

Fermentasyon Kinetiği

Fermentasyon

Fermentasyon, hücre içinde oksijen yokluğunda meydana gelen metabolik bir faaliyet olarak 'NAD⁺'yi yeniden oluşturmak için glikozun glikoliz yoluyla kısmi oksidasyonunu takip eden metabolik adımlar' şeklinde tanımlanmaktadır.^[1] Fermentasyon anaerobik şartlarda, yani oksidatif fosforilasyon olmadığı durumlarda, glikoliz yoluyla ATP üretimini sağlayan önemli bir biyokimyasal süreçtir. Biyokimyanın fermentasyonla ilgilenen dalı zimolojidir.

Fermentasyonda glukoz (veya başka bir bileşik) hidrojenlerini teker teker kaybederek enerji üretimini sağlar. Oksijen olmadığı için bu parçalanma sonucunda ortaya çıkan basit organik bileşikler hücrenin kullanabileceği nihai elektron alıcısı ve hidrojen alıcıları olurlar.

Fermentasyonun son adımı (pirüvatın fermentasyon ürünlerine dönüşmesi) enerji üretme dahi, bu süreç anaerobik bir hücre için önemlidir çünkü glikozun pirüvata dönüşmesi sırasında harcanan nikotinamid adenin dinükleotit'in (NAD⁺) yenilenmesini sağlar; glikolizin devamı için bu gereklidir. Örneğin alkol fermentasyonunda pirüvattan oluşan asetaldehit, NADH + H⁺ tarafından etanola dönüşür, bu da hücreden dışarı atılır.

Mikroorganizmalarda, fermentasyon, organik besinlerin anaerobik olarak bozunmasıyla adenosin trifosfat üretmenin birincil yoludur. İnsanlar, Neolitik çağdan beri yiyecek ve içecek üretmek için fermentasyonu kullandılar. Fermentasyon, turşu yapımı, yoğurt yapımı gibi süreçlerle gıdaları muhafaza etmek ve ayrıca şarap ve bira gibi alkollü içecekler üretmek için kullanılır. Fermentasyon, insanlar da dahil olmak üzere tüm hayvanların mide-bağırsak sistemlerinde de gerçekleşir.^[2]

Fermentasyon, bir elektron taşıma sistemi içermez ve glikoliz sırasında substrat düzeyinde fosforilasyon tarafından üretilen ötesinde doğrudan herhangi bir ek ATP üretmez. Fermentasyon yapan organizmalar, yani fermentörler, glikoliz sırasında glikoz başına maksimum iki ATP molekülü üretir.

Mikrobiyal fermentasyon süreçleri insanlar tarafından manipüle edilmiştir ve çeşitli gıdaların ve farmasötikler dahil diğer ticari ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal fermentasyon, teşhis amacıyla mikropların tanımlanması için de yararlı olabilir.^[3]

Glukozun fermentasyonunda genelde en sık üretilen basit bileşik pirüvat veya ondan türemiş bir veya birkaç bileşiktir: bunlar arasında etanol, laktik asit, hidrojen, bütiirik asit ve aseton sayılabilir. Şeker ve amino asitlerin fermentasyonu çeşitli canlılarda görülmekle beraber, bazı ender organizmalar alkanoik asitler, pürinler, pirimidinler ve başka bileşikler de fermente edebilir. Çeşitli fermentasyon tipleri ürettikleri ürünlere göre adlandırılırlar.

Fermantasyon terimi biyokimyada oksijen yokluğunda enerji üreten reaksiyonlar için kullanılmasına karşın, gıda sanayisinde daha genel bir anlam taşır, mikroorganizmaların oksijen varlığında yaptığı parçalama reaksiyonlarını da kapsar (sirke fermantasyonu gibi). Biyoteknolojide bu terim daha da genel kullanılır ve büyük tanklarda büyütülen mikroorganizmalara yaptırılan her türlü üretime (proteinler dahil) fermantasyon denir.

Fermantasyonun Biyokimyası

Fermantasyon reaksiyonları, ilgili yakıt molekülüne ve son ürüne göre değişir. Aşağıdaki kimyasal denklemde şeker glikozdur.



Denklem sözlü olarak aşağıdaki gibi yazılabilir:

Şeker (glikoz, fruktoz veya sükroz) → Alkol (etanol) + Karbon Dioksit + Enerji (ATP)

Enerji Verimi

En katı anlamıyla fermantasyon, glikoz gibi bir besin molekülünün net oksidasyon olmadan anaerobik metabolik parçalanmasıdır. Fermantasyon, bir moleküldeki tüm mevcut enerjiyi serbest bırakmaz; sadece glikolizin (glikoz başına iki ATP veren bir süreç) indirgenmiş koenzimleri yenileyerek devam etmesine izin verir.

Fermantasyon ürünleri kimyasal enerji içerir, (yani tamamen oksitlenmezler), ancak oksijen (veya diğer daha yüksek oranda oksitlenmiş elektron alıcıları) kullanılmadan daha fazla metabolize edilemeyecekleri için atık ürünler olarak kabul edilirler. Bunun sonucu olarak da fermantasyon yoluyla yapılan ATP üretimi, piruvatın tamamen karbon dioksit oksitlendiği oksidatif fosforilasyondan daha az verimlidir. Fermantasyon, aerobik solunumla elde edilen yaklaşık 36 ATP'ye kıyasla glikoz molekülü başına iki ATP molekülü üretir. İnsan metabolizması öncelikle aerobik olmasına rağmen, oksijenin kısmen veya tamamen yokluğunda (örneğin, oksijen açlığı yaşayan aşırı çalışan kaslarda veya enfarkte kalp kası hücrelerinde), piruvat, hidrojenini piruvata bağışlayarak atık ürün laktata dönüştürülebilir. Bir fermantasyon örneği olan bu reaksiyon, oksijen yokluğunda veya oksijen seviyeleri düşük olduğunda glikoliz yoluyla metabolik akışı sürdürmek için bir çözümdür. Fermantasyon, kısa, yoğun efor dönemlerinde yardımcı olurken, karmaşık aerobik organizmalarda uzun süreler boyunca sürdürülemez. Örneğin insanlarda laktik asit fermantasyonu, 30 saniye ile 2 dakika arasında değişen bir süre boyunca enerji sağlar.

Fermantasyonun son aşaması olan piruvatın bir son ürüne dönüştürülmesi enerji üretmez. Bununla birlikte, anaerobik koşullarda glikolitik yoldan akışı sürdürmek için gerekli olan nikotinamid adenin dinükleotidini (NAD⁺) yeniden ürettiği için anaerobik bir hücre için kritik öneme sahiptir.^[4]

Ürünler

Piruvat ve NADH'nin anaerobik olarak metabolize edilerek nihai hidrojen alıcısı olarak hareket eden bir organik molekül ile çeşitli ürünlerden herhangi birini verdiği çeşitli fermentasyon türleri vardır. Örneğin, yoğurt yapımında yer alan bakteriler piruvatu laktik aside indirger. Bira mayası gibi organizmalarda, asetaldehit ve karbon dioksit oluşturmak için önce pirüvattan bir karboksil grubu çıkarılır; asetaldehit daha sonra indirgenerek etanol ve NAD⁺ elde edilir. Anaerobik bakteriler, terminal elektron alıcıları olarak oksijen dışındaki çok çeşitli bileşikleri kullanma yeteneğine sahiptir. Sirke (asetik asit) bakteri metabolizmasının doğrudan sonucudur. (Bakterilerin etanolü asetik aside dönüştürmek için oksijene ihtiyacı vardır.) Sütte asit kazeini pıhtılaştırarak kesmik üretir. Asitlemede asit, gıdayı patojenik ve çürütücü bakterilerden korur.^[4]

Türleri

Glikozun Fermantasyonu[[değiştir](#) | [kaynağı değiştir](#)]



Alkol fermentasyonu

Glikoz fermentasyonu sırasında piruvat çeşitli bileşiklere dönüşür:

- **Alkol Fermantasyonu:** Bilinen başka bir fermentasyon işlemi, etanol üreten alkol fermentasyonudur. Birinci reaksiyonda piruvat dekarboksilaz enzimi piruvattan bir karboksil grubu çıkarır, iki karbonlu asetaldehit molekülü üretirken CO₂ gazı açığa çıkar.

Alkol dehidrojenaz enzimi tarafından katalize edilen ikinci reaksiyon, NADH'den asetaldehite bir elektronu transfer eder, etanol ve NAD⁺ üretir. Saccharomyces cerevisiae tarafından piruvat'ın etanol fermantasyonu alkollü içeceklerin yapımında kullanılır ve CO₂ salımı nedeniyle ekmeklik ürünlerin kabarmasını sağlar. Gıda endüstrisinin dışında, bitki ürünlerinin etanol fermantasyonu biyoyakıt üretimi için de önemlidir.^[5]

- **Laktik Asit Fermantasyonu** :Laktik asit bakterileri, sağlıklı gıdaların korunmasında ve üretilmesinde önemli bir rol oynar. Laktik asit fermantasyonları genellikle ucuzdur ve hazırlanmalarında genellikle çok az veya hiç ısı gerekmez, bu da onları yakıt açısından verimli kılar. Laktik asitle fermente edilmiş gıdalar her kıtada dünya nüfusunun beslenmesinde önemli rol oynamaktadır.Lactobacillus, Leuconostoc ve Streptococcus dahil olmak üzere birkaç gram-pozitif bakteri cinsi toplu olarak laktik asit bakterileri (LAB) olarak bilinir ve bunların çeşitli suşları gıda üretiminde önemlidir. Yoğurt ve peynir üretimi sırasında laktik asit fermantasyonu ile oluşan yüksek asitli ortam sütün içerdiği proteinleri denatüre ederek katılaşmasına neden olur. Laktik asit tek fermantasyon ürünü olduğunda, süreç homolaktik fermantasyon olarak adlandırılır. Bununla birlikte, birçok bakteri heterolaktik fermantasyon gerçekleştirir. Glikoliz için EMP yolu yerine pentoz fosfat yolu kullanmaları nedeniyle laktik asit, etanol, asetik asit karışımını üretirler ve sonuç olarak CO₂ gazı açığa çıkar. Laktik asit bakterileri tıbbi açıdan da önemlidir. Vücutta düşük pH ortamlarının üretimi ile patojenlerin bu bölgelere yerleşmesini ve büyümesini engeller. Laktik asit bakterileri gastrointestinal sağlığın korunmasında önemlidir, probiyotiklerin birincil bileşenidir.^{[5][6]}
- **Karışık Asit Fermantasyonu** : Enterobacteriaceae grubunda görülür. Piruvat'tan asetat ve format, veya piruvat, süksinik asit ve formik asit meydana gelir ve glikoz başına 3 ATP elde edilir. Düşük pH'de (pH 6'dan küçük) formik asit CO₂ + H₂'ye dönüşür. Clostridium türleri de karışık asit fermantasyonu yapar^[7]
- **Butirik Asit Fermantasyonu** : Bütirik asit, Clostridium türleri tarafından biyolojik olarak üretilir ve diğer asitler gibi (asetik asit, laktik asit, propionik asit), belirli bir konsantrasyondan sonra bakteriler için toksiktir. Bu nedenle, ürün titreleri genellikle düşüktür.^[8]
- **Solvent Fermantasyonu** : Bazı Clostridium türleri şekerleri asetik asit ve bütirik aside dönüştürüp sonra bunlardan aseton ve butanol yaparlar.^[9]

- **Bütandiol Fermantasyonu :** *Erwinia-Enterobacter-Serratia* grubunun özelliğidir, son ürün olarak bütandiol oluşur.^[10]
- **Propiyonik Asit Fermantasyonu :** Bu fermantasyonda pirüvat oksalasetik asite dönüşür, bu süksinik asite indirgenir, o da propiyonik aside dönüşür. Bu süreçte 9 karbondan sadece 1 ATP oluştuğu için bu yolu kullanan bakteriler çok yavaş büyür.
- **Amino Asit Fermantasyonu :** Amino asitler boyut ve yapı bakımından önemli ölçüde farklılık gösterir ve mevcut amino asitlerin türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak farklı yollar aracılığıyla bir dizi ürüne anaerobik veya aerobik olarak fermente edilir. Amino asit çiftleri, Stickland reaksiyonu yoluyla parçalanabilir. Ayrıca tipik bir metabolik sistem, tek bir amino asit fermantasyonu gerçekleştirebilir. Bazı amino asitler hem elektron donörü hem de elektron alıcısı olarak görev alabilir. Bu nedenle, Stickland reaksiyonları, transforme amino asitleri molü başına yaklaşık 0.5 mol ATP sağlayarak amino asitleri mikrobiyal büyüme için fermente etmenin en basit yoludur.^[11]

Fermantasyon Teknolojisinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Mayalar; Maya, eski zamanlardan beri şarap yapımında, fırınlamada ve bira yapımında kullanılan tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Mayalar doğada çok yaygındır. Mayaların yaşam çevriminde esas olarak toprak, tatlı ve sulu meyveler bulunur. Maya konukçulardan yağmurla, düşen yaprak ve meyvelerle toprağa geçer ve toprağın daha çok üst katmanlarında, 0–10 cm derinliklerinde kışı geçirir. Buradan mayanın nasıl toprağın yüzeyine nakledildiği tam olarak bilinmemekle beraber, bunun böcek ve diğer hayvanlar aracılığıyla olduğu, sonra gene bunlarla veya tozla yaz konukçularının üzerine nakledildiği zannedilmektedir.^{[12][13]}

Bakteriler; Bakteriler küçük tek hücreli organizmalardır. Bakteriler Dünya'nın hemen hemen her yerinde bulunur ve gezegenin ekosistemleri için hayati öneme sahiptir. Bazı türler aşırı sıcaklık ve basınç koşullarında yaşayabilir. İnsan vücudu bakterilerle doludur ve aslında insan hücrelerinden daha fazla bakteri hücresi içerdiği tahmin edilmektedir. Vücuttaki çoğu bakteri zararsızdır ve hatta bazıları faydalıdır. Nispeten az sayıda tür hastalığa neden olur.^{[13][14]}

Küf Mantarları; Besinlerin üzerinde beyaz veya renkli hifler oluşturan mantarlardır. Küf mantarlarının bazıları saprofit, bazıları parazit, bazıları da diğer organizmalarla simbiyotik bir hayat yaşarlar. Küf mantarlarını karakterize eden ilk organ ipliksi ve çok çekirdekli bir yapıya malik olan "miselyum" adı verilen vejetatif organdır. Miselyum dallanmış ve devamlı olarak uçtan gelişen ve yan dallanma yapan hiflerden ibaret bir topluluktur.^{[13][15]}

Algler; Algler de bakteriler mayalar ve mantarlar gibi en basit bitkilerdendir. Pek çoğu klorofil içerdiklerinden fotosentez yapabilirler. Alglerin protein, yağ, karbonhidrat ve vitamin

gibi önemli besin maddelerini sentez yapabilmeleri mikrobiyolog ve beslenmecilerin ötedenberi dikkatlerini üzerine çekmiştir. Büyüklükleri bazı bakterilerden daha küçük olabildiği gibi, "seaweed" gibi metrelerce uzunlukta olanları da vardır. Dünyada birkaç yer dışında her yerde bulunan alglerin mikroskopik şekillerine örnek olarak balinaya kadar su hayvanlarının esas besinini oluşturan fitoplanktonları (phytoplankton) gösterebiliriz.^{[13][16]}

Şapkalı Mantarlar ; Bugün şapkalı mantarlar denilince gözle görülebilen ve etimsi karpoforlara (carpophore) sahip mantarlar anlaşılmaktadır. Bu çeşit mantarlara hem Ascomycetes hem 39 de Basidiomycetes sınıfında rastlanır. İnsanlar doğada kendiliğinden yetişen şapkalı mantarlarla besin olarak ve bazı ilâçların yapılması münasebetiyle çok eskiden beri ilgilenmişlerdir. Fakat bu mantarların ticarî içerikte üretimi ilk defa yak. 1650 yılında yapılmıştır. Doğada yetişen ve 4000 kadar lamelli (gilli) mantarlardan şimdiye kadar saptanan zehirli olanların sayısı 30-40'ı bulur.^[13]

Fermantasyon Teknolojisinin Çalışma Alanları

Çeşitli gıda ve içkilerin üretimi: Zeytin işleme, yoğurt ve alkollü içkiler yapımı.

