

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.

Mikroorganizmalar gereksinimleri olan enerjiyi, ortamda bulunan bazı bileşiklerin kimyasal bağlarındaki depolanmış enerjiyi kullanarak sağlarlar. Bunlar organik veya inorganik maddeler olabilir. En iyi enerji kaynakları karbonhidratlardır.

İkinci beslenme faktörü ise biyokütle oluşumu ve biyosentez için gerekli olan C, H, O, N, P, S gibi ana elementler ve iz elementlerdir. Bunlar substrat içinde basit bileşikler halinde bulunabileceği gibi kompleks bileşikler halinde de bulunabilirler.

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

1. Substrat İçinde Bulunan Temel Bileşenler

Substrat içinde bulunan bileşenler temel fonksiyonlarına göre; karbon, azot kaynakları, inorganik bileşikler ve vitaminler olarak gruplandırılır.

a- Karbon kaynakları:

Karbon kaynaklarının başında karbonhidratlar gelir. Biyokütle yaklaşık %50 C içerdiğinden, karbonhidratlar besiyerlerinde diğer besin maddelerinden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar ve çok iyi oksijen, hidrojen ve metabolik enerji kaynaklarıdır.

Bazı karbon kaynakları gelişmeyi artırır, fakat bunun yanısıra biyosentez hızı yavaşlar. Karbonhidratların mikroorganizmalar tarafından metabolize edilme kolaylığı heksozlardan polisakkaritlere doğru gidildikçe azalır. Böyle durumlarda gelişmeyi artıran karbonhidrat ile birlikte biyosentez hızını artırıcı etki gösteren karbonhidrat da ortamda bulunmalıdır.

En önemli karbonhidrat kaynakları glikoz, sakkaroz, melas, mısır, buğday, patates, pirinç, arpa, yulaf nişastaları ve unlarıdır. Melas karbonhidrat kaynağı olmasının yanısıra azot, inorganik bileşikler ve vitaminler de içerdiğinden ucuz ve iyi bir hammadDEDİR.

Bunların dışında hidrokarbonlar; yağlar, alkoller, selüloz ve türevleri de mikroorganizmaların cinslerine göre substrat içerisinde karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmaktadır.

b- Azot kaynakları:

Hücre yapısında karbon ve oksijenden sonra en fazla bulunan element azottur. Azot kaynakları inorganik veya organik olabilir. Çoğu mikroorganizma moleküler azotu, nitratları, nitritleri, amonyağı azot kaynağı olarak kullanabilir. Amonyak, aynı zamanda fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutma amacı ile de kullanılabilir.

Mikroorganizmaların büyük çoğunluğu organik azot kullanırlar. Organik azot kullanımı hücrenin gelişme hızını artırır. Fazla kullanımı olumlu etki gösterebileceği gibi üretim verimini de düşürebilir.

Organik azot kaynaklarının başlıcaları amino asitler, pürinler, pirimidinler, üre, bitkisel ve hayvansal proteinlerdir. Bu proteinler gıda ve tarım endüstrisinin yan ürünleri olup, saf azotlu bileşiklerden daha ucuz olmalarının yanısıra, hücre gelişmesi için gerekli olan vitaminleri, çeşitli mineralleri ve çeşitli büyüme faktörlerini de içerirler.

Substratta bulunan azot kaynağının hücre tarafından kolayca kullanılabilir olması dikkate alınmalıdır. Örneğin proteinler, yalnızca hücre dışı proteazlar salgılayarak proteinleri enzimatik olarak aminoasitlere hidrolize edebilen mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir. Bu özelliği olmayan mikroorganizmanın protein hidrolizatlarına, peptonlara veya proteinli maddeleri asit veya enzimlerle hidroliz etmek suretiyle hazırlanmış ve serbest amino asitleri içeren azotlu maddelere gereksinimleri vardır.

c- İnorganik bileşenler:

Biyokütlenin ortalama %5-10'u küldür. Külün büyük bölümünü fosfor (%60) ve kükürt (%20) oluşturur. Ayrıca K, Mg, Na, Ca, Fe, Mn, Mo, Co, Zn, Cl gibi elementler bulunur. Fosfor en fazla şeker fosfatları, kükürt ise en çok sistin ve methionin aminoasitlerinde bulunur. Diğer elementler çoğunlukla enzimlerle kompleks halde bulunur.

