 'la nötralizasyonu sonucunda kalsiyum glukonat elde edilmektedir. Çalışmalarda kalsiyum glukonat üretimi sırasında optimum glukoz çözeltisi derişiminin % 15 olduğu bulunmuştur. Kalsiyum kaynağı, Lobry-du-Bryn-Van Ekenstein tepkimesini engellemek amacıyla besin ortamından ayrı olarak sterillenir. Nötralizasyon maddesi steril glukoz çözeltisine aseptik koşullarda ve aşılamaadan sonra eklenir. Fermentasyon ortamına spor oluşumundan önce eklenen nötralizasyon maddesi spor oluşumunu engellemektedir. Fazla miktarda eklenen alkali çözelti ise miseli öldürmektedir (Peppler and Perlman, 1979).

Yapılan bir çalışmada kullanılan kültür çözeltisi; D-glukoz, çeşitli inorganik tuzlar ve mısır özütü sıvısını içermektedir. Kalsiyum glukonat fermentasyonunda hava basıncının etkisi incelenmiş ve basıncın 1 atm'dan büyük olmasının fermentasyonu olumlu yönde etkilediği bulunmuştur (May et al., 1934).

Sodyum Glukonat Fermentasyonu: Sodyum ve kalsiyum glukonat üretimleri arasındaki önemli farklılıklar, fermentasyonun başlangıcındaki glukoz derişimleri ve fermentasyon sonunda elde edilen glukonat derişimleri ile pH kontrolü arasındadır. Sodyum glukonat fermentasyonunda, NaOH fermentasyon ortamına otomatik olarak eklenerek pH kontrol edilmekte, kalsiyum glukonat üretiminde ise; CaCO_3 eklendikten sonra pH kontrolü yapılmaktadır. Sodyum glukonat, kalsiyum glukonattan daha kolay çözünür. Buna bağlı olarak, otomatik kontrolle eklenen NaOH'le asidin nötralizasyonu da çabuk olmaktadır. Sodyum glukonat üretiminde pH kontrolü yapılmayan metodlar da bulunmaktadır (Blom et al., 1952; Novak and Fencl, 1973).

Tipik bir fermentasyon ortamının bileşimi; glukoz, mısır özütü sıvısı, çeşitli inorganik tuzlar ve üreden oluşmaktadır. *A. niger*'e ait pek çok suş glukonik asit üretiminde kullanılmıştır. Elde edilen ürün, glukonik asit, sitrik asit ve okzalik asitten birini ya da bir kaçını içeren bir karışımdır. Karışım içerisindeki sitrik asit, ürünü kontamine etmektedir (Blom et al., 1952; Pepler and Perlman, 1979).

Glukonik asit üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, kullanılan yöntemler ve elde edilen verimler Çizelge 2.2'de verilmiştir (Atkinson and Mavituna, 1983).

Çizelge 2.2. Glukonik asit ve bazı tuzlarının üretim yöntemleri

Mikroorganizma	Glukoz derişimi(%)	Sıcaklık (°C)	Yöntem	Fermentasyon süresi	Temel ürün	Ürün verimi (%)
<i>Acetobacter gluconicum</i>	5	30	Havalandırma	4 gün	Glukonik asit	71.8-77.2
<i>Penicillium luteum purpurogenum var. rubrisclerotium</i>	20-25	25	Yüzey Fermentasyonu	9 gün	Glukonik asit	55-65
<i>P. chrysogenum</i>	20-25	30	Yüzey Fermentasyonu	8-10 gün	Glukonik asit, kalsiyum glukonat	60
<i>P. chrysogenum</i>	20	30	Derin Üretim (basınç)	8 gün	Glukonik asit, kalsiyum glukonat	80-87
<i>P. chrysogenum</i>	20	30	Derin Üretim (basınç)	2.2 gün	Glukonik asit, kalsiyum glukonat	80
<i>A. niger</i> NRRL 67	15.5	30	Derin Üretim (basınç)	18 saat	Glukonik asit, kalsiyum glukonat	97.1*
<i>A. niger</i> NRRL 67	11.5	30	Derin Üretim (basınç)	9 saat	Glukonik asit, kalsiyum glukonat	-
<i>A. niger</i> NRRL 3	24-30	33-34.4	Derin Üretim (basınç)	40 saat	Sodyum glukonat	-

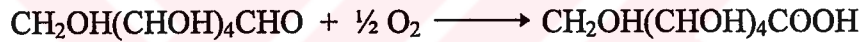
*kullanılan glukoz temelinde

2.2. Ürün Kazanımı, Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri

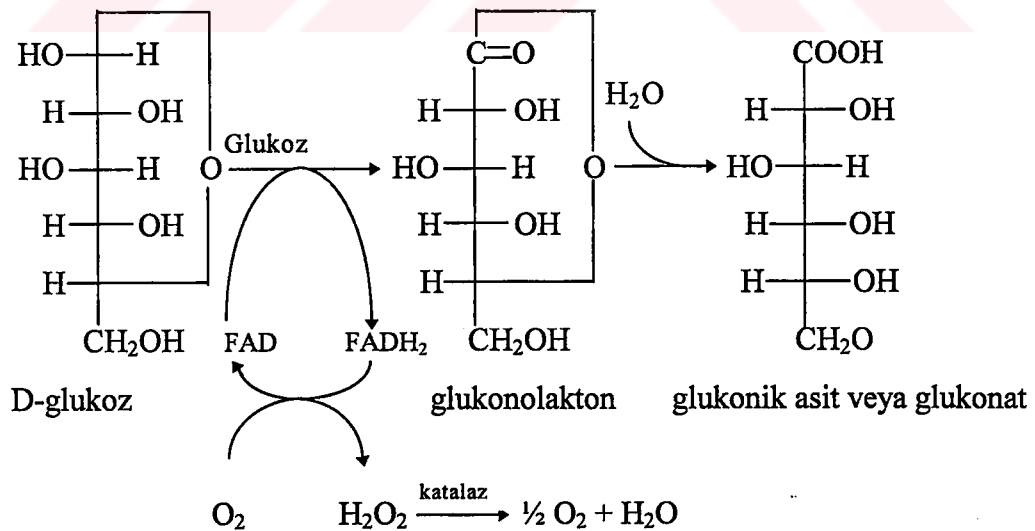
2.2.1. Mikroorganizmanın Metabolizması

Glukozun glukonik aside dönüşümü, glukozdaki karboksil grubunun aldehide yükseltgenmesi ile gerçekleşir. Molliard'ın *A. niger* kültürü ile glukonik asit üretimini incelemesinden üç yıl sonra Müller, hücredeki ilgili enziminin ayrılması ve saflaştırılması amacıyla bir çalışma yapmıştır. Bu çalışma ile glukonik asit üretiminde kullanılan enzimin glukoz oksidaz olduğu bulunmuştur.

Glukozun glukonik aside dönüşümü glukoz oksidaz enzimi varlığında gerçekleştiğinde 1 atom oksijene ihtiyaç vardır. Tepkime sonunda 1 mol H_2O_2 oluşumu sadece saf enzim kullanıldığında görülmektedir. Canlı hücrelerde katalaz enziminin bulunması H_2O_2 'yi yok eder ve toplam tepkime aşağıdaki gibi yazılabilir (Underkofler, 1954).



A. niger tarafından glukonik asit üretiminin biyokimyası Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. *Aspergillus niger* ile glukonik asit üretiminin biyokimyası

FAD ve FADH₂ sırasıyla flavin adenin dinükleotidin yükseltgenmiş ve indirgenmiş

formlarıdır. β -D-glukoz, glukoz oksidaz enzimi ile katalitik olarak glukono- δ -laktona yükseltgenmektedir. Laktonun glukonik aside hidrolizi kendiliğinden ve glukonolaktonaz enziminin etkisiyle gerçekleşen bir olaydır. Glukoz oksidaz (MW 186000) prostetik grup olarak iki mol FAD içermektedir. Bunlar glukozdan hidrojen atomunun uzaklaşmasında önemli rol oynarlar (FADH_2 formunda). Daha sonra oksijenle birleşerek H_2O_2 oluştururlar. H_2O_2 ise katalaz enzimiyle parçalanır. Glukoz oksidaz ve katalaz endoenzimlerdir.

A. niger'le glukonik asit üretiminde glukoz oksidaz dışında başka enzimler de rol oynamaktadır. Fermentasyonun metabolik incelemesinde üç basamak olduğu bulunmuştur. Lag fazın ardından üssel üreme dönemi, daha sonra ise durgun faz dönemi gelmektedir. Son dönemde glukonik asit oluşumu sabit hızla gerçekleşmektedir (Ullmann, 1989).

Literatürde; bu tezde glukonik asit üretiminde kullanılan *Aspergillus foetidus*'un ürün sentez metabolizması ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.2.2. Glukonik Asidin Ayrılması ve Saflaştırılması

Teknik glukonik asit, kalsiyum glukonat veya sodyum glukonatın sulu çözeltilerinden hazırlanmaktadır. Sulu kalsiyum glukonat çözeltisi kullanılarak glukonik asit eldesinde izlenen yol kısaca şöyledir; sulu kalsiyum glukonat çözeltisine stokiometrik miktarda sülfürik asit eklenir, elde edilen karışım ısıtılarak kalsiyum glukonatın çözülüp, kalsiyum sülfat şeklinde çökmesi sağlanır. Çökelek çözeltiden ayrıldıktan sonra süzüntü %50'lik glukonik asit çözeltisi olacak şekilde derişikleştirilir. İyon değıştirici reçine veya aktif karbondan geçirilerek renk giderilmesi sağlanır (Peppler and Perlman, 1979).

Kristal Glukonik Asit ve Laktonu: Sulu glukonik asit çözeltisinde, glukonik asit, glukono- δ -lakton, glukono- γ -lakton denge halinde bulunurlar. Bu bileşiklerin oranları sıcaklığa, derişime ve zamana bağlıdır (Peppler, 1967).

Doygun glukonik asit çözeltisinden kristallerin ayrılması işlemi 30°C 'nin altında (yaklaşık 0°C) yapılırsa ürün baskın olarak glukonik asittir. 30 - 70°C aralığında

kristaller glukono- δ -lakton, 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise; kristaller, glukono- γ -laktondur. Kristal ürünün saflığı için sıcaklık kontrolü çok önemlidir. Glukonik asidin kristalizasyonu zor ve pahalı bir işlem olduğu için ticari olarak tercih edilmemektedir (Atkinson and Mavituna, 1983).

2.2.3. Glukonik Asidin Analiz Yöntemleri

Glukonik asit, fenolftalein indikatörü ile standart alkali kullanılarak (NaOH çözeltisi) titre edilebilir (Peppler, 1967). Diğer bir analiz yönteminde ise; serbest glukonik asit, kalsiyum glukonat şekline dönüştürülür, ortamda kalan kalsiyum, okzalik asitle çöktürülür ve süzüntü permanganatla titre edilir (Underkofler 1954). Glukonolakton, galaktonolakton ve serbest glukonik asit hidroksimat metodu ile analiz edilebilirler (Lien, 1959). Glukonik asidin enzimatik analizi ise; Moellering ve Bergmeyer'e göre yapılabilir (Roukas and Harvey, 1988). Aynı mikroorganizmadan elde edilen üründe karışım halinde iki ya da daha fazla organik asit bulunuyorsa, analiz işlemi kağıt kromatografisiyle yapılabilir (Kristiansen and Sinclair, 1979). Ayrıca kapiler isotachophoresis yöntemiyle de glukonik asit analizi yapılabilmektedir (Rosenberg et al., 1992).

3. SİSTEMİN MATEMATİKSEL MODELLEMESİ

3.1. Mikroorganizmanın Üreme Kinetiği

Kesikli sistemlerde, üremeyi kısıtlayıcı substratın belirli bir başlangıç derişiminde, mikroorganizmaların üssel üreme bölgesindeki çoğalma hızı Eşitlik 3.1 ile gösterilir. Üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı (μ) değeri sabittir. Üreme hızı, hücrelerin ağırlığı veya sayısı ile doğru orantılıdır.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.1)$$

Burada; X, kuru ağırlık olarak mikroorganizma derişimini (g m.org./L) ve t, zamanı (saat) göstermektedir. Mikroorganizma özgül üreme hızı μ (saat⁻¹), birim mikroorganizma derişimindeki üreme hızı olarak tanımlanmakta ve Eşitlik 3.2 ile gösterilmektedir (Aiba et al., 1973).

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \Rightarrow \mu = \frac{d \ln X}{dt} \quad (3.2)$$

Şekil 3.1'den görüleceği gibi üssel üreme bölgesi dışında da mikroorganizma üreme tanımı yapılabilmektedir. Üssel üremenin olduğu lineer bölgede mikroorganizma özgül üreme hızının substrat başlangıç derişimi ile değışimi sabittir.

Özgül üreme hızının, üremeyi kısıtlayıcı substratın başlangıç derişimi ile değışimini gösteren bağıntı 1942 yılında Monod tarafından bulunmuştur (Eşitlik 3.3). Monod Eşitliği üssel üreme bölgesinde, ürün ve substrat inhibisyonlarının olmadığı durumlarda geçerlidir.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (3.3)$$

$\mu_{\max}$: Maksimum özgül üreme hızı, (saat⁻¹)

K_s : Monod Sabiti, (g substrat/L)

S : Üremeyi kısıtlayıcı substratın başlangıç derişimi, (g/L)

Eşitlik 3.3’de yer alan maksimum mikroorganizma özgül üreme hızının ve Monod Sabiti’nin değerleri, kullanılan mikroorganizmaya ve besin ortamında bulunan üremeyi kısıtlayıcı substratın türüne bağlı olarak değişmektedir. Monod Eşitliği’nin Lineweaver-Burke denklemine benzer şekilde doğrusallaştırılmasıyla Eşitlik 3.4 elde edilir.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (3.4)$$

Eşitlik 3.4’e göre $1/\mu$ değerlerine karşı $1/S$ değerleri grafiğe geçirilirse, elde edilen doğrunun eğiminden $K_s/\mu_{\max}$ değeri ve ordinatı kestiği noktadan $1/\mu_{\max}$ değeri saptanabilir (Bailey and Ollis, 1986).

3.2. Substrat İnhibisyonunun Olduğu Durumda Mikroorganizma Özgül Üreme Hızının Hesaplanması

Eşitlik 3.3, substrat derişimi değerinin mikroorganizma özgül üreme hızı ile değişimini en sade haliyle tanımlamaktadır. Ancak mikroorganizma sistemlerinde karşılaşılabilecek pek çok inhibisyon problemi bulunmaktadır. Mikroorganizmaların büyüme hızı, hücre derişimine, X , büyümeyi kısıtlayıcı substratın derişimine, S , ve inhibitörün derişimine, I , bağlı olarak aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\frac{dX}{dt} = f(X, S, I) \quad (3.5)$$

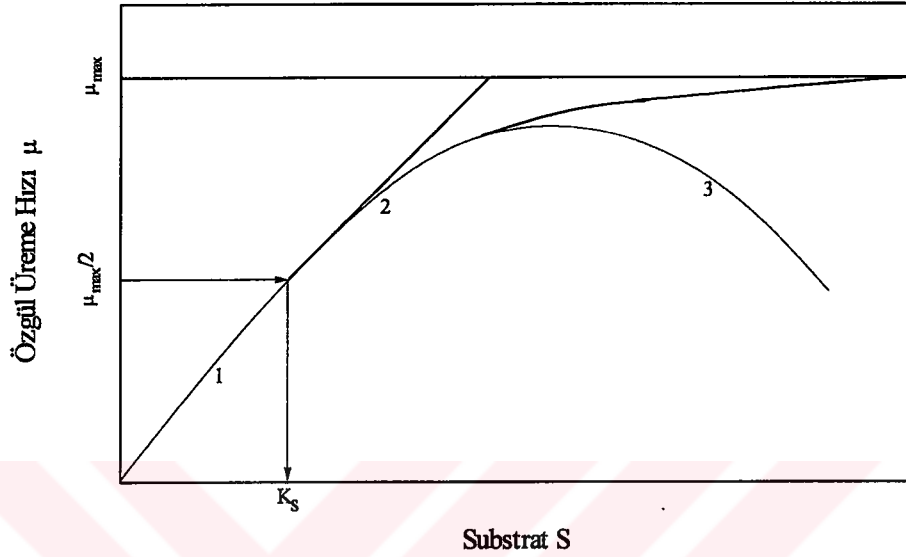
Pek çok sistemde X , S , I , değişkenleri beraber düşünülür. Bu nedenle hücre büyüme kinetiği lineer olmayan bir değişim gösterir. Genel olarak ürün inhibisyonu, enzim zehirlenmesi ve yüksek substrat derişimlerinde ise; substrat inhibisyonu ortaya çıkmaktadır. Şekil 3.1’de üreme-substrat ilişkisinin tipik bir değişimi gösterilmiştir. Şekil 3.1’deki bölgelerin açıklamaları ise aşağıdadır (Aiba et al., 1973).

1. Bölge:

Substrat derişimi, S ; ile Monod Sabiti, K_s arasındaki ilişki; $S \ll K_s$ olduğu durumda, özgül üreme hızı ile substrat derişimi arasında lineer bir değişim vardır. Bu ilişki

Eşitlik 3.6 ile gösterilmiştir.

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{K_s} S \quad (3.6)$$



Şekil 3.1. Mikroorganizma özgül üreme hızının substrat derişimi ile değışimi

2. Bölge:

2. bölge üssel üreme bölgesi olarak alındığında inhibisyon yokken Monod Eşitliği uygulanmaktadır. Substrat inhibisyonu için ise Monod eşitliğinin yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Yarışmasız substrat inhibisyonu tanımını için Monod eşitliği aşağıdaki gibi gösterilmiştir.