Alkollü fermantasyon, endüstrilerde alkollü içecekler, ekmek ve sirke üretmek için kullanılır. Örneğin şarap, üzümde bulunan doğal şekerlerin fermantasyonu ile sentezlenir. Benzer şekilde romlar, şeker kamışı ürünü melasın fermente edilmesi ve ardından damıtılmasıyla üretilir.^[17]

Sütü yoğurda dönüştürmek için bu bakteriler sütü fermente ederek sütteki laktoz şekerlerini laktik aside dönüştürür. Laktik asit, sütün fermente olurken koyulaşmasına ve ekşi bir tada sahip olmasına neden olan şeydir. Bakteriler zaten sütü kısmen parçalamış oldukları için yoğurdun sindirimimizi kolaylaştırdığı düşünülmektedir.^[18]

Sofralık zeytin, Akdeniz bölgesindeki en eski bitkisel fermente gıdalardan biridir. Fermente sofralık zeytinler, ekonomik etkilerinin yanı sıra, yüksek biyoaktif ve sağlığı geliştiren bileşikler içeriği nedeniyle Akdeniz diyetinde önemli bir sağlıklı gıdayı temsil eder.^[19]

Fermentasyon metoduyla birçok antibiyotikler elde edilmiştir.

Antibiyotikler, endüstriyel olarak, kaynak mikroorganizmanın sıvı bir büyüme ortamı içeren büyük kaplarda (100.000 – 150.000 litre veya daha fazla) büyütüldüğü bir fermantasyon işlemiyle üretilir. Oksijen konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve besin seviyeleri optimal olmalıdır ve gerekirse yakından izlenir ve ayarlanır. Antibiyotikler ikincil metabolitler olduğundan, hücreler ölmeden önce maksimum verimin elde edilmesini sağlamak için popülasyon büyüklüğü çok dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir. İşlem tamamlandıktan sonra, antibiyotik özütlenmeli ve kristal bir ürüne saflaştırılmalıdır.^[20]

Çeşitli organik asitler elde edilmektedir.

Organik asitlerin mikrobiyal üretimi, yenilenebilir karbon kaynaklarından yapı taşı kimyasalları elde etmek için umut verici bir yaklaşımdır. Bir süredir bazı organik asitler üretilmiş ve bu mikrobiyal üretim süreçleri hakkında derinlemesine bilgi edinilmiş olsa da, daha ileri mikrobiyal üretim süreçleri mümkün görünmektedir, ancak büyük ölçekli üretim henüz mümkün olmamıştır. Bu yöntemle üretilen organik asitlere örnek olarak, lakstik asit, poliaktik asit, sitrik asit, süksinik asidi verebiliriz.^[21]

Gelişme maddeleri elde edilmektedir. Özellikle vitaminler; B grubu vitaminler fermentasyon metoduyla elde edilmektedir.

Vitamin fermentasyonu temel olarak parti modunda yapılır. Besinler ve aşılarda daha sonra steril fermentöre eklenir ve bir süre bekletilir. Daha sonra köpük önleyici madde eklenir. Fermentörde iyi miktarda ürün bulunduktan sonra içerik alınır ve ardından ürün ekstrakte edilir. Mikrobiyal hücrelerde siyanokobalamin, 5,6-dimetil benzimidazol kobalamid ve psödoitamin B12 gibi doğal maddeler formunda kalır. Kültür suyu 10–15 mg Vitamin B12/lt içerir.^[22]

Tek hücre proteini ve tek hücre yağı elde edilmektedir.

Ticari üretim tesislerinde, mikrobiyal kültürden aşı üretimi laboratuvar ortamında gerçekleştirilmektedir. Tek hücre yağı, mikroorganizma için uygun üretim ortamında fermentasyon ile elde edilmektedir. Hücre hasadı santrifüj veya filtrasyon ile yapılmaktadır. Elde edilen yağ biyokütle vakum veya sprey kurutucuda işlem görmektedir. Kuru biyokütle solvent ekstraksiyonu ile muamele edilerek ham yağ ekstrakte edilmektedir. Son olarak, üretilen ham yağ nötralizasyon, degumming (müsilaj giderme), ağartma ve kokudan arındırma aşamaları ile rafine edilmektedir.^[23]

Çeşitli ketonlar üretilmektedir (butanon, pentanon, aseton).

Fermente aseton üretimi, Weizmann işlemi olarak da bilinen aseton-bütanol-etanol (ABE) fermentasyonu, nişasta ve glikoz gibi karbonhidratlardan aseton, n-bütanol ve etanol üretmek için bakteriyel fermentasyon kullanan bir süreçtir. Kimyager Chaim Weizmann tarafından geliştirildi ve Dünya Savaşı sırasında İngiliz savaş endüstrisi için gerekli bir madde olan korditi yapmak için gerekli olan asetonu üretmek için kullanılan birincil yöntemdi. Yine aynı şekilde pentanon, butanon gibi bazı ketonlarda fermentasyon ile üretililebilir.^{[24][25]}

Enzimlerin fermentasyonla elde edilmesi.

Fermentasyon, endüstriyel amaçlar için enzim üretme yöntemidir. Fermentasyon, enzimleri üretmek için bakteri ve maya gibi mikroorganizmaların kullanılmasını içerir. Enzim üretmek için iki tür fermentasyon kullanılır. Bunlar batık fermentasyon ve katı hal fermentasyonudur. Batık fermentasyon, sıvı bir besin ortamında mikroorganizmalar tarafından enzim üretimini

içerir. Katı hal fermantasyonu mikroorganizmaların ve dolayısıyla enzimlerin katı bir substrat üzerinde yetiştirilmesidir.^[26]

Endüstriyel Fermantasyon Yöntemleri

Biyoteknolojide fermantasyonlar kesikli kesikli (batch), kesikli beslemeli (fed-batch) -batch) veya sürekli (continous) yöntemlerle sürekli (continous) yürütülmektedir.

Kesikli Fermantasyon: Kesikli fermantörler kapalı sistemler olarak düşünülebilir. Kesikli sistemlerde fermantasyon ortamı hazırlanır ve mikroorganizma aşılanır. Sistemin pH, sıcaklık ve diğer değerleri ayarlandıktan sonra ortama yeni substrat veya mikroorganizma ilavesi olmaz. Fermantasyon, ortamdaki besin elementleri tükeninceye kadar veya çevresel koşullarda gözlemlenen değişikliklere göre sonlandırılır.^[27]

Kesikli Beslemeli Fermantasyon: Kesikli beslemeli fermantörler kesikli ve sürekli sistemlerin avantajlarını beraberce taşıdığı için endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Proses başlangıçta kesikli olarak başlar. Besin elementleri tükenmeye başlayınca substrat, fermantasyon sırasında çeşitli zamanlarda azar azar ortama ilave edilir. Kritik öneme sahip besin elementinin konsantrasyonu çok iyi takip edilmelidir. Başlangıçta fermantöre konan substratın mümkün olduğu kadar konsantre olması istenir. Böylece reaktör hacminin neden olduğu problemler aşılmış olur. Bu yöntemin en önemli avantajı hem reaksiyon oranının hem de metabolik reaksiyon hızının substratın ilave oranına göre kontrol edilebilmesidir. Oksijen transferi ve soğutma gibi fermantasyona etki eden parametreler reaksiyon oranı izlenerek edilerek kontrol altında tutulabilir.^[28]

Sürekli Fermantasyon: Bu sistemde steril besin biyoreaktöre ilave edilirken, eşit miktarda ürün ve onunla birlikte mikroorganizma sistemden alınır. Ürünün alımı sırasında kaybedilen mikroorganizmalar, reaktördeki hücre bölünmesiyle dengelenir. Sürekli fermantasyon yönteminde iki temel uygulama vardır. Homojen karışımın sağlandığı biyoreaktörler ve tapa akışlı reaktörler. Homojen karışımın sağlandığı reaktörlerde: Kemostat veya turbidostat olarak çalışılabilir. Kemostat sisteminde fermantasyonunun kararlılığı substratlardan bir tanesinin konsantrasyonu ayarlanarak hücre büyümesi kontrol edilerek sağlanır. Turbidostat yönteminde ise fermantasyonda biyomas konsantrasyonu turbidimetrik olarak ölçülür ve elde edilen verilere göre besin ilave edilerek kararlılık sağlanır. Tapa akışlı reaktörlerde: Kültür solüsyonu silindirik yapıda bir reaktörde karıştırma olmaksızın ilerler. Silindirik tüpün kesitlerinde hücre sayısı veya ürün konsantrasyonu farklılık gösterir. Sürekli fermantasyonda kararlı hal durumunda biyoreaktörden alınan mikroorganizmalardan dolayı sistemden ayrılan mikroorganizmalar reaktör içinde hücrelerin bölünmesi ile dengelenir.^[28]

Doğal kimyasal fermantasyon süreci, günümüzün yiycilerine nefis tatlar sağlamak ve insan bağırsağı üzerinde olumlu probiyotik etkiler getirmek için binlerce yıldır devam eden çok uzun bir süredir var. Son on yılda popülaritesi hızla artan probiyotiklerdeki temel bileşenlerden de fermantasyon sorumludur. Ulusal Sağlık Enstitüsü'ne göre, 2012 itibarıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 4 milyon yetişkin probiyotik denemiştir.

İnsan kaynaklı fermantasyon, deve, sığır, koyun ve keçilerden elde edilen sütün korunmasıyla MÖ 10.000 yılına kadar uzanır. Süt ürünleri, ideal iklim ve temel mikroflorası göz önüne alındığında doğal olarak fermente olur. Kuzey Afrika'nın kavurucu sıcaklıklarında süt kendiliğinden fermente oldu ve belgelenen ilk yoğurt bu şekilde yapıldı.

Fermente süt ürünleri, besin açısından çok zengindir ve bağırsak sağlığını artırır; ayran, yoğurt, kefir, ekşi krema ve peynir probiyotik açısından en zengin süt ürünleridir.

2004 yılında arkeologlar, MÖ 7.000 yılına kadar uzanan Neolitik Çin çömlekleri üzerinde kimyasal testler yaparak dünyanın en eski fermente içeceğini keşfettiler. Fermente pirinç, bal ve meyveden yapılan bu bira, İran'da bulunan en eski biracılık kanıtı için önceki rekordan yaklaşık 1500 yıl öncesine dayanıyor.

Eski Mısırlılar ilk önce mayayı ekmek mayalamak için hamur fermantasyonunda denediler. MÖ 3.500 ile 300 yılları arasında geliştirilen Mısır fermantasyon teknikleri bugün hala kullanılmaktadır.

Salatalık turşusu, MÖ 2000'de Dicle Vadisi'nde veya günümüz Irak'ında ortaya çıktı.

Çinliler tarafından MÖ 500 'de çibani için bir antibiyotik tedavisi olarak küflü soya fasulyesi kullanıldı.^[29]

Gıdaları muhafaza etmek için fermantasyonun kullanımını gösteren inanılmaz ve zengin antropolojik geçmişe rağmen fermantasyonun mikroorganizmalara özgü bir metabolik süreç olduğu yakın bir zaman kadar bilinmiyordu. Antonie van Leeuwenhoek ilk olarak 1665'te mikroorganizmaları tanımladı ve yaklaşık 200 yıl sonra Fransız bilim adamı Louis Pasteur'un kalan parçaları bir araya getirmesine zemin hazırladı. 1856'da Pasteur, fermantasyonun canlı hücreler gerektirdiğini ve mayanın bu süreçte kritik bir rol oynadığını keşfetti. Isı ile ilgili deneyleri daha sonra pastörizasyonun geliştirilmesinde kullanılacaktı.^[30]

1856'da Pasteur'ün kimya öğrencilerinden birinin babası, pancarı fermente ederek alkol yapma girişiminde karşılaştığı bazı sorunları çözmesine yardım etmesini istedi. O zamanlar fermantasyonun, şekerin alkole dönüştürüldüğü saf bir kimyasal süreç olduğuna inanılıyordu. Ancak 1857'de Pasteur, mikroskopik bir bitkinin sütün ekşimesine (laktik asit fermantasyonu) neden olduğunu kanıtladı. Pasteur, canlı hücrelerin, mayanın şekerden alkol oluşturmaktan sorumlu olduğunu ve bazı mikroorganizmaların fermantasyonları ekşi hale getirebileceğini

kanıtlayabildi. Daha sonra hem normal hem de anormal fermentasyonlardan sorumlu mikroorganizmaları tanımladı ve şarap, bira, süt veya sirkeyi ısıtmak suretiyle bazı canlı organizmaların öldürülebileceğini ve böylece maddelerin sterilize - veya "pastörize" edilebileceğini buldu.^[31]

1896 yılında da Eduard Buchner, mayalanmanın gerçekleşmesi için sadece canlı maya hücrelerinin bulunmasının yeterli olmadığını fark etmiştir. Hücreden gelen ve "Zymase" adı verdi bir ekstraktın da olması gerekmiştir. Bugün bu, enzim olarak adlandırılmaktadır. Enzimler günümüzde modern biyoteknolojinin en önemli yardımcı araçlarıdır. 1907 Nobel Kimya Ödülü, "biyokimyasal araştırmaları ve hücresiz fermentasyonu keşfi nedeniyle" Eduard Buchner'e verildi.^[32]

Kimyasal kinetik

Reaksiyon kinetiği olarak da bilinen **kimyasal kinetik**, kimyasal reaksiyonların hızlarını ve mekanizmalarını araştırmakla ilgilenen bir fiziksel kimya dalıdır. Bir sürecin gerçekleştiği yön ile ilgilenen ancak gerçekleşme hızları hakkında bir bilgi vermeyen termodinamik ile karıştırılmamalıdır. Kimyasal kinetik, deneysel koşulların kimyasal reaksiyonların hızı üzerine etkilerini, reaksiyon mekanizmaları ile geçiş hâllerinin verim bilgilerini ve kimyasal reaksiyonların karakteristiklerini tanımlayan matematiksel modellerin çıkarılmasını kapsayan bir bilim alanıdır.

