

## MİKROORGANİZMA GELİŞMESİNİN ÇEVRE İLE İLİŞKİSİ

Bir mikroorganizmanın belirli bir çevrede gelişme ve ürün sentezleme yeteneği organizmanın genetik özellikleri ile belirlenir. Fermantasyon prosesinin başarıyla ilerlemesi, önce seleksiyon veya mutasyon yolu ile iyi bir mikroorganizma suşunun elde edilmesine, sonra çevre koşullarının gelişme ve ürün oluşumu için iyi uyarlanmasına bağlıdır.

### 1. Sıcaklığın Etkisi

Mikroorganizmaların gelişmeleri ve ürün oluşturmaları bir dizi kimyasal reaksiyonların sonucudur ve tüm kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi sıcaktan etkilenirler. Genel bir gelişme modelini aşağıdaki gibi tanımlayabiliriz.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \alpha X$$

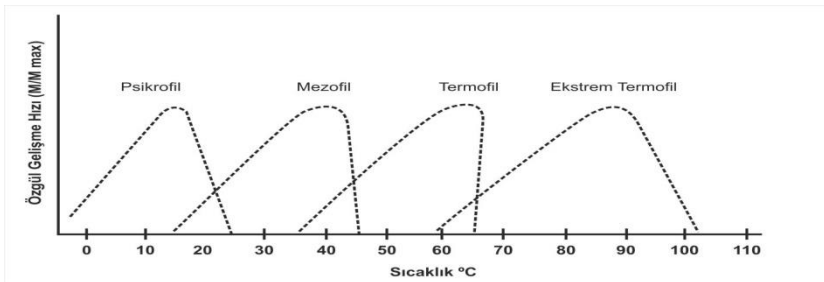
veya

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu - \alpha$$

Burada  $\alpha$  özgül ölüm hızıdır. Bu eşitlikte görülen özgül gelişme hızı,  $(1/X) dX/dt$ , gelişme ve ölüm arasındaki bir dengedir. Genellikle, mikroorganizmalar  $\mu > \alpha$  olduğu zaman gelişirler ve bu aşamada  $\alpha$  ihmal edilebilir. Buna rağmen, gerek  $\mu$  gerekse  $\alpha$  sıcaklığa oldukça bağımlı olduklarından burada her ikisi de birlikte düşünülmelidir.

Şekil 4.1’de psikrofilik, mezofilik ve termofilik gelişme ile ilgili 3 değişik gelişme sıcaklığı kurvesi görülmektedir. Bazı istisnaları varsa da çoğu mikroorganizma 20-30 °C sıcaklık sınırının içerisinde gelişirler. Ayrıca çoğu mikroorganizma da bu gruplardan birinin içerisinde. Maksimum gelişme sıcaklığı 20 °C’nin altında olanlar psikrofilik, 30-35 °C civarında olanlar mezofilik ve 50 °C’nin üzerinde olanlar termofiliktir.

Kurveler şekildeki gibidir. Sıcaklık optimum gelişme sıcaklığına doğru yükseldikçe, 10°C’lik bir sıcaklık aralığında gelişme hızı yaklaşık 2 kat artar. Optimum gelişme sıcaklığının üzerinde artan sıcaklıkla birlikte gelişme hızı hızla düşer.



Şekil... Psikrofil, mezofil ve termofil mikroorganizmalar için tipik gelişme kurveleri

Gelişme ve hızları Arrhenius eşitlikleri ile açıklanabilir:

$$\mu = A e^{-Ea/RT}$$

ve

$$\alpha = A' e^{-Ea'/RT}$$

Burada	A ve A'	; Arrhenius sabitleri
	Ea ve Ea'	; Aktivasyon enerjileri
	R	; Gaz sabiti (1.987 cal/mol °K)
	T	; Mutlak sıcaklık (°K)

Tipik aktivasyon enerjisi gelişme için 15-20 k.cal/mol, ölüm için 60-70 k.cal/mol'dür. Buradan, ölüm hızının sıcaklığa karşı gelişme hızından daha duyarlı olduğu anlaşılmaktadır.

Mikroorganizmaların ürün oluşturmaları da, gelişmedekine benzer şekilde sıcaklığa bağlıdır. Buna rağmen gelişme ve ürün oluşumu için optimum sıcaklıklar aynı olmayabilir ve ayrı ayrı saptanmalıdır. Böylece proses sırasında her iki amaca uygun olacak bir sıcaklık seçilmelidir.

