

KİM 458

Biyoteknolojinin Temelleri

Fermentasyonun Teknik Prensipleri, Biyoteknolojide Temel Yöntemler

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Fermentasyonun Teknik Prensipleri

- Sterilizasyon

Biyoteknolojik bir üretim ortamında genelde yalnız görevli mikroorganizmanın bulunması istenir. Özellikle melas, soya gibi teknik hammaddeler çok sayıda mikroorganizma içerdiklerinden sterilizasyon şarttır.

Değişik bölgelerde havadaki ortalama mikroorganizma sayısı

| Bölge | M.O Sayısı/m ³ hava |
|--|--------------------------------|
| Açık arazi | 50 < |
| Yoğun yerleşim bölgeleri ve iyi havalanmayan kapalı yerler | 2000 |
| Fermentör çıkış gazı | 1,500,000 |
| Hiçbir işlemde geçmemiş akarsu | 10,000 |

Fermentör Sisteminin Temizlenmesi

- Bir fermentasyona başlamadan önce ilk yapılacak iş fermentör sisteminin temizlenmesidir. Pratikte bu temizlik üç şekilde yapılır.
 - Mekanik ve hidrolik temizleme
 - Seyreltik alkali ile pişirme
 - Formaldehit ile pişirme

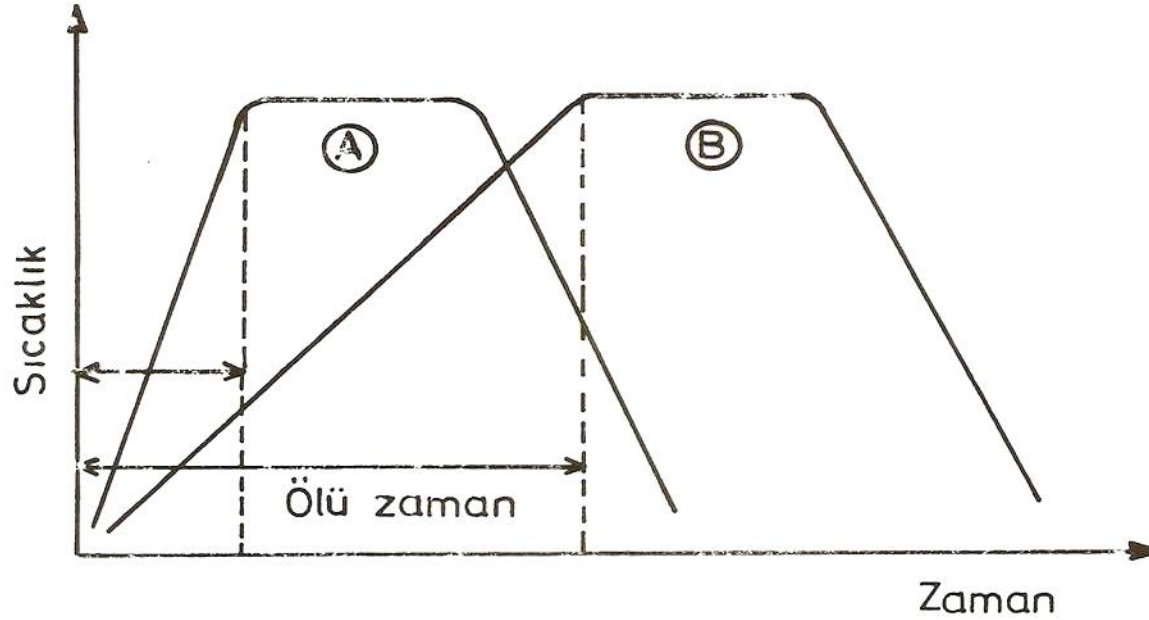
Mikroorganizmaların Öldürülmesi

- Mikroorganizmaların öldürülmesinde yabancı mikroorganizmaların aktivitesinin düşürüleceği düzeye göre farklı teknikler uygulanır.
 - **Dezenfeksiyon:** Sadece istenmeyen organizmaları öldürme işlemidir.
 - **Pastörizasyon:** Özellikle gıda endüstrisinde uygulanır. İstenmeyen mikroorganizmalar sporlar öldürülmeden yok edilirler.
 - **Sterilizasyon:** Tüm canlı mikroorganizmaların kesinlikle öldürülmesini amaçlar.

Termik Sterilizasyon

- Termik sterilizasyonun uygulanmasında aşağıdaki kriterleri göz önünde bulundurmak gerekir.
 - Mümkün olabilecek en düşük sıcaklıkta sterilizasyonu gerçekleştirerek enerji kaybını azaltmak,
 - Sterilizasyon süresi fermentör için ölü zamandır. Bu sebeple, tesisin verimliliğini arttırmak için sürenin olabildiğince kısaltılması gerekir.
 - Termik işlemler besi ortamının bileşimine zarar vereceğinden düşük sıcaklıkta ve yavaş ısıtmak gerekir.