Mikroorganizmaların mineral gereksinimlerini tam olarak bilmek her zaman gerekli değildir. Çünkü endüstriyel karbon ve azot kaynaklarının çoğu, hatta şehir suyu yeterli miktarda mineral içerir. Bazan bu maddeleri azot, fosfat ve sülfatlarla, nadiren de Mg ile takviye etmek gerekebilir.

d- Vitaminler :

Koenzim veya koenzimlerin bileşikleri olarak vitaminlerin hücre içerisinde önemli katalitik fonksiyonları vardır ve metabolizma için gereklidir. En sık gereksinme duyulan vitaminler thiamin, biotin, niasin, pantotenat, riboflavin ve B₆ vitaminleridir.

Vitaminler endüstriyel fermantasyonlarda kullanılan karbon ve azot kaynaklarının içinde çoğunlukla yeterli miktarda bulduklarından, ayrıca substrata ilave edilmeleri gerekmez.

e- Diğer katkı maddeleri:

Bütün bunların dışında substrata, çeşitli amaçlara yönelik katkı maddeleri ilave edilebilir:

- Aşırı gelişmeyi yavaşlatan (misel artış hızını yavaşlatan), metabolik ürünün biyosentez hızını artıran maddeler (inhibitör). Örneğin; antibiyotik fermantasyonlarında bu amaçla benzil-tiyosiyanat kullanılmaktadır.
- Biyosentez kademelerinde reaksiyona giren ve ürün verimini artıran maddeler (prekürsörler). Örneğin; klortetrasiklin fermantasyonunda ortama tuz ilavesi, penisilin G fermantasyonunda fenilalalin, fenilasetik asit ilavesi,
- Fermantasyon pH'sını istenen düzeyde tutmak için ilave edilen asit, baz veya tampon karakterinde maddeler.
- Köpürmeyi azaltıcı yüzey aktif maddeler (bitkisel ve hayvansal yağlar, silikonlar vb).

2. Hücre Bileşimi

Substrat formülasyona girmeden önce hücre bileşiminin açıklanması yararlı olacaktır. Genellikle, hücre bileşimi ile ilgili detaylı elementel analizler burada belirtilmeyecek, fakat kullanılacak değerler substrat formülasyonunda bir rehber niteliğinde olacaktır. Bir mikroorganizma hücresinin tipik elementel bileşimi Tablo 5.1'de görülmektedir. Mikrobiyal gelişme için kullanılacak herhangi bir ortam, en azından, bu elementleri uygun oranda içermelidir.

Tablo1. Mikroorganizmaların tipik elementel bileşimi

Element	Hücre kuru ağırlığına göre %
Karbon	50
Azot	7-12
Fosfor	1-3
Kükürt	0,5-1,0
Magnezyum	0,5

Karbon, oksijen ve hidrojen hariç substrat içerisindeki besinlerin formülasyonu Tablo 5.1'deki verileri esas alır. Örneğin; azot ve kükürt kaynağı olarak amonyum sülfat kullanılarak 30 g/L maya hücresi kitlesinin sentezi arzulanıyorsa, 12 g/L $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ' in ortamda bulunması gereklidir. Bu miktar $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 2,4 g/L azot ve 3.0 g/L kükürt sağlayacaktır. Azot gereksiniminin temin edilmesi ile kükürt gereksiniminin fazlaca karşılanabileceği görülmektedir.