Sıcaklığın optimum değerinin üzerine çıkmasıyla hücre verimi hızla azalır. Sıcaklık yükseldiğinde hücre veriminin azalmasının en önemli nedeni, hücrenin muhafaza gereksiniminin artmasıdır. Muhafaza katsayısı artan sıcaklıkla birlikte 15-20 k cal/mol aktivasyon enerjisi ile artar. Sonuç olarak, gelişme sırasında sıcaklık yükseldiğinde, hücrenin muhafaza gereksinimini karşılaması amacıyla karbon ve enerji kaynağı kullanımını da artar.

## 2. pH'nın Etkisi

Kültür ortamının pH'sı gelişme ve ürün oluşumuna etki edecek önemli bir parametredir. Çoğu mikroorganizma 3-4 pH birimi aralığında fonksiyon gösterir. Maksimum gelişme hızı ise çoğunlukla 1-1.5 pH birimi genişliğinde görülür. pH, bu kadar önemli olduğundan, çoğu fermentasyonlarda, tampon ilavesi veya pH kontrol sistemleri yardımı ile kontrol edilir.

Mikroorganizma gelişmesinin pH'ya bağımlılığı ile ilgili birçok genelleme yapılabilir. Bakteriler, genellikle, pH 4-8 arasında gelişir. Mayalar 3-6, küfler 3-7 ve yüksek ökaryotik hücreler pH 6.5-7.5'i tercih ederler. Sonuç olarak; kontaminasyon tehlikesini en aza indirecek bir çevre koşulunun yaratılması amacıyla bazan bu durumdan yararlanılabilir ve bakteri gelişmesinin engelleneceği, mayaların gelişebilecekleri bir pH seçimi yapılabilir. Örneğin; pH 3'de yapılan bir maya fermentasyonunda bakteri kontaminasyonu riski düşünülemez.

Fermentasyon sırasında pH çeşitli nedenlerle değişme eğilimindedir. Azot kaynağı olarak amonyum kullanıldığında pH düşme eğilimi gösterir. Çözelti içindeki amonyak amonyum (NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> halindedir ve mikroorganizma bunu hücre içinde R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> şeklinde birleştirir. Buradaki R bir karbon iskeletidir. İşlem sırasında H ortamda serbest kalır. Azot kaynağı nitrat ise, hidrojen iyonları NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ü R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> indirgemek için ortamdan ayrılır ve pH yükselme eğilimi gösterir.

pH' daki değişmelerin diğer bir nedeni; laktik asit, asetik asit, sitrik asit vb organik asitlerin üretimlerinde görülür. Eğer pH değişikliğindeki en önemli etken biliniyorsa, bu değişikliği nötrale etmek için ilave edilen asit veya alkalinin ölçülmesiyle, gelişme ve ürün oluşumu üzerine bazı bilgiler elde etmek mümkündür.

### 3. Yüksek Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Besin konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda substrat inhibisyonu meydana gelir. Bu inhibisyonun değişik nedenleri vardır. Glikoz vb besinler için inhibisyon oldukça yüksek şeker seviyelerine kadar (100-150 g/L), genellikle, meydana gelmez, fakat konsantrasyonun 350-500 g/L'ye ulaştığı durumlarda birçok mikroorganizma için gelişme olanaksızdır. Bunun nedenine ilişkin en uygun açıklama, bu konsantrasyonlarda hücrenin dehidrasyona uğramasıdır. Böyle çözeltilerde yalnızca ozmofilik veya ozmotolerant mikroorganizmalar gelişebilir. Benzer durum 40 g/l NaCl konsantrasyonunun üzerindeki gibi yüksek tuz çözeltilerinde meydana gelir. Böyle çözeltilerde de yalnızca halofilik mikroorganizmalar gelişebilir. Bu iki örnek bazı gıdaların muhafazalarında çok önemlidir.

Substrat inhibisyonunun görüldüğü durumlarda Monod bağlantısının

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

şeklinde yazılabileceği deneysel veriler sonucunda bulunmuştur. Burada  $K_i$  substrat inhibisyonuna bağlı ayrışma sabitidir.

Substratın çok düşük olduğu koşullarda,  $K_i$  yanında  $S$  ihmal edilebileceğinden, yukarıdaki eşitlikler inhibisyonuz koşullar için yerine normal Monod bağlantısına dönüşmektedir.

Çok sık kullanılan besinler için inhisibyona neden olabilecek limit değerler şöyledir; amonyum iyonu 5 g/L, fosfat tuzları 10 g/L, nitrat 5 g/L, etanol 10 g/L, glikoz 100 g/L.