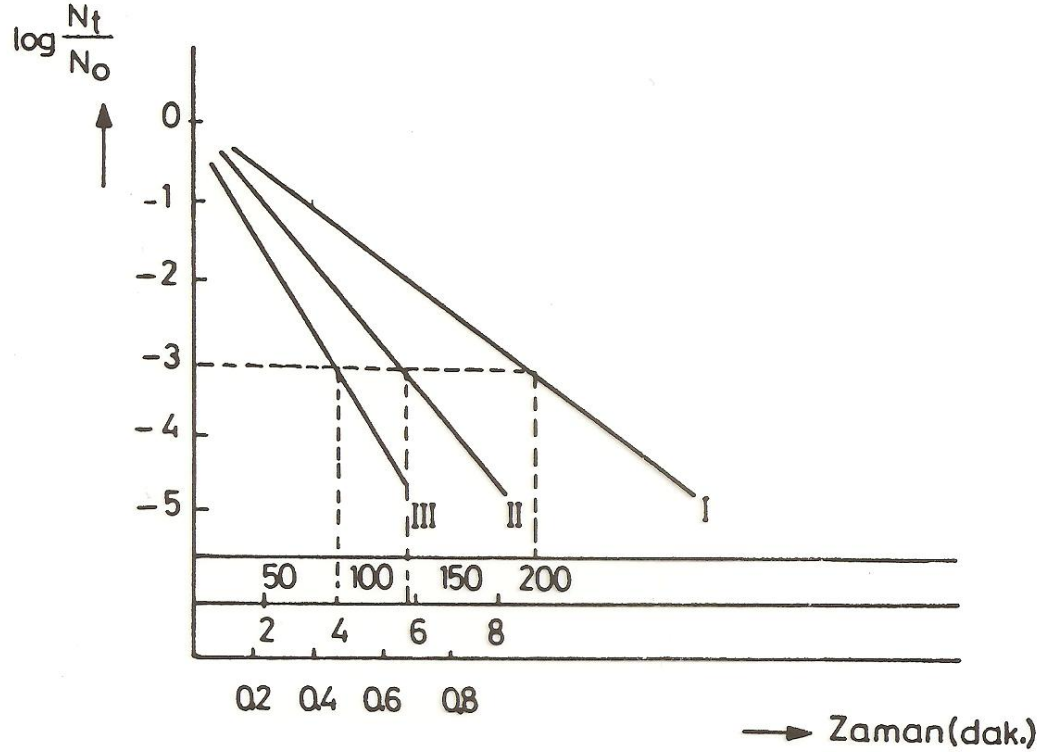
Termik Sterilizasyonda Sıcaklık Profilleri



Termik sterilizasyonda sıcaklık profilleri.
(A): hızlı ısıtma, (B): yavaş ısıtma

$$\frac{dN}{dt} = -Nk_T(\text{zaman}^{-1}) \text{ veya } \frac{dN}{N} = -k_T \cdot dt$$

Sporların sulu ortamda değişik sıcaklıklarda canlı kalabilme diyagramları



(I): 104,5 °C, $k_T = 0,57 \times 10^{-3} \text{ sn}^{-1}$,

(II): 120 °C, $k_T = 0,02 \text{ sn}^{-1}$

(III): 132 °C, $k_T = 0,25 \text{ sn}^{-1}$

Fermentasyon Teknikleri ve Biyoreaktörler

- Biyoreaktör hücre çoğalmasını, büyümesini ve metabolit üretimini garantileyecek koşullara sahip olmalıdır (Optimum pH, yeterli O₂, tuz ve substrat temini gibi).
- Fermentasyon tekniği,
 - Yüzey kültür tekniği
 - Derin kültür tekniği, ile gerçekleştirilir ve biyoreaktörler de uygulanan tekniğe göre şekillenirler.

1. Yüzey Kültür Tekniği

- Yüzey kültür tekniğinde mikroorganizmalar besi ortamının yüzeyinde çoğalır ve yüzeyde mikroorganizma hücreleri ve bunların metabolitlerinden ibaret bir tabaka veya mantarlarda bir misel örtüsü oluşur. Metabolitlerin besi ortamına diffüzlenmesi de mümkündür.

Yüzey kültür tekniğinin sakıncaları,

- Misel tabakasının duyarlılığı
- Fermentasyon süresinin uzunluğu
- Kapasitenin düşüklüğü
- Operasyonun zorluğu
- Prosesin otomatik kontrol imkanının çok düşük oluşudur.

Mayalanma Tepsili Reaktör

- Katı besi yerinde mikroorganizmaların çoğalması katı fazdaki difüzyonun hızı tarafından kontrol edilmektedir.
- Bu engel, mayalanma tepsili reaktörde jelimsi besi ortamı yerine sıvı besi ortamı kullanılarak önemli ölçüde aşılmıştır.

2. Derin Kültür Tekniği

- Derin kültür reaktörleri uygulanan karıştırma ve havalandırma şekline göre üç grupta incelenebilir:
 - Mekanik karıştırmalı biyoreaktörler
 - Konveksiyon akımlı biyoreaktörler
 - Pnömatik alıřan biyoreaktörler