Tarihçe

1864'te Peter Waage ve Cato Guldberg, kimyasal reaksiyon hızının reaksiyona giren maddelerin miktarıyla orantılı olduğunu belirten kütle etki yasasını formüle ederek kimyasal kinetiklerin geliştirilmesine öncülük ettiler.^{[1][2][3]}

Van 't Hoff kimyasal dinamik üzerine çalışmalar gerçekleştirmiş ve 1884'te ünlü "*Études de dynamique chimique*" (*Dinamik Kimya Alanında Çalışmalar*) adlı kitabını yayınlamıştır.^[4] 1901'de "kimyasal dinamik ve çözeltelerde ozmotik basınç kanunlarının keşfi ile sağladığı müstesna hizmetler karşılığında" ilk Nobel Kimya Ödülü'nü almıştır.^[5] Kimyasal kinetik, van 't Hoff'tan sonra hız denklemleri ve hız sabitlerinin türetildiği reaksiyon hızlarının deneysel olarak belirlenmesi ile ilgilenmiştir. Sıfır mertebeli reaksiyonlar (hızın derişime bağlı olarak *değişim göstermediği* reaksiyonlar), birinci dereceden reaksiyonlar ve ikinci dereceden reaksiyonlar için görece basit hız denklemleri mevcuttur. Diğer reaksiyonlar için de bu denklemler türetilir. Basit (elementer) reaksiyonlar kütle etki yasasına uyar ancak kademeli reaksiyonlar için çeşitli reaksiyon adımlarının hız denklemleri birleştirilmelidir ve bu oldukça karmaşık bir hâl alabilir. Ardışık reaksiyonlarda ise kimyasal

kinetiği hızı belirleyen basamak belirler. Birinci dereceden ardışık reaksiyonlar için yatışkın hâl yaklaşımı yapmak hız denklemini basitleştirebilir. Bir reaksiyon için gereken aktivasyon enerjisi Arrhenius ve Eyring denklemi üzerinden deneysel olarak belirlenir. Tepkimeye giren maddelerin fiziksel hâlleri ve derişimleri, reaksiyonda bir katalizör bulunup bulunmadığı ve reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık, reaksiyon hızını etkileyen başlıca unsurlardır.

Gorban ve Yablonsky, kimyasal dinamik tarihinin üç döneme ayrılabilceğini öne sürmüştür.^[6] İlki kimyasal reaksiyonların genel yasalarını araştıran ve kinetiği termodinamikle ilişkilendiren van 't Hoff akımıdır. İkincisi de özellikle zincirleme reaksiyonlar için tepkime mekanizmalarının önemine vurgu yapan Semyonov-Hinshelwood akımı olarak düşünülebilir. Üçüncüsü ise Aris'in kimyasal reaksiyon ağlarının ayrıntılı matematiksel açıklamaları ile ilişkilendirilir.

Reaksiyon hızını etkileyen unsurlar

Tepkimeye giren maddelerin doğası

Reaksiyon hızı tepkimeye giren madde (reaktan olarak da adlandırılır) çeşidine göre değişkenlik gösterir. Asit-baz tepkimeleri, tuz oluşumu ve iyon değişimi genelde hızlı gerçekleşen tepkimelerdir. Büyük moleküller oluştuğunda ve moleküller arasında kovalent bağ oluşumu gerçekleştiğinde, tepkimeler genelde yavaşlama eğilimi gösterir.

Tepkimeye giren moleküllerin doğası ve barındırdıkları bağların gücü, reaksiyon hızını önemli ölçüde etkiler.

Fiziksel hâl

Bir reaktanın fiziksel hâli de (katı, sıvı veya gaz) tepkime hızını etkileyen önemli bir unsurdur. Reaktanlar sulu çözeltilerde olduğu gibi aynı fazdayken termal hareket ile birbirlerine yaklaşırlar. Ancak farklı fazlarda bulunuyorlarsa, tepkime reaktanlar arası yüzeyde gerçekleşir. Reaksiyon sadece temas ettikleri bölge ile sınırlı kalır. Örneğin biri sıvı ve biri de gaz hâldeki iki maddenin tepkimeye girmesi durumunda, tepkime yalnızca sıvı yüzeyinde gerçekleşir. Tepkimenin tamamlanması için iyice çalkalamak ve karıştırmak gerekebilir. Bu durum, bir katı veya sıvı reaktan ne kadar iyi ayrılmışsa, birim hacme düşen yüzey alanının ve reaktanların birbiriyle temasının aynı oranda artacağı ve bu sayede reaksiyonun hızlanacağı anlamına gelir. Bir benzerlik kurmak adına şu örnek verilebilir: Ateş yakmak isteyen biri, büyük odun parçaları yerine çok daha ufak dallar ve çıra kullanarak başlayacaktır. Organik kimyada, su yüzeyi reaksiyonları, homojen reaksiyonların heterojen reaksiyonlardan (çözünen ve çözücünün uygun şekilde karışmadığı reaksiyonlar) daha hızlı gerçekleştiği kuralına bir istisnadır.

Yüzey alanı ve katı hâl

Katı bir maddede yalnızca yüzeyde bulunan partiküller reaksiyona girebilir. Bir katıyı daha küçük parçalara ayırmak, yüzeyde daha fazla partikül oluşmasını sağlayarak bu partiküller ile diğer reaktan partiküller arasındaki çarpışma sıklığını arttırmak suretiyle reaksiyonun çok daha hızlı gerçekleşmesine neden olacaktır. Örneğin toz hâldeki şerbet, ince toz hâlinde malik asit (oldukça zayıf bir asit çeşidi) ve sodyum bikarbonat karışımından meydana gelir. Ağızdaki tükürük ile temas ettiğinde, bu kimyasallar hızla çözülür ve reaksiyona girerler. Reaksiyondan ortaya çıkan karbondioksit gazlı içeceklerin verdiği hissi sağlar. Ayrıca havai fişek üreticileri, havai fişeklerdeki yakıtın oksitlenme (yanma) hızını kontrol etmek için katı reaktanların yüzey alanını değiştirir ve bunu çeşitli efektler oluşturmak için kullanırlar. Örneğin, bir havai fişekin içinde bulunan küçük parçalara bölünmüş alüminyum şiddetli bir şekilde patlar. Daha büyük alüminyum parçaları kullanılırsa, reaksiyon yavaşlar ve yanan metal parçaları çıkarıldıkça kıvılcımlar görülür.

Derişim (konsantrasyon)

Ana madde: Reaksiyon hız denklemi

Reaksiyonlar tepkimeye giren madde türlerinin çarpışması ile gerçekleşir. Molekül veya iyonların çarpışma sıklığı derişimlerine bağlıdır. Moleküller ne kadar çoksa, birbirlerine çarpıp tepkimeye girme olasılığı da o kadar fazla olur. Dolayısıyla, reaktanların derişimindeki bir artış genellikle reaksiyon hızında artışa neden olurken, derişimdeki bir azalmanın genellikle tam tersine yavaşlatıcı bir etkisi olacaktır. Örneğin yanma tepkimesi saf oksijen bulunan bir ortamda havaya göre (havanın yaklaşık %21'i oksijendir) daha hızlı gerçekleşir. Hız denklemi, reaksiyon hızının mevcut reaktanların ve diğer türlerin derişimleriyle ilişkisini detaylı olarak gösterir. Matematiksel biçimler reaksiyon mekanizmasına bağlıdır. Belli bir reaksiyon için gerçek hız denklemi deneysel olarak belirlenir ve reaksiyon mekanizması hakkında bilgi verir. Hız denkleminin matematiksel ifadesi şu şekilde gösterilir:

Burada reaksiyon hız sabiti, reaktanının molar derişimi ve ise geçerli reaktanın kısmi reaksiyon sırasıdır. Bir reaktanın kısmi hızı stokiyometrik katsayısı ile genel olarak belirlenemez, sadece deneysel olarak belirlenebilir.

Sıcaklık

Ana madde: Arrhenius eşitliği

Sıcaklığın gerçekleşen tepkime üzerine genellikle büyük bir etkisi vardır. Yüksek sıcaklıkta bulunan moleküllerin termal enerjisi daha fazladır. Her ne kadar yüksek sıcaklıklarda çarpışma sıklığı daha fazla olsa da, bu durum reaksiyon hızındaki artışa esasında oldukça

küçük bir katkıda bulunmaktadır. Bu konuda daha önem arz eden durum, reaksiyona girmek için yeterli enerjiye sahip (enerji büyüktür aktivasyon enerjisi: $E > E_a$) reaktan moleküllerin oranının önemli ölçüde daha yüksek olması ve moleküler enerjilerin Maxwell-Boltzmann dağılımı ile ayrıntılı olarak açıklanabilmesidir.

Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi genellikle formülü ile gösterilen Arrhenius eşitliğine uymaktadır. Burada ön üstel faktör veya A-faktörü, aktivasyon enerjisi, molar gaz sabiti ve mutlak sıcaklıktır.^[7]

Belli bir sıcaklıkta kimyasal reaksiyon hızı A-faktörü, aktivasyon enerjisinin büyüklüğü ve reaktanların derişimine bağlıdır. Hızlı gerçekleşen reaksiyonlar genellikle düşük aktivasyon enerjisine sahiptirler.

Hızlı reaksiyonların kinetiği sıcaklık fırlayış yöntemi ile araştırılabilir. Bu metotta sıcaklıkta keskin bir artış kullanılarak dengeye geri dönüş için geçen gevşeme süresi gözlemlenir. Bilhassa kullanışlı sıcaklık fırlayış cihazlarından biri de şok tüpüdür. Şok tüpleri bir gazın sıcaklığını 1000 dereceden yüksek sıcaklıklara hızla çıkarabilir.

Katalizörler



Bir katalizörün varsayımsal bir endotermik kimyasal reaksiyon üzerine etkisini gösteren grafik. Katalizör varlığında daha düşük bir aktivasyon enerjisine sahip bir reaksiyon yolu açılır (kırmızı ile gösterilmiştir). Reaksiyon gerçekleştiğinde toplam sonuç ve entalpi farkı değişmez.

Katalizör bir reaksiyonun hızını değiştiren fakat sonrasında kimyasal olarak değişmeden kalan maddedir. Katalizörler reaksiyon hızını daha düşük bir aktivasyon enerjisine sahip yeni bir reaksiyon mekanizması oluşturarak arttırmırlar. Otokatalizde oluşan reaksiyon ürünü, söz konusu reaksiyon için pozitif geri beslemeye yol açan bir katalizör işlevi görür. Biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör işlevi gören proteinlere enzim adı verilir. Enzim yoluyla gerçekleşen

reaksiyonların hızı Michaelis-Menten kinetiği ile açıklanır. Katalizörler ileri ve geri yöndeki reaksiyonları eşit olarak hızlandırdığından kimyasal dengenin konumunu etkilemezler.

Bazı organik moleküllerde yer değiştiren özel gruplar, komşu grup etkisindeki reaksiyon hızını etkileyebilir.

Basınç

Gaz hâlde gerçekleşen bir reaksiyonda basıncı artırmak reaktanların birbirleriyle çarpışma oranını artırarak reaksiyon hızının artmasına neden olacaktır. Bunun sebebi bir gazın aktivitesinin kısmi basıncıyla doğru orantılı olmasıdır. Bu durum reaksiyon üzerine bir çözeltilinin derişiminin artırılmasına benzer bir etki gösterir.

Bu basit kütle etki yasası tesirine ek olarak hız katsayıları da basınç ile değişim gösterebilirler. Gaz karışımına bir inert (tepkimeye girmeyen) gaz eklenirse, hız katsayıları ve yüksek sıcaklıkta gerçekleşen gaz fazdaki birçok reaksiyonun ürünleri değişir. Bu etki üzerindeki değişimlere **kimyasal aktivasyon** adı verilir. Ekzotermik veya endotermik reaksiyonların ısı aktarımından daha hızlı gerçekleşerek tepkimeye giren moleküllerin termal olmayan enerji dağılımlarına (Boltzmann dağılımına aykırı dağılım) sahip olmasına neden olduğundan dolayı bu olay gerçekleşir. Basıncı arttırmak, reaksiyona giren moleküllerin ve sistemin geri kalanının ısı aktarım hızını arttırarak söz konusu etkinin azalmasını sağlar.

Yoğun fazların da hız katsayıları basınçtan etkilenebilir ancak iyon ve moleküller bu fazda pek sıkıştırılabilir olmadığından ölçülebilir bir etki gözlemleyebilmek için görece yüksek basınçlar uygulamak gerekir. Bu etki sıklıkla hücre tabanlı elmaslar kullanılarak araştırılır.

Bir reaksiyonun kinetiği basınç fırlayış yaklaşımıyla da anlaşılabilir. Bu yöntem ile basınçta hızlı değişiklikler yapıldıktan sonra kimyasal dengeye geri dönüşün gevşeme süresi ölçülür.

Işık emilimi (absorpsiyonu)

Bir kimyasal reaksiyon için gereken aktivasyon enerjisi, tepkimeye giren bir molekülün uygun dalga boyundaki ışığı absorplayarak uyarılmış duruma geçmesiyle sağlanabilir. Işık enerjisi tarafından başlatılan reaksiyonlar fotokimyanın konusudur. Bu reaksiyonların başlıca örneklerinden biri fotosentezdir.

DeneySEL yöntemler



Spinco Division Model 260 Reaksiyon Kinetiği Sistemi, moleküler reaksiyonların hız sabitlerini yüksek hassasiyetle ölçer.

Reaksiyon hızlarının deneysel olarak belirlenmesi, reaktan veya ürün konsantrasyonlarının zamanla değişiminin ölçülmesi yoluyla gerçekleştirilir. Örnek olarak, bir reaktanın konsantrasyonu spektrofotometre cihazı ile sistemdeki başka hiçbir reaktan veya ürünün absorbe etmediği bir dalga boyundaki ışık yardımıyla ölçülebilir.

En az birkaç dakika süren reaksiyonlar için reaktanlar istenilen sıcaklıkta karıştırıldıktan sonra gözlem yapmaya başlamak mümkündür.

Hızlı reaksiyonlar

Daha hızlı reaksiyonlar için reaktanların karıştırılması ve belirli bir sıcaklığa getirilmesi için gereken süre, reaksiyonun yarı ömrüne benzer veya daha uzun olabilir.^[8] Hızlı reaksiyonları başlatmak için yavaş karıştırma adımı olmayan özel yöntemler şunlardır:

- Durgulu akım yöntemleri karıştırma süresini bir milisaniyeye kadar düşürebilir.^{[8][9][10]} Ancak durgulu akım yöntemlerinin bazı kısıtlamaları vardır. Gazları veya çözeltileri karıştırmak için geçen sürenin durgulu akım yönteminde dikkate alınması gerekir. Yarılanma ömrü saniyenin yüzde birinin altındaysa bu yöntem uygun değildir.
- Önceden karıştırılmış ve başlangıçta dengede olan sistemlerin, sıcaklık fırlayışı ve basınç fırlayışı gibi kimyasal gevşeme yöntemlerinde hızlı ısıtma veya basınçsızlaştırma ile pertürbe edilerek kimyasal dengeden çıkması sağlanır. Dengeden uzaklaşan sistemin tekrar dengeye dönüşünün süresi ölçülür.^{[8][11][12][13]} Örneğin bu yöntem normal koşullar

altında 1 μ s veya daha düşük bir yarılanma ömrüne sahip (sırasıyla hidronyum ve hidroksit iyonları) nötralleşmesini incelemek için kullanılır.^{[8][13]}

- Parlamalı fotolizde bir lazer atımı ile serbest radikaller gibi yüksek derecelerde uyarılmış kimyasal türler üretilir. Sonrasında bu türlerin reaksiyonları üzerinde çalışmalar gerçekleştirilir.^{[10][14][15][16]}

Kimyasal denge

Kimyasal kinetik bir kimyasal reaksiyonun hızı ile ilgilenirken, termodinamik bir reaksiyonun hangi ölçüde gerçekleşeceğini belirler. Tersinir bir reaksiyonda, ileri ve geri tepkime hızları birbirine eşit olduğu (dinamik denge prensibi) ve reaktanlar ile ürünlerin derişimleri değişim göstermediği anda kimyasal dengeye ulaşılır. Bu durum örnek olarak azot ve hidrojenenden amonyak üretilen Haber-Bosch sürecinde gözlemlenebilir. Belousov–Zhabotinsky reaksiyonu gibi salınım reaksiyonları, tepkimede kimyasal dengeye ulaşılmadan önce bileşen derişimlerinin uzun bir süre boyu salınım yapabileceğini göstermektedir.