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_s}{S}\right) \left(1 + \frac{S}{K_i}\right)} \quad (3.7)$$

3. Bölge:

Yüksek substrat derişiminin olduğu bu bölgede substratın inhibisyon etkisi de çok fazla olmaktadır. Mikroorganizmaların üremesinde hız kısıtlayıcı basamak bir tek substratın olduğu ortamda enzimle katalizlenen tepkime ise, enzimin aktivitesinde

inhibisyona neden olacak bir etki mikroorganizmanın üremesinde de inhibisyona neden olmaktadır. $K_I \gg K_S$ olduğu durumda yarışmasız substrat inhibisyonu için Eşitlik 3.8 yazılabilir (Shuler and Kargı, 1992).

$$\mu \cong \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + S^2 / K_I} \quad (3.8)$$

Monod grafiğinde eğrinin tepe noktasındaki $d\mu/dS$ değeri sıfır olacağından Eşitlik 3.8'in birinci türevi alınıp sıfıra eşitlendiğinde Eşitlik 3.9 elde edilir. K_I değeri bu eşitlik kullanılarak hesaplanır. Substrat inhibisyonunun olduğu durum için maksimum özgül üreme hızı ($\mu_{\max,i}$) ise; K_S , K_I ve $\mu_{\max}$ değerleri hesaplandıktan sonra Eşitlik 3.10 kullanılarak hesaplanabilir.

$$S = \sqrt{K_S K_I} \quad (3.9)$$

$$\mu_{\max,i} = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + S^2 / K_I} \quad (3.10)$$

3.3. Üreme Verimi

Mikroorganizma derişimi ile besin ortamındaki üremeyi kısıtlayıcı substrat derişimi arasındaki sabit oran, üreme verimi (Y_{X/S_0}) olarak tanımlanmaktadır (Aiba et al., 1973)

$$Y_{X/S_0} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad (3.11)$$

Kesikli üretimde, başlangıç anı için X_0 ve S_0 ; t anı için ise X ve S değerleri alındığında Eşitlik 3.11 aşağıdaki gibi gösterilir.

$$Y_{X/S_0} = -\frac{X - X_0}{S - S_0} \quad (3.12)$$

Üremeyi kısıtlayıcı substratın tümünün harcandığı durumda maksimum mikroorganizma derişimine (X_m) ulaşılacağı düşünülürse, mikrobiyal üreme verimi ile substrat arasındaki ilişki Eşitlik 3.13 ile gösterilir.

$$X_m - X_0 = Y_{x/s_0} S_0 \quad (3.13)$$

3.4. Ürün Verimi

Aspergillus foetidus ile çeşitli substratlar kullanılarak yapılan çalışmalarda glukonik asit verimi ($Y_{\tilde{U}/S_0}$) değerleri, fermentasyon ortamlarından elde edilen maksimum glukonik asit miktarlarına ve üremeyi kısıtlayıcı substratların başlangıç derişimlerine bağlı olarak, Eşitlik 3.14 ile hesaplanır.

$$Y_{\tilde{U}/S_0} = \frac{\tilde{U}_m}{S_0} 100 \quad (3.14)$$

3.5. Özgöl Ürün Oluşum Hızı

Kesikli fermentasyonlarda, substrat stokiyometrik olarak ürüne dönüşüyorsa, ürün oluşum hızı aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$\frac{d\tilde{U}}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} \quad (3.15)$$

α : Stokiyometrik sabit

Ürün oluşumu, hücre derişimiyle bağımlı ve hücredeki enzim sistemi ürün oluşumunu kontrol ediyorsa, ürün oluşum hızı Eşitlik 3.16 ile tanımlanır.

$$\frac{d\tilde{U}}{dt} = \beta X \quad (3.16)$$

β : Orantı katsayısı

Luedeking ve arkadaşları Eşitlik 3.15 ve 3.16'yı birleştirerek kesikli ve sürekli fermentasyonlara uygulanabilen bir ürün oluşum hızı eşitliği tanımlamışlardır (Aiba et al., 1973):

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{U}}{dt} &= \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{ya da} \\ v &= \alpha \mu + \beta \equiv \frac{1}{X} \frac{d\tilde{U}}{dt} \end{aligned} \quad (3.17)$$

v : Özgöl ürün oluşum hızı, (g ürün/g m.org.zaman)

3.6. Havalandırma Sayısı

Mekanik karıştırma yapılan havalandırmalı fermentasyon sistemlerinde boyutsuz bir sayı olan havalandırma sayısı (N_a), Eşitlik 3.18'deki gibi tanımlanmaktadır (Bailey and Ollis, 1986).

$$N_a = \frac{Q}{ND^3} \quad (3.18)$$

Q: Havanın hacimsel akış hızı, (m^3/s)

N: Karıştırma hızı, (rps)

D: Karıştırıcının çapı, (m)



4. DENEY SİSTEMİ VE YÖNTEMLERİ

4.1. Kullanılan Mikroorganizma

Glukonik asit üretiminde kullanılan mikroorganizma, Amerika'dan liyofilize olarak getirtilen, NRRL 337 kod numaralı *Aspergillus foetidus*'dur. Mikroorganizma steril ortamda, saf su içerisinde süspansiyonu yapılarak agarlı katı besin ortamlarında üretilmiş ve belirli zaman aralıklarında yeni katı besin ortamlarına aktifliğini kaybetmemesi amacıyla aktarılmıştır.

4.2. Üretim Yöntemleri

Çalışmada kullanılacak mikroorganizma, petri tabakları ve deney tüplerine hazırlanmış agarlı katı besin ortamlarına ekilerek 25°C'deki bir inkübasyon etüvüne bırakılmış ve aktifleşmesi beklenmiştir. Katı besin ortamında üreyen mikroorganizma kültürü daha sonra sürekli katı besin ortamına aktararak, besin ortamına alışması sağlanmıştır. Mikroorganizmanın ortam koşullarında üretimi sağlandıktan sonra ise deneysel çalışmalara geçilmiştir.

Aspergillus foetidus ile glukonik asit üretiminde steril katı besin ortamına aşılama genellikle 72-96 saatlik kültürler kullanılarak yapılmaktadır. Mikroorganizmanın üretilmesinde kullanılan katı besin ortamının bileşimi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Aspergillus foetidus*'un üretilmesinde kullanılan katı besin ortamının bileşimi

Bileşen	Derişim (g/L)
Malt özütü	30
Soya peptonu	5
Agar	15

Katı besin ortamında yaklaşık olarak 72 saat sonunda üretilen mikroorganizma üzerine 10-12 ml steril saf su eklenir, bir özeyele mikroorganizma sporları kazınarak suda süspanse edilir. Bu süspansiyondan bir steril pipetle gerekli hacimde alınarak sıvı besin ortamı aşılanır. Glukozlu sıvı besin ortamının bileşimi Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Aspergillus foetidus* ile yapılan çalışmalarda kullanılan glukozlu sıvı besin ortamının bileşimi

Bileşen	Derişim (g/L)
Glukoz	57
MgSO ₄ ·H ₂ O	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.5
NH ₄ NO ₃	0.5
Pepton	1

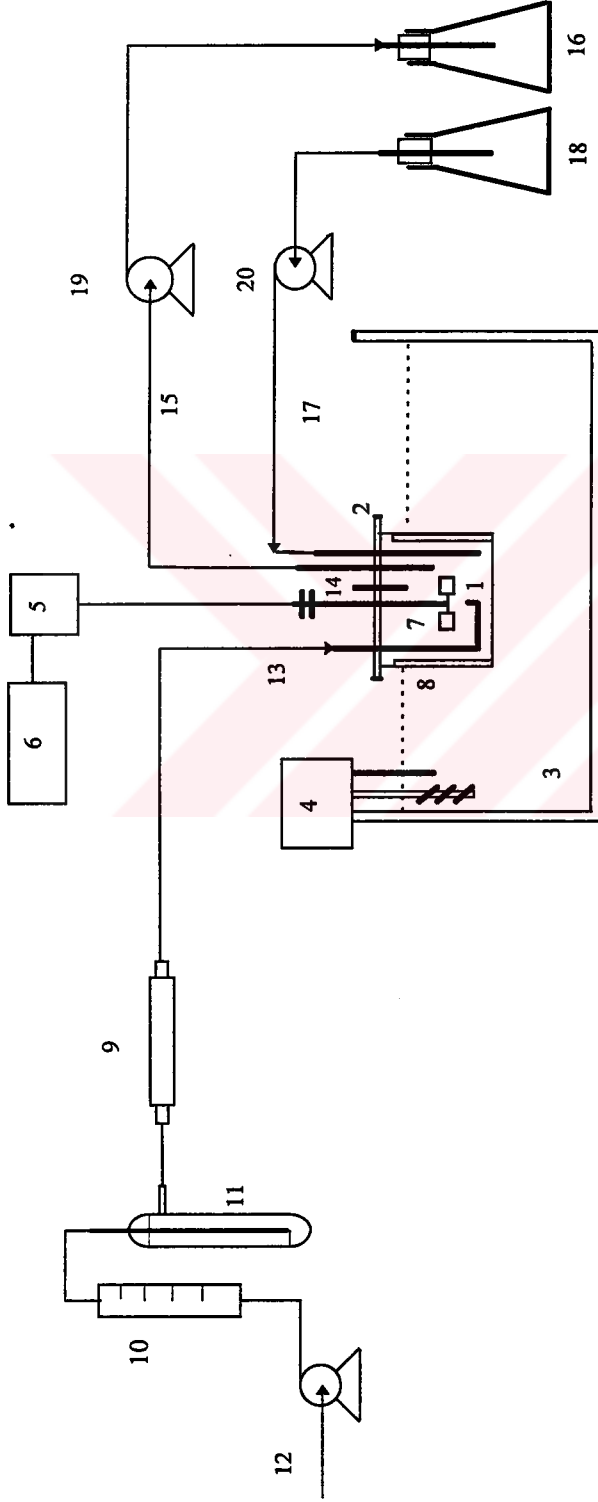
Sıvı besin ortamı otoklavda sterillenmeden önce pH'ı H₂SO₄ ve NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanır.

4.3. Deney Düzenekleri

Deneysel çalışmaların bir kısmı, *Aspergillus foetidus* ile 250 ml hacim kapasiteli erlenlerde, 100 ml'lik çalışma hacmiyle sıcaklık kontrollü, çalkalamalı su banyolarında yapılmıştır.

Deneysel çalışmaların diğer bölümü ise, *Aspergillus foetidus* ile Şekil 4.1'de gösterilen deney düzeneğinde gerçekleştirilmiştir. Çeşitli üretim parametrelerinin glukonik asit üretimindeki etkilerinin incelendiği fermentasyon çalışmalarında 500 ml'lik çalışma hacmine sahip pyrex camdan yapılmış bir fermentör kullanılmıştır. Fermentör boyutlarıyla ilgili geometrik oranlar standartlara uygundur (McCabe and Smith, 1976).

Fermentör içerisinde, vortex oluşumunu engellemek amacıyla tampon levhalar bulunmaktadır. Fermentörün üst kısmı pleksiglastan yapılmış bir kapak ile kapatılmıştır. Kapak üzerinde, hava çıkışı, hava girişi, analiz örneği çıkışı ve yedek besin çözeltisi girişi için uygun delikler ve karıştırıcı mil yatağı yer almaktadır. Devir ayarlı bir karıştırıcı ile karıştırılan fermentör, sabit sıcaklıkta tutulan bir su banyosuna yerleştirilmiştir. Hava bir hava pompası yardımıyla, yıkama şişesi ve steril filtreden geçirildikten sonra bir rotametre ile akış hızı ayarlanarak fermentöre



Şekil 4.1.1. Fermentasyon çalışmalarında kullanılan deney düzeneği

- | | | |
|--|---|---|
| 1. Fermentör | 9. Filtre | 16. Mikroorganizma aşısı kültürü |
| 2. Fermentör kapağı | 10. Rotametre | besleme ve örnek alma erleni |
| 3. Sabit sıcaklık su banyosu | 11. Yıkama şişesi | 17. İlave besleme borusu |
| 4. Kontrollü (on-off) ısıtıcı | 12. Hava pompası | 18. İlave besin ortamı erleni |
| 5. Karıştırıcı Motor | 13. Hava besleme borusu | 19. 20. Besleme ve örnek alma pompaları |
| 6. Varyak | 14. Fermentör hava çıkış borusu ve filtresi | |
| 7. Altı düz bıçaklı türbin karıştırıcı | 15. Mikroorganizma aşısı kültürü besleme ve | |
| 8. Tampon levha | örnek alma borusu | |

gönderilmektedir. Fermentasyon ortamı, paslamaz çelikten yapılmış altı düz bıçaklı bir türbin tipi karıştırıcı ile karıştırılmaktadır.

Fermentöre hava beslemesi karıştırıcı merkezine yakın bir yerden yapılmakta ve havanın fermentasyon ortamı içinde iyi bir şekilde dağıtılması sağlanmaktadır. Substrat olarak melas kullanılan fermentasyonda köpük oluşumunu önlemek amacıyla besin ortamına silikon köpük giderici eklenmiştir. Aşı mikroorganizma kültürlerinin fermentöre beslenmesinde ve analiz örneklerinin alınmasında, hızı ayarlanabilen bir pompa kullanılmıştır.

4.4. Analiz Yöntemleri

Aspergillus foetidus ile glukonik asit üretiminde, fermentasyon ortamından alınan örnekler için aşağıdaki analizler yapılmıştır.

4.4.1. Glukonik Asit Analizi

Fermentasyon ortamından belirli zaman aralıklarında alınan örnekler kaba bir süzgeç kağıdından süzülür. Süzgeç kağıdındaki mikroorganizma, mikroorganizma analizinde kullanılmak üzere saklanır. Süzme işleminden elde edilen süzüntü ise; glukonik asit ve glukoz analizlerinde kullanılmak amacıyla saklanır.

Fermentasyon ortamından elde edilen süzüntüdeki glukonik asit derişimi titrasyonla tayin edilmiştir. Ek 1’de anlatılan yöntemle göre oluşturulan kalibrasyon grafiğı kullanılarak titrasyon sırasında harcanan NaOH hacimlerinden glukonik asit derişimine geçilmiştir.

4.4.2. Glukoz Analizi

Bölüm 4.4.1’de anlatılan şekilde elde edilen süzüntünün bir kısmı glukoz analizinde kullanılır. Ayrılan süzüntüdeki glukoz derişimi örnek seyreltildikten sonra Nelson’un indirgenmiş şeker analizi (Nelson, 1944) yöntemine göre, spektrofotometrik olarak önceden hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak tayin edilir (Ek 2).

4.4.3. Mikroorganizma Analizi

Aspergillus foetidus sıvı besin ortamındaki gelişimi sırasında topak oluşturmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmanın sıvı besin ortamında homojen bir dağılımı yoktur. Mikroorganizmanın kuru ağırlık tayini belirli zamanlarda açılan erlenlerdeki fermentasyon ortamları süzildükten sonra yapılmıştır.

Süzme işlemi önceden tartılmış kuru, kaba süzgeç kağıtlarında yapılır. Süzülen mikroorganizma topakları saf su ile iki kez yıkanır, 24 saat süreyle 70°C'daki etüvde tutulur. Kurutulan mikroorganizma desikatörde 1 saat tutularak soğuması sağlanır ve daha sonra süzgeç kağıdı ile birlikte tartılır. Bu yöntemle mikroorganizma miktarı kuru ağırlık cinsinden (g m.org./L) olarak tayin edilmektedir.



5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Deneysel çalışmalarda bir küf olan NRRL 337 numaralı *Aspergillus foetidus* ile çalkalamalı ve sıcaklık kontrollü su banyolarında ve bir karıştırmalı ve havalandırılmalı fermentörde çeşitli substratların fermentasyon yoluyla glukonik aside dönüşümü incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda *Aspergillus foetidus*'un seçilmesinin nedeni daha öncede belirtildiği gibi bu mikroorganizmanın tek ürün olarak glukonik asit üretmesidir.

Çalkalamalı ve sıcaklık kontrollü su banyolarında yapılan çalışmalarda; sıcaklık, substrat türü ve başlangıç substrat derişiminin; ayrıca besin ortamı başlangıç pH'ı, karıştırma hızı ve aşı miktarının mikroorganizmanın özgül üreme ve glukonik asit üretim hızlarına etkileri incelenmiştir. Araştırmada substrat türü olarak glukoz, sakkaroz ve melas kullanılmıştır. Çalışmada, azot kaynağı olarak amonyum nitratın başlangıç derişiminin etkileri de incelenmiştir.

Fermentörde yapılan çalışmalarda ise; glukoz içeren besin ortamında havalandırma hızı ve karıştırma hızının etkileri araştırılmış ve fermentasyon ortamında substrat olarak melas kullanılarak, glukonik asit üretimine etkileri incelenmiştir.

5.1. Üretim Yöntemleri

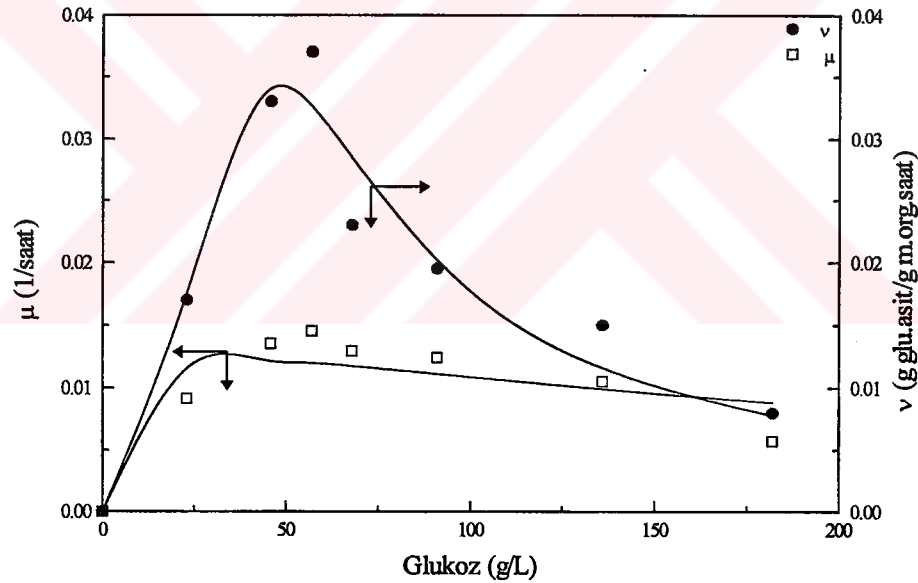
Aspergillus foetidus ile glukonik asit üretiminde temel substrat olarak glukoz kullanılmaktadır. Mikroorganizma glukozu tüketerek hem kendisi çoğalmakta hem de glukonik asit üretmektedir. Mikroorganizmanın üremesi Gaden sınıflandırmasının 1. tipine uymaktadır.

Mikroorganizmanın sıvı besin ortamına aşılmasından yaklaşık olarak iki gün sonra ürün oluşumu gözlenmektedir. Bu esnada mikroorganizma topaklarının renginde de bir değişim olmaktadır. Deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlardan; *Aspergillus foetidus* için özgül üreme hızları (Ek 3),

mikroorganizma verimleri (Ek 4), glukonik asit için ürün oluşum hızları (Ek 5) ve ürün verimleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

5.1.1. Başlangıç Glukoz Derişiminin Etkisi

Aspergillus foetidus ile glukonik asit üretiminde temel substrat olarak glukoz kullanılmıştır. Başlangıç glukoz derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda besin ortamlarındaki başlangıç glukoz derişimleri 0-182 g/L aralığında değiştirilmiştir. Her deney için elde edilen verilerden mikroorganizma özgül üreme ve ürün oluşum hızları hesaplanmış ve substrat başlangıç derişimine karşı grafiğe alınarak Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. *Aspergillus foetidus* için başlangıç glukoz derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi (Başlangıç pH'ı = 6.5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

Mikroorganizmanın özgül üreme ve ürün oluşum hızları başlangıç glukoz derişiminin artmasıyla önce artmakta; 57 g/L değerinde maksimuma ulaşmakta ve bu derişimden daha yüksek değerlerde ise substrat inhibisyonu ortaya çıkmaktadır. 57 g/L başlangıç glukoz derişiminde elde edilen mikroorganizma

özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızları sırasıyla 0.0145 (sa⁻¹) ve 0.0375 [g glukonik asit/(g m.org.saar)]'dir.

