

Sürekli Kültür Sistemlerinin Teorik Analizi

Uzm. Biyo. Nazan AKÇELİK — Arş. Gör. Mustafa AKÇELİK
Ank. Üniv. Ziraat Fak. Tarım Ürün. Tek. Böl. — ANKARA

ÖZET

Mikroorganizmaların sürekli kültürlenmesi, kesikli fermentasyonlardan bağımsız olarak kültürün gelişme oranı, besinsel ve fiziksel çevre, hücre yoğunluğu gibi parametrelerin ayrılmasına ve tanımlanmasına izin vermektedir. Yatışkın durum koşullarının değişmezliği, parametrelerin sayısal gelişimi ve belirlenmesinde önemli ölçüde yararlı olmaktadır. Nitekim yatışkın duruma ait matematik yasaların tanımlanması olasıdır.

SUMMARY

Continuous cultivation of microorganisms allows one to separate and define parameters which are independent in batch fermentation, namely, culture growth rate, nutritional and physical environment and cell density. The constancy of the steady state to a considerable degree facilitates their determination and numerical evaluation. It is thus possible to define mathematically the laws leading to the steady state.

GİRİŞ

Mikrobiyel gelişme, hücre sayısının veya kütlelerinin artışı ile karakterize edilmektedir. Gelişme hızı Fiziksel Kimyasal çevrenin kontrolü altında değişkenlik gösterir. Besi ortamının yapısı ve konsantrasyonu ile mikrobiyel gelişme hızı arasındaki kinetik bağıntılar Fermentasyon Teknolojisi'nde büyük öneme sahiptir. Kinetik parametrelerin saptanması ile sürekli ve süreksiz kültürler için gerekli besiyerinin tasarımı yapılarak, verimi maksimum düzeye çıkaracak koşullar saptanabilmektedir.

Sürekli üretimlerde besin ortamının kesiksiz olarak reaksiyon ortamından içeri ve dışarıya akışı sözkonusudur. Bir yandan uygun substrat steril kaynaktan fermentasyon ortamına verilirken, öte yandan metabolizma ürünleri alınarak üretim hacmi ve maksimum çoğalma korunabilmektedir. Bir sürekli üretim tipi olan yarı sürekli üretimde ise, ortamın bir kısmının belirli aralıklarla ve düzenli olarak geri alınması sözkonusudur. Kapalı sistemler-

de mikrobiyel gelişmenin yavaşlamasına, metabolitlerin birikmesi ve/veya besin kaynaklarının azalması gibi etkenler neden olmaktadır. Mikrobiyel kültürün sürekli üretimi, uygun koşulların korunması halinde olasıdır. Bu nedenle, sürekli işlemler ve homojen yarı sürekli işlemler önceden belirlenen matematiksel bağıntılara göre düzenlenir. Günümüzde Fermentasyon Teknolojisi; Hammaddenin hazırlanması, Fermentasyon ürünlerinin eldesi, Atık temizleme gibi ana basamakları ve bunların gerçekleştirilmesine yardımcı olan bir dizi ara basamağı kapsamaktadır.

Sürekli üretimlerde maksimum gelişme hızının uzun süre korunabilmesi için; substrat konsantrasyonu, populasyon yoğunluğu, ortamın pH sı ve/veya kültür ortamındaki çözülmüş oksijenin miktarı, sıcaklık gibi parametrelerin saptanması ve kontrolü yanında, gelişme ortamının tasarımı ve teknoekonomik sorunların da göz önünde tutulması gerekmektedir.

1 — Substrat Konsantrasyonu ve Populasyon Yoğunluğu

Gelişme hızı, mevcut besin maddelerinin kontrolü altındadır. Spesifik gelişme oranı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki, Monod (1950) tarafından şöyle ifade edilmiştir:

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

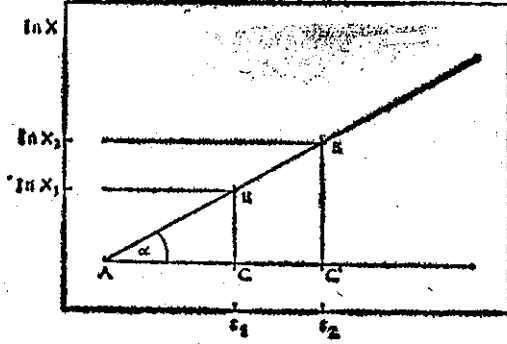
Bu formül gelişmenin logaritmik evresinde ve inhibisyonun sözkonusu olmadığı durumlarda geçerlidir. Bu şekilde K_s daima sıfırdan büyüktür. Maksimum gelişme oranı

$$[\mu_{\max} = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}] \text{ yalnız teorik olarak}$$

tam doğrusal artan bir ilişki gösterir. Kurvenin değeri sonsuzdur (Şekil 1) (1).