Serbest enerji

Genel olarak incelendiğinde, serbest enerji değişimi (ΔG) kimyasal bir değişimin gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini belirlerken, kimyasal kinetik bir reaksiyonun hangi hızda gerçekleşeceğini izah eder. Bir reaksiyon oldukça ekzotermik olsa ve büyük bir entropi değişimi gösterse dahi eğer çok yavaşsa pratikte gerçekleşmez. Bir reaktandan iki ürün elde edilirken eğer tepkime kinetik reaksiyon kontrolü gibi özel koşullarda tutulmuyorsa bu iki üründen termodinamik olarak en kararlı ürün oluşur. Her biri farklı bir ürün oluşturan, karşılıklı olarak hızla dönüşen iki reaktan için ürün oranının belirlenmesinde ise Curtin–Hammett prensibi uygulanır. Serbest enerji ilişkilerinden yola çıkılarak bir tepkimenin reaksiyon hız sabitleri hakkında tahminlerde bulunmak mümkündür.

Reaktanlardan birine ait bir atomun, izotopu ile yer değiştirildiği zaman reaksiyon hızında oluşan farka kinetik izotop etkisi adı verilir.

Kimyasal kinetik, kimya mühendisliğinde reaktörlerde kalma süresi ve ısı transferi hesabı, polimer kimyasında da molar kütle dağılımı hakkında bilgi sağlar. Korozyon mühendisliğine de çeşitli bilgiler sağlamaktadır.

Modeller ve uygulamalar

Reaksiyon kinetiğini tanımlayan matematiksel modeller, kimyagerlere ve kimya mühendislerine gıda bozulması, biyolojik sistemlerin kimyası, mikroorganizmaların üremesi ve stratosferik ozon bozulması gibi kimyasal süreçleri daha iyi anlamak ve tanımlamak için araçlar sağlamaktadır. Bu modeller aynı zamanda kimyasal reaktörlerin ürün verimini optimize etmek, ürünlerini daha verimli bir şekilde ayırmak ve çevreye zararlı yan ürünlerini ortadan kaldırmak için gerekli tasarım ve değiştirmelerde kullanılabilir. Örneğin, kinetik modeller ağır hidrokarbonların benzine ve gaza katalitik olarak

parçalanması işleminde, ağır hidrokarbonlardan benzinin en yüksek verimle üretileceği sıcaklığı ve basıncı bulmak için kullanılabilir.

Kimyasal kinetik, eğri uydurma yönteminin ve adi diferansiyel denklem çözümlerinin (ODE çözümü) bir fonksiyonu halindeki özel paketleri modelleme yoluyla sık sık araştırılır ve doğrulanır.^[17]

Mikrobiyal Üreme ve Kontrolü

Bakteriyal Hücre Bölünmesi

İkiye bölünerek çoğalma (binary fission)

Mikrobiyolojide üreme hücrelerin sayısındaki artış olarak tanımlanmaktadır. Eschericia coli gibi çubuk şeklindeki bir bakterinin üremekte olan kültüründe hücreler kendi orijinal uzunluklarının yaklaşık iki katına çıkana kadar uzarlar ve daha sonra hücreyi iki kardeş hücreye ayıracak olan bölmeyi oluştururlar. Bu işlem ikiye bölünme (binary fission) olarak adlandırılır. Bir septum oluşumu ile bölme gerçekleşir. Bir hücre nihayetinde iki hücre oluşturmak için bölündüğünde bir generasyon meydana geldi denir. Bölünme için gerekli zamana da generasyon zamanı adı verilir.

Bir generasyon sırasında hücresel bileşenlerin tümü doğrusal olarak artar ve hücrelerin dengeli büyüme durumunda olduğu ifade edilir. Her bir karde hücre bağımsız hücre seklinde var olabilmek için kromozom ile ribozomlar, diğer bütün makromoleküler kompleksler, monomerler ve inorganik iyonlardan yeterli miktarda kopyalar almaktadır. Replike olmuş DNA molekülünün iki kardeş hücre arasında paylaşılması bölünme sırasında membrana bağlı halde kalmış DNA'ya bağlıdır ve daralma kromozomların her bir kardeş hücreye bir tane gelecek şekilde ayrılmasına neden olur. Bakterilerde generasyonun ortaya çıkması için gereken zaman oldukça değişkendir ve hem beslenme, hem genetik faktörler hemde sıcaklığa bağlıdır.

Fts proteinleri ve Hücre Bölünmesi

Bütün bakterialarda mevcut olan bir dizi protein hücre bölünmesi için gereklidir. Bu proeinler FTS proteinleri olarak adlandırılır ve en temeli olan FtsZ ikiye bölünerek çoğalma işlevinde önemli bir rol oynar.

Divizom

Fts proteinleri hücrede birbiri ile etkileşime girerek divizom olarak adlandırılan bölünme aparatını oluştururlar. Çubuk şeklindeki hücrelerde divizom oluşumu FtsZ

moleküllerinin tam hücrenin merkezin etrafındaki halkaya bağlanması ile başlar; bu halka hücre bölünme düzlemini oluşturacaktır.

E.coli hücrelerinde yaklaşık 10000 FtsZ molekülü halka oluşturacak şekilde polimerize olur ve daha sonra bu halka FtsA ve ZipA dahil olmak üzere düşer hücre bölünme proteinlerini çeker. Zip A, FtsZ halkasını sitoplazmik membrana bağlayan ve onu stabilize eden bir çapadır.

Divizom FtsI gibi peptidoglikan sentezinde gerekli olan FTS proteinlerini de içerir.

Divizom, hücrenin uzunluğu orijinal boyunun iki misline çıkana kadar çubuk şeklindeki bir hücrenin merkezinde divizom septum olarak adlandırılan sitoplazmik membran ve hücre duvar materyal sentezini düzenler. Uzayan hücre daha sonra bölünerek iki kardeş hücre meydana getirir.

DNA replikasyonu, Min Proteinleri ve Hücre Bölünmesi

FtsZ halkası oluşmada önce DNA replike olur, çünkü halka duplike olmuş nükleoidler arasındaki boşlukta ortaya çıkar.

MinC, MinD ve MinE proteinleri FtsZ'nin hücrenin tam ortasına yerleşmesine yardımcı olmak için birbirleri ile etkileşime girerler.

MinD sitoplazmik membranın iç yüzeyinde sarmal bir yapı oluşturur. Bu protein yapıları hücre DNA'sı eşleştikten ve yeterli uzunluğa ulaştıktan sonra FtsZ proteinin (halkasının) replike olmuş DNA'nın tam ortasına bağlanmasına yardımcı olur.

Hücre uzaması devam ederken ve septum oluşumu başlarken, kromozomun iki kopyası birbirinden uzaklaşır, her biri kendi kardeş hücreğine geçer.

Hızlı-üreyen hücrelerde Genom replikasyonu

E.coli ve diğer bir çok prokaryot kromozomun halkasal yapısı DNA replikasyonunu hızlandırmak için bir fırsat yaratır. Bunun sebebi halkasal genomlarda replikasyonun replikasyon orijininden çift yönlü (bidirectional) olmasıdır. Çift yönlü replikasyon esansında sentez bir kalıp zincir üzerinden meydana gelir ve bu DNA'nın mümkün olduğunca çabuk bir biçimde replike olmasına izin verir.

Yapılan çalışmalarda *E.coli*'deki genom replikasyonu gerekli zamanı minimum 40 dakika olarak bulunmuştur. Ancak *e.coli* 20 dakikada bir bölünebildiğine göre bu sorunun üstesinden nasıl gelmiştir?

Bu sorunun çözümü 40 dakikadan daha kısa bir ikilenme zamanında üreyen *E.coli* hücrelerinin birden fazla DNA replikasyon çatalı içermesidir. Yani DNA replikasyonun son turu tamamlanmadan önce DNA replikasyonunun yeni turu başlar ve dolayısıyla bazı genler birden fazla kopya halinde bulunur. Bu durum genomu replike etmek için gerekli olan

zamandan daha kısa generasyon zamanlarında her bir kardeş hücrenin septum oluşum zamanında genoma ait bir kopyalama almasını sağlar.

MreB ve Hücre Morfolojisi

Hücre şekli ve MreB

Bacteria’da en temel şekil belirleyen faktör MreB olarak adlandırılan bir proteindir. MreB bacterialarda basit bir hücre iskeleti oluşturur. MreB sitoplazmik membranın hemen altında hücrenin iç çevresinde ipliklerden bir sarmal oluşturur. MreB hücre iskeleti, hücre duvarı büyümesinde görev yapan diğer proteinleri bir kalıp içerisinde toplayarak hücre şeklini belirler. Çubuk şeklindeki bakterilerde MreB kodlayan genin in aktivasyonu hücrelerin kok şeklini almasına sebep olur.

Popülasyon Üremesi

Mikrobiyal Üremenin Kantitatif Yönleri

Hücre bölünmesi sırasında, tek bir hücreden iki hücre meydana gelir. Bunun gerçekleşmesi için gereken süre boyunca (generasyon zamanı) hem toplam hücre sayısı hemde kütle iki katına çıkar.

Üreme Döngüsü

Çeşitli nedenlerden dolayı kapalı kaplıta üretilen mikroorganizmalarda belli bir seviyeye kadar popülasyon artışı gözlenir. Daha sonra besin tükendikten sonra popülasyon çöküş aşamasına geçer.

Bu yüzden popülasyon için tipik bir üreme eğrisi elde edilir. Üreme eğrisi; Lag fazı, üssel üreme, durgun faz ve ölüm fazını içeren üreme döngüsünün tümünü ifade eder.

Lag Fazı

Mikrobiyal kültür taze bir besi yerine inokule edildiğinde ürem lag fazı denilen bir sürecin ardından başlar. Bakteriler besi yerinde çoğalmaya başlamadan önce çeşitli zorunlu bileşenleri sentezlemek zorundadır bunun içinde belirli bir zaman geçmelidir. Bu zaman lag fazı olarak adlandırılır.

Üssel Üreme Fazı

Üssel üreme sırasında mevcut kaynaklar ve diğer faktörlere bağlı olarak hücre popülasyonu düzenli aralıklarla iki katına çıkar. Üssel olarak üreyen hücrelerin üremenin üssel fazında olduğu söylenir.

Üssel üreme oranları büyük ölçüde farklılık gösterir. Üssel üreme hızı hem çevresel koşullardan (sıcaklık, besi yerinin bileşimi) hem de genetik özelliklerden etkilenir.

Durgun ve Ölüm Fazları

Kültür ortamındaki temel besinlerin tükenmesi veya üremiş olan mikroorganizmaların metabolik atıkları sonucu büyüme sınırlanır ve bir süre sonra durur. Bu sebeplerden logaritmik üreme sona erdiğinde popülasyon durgun faza girer.

Durgun fazda hücre sayısında net bir artış yada azalış yoktur ve dolayısıyla popülasyonun üreme hızı sıfırdır.

Bazı hücreler durgun fazda bölünebilirler ancak meydana gelen hücre sayısında net bir artış yoktur. Bunun nedeni popülasyondaki bazı hücrelerin çoğalmasına rağmen diğerlerinin ölmesidir. Bu iki işlem birbirini dengelemektedir (Kriptik üreme)

Bununla birlikte er yada gec popülasyon logaritmik bir fonksiyon olarak meydana gelen üreme döngüsü ölüm fazına girecektir. Genelde hücre ölüm hızı üreme hızından çok daha yavaştır ve canlı hücreler popülasyonda günlerce hatta aylarca kalabilir.

Reaksiyon Kinetiği

Reaksiyon kinetiği eczacılıkta, ilaç stabilitesinin izlenmesi, katı ilaç şekillerinin çözünme profillerinin oluşturulması ve etkin maddenin vücuda alınmasını takiben emilim, dağılım atılım ve metabolizmasının incelenmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca radyoaktif maddelerin bozunması belli bir kinetikte gerçekleşir. Karıştırma, kurutma ve sterilasyon gibi temel işlemlerde de kinetik prensipler uygulanmaktadır. Bir reaksiyon içinde geçen aşamaları, bu aşamaların oluş hızı ve hız üzerine reaksiyona giren maddelerin (reaktanların) ve reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin derişimlerinin (konsantrasyonlarının) ve ayrıca reaksiyona etki eden diğer etkenlerin (ısı, ışık, pH, vb) etkisi reaksiyon kinetiğiyle açıklanır.

Reaksiyon hızı: Her reaksiyonun bir hızı vardır. Bir kimyasal reaksiyonda, reaksiyonun zamanla ilerleyişinin ölçüsü, o reaksiyonun hızıdır. Hız eşitliği, reaksiyon hızının matematiksel bir ifadesidir. Birim zamanda, reaksiyona giren maddelerden veya reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerden birinin derişiminde görülen değişikliğe o reaksiyonun hızı denir. Reaksiyon hızı ölçülürken reaksiyona giren ve çıkan maddelerden, derişimindeki değişikliğin en kolay izlenebilenlerinden biri seçilir. Bir kimyasal reaksiyonun hızı, reaksiyona giren maddelerin veya reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin molar derişimi ile orantılıdır. Kimyasal bir reaksiyonda atomlar birbiriyle çarpışarak bir veya birden fazla ürün oluşturmaktadır.

Reaksiyon derecesi: Bir reaksiyonun derecesi üslerin toplamına eşittir. Reaksiyon derecesi çarpışan molekül sayısını gösterir. Üsler deneysel olarak kinetik çalışmalar sonucu belirlenir.

Sıfır-derece Reaksiyonlar

Sıfır derece reaksiyonlarda reaksiyon hızı reaksiyona giren maddelerin derişimlerinden bağımsızdır, yani reaktanın sıfırına kuvvetiyle orantılıdır. Bu tip reaksiyonlar genellikle katalizörler üzerinden yürür. Reaksiyonda sınırlayıcı faktör, derişimden daha farklı olup, örneğin çözünürlük veya bazı fotokimyasal reaksiyonlarda ışığın soğurulması olabilir. Çözünürlüğün sınırlayıcı faktör olduğı durum düşünöldüğünde, süspansiyon şeklindeki bir preparatta, sadece çözünen miktarda madde reaksiyona girerek bozunur.