Mikroorganizma özgül üreme ve ürün oluşum hızlarının başlangıç glukoz derişimi ile değişimini gösteren bağıntılar lineer olmayan regrasyon tekniği kullanılarak bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.1 ve 5.2'de gösterilmiştir.

$$\mu = \frac{(0.017S_{Go})}{\left(8.241 + S_{Go} + \frac{S_{Go}^2}{207.872}\right)} \quad (5.1)$$

$$R^2 = 0.972$$

$$v = \frac{0.005S_{Go}}{\left[(6.181 + S_{Go})\left(1 + \frac{S_{Go}}{194.38}\right) + (-1.376S_{Go}) + 5.713\right]} \quad (5.2)$$

$$R^2 = 0.983$$

Substrat olarak glukozun kullanıldığı çalışmalarda inhibisyonun olduğu durumda maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı, Monod Sabiti ve substratın ayrışma sabiti; Eşitlik 5.1'den sırasıyla $\mu_{max,i} = 0.017$ (sa⁻¹), $K_S=8.241$ (g glukoz/L) ve $K_I = 207.872$ (g glukoz/L) olarak hesaplanmıştır.

Başlangıç glukoz derişiminin etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalarda elde edilen maksimum ürün ($\dot{U}_m$) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri ($Y_{\dot{U}/S_0}$) Çizelge 5.1'de verilmiştir. Glukozla yapılan deneysel çalışmalarda, en yüksek glukonik asit derişimi 91 g/L başlangıç glukoz derişiminde elde edilmiştir. Bu substrat derişimindeki glukonik asit verimi ise; %15.6 olarak hesaplanmıştır.

Glukoz kullanılan çalışmalarda mikroorganizma verimi ise; Eşitlik 3.13'e göre çizilen grafiğin eğiminden $Y_{x/S_0} = 0.217$ (g m.org./g glukoz) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.1. *Aspergillus foetidus* için glukoz başlangıç derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ve glukonik asit verimine etkileri (Başlangıç pH'ı = 6.5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

S_{Go} (g/L)	$\dot{U}_m$ (g/L)	X_m (g/L)	$Y_{\dot{U}/S_0}$
0	0	0	0
23	3.2	7.0	13.9
46	6.5	8.8	14.1
57	8.3	13.6	14.6
68	10.3	16.7	15.1
91	14.2	20.8	15.6
136	8.7	16.0	6.4
182	7.3	20.6	4.0

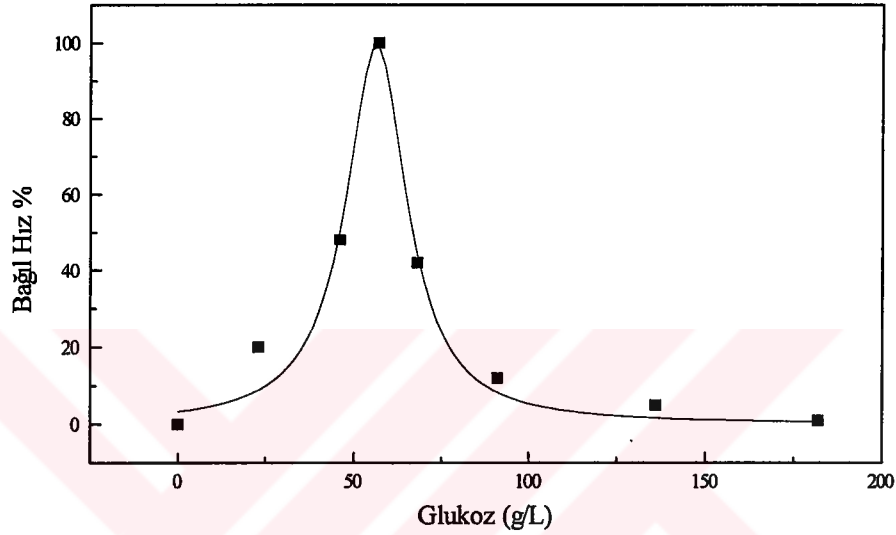
Substrat olarak glukozun kullanıldığı çalışmalarda ortamdaki glukoz derişimleri fermentasyon süresi boyunca tayin edilerek grafikler hazırlanmıştır. Başlangıçta 57 g/L derişiminde glukoz içeren fermentasyon ortamındaki glukoz derişiminin zamanla değışimi Şekil 5.3'de gösterilmiştir.

Glukozla yapılan deneyler için grafiklerden belirli zamanlara karşı gelen glukoz tüketim hızları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde fermentasyonun ilk iki gününde glukoz tüketiminin çok düşük hızla gerçekleştiği, en hızlı substrat tüketiminin üssel üreme bölgesine karşı gelen zaman aralığında gerçekleştiği; daha sonraki günlerde ise; tüketim hızının tekrar azaldığı bulunmuştur. Fermentasyonun beşinci günündeki glukoz tüketim hızları Çizelge 5.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2. *Aspergillus foetidus* için çeşitli glukoz başlangıç derişimlerinde ve fermentasyonun beşinci gününde hesaplanan glukoz tüketim hızları

S_{Go} (g/L)	Glukoz tüketim hızı [g glukoz/(L.sa)]
0	0
23	0.0589
46	0.1416
57	0.2945
68	0.1244
91	0.0353
136	0.0137
182	0.0040

Çizelge 5.2'deki değerler incelendiğinde en yüksek glukoz tüketim hızının 57 g/L'ye karşı gelen başlangıç derişiminde elde edildiği bulunmuştur. Diğer glukoz başlangıç derişimleri için bu değer temel alınarak bağıl glukoz tüketim hızı yüzdeleri hesaplanmış ve Şekil 5.2'de gösterilmiştir.



Şekil 5.2. Bağıl glukoz tüketim hızı yüzdesinin glukoz başlangıç derişimi ile değişimi

Şekilden de görüldüğü gibi substrat inhibisyonuna karşı gelen glukoz derişimlerinde glukoz tüketim hızında büyük bir azalma olmaktadır.

5.1.2. Glukozlu Besin Ortamında Genel Çalışmalar

Çalkalamalı su banyosunda, substrat olarak 57 g/L başlangıç derişiminde glukoz kullanılarak yürütülen kesikli çalışmalarda; glukoz, mikroorganizma ve glukonik asit derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri Şekil 5.3'de gösterilmiştir. *Aspergillus foetidus* için mikroorganizmanın büyüme eğrisinden aşağıdaki evreler belirlenmiştir.

1. Gecikme Evresi (Lag Periyod): Besin ortamına ekilen mikroorganizmanın yeni ortama uyum göstererek çoğalmaya başladığı bu evrede mikroorganizma

derişiminde hemen hemen hiç bir artış görülmemektedir. Genel olarak 10-14 saat süresince bu evre gözlenmektedir.

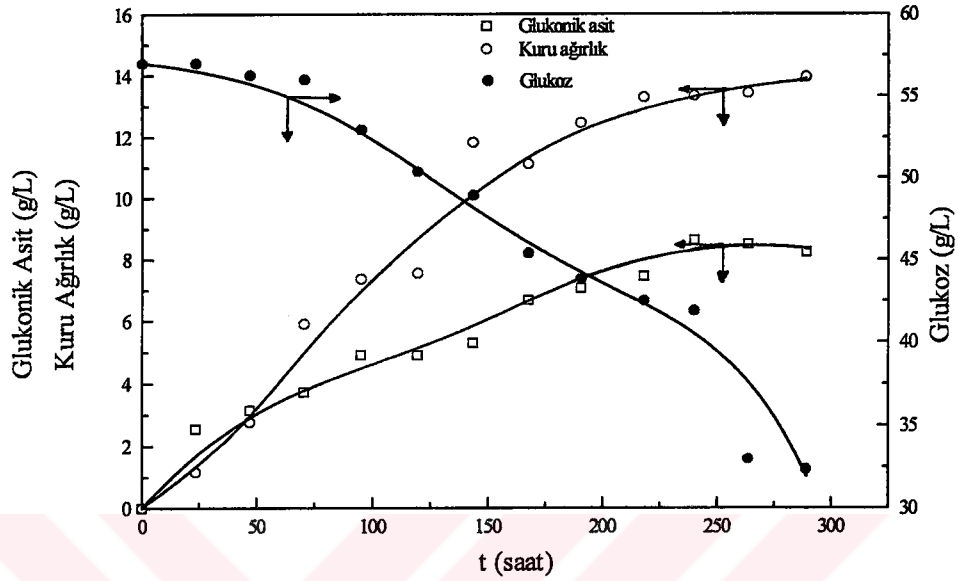
2. Geçiş Evresi: Gecikme evresi ile üssel üreme evresi arasında kalan bu evrede mikroorganizmanın özgül üreme hızı çok küçük bir değerdedir. *Aspergillus foetidus* için geçiş evresi 15-25. saatler arasında sürmektedir.

3. Üssel  reme Evresi: Geçiş evresinde belli bir sayıya ulaşan mikroorganizmalar üssel üreme bölgesine geçmektedir. Üssel  reme evresi 25-130. saat arasında değişmektedir. Üssel  reme evresindeki özgül üreme hızları 57 g/L başlangıç glukoz derişiminde; başlangıç pH değeri 6.5 için, $\mu=0.0145$ (sa^{-1}) ve pH değeri 5 için $\mu = 0.0228$ (sa^{-1}) ve en düşük değer ise; başlangıç glukoz derişimi 182 g/L olan besin çözeltisinde başlangıç pH değeri 6.5 için $\mu=0.0057$ (sa^{-1}) olarak bulunmuştur.

4. Duraklama Evresi: Üssel  reme evresini izleyen bu evrede mikroorganizmaların çoğalmasında bir yavaşlama görülmektedir. Bu evrede mikroorganizmaların üreme hızı üssel üreme bölgesine göre azalmaktadır. Duraklama evresinde ortamdaki besin maddeleri giderek azalacağı ve ortamda inhibe edici ürünler de oluşabileceği için mikroorganizmanın ideal ve maksimum derişime ulaşması  nlenebilir. *Aspergillus foetidus* için bu evre genel olarak 130-200. saat arasında gözlenmektedir.

5. Sabit Evre: Bu evrede zamana göre mikroorganizma sayısında net bir artış veya azalış görülmemektedir. Bu evrede üreme hızı yaklaşık olarak ölüm hızına eşittir. *Aspergillus foetidus*'la glukonik asit üretimi sırasında sabit evre genellikle 200-275. saatler arasında gözlenmektedir.

6. Ölüm Evresi: Mikroorganizma  reme eğrisinde ölüm evresinin gözlendiği çalışmalarda bu evreye yaklaşık olarak 280. saatten sonra geçilmekte ve mikroorganizmada belirgin bir renk ve görünüş değişimi oluşmaktadır.

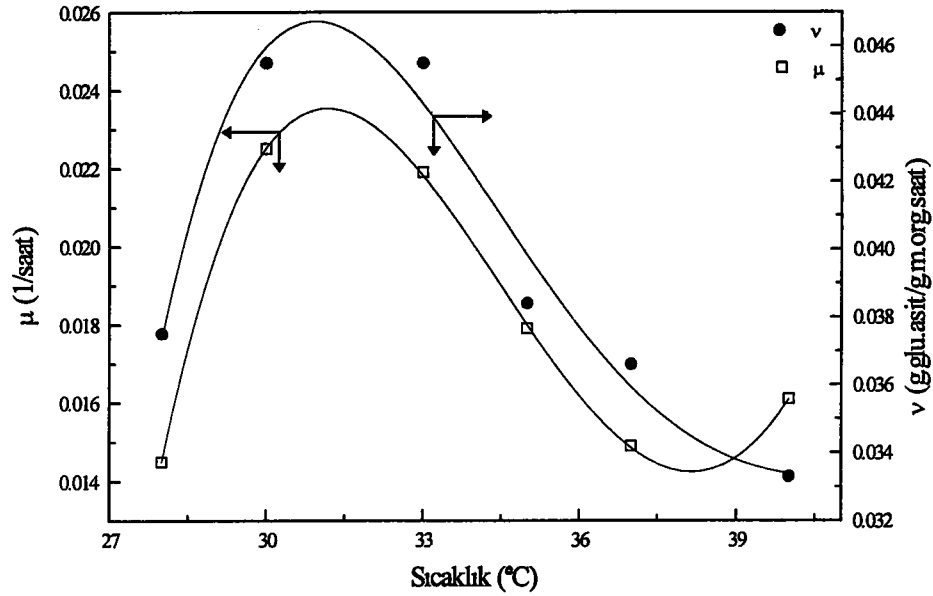


Şekil 5.3. *Aspergillus foetidus* için glukozlu besin ortamında glukonik asit, glukoz ve mikroorganizma derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri (S_{G0} = 57 g/L; başlangıç pH'ı = 6.5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

5.1.2. Sıcaklığın Etkisi

Glukonik asit üretiminde sıcaklığın ürün oluşumu ve mikroorganizma özgül üreme hızına etkileri 28-40°C aralığında incelenmiştir. Sıcaklık çalışmalarında ortamdaki glukozun başlangıç derişimi en yüksek hız değerlerinin elde edildiği 57 g/L değerinde sabit tutulmuştur.

Aspergillus foetidus için laboratuvar koşullarında optimum mikroorganizma üreme ve glukonik asit üretim sıcaklığı 30°C olarak bulunmuştur (Şekil 5.4). Sıcaklığın glukonik asit üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarının sıcaklıkla değişimleri en küçük kareler regrasyon tekniği kullanılarak bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.3 ve 5.4'de gösterilmiştir.



Şekil 5.4. *Aspergillus foetidus* için glukozlu besin ortamında sıcaklığın mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{Go} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 6.5; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

$$\mu = -4.35252 + 0.44766 T - 0.01671 T^2 + 0.00027 T^3 - 1.5381 \times 10^{-6} T^4 \quad (5.3)$$

$$R^2 = 0.999$$

$$v = -6.99249 + 0.7679 T - 0.0311 T^2 + 0.00055 T^3 - 3.6764 \times 10^{-6} T^4 \quad (5.4)$$

$$R^2 = 0.966$$

Sıcaklıkla ilgili deneylerde elde edilen maksimum ürün ($\bar{U}_m$) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri ($Y_{\bar{U}/S_0}$) Çizelge 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5.3'e göre *Aspergillus foetidus* için sıcaklığın glukonik asit üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda en yüksek glukonik asit verimi 33°C'da % 50.5 olarak elde edilmiştir. Bununla birlikte mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarının en yüksek bulunduğu değer 30°C olduğu için optimum sıcaklık aralığı (30-33°C) olarak seçilmiştir.

Çizelge 5.3. *Aspergillus foetidus* için sıcaklığın gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimlerine etkileri ($S_{Go} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı=6.5; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

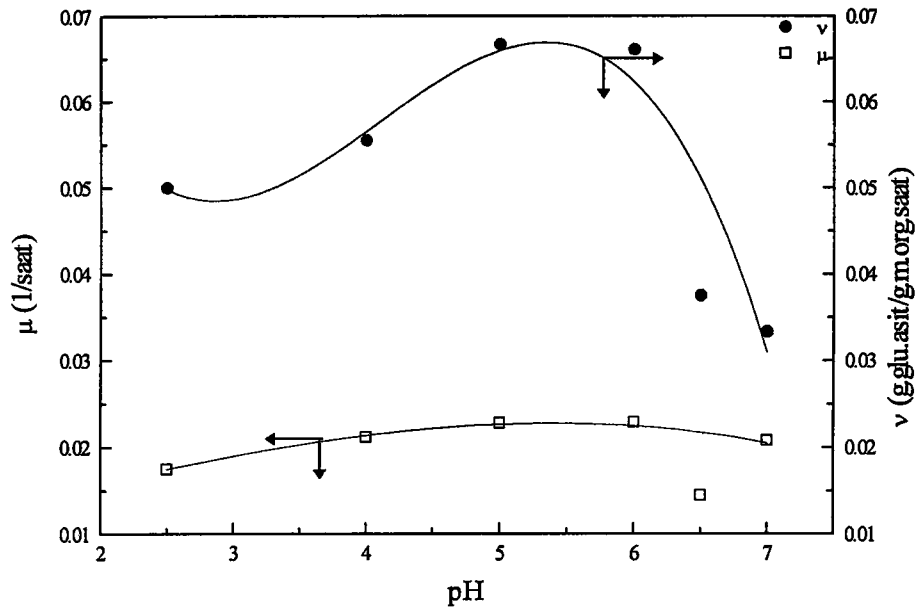
T (°C)	$\dot{U}_m$ (g/L)	X_m (g/L)	$Y_{\dot{U}/s_0}$
28	8.3	13.6	14.6
30	10.2	13.2	17.9
33	28.8	15.2	50.5
35	20.6	12.4	36.1
37	11.2	12.8	19.6
40	28.7	14.6	50.3

30°C'da elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızı 0.0226 (sa^{-1}) iken 33°C'da bu değer 0.0219 (sa^{-1})'dir. Bu sıcaklıklardaki glukonik asit oluşum hızı ise; 0.046 [g glukonik asit/(g m.org.saar)]'dir.

5.1.3. Başlangıç pH'ının Etkisi

Aspergillus foetidus kullanılarak glukonik asit üretiminde başlangıç pH'ının etkisi pH 2.5-7 aralığında incelenmiştir. Maksimum mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızları (5-6) başlangıç pH aralığında elde edilmiştir (Şekil 5.5). Bu aralıkta mikroorganizmanın özgül üreme hızı 0.0228 (sa^{-1}) ve glukonik asit oluşum hızı ise; 0.0667 [g glukonik asit/(g m.org.saar)] olarak hesaplanmıştır.

En küçük kareler regresyon tekniğı kullanılarak mikroorganizma özgül üreme; ve glukonik asit oluşum hızlarının başlangıç pH değeri ile değişimleri bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.5 ve 5.6'da gösterilmiştir.