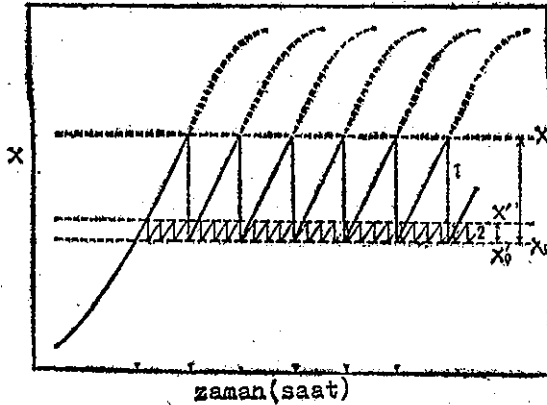
Kısaltmalar : μ : Gelişme oranı,
 μ_{\max} : Spesifik gelişme oranı
S : Substrat konsantrasyonu (gr/lt),

K_s : Doygunluk sabiti, t : zaman,
 $\ln X$: Biomas konsantrasyon, $\ln X_0$: t_0 zamanındaki konsantrasyon, S_0 : Başlangıç konsantrasyonu. Eğer mikroorganizmaların gelişimi metabolitlerden etkileniyorsa spesifik gelişme oranı ile substrat konsantrasyonu arasındaki bağıntı yukarıda verdiğimiz eşitlikten daha karmaşık olacaktır.



Şekil 1. Spesifik gelişme oranı (log evresinde)

Spesifik gelişme oranının, gelişmeyi sınırlayan substratın yeterli düzeyde konsantrasyonu tarafından maksimum gelişme oranına yakın ve sabit düzeyde korunduğu kabul edilmektedir. Ancak bu durum kültürün sürekli üretiminde uygun koşullar korunduğunda olasıdır. Harcanan ortamın belirli zaman aralıklarında ve düzenli olarak geri alınması yarı sürekli üretimlerde sözkonusudur (2). Her üretim periyodunda mikroorganizmasız substrat fermentöre verilmekte, dolayısıyla biyomasın kurvesi periyodik bir artış ve azalış göstermektedir (Şekil 3) (3).



Şekil 2. Yarı sürekli kültürlerde biyomasın periyodik artışı ve azalışı

Birim zamanda ortama ilave edilen ve ortamdan alınan substrat miktarı farklı zamanlarda düzenli olarak artırılmakta ise mikrobiyal gelişmenin matematiksel ifadesi şöyledir;

$$X = X_0 e^{\mu t} \left(1 - \frac{D}{n}\right)^n \quad (1)$$

Spesifik gelişme oranı, substrat konsantrasyonu yanında populasyon yoğunluğundan da etkilenmektedir. Bir kültürün yarı sürekli yada sürekli olarak üretiminde denge durumuna erişilmesi gerekir. Fermentörde bulunan mikrobiyel kütlelerin yavaş yavaş artması dinamik bir dengeyi tanımlar ve mikrobiyel kütlelerin geri alınması ile azalma gösterir. Yarı sürekli sistemlerde kültürde bulunan mikroorganizmaların miktarı substratın akış periyodu ile ilişkilidir. Oysa bu periyod boyunca mikroorganizmaların miktarı limitin üstüne çıkmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmalar geri alınarak miktar azaltılır. Bu yolla denge, mikroorganizmaların gelişme oranı ve dolayısıyla fermente edilen ortamda kalan mikroorganizmalar arasında kurulmaktadır (3). Spesifik gelişme oranı (μ) ile dilüsyon oranı (D) arasındaki ilişki;

$$D = n \left(1 - \frac{1}{e^{\mu/n}}\right) \text{ olarak belirlen-$$

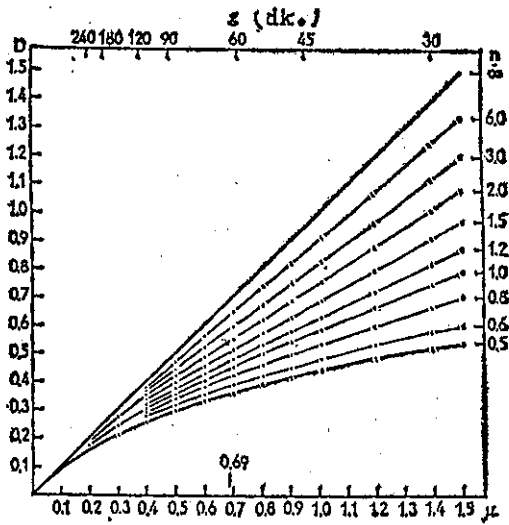
miştir. Bu deneysel formül, sürekli ve yarı sürekli kültürleme için geçerlidir (Şekil 3) (4).