Karıştırmalı Fermentör Sistemi

Mekanik Karıştırmalı Biyoreaktörler

Konveksiyon Akımlı Biyoreaktörler

Pnömatik Çalışan Biyoreaktörler

Biyoteknolojide Temel İşlemler

- Ayırma

- **Flokulasyon ve Flotasyon**

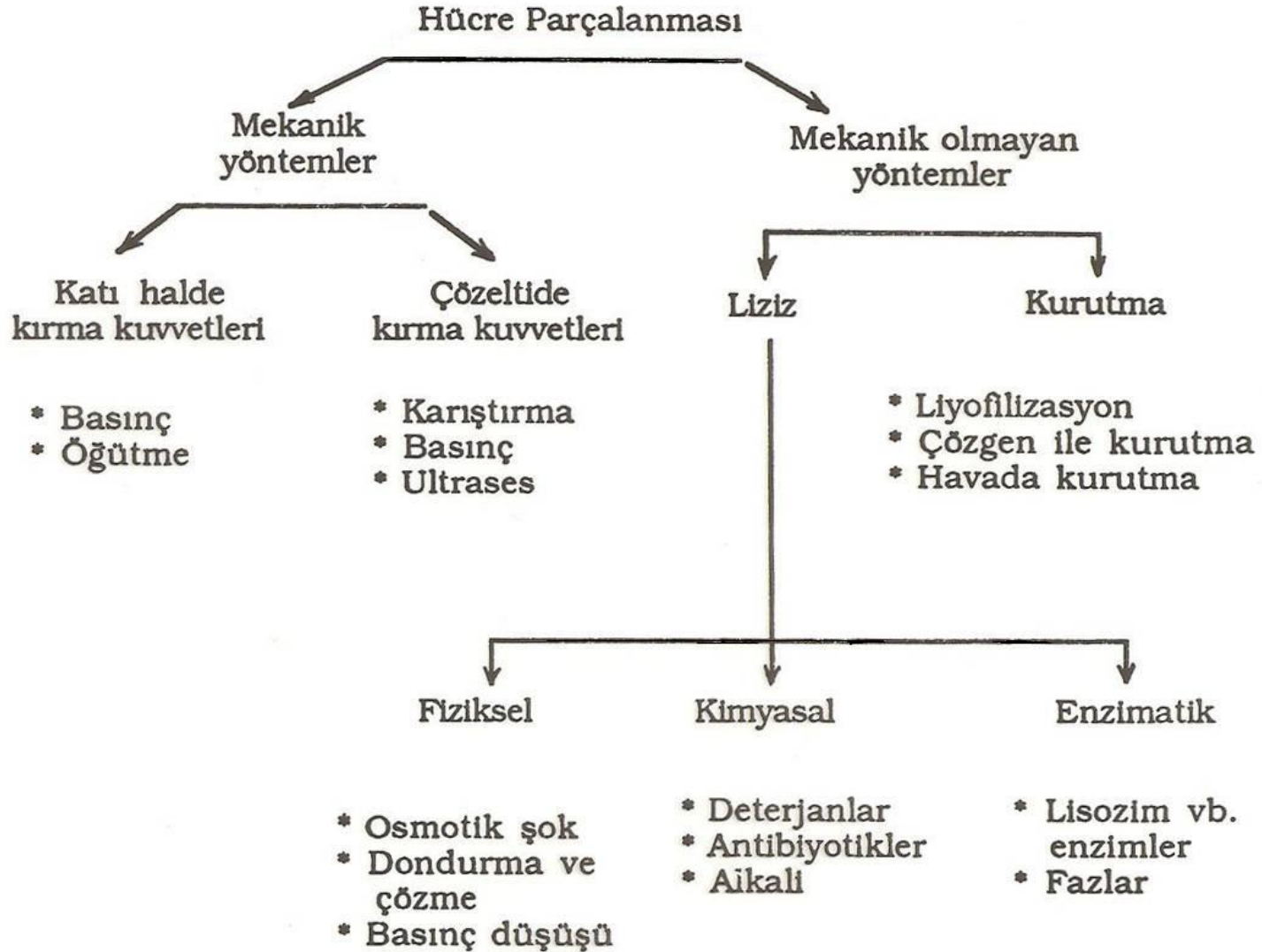
- Flokulasyon: Çökelme ile ortamdan ayırma (pH, sıcaklık, iyon şiddeti, yüzey gerilim kuvveti, hücre yaşı, organizma türü)
 - Flotasyon: Gaz habbeciklerinde adsorplama (habbecik boyutu)

- **Filtrasyon**

- Yüzey filtrasyon, Derin filtrasyon, Elek filtrasyonu

- **Santrifüjleme**

Hücre Parçalama Yöntemleri



Zenginleştirme

1. Ekstraksiyon:

Maddenin fazlar arası dağılım farkına dayanır.

$$k_D = \frac{C_{\bar{u}}}{C_a}$$

k_D : Maddenin fazlar arası dağılıma katsayısı

$C_{\bar{u}}$: Üst fazdaki konsantrasyon

C_a : Alt fazdaki konsantrasyon

Etkin maddenin ekstraksiyon faktörü aşağıdaki ifade ile verilir.