Şekil 5.5. *Aspergillus foetidus* için glukozlu besin ortamında başlangıç pH'ının mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{G0} = 57$ g/L; 28°C ; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

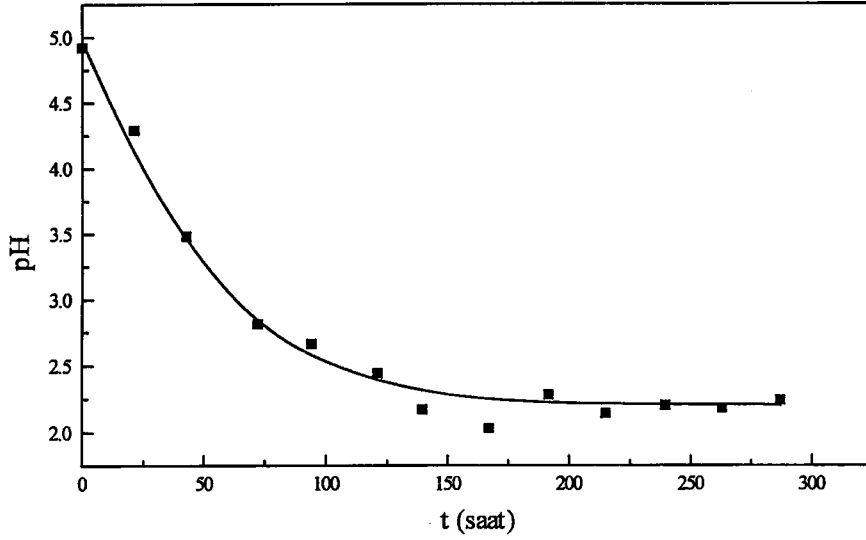
$$\mu = 0.00865 + 0.00352 \text{ pH} + 0.00015 \text{ pH}^2 - 0.00006 \text{ pH}^3 \quad (5.5)$$

$$R^2 = 0.955$$

$$v = 0.17976 - 0.11164 \text{ pH} + 0.02994 \text{ pH}^2 - 0.00243 \text{ pH}^3 \quad (5.6)$$

$$R^2 = 0.930$$

Deneysel çalışmalar sırasında besin ortamından alınan örneklerin pH ölçümleri yapılarak pH'ın fermentasyon süresince değişimi incelenmiştir. *Aspergillus foetidus* ile glukonik asit üretiminin başlaması genellikle ikinci günden sonra olmaktadır. Glukonik asit üretimi sırasında fermentasyon ortamının pH değeri zamanla azalmaktadır. Azalma eğrisinin eğimi 90-100. saatten sonra fazla değişmemektedir. pH azalmasının en fazla olduğu zaman aralığı ise; 10-90 saat arasındadır. Fermentasyon ortamının onikinci gün sonundaki pH değeri yaklaşık 2.20 dir. Glukoz içeren bir besin ortamında pH'ın zamanla değişimi Şekil 5.6'da gösterilmiştir.



Şekil 5.6. *Aspergillus foetidus* ile glukonik asit üretiminde fermentasyon ortamının pH değerinin zamanla değişimi ($S_{Go} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

Optimum başlangıç pH değerinin belirlenmesi için yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen maksimum ürün ($\dot{U}_m$) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri ($Y_{\dot{U}/S_0}$) Çizelge 5.4'de verilmiştir.

Çizelge 5.4. *Aspergillus foetidus* için besin ortamı başlangıç pH değerinin gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimlerine etkileri ($S_{Go} = 57$ g/L; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

pH	$\dot{U}_m$ (g/L)	X_m (g/L)	$Y_{\dot{U}/S_0}$
2.5	7.3	8.0	12.8
4.0	8.6	12.8	15.1
5.0	13.4	13.8	23.5
6.0	12.2	13.0	21.4
6.5	8.3	13.6	14.6
7.0	8.2	14.2	14.4

Çizelgede yer alan sonuçlar incelendiğinde; en yüksek glukonik asit üretiminin optimum başlangıç pH aralığı olan (5-6) değerlerinde elde edildiği görülmektedir.

5.1.5. Diğer Substratların Glukonik Asit Fermentasyonuna Etkisi

Aspergillus foetidus ile glukonik asit üretiminde, mikroorganizmanın üremesi ve ürün oluşumu için en uygun başlangıç glukoz derişimi 57 g/L olarak belirlendikten sonra; substrat olarak sakkaroz ve melas kullanılmış ve en uygun başlangıç derişim değerleri bulunmuştur.

Deneylerde sıvı besin ortamının başlangıç pH'ı 5'e ayarlanmış, sıcaklık 28°C'da tutulmuş ve çalışmalar % 0.5'lik (v/v) aşı derişimi kullanılarak, 84 vuru/dk çalkalama hızında yapılmıştır.

5.1.5.1. Başlangıç Sakkaroz Derişiminin Etkisi

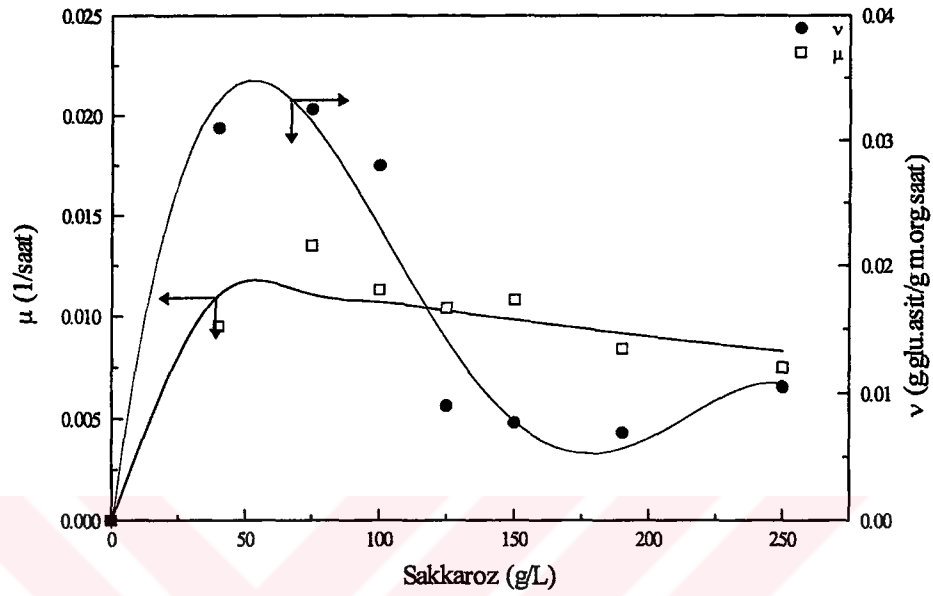
Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı besin ortamlarında sakkaroz başlangıç derişimleri 0-250 g/L aralığında değiştirilmiştir.

Mikroorganizma özgül üreme hızının, 75 g/L başlangıç derişiminde sakkaroz içeren ortamda en yüksek değerine ulaştığı bulunmuştur. Ürün oluşum hızının da en yüksek değerinin gözleendiği bu derişimden daha yüksek sakkaroz başlangıç derişim değerlerinde substrat inhibisyonu ortaya çıkmaktadır.

Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı deneysel çalışmalarda en yüksek mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızları 75 g/L sakkaroz derişiminde sırasıyla; 0.013 (sa⁻¹) ve 0.0325 [g glukonik asit/(g m.org.saatt)] olarak hesaplanmıştır.

Aspergillus foetidus için başlangıç sakkaroz derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi Şekil 5.7'de gösterilmiştir.

Lineer olmayan regrasyon tekniği kullanılarak mikroorganizma özgül üreme hızının ve en küçük kareler regrasyon tekniği kullanılarak ise; glukonik asit oluşum hızının başlangıç sakkaroz derişimi (S_{so}) ile derişimleri bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.7 ve 5.8'de gösterilmiştir.



Şekil 5.7. *Aspergillus foetidus* için başlangıç sakkaroz derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

$$\mu = \frac{(0.015S_{so})}{\left(9.363 + S_{so} + \frac{S_{so}^2}{324.239}\right)} \quad (5.7)$$

$$R^2 = 0.986$$

$$v = -0.00058 + 0.0016S_{so} - 0.00002S_{so}^2 + 1.0971 \times 10^{-7}S_{so}^3 - 1.7268 \times 10^{-10}S_{so}^4 \quad (5.8)$$

$$R^2 = 0.947$$

Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmalarda inhibisyonun olduğu durumda maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı, Monod Sabiti ve substratın ayrışma sabiti; Eşitlik 5.7'den sırasıyla $\mu_{max;i} = 0.015$ (sa⁻¹), $K_S = 9.363$ (g sakkaroz/L) ve $K_I = 324.239$ (g sakkaroz/L) olarak hesaplanmıştır.

Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı çalışmalarda mikroorganizma verimi ise; Eşitlik 3.13'e göre çizilen grafiğin eğiminden $Y_{x/s_0} = 0.063$ (g m.org./g sakkaroz) olarak bulunmuştur.

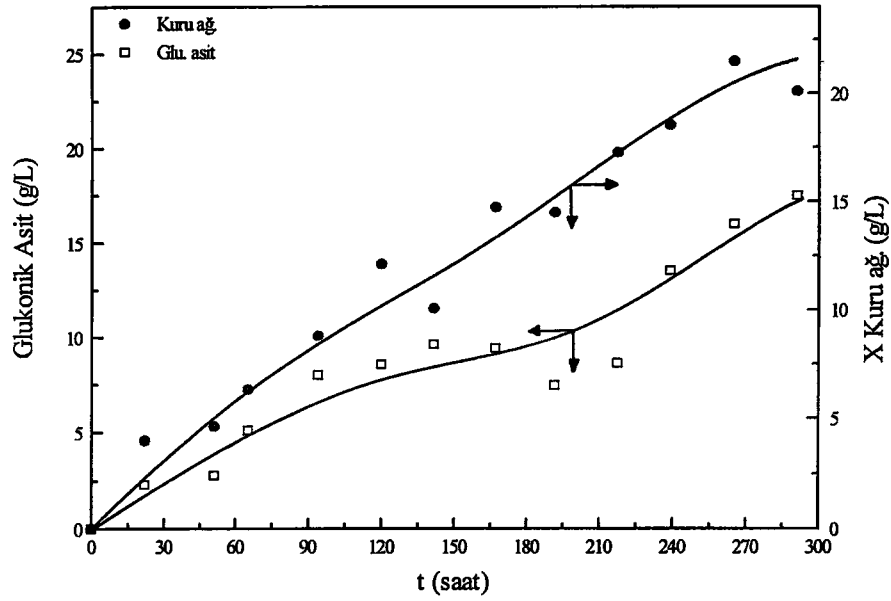
Başlangıç sakkaroz derişiminin etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalarda elde edilen maksimum ürün ($\ddot{U}_m$) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri ($Y_{\ddot{U}/s_0}$) Çizelge 5.5'de verilmiştir.

Çizelge 5.5. *Aspergillus foetidus* için sakkaroz başlangıç derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ve glukonik asit verimine etkileri (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

S_{s_0} (g/L)	$\ddot{U}_m$ (g/L)	X_m (g/L)	$Y_{\ddot{U}/s_0}$
0	0	0	0
40	9.0	14.0	22.5
75	17.4	21.2	23.2
100	19.8	20.8	19.8
125	24.6	22.5	19.6
150	16.3	22.4	10.9
190	15.5	23.5	8.2
250	11.2	18.0	4.5

Sakkarozla yapılan deneysel çalışmalarda, en yüksek glukonik asit derişimi 125 g/L başlangıç sakkaroz derişiminde elde edilmiştir. Bu substrat derişimindeki glukonik asit verimi ise; %19.6 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 5.5'e göre en yüksek glukonik asit verimi ise; 75 g/L başlangıç sakkaroz derişiminde elde edilmiştir.

Optimum koşullarda *Aspergillus foetidus* için besin ortamındaki glukonik asit ve mikroorganizma derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri Şekil 5.8'de gösterilmiştir.



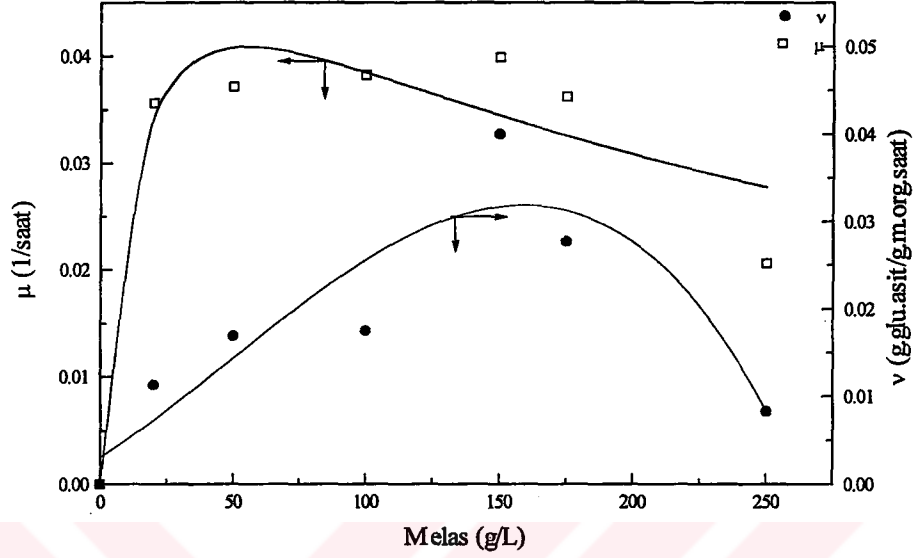
Şekil 5.8. *Aspergillus foetidus* için sakkarozlu besin ortamında glukonik asit ve mikroorganizma derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri ($S_{so} = 75$ g/L; başlangıç pH'ı = 6.5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

5.1.5.2. Başlangıç Melas Derişiminin Etkisi

Çalışmalarda kullanılan melas, Ankara şeker Fabrikası'ndan getirtilmiştir. Bileşiminde %50 sakkaroz içeren melasla yapılan deneylerde fermentasyon süresince mikroorganizma ve ürün oluşumunun zamanla değişimleri izlenmiştir. Melas çalışmalarında mikroorganizmanın substratı sakkaroz çalışmalarındakine benzer şekilde tükettiği gözlenmiştir.

Aspergillus foetidus için glukonik asit fermentasyonunda substrat olarak melasın etkileri 0-250 g/L başlangıç substrat derişimi aralığında incelenmiştir. Mikroorganizma özgül üreme ve ürün oluşum hızlarının melas başlangıç derişimi ile değişimleri Şekil 5.9'da gösterilmiştir. Özgül glukonik asit üretim hızının 150 g/L başlangıç melas derişiminde maksimuma ulaştığı bulunmuştur. Bu değerden daha yüksek başlangıç derişim değerlerinde melas için substrat inhibisyonu gözlenmektedir. Fermentasyon ortamında 150 g/L melasın kullanıldığı deneyde mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum

hızlarının değerleri sırasıyla 0.0399 (sa⁻¹) ve 0.040 [g glukonik asit/(g m.org.saatt)] olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.9. *Aspergillus foetidus* için başlangıç melas derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

Başlangıç melas derişiminin glukonik asit üretimine etkisini gösteren model denklemlerin türetilmesi amacıyla lineer olmayan regrasyon tekniği kullanılarak mikroorganizma özgül üreme hızının ve en küçük kareler regrasyon tekniği kullanılarak glukonik asit oluşum hızının başlangıç melas derişimi ile değışimleri bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.9 ve 5.10'da verilmiştir.

$$\mu = \frac{0.062S_{Mo}}{\left(14.211 + S_{Mo} + \frac{S_{Mo}^2}{212.645}\right)} \quad (5.9)$$

$$R^2 = 0.985$$

$$v = 0.00309 + 0.00019S_{Mo} + 9.9229 \times 10^{-7}S_{Mo}^2 - 6.7196 \times 10^{-9}S_{Mo}^3 \quad (5.10)$$

$$R^2 = 0.828$$

Substrat olarak melasın kullanıldığı çalışmalarda inhibisyonun olduğu durumda maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı, Monod Sabiti ve substratın ayrışma sabiti; Eşitlik 5.9'dan sırasıyla $\mu_{\max,i} = 0.062 \text{ (sa}^{-1}\text{)}$, $K_s = 14.211 \text{ (g melas/L)}$ ve $K_i = 212.645 \text{ (g melas/L)}$ olarak hesaplanmıştır.

Melas kullanılan çalışmalarda mikroorganizma verimi; Eşitlik 3.13'e göre çizilen grafiğin eğiminden $Y_{X/S_0} = 0.268 \text{ (g m.org./g melas)}$ olarak bulunmuştur.

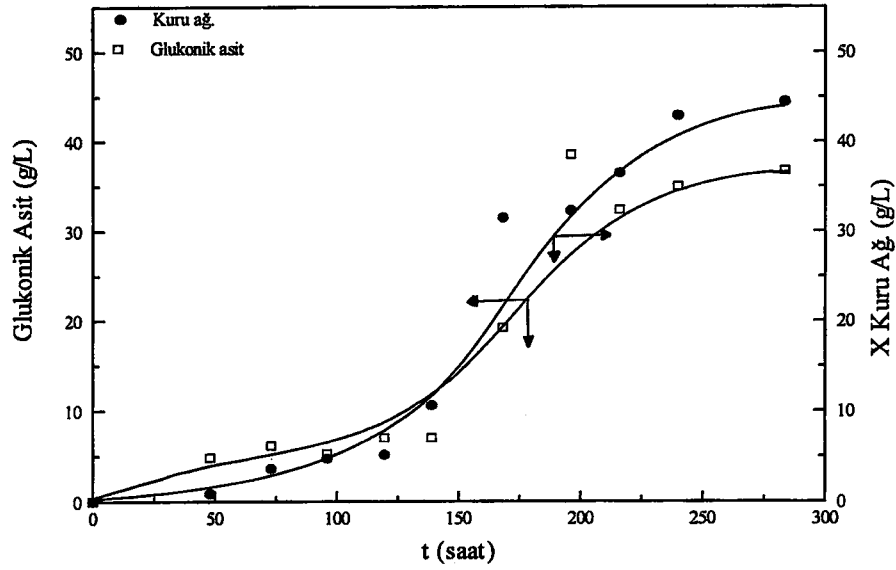
Başlangıç melas derişiminin etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalarda elde edilen maksimum ürün ($\dot{U}_m$) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri ($Y_{\dot{U}/S_0}$) Çizelge 5.6'da verilmiştir.

Melasla yapılan deneysel çalışmalarda, en yüksek glukonik asit derişimi 250 g/L başlangıç melas derişiminde elde edilmiştir. Bu substrat derişimindeki glukonik asit verimi % 19.0 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 5.6'ya göre en yüksek glukonik asit verimi ise; 150 g/L optimum başlangıç melas derişiminde % 24.6 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 5.6. *Aspergillus foetidus* için başlangıç melas derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve maksimum mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimlerine etkileri (Başlangıç pH'ı = 5; 28°C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

$S_{M_0} \text{ (g/L)}$	$\dot{U}_m \text{ (g/L)}$	$X_m \text{ (g/L)}$	$Y_{\dot{U}/S_0}$
0	0	0	0
20	3.9	7.0	19.5
50	8.2	14.6	16.4
100	20.9	31.8	20.9
150	37.0	44.8	24.6
175	41.0	45.8	23.4
250	47.2	67.8	19.0

Optimum koşullarda *Aspergillus foetidus* için melas içeren besin ortamındaki mikroorganizma ve glukonik asit derişimlerinin fermentasyon süresince değışimleri Şekil 5.10'da gösterilmiştir.