Substrattan oluşturulan biyomas veya ürünün sabit, substrat ve dilüsyon oranının bağımsız olduğu kabul edilirse; Mikrobiyel kütle ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki;

$$Y = \frac{DX}{DS} = \frac{dx}{ds} \text{ şeklinde düzenle-$$

nebilir. Buradan hareketle biyomas üretimi ile

Kısaltmalar : n: Ürünün geri alınması periyodu, R: Gaz sabiti, T: Mutlak sıcaklık, A: Arrhenius sabiti, E: Mikroorganizmaların ısıl ölümlerine ilişkin aktivasyon enerjisi, e_{μ} : Spesifik gelişme oranının logaritmik ifadesi, V: Doygunluk sabiti, H: Henry katsayısı, P: Gazın sıvı üzerindeki bağıl basıncı.



Şekil 3. Spesifik gelişme oranı ile dilüsyon oranı arasındaki deneysel ilişki

substrat tüketimi arasındaki ilişkinin matematiksel tanımı;

$$-\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \frac{X}{Y} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \text{ olacaktır (1, 4).}$$

Mikrobiyel kütle için denge durumunu ise;

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \frac{X}{Y} - DX = 0 \text{ eşitliği ile ta-}$$

arımlanabilir. Monod eşitliğindeki yerine koyarsak, denge durumu için kütle artışının tanımlanması;

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \frac{X}{Y} \frac{S}{K_s + S} - DX = 0 \text{ ifadesi}$$

ile mümkün olur (1).

Yine Monod eşitliğinden yararlanılarak, denge durumunda substrat artışının belirlenmesi için;

$$\frac{ds}{dt} = DS_0 - DS \mu_{\max} \frac{X}{Y} \frac{S}{K_s + S} = 0 \text{ ifadesi ortaya çıkar (5).}$$

Sonuç olarak; Tüm bu eşitliklerden yararlanmak suretiyle mikrobiyel kütle için belirlenmesi için;

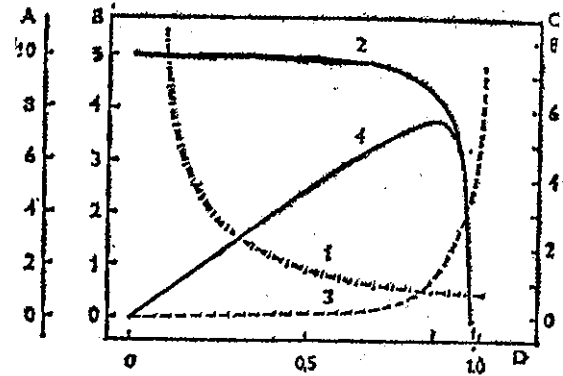
$$D(S_0 - S) = \frac{X}{Y} \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Substrat konsantrasyonunun belirlenmesi içinse;

$$S = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D} \text{ eşitlikleri türetilmiş-}$$

tir (6).

Sürekli işlemin kendini yenileme kapasitesi deneysel olarak belirlenebilir. Ürünün geçici değerleri için spesifik gelişme oranı ve doygunluk sabiti gibi verilerden, substrat konsantrasyonu ile spesifik gelişme yada generasyon zamanı arasındaki ilişkiler saptanabilmektedir (Şekil 4) (1).



Şekil 4. Sürekli kültürlerde denge durumunun teorik oranlarının belirlenmesi (B: Mikroorganizma konsantrasyonu, C: İnküleme süresi, D: Dilüsyon oranı, 1. kurve: İnküleme süresi, 2. kurve: Biyomass konsantrasyonu, 3. kurve: Substrat konsantrasyonu, 4. kurve: Bakteri üretimi = Dx)

Mikroorganizma ve substrat konsantrasyonlarındaki küçük değişimler, dilüsyon oranında önemli değişimlere karşılık gelmektedir. Aynı şekilde, dilüsyon oranındaki küçük değişimler de substrat konsantrasyonunda büyük değişimlere neden olmaktadır. Pratik uygulamalarda işlemin kontrol edilmesi için, mikroorganizma yoğunluğunun sabit tutulması, substrat konsantrasyonunun sabit tutulmasından daha kolay ve avantajlıdır (7).