### 4. İnhibitörlerin Etkisi

Bazı özel bileşikler hücrenin yapısal bileşenleri veya anahtar özellikleri enzimler üzerinde toksik etki göstererek inhibisyona neden olur ve böylece gelişmeyi yavaşlatır veya tamamen engellerler. Birçok mikroorganizma 1 g/L'nin üzerindeki konsantrasyonlardaki fenol, formaldehit, toluen, metanol vb belişiklerden inhibe olur. Buna rağmen eğer konsantrasyonları yeterince düşükse, bu bileşikler gelişme için kolaylıkla kullanılabilirler.

Bu tür engelleyici etki gösteren inhibitörler, mikroorganizmaların bünyelerine girebilmeleri yönünden bazen substratlarla rekabete girebilir ve böylece "rekabet edici (kompetitif) inhibisyona" neden olurlar. Kompetitif olmayan inhibisyonlarda ise inhibitör, mikroorganizma ile substrat arasındaki ilişkiye bir etkide bulunmaz.

Diğer taraftan, gelişme için gerekli olmayan fakat gelişme hızını artıran maddelere de "aktivatör" denilmektedir. İnhibitör, gelişen bir mikroorganizmanın  $\mu_{\max}$  değerini azaltır ve

Ks değerini artırır, aktivatör ise tersine  $\mu_{max}$  değerini artırır, buna karşılık Ks değerini azaltır.

DeneySEL sonuçlar, kompetitif inhibitör bulunan besiyerindeki üreme kinetiği için Monod denkleminin aşağıdaki şeklini geçerli olabileceğini göstermektedir:

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

Buradaki  $\alpha$  katsayısı mikroorganizma ve inhibitörün türü ile konsantrasyonuna bağlı olup;

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

eşitliği ile belirlenmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi inhibitörsüz besiyerinde  $[I] = 0$  olduğundan yukarıdaki eşitlik normal Monod bağlantısına dönüşecektir. Ayrıca  $K_i$  sabiti çok büyük olan inhibitörler için  $[I]/K_i$  “1” yanında yok sayılabileceğinden gene aynı şekilde normal Monod bağıntısı geçerli olacaktır.

Kompetitif inhibisyonlar için geçerli olan yukarıdaki bu eşitlik,  $K_s$  sabitinin  $\alpha$  faktörüne bağlı olarak arttığını, fakat “ $\mu_{max}$ ” değerinin değişmediğini göstermektedir.

Kompetitif olmayan inhibisyonlar ise, Monod bağıntısının aşağıdaki şekli geçerli olmaktadır:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{\alpha (S + K_s)}$$

Bu eşitlikten de anlaşılacağı gibi bu tür inhibisyonlarda inhibitör, mikroorganizmanın  $K_s$  değerini değiştirmeden maksimum özgül gelişme hızını ( $\mu_{max}$ ) azaltmaktadır.  $K_s$ 'nin çok küçük olduğu durumlarda, S yanında yok sayılabileceğinden

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{\alpha}$$

eşitliği geçerlilik kazanır.

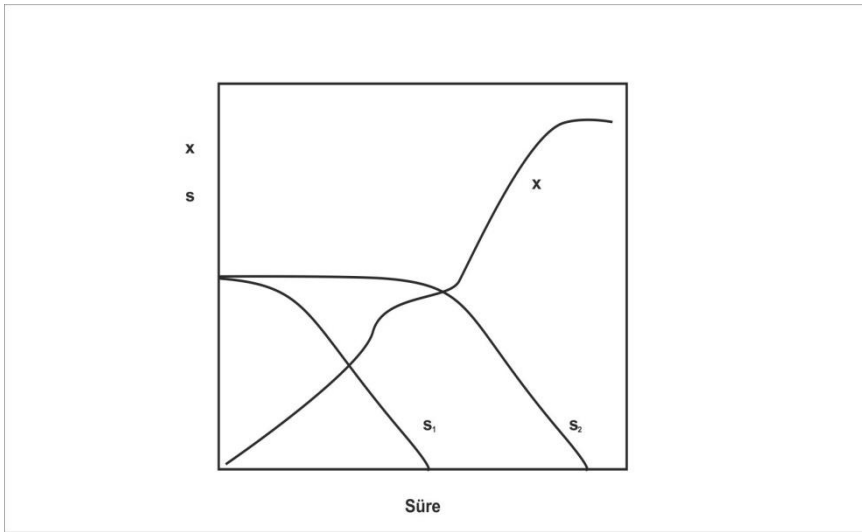
## 5. Suda Çözünmeyen Bileşiklerin Etkisi