Benzer bir hesaplama, 3,0 g/L hücre biyokütlesinin sentezi için Tablo 5.2'de görülen minimal ortamın düzenlenmesine olanak verir.

Tablo 2. Seçilmiş bir karbon kaynağından 30 g/L maya üretimi için düzenlenmiş bir gelişme ortamı

Ortam Bileşenleri	Konsantrasyon (g/L)
Karbon enerji kaynağı	
Metanol	60.0
Etanol	40.0
Glikoz	60.0
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	12.0
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	1.3
MgSO_4	1.5
İz elementler	
(Cu, Co, Fe, Ca, Zn, Mo, Mn)	10^{-4}M

Biyokimyasal ko-faktörler veya yapısal komponentler olarak iz elementlere de gereksinim duyulmaktadır. Fakat bu elementlere olan gereksinimi tahmin etmek çok zordur. Buna rağmen, bir kural olarak, Tablo 5.2.'de görülen iz elementler 30 g/L hücre için 10^{-4}M , 3 g/L hücre için 10^{-5}M konsantrasyonlarında ilave edilebilirler. Bazı mikroorganizmaların bir veya daha fazla iz elemente normalden daha fazla ihtiyaç duyulabileceği, ayrıca hatırlanmalıdır.

3. Özel Biyokimyasal Gereksinimler

Birçok mikroorganizma basit mineral tuzları içeren ortamlarda iyi gelişebilirlerse de, bazıları bir veya daha fazla özel biyokimyasal bileşiklere gereksinim duyarlar. Bu bazı mikroorganizmaların gereksinim duydukları tüm biyokimyasal bileşikleri kendilerinin sentezleyememesinden kaynaklanmaktadır. En fazla gereksinim duyulanlar vitaminler ve aminoasitlerdir. Örneğin; mayalar çoğunlukla biotin, tiamin ve riboflavine gereksinim duyarlar. Bazı mikroorganizmalar oldukça müşkülpeştir ve 10-12 tane biyokimyasal komponentin besiyerine ilavesi gerekir. Genellikle, vitaminlere olan gereksinim az miktarlardadır ve bunlar tipik olarak litreye "mg" düzeyinde ilave edilirler.

4. Enerji Gereksinimleri

Mikroorganizmalar temel kimyasal maddeleri kompleks moleküllere çevirirlerken bu reaksiyon serilerini gerçekleştirebilmek için, enerji kullanmaya gereksinim duyarlar. Çoğunlukla, bu enerji indirgenen organik bileşiklerin kontrollü oksidasyonu ile temin edilir. Bu tür karbon bileşikleri hücrelerin elementel karbon gereksinimlerini karşılamalarının yanısıra, biyosentez enerjisi üretmek amacıyla da kullanılırlar. Biyosenteze ilave olarak; hücre yapısının muhafazası, moleküllerin aktif transportu, hücre ve çevresi arasındaki konsantrasyon değişimlerini dengelemek ve bazen hücre hareketi için de enerjiye gereksinim duyulur.

Bu nedenlerle, besiyeri ortamında tüm bu gereksinimleri karşılayacak yeterli karbon kaynağı bulunmalıdır. Hücre gelişmesi için karbon kaynağı gereksiniminin hesaplanması, arzulanan hücre yoğunluğunun ümit edilen hücre verimine ($Y_{x/s}$) bölünmesi suretiyle yapılır. Örneğin; verim 0,5 g hücre/g metanol olduğu zaman, metanolden 30 g/L hücre elde etmek için, Tablo 5.2'de görüldüğü gibi, 60 g/L metanole gereksinim duyulur.

Temel besinlerden biri olan oksijen, suda zor çözünen bir gaz olduğundan, fermantasyonda özel bir kütle transferi sorunu getirir. Bununla birlikte, oksijen gereksiniminin mikroorganizmaya, karbon kaynağına ve kullanımındaki etkinliğe bağlı olduğu söylenebilir.

5. 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 edilmelemdir.
- 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- Substrat 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.