İkinci derece Reaksiyonlar

İkinci derece reaksiyonlarda reaksiyon hızı, reaksiyona giren iki aynı veya farklı molekülün derişimine bağılıdır.

Karmaşık Reaksiyonlar

Pek çok reaksiyon basit sıfır, birinci, ikinci ve üçüncü derece reaksiyon eşitlikleriyle tanımlanamaz. Kompleks reaksiyonlar birden fazla basamak veya reaksiyon içerirler. Bu tip reaksiyonlar, geri-dönüşümlü, paralel ve ardışık reaksiyonlardır.

Reaksiyonun toplam hızını, hız saptayan adım adı verilen en yavaş basamağın hızı kontrol etmektedir.

Geri-dönüşümlü (tersinir-reversibl) Reaksiyonlar

Geri dönüşümlü reaksiyonlar bir denge konumuna ulaşılana dek yürür. En basit geri-dönüşümlü reaksiyonlar, her iki reaksiyonun da birinci derece olduğı reaksiyonlardır.

Paralel (yarışmalı) Reaksiyonlar

Bu tür reaksiyonlarda aynı anda iki veya daha fazla reaksiyon ürünü oluşur. Paralel reaksiyonlar genellikle organik yapıdaki ilaçların bozunma reaksiyonlarında görülür.

Peş peşe (Seri veya ardışık) Reaksiyonlar

Peş peşe reaksiyonlar genellikle radyoaktif bileşiklerde ve farmakokinetikte görülür. Bu reaksiyonların en basit şekli her basamağın birinci-derece olduğı reaksiyonlardır.

KÜLTÜR ÇEŞİTLERİ ÜRETİMİ VE FAJ PROBLEMLERİ

Tek Hücreli Kültürler; Bir suju içerir. Örneğin; *Lactococcus lactis* spp *lactis* kültür örnek verilebilir.

Biyokimyasal olarak kuvvetli bir etkiye sahip olan bu bakteri fermentasyon düzensizliklerine de neden olabilmektedir.

Çok hücreli kültürler; Daha fazla aynı türün alt türlerini içerirler. Örneğin; derişik *Lactococcus lactis* spp *cremoris* bunlar mikrobiyolojik olarak çok spatildirler. Genetik olarak uyum yeteneğı gösterirler.

Karışık kültürler; Çeşitli bakteri cins ve suşlarını bir arada bulunduran kültürlerdir. Örneğin;

Streptococcus thermophilus –Yoğurt

Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus –Yoğurt

Streptococcus thermophilus –Emmental kültür

Lactobacillus helveticus–Emmental kültür

Lactococcus lactis spp. lactis –Tereyağı, yayık altı kültürü

Lactococcus lactis spp. lactis var. diacetylactis –Tereyağı, yayık altı kültürü

Lactococcus lactis spp. cremoris –Tereyağı, yayık altı kültürü

Leuconostoc mesenteroides ssp. Cremoris

Kültür çoğaltma aşamaları; Bakteri kültürlerinin optimum bir verimliliğini elde edebilmek için her bakteri suşuna ait gelişme kurvesinin iyi bilinmesi gerekir.

Bunların başında pratik olarak hızlı bir asitlendirme gelmektedir. Bakteri iyi bir asitlik gelişi gösterebilmektedir. Uzun bir gelişim fazında önemli bir risk yabancı kökenli bir bakterinin veya suşun kontaminasyonudur. Bu nedenle kültürlerin kültür hazırlanmasında gelişim fazlarının (Başlangıç-geçiş-isyoner(durağan)) bilinmesi ve hedef noktadan sonra stabilizeye geçmesi gerekir.

ÇOĞALTMANIN AŞAMALARI

- 1. Kök Kültür;** Genelde 8-10 gün arasında bir süreçte bu saf hücre özel laboratuvarlarda elde edilmekte ve daha sonraki aşamalar için kök olmaktadır.
- 2. Ana Kültür;** Bu işletme laboratuvarlarında 100-150ml miktarında üretilmekte haftalık 1-3 kez kullanılmakta sonra ki ara kültür üretiminde enjekte edilmektedir. Ancak uygun koşullarda (derin dondurucu da) muhafaza edilmektedir.
- 3. Ara Kültür;** Laboratuvarlarda üretilen 1-30lt arasındaki miktarlarda üretilir ve sonra ki işletme kültüründe enjekte edilir.
- 4. İşletme Kültür;**(Proses Kültürü, Bulk Kültürü) Doğrudan doğruya yoğurt sütü,peynir sütü vb. materyallere inoküle edilir.Kontaminasyondan kaçınmak için mutlaka separe edilmiş (kültür odalarında) işletme kültürlerinin üretilmesi gerekir.

STARTER KÜLTÜRLERİN TİCARİ FORMLARI

1. **Sıvı Kùltürler;** Konsantre edilmiş veya edilmemişlerdir. Nakil ve depolama sırasında sıcaklık etkileri karşısında oldukça hassastırlar. Bu nedenle hızlı bir biçimde nakil edilmeleri gerekmektedir.
2. **Dondurarak Kurutulmuş Kùltürler;** Belirlenmiş bakteri kùltürlerinin hızlı bir şekilde donması ve ardından -30°C de vakumda süblimasyon kurutma (liyofilizasyon) denir.Bu toz halindeki kùltürün gelişme fazları sıvı kùltürler karşılaştırıldığında biraz gecikebilmektedir.Yine tek tek ve duyarlı suşlar daha az aktivite gösterebilmektedirler.
3. **Konsantre ve Derin Dondurulmuş Kùltürler;** Konsantre ve derin dondurulmuş kùltür prepatların üretiminde mikroorganizmaların aktivite kayıplarının kaçınılması gerekir. Çok hızlı donmanın koşulu sıvı azot gazı (-196°C altında bekletilmelidir.) Soğuk şoklama karşısında koruyucu ortam olarak şekerler, pekton, gliserin vb uygun olmaktadır. Azot gazı altında dondurulmuş Starter kùltürler sınırsız şekilde dayanıklılık gösterebilmektedir.0°C altındaki sıcaklıklarda muhafaza edildiğinde Starter kùltürün dayanıklılığı kùltür tipiyle ilgili olabildiği gibi en düşük sıcaklık -35°C’de olabilmeli ve en yüksek depolama süresi bu sıcaklıkta 4 haftayı geçmemelidir.

Besi Ortamı; Starter kùltür üretiminde süt teknolojisinde çoğunlukla yağsız süttten yararlanılır. Ancak bu süttün kesinlikle inhibitör maddeler içermemelidir. Bunun için test edilmelidir. Pastörize yağsız süt iyice yıkanmış ve steril hale getirilmiş aparatlarla 95-98°C’de (15-30 dk) ısıtılmalıdır.Ardından bakterinin inkübasyon sıcaklığına soğutulmalı bakteri enjekte edilmeli inkübe edilmeli ve inkübasyon sonunda optimum pH değerine soğutulmalıdır.

Ana,ara,işletme kùltürlerinin üretiminde Starter kùltür firmaları kùltürlere özgü özel besi ortamları geliştirmişlerdir.Bu besi ortamları genellikle inhibitör madde içermeyen yağsız süt tozu, tatlı peyniraltı suyu tozu, laktoz tozundan meydana gelebilir. Bunun dışında bu besi ortamları bilinen büyüme aktivatörlerini aminoasitler, pankreas ekstratları, dekstrin, ekstoza, vitaminler, farklı iz elementler gibi aktivatörleri içermektedir. Bu besi ortamları işletme kùltürünün asitlenebilirlik yeteneğini sağlayabilmelidir. Bunun yanında besi ortamında aşırı asitlendirmeyi engellemek için buffer madde olarak tuz bileşiklerini de içermektedir. İyi bir asitlenme yoğunluğu bakteri aktivitesi elde edilmesinde katkıda bulunur. Fosfatların özel karışımının besi ortamına ilave edilmesiyle bakteri fajlardan da korunabilirler.

Simbiyotik kültürler

Bu tip kültürlerde nötralizmus (karşılıklı etkilenmeden birlikte yaşayabilen), antogonismus (yaşam şeklinde değişim etkisi olmadan bir arada bulunan), bunların yanında mikroorganizmalar simbiyo olarakta bulunabilmektedir. Bu tek yönlü veya karşılıklı taleplerin olabildiği ortak bir yaşamdır. Örneğin, yoğurt kültüründe olduğu gibi her iki yoğurt bakterisi sorunsuz ve sırası ile bir arada fermentasyonu gerçekleştirirler. Bu fermentasyonda *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* için gerekli olan valin aminoasidini fermentasyon sırasında üretmektedir. Valin, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* için uygun, karınca asidi ve diğer metabolizma ürünlerini üretir.

Çeşitli starter kültürlerde faj problemleri

Tek bakteri içeren (suştan oluşan) starter kültürler, faj karşısında oldukça hassastırlar. Böyle bir durumda homolog kültür kullanımı yerine ardışık zamanlarda aynı suşu içeren ancak farklı starter kültürlerin sırasıyla kullanılması gerekir.

Bakteriyofajların engellenmesinde alınacak önlemler;

- İki veya daha fazla suş içeren starter kültürlerin seçimi
- Rotasyon şeklinde aynı suşları içeren starter kültürlerin farklı çeşitlere göre girmesi
- Steril çalışmak ve dezenfeksiyon önlemlerinin alınması
- Yüksek sıcaklıklarda uygun tutma sürelerine mevcut fajların inaktivasyonu. Örneğin, 92°C'de 10dk kültür sütünün pastörizasyonu faj inaktivasyonunu sağlayabilmektedir. Çünkü bakteriyofajların sıcaklığa dayanıklılığı oldukça yüksektir. Klasik 73°C 10sn pastörizasyon yöntemi bakteriyofaj için yeterli olmayabilir. Sütte bulunan streptokok bakteriyofajların inaktivasyonu için daha yüksek sıcaklığa çıkılması gerekir. Genellikle süt mikrobiyolojisindeki fajların çoğalabilmeleri 8-46°C ve 6,8-7,4 pH koşulları gerekmektedir.

Süt ürünlerindeki starter kültürler

Süt ürünlerinin üretiminde yüksek miktarda kullanılan mikroorganizmalar bakteriler, mayalar ve küf mantarlarıdır. Bunlar saf veya karışık kültür olarak kullanılırlar.

Süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmalar;

1. Fermente süt  r nleri

Lactococcus lactis spp. cremoris,
Lactococcus lactis spp. lactis,
Lactococcus lactis spp. lactis var diacetylactis,
Leuconostoc mesenteroides spp. cremoris,
Leuconostoc mesenteroides spp. dextranicum,
Streptococcus thermophilus,
Lactobacillus acidophilus,
Bifidobacterium bifidum

2. Yoğurt:

Streptococcus thermophilus,
Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus,
Lactobacillus helveticus

3. Kefir:

Lactococcus lactis spp. cremoris,
Lactococcus lactis spp. lactis,
Lactococcus lactis spp. lactis var diacetylactis,
Leuconostoc mesenteroides spp. dextranicum,
Leuconostoc paramesenteroides,
Leuconostoc mesenteroides spp. cremoris,
Lactobacillus kefir,
Lactobacillus acidophilus,
Kluyveromyces marxianus var. lactis (synonym: Candida kefir,
Saccharomyces unisporus

4. Peynir:

Lactobacillus helveticus,
Lactobacillus delbrueckii spp. lactis,

Lactobacillus delbrueckii spp. *bulgaricus*,
Lactobacillus casei spp. *casei*,
Brevibacterium linens,
Geotrichum candidum,
Propionibacterium petersonii,
Penicillium roqueforti,
Penicillium caseicolum (synonym: *P. Candidum*)

Saf kültürlerin temel işlevleri

Saf kültürlerde yer alan mikroorganizmalar faaliyetleri sırasında çıkardıkları enzimler sütün bileşiminde bulunan bazı maddeleri değişikliğe uğratarak yeni maddeler oluşturur. Mamle işlenen sütte veya mamlde oluşan bu değişikler ürünün karakteristik özelliklerini meydana getirir.

Kültürlerin temel işlevleri şu şekilde işlenebilir;

1) Laktik Asit (süt asidi) retimi

Süt endüstrisinde kullanılan saf kültür mikroorganizmaların büyük çoğunluğunu süt asidi bakterileri oluşturur. Hemen hemen tüm fermente süt ürünlerindeki kültürlerde süt asidi bakterileri bulunmaktadır. Bu bakterilerin en önemli özelliği çıkardıkları laktaz (β – galaktozidaz) enzimi ile süt şekerini parçalayıp süt asidi oluşturmalarıdır. Saf kültürde yer alan laktik asit bakterileri laktozu fermente edebilmelerine göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere 2 grupta toplanır. Genel olarak homofermentatif laktik asit bakterileri %99 oranında laktik asit, %1 oranında diğer maddeleri meydana getirir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, %70 oranında laktik asit %30 oranında CO₂, C₂H₅OH (etanol) ve CH₃COOH (asetik asit) meydana getirir. Laktozun fermentasyonu ile oluşan laktik asit, yoğurt ve diğer fermente süt ürünlerinin oluşumu için gerekli. Süt, saf kültürlerde yer alan bakterilerin oluşturduğu süt asidi sayesinde yoğurt haline gelir.

Süt asidinin ışığı sağa veya sola çevirme durumlarına göre 3 tipi bulunmaktadır.

- Işığı sağa evirenler; L(+) laktik asit fermentasyonu
- Işığı sola evirenler; D(-) laktik asit fermentasyonu
- Işığı sağa veya sola çevirme açısından inaktif olanlar;DL laktik asit fermentasyonu

Yapılan çalışmalara göre;

Streptococcus thermophilus
Streptococcus lactis
Streptococcus diacetylactis
Streptococcus faecium

} L(+)

Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus lactis

} D(-)

Lactobacillus bifidus
Lactobacillus casei

} L(+), LD

Lactobacillus helveticus
Lactobacillus citrovorum

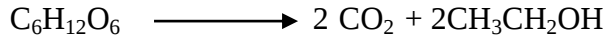
} D(-), L(+)

L(+) laktaz insan vücudunda çok çabuk parçalanıp yok olduğundan beslenme yönünden büyük öneme sahiptir. Oysa D(-) laktaz yetsiz ve yavaş şekilde parçalanmaktadır. Özellikle bebeklerin ve küçük çocukların gıdalarında D(-) süt asidi bulunması istenmez.

2) Etil Alkol retimi

Kefir, kımız ve diğer fermente süt ürünlerinde bulunan çok az veya iz halindeki etil alkol, *Saccharomyces kefir* ve *Kluyveromyces lactis* gibi mayalar tarafından süt şekerinden (laktoz) oluşturulur. Etil alkol bu tip ürünlerin doğal bileşenidir. Ama çok az miktarda laktozun etil alkole fermentasyonu diğer şekerler kadar kolay olmamaktadır. Mayalar laktozu önce

monosakkaritleri olan glikoz ve galaktoza parçalar ve 1 molekül glikoz veya galaktozdan 2 molekül etil alkol ve CO₂ meydana getirir.