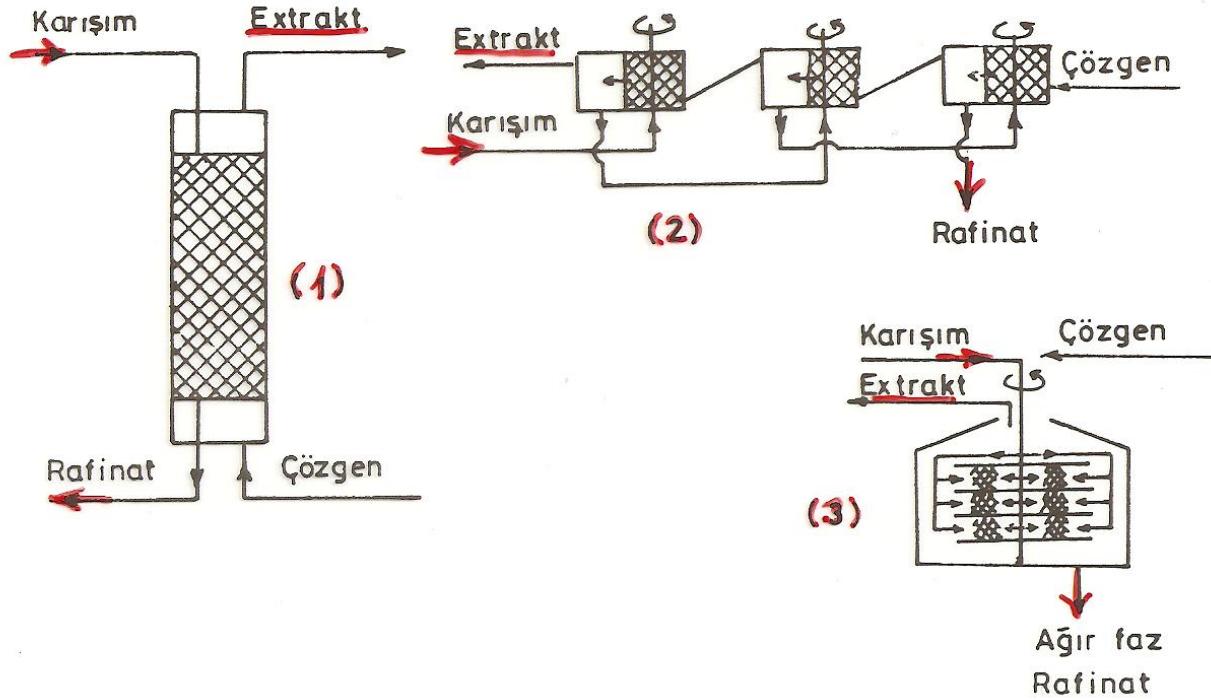
$$E.F. = k_D \frac{\% V_{\bar{u}}}{\% V_a}$$

E.F. : Ekstraksiyon faktörü

$\% V_{\bar{u}}$: Üst fazın hacımsal yüzdesi

$\% V_a$: Alt fazın hacımsal yüzdesi

Bazı Ekstraktör Tipleri



Çok kullanılan ekstraktör tiplerinin şematik gösterimi.

- (1): Ekstraksiyon kolonu
- (2): Terk akım ekstraktörü
- (3): Ekstraksiyon santrifüjü

2. Termik Yöntemlerle Deriştirme:

Biyoürünlerin termal kararlılıkları düşük olduğundan işlemin kısa sürmesi özel bir önem taşır. Kısa sürede ve nispeten düşük sıcaklıklarda deriştirme geniş yüzeyli vakumlu buharlaştırıcılar ile başarılır. Fakat bu aletlerin temizlenmesi çok zordur ve enerji tüketimi fazladır. Ayrıca köpük oluşumu buna bağlı olarak vakum ve yoğunlaştırıcı kısımlarında kirlenmeler önemli bir problem oluşturur.