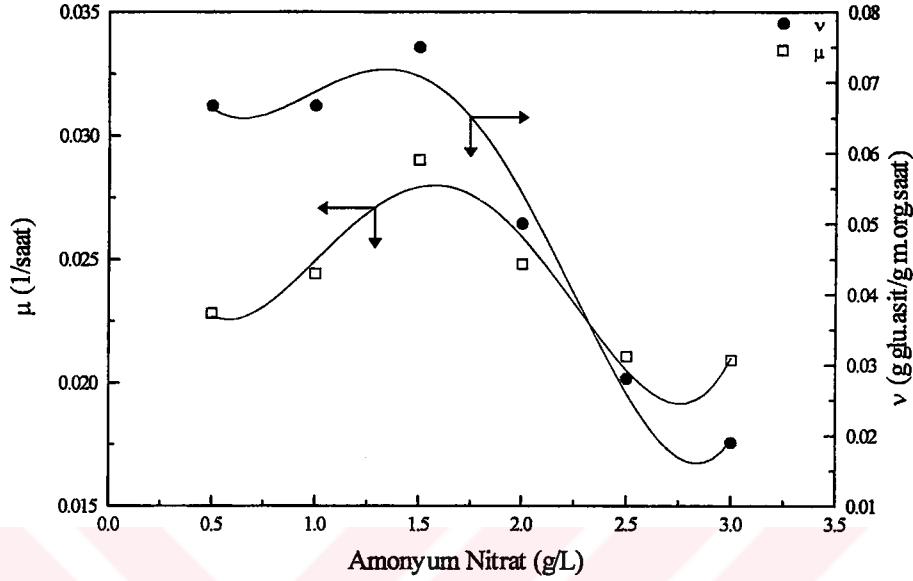


Şekil 5.10. *Aspergillus foetidus* için melas içeren besin ortamında glukonik asit ve mikroorganizma derişimlerinin fermentasyon süresi ile değişimleri ($S_{Mo} = 150$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

5.1.6. Başlangıç Amonyum Nitrat Derişiminin Etkisi

Aspergillus foetidus ile glukonik asit fermentasyonu çalışmalarının bu bölümünde; besin ortamında azot kaynağı olarak kullanılan amonyum nitratın başlangıç derişiminin mikroorganizma özgül üreme hızına ve glukonik asit oluşum hızına etkileri incelenmiştir. Bu deneylerde ortamdaki glukoz miktarı başlangıçta 57 g/L'ye ve pH değeri 5'e ayarlanmış; sıcaklık 28°C'da, çalkalama hızı 84 vuru/dk'da ve aşı derişimi ise; % 0.5 (v/v)'de sabit tutulmuştur.

Çalışmada kullanılan amonyum nitratın başlangıç derişimi 0-3 g/L derişim aralığında değiştirilmiştir. Başlangıç amonyum nitrat derişiminin mikroorganizma özgül üreme hızına ve ürün oluşum hızına etkileri Şekil 5.11'de gösterilmiştir.



Şekil 5.11. *Aspergillus foetidus* için başlangıç amonyum nitrat derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{G0} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

Fermentasyon ortamındaki azotlu bileşğin glukonik asit üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla en küçük kareler regrasyon tekniği kullanılarak mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarının başlangıç amonyum nitrat derişimi ile değişimleri bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.11 ve 5.12'de verilmiştir.

$$\mu = 0.03446 - 0.05013 A + 0.06829 A^2 - 0.03267 A^3 + 0.00499 A^4 \quad (5.11)$$

$$R^2 = 0.936$$

$$v = 0.10767 - 0.16902 A + 0.22351 A^2 - 0.11059 A^3 + 0.0172 A^4 \quad (5.12)$$

$$R^2 = 0.984$$

Başlangıç amonyum nitrat derişiminin etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalarda elde edilen maksimum ürün ($\ddot{U}_m$) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri ($Y_{\ddot{U}/S_0}$) izelge 5.7’de verilmiştir.

Çizelge 5.7. *Aspergillus foetidus* için başlangıç amonyum nitrat derişiminin gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimine etkileri ($S_{G_0} = 57$ g/L; başlangıç pH’ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

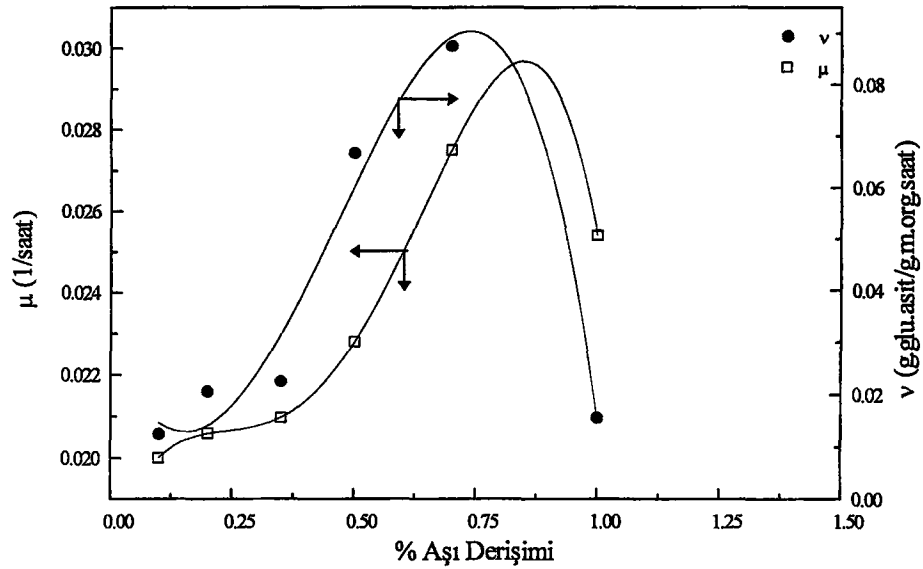
NH_4NO_3 (g/L)	$\ddot{U}_m$ (g/L)	X_m (g/L)	$Y_{\ddot{U}/S_0}$
0.0	0	0	0
0.5	13.4	13.8	23.5
1.0	13.1	12.0	22.9
1.5	16.1	11.1	28.2
2.0	9.2	10.5	16.1
2.5	8.8	10.5	15.4
3.0	9.4	12.2	16.5

En yüksek glukonik asit derişimi başlangıçta 1.5 g/L NH_4NO_3 içeren besin ortamı bileşiminde elde edilmiştir. Ayrıca; bu derişim değerinde en yüksek mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızları sırasıyla 0.029 (sa^{-1}) ve 0.075 [g glukonik asit/(g m.org.saat)] olarak hesaplanmıştır. Daha yüksek amonyum nitrat başlangıç derişimlerinde ise; glukonik asit veriminin azaldığı bulunmuştur.

5.1.7. Aşı Derişiminin Etkisi

Aspergillus foetidus ile glukonik asit fermentasyonunda aşı derişiminin etkileri % 0.1-1 (v/v) aralığında incelenmiştir. Mikroorganizmanın sıvı besin ortamına aşılanması Bölüm 4.2’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Aşı derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi şekil 5.12’de gösterilmiştir.



Şekil 5.12. *Aspergillus foetidus* için aşı derişiminin mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{Go} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

Mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarının aşı derişimi ile değişimini gösteren bağıntılar en küçük kareler regresyon tekniği kullanılarak bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.13 ve 5.14'de gösterilmiştir.

$$\mu = 0.01772 + 0.03665 C - 0.16872 C^2 + 0.32309 C^3 - 0.18334 C^4 \quad (5.13)$$

$$R^2 = 0.999$$

$$v = 0.02789 - 0.20279 C + 0.73026 C^2 - 0.24093 C^3 - 0.299 C^4 \quad (5.14)$$

$$R^2 = 0.965$$

Aşı derişiminin glukonik asit fermentasyonuna etkisinin incelendiği deneysel çalışmalarda elde edilen maksimum ürün ($\bar{U}_m$) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri (Y_{U/S_0}) Çizelge 5.8'de verilmiştir. En yüksek glukonik asit derişimine % 0.5 (v/v)'lik aşı derişimiyle yapılan fermentasyon ortamında ulaşılmıştır. % 0.7'lik aşı miktarı ile elde edilen en yüksek mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızı ise; sırasıyla

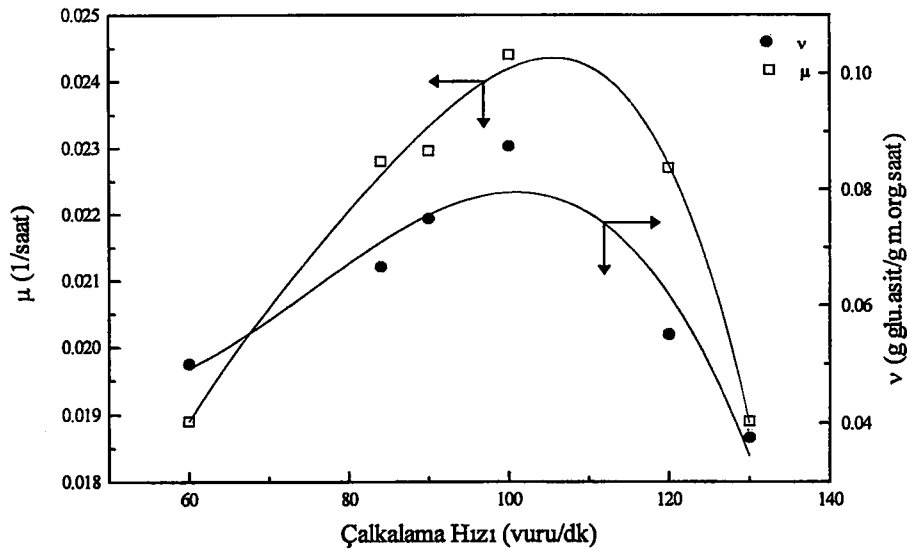
0.0275 (sa⁻¹) ve 0.0875 [g glukonik asit/(g m.org.saar)] olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.8. *Aspergillus foetidus* için aşılama yüzdesinin gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimine etkileri ($S_{Go} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; 84 vuru/dk; aşı derişimi % 0.5)

% Aşı (v/v)	$\ddot{U}_m$ (g/L)	X_m (g/L)	$Y_{\ddot{U}/S_0}$
0.10	7.2	11.2	12.6
0.20	7.9	11.0	13.8
0.35	8.0	12.0	14.0
0.50	13.4	13.8	23.5
0.70	10.0	13.6	17.5
1.00	9.0	13.0	15.8

5.1.8. Çalkalama Hızının Etkisi

Aspergillus foetidus ile glukonik asit fermentasyonunda çalkalama hızının etkisi bir çalkalamalı su banyosunda 60-130 vuru/dk aralığında incelenmiştir. Çalkalama hızının mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkileri şekil 5.13'de gösterilmiştir.



şekil 5.13. *Aspergillus foetidus* için çalkalama hızının mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına etkisi ($S_{Go} = 57$ g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; aşı derişimi % 0.5)

Mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit üretim hızlarının çalkalama hızı ile değişimleri en küçük kareler regresyon tekniği kullanılarak bulunmuş ve sırasıyla Eşitlik 5.15 ve 5.16'da verilmiştir.

$$\mu = -0.02725 + 0.002 K - 0.00003 K^2 + 2.9807 \times 10^{-7} K^3 - 9.7608 \times 10^{-10} K^4 \quad (5.15)$$

$$R^2 = 0.992$$

$$v = 0.20049 - 0.00749 K + 0.00011 K^2 - 5.001 K^3 \quad (5.16)$$

$$R^2 = 0.914$$

En yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı ve glukonik asit oluşum hızı 100 vuru/dk çalkalama hızında elde edilmiştir. Bulunan değerler sırasıyla 0.0244 (sa⁻¹) ve 0.0875 [g glukonik asit/(g m.org.saar)] dir.

Çalkalama hızıyla ilgili deneysel çalışmalardan elde edilen maksimum ürün (Ü_m) ve mikroorganizma kuru ağırlık (X_m) derişimleri ve glukonik asit verimleri (Y_{Ü/So}) Çizelge 5.9'da verilmiştir.

Çizelge 5.9. *Aspergillus foetidus* için çalkalama hızının gözlenen maksimum glukonik asit ve mikroorganizma kuru ağırlık derişimleri ile glukonik asit verimine etkileri (S_{Go} = 57 g/L; başlangıç pH'ı = 5; 28 °C; aşı derişimi % 0.5)

Çalkalama Hızı (vuru/dk)	Ü _m (g/L)	X _m (g/L)	Y _{Ü/So}
60	10.4	11.2	18.2
84	13.6	13.8	23.5
90	12.8	12.9	22.5
100	33.5	17.2	58.8
120	44.5	17.0	78.1
130	39.8	15.9	69.8

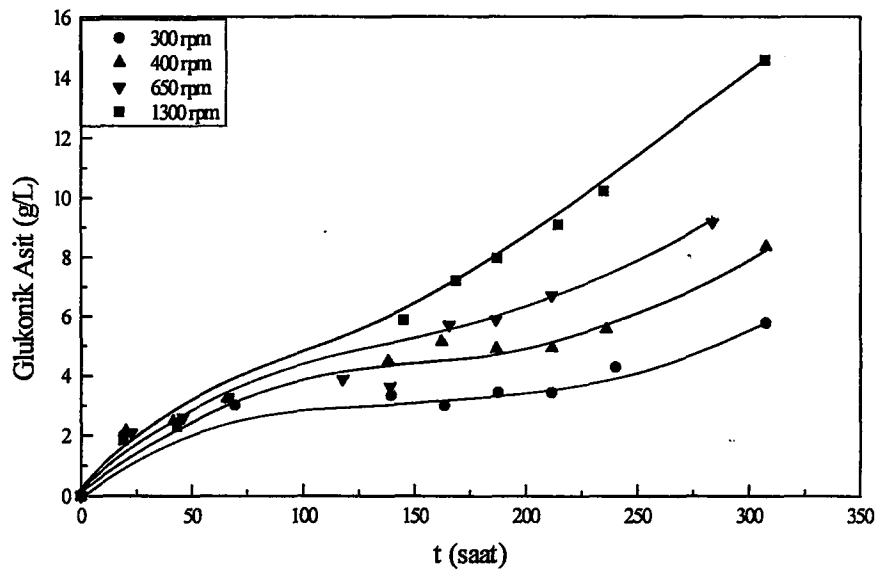
Elde edilen sonuçlara göre en yüksek glukonik asit verimine 120 vuru/dk'da ulaşılmakta; ancak mikroorganizma daha yavaş bir hızla üreyerek glukonik asit sentezlemektedir.

5.2. Fermentör Çalışmaları

5.2.1. Karıştırma Hızının Etkisi

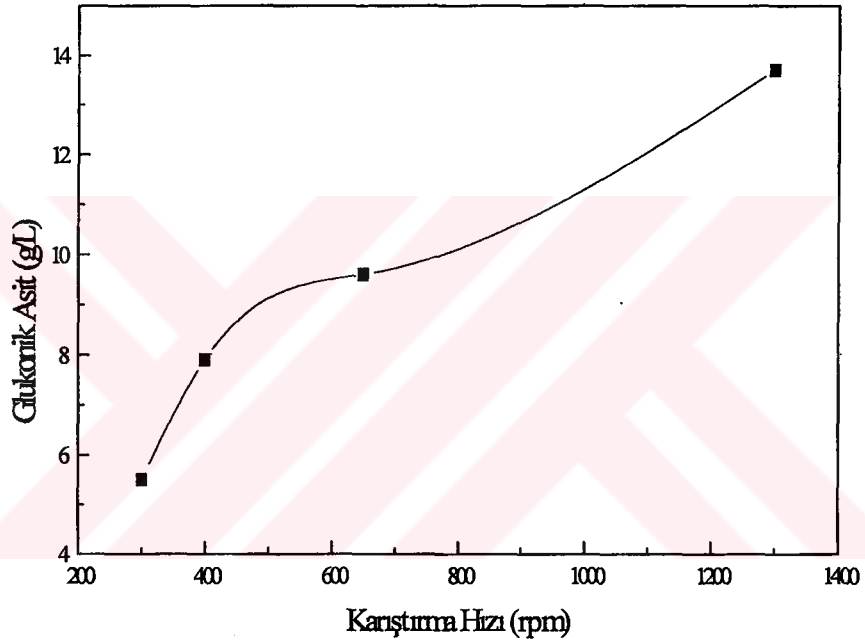
Aspergillus foetidus ile glukonik asit üretiminde karıştırılmalı ve havalandırılmalı bir fermentör kullanılarak karıştırma hızının mikroorganizma ve ürün derişimlerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda *Aspergillus foetidus* için çalkalayıcıda elde edilen en uygun başlangıç pH değeri olan 5’de, 30°C’da, substrat olarak 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde, % 0.5 (v/v)’lik aşılama yüzdesi ile, 10 (L/sa) sabit hava akış hızında ve 300-1300 rpm karıştırma hızı aralığında deneyler yapılmıştır.

Aspergillus foetidus’un sıvı besin ortamında topak şeklinde üremesi nedeniyle fermentör içerisinde homojen bir hücre dağılımı gözlenmemiştir. Bu nedenle de fermentörden alınan analiz örneklerinde zamana karşı bir kuru ağırlık tayini yapılamamış, sadece fermentasyon sonundaki mikroorganizma derişimleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen glukonik asit derişimlerinin zamanla değışimleri çeşitli karıştırma hızları için Şekil 5.14’de gösterilmiştir.



Şekil 5.14. Fermentörde farklı karıştırma hızlarında elde edilen glukonik asit derişimlerinin zamanla değışimi

300. saat sonunda elde edilen glukonik asit derişimlerinin karıştırma hızı ile değişimleri Şekil 5.15’de yer almaktadır. Bu grafikten 10 L/sa sabit havalandırma hızında karıştırma hızının artmasıyla glukonik asit derişimlerinin de arttığı görülmektedir. Yüksek hızlarda; karıştırmanın ürün derişimine etkisinin azaldığı bulunmuştur.



Şekil 5.15. Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen maksimum glukonik asit derişimlerinin karıştırma hızı ile değişimi

Fermentör çalışmalarında vizkozite tayini yapılamamış ve bu nedenle de Reynolds Sayısı hesaplanamamıştır.

Mekanik karıştırma yapılan fermentörlerde karıştırma işlemi için gerekli olan güç miktarı sistemin havalandırmalı veya havalandırmasız oluşuna göre iki farklı şekilde hesaplanabilir.

Farklı karıştırma hızlarında havalandırılan ve karıştırılan fermentördeki güç gereksinimleri (P_a) havalandırma olmayan durumdaki güç gereksinimlerine (P) bağlı olarak belirlenmiştir. Bu amaçla önce havalandırma sayıları (N_a)

hesaplanmış ve literatürde yer alan grafikler kullanılarak (N_a) değerlerine karşı gelen (P_a/P) oranları saptanmıştır (Rushton et al., 1950a; 1950b; Rushton and Olshue, 1953a; 1953b).

Fermentasyonun 300. saati temel alındığında elde edilen maksimum glukonik asit derişimleri, hesaplanan havalandırma sayıları ve (P_a/P) oranları karıştırma hızına bağlı olarak Çizelge 5.10'da gösterilmiştir.