3) Proteoliz

Proteoliz, mikroorganizmaların çıkardıkları proteolitik enzimlerle proteinlerin parçalanmasıdır. Kültürlerde yer alan suşların en önemli görevlerinden biri proteoliz olayını gerçekleştirmeleridir. Bazı mikroorganizmaların gelişmeleri için ortamda serbest aminoasit ve peptidler gibi doğrudan doğruya özümmlenebilecek azotlu madde bulunması gerekir. Bunlar salgıladıkları proteaz enzimleri ile kazeini peptidlere kadar parçalar. Oluşan peptidler hücre içine alınarak yine peptidaz enzimleri ile bileşenleri olan aminoasitlere hidrolize olur. Proteoliz, peynir olgunlaşması için olması gereken en önemli olaydır. Bu fermentasyon mikroorganizmaların salgıladıkları enzimler (ektoenzimler) yanında mikroorganizma içerisinde olup dışarıya çıkabilen enzimler (endoenzimler) ve çok az pıhtılaştırıcı enzimler (kimozin gibi) yardımıyla proteinler aminoasitlere hatta amonyağa kadar parçalanabilirler ve peynirin karakteristik koku, yapı, tat ve aroması ortaya çıkar.

Lipoliz

Lipolitik enzimlerin etkisiyle süt yağının yapı taşları olan gliserin ve yağ asitlerine parçalanmasıdır. Süt yağı % 97-98 'i olan trigliseridler lipolitik bir enzim olan lipaz enzimi vasıtasıyla gliserin ve yağ asitlerine parçalanırlar. Mikroorganizmaların hemen hemen hepsi lipaz enzimi oluşturmaktadır. Özellikle küf ve mayalar ile bakterilerdir. Genelde pek istenmeyen lipoliz olayı bazı peynirlerin olgunlaşması için gereklidir. Örneğin: Camambert, Roquefort, Gorgonzola gibi küflü peynirlerle küflerin oluşturduğu lipaz enzimiyle süt yağı lipolize uğramaktadır. Lipoliz sonunda ortaya çıkan maddeler bu peynirlerin özgün tad, koku ve aromasını oluşturur.

Patojen ve Diğer Zararlı Bakterilerin İnhibisyonu

Saf kùltùrlerde bulunan bazı mikroorganizmalar bu tip patojen ve zararlı bakterilerin faaliyetlerini inhibe ederek fermentasyonu arzulanan şekilde olmasını sağlar. Örneğin yoğurttaki patojenlerin 48 saat içerisinde veya olgun peynirlerde olgunlaşma sonuna doğru patojenlerin inhibisyonu böyle bir biyoteknolojik etki oluşturur.

Tat ve Aroma Oluşumu

Saf kùltùrlerde bulunan mikroorganizmaların önemli görevi sùt ùrünlerinin istenen tat ve aromalarını oluşturmalarıdır. Örneğin tereyağı kùltüründe yer alan *Streptococcus diacetilactis* ve *Leuconostoc* bakterileri laktozu fermente ederek sùt asidi yanında tereyağının karakteristik aroma maddesi diasetili oluştururlar. Sùt ùrünlerinde diasetil, ortamda bulunan sitratın metabolizması sonucu oluşmaktadır. Örneğin yoğurtta yoğurt bakterilerinin oluşturduğu asetaldehit, sùt asidi bakterilerinin birçoğu tarafından sùtte ve diğer besi ortamlarında kùük miktarlarda oluşturulmaktadır.

Asetaldehit, karbonhidrat metabolizması sonucunda pirüvatın doğrudan dekarboksilasyonu veya asetata dñnüşümünden sonra veya aminoasitlerin katabolizması yoluyla meydana gelmektedir. Yoğurtta istenilen bir madde olan asetaldehit bazı peynirlerde bozukluklara neden olabilmektedir.

Saf Kùltür Kullanımının Yararları

❖ Peynir üretimindeki yararları şu şekilde sıralanabilir

- 1) Pıhtı oluşumundan itibaren peynirlerde asitliği arttırmak
- 2) Peynir suyu çıkışını (sinerez) hızlandırmak
- 3) Salamurada tuz alımını azaltmak
- 4) Peynir suyuna kaçan yağ ve protein miktarını azaltmak
- 5) Peynirde zararlı mikroorganizmaların gelişmesini önlemek
- 6) Olgunlaştırma sırasında tat ve aroma meydana getirmek
- 7) Peynirde olgunlaşmayı hızlandırmak

❖ Tereyağı üretimde saf kùltür kullanmanın yararları

Tereyaę tatlı ve asit (ekşi) krema olmak üzere 2 şekilde üretilebilir. Tereyaę kùltürü ile krema olgunlaştırılır ve öylece yayıkılarak tereyağına işlenir. Starter kùltürdeki bakteriler tereyağının karakteristik aroma maddesi diasetili asetoini ve aroma bileşenleriyle laktik asiti oluşturmaktadır. İkinci önemli yarar ise; tereyağına dayanıklılık kazandırmaktır. Buda bakterilerin oluşturduğu laktik asitin istenmeyen mikroorganizmaların gelişme ve çoğalmasını inhibe etmesiyle mümkündür.

- ❖ Yoğurt üretiminde saf kültür kullanmanın yararları (*S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*)
 - Saf kültür kullanılarak elde edilen yoğurtlar birkaç hafta muhafaza edilebilir, asitlikte önemli bir değişme olmadığı için.
 - Yine diğer ürünlerde olduğu gibi yoğurtta da ürüne özgü tat ve aroma ile yapı oluşmasını sağlar.

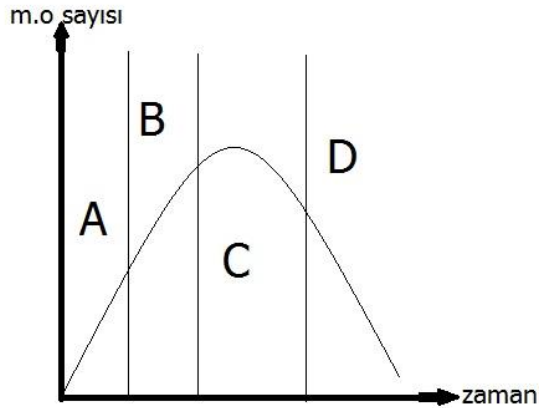
Saf Kültürlerin Üretimi

İki yöntem vardır;

- 1) İşletmeye alınan sıvı, normal liyofilize veya dondurulmuş kültürlerden önce ana stok hazırlanır. Ana stoktan ara stok ve ara stoktan işletme kültürü hazırlanır.
- 2) Konsantre liyofilize yada konsantre dondurulmuş ürünler kullanılarak doğrudan işletme kültürü hazırlanır.

Bakteriyofaj içermeyen saf aktif kültürlerin çoğaltılması temel amaçtır.

Bakterilerin çoğaltılması



A- Duraklama Dönemi (lag fazı) : Bu dönem de bakteriler ortama adapte olur. Yavaş aktivite gösterirler. Bakteri hücreleri gerekli olan enzimlerin yapılmasını sağlayacak olan RNA'yı meydana getirirler.

B- Logaritmik Dönem (log faz): Hücrelerin düzenli bir şekilde bölünmeye başladığı ve çoğalmaya başladığı dönemdir. Hücreler bu dönemde maksimum aktivite gösterir.

C- Sabit Dönem: Besin maddeleri azalır. Süt asidi gibi metabolizma artıklarının miktarı artar. Yaşlı hücre sayısı artar. Yani bu dönemde hücre çoğalması ile ölümü arasında bir denge vardır.

D- Azalma veya Ölme Dönemi: Ölü mikroorganizma sayısı canlı mikroorganizma sayısından fazla olur. Gelişme koşulları kötüleşir. Canlı hücre sayısı azalır.

Kültür Çoğaltma Yöntemleri

1. Basit mikrobiyolojik teknikler

Sütü ısıtmaya yarayan aletler, cihazlar (su banyosu, etüv, otoklav, cam malzemeler)

İnkübasyon odaları

Viskübatör

Etüv

2. Mekanik olarak korunmuş sistemler

Tamamen kapalı hava almayan ortamlarda ısıtma sağlanır ve inkübasyon derecesine soğutulur.

Levis sistemi

Alpha-Laval

Jaras

Terlet-Zuphter

Lewis Sistemi

Ana stok → Ara stok → İşletme kültürü

Özellikleri;

- İzoleli dış tank içerisinde su mevcuttur. Süt burada ısıtılır. İnkübasyon sıcaklığına soğutulur ve herhangi bir bulaşma olmadan aşılır.
- Tüm aşamalarda bulaşmayı önlemek şeklinde klorlu su engeli geliştirilmiştir.
- İnkübasyon sırasında hava kontaminasyonunu önleyecek şekilde sistem vardır.

Alpha- Laval Sistemi

İnkübasyon tankının her bir yüzünde hidrofobik kağıtlı özel filtreler bulunur. Filtre ünitesinin tamamı koruyucu bir kasa ile kaplıdır. Sütün ısıtılması sırasında filtreden hava çıkar. Soğutulması sırasında içeriye sterilize edilmiş hava girer. Özel olarak viskübatöre bağlanabiliyor. Böylece hazırlanan ara kültür aseptik bir şekilde tanka gelir.

Kültür Geliştirme Ortamları

İşletmelere gelen stok kültürün ana kültür ara kültür ve işletme kültürü şeklinde çoğaltılmasında esas olarak inek sütü ve yağsız süttözu kullanılır. Kullanılacak inek sütü hastalıksız bir hayvandan sağılan, taze, yabancı tat ve koku içermeyen normal bileşimli olmalıdır.

Yağsız süttözu özellikleri

- Süttözünün suda erime kabiliyeti belirlenmeli ve % 99 -100 oranında suda çözünen süt tozu tercih edilmelidir.
- Süt tozunda su oranı en fazla %3,5 olmalıdır
- Yağ oranı %1.25'i geçmemelidir
- Asitliği %0,15'i geçmemelidir
- Koliform bakteri bulunmamalıdır
- Termofilik bakteri ve spor yapan bakteri en fazla 100 adet/g olmalıdır

Yağsız süt tozundan hazırlanan sütün bileşimi;

Sütün kurumaddesi arttıkça bu sütte hazırlanan kültürün mililitresindeki canlı bakteri sayısı ve buna bağlı olarak süt asidi miktarıda artmaktadır. Dolayısıyla kullanılan sütte %11 kurumadde olması önerilmektedir.

Kullanım İçin Kültürlerin Çoğaltılması

1)Ana Stok Hazırlanması

- Yağsız süttözu veya yağsız inek sütü
- 115 °C de 15 dakika – 90-95 °C 1 saat ısıtma işlemi
- İnkübasyon sıcaklığına soğutma
- Sıvı, liyofilize veya dondurulmuş kültür ilave edilir.
- İnkübasyon
- Oda sıcaklığında 30 dakika bekletme
- 10°C altında saklama

2) Ara stok hazırlanması

Yağsız süttözünden hazırlanan süt

- İnek sütü
- 115 °C de 15 dakika – 90-95 °C 1 saat
- İnkübasyon sıcaklığına soğutma

- Ara stoktan %2,5 oranında aşılama(genelde bir gün önce hazırlanmış ana stok kullanılır)
- İnkübasyon
- Soğutma
- 10⁰C altında bekletme

3)İşletme Kültürü Hazırlanması

- Yağsız inek sütü veya yağsız süttözünden hazırlanan süt
- 115 ⁰C de 15 dakika – 90-95 ⁰C 1 saat
- İnkübasyon sıcaklığına soğutma
- Ara kültürden %2,5 oranında aşılama
- İnkübasyon
- Soğutma
- 40⁰C altında bekletme

Kültür ismi	İnkübasyon (⁰ C)	İnk süresi (saat)	Kültür Oranı
Beyaz Peynir	20-33 ⁰ C	15-18 saat	% 2-3
Kaşar Peynir	40-42 ⁰ C	4-6 saat	% 2-3
Yoğurt	40-45 ⁰ C	3-6 saat	% 3
Krema Olgunlaştırma	20-25 ⁰ C	18-24 saat	% 5

ENZİMLER VE KULLANIM ALANLARI

Enzimler biyokatalizörler olarak kimyasal reaksiyonları hızlandırır.aktivasyon enerjisi yükselmekte , yüksek bir substrat ve etki özgünlüğüne sahiptirler.

Süt ve ürünlerinde enzimler şu amaç için kullanılırlar;

Peynir üretiminde: Buzağaların midelerinden elde edilen kimozen enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim bugün gen teknolojisi ile mikroorganizmalardan da saf olarak elde edilmektedir. Peynir olgunlaşmasının hızlandırılmasında ve peynire özgü aromanın oluşumunda keza değişik enzimler proteazlar, lipazlar, laktozlar ve esterazlar gibi kullanılmaktadır. Yine peynirlerde yanlış fermantasyon ve istenmeyen delik oluşumu gibi (özellikle dilimlenebilir sert peynirlerde), tat oluşumunu sınırlayan bozukluklar lisozen enzimi

ile önlenmeye çalışılır. Bu enzim yumurta akından klasik olarak elde edildiği gibi gen tekniği olarak değiştirilmiş mikroorganizma vasıtasıyla da üretilebilir.

Endoproteanizlar gibi enzimler kazeinden acı tada neden olan hidrofob peptitlerin elde edilmesi için bir kaynak oluşturmaktadır. Yine laktozun parçalanmasında B galaksidaz enzimi kullanılmaktadır. Diğer gıda alanlarında ise yine enzimlerden geniş ölçüde yararlanılabilmektedir. Örneğin; et ve balık ürünlerinde proteazlar eti daha olgun hale getirebilmektedir. katalazlar yağ oksidasyonuna karşı etki gösterirler. Yumurta tozu üretiminde glukozoksidaz enzimi glikozun eliminasyonu ile yumurtanın pastörizasyonu ve kurutulmasında mayloik reaksiyonunun renk kaybını engellemektedir. katalaz enzimiyle ise reaksiyon ürünü olarak hidrojen peroksit uzaklaştırılabilir. Buğday ve fırıncılık ürünlerinde amilazlar, proteazlar, oksidazlar, fosfotazlar, glikozidazlar, pentonazlar bu tip ürünlerde hamurun su bağlama kapasitesinin artması, reolijik niteliklerin iyileşmesi ve dayanımının artması amacıyla kullanılırlar meyve sularında ise berraklaşma ve filtrasyonu pektinazlar sağlar. Daha iyi bir hücre açılımı ve daha yüksek bir randıman özgül enzim prepatlarının kullanılmasıyla elde edilebilir. Alkollü içeceklerin üretiminde ise mayşe enzimleriyle işlenmektedir. Amilazlar ve selülozlar substratı açarlar bu bağlamda pektinazlar hücre bağlarını çözer ve şeker maya fermentasyonuna uğrar. Pektinazlar ve proteinazlar ile içecekteki asıltı halindeki maddeler ve protein içerikli tortular parçalanarak daha iyi bir filtrasyon sağlarlar.

Süt Teknolojisinde peynir altı suyu çeşitleri aşağıdaki gibidir;

1. Peynir mayasıyla(kimozin) işlenen peynirlerden alınan maya veya tatlı peynir altı suyu
2. Asitlenmiş sütten elde edilen asit peynir altı suyu
3. Peynir üretim hattında alınan teknik peynir altı suyu
4. Yağsız süt veya peynir altı suyunun ultrafiltre edilmesiyle(protein içermeyen) elde edilen permeat(filtrat)

Maya ve asit peynir altı suyu bileşimi genel olarak şu şekilde verilebilir.