2 — Sıcaklık

Mikrobiyel gelişme için sıcaklığın aralığı; Biyolojik yapıların denatürasyonuna neden olan üst sınır ile aktivasyon enerjisine bağlı alt sınırlar arasındadır. Sıcaklığın mikroorganizmaların spesifik gelişme hızı üzerine olan etkisi Arrhenius eşitliği ile ifade edilmektedir;

$$\ln \mu = \ln A - \frac{E_a}{R T} \quad (1)$$

Yani mikroorganizmaların gelişme hızı, sıcaklığın artmasına bağlı olarak maksimum noktaya erişinceye kadar artar. Sıcaklığın maksimum gelişme sıcaklığının üzerine çıkması halinde gelişme hızı süratle düşmeye başlar. Aktivasyon enerjisinin değerinin düşük olması, gelişme hızının artacağını belirtir. Yüksek aktivasyon değeri ise mikrobiyel ölümü belirler (8). Besi ortamının sıcaklığı, karbon ve enerji kaynaklarının verimi üzerinde de etkilidir. Sıcaklık düşünce daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulacağından, karbon ve enerji kaynağının verimi de düşer (9).

3 — pH

Gelişme veya ürün için optimal çevrenin temini pH kontrolü ile tamamlanır. Fermentasyonda pH'nın kontrolü ve düzenlenmesi kritik bir değişken olarak kabul edilmektedir. pH değişimleri mikrobiyel aktiviteye göre meydana gelir. pH'nın düzenlenmesi ve kontrolü ile fermentasyonda kalitatif ve kantitatif kazanç mümkün olmaktadır. Ortamın pH sınırı istenen düzeyde tutmak için kullanılan tampon maddeler, mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerini etkilemeleri ve ortamın pH sınırını bu yöntemle ayarlanmasında sınırlayıcı etmenler göz önüne alınarak, fermentörlerde özellikle oluşan ürünlerden saptanan pH değişimleri, kültür ortamına katılan bazı çözeltilerle önlenmektedir (10).

4 — Kültür Ortamındaki Çözünmüş Oksijen Miktarı

Bir aerobik fermentasyonda gerçek oksijen gereksinimi deneysel olarak belirlenebilir. Deneysel verilerin olmaması halinde oksijen gereksinimi, çeşitli fermentasyonlar için oksijen ve karbon ihtiyacına göre saptanabilmek-

tedir. Oksijenin çözünürlüğünde, gaz-sıvı çözünürlüğü için verilmiş olan Henry kanunu geçerlidir (11).

$$C = H \cdot P$$

5 — Toksik Maddeler

Mikroorganizmalar yaşam faaliyetlerinin tüm kademelerinde besin maddeleri ve diğer maddelerle sürekli ilişki halindedir. Bu maddelerin çoğu mikroorganizmalar için yararlı maddelerdir. Ancak ortamda az miktarda bulunsa bile mikrobiyel gelişimi ve biosentezi yavaşlatan yada tamamen durduran toksik maddeler besin ortamında bulunabilir. Toksik etkiler çoğunlukla uygulama sırasında ortaya çıkan problemlerle kendini gösterir ve yeterli ön kontroller yapılmamışsa işlem kayıplarına neden olabilir. Ön kontrolleri ve optimizasyon çalışmaları yapılmamış bir melas örneğinin; Sitrik asit fermentasyonunda sorunlar yaratabilir. Ön kontrolleri çok iyi yapılmış bir besin maddesi bile, depolama süresinde içinde üreyen mikroorganizmalarla elverişsiz hale gelebilir. Yabancı mikroorganizma sterilizasyonla giderilmiş olsa bile önceden salgıladığı toksinler fermentasyon için olumsuz faktör olarak kalabilir. İstenen konsantrasyonun üzerine çıkan uygun bir besiyeri bileşeni de gelişme üzerine toksik etki yapabilir (12).