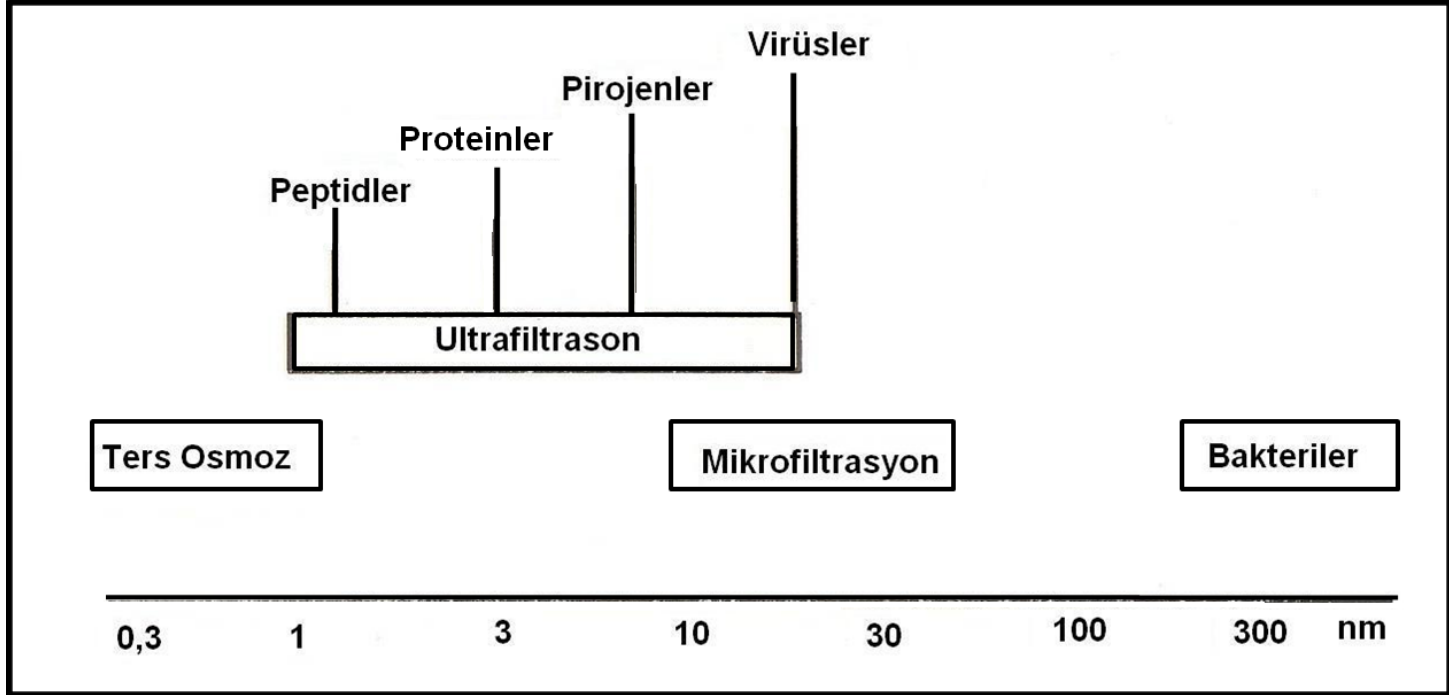
3. Membran Filtrasyonu

Çözünmüş partiküllerin konveksiyon vasıtasıyla mebran yüzeyine transportudur. Etkin olan büyüklük osmotik basınçtır.

Uygulamada üç önemli teknik vardır:

- Ultrafiltrasyon: 10^3 - 10^6 D M_A ' lı maddeler ayrılabilir.
- Ters Osmoz: Tuzlar tutulabilir.
- Elektrodializ

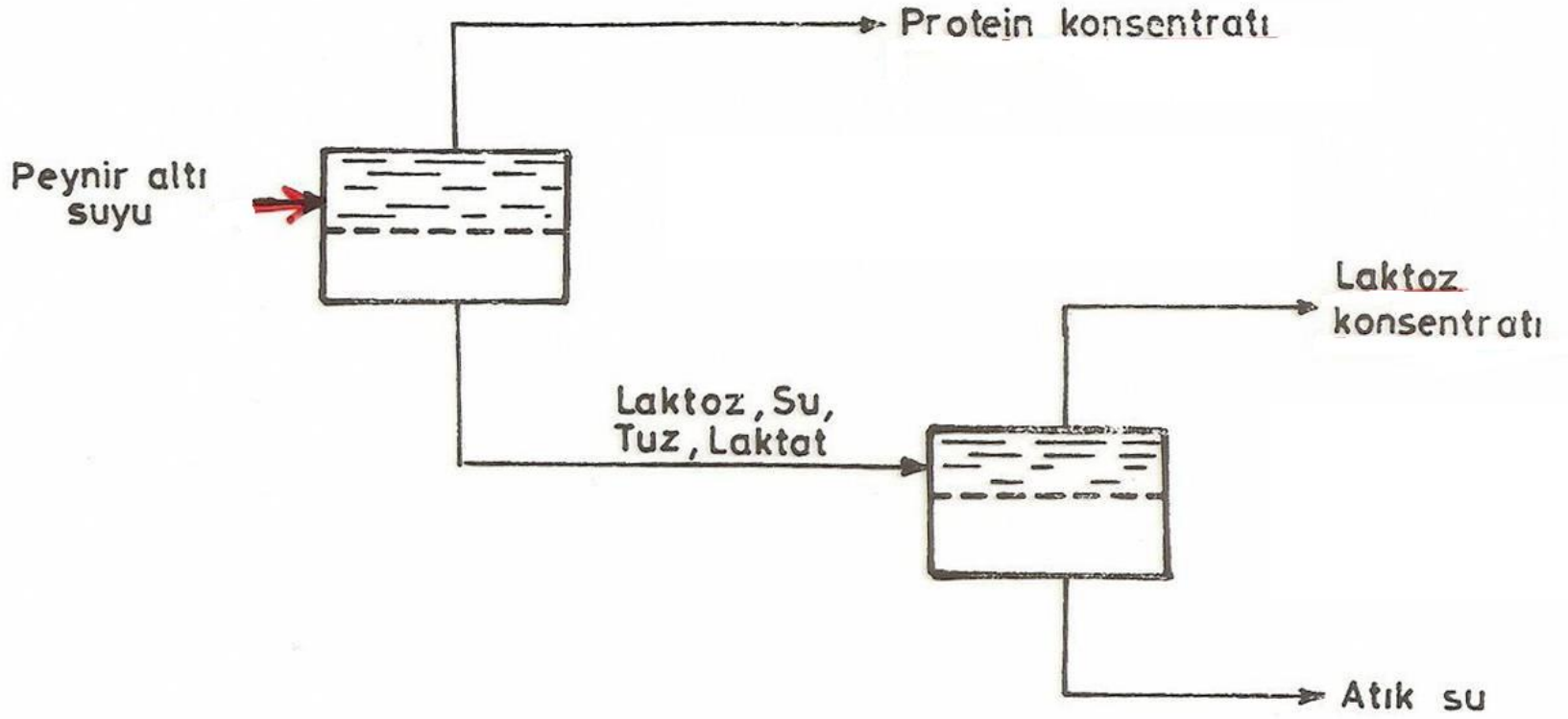
Bazı Membranların Gözenek Çapı



Değişik membranların gözenek çapı (nm) ve alıkonan maddeler

Ultrafiltrasyon ile ters osmoz arasındaki önemli farklar:

| Parametre | Ters osmoz | Ultrafiltrasyon |
|-----------------------------------|--|--|
| Alıkonan çözünmüş partikül boyutu | Mol.kütle <500-1000 | Mol.kütle >1000 |
| Osmotik basınç | Önemli, 80-100 kg/cm ² ye kadar ulaşabilir. | İhmal edilebilir. |
| Çalışma basıncı | >10-150 kg/cm ² | < 10 kg/cm ² |
| Temel olaylar | Diffüzyon ile transport, membran materyali transport özelliğini etkiler. | Molekül boyutuna göre ayırma, membran materyalinin etkisi yok, elek etkisini belirleyici büyüklük gözenek boyutudur. |



Membran filtrasyonu ile peynir altı suyundan protein ve laktoz üretimi

Diğer Zenginleştirme Yolları

- Çöktürme:

Bu yöntemle proteinlerin ayrılması ucuzdur fakat yöntemin seçiciliği düşüktür.