MAYA PEYNİR ALTI SUYU	ASİT PEYNİR ALTI SUYU
Su(%) :93-34	94-95
Yoğunluk(%) :1.026	1.024-1.025
Yağı(%)< 0,8	----

Protein(%):<0.9	<0.9
Laktoz(%): 4,5-5	3.3-4.4
Laktik Asit(%):17	<0.8
Mineral Maddeler: 0,5-0,7	0.7-0,8
pH: 6.2-6.6	4.5-4.7

ANAEROBİK PEYNİR ALTI SUYUNUN İŞLENMESİ;

- 1. Metan Fermantasyonu;** Fermantasyon olayı iki kademedede gerçekleşir. Birinci kademedede peynir suyunun organik bileşikleri bakteri ve mayalardan oluşan fakültatif anaerob karışık bir floranın asit oluşturmasıyla kısa zincirli organik asitlere parçalanır. Bu mikroorganizmalar değişken olan çevre koşulları karşısında nispeten daha hassastırlar. İkinci aşamada özellikle metan oluşturan mikroorganizmalar birinci aşamada elde edilen metabolizma ürünlerine basit gaz formundaki bileşiklere parçalarlar ilk aşamada eğer materyal üründe laktoz domine durumda ise karbondioksit ve metan meydana gelmektedir. Metan oluşturan mikroorganizmalar obligat, anaeropturlar, sıcaklık ve pH değeri bakımından çökelti oluşumunu sağlarlar. Fermantasyon 6.8-7.5 pH aralığında ve 55°C’de gerçekleşir. Çabuk gelişen asitlik oluşumu karşısında (laktik asit bakterileri, propiyonik asit bakterileri, butirik asit bakterileri, clostridiumlar ve mayalar) metan oluşturan bakteriler çok uzun bir generasyon zamanına 3-10 gün ve gelişme fazına sahiptirler bu nedenle proses sırasında (1 kaç haftalık) aşırı asitlenme görülebilir. Metan bakterileri fermantasyonda stabil fazında popülasyona ulaşmasını sağlarlar.
- 2. Laktik Asit (laktat)Bakterileri;** Laktik asit peynir altı suyundan (özellikle asit peynir suyundan) termofil laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus spp*) anaerop yöntemle homofermantatif fermantasyonuyla elde edilir laktik asit bakterileri yüksek laktat konsantrasyonu ve oksijen karşında duyarlı olduğu için ve sadece zayıf asit bir pH değerinde tam bir randıman gösterdiği için oluşan laktik asit bufferlanma(kireç sütü) veya elektrodializle uzaklaştırılır.

Önemli İşlem Aşamaları Şu Şekilde Sıralanabilir;

1. Serum proteinlerin ultra filtrasyon ile ayrılması
2. Kalsiyum karbonat ilavesi ile fermantasyonun nötralize edilmesi
3. Hücre yönlendirilmesi ile filtrasyon
4. Sülfirikasit ilavesi ile kalsiyum laktattan laktik asidin çökeltilmesi
5. Kalsiyum sülfatın vasıtası ile filtrasyon

6. Saf olmayan laktik asidin konsantrasyonu
7. Pres filtrasyonla aktif kömür uygulaması
8. İki kez ekstasyonla (çözücü vasitanın ilave edilmesinden sonra) kalıntıların uzaklaştırılması.

SUBSTRAT FORMÜLASYONU

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

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

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

a- Hücre metabolizması için gerekli enerji kaynakları,

b- Hücreyi oluşturan ve ürünlerin biyosentezi için gerekli olan madde kaynakları.

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

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

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

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

Yapay besiyerleri araştırma amaçları için seçilirler. Bunlar araştırmacıya aynı koşullarda çalışmayı yineleme olanağı, saydamlık, az köpürme, ürünün kolaylıkla saflaştırılması gibi avantajlar sağlar. Bilimsel açıdan birçok yararları olmasına karşın bu tip besiyerlerinde elde edilen ürün verimi genellikle düşüktür ve daha önemlisi maliyet yüksektir. Bu nedenle

endüstriyel fermentasyonlarda çoğunlukla doğal besiyerleri kullanılır. Bununla birlikte endüstriyel fermentasyonların ilk kademelerini oluşturan laboratuvar dönemlerindeki besiyerlerinde daha çok saf maddeler tercih edilir.

Endüstriyel Substrat Seçimi ve Formülasyondaki Genel İlkeler

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

Substrat formüle edilirken aşağıdaki hususlara özellikle dikkat edilmelidir:

a- Substrat hücre gelişmesi ve biyosentez için gerekli besin maddelerini, mikroorganizmaların yararlanabileceği uygun bileşikler halinde içermelidir. Eksik olanlar takviye edilmeleir.

b- Endüstriyel substrat formülasyonları hazırlanırken yöresel hammaddenin seçimi ve üretimde kullanılması büyük önem taşır. Belirli bir substrat içinde çok iyi gelişen bir suş, aynı hammaddenin başka bir yöreden temin edilmesi durumunda gelişmeyebilir. Bu durum hammaddenin üretiminde yöresel koşullara bağlı farklılıklardan kaynaklanabilir. Bu farklılıkların kimyasal analizler ile tespit edilmesi zor olduğundan, en iyisi mikroorganizmanın yöresel hammaddeye uyumu (adaptasyonu) sağlanmalıdır.

c- Hammaddenin kimyasal kalite kontrol analizlerinin yanısıra, küçük çapta üretim denemeleri ile biyolojik yönden uygunluğu denenmelidir.

d- Hammaddedeki gereksiz fazlalıkların olumsuz sonuçlara neden olabileceği dikkate alınmalıdır.

e- Subtrat formülasyonları saptanırken, hammaddeler ile ilgili birim ve taşıma maliyeti, depolama süresi ve koşulları, korozyon gibi ekonomik faktörler gözönünde tutulmalıdır.

f- Hammadde içindeki toksik özellikteki maddeler substrattan uzaklaştırılmaya çalışılmalıdır.

Enzim ölçümü

Enzim ölçümleri enzim aktivitesini ölçmek için laboratuvar yöntemleridir. Enzim kinetiğini ve enzim inhibisyonunun araştırılması için önemlidirler.

Enzim birimleri

Enzim miktarları, diğer kimyasal bileşikler gibi, molar birim ile ifade edilebilir veya aktivite cinsinden enzim birimi ile ölçülebilir.

Enzim aktivitesi

Enzim aktivitesi, birim zaman başına dönüştürülen substrat mol sayısına eşittir, bir diğer deyişle reaksiyon hızı çarpı reaksiyon hacmine eşittir. Enzim aktivitesi mevcut aktif enzim miktarının bir ölçüsüdür ve dolayısıyla *belirtilmesi gereken* şartları

bağlıdır. SI birimi katal'dır, 1 katal = 1 mol s⁻¹ (1 mol/saniye)'dir ama bu aşırı büyük bir birimdir. Daha pratik ve yaygın kullanılan bir birim 1 enzim birimi = (U) = 1 µmol min⁻¹. 1 U, 16.67 nanokatal'a eşittir.^[1]

Katal olarak verilen enzim aktivitesi genelde enzimin doğal hedefi varsayılarak ifade edilir. Enzim aktivitesi bazı standart substratlar cinsinden de verilebilir. Örneğin, jelatin için *jelatin sindirim birimleri* (İngilizce *gelatin digesting units* veya GDU) veya süt proteinleri için *süt pıhtılaştırma birimleri* (İng. *milk clotting units* yani MCU) kullanılır. Bu birimler bir gram enzimin jelatin veya süt proteinleini ne hızla sindireceğini ifade eder. Bir GDU yaklaşık 1,5 MCU'ya eşittir.^[2]

Spesifik aktivite

Bir enzimin spesifik aktivitesi yaygın kullanılan bir diğer birimdir. Bu, bir enzimin, 1 miligram toplam proteindeki aktivitesidir ve µmol dk⁻¹mg⁻¹ (mikromol bölü dakika bölü miligram) olarak ifade edilir. Spesifik aktivite enzim aktivitesinin bir ölçüsüdür. Toplam proteinin miligramı başına, belli bir süre zarfında ve belli şartlarda bir enzim tarafından meydana getirilen ürün miktarıdır. Spesifik aktivite reaksiyon hızı çarpı reaksiyon hacmi bölü toplam protein kütlesine eşittir. SI birimi katal kg⁻¹'dir ama daha pratik bir birim µmol mg⁻¹ dk⁻¹'dir. Spesifik aktivite enzim ilerleyiciliğinin bir ölçüsüdür, belli bir substrat konsantrasyonunda (genelde enzimi doyurucu bir konsantrasyon kullanılır) ve saf enzim için genelde sabit bir değerdir. Enzimin saflaştırmasındaki veya diğer faktörlerdeki toplu iş (İng. *batch*) farklılıklarından kaynaklanan hataları bertaraf etmek için bir aktif bölge titrasyonu yapılması gerekir. Aktif bölge miktarını titre etmek için tersinmez bir enzim inhibitörü kullanılır, böylece aktif enzim miktarı ölçülür. Bu durumda, spesifik aktivite µmol min⁻¹ mg⁻¹ aktif enzim olarak ifade edilmelidir.

İlgili terminoloji

Reaksiyon hızı, birim zaman başına yok olan substrat (veya meydana gelen ürün) konsantrasyonudur (*mol*).

% saflık, %100 × (enzim numunesinin spesifik aktivitesi / saf enzimin spesifik aktivitesi)'dir. Saf olmayan numunenin daha düşük bir spesifik aktivitesi olur çünkü kütlenin bir kısmı enzimden oluşmamaktadır. %100 saf enzimin spesifik aktivitesi biliniyorsa, saf olmayan bir numunenin spesifik aktivitesi daha düşük olacaktır, bu sayede saflık derecesi hesaplanabilir.

Ölçüm tipleri

Tüm enzim ölçümleri zamana bağlı olarak ya substrat tüketimini veya ürün üretimini ölçer. Substrat ve ürün konsantrasyonlarını ölçmek için çok sayıda farklı yöntem mevcuttur ve çoğu

enzim birden çok yöntemle ölçülebilir. Biyokimyacılar genelde enzim tarafından katalizlenen reaksiyonları dört tip deney yoluyla çalışır.^[3]

- **İlk hız deneyleri.** Bir enzim aşırı miktarda bir substrat ile karıştırılınca, geçici bir dönem boyunca enzim-substrat araürünü hızla birikir. Ardından, reaksiyon sabit durum kinetiğine ulaşır, enzim-substrat araürün konsantrasyonu zaman içinde yaklaşık sabit kalır ve reaksiyon hızı nispeten yavaş değişir. Sabit duruma ulaşıldıktan kısa bir süre sonra reaksiyon hızı ölçülmeye başlanır, genelde zamana bağlı olarak ürünün birikmesi takip edilir. Ölçümler kısa bir süre için yapıldığı ve aşırı konsantrasyonda substrat kullanıldığı için, serbest substrat konsantrasyonunun ilk substrat konsantrasyonuna yaklaşık eşit olduğu varsayımı yapılabilir. İlk hız deneyleri yapılması ve analizi en kolay ölçümlerdir, çünkü ters reaksiyon ve enzim yıkımı gibi komplikasyonlardan yoksundur. Bu yüzden enzim kinetik deneylerinde kullanılan en yaygın deneylerden biridir.
- **İlerleme eğrisi deneyleri.** Bu deneylerde, kinetik parametrelerin belirlenmesi için, zamana bağlı substrat ve ürün konsantrasyonlarını ifade eden denklemler kullanılır. İlk hızlı dönemin ardından, reaksiyonun dengeye ulaşmasına izin verecek kadar uzun bir süre için, substrat veya ürün konsantrasyonu zamana bağlı olarak kaydedilir. Günümüzde artık pek kullanılmamakla beraber, enzim kinetiği tarihinin ilk dönemlerinde ilerleme eğrisi deneyleri yaygın olarak kullanılırdı.
- **Geçici kinetik deneyleri.** Bu deneylerde, ilk hızlı dönem sırasında reaksiyon takip edilir, enzim-substrat araürünü sabit-durum kinetiği dönemine ulaşana kadar. Bu deneyler yukarıda belirtilen diğer iki yöntemden daha zordur çünkü hızlı karıştırma ve gözlemlene yöntemleri gerektirirler.
- **Relaksasyon deneyleri.** Bu deneylerde bir enzim substrat ve ürün karışımına bir perturbasyon uygulanır, örneğin sıcaklık, basınç veya pH'de ani bir değişiklik yapılarak, ve denge geri dönüş izlenir. Bu deneylerin analizi için tamamen tersinir reaksiyonun gözününe alınması gerekir. Üstelik, relaksasyon deneyleri mekanistik ayrıntıları nispeten duyarsızdır ve dolayısıyla genelde mekanizmanın belirlenmesi için kullanılmaz.

Enzim ölçümleri örnekleme yöntemeine göre iki gruba ayrılabilir: **sürekli ölçümler**'de aktivite sürekli olarak kaydedilir, **süreksiz ölçümler**'de ise düzenli zaman aralıklarında numuneler alınır, reaksiyon durudurulur ve substrat veya ürünlerin konsantrasyonları belirlenir.



Bir spektrofotometrenin sıcaklık kontrollü küvet haznesi.

Sürekli ölçümler

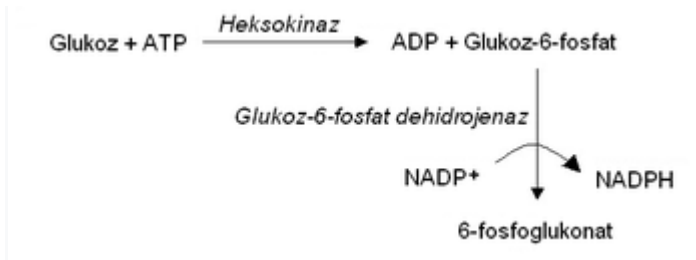
Sürekli ölçümler kullanışlıdır, fazladan bir işleme gerek kalmadan bir ölçüm ile reaksiyon hızı elde edilir. Sürekli ölçümlerin pek çok tipi vardır.

Spektrofotometrik

Spektrofotometrik ölçümlerde, reaksiyonun gidişini izlemek için reaksiyon solüsyonunun ne kadar ışık soğurduğuna bakılır. Eğer ışık görünür bölgede ise, reaksiyonun renginde bir değişiklik görülebilir, bunlara **kolorimetrik ölçüm** denir. Bir tetrazolyum boyasının substrat olarak kullanıldığı MTT ölçümü, kolorimetrik ölçüme örnektir.

Mor ötesi sıkça kullanılır çünkü NADH ve NADPH gibi çoğu koenzim, indirgenmiş hâllerinde mor ötesini soğurur ama yükseltgenmiş (okside) biçimlerinde soğurmaz. NADH'yi substrat olarak kullanan bir oksidoredüktaz'ın aktivitesini ölçmek için 340 nm dalgaboyundaki mor ötesi soğurmasındaki azalmayı takip edilebilir.^[4]

Doğrudan ve kenetli ölçümlerin kıyaslaması



Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz kullanılarak yapılan heksokinaz enzimi kenetli ölçümü.