Mikroorganizmalar gelişme için gerekli fakat suda çözünmeyen besinler üzerinde geliştirdikleri zaman, gelişme difüzyon hızı veya besinlerin çözünme hızları tarafından engellenebilir. Bu durum, hücrelerin havalı koşullarda çalkalamalı veya çalkalamasız geliştirilmelerinde açık biçimde gözlenebilir. Oksijen suda az çözünen bir gazdır ve oksijenin hava kabarcıkları halinde veya sıvı-hava yüzeyinden kültür ortamına taşınması gerekir. Çünkü gelişme hızı ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Çözülmüş oksijen konsantrasyonu kritik konsantrasyon değerinin altına düştüğünde mikroorganizmanın özgül gelişme hızında bir azalmaya neden olur. Bu kritik oksijen konsantrasyonu değeri mikroorganizma türüne göre değişir. Örneğin, bakteri ve mayalar için bu değer hava doymuşluğunun %3-10'u arasında olup, küfler için daha yüksektir ve hava doymuşluğunun %10-50'si arasında değişebilir.

## 6. Çoklu Karbon kaynaklarında ve Kompleks Ortamlarda Mikroorganizmaların Gelişmeleri

Şekil’de görülen gelişme kurvesi, birtek karbon ve enerji kaynağı ile belirli ortamda gelişen mikroorganizmalar için tipik bir gelişme modelidir. Mikroorganizmanın özgül gelişme hızı kullanılan karbon kaynağına sıkıca bağlıdır. Birden fazla karbon ve enerji kaynağı içeren ortamlardaki kesikli kültürlemede, genellikle belli bir süre için karbon kaynaklarından yalnızca biri kullanılacaktır. Yaygın olarak bilinen bir örnek mikroorganizmaların glikoz ve laktoz içeren bir ortamda geliştirilmeleridir.

Böyle bir ortamda gelişme ve substrat kullanımının kinetiği Şekil’de görülmektedir.



Şekil ... İki karbon ve enerji kaynağı içeren bir ortamda kesikli gelişme

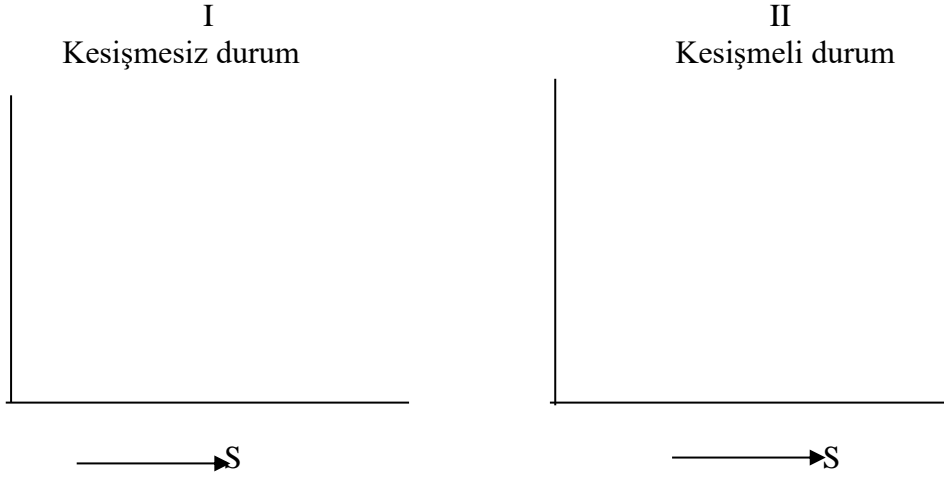
Bu tip iki gelişme fazına sahip davranış “diauxic” gelişme olarak isimlendirilir. Glikoz çok kolay kullanılan bir karbon kaynağı olup, öncelikli kullanılır ve daha sonraki laktoz kullanımı üzerinde katabolik baskıya sebep olur.

Eğer ortamdaki karbon substratlarının sayısı ikiden de fazla ise, birbirini izleyen gelişme hızlarındaki azalma ile birlikte bir seri halinde gelişme fazları gözlenir. Yalnızca çoklu karbon kaynağı değil, aynı zamanda amino asitler, nükleotidler, vitaminler ve diğer metabolik ara ürünler gibi çeşitli bileşenler içeren kompleks bir ortamda, hücreler gelişmeleri sırasında birçok geçiş devreleri gösterirler. Hücreler önceden ilave edilen ara ürünlerin bulunduğu ortamlarda geliştirilirse bu bileşenleri katalize eden enzim sistemleri, bu bileşenler tamamen kullanılana kadar sentezlenmez. Bu nedenle, gelişme kompleks ortamlarda gerçekleştirildiğinde, hücre ortamdaki yararlanabileceği ara ürünleri sırasıyla tüketilir ve zamanla daha fazla enzim sentezine gereksinme duyulur. Böylece önceden oluşturulmuş ara ürünler ve kolay kullanılabilen besinler tüketilip gelişme hızı azalır.