- Dondurarak deriştirme:

Ayrılacak maddeyi içeren çözeltiden saf suyun dondurularak uzaklaştırılması ve böylece çözeltinin deriştirilmesi esasına dayanır. Daha çok gıda endüstrisinde uygulanır.

4. Saflaştırma

- Kristallendirme:

Sitrik asit, bazı antibiyotik ve enzimlerin üretiminde uygulanır.

- Kromatografi:

- Tekniğin önemli avantajları şunlardır:

- Yüksek verim
- Otomasyon olanağı
- Sabit fazın tekrar kullanılması
- Steril ve pirojeniz sistemlerde çalışma

- Değişik tip kromatografik teknikler:

- Adsorpsiyon Kromatografisi
- İyon-değişim Kromatografisi
- Jel filtrasyonu
- Affinite Kromatografisi
- Hidrofobik Kromatografi
- Dağılma Kromatografisi

5. Kurutma

- Biyoteknolojik üretimlerde üç tip kurutma tekniği kullanılır:
 - Liyofilizasyon (Dondurarak kurutma)
 - Kontakt Kurutma (Hareketli tabakada)
 - Konveksiyon Kurutma (Sıcak hava akımıyla)

Kromatografik tekniklerin karşılaştırılması

| Teknik Adı | Etki Prensibi | Ayrırmanın Dayanağı |
|-----------------------------|--|----------------------------|
| Adsorpsiyon kromatografisi | Yüzeysel bağlanma | Yüzeysel affinite |
| İyon değişim kromatografisi | İyonik bağlanma | Elektriksel yük |
| Jel filtrasyonu | Gözenek diffüzyonu | Molekül şekli ve büyüklüğü |
| Affinite kromatografisi | Biyospesifik adsorpsiyon/ desorpsiyon | Molekül yapısı |
| Kovalent kromatografi | Kovalent bağlanma | Fonksiyonel gruplar |
| Hidrofobik kromatografi | Hidrofobik kompleks oluşumu | Molekül yapısı |
| Dağılım kromatografisi | Dağılım dengesi | Polarite |