Enzim reaksiyonu ışık soğurmasında bir değişikliğe neden olmasa da, **kenetli ölçüm** (İng. *coupled assay*) kullanılarak enzim için spektrofotometrik bir ölçüm yapılabilir. Burada, bir reaksiyonun ürünü, kolayca izlenebilen başka bir reaksiyonun substratıdır. Örneğin, sağdaki şekilde heksokinaz enzimi için bir kenetli ölçüm gösterilmiştir. Bu enzimin ürettiği glukoz-6-fosfat, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz aracılığıyla, NADPH üretimine bağlanır.

Florometrik

Floresans, bir molekülün belli bir dalga boyunda ışık soğurduktan sonra başka bir dalga boyunda ışık salmasıdır. Florometrik enzim ölçümlerinde substrat floresansı ile ürün floresansı arasındaki farktan yararlanılır. Bu ölçümler spektrofotometrik ölçümlerden daha duyarlıdır ama bir dezavantajları, katışıklardan kaynaklanan enterferans ve çoğu floresan bileşiğin ışığa maruz kalınca bozulmalarıdır.

Bu ölçümlerin bir örneği, gnee nükleotit koenzimler NADH ve NADPH'nin kullanımıdır. Bu durumda, indirgenmiş (redüklenmiş) biçimler floresandır, yükseltgenmiş (okside) biçimler ise floresan değildir. Dolayısıyla, oksidasyon reaksiyonları floresans azalması ile, redüksiyon reaksiyonları da floresans artması ile izlenebilir.^[5] Enzim tarafından katalizlenen reaksiyonlarda floresan boya salan sentetik sbstratlar da mevcuttur, β -galaktozidaz ölçümü için 4-metilumbelliferil- β -D-galactosit gibi.

Kalorimetrik



Luminol'un kemilüminesansı

Kalorimetri kimyasal reaksiyonlarda yayılan veya emilen ısının ölçümüdür. Çoğu reaksiyon bir ısı değişimine yol açtığı için bu yöntem çok genel amaçlıdır. Bir mikrokalorimetre kullanılırsa ölçüm için az miktarda enzim veya substrat yeterlidir. Başka yolla ölçülemeyen reaksiyonlar bu ölçüm yöntemi ile takip edilebilir.^[6]

Kemilüminesan

Kemilüminesans, bir kimyasal reaksiyon sonucu ışık salınmasıdır. Bazı enzim reaksiyonları ışık üretirler ve bu yolla ürün oluşumu ölçülebilir. Bu tip ölçümler çok duyarlı olabilir çünkü üretilen ışık fotoğraf filmi kullanılarak günler veya haftalar boyunca yakalayabilir, ama nicelenmesi zor olabilir, çünkü salınan ışığın tamamı tespit edilmez.

Enzimatik kemilüminesans ile peroksidaz tespiti, Western blot ile antikorların tespiti için yaygın olarak kullanılır. Bir diğer örnek, ateş böceklerinden elde edilen lusiferaz enzimidir; bu enzim, substratı olan lusiferin ile reaksiyona girince ışık salar.

Işık saçılımı

Statik ışık saçılımı çözeltideki makromoleküllerin ağırlıklı molar kütlesi ile konsantrasyonlarının çarpımını ölçer. Saçılım sinyali, ölçüm sırasında, bir veya birkaç kimyasalın belli bir sabit toplam konsantrasyonu için, çözeltideki tüm bileşiklerin molar kütlesinin ağırlıklı hesaplanmış doğrudan ölçümüdür. Kompleksler oluştuğu veya ayrıştıkça bu değer değişir. Dolayısıyla bu ölçüm ile komplekslerin stokyometresi ve kinetiği nicelenir. Protein kinetiğinin ışık saçılımı ile ölçümü, enzim gerektirmeyen çok genel bir yöntemdir.

Süreksiz ölçümler

Süreksiz ölçümlerde, bir enzim reaksiyonundan düzenli aralıklarla numuneler alınır ve bunlardaki ürün oluşumu veya substrat tüketimi ölçülür.

Radyometrik

Radyometrik ölçümler substratların için radyoaktivite dahil oluşu veya substrattan ayrılması ölçülür. Bu ölçümlerde en sık kullanılan radyoaktif izotoplar ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ve ^{125}I dir. Radyoaktif izotoplar bir substratın tek bir atomunun spesifik işaretlenmesine izin verdiği için, bu ölçümler hem çok duyarlı hem de spesifiktir. Biyokimyada sıkça kullanılırlar ve kaba lizatlarda (yani bir hücre parçalandığı zaman elde edilen karmaşık enzim karışımlarında) spesifik bir reaksiyonun izlenmesinin çoğu zaman tek yoludur.

Bu yöntemlerde radyoaktivite genelde sintilasyon sayacı ile ölçülür.

Kromatografik

Kromatografik ölçümlerde, reaksiyon karışımı kromatografi yoluyla bileşenlerine ayrıştırılıp ve ürün miktarı belirlenir. Genelde bunun için yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılır ama daha basit bir teknik olan ince tabaka kromatografisi de kullanılabilir. Bu yaklaşım için çok miktarda malzeme gerekse de, substrat veya ürünler radyoaktif veya floresan etketle işaretlenerek duyarlılık artırılabilir. Daha yüksek basınçta çalışan kromatografi araçlarının kullanımıyla da ölçüm duyarlılığı artırılabilir (bakınız yüksek basınçlı sıvı kromatografisi#Pompa basıncı).^[7]

Ölçümlerde kontrol edilecek faktörler[değiştir | kaynağı değiştir]

- **Tuz konsantrasyonu:** Çoğu enzim çok yüksek tuz konsantrasyonuna dayanamaz. İyonlar, proteindeki zayıf iyon bağlarına etki eder. Tipik enzimler 1-500 mM tuz konsantrasyonları arasında çalışır. Tabii ki, halofilik (tuz seven) yosun ve bakterilerin enzimleri gibi istisnalar mevcuttur.

- **Sıcaklık Etkileri:** Tüm enzimler ait oldukları organizmaya has sıcaklık aralığında çalışır. Sıcaklığın artırılması genelde reaksiyon hızında artışa yol açar. Ancak belli bir optimumun üstünde sıcaklığın yükselmesi reaksiyon hızını azaltır, çünkü enzim aktif bölgesinin üç boyutlu yapısını stabilize eden iyonik bağlar ve hidrojen bağları kopmaya başlar.^[8] İnsan enzimlerinde optimum sıcaklık genelde 35 ila 40 °C'dır. İnsan enzimleri 40 °C'ın üstünde hızla denatüre olmaya başlar. Sıcak su kaynaklarında (kaynarcalarda?) bulunan termofilik arkekerin enzimleri 100 °C'ye kadar stabildir.^[9] Ancak, bir enzim için "optimum" bir hız olduğu fiktî yanıltıcıdır çünkü belli bir sıcaklıkta gözlemlenen hız aslında iki sıcaklığın çarpımıdır, reaksiyon hızı ve denatürasyon hızı. Eğer bir saniye için enzim aktivitesi ölçerseniz yüksek sıcaklıkta daha yüksek bir hız bulabilirsiniz ama ürün oluşumunu bir saat boyunca ölçerseniz, yüksek sıcaklıkta daha az ürün oluştuğunu bulursunuz.
- **pH etkileri:** Çoğu enzim pH'ye duyarlıdır ve belli bir pH aralığında etkinlik gösterir. Hepsinin ptimum bir pH'si vardır. Aşırı pH değerlerinde iyonik bağlar ve hidrojen bağlarının kırılır, bunun sonucu enzimin üç boyutlu yapısı değişir (denatüre olur) ve enzim aktivitesi durur. Çoğu enzim pH 6 ilas 8'de çalışır; ancak, midede bulunan pepsin en iyi pH 2'de, tripsin ise en iyi pH 8'de çalışır.
- **Substrat doyumu:** Substrat konsantrasyonunu artırmak reaksiyon hızını (enzim aktivitesini) artırır. Ancak, enzimin doyumu reaksiyon hızını sınırlar. Tüm enzim moleküllerinin aktif bölgesi hemen hep dolu olduğu zaman enzimin doymuş olur. Doyum noktasına ulaşılnca artık ne kadar daha çok substrat eklenirse eklensin reaksiyon daha çok hızlanmaz. Reaksiyon grafiği plato yapar.
- **Kalabalıklık derecesi:** Çözeltideki yüksek miktarda makromolekül olması, makromoleküler kalabalıklaşma adı verilen bir etki ile, enzim reaksiyonlarının reaksiyon hızını ve denge sabitlerini etkiler.^[10]

Tarımsal Atıklardan Biyogaz Üretimi İçin Anaerobik Fermentör Tasarımında Etkili Etmenler

Kırsal alanlarda, bitkisel ve hayvansal ürünlerin yoğun olarak üretim sonucunda her yıl bol miktarda kalıntı oluşmaktadır. Bu atıkların bir kısmı kullanılmakla birlikte, artıkların önemli bir bölümü kullanılmamaktadır. Bu atıklar, farklı özelliklere sahiptirler ve dağınık yerlerde kalırlar. Dünyada her yıl büyük miktarlarda ürün kalıntısı üretilmekte ve genellikle açık çevreye dökülmektedir. Bu atıklar genellikle, tahıl ürünleri samanı, pirinç kabuğu, küspe,

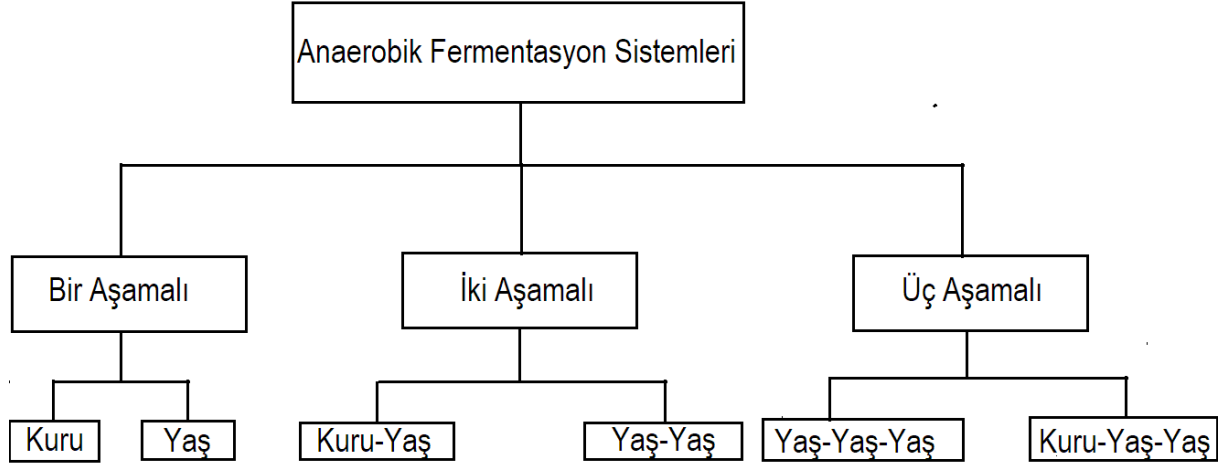
mısır koçanı, hindistancevizi kabuğu, yer fıstığı ve diğer fındık kabukları ve talaştır. Mısır, buğday, pirinç ve şeker kamışı ürünlerinden her yıl fazla miktarda biyokütle atık oluşur. Bununla birlikte, bu atıkların önemli bir bölümü hayvanlar için yem olarak kullanılır. Bununla birlikte, bu biyokütlenin büyük bir kısmından yararlanılmamakta ve açık alanlarda yakılmaktadır. Çeltik kabuğu ve şeker kamışı küspesi genellikle bir yerde büyük miktarlarda birikir. Çeltik kabuğu en yaygın tarımsal kalıntılar arasındadır. Geniş tarım alanları ile çevrili büyük şehirlerde, açık havada çeltik kabuğu yakılması önemli sorunlar yaratır.

Biyogaz üretimi, 1950'li yıllarda dünya genelinde başlatılmış olsa da, kırsal bölgelerde yaşayan insanlar arasında biyogaz üretim teknolojileri konusunda farkındalık bulunmaması nedeniyle, Hindistan gibi ülkelerde uygulanabilir biyogaz üretimi sağlanamamıştır. Ayrıca, biyogaz üretimi için uygun teknolojilerin azlığı, Hindistan'da biyogaz temelli uygulamaların uygulanmasını sınırlamaktadır. Biyogaz, aynı zamanda pişirme için kullanılan geleneksel yakıtlara kıyasla ucuz bir yakıttır. Mutfak atığı ve sığır gübresi karışımı uygulanabilir gaz üretimi elde etmek için çok önemlidir. Çünkü sığır gübresinin mevcudiyeti, konutlar için biyogaz üretiminin genişlemesindeki ana endişelerden biridir. Çeşitli biyolojik atıkların bileşimi, herhangi bir sistemin genel verimliliğine etki eder. Günlük sabit yükleme hızı, farklı materyallerin dengeli karıştırılması ve hidroliz ve asitleşme fazlarının metanlaşma fazından ayrılması, biyogaz verimini ve kalitesini en üst düzeye çıkaran önemli faktörlerdir. Organik kökenli atıklar, anaerobik fermentasyon sistemleri kullanılarak, yenilenebilir bir yakıt olarak, metan gazına dönüştürülebilir. Bir tarım işletmesinde günlük faaliyetler sırasında, farklı türde birçok atık açığa çıkar. Bunlar, tarımsal üretimden kaynaklanan sığır gübresi ve mısır sapları gibi ürün kalıntılarından oluşan hayvansal ve bitkisel kökenli sıvı veya katı atıklardır. Bu konuda kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır (Eryılmaz ve Ark., 2015; Kocabey, 2019; Zenk, 2019; Kanat ve Ergüven, 2020).

Anaerobik Fermentasyon Sistemleri

En basit tasarımdaki bir anaerobik fermentasyon sisteminde, dört fermentasyon aşamasının tamamının gerçekleştiği bir adet fermentör bulunur. Buna tek aşamalı fermentasyon sistemi denir. Bununla birlikte, bilim ve biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, bilim adamları her fermentasyon aşamasının farklı ve en iyi gelişen koşullara sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle, fermentasyon aşamalarının (çok aşamalı fermentasyon) fiziksel olarak ayrılmasıyla, her bir aşamanın en yüksek dönüşüm verimliliğine ulaşmak için optimize edilmesi amaçlanmıştır. Günümüzde, çok aşamalı fermentasyon sistemleri sadece iki aşamalı ve üç aşamalı sistemleri kapsar. İki aşamalı sistemde, iki farklı fermentörde hidroliz ve metanojenez aşamaları gerçekleşir. Daha karmaşık olan üç aşamalı sistemde ise, çeşitli

fermentörlerde hidroliz, asidojenez/asetojenez ve metanojenez aşamaları gerçekleşir. AD sistemleri, Şekil 1’de gösterildiği gibi, kullanılan fermentörün tipine göre (yaş veya kuru) sınıflandırır.



Şekil 1. Anaerobik fermentasyon sistemlerinin sınıflandırılması