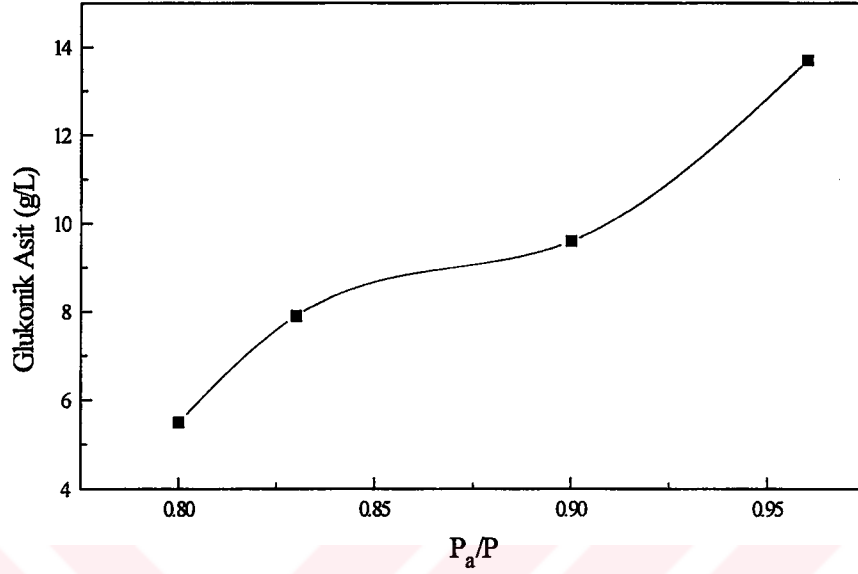
Çizelge 5.10. Karıştırma hızının glukonik asit derişimi, havalandırma sayısı (N_a) ve (P_a/P) oranına etkisi [Hava akış hızı = $2.78 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{sn} \equiv 10 \text{ L/sa}$]

Karıştırma hızı (rpm)	Glukonik asit derişimi (g/L)	(N_a)	(P_a/P)
300	5.5	0.0316	0.80
400	7.9	0.0237	0.83
650	9.6	0.0146	0.90
1300	13.7	0.0007	0.96

Çizelge 5.10'a göre karıştırma hızının ve havalandırma ve karıştırma yapılan durumdaki güç tüketiminin havalandırma uygulanmayan durumdaki güç tüketimine oranının artmasıyla glukonik asit derişimleri de artmaktadır.

Karıştırma hızının etkilerinin incelendiği deneylerde; 300. saatteki glukonik asit derişimlerinin havalandırma ve karıştırma yapılan durumdaki güç tüketiminin havalandırma uygulanmayan durumdaki güç tüketimine oranı ile derişimleri Şekil 5.16'da gösterilmiştir. Grafiğe göre (P_a/P) oranının artmasıyla fermentasyon sırasında üretilen glukonik asit derişimleri de artmaktadır.

Fermentör çalışmalarında mikroorganizmanın; yüksek karıştırma hızı değerlerinde kabın çeperlerine yapışarak aşırı miktarda spor oluşturması ve zamanla sıvının yüzeyini de kaplayarak fermentörün kapağına doğru yükselmesi nedeniyle deneyler defalarca tekrarlanmıştır.

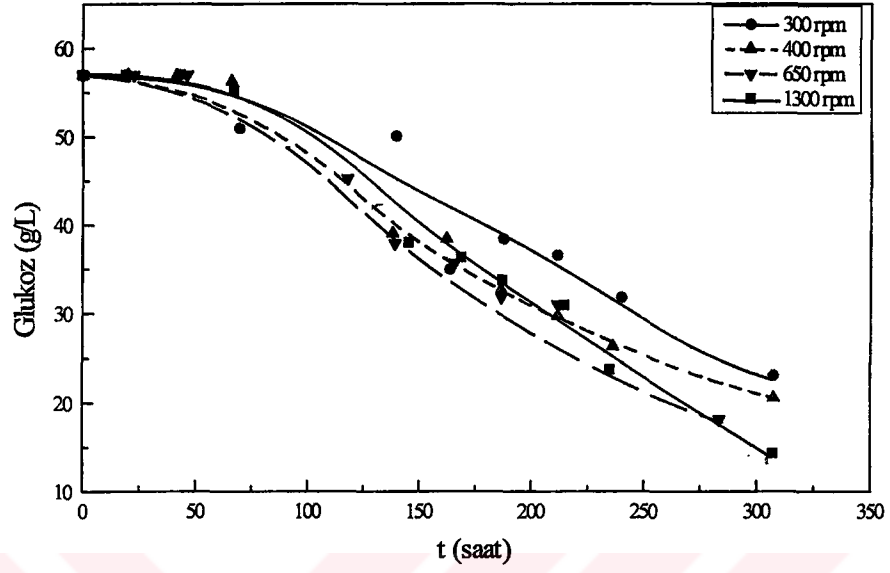


Şekil 5.16. Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen maksimum glukonik asit derişimlerinin (P_a/P) oranı ile değişimi

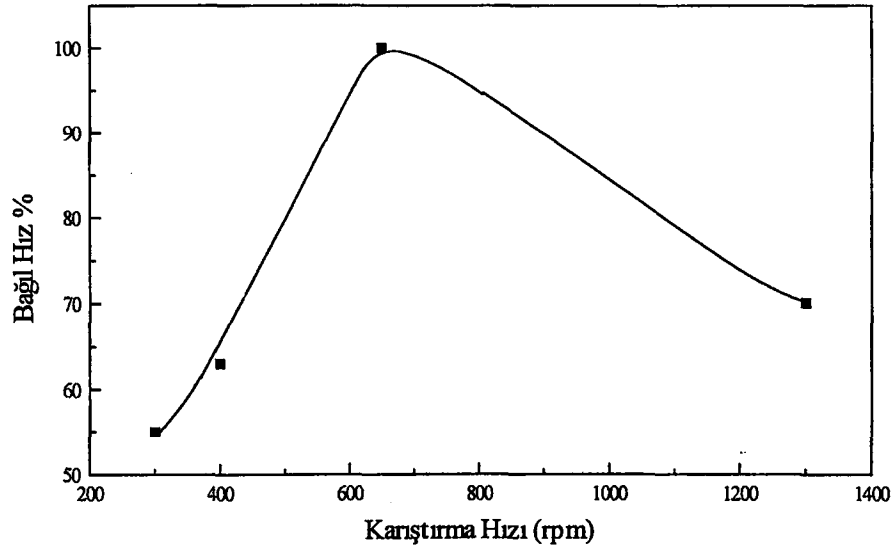
Karıştırma hızının 1300 rpm olduğu fermentör deneyinde en yüksek mikroorganizma kuru ağırlık değeri olan 14.41 g/L derişimine fermentasyonun 13. gününde; en yüksek glukonik asit derişimine (13.7 g/L) ise; 300. saatte ulaşılmıştır. En düşük mikroorganizma kuru ağırlık ve glukonik asit derişimleri ise; 300 rpm'de, sırasıyla 10.76 g/L ve 5.5 g/L olarak bulunmuştur.

Farklı karıştırma hızlarında fermentasyon ortamındaki glukoz derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 5.17'de gösterilmiştir.

Çizilen grafiklerden farklı zamanlara karşı gelen glukoz tüketim hızları hesaplanmıştır. Üssel üreme bölgesindeki en hızlı glukoz tüketiminin 650 rpm'de, 0.2106 [g glukoz/(L.saat)] olduğu bulunmuştur. Diğer karıştırma hızlarındaki ve aynı zamana karşı gelen glukoz tüketim hızları bu değeri temel alınarak düzenlenmiş ve bağıl glukoz tüketim hızı yüzdelerine geçilerek Şekil 5.18'de gösterilmiştir.



Şekil 5.17. Fermentörde farklı karıştırma hızlarında glukoz tüketiminin zamanla değişimi



Şekil 5.18. Fermentörde bağıl glukoz tüketim hızı yüzdesinin karıştırma hızı ile değişimi

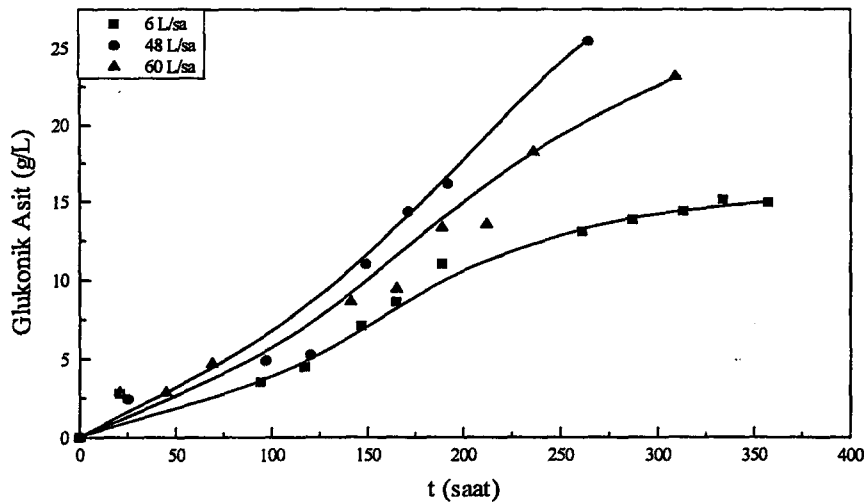
Şekil 5.18’de yer alan grafikten de görüldüğü gibi en yüksek glukoz tüketim hızı 650 rpm’de elde edilmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre; *Aspergillus foetidus* ile karıştırılmalı ve havalandırılmalı bir fermentörde glukonik asit üretimi yapılabilmesi için karıştırma hızının 650 rpm’e yakın bir aralıkta tutulması gerektiği söylenebilir.

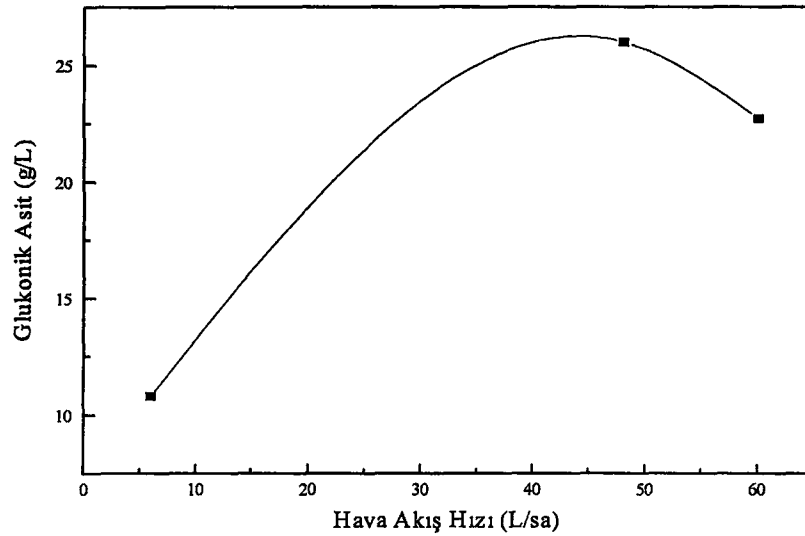
5.2.2. Havalandırma Hızının Etkisi

Fermentör çalışmalarında havalandırma hızının etkisi başlangıç pH’ı 5 değerinde, % 0.5 (v/v)’lik aşı derişimi kullanılarak, 30°C’da, 1000 rpm sabit karıştırma hızında, 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde ve 6-60 L/sa havalandırma hızı aralığında incelenmiştir.

1000 rpm sabit karıştırma hızında, farklı havalandırma hızlarında elde edilen glukonik asit derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 5.19’da gösterilmiştir. Hava akış hızının glukonik asit derişimine etkisini gösteren Şekil 5.20’ye göre; 300. saatte tayin edilen en yüksek glukonik asit derişimi 48 L/sa’lik havalandırma hızında elde edilmektedir. Bu akış hızında elde edilen glukonik asit derişimi; 26.0 g/L ve ürün verimi ise; % 45.6’dır.



Şekil 5.19. Fermentörde farklı hava akış hızlarında elde edilen glukonik asit derişimlerinin zamanla değişimi



Şekil 5.20. Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen glukonik asit derişimlerinin hava akış hızı ile değışimi

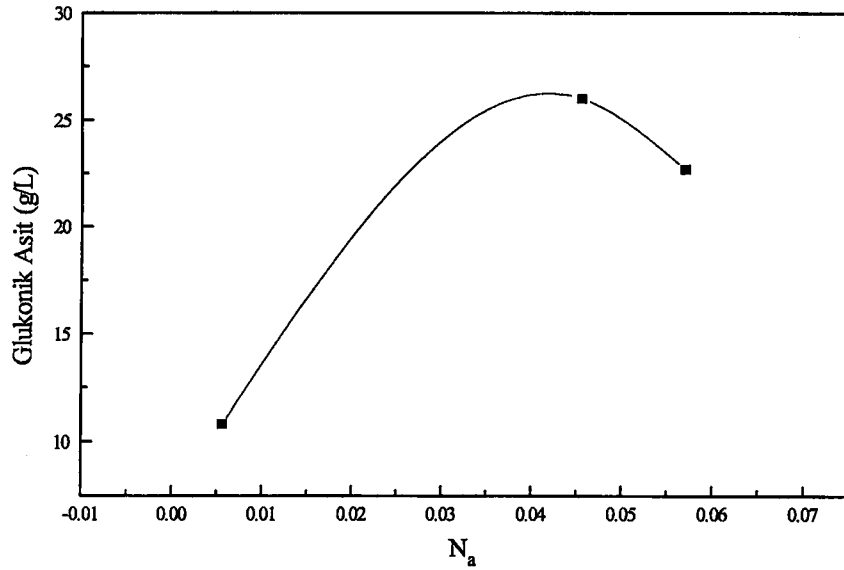
İncelenen hava akış hızı aralığında havalandırma sayıları ve (P_a/P) oranları hesaplanarak Çizelge 5.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.11. Hava akış hızının glukonik asit derişimi, havalandırma sayısı (N_a) ve (P_a/P) oranına etkisi (Karıştırma hızı = 1000 rpm)

Hava akış hızı, Q		Glukonik asit derişimi (g/L)	N_a	P_a/P
(m^3/s)	(L/sa)			
1.67×10^{-6}	6	10.8	0.0056	0.97
1.33×10^{-5}	48	26.0	0.0454	0.73
1.67×10^{-5}	60	22.7	0.0569	0.68

Çizelge 5.11’e göre hava akış hızının artmasıyla havalandırma sayısı da artmakta; (P_a/P) oranı ise azalmaktadır.

Fermentörde, hava akış hızının etkisinin incelendiği çalışmalarda elde edilen glukonik asit derişimlerinin havalandırma sayısı ile değışimleri Şekil 5.21’de gösterilmiştir.



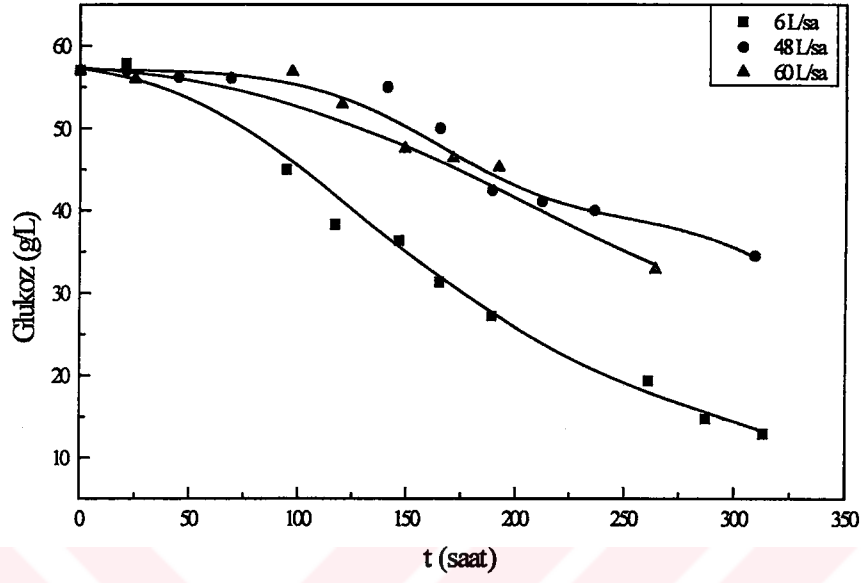
Şekil 5.21. Fermentör deneylerinde 300. saat sonunda elde edilen maksimum glukonik asit derişimlerinin havalandırma sayısı (N_a) ile değişimi

Çizelge 5.10 ve 5.11'de yer alan ürün derişimleri incelendiğinde glukonik asit fermentasyonunda havalandırma hızının karıştırma hızından daha etkili bir parametre olduğu görülmektedir.

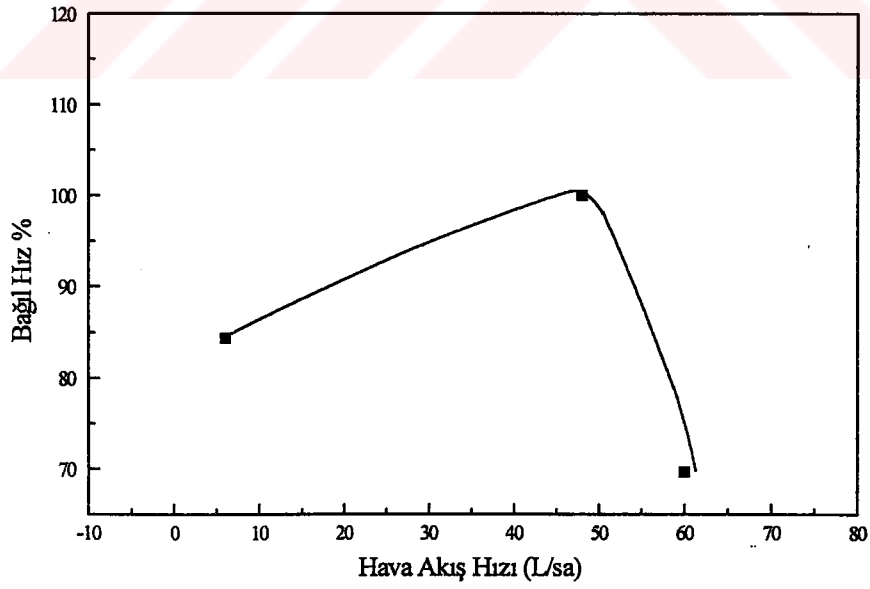
Fermentasyonun sonundaki en yüksek mikroorganizma derişimine 14.33 g/L değeri ile 48 L/sa'lik havalandırma hızında ulaşılrken en düşük derişim değeri olan 12.51 g/L'ye ise; en düşük havalandırma hızında (6 L/sa) ulaşılmıştır.

Farklı havalandırma hızlarında fermentasyon ortamındaki glukoz derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 5.22'de gösterilmiştir.

Üssel üreme bölgesindeki en yüksek glukoz tüketim hızı 0.1674 [g glukoz/(L.saat)] olarak hesaplanmıştır. Bağıl glukoz tüketim hızları bu değeri temel alınarak bulunmuş ve hava akış hızı ile değişimleri Şekil 5.23'de gösterilmiştir.