6 — Gelişim Ortamının Tasarımı

Fermentasyon işleminde amaç; Uygun olan en kısa sürede en az hammadde kullanılarak, en fazla ürün kazanılmasıdır. Deneysel ve teorik çalışmalar beraber yürütülerek en verimli ve en ekonomik besiyeri saptanır. Fermentasyon besiyerinde, kullanılan mikroorganizmaların gelişmesi, çoğalması, biosentezi ve diğer faaliyetlerinin optimum olmasını sağlayacak diğer maddelerin bulunması gerekmektedir (13). Ortamda sadece mikroorganizmaların çevresel ve besinsel ihtiyaçlarının değil, aynı zamanda çeşitli ekonomik ve teknik sorunların da aşılması önem taşımaktadır.

7 — Teknoekonomik Sorunlar

Buraya kadar gelişme optimizasyonu ve besiyerinin tasarımı üzerinde duruldu. Ham maddelerin kullanımı yada yeterli miktarda bulunması gibi konuların da göz önünde tutul-

ması gerekir. Fermentasyonda ürün maliyetinin düşürülmesi temel unsuru oluşturmaktadır. Bugünkü üretim koşullarında fermentasyon ürünlerinin maliyet fiyatının % 10 - 60 ını besin maddeleri oluşturmaktadır (14). Önemli olan nokta, bu besin maddelerinin maliyetinin minimuma indirilmesidir. Her fermentasyon işlemi sonunda ürünlerin ortamdaki alınması ge-

reker. Fermentasyon ekonomisinde esas; Minimum maliyet gösteren hammaddenin kullanılması ile maksimum ürüne ulaşılması ve ürünün basit yöntemler kullanılarak ortamdaki alınmasıdır. Bu durumda ürünün geri kazanılması, çevre kirliliğinin kontrolü için atıkların işlenmesi gibi maliyetlerin etkisinin de hesaplanması gerekmektedir (15).

KAYNAKLAR

- 1 — FENCL, Z. 1966. Theoretical Analysis of Continuous Culture Systems. Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms. Ed: I. MALEK and Z. FENCL, Academic Press, New York, 1966. 655 pp.
- 2 — STAINER, R. Y., ADELBERG, A. E., INGRAHAM, J., The Microbial World, Academic Press, New York, 871 pp.
- 3 — FENCL, Z., SILLINGER, V., MALEK, I. 1961. Theory of Semicontinuous Cultivation Applied to Yeast *Torula utilis*. Pol. Microbiol. 6: 94 - 100.
- 4 — WATSON, T. G. 1969. Steady State Operation of a Continuous Culture at Maximum Growth Rate by Control of Carbon Dioxide Production. Jour. Gen. Microbiol. 59: 83-87.
- 5 — GOLDBERG, I., ER-EL, Z. 1981. The Chemostat-an Efficient Technique for Medium Optimization. Process. Biochem. (Oct/nov.) pp: 2 - 8.
- 6 — STAFFORD, K. 1986. Continuous Fermentation. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Ed: A. L. DEMAIN, N. A. SOLOMON. American Society for Microbiology, Washington DC, 1986. 466 pp.
- 7 — HOLMBERG, A. 1980. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for Exotoxin Production: Process Analysis Study. Biotech. Bioeng. 22: 1707 - 1724.
- 8 — DEMAIN, A. L. 1972. Cellular and Environmental Factor Effecting the Synthesis and Excretion of Metabolites. Jour. Appl. Chem. Biotech. 22: 345 - 361.
- 9 — BORZANI, W., VARIO, M. R., 1973. Observations of Continuous Culture Responses to Additions of Inhibitors. Biotechnol. Bioeng. 15: 299 - 306.
- 10 — GODEN, E. L. Jr. 1959. Fermentation Process Kinetics. Jour. Biochem. Tec. Eng. 1: 413 - 417.
- 11 — BANDYOPADHYAY, B. 1967. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. Biotech. Bioeng. 9: 533 - 544.
- 12 — DUNN, I. J., MOR, J.R. 1975. Variable Volume Continuous Cultivation. Biotech. Bioeng. 17: 1805 - 1822.
- 13 — HORDER, W., KUAREN, J.G., MATIN, A. 1977. Microbial Selection in Continuous Culture. Jour. Appl. Bacteriol. 43: 1 - 24.
- 14 — BATTAT, E. 1974. Growth of *Pseudomonas C* and Compounds: Continuous Culture. Appl. Microbiol. 28 (6): 906 - 911.
- 15 — KRISTIANSEN, B., SINCLAIR, C. G. 1979. Production of Citric Acid in Continuous Culture. Biotech. Bioeng. 21: 315 - 323.