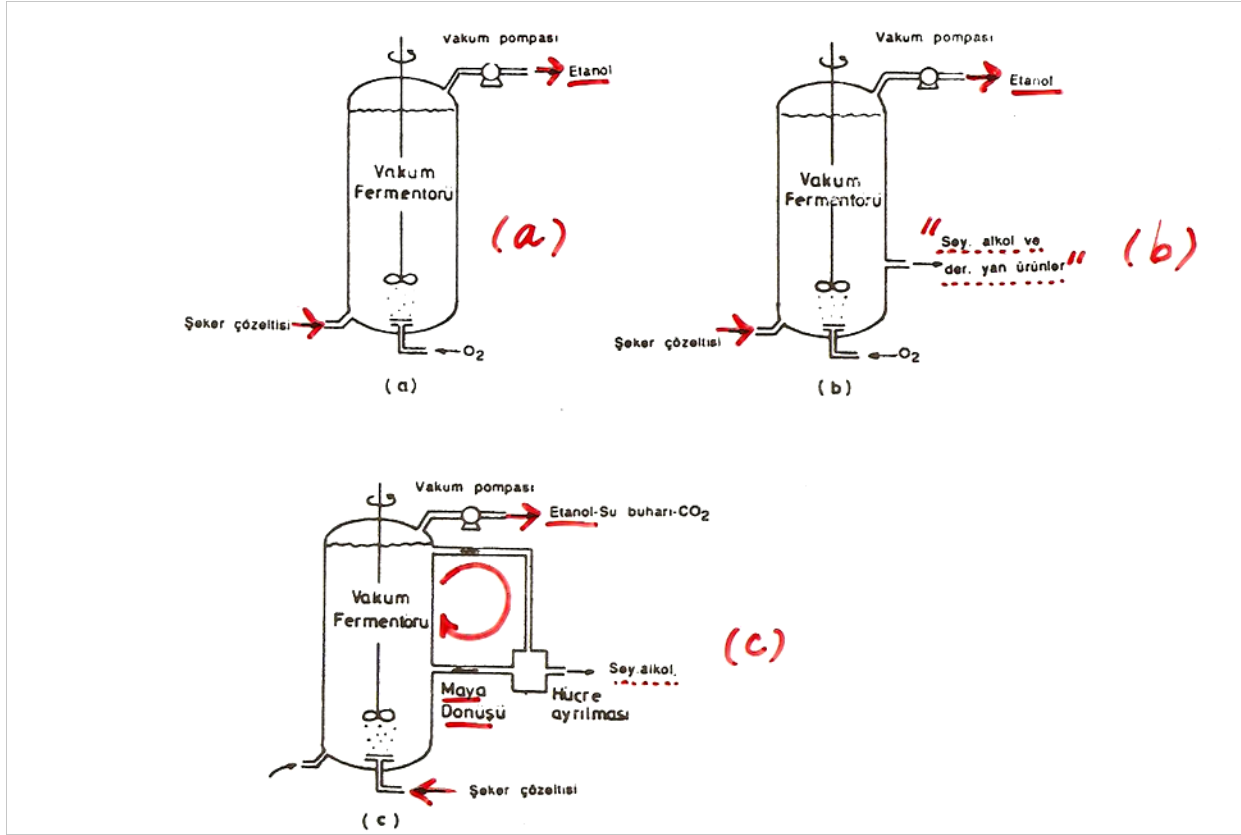
IN SITU ÜRÜN AYRILMASI

Verimliliği arttırmak ve atık su miktarını azaltmak için fermentasyon sürerken ürünün kesiksiz biçimde ayrılması gerekir.

Bu işle dört farklı teknikle gerçekleştirilir:

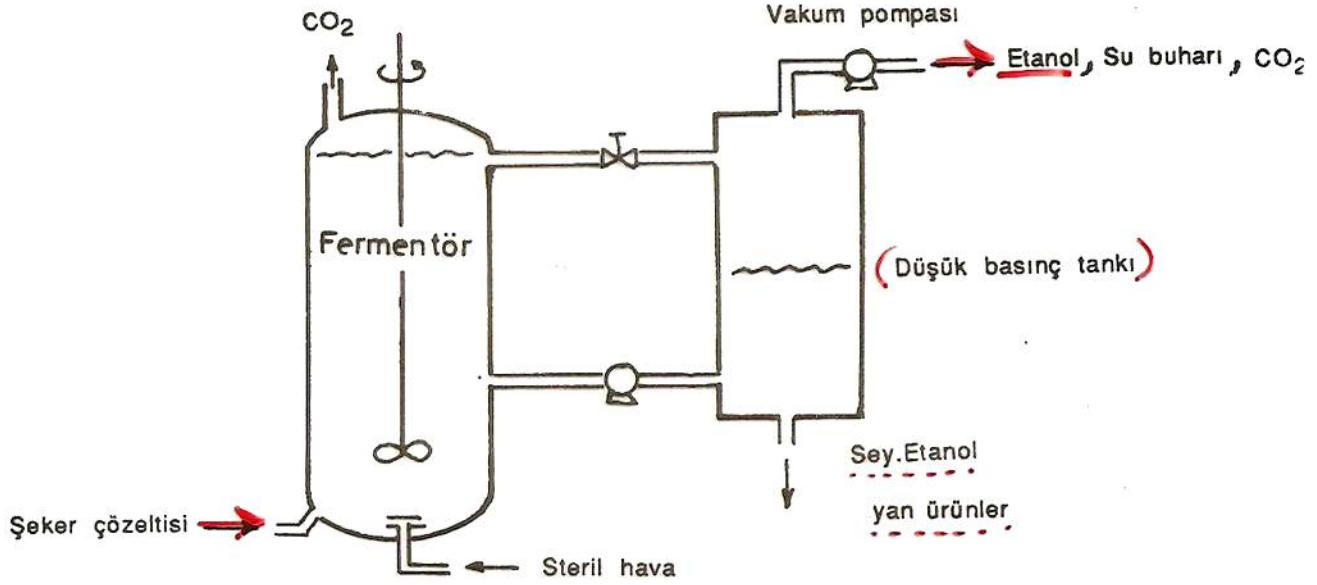
1. Vakum Fermentasyonu
2. Ekstraktif Fermentasyon
3. Diyaliz fermentasyonu
4. Adsorban destekli fermentasyon

1. Vakum Fermentasyonu



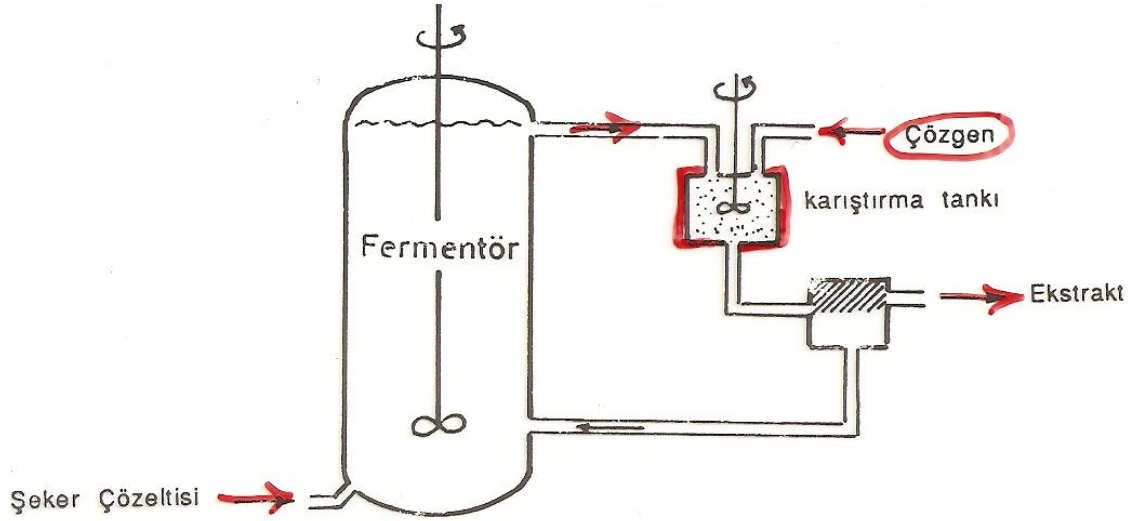
Vakum fermentasyonunun değişik türleri.