## 7. Birden Fazla Mikroorganizma Türü İçeren Karışık Kültürler

Fermantasyon teknolojisinde genellikle belirli ve tek türden mikroorganizmalar kullanılıyorsa da toprakta, sularda, atık suların arıtılmasında kullanılan aktif çamurda birden fazla türde mikroorganizmalar birarada bulunurlar. Bu bakımdan gıda endüstrisinin bazı dallarında suların biyoteknolojik yöntemlerle arıtılmasında ve bazı fermantasyonlarda (örneğin aspartik asit üretimi) karışık mikroorganizmaların (mixed culture) kinetiği bilinmelidir. Burada basit olması amacıyla, 2 tür mikroorganizmanın birlikte geliştiği kültürlere uyan kinetik bağıntılar üzerinde durulacaktır. Daha çoklu mikroorganizma toplulukları için de ilke aynıdır.

Kesikli kültürde ayrı türdeki mikroorganizmalar kendi gelişme ve üreme hızlarına göre fiziksel ve kimyasal çevre koşullarına bağımlı olarak gelişirler. Ancak, bu sırada bir türün oluşturduğu ürün kendisini inhibe ettiği gibi öteki tür mikroorganizmanın gelişmesini de engelleyebilir. Kültür ortamında bulunan herhangi bir "S" substratının her iki tür mikroorganizma için gelişmeyi sınırlayıcı substrat olduğu düşünülürse; A ve B türündeki mikroorganizmalar için  $\mu$  ile S ilişkisine ait çizilen Monod grafikleri Şekil 4.5'dekiler gibi olabilir.



Şekil ... İki ayrı tür (A ve B) mikroorganizmanın Monod gelişme grafikleri

Eğer A türünden oluşan ürün yalnız A türü mikroorganizmaları inhibe ediyor, B türüne herhangi bir etki yapmıyorsa;

$$\mu_a = \frac{\mu_m(a) S}{K_s(a) + S}$$

$$\mu_b = \frac{\mu_m(b) S}{K_s(b) + S}$$

bağıntıları geçerli olur. Burada;

$$\alpha = (1 + \frac{\quad}{K_i})$$

olarak alınmıştır.

P = 0 iken, yani fermentasyonun başında  $\mu_a > \mu_b$  ise A giderek inhibe olacağı için belirli bir ürün konsantrasyonuna ulaşıldığı zaman  $\mu_a = \mu_b$  olur. Bu durum Şekil II' de görülen kesişmeli duruma uymaktadır.

A türünün ürünü B türünü de inhibe ediyorsa;

$$\mu_b = \frac{\mu_m(b) S}{\alpha' K_s(b) + S}$$

olacaktır. Burada  $\alpha'$  aşağıdaki bağıntı ile belirlenmektedir.

$$\alpha' = (1 + \frac{P}{K'_i})$$

A'nın ürünü B'yi aktive ediyorsa, A ve B türü mikroorganizmaların gelişmelerinde Monod bağıntısının aşağıdaki şekilleri geçerli olur.

$$\mu_a = \frac{\mu_m(a) S}{K_s(a) + S}$$

$$\mu_b = \frac{\beta \mu_m(b) S}{K_s(b) + S}$$

Burada  $\beta$  aktivatör olarak hareket eden ürünün ve mikroorganizmanın türüne ilişkin bir katsayıdır.

P = 0 iken  $\beta = 1$  dir.  $\mu_b < \mu_a$  ise bu durumda "P" arttıkça  $\beta$ 'da artacak ve belirli bir süre sonra  $\mu_b = \mu_a$  olacağı için gene kesişmeli bir grafik gözlenecektir.

Bir mikroorganizma türünün (örneğin A'nın) oluşturduğu ürün öteki türün (bu örnekte B'nin) substratı ise B türü mikroorganizmaların gelişmesi zamanla gene hızlanır. Bu durumda;

$$\mu_b = \frac{\mu_m(b) P}{K_s(b) + P}$$

bağıntısı geçerli olur.