Şekil 5.22. Fermentörde farklı hava akış hızlarında glukoz tüketiminin zamanla değişimi

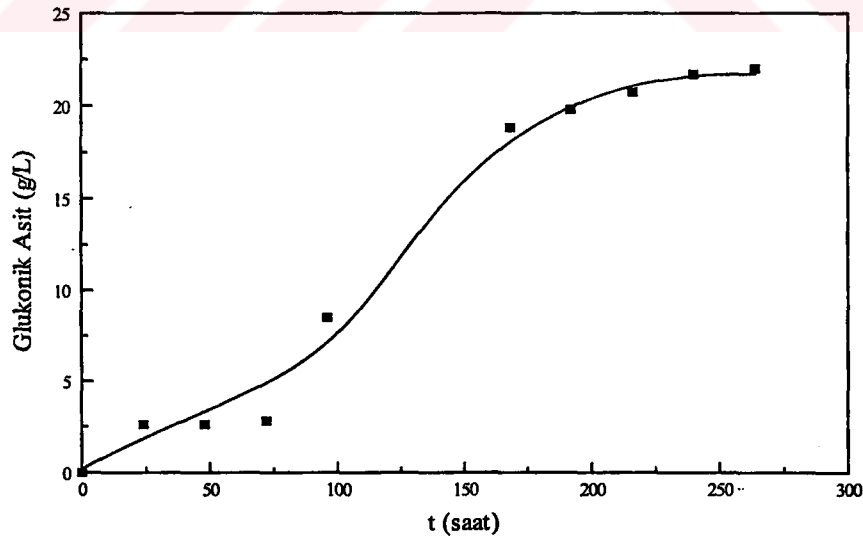


Şekil 5.23. Fermentörde bağıl glukoz tüketim hızı yüzdesinin hava akış hızı ile değişimi

En yüksek glukonik asit derişimini elde edildiği 48 L/sa değerindeki hava akış hızından daha yüksek hız değerlerinde mikroorganizmanın glukozu daha yavaş tükettiği ve daha az asit ürettiği bulunmuştur. Bu sonuç fermentasyon ortamına gönderilen oksijenin belli bir değerden sonra inhibisyon etkisi yaptığını göstermektedir.

5.2.3. Substrat Olarak Melasın Etkisi

Fermentörde glukoz dışında substrat olarak melas kullanılarak da bir çalışma yapılmıştır. Bu deney 1000 rpm karıştırma hızında, başlangıç pH'ı 5 değerinde, % 0.5 (v/v)'lik aşı derişimi kullanılarak, 36 L/sa hava akış hızında ve melasın başlangıç derişimi 150 g/L olan bir besin ortamında yapılmıştır. Melas denemesinde ortamda köpük oluştuğu için silikon köpük giderici kullanılmıştır. Fermentasyonun 11. gününde mikroorganizma kuru ağırlık değeri 33.038 g/L, 300. saatteki glukonik asit derişimi 22.0 g/L olarak bulunmuş ve ürün verimi $Y_{Ü/S}$ ise; % 14.7 olarak hesaplanmıştır. Bu deney için glukonik asit derişiminin zamanla değişimi Şekil 5.24'de gösterilmiştir.



Şekil 5.24. Fermentörde melas içeren besin ortamında glukonik asit derişiminin zamanla değişimi

Grafikten de görüleceği gibi glukonik asit üretimi yetmişikinci saatten sonra hızla artmakta ve yaklaşık olarak yüzdoksanıncı saatten sonra fazla değişmemektedir.

Fermentörde glukoz ve melasla yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında, mikroorganizmanın melaslı besin ortamında daha fazla ürediği bulunmuştur.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, çalkalamalı su banyolarında ve bir karıştırıcı ve havalandırıcı fermentörde bir küf olan NRRL 337 numaralı *Aspergillus foetidus* ile glukonik asit üretimi incelenmiştir. Ele alınan üretim parametreleri; mikroorganizma özgül üreme hızı ve mikroorganizma verimi ile glukonik asit özgül oluşum hızı ve glukonik asit verimine bağlı olarak değerlendirilmiştir. Mikroorganizma özgül üreme hızının ve glukonik asit oluşum hızının incelenen üretim değişkenleri ile değişimini gösteren eşitlikler Systat® lineer olmayan regresyon programı ve Origin Programı kullanılarak bulunmuştur.

1. 84 vuru/dk sabit karıştırma hızında, substrat olarak 57 g/L başlangıç derişimindeki glukoz ve % 0.5 (v/v) aş derişimi kullanılarak, bir çalkalamalı su banyosunda yapılan erlen çalışmalarında, mikroorganizma için optimum sıcaklık değeri 30-33°C ve başlangıç pH değeri ise; 5-6 aralıklarında bulunmuştur.
2. Substrat türü ve başlangıç derişimlerinin etkilerinin incelendiği çalışmalarda ise; substrat olarak glukoz, sakkaroz ve melas kullanılmıştır. Glukozun denendiği çalışmalarda en yüksek mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına 57 g/L başlangıç derişiminde ulaşılmıştır. Bu derişim değeriinde glukonik asit verimi % 14.6 olarak elde edilmiştir. Bu verim değeri teorik verimin % 13.3'ünü oluşturmaktadır. Benzer çalışmalar sakkaroz ve melas için de yapılmış ve en yüksek mikroorganizma özgül üreme ve glukonik asit oluşum hızlarına sakkaroz için 75 g/L ve melas için ise; 150 g/L başlangıç derişimlerinde ulaşılmıştır. Bu derişim değeriindeki glukonik asit verimleri sırasıyla % 23.2 ve % 24.6 olarak bulunmuştur. Bu verim değeri teorik verimlerin sırasıyla % 40.4 ve % 86.0'sını oluşturmaktadır.

Bulunan sonuçlar incelendiğinde substrat olarak melasın kullanıldığı çalışmada en yüksek glukonik asit verim değeriinde elde edildiği görülmektedir. Mikroorganizma melas içeren besin ortamında daha iyi üremekte ve daha çok asit sentezlemektedir.

Yüksek substrat başlangıç derişimi değerlerinde her üç substrat türü için de substrat inhibisyonu gözlenmiştir. Glukoz, sakkaroz ve melas için mikroorganizmanın özgül üreme hızı eşitliklerindeki kinetik sabitler, substrat inhibisyonunun olduğu durum için Systat® Programı kullanılarak hesaplanmış ve bulunan mikroorganizma verimleri ile beraber Çizelge 6.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 6.1. *Aspergillus foetidus* için, maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı, Monod Sabiti, substrat inhibisyonuna bağlı ayrışma sabiti ve mikroorganizma verimi değerlerinin substrat türü ile değişimleri

Substrat	μ_m (sa ⁻¹)	K_S (g substrat/L)	K_I (g substrat/L)	Y_{X/S_0}
Glukoz	0.017	8.241	207.872	0.217
Sakkaroz	0.015	9.363	324.239	0.063
Melas	0.062	14.211	212.645	0.268

3. Substrat olarak glukozun kullanıldığı çalışmalarda en yüksek bağıl glukoz tüketim hızı, saptanan optimum değer olan 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde elde edilmiştir
4. Fermentasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanılan amonyum nitratın başlangıç derişiminin glukonik asit üretimine etkileri de incelenmiştir. Bu bileşik için optimum derişim değeri; 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde, 28°C’da, başlangıç pH’ı 5 değerinde ve % 0.5 (v/v)’lik aşı derişimi ile 1.5 g/L olarak belirlenmiştir.
5. Fermentasyon ortamında mikroorganizmanın aşı derişiminin glukonik asit üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda ise; 84 vuru/dk çalkalama hızında, 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde, başlangıç pH’ı 5 değerinde ve 28°C’da yapılan deneylerde en yüksek özgül hız değerleri % 0.7 (v/v)’lik aşı derişimi ile elde edilmiştir.
6. Fermentasyon ortamında çalkalama hızının glukonik asit üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda ise; 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde, başlangıç pH’ı

5 değerinde, 28°C'da ve % 0.5 (v/v)'lik aşı derişimi kullanılarak yapılan deneylerde optimum çalkalama hızı 100 vuru/dk olarak bulunmuştur.

7. *Aspergillus foetidus* ile glukonik asit üretiminde karıştırılmalı ve havalandırılmalı bir fermentör kullanılarak karıştırma hızının mikroorganizma ve ürün derişimlerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla saptanan optimum başlangıç pH değeri olan pH 5'de, 30°C'da, 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde, % 0.5 (v/v)'lik aşı miktarı kullanılarak, 10 (L/sa) sabit hava akış hızında ve 300-1300 rpm karıştırma hızı aralığında deneyler yapılmıştır. Karıştırma hızının artmasıyla glukonik asit üretiminin arttığı ve mikroorganizmanın daha fazla ürediğı gözlenmiştir. Bağlı glukoz tüketim hızının karıştırma hızı ile değışimi incelendiğinde ise; en yüksek glukoz tüketim hızının 650 rpm'de elde edildiğı bulunmuştur.

8. Fermentör çalışmalarında havalandırma hızının etkisi, başlangıç pH'ı 5 değerinde, 30°C'da, 1000 rpm sabit karıştırma hızında, 57 g/L glukoz başlangıç derişiminde, % 0.5 (v/v)'lik aşı miktarı kullanılarak ve 6-60 L/sa havalandırma hızı aralığında incelenmiştir. En yüksek glukonik asit derişimi 48 L/sa'lik havalandırma hızında elde edilmiştir.

Bağılı glukoz tüketim hızının hava akış hızı ile değışimi incelendiğinde ise; en yüksek glukoz tüketim hızının 0.1674 [g glukoz/(L.saat)] değeri ile 48 L/sa'lik havalandırma hızında elde edildiğı bulunmuştur.

Belli bir hava akış hızı değerinden sonra fermentasyon ortamına gönderilen oksijenin inhibisyon etkisi yaptığı gözlenmiştir. Elde edilen ürün miktarları karşılaştırıldığında; glukonik asit fermentasyonunda havalandırma hızının karıştırma hızından daha etkili bir parametre olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

9. Fermentörde substrat olarak melasın glukonik asit üretimine etkisinin incelenmesi, 1000 rpm karıştırma hızında, başlangıç pH'ı 5 değerinde, 150 g/L melas başlangıç derişimi ve % 0.5 (v/v)'lik aşı derişimi kullanılarak, 36 L/sa hava akış hızında yapılmıştır. Fermentörde glukoz ve melasla yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında, mikroorganizmanın melas içeren ortamda daha iyi ürediğı bulunmuştur.

Bu deneylerin daha ileri aşamasında glukonik asit fermentasyonu pH kontrolü yapılan ve kesikli veya sürekli sistemde çalışan bir fermentörde incelenebilir. Yapılan tez çalışmasında havalandırmanın mikroorganizma için oldukça etkin bir parametre olduğu bulunmuştur. Bu nedenle sürekli sistemde çalışan bir fermentörde besin ortamının havalandırılması değişik havalandırma sistemleri ve saf oksijen kullanılarak incelenebilir.

Ayrıca; havalandırma çalışmaları için fermentöre giren hava içindeki oksijen yüzdesi ile fermentörden çıkan gaz akımındaki oksijen yüzdesi aynı anda uygun oksijen analizörleri ile ölçülerek ve ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi de tayin edilerek hacimsel oksijen aktarım katsayıları (k_{La} , sa^{-1}) ve mikroorganizmanın oksijen tüketim hızları hesaplanabilir.

Aspergillus foetidus'un sıvı besin ortamında topak oluşturması nedeniyle mikroorganizmanın substratı tüketmesi ve sentezlenen glukonik asidin fermentasyon ortamına aktarılması sırasında difüzyon kısıtlamaları ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle; daha büyük ölçekli bir üretime geçilebilmesi için mikroorganizma taneciklerindeki difüzyonla ilgili bir araştırma yapılması gereklidir.

Fermentörde melasla yapılan çalışmalarda mikroorganizmanın daha iyi ürediği bulunmuştur. Yüksek havalandırma ve karıştırma hızlarında ortaya çıkan köpük oluşumunun engellenmesi halinde *Aspergillus foetidus* ile melastan glukonik asit üretiminin yüksek verimle gerçekleştirilebileceği görülmüştür. Bu nedenle de büyük ölçekli bir fermentörde substrat olarak melasın kullanılması önerilebilir

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aiba, S., Humphrey, A.E. and Mills, N.F., 1973, Biochemical Engineering, 2nd ed., 114p, New York and London.
- Argüeso, T.R. and Navarro, A.R., 1973, Gluconic Acid Producing Bacteria from Honey Bees and Ripening Honey, Journal of General Microbiology, 76, 211-216.
- Atkinson B. and Mavituna, F., 1983, Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, M The Nature Press, 434p, New York.
- Attwood, M. M., Dijken, J. P. and Pronk, J.T., 1991, Glucose Metabolism and Gluconic Acid Production by *Acetobacter diazotrophicus*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 72, 2, 101-105.
- Bailey, L.E. and Ollis, D.F., 1986, Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd ed., Mc Graw Hill, 492p, New York.
- Blom, R.H., Pfeifer, V.F., Moyer, A.J., Traufler, D.H., Conway, H.F., Crocker, C.K., Farison, R.E. and Hannibal, D.V., 1952, Sodium Gluconate Production, Industrial and Engineering Chemistry, 44, 2, 435-440.
- Casida, L.E., 1964, Industrial Microbiology, John Wiley & Sons, Inc., 345p, USA.
- Clark, D.S., Ito, K. and Tymchuk, P., 1965, Effect of Potassium Ferrocyanide on the Chemical Composition of Molasses Mash Used in the Citric Acid Fermentation, Biotechnology and Bioengineering, 21, 297-315.
- Gastrock, E. A., Porges, N., Wells, P.A. and Moyer, A.J., 1938, Gluconic acid Production on Pilot-Plant Scale, Industrial and Engineering Chemistry, 20, 30, 782-789.
- Hatcher, H.J., 1972, Gluconic Acid Production, US Patent, 3,669,840.
- Herrick, H.T., Hellbach, R. and May, O.E., 1935, Apparatus for the Application of Submerged Mold Fermentations Under Pressure, Industrial and Engineering Chemistry, 27, 6, 681-683.

Kristiansen, B. and Sinclair, C.G., 1979, Production of Citric acid in Continuous Culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 297-315.

Lien, O.G., 1959, Determination of Gluconolactone, Galactonolactone and Their Free Acids by the Hydroxamate Method, *Analytical Chemistry*, 31, 8, 1363-1366.

Lockwood L.B. and Berry D.R., 1975, *Filamentous Fungi*, Vol.1, Wiley, 140p. New York.

Mattey, M., 1992, The Production of Organic Acids, *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 1^{1/2}, 87-132.

May, O.E., Herrick, H.T., Moyer, A.J. and Hellbach, R., 1929, Semi-Plant Scale Production of Gluconic acid by Mold Fermentation, *Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 12, 1198-1203.

• May, O.E., Herrick, H.T., Moyer, A.J. and Wells, P.A., 1934, Gluconic Acid, *Industrial and Engineering Chemistry*, 26, 5, 575-578.

McCabe, W.L., and Smith, L.C., 1976, *Agitation and Mixing Liquids, Unit Operations of Chemical Engineering*, International Student Edition, 3rd ed., 221p, New York.

Michel, B.J. and Miller, S.A., 1962, Power Requirements of Gas-Liquid Agitated Systems, *AIChE Journal*, 8, 2, 262-266.

Miroslav, N., Ida, M., Marcela, S., Vladimir, K., Jiri, J., Miroslav P., Miroslav, N. and Miroslav, B., 1988, Production of Gluconic Acid and Its salts by *Aspergillus foetidus*, CS. 250,277, *Chem. Abstr.*, 1989, 111, 113788s.

Moresi, M., Parente, E. and Mazzatura, A., 1991, Effect of Dissolved Oxygen Concentration on Repeated Production of Gluconic Acid by Immobilized Mycelia of *Aspergillus niger*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 320-323.

Moyer, A.J., 1944, Process for Gluconic acid Production, US Patent, 2,351,500.

- Moyer, A.J., Wells, P.A. and Stubbs, J.J., 1937, Gluconic Acid Production, *Industrial and Engineering Chemistry*, 29, 7, 777-781.
- Nakagawa, Y. and Murai, N.K., 1973, Oxidation of Gluconic Acid from Ozone, JP 7,330,618, *Chem. Abstr.*, 1974, 80, 71052f.
- Nelson, N., 1944, A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose, *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.
- Novak, M. and Fencel, Z., 1973, Kinetic Analysis of the Relationship Between Batch and Continuous Cultivation of *Aspergillus niger*, *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 4, 43-52.
- Peppler, H.J. and Perlman, D., 1979, *Microbial Technology*, Vol.1, Academic Press, 376p. New York.
- Peppler, H.J., 1967, *Microbial Technology*, Reinhold Publishing Corporation, 200p, New York.
- Prescott, F.J., Shaw, J.K., Bilello, J.P. and Cragwall, G.O., 1953, Gluconic Acid and Its Derivatives, *Industrial and Engineering Chemistry*, 45, 2, 338-342.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G., 1959, *Industrial Microbiology*, 3rd ed., McGraw-Hill Book Co., 578p, New York.
- Porges, N., Clark, T.F. and Gastrock, E.A., 1940, Gluconic Acid Production Repeated Use of Submerged *Aspergillus niger* for Semicontinuous, *Industrial and Engineering Chemistry*, 32, 1, 107-111.
- Porges, N., Clark, T.F. and Aronovsky, S.I., 1941, Gluconic Acid Production Repeated Recovery and Re-Use of Submerged *Aspergillus niger*, *Acta Biotechnology*, 12, 4, 311-317.
- Rosenberg, M., Svitel, J., Rosenbergova, I. And Stundik, E., 1992, Importance of Invertase Activity for Gluconic Acid Production from Sucrose by *Aspergillus niger*, *Acta Biotechnology*, 12, 4, 311-317.

- Roukas, T. and Harvey, L., 1988, The Effect of pH on Production of Citric and Gluconic Acid from Beet Molasses Using Continuous Culture, *Biotechnology Letters*, 10, 4, 289-294.
- Rushton, J.M., Costich, E.W. and Everett, H.J., 1950a, Power Characteristics of Mixing Impellers, Part 1, *Chemical Engineering Progress.*, 46, 8, 395-404.
- Rushton, J.M., Costich, E.W. and Everett, H.J., 1950b, Power Characteristics of Mixing Impellers, Part 2, *Chemical Engineering Progress.*, 46, 9, 467-476.
- Rushton, J.M., Oldshue, J.Y., 1953a, Mixing-Principle Theory and Practice, Part 1, *Chemical Engineering Progress.*, 49, 5, 267-275.
- Rushton, J.M., Oldshue, J.Y., 1953b, Mixing-Principle Theory and Practice, Part 2, *Chemical Engineering Progress.*, 49, 4, 161-168.
- Sakurai, H., Lee, H.W., Sato, S., Mukataka, S. and Takahashi, J., 1989, Gluconic Acid Production at High Concentrations by *Aspergillus niger* Immobilized on a Nonwoven Fabric, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67, 6, 404-408.
- Shuler, M.L. and Kargi, F., 1992, *Bioprocess Engineering*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 174p, New Jersey.
- Systat® Version 5 by Systat Incorporation, 1993, 2902 Central St. Evanston, IL USA.
- Trager, M., Hollmann, D., Buse, R. and Onken, U., 1991, Device for Fermentations with Oscillations of Dissolved Oxygen, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72, 1, 46-53.
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1989, Gluconic Acid, Vol.A12, 5th ed., Verlag Chemie, 449p, Weinheim.
- Underkofler, L.A., Hickey, R.J., 1954, *Industrial Fermentations*, Vol.1, Ch.14, Chemical Publishing Co., 446p, New York.
- Wells, P.A., Moyer, A.J., Stubbs, J.J. Herrick, H.T. and May, O.E., 1937, Gluconic Acid Production, *Industrial and Engineering Chemistry*, 29, 6, 653-656.