- a: Kesiksiz fermentasyon,
- b: Ortamın kısmen boşaltıldığı durum,
- c: Maya hücrelerinin fermentöre geri dönme durumu.



Kesiksiz flaş-fermentasyonu

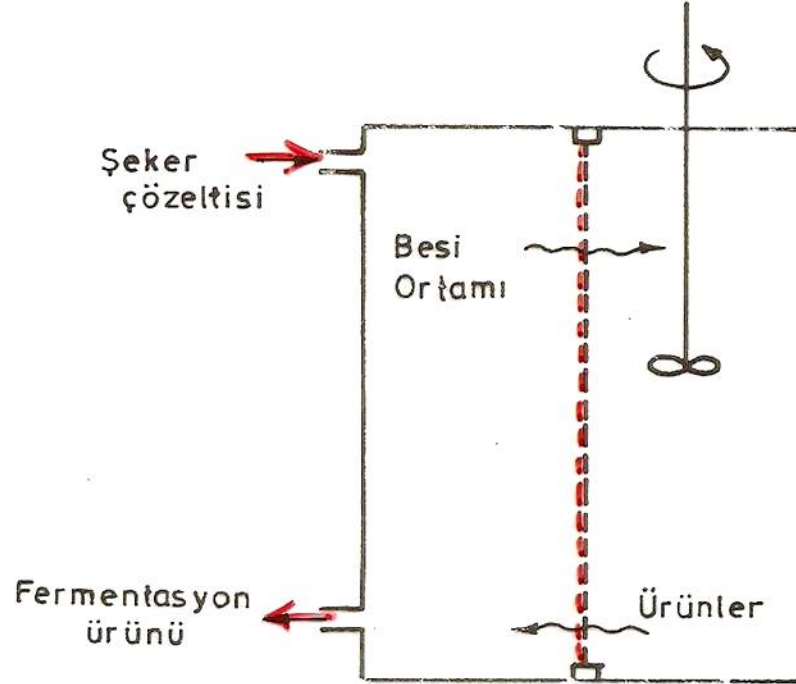
2. Ekstraktif Fermentasyon



Ekstraktif Fermentasyon

Biyöürünü iyi çözen ve hücrelere toksik olmayan çözümler kullanılır.

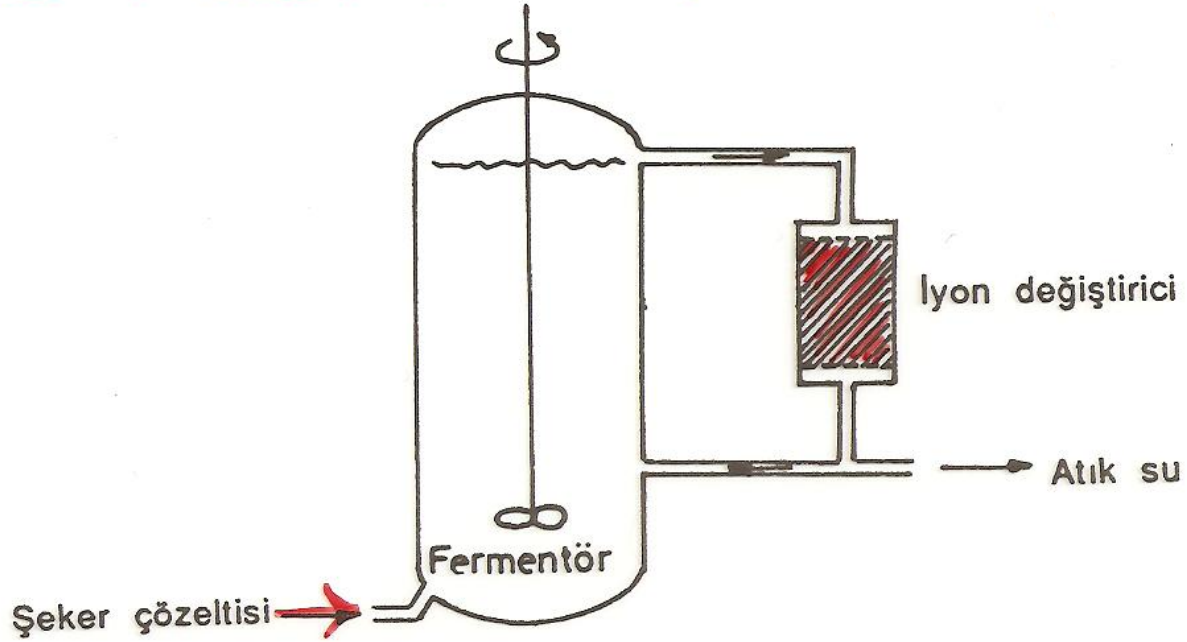
3. Diyaliz Fermentasyonu



Diyaliz-Fermentasyonun Prensibi

- + Ürün inhibisyonu engellenir.
- Düşük ürün konsantrasyonu, pahalı membranlar, tıkanmalar

4. Adsorban Destekli Fermentasyon



Adsorpsiyon vasıtasıyla ürünün ayrıldığı kesiksiz fermentasyon

(İyon-deęiřtirici)