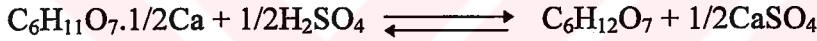
EKLER

EK 1.

GLUKONİK ASİT ANALİZ YÖNTEMİ

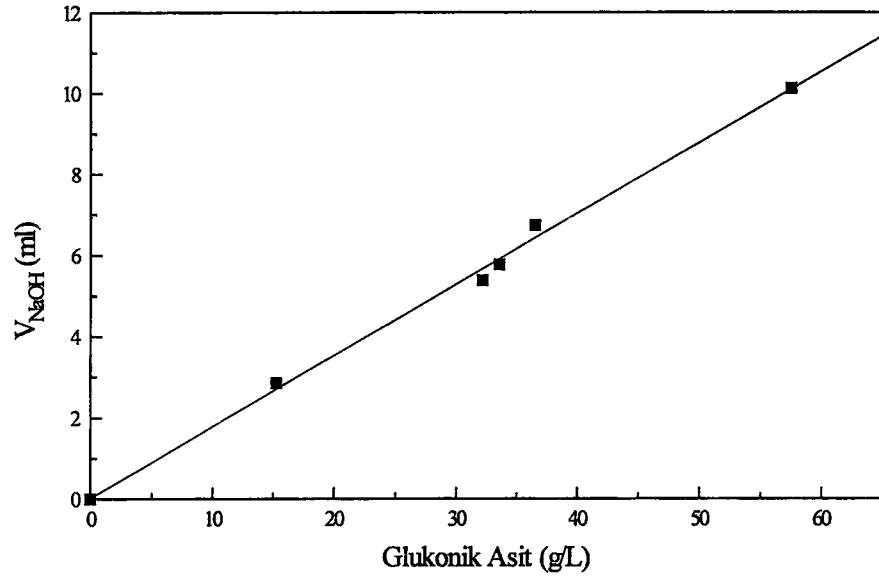
Sulu glukonik asit çözeltisinin derişimi sodyum hidroksitle titrasyonu yapılarak belirlenmiştir. Ticari glukonik asidin sudaki çözeltisinin bulunması oldukça zordur. Bu nedenle glukonik asidin; bir tuzu olan kalsiyum glukonattan, eldesi aşağıdaki yöntemle göre yapılmış ve ortamdaki asit sodyum hidroksitle titre edilerek bir kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır.

Ek 1.1. Analiz Yöntemi: Tepkime için gereken H_2SO_4 miktarı, tartılan kalsiyum glukonat örneği miktarı kullanılarak hesaplanır.



Belirli miktardaki kalsiyum glukonat, 50 ml saf su ile kaynar su banyosunda ($\cong 95^\circ C$) ısıtılarak çözülür. Daha sonra üzerine hesaplanan hacimde H_2SO_4 eklenerek $CaSO_4$ 'ın oluşması sağlanır. Elde edilen karışım sıcak su banyosunda 10-15 dakika daha tutularak $CaSO_4$ 'ın oluşmasının tamamlanması sağlanır. Oluşan karışım, soğutulduktan sonra beyaz bant süzgeç kağıdından süzülür ve süzgeç kağıdında kalan katı saf su ile bir kez yıkanır. Süzme işlemi bittikten sonra elde edilen süzüntünün hacmi ölçülüp %10'luk NaOH ve 3-4 damla fenolftalein indikatörü kullanılarak titre edilir.

Fermentasyon deneyleri sırasında glukonik asit derişimlerinin tayini için ortamdan belirli zamanlarda örnekler alınarak süzülür. Süzüntüden belirli hacimde alınarak sodyum hidroksitle titre edilir ve kalibrasyon doğrusundan glukonik asit derişimine geçilir.



Şekil Ek 1.1. Glukonik asit derişimi tayini için kalibrasyon doğrusu

$$Y = 0.02839 + 0.17531 X \quad R^2 = 0.996 \quad (1.1)$$

EK 2.

GLUKOZ TAYİNİ

TOPLAM İNDİRGENMİŞ ŞEKER ANALİZ YÖNTEMİ

Fermentasyon ortamından alınan örnekler mikroorganizma, glukoz ve glukonik asit analizleri için önceden tartılmış kaba süzgeç kağıtlarından süzülürler. Süzülen örneklerden elde edilen süzüntüler glukoz ve glukonik asit analizlerinde kullanılırlar. Glukoz derişimi Nelson toplam indirgenmiş şeker analizi yöntemi ile mg/L cinsinden önceden hazırlanmış kalibrasyon doğrusu ile tayin edilir. Bu yöntemle göre alınan analiz çözeltileri 500 ile 1000 kez seyreltilir ve aşağıdaki reaktifler kullanılarak analiz yapılır.

Glukoz analizi için yapılan çalışmalarda optimum dalga boyu 530 nm olarak belirlenmiştir. Glukoz derişimleri Hitachi 150-20 Model U.V. spektrofotometre ile okunan absorbans değerleri kullanılarak Şekil Ek 2.1'deki çalışma doğrusu yardımıyla belirlenir. Kör numunede 2 ml örnek yerine damıtık su kullanılır.

EK 2.1. Analiz Çözeltileri

A. Bakır Çözeltisi

- I) 24 g susuz Na_2CO_3 ile 12 g Rochelle tuzu (Na-K tartarat) 250 ml suda çözülür.
- II) %10'luk 40 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ karıştırılarak birinci çözeltiliye eklenir. Buna 16 g NaHCO_3 ilave edilir.
- III) Na_2SO_4 (susuz)'dan 18 g tartılıp 500 ml sıcak suda çözülür, kaynatılır ve soğutulur.
- IV) Her iki çözelti karıştırılıp 1000 ml'ye seyreltilir.

B. Nelson Çözeltisi

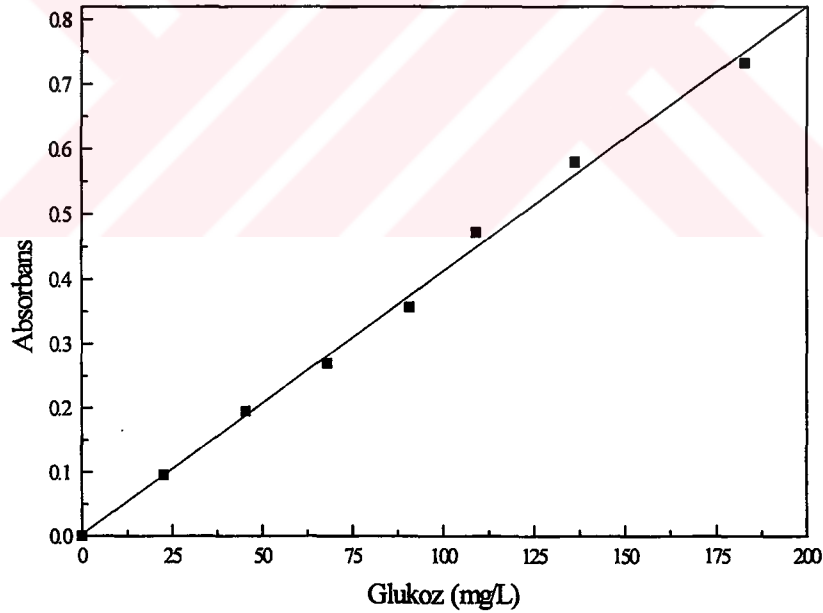
- I) 50 g amonyum molibdat 900 ml suda çözülür. 42 ml derişik H_2SO_4 eklenip, karıştırılır.
- II) 6 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 ml H_2O 'da çözülür, çözeltiliye eklenir ve karıştırılır.
- III) Çözelti 37°C 'de 24-48 saat tutulur.

EK 2.2. Analiz İşlemi

2 ml örnek çözeltisine 2 ml bakır çözeltisi eklenir. 20 dakika kaynar su banyosunda tutulup, musluk suyunda soğutulur. Soğuyan çözelti üzerine 2 ml Nelson çözeltisi eklendikten sonra CO₂ çıkışı tamamlanuncaya kadar beklenir. Gaz çıkışı tamamlandıktan sonra toplam hacmi 25 ml olacak şekilde saf su ile seyreltilir. Hazırlanan örneğin, 530 nm dalga boyunda sadece bakır ve Nelson çözeltileriyle hazırlanmış kör çözeltiye karşı absorbans değeri ölçülür.

530 nm dalga boyunda farklı derişimlerdeki glukoz çözeltileri için absorbans değerleri saptanmış ve Şekil Ek 2.1'deki çalışma doğrusu elde edilmiştir.

Fermentasyon ortamından alınan örneklerin bu yöntemle göre okunan absorbans değerleri kullanılarak çalışma doğrusundan glukoz derişimlerine geçilir.



Şekil Ek 2.1. Glukoz tayini için çalışma doğrusu

$$Y=0.00291+0.0041 \cdot X$$

$$R^2=0.992$$

(2.1)

EK 3.

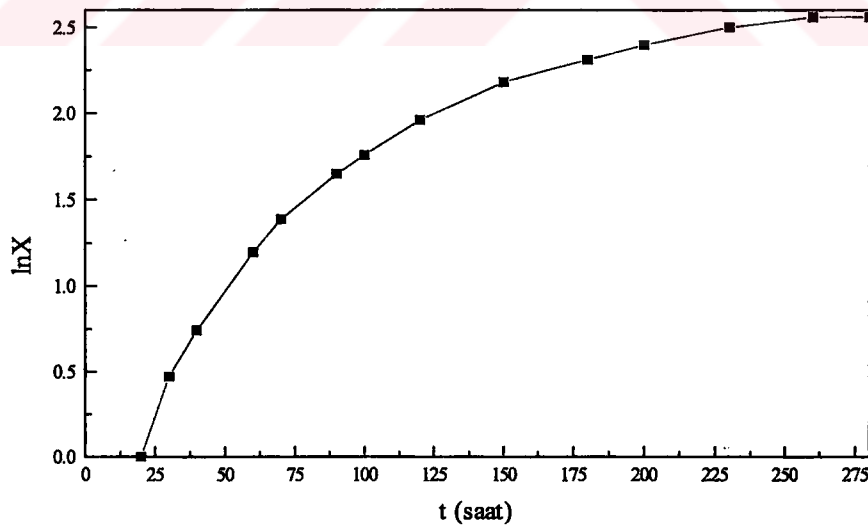
MİKROORGANİZMANIN ÖZGÜL ÜREME HIZININ HESAPLANMASI

Kesikli sistemlerde üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızı Eşitlik 3.2 ile tanımlanmaktadır.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (3.2)$$

Aspergillus foeditus ile yapılan deneylerde, mikroorganizma derişimlerinin logaritmaları zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Her grafikte üssel üreme bölgesi saptanmış ve bu bölgedeki mikroorganizma özgül üreme hızı, doğrunun eğimi bulunarak hesaplanmıştır.

57 g/L başlangıç derişiminde glukoz içeren besin ortamında yapılan çalışma için mikroorganizma derişiminin fermentasyon süresi ile değişimi, bir grafikte Şekil Ek 3.1’de gösterilmektedir. Mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı bu grafikten $\mu = 0.0228 \text{ (sa}^{-1}\text{)}$ olarak bulunmuştur.



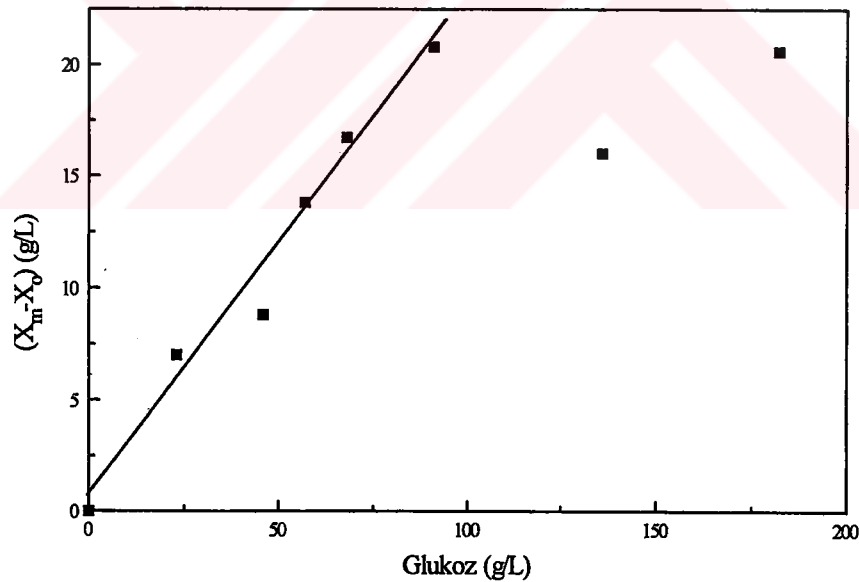
Şekil Ek 3.1. *Aspergillus foetidus* için mikroorganizma özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan örnek grafik ($S_{Go} = 57 \text{ g/L}$; 28°C ; başlangıç pH'ı = 5; 84 vuru/dk çalkalama hızı; aşı derişimi % 0.5)

EK 4.

MİKROORGANİZMA VERİMİNİN HESAPLANMASI

Aspergillus foetidus için mikroorganizma verimi; Eşitlik 3.13'e göre besin ortamındaki üremeyi kısıtlayıcı substratın farklı başlangıç derişimlerinde tayin edilen maksimum mikroorganizma derişimlerinin, başlangıç substrat derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun eğiminden hesaplanmıştır.

Substrat olarak glukozun kullanıldığı deneylerde elde edilen maksimum mikroorganizma derişimlerinin başlangıç glukoz derişimi ile değişimi Şekil Ek 4.1'de gösterilmiştir. Yüksek glukoz başlangıç derişimlerinde substrat inhibisyonu nedeniyle grafikte doğrusallıktan sapmalar görülmektedir. Glukozlu besin ortamında *Aspergillus foetidus* için mikroorganizma verimi $Y_{x/S_0} = 0.217 [(g \text{ m.org})/(g \text{ glukoz})]$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil Ek 4.1. Glukozun substrat olarak kullanıldığı deneylerde $(X_m - X_0)$ değerlerinin başlangıç glukoz derişimi ile değişimi ($S_{G_0} = 57 \text{ g/L}$; 28°C ; başlangıç pH'ı = 6.5; 84 vuru/dk çalkalama hızı; aşı derişimi % 0.5)

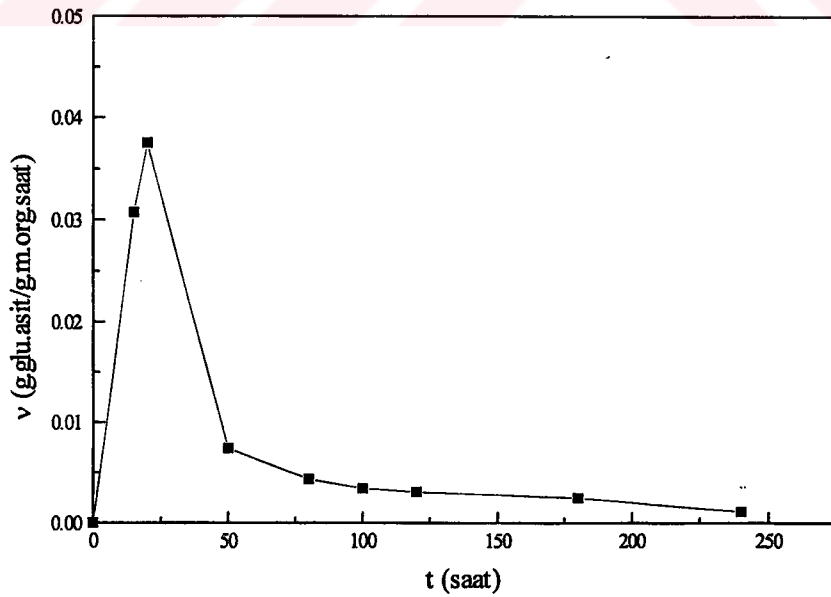
EK 5.

ÖZGÜL ÜRÜN OLUŞUM HIZININ HESAPLANMASI

Elde edilen deneysel sonuçlardan glukonik asit oluşum hızlarının bulunması amacıyla, tayin edilen glukonik asit ve mikroorganizma derişimleri zamana karşı grafiğe alınmıştır. Zamana karşı çizilen glukonik asit derişimlerinden farklı zamanlardaki eğim değerleri $[(d\ddot{U}/dt), (g \text{ glukonik asit/saat})]$ hesaplanmıştır. Karşı gelen mikroorganizma derişimleri ise; grafiklerden okunarak özgül ürün oluşum hızları v , $[g \text{ glukonik asit}/(g \text{ m.org.saat})]$ Eşitlik 3.17'ye göre hesaplanmıştır.

$$v = \frac{1}{X} \frac{d\ddot{U}}{dt} \quad (3.17)$$

Şekil Ek 5.1'de *Aspergillus foetidus* için glukozlu besin ortamında özgül glukonik asit oluşum hızlarının fermentasyon süresi ile değişimi gösterilmektedir. Glukonik asit oluşum hızı 25. saatte $v = 0.0375 [g \text{ glukonik asit}/(g \text{ m.org.saat})]$ olarak elde edilmiştir.



Şekil Ek 5.1. Özgül glukonik asit oluşum hızının zamanla değişimi ($S_{G_0} = 57 \text{ g/L}$; 28°C ; başlangıç pH'ı = 6.5; 84 vuru/dk çalkalama hızı; aşı derişimi % 0.5)

EK 6.**HAVALANDIRMA SAYISININ HESAPLANMASI**

Mekanik karıştırma uygulanan havalandırma sistemlerinde boyutsuz bir sayı olan havalandırma sayısı (N_a) Eşitlik 6.1 kullanılarak hesaplanabilir.

$$N_a = \frac{Q}{ND^3} \quad (6.1)$$

Deneylerde kullanılan fermentör, pyrex camdan yapılmış olup 500 ml çalışma hacmine sahiptir. Fermentasyon ortamının karıştırılmasında 2.6 cm çapındaki, 6 düz bıçaklı bir türbin tipi karıştırıcı kullanılmıştır.

1000 rpm karıştırma hızında ve 6 L/sa'lik hava akış hızı için havalandırma sayısı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$Q = 1.67 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{sn}$$

$$N = 16.67 \text{ rps}$$

$$D = 0.026 \text{ m}$$

$$N_a = \frac{1.67 \times 10^{-6}}{16.67 \times (0.026)^3} = 0.0056$$

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aysun Kara
Doğum Yeri : Eskişehir
Doğum Yılı : 10 - 02 - 1972
Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise : 1986 - 1989; Sivrihisar Lisesi

Lisans : 1989 - 1990; Hacettepe Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek
Okulu İngilizce Hazırlık Okulu

: 1990 - 1994; Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği
Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya
Mühendisliği Anabilim Dalı

Yabancı Dili : İngilizce

İş Tecrübesi : 1995- ; Araştırma Görevlisi
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü