Sitrik Asit Üretiminde Katkı Maddelerinin Verim Üzerine Etkisi (1)

Prof. Dr Hilmi PAMİR
A.Ü.Z.F. Fermantasyon
Teknolojisi Kürsüsü

Necla AYTEKİN
TBTAK Marmara Araştırma
Enstitüsü

1. Giriş

Oksidatif fermantasyonlar grubundan önemli bir fermantasyon da sitrik asit fermantasyonudur. Bugün teknikte sitrik asit biyolojik yolla elde edilmektedir. Bu amaçla mikroorganizma olarak küf mantarları kullanılır. Birçok küf mantarı sitrik asit oluşturdukları halde **Aspergillus niger**'in suşları tercih edilir

Sitrik asit üretiminde substrat olarak daha ziyade şekerler söz konusudur. Şekerlerin küf mantarı aracılığı ile parçalanması aşağıdaki genel formülde olduğu gibidir :

$$C_6H_{12}O_6 + 3\,O_2 \longrightarrow 2\,\begin{array}{l} CH_2COOH \\ | \\ C\,(OH)\,COOH \\ | \\ CH_2COOH \end{array} + 4\,H_2O$$

Yukardaki formülde reaksiyonun bir kademede meydana geldiği görülmekte ise de, aşağıdaki formülde görüldüğü gibi, bunun böyle olmadığı yapılan araştırmalardan anlaşılmıştır:

$C_6H_{12}O_6$
Glükoz

EMP-Yolu

$CH_3COCOOH$

Pirüvik asit

$CH_3CO\text{-}SCoA$

Asetil-CoA

+

$CO.COOH$
CH_2COOH

Okzalasetik asit

Yoğunlaştıran enzim (Condensing enzim)

$$\begin{array}{l} CH_2COOH \\ | \\ C\,(OH)\,COOH \\ | \\ CH_2COOH \end{array} + \begin{array}{l} HSCoA \\ \text{Ko-enzim} \end{array}$$

sitrik asit

Memleketimizde gelişen gıda ve tekstil endüstrisinin sitrik asit gereksinmesi giderek artmaktadır. Son yıllarda memleketimizde biyolojik yolla sitrik asit üreten bir fabrika kurulmuş bulunmaktadır. Bunu diğerlerinin izlemesi beklenebilir. Çünkü memleketimizde sitrik asit üretiminde kullanılan hammadde olan melas diğer kullanma yerlerinin gereksinmesinden fazla üretilmektedir. Diğer bir deyimle elde daima gereksinme fazlası melas bulunmaktadır.

Sitrik asit üretiminde kullanılan melas mikroorganizma için gerekli bazı besin maddelerini ya hiç ya da yeteri kadar ihtiva etmez. Bunlardan bir grup olarak besin tuzlarını söyleyebiliriz. Şu halde sitrik asit üretiminde besin tuzları bir girdi olarak maliyeti etkiler. Bu çalışmada ucuz ve kolay sağlanabilen bira endüstrisi artığı olan malt çimini sitrik asit üretiminde besin tuzları yerine koyabilmek olasılığı üzerinde durulmuştur.

2. Literatür Özeti :

Rehm'e (6) göre fermantasyon sırasında substratın pH'sı düşük tutulduğu zaman elde olunan üründe sitrik asit oranı okzalik asite nazaran daha yüksek olmaktadır. Aynı araştırıcıya göre mağnezyum, potasyum ve sodyum

1) 1973 yılında A.. Ü. Ziraat Fakültesi Fermantasyon Teknolojisi Kürsüsü'nde bu isim altında yapılan bir Diploma Tezi nin özeti.

iyonları da sitrik asit oluşunu teşvik etmektedir.

Schlegel (7) substrata NH_4NO_3 ve $MgSO_4$ tuzlarının ilâvesinin sitrik asit üretimi üzerinde belirli bir etki yapmadığını, buna karşılık bu tuzların miçel gelişmesini etkilediğini, çinko, demir ve fosfor elementlerinin miçel gelişmesini gerilettiğini ve fakat asit oluşunu teşvik ettiğini, daha düşük konsantrasyonlarda ise hem miçel, hem de asit oluşunu sınırlandırdığını, özellikle çinko ve demirin belirli miktarlarda olumlu etki yaptığını söylemektedir.

Metal iyonlarının sitrik asit fermantasyonu üzerindeki etkileri kullanılan mikroorganizmanın suşuyla ilgilidir. Örneğin, 5 **Aspergillus niger** suşuyla üst yüzey yöntemiyle yapılan bir araştırmada **Asp. niger** 62 suşu 0.1 mg/1 Fe^{2+} konsantrasyonunda optimal verim verdiği halde, aynı sonuç **Asp. niger** 59 suşu için 10 mg/1 konsantrasyonda elde olunmuştur.

Diğer taraftan Kovats'a (3) göre daldırma (submers) yöntemiyle sitrik asit üretiminde kullanılan pancar ve kamış melaslarının bileşimi sitrik asit üretiminde çok önemlidir. Çünkü melasın bileşimi toprak, gübreleme, iklim ve diğer faktörlere göre değişmektedir. Uzun süre bekletilen pancardan veya şeker kampanyasının son safhasında elde olunan melaslar sitrik asit üretimi için uygun değildir.

Sitrik asit fermantasyonu genel olarak demir iyonundan olumsuz olarak etkilenir. Bu nedenle ortamdaki demir miktarını zararsız bir düzeye kadar indirmek gerekir. Bu iş en kolay olarak bir çok hallerde ortama % 0.06 - 0.1 konsantrasyonunda potasyum ferro siyanür katmak suretiyle yapılır.

Kalsiyum iyonunun fazlası da sitrik asit fermantasyonuna zararlı etki yapar. Bu takdirde amonyum okzalat kullanarak fazla kalsiyum melastan alınmalıdır. Bu amaçla suyla 1 : 1 oranında seyreltilmiş olan sıcak melasa amonyum okzalat ilâve edilir. Sonra potasyum ferrosiyanür ilâvesiyle demir çökertilir.

3. Materyal ve Metod :

Bu bölümde kullanılan materyal ve metod Kürsümüzde aynı çalışmaya paralel olarak yürütülen ve Ziraat Mühendisliği dergisinin 110 uncu sayısında yayınlanan «Melastan Besin ve Yem Mayası Üretiminde Katkı Maddelerinin Verim Üzerine Etkisi» adlı araştırmada geçtiği için burada tekrardan kaçınılmıştır (1, 2 ve 4). Yalnız bu deneyde farklı olarak Türkiye Şeker Fabrikaları Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen **Aspergillus niger** T-2 ve **Aps. niger** A1-2 suşları kullanılmış ve başlatıcı kültür (Starter) aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır :

Daha önce malt şırası agarında gelişmiş küf mantarı kültürü üzerine 5 ml. steril su ilâve edilerek spor süspansiyonu elde olunmuş ve buradan önce 10 ml. melasa, daha sonra içine besin tuzu ve malt çimi ekstraktından ilâve edilmiş erlenmeyerde bulunan 50 ml. melasa aşılama yapılmıştır. Daha sonra erlenmeyerler 30°C'de inkubasyona bırakılmıştır. İstenilen gelişme 2-3 gün almıştır.

Starter hazırlanmasında kullanılan melasın pH'sı önce literatür bilgilerine (5) uyularak 2.2 - 2.4'e ayarlanmış ise de, küf mantarının gelişmemesi üzerine bir seri deneme yapılarak deney küf mantarlarının en iyi olarak 4.5 ve 5 pH'larda gelişme gösterdiği saptanmış ve sonuç olarak bu amaçla kullanılan melasın pH'sı bu değere ayarlanmıştır.

4. Sonuçlar :

Yukarıda açıklanan şekilde hazırlanmış olan melas (Bak : Zir. Müh. Dergisi, Sayı 110, Melastan Besin ve Yem Mayası Üretiminde Katkı Maddelerinin Verim Üzerine Etkisi) ayrı ayrı 1'er litrelik balonlara 600 ml. konarak starterlere aşılanmıştır.

4.1 Fermantasyonun asit tayini ile izlenmesi : İki ayrı bileşimdeki substratla alınan sonuçlar Tablo 1'de toplu olarak gösterilmiştir.

4.2 Fermantasyonun şeker tayini ile izlenmesi : Deneme süresince titrasyon asitliği yanında, şeker tayini de yapılmıştır. Alınan sonuçlar aşağıda Tablo 2'de verilmiştir.

4.3 Fermantasyon derecesi : Fermantasyon derecesi substrattaki şekerlerin maya tarafından hangi oranda kullanıldığını gösterir ve aşağıdaki denkleme göre hesap edilir.

Tablo 1.

Değişik bileşimde hazırlanmış substratlarda fermantasyonun gidişi

Günler	Harcanan N/10 luk NaOH eriyiği (ml.)			
	Besin tuzu + melas		Malt çimi extraktı + melas	
	A1 — 2	T — 2	A1 — 2	T — 2
1	1.3	1.3	1.2	1.3
3	1.5	1.8	1.6	1.8
5	2.5	2.7	2.7	2.9
7	3.0	3.1	3.0	3.2
9	2.7	2.8	2.6	2.9

Tablo 2.

Değişik bileşimde hazırlanmış substratlarda fermantasyonun gidişi

Günler	Toplam Şeker (%)			
	Besin tuzu + melas		Malt çimi extraktı + melas	
	A1 — 2	T — 2	A1 — 2	T — 2
1	10.0	10.0	10.0	10.0
3	9.1	8.4	8.9	8.6
5	7.2	6.3	7.0	6.9
7	5.7	5.2	6.0	5.5

$$\text{Fermantasyon derecesi (\%)} = \frac{\text{Toplam şeker - Kullanılan şeker}}{\text{Toplam şeker}} \times 100$$

Tablo 3.

Fermantasyon derecesi

Günler	Besin tuzu + melas		Malt çimi extraktı + melas	
	A1 — 2	T — 2	A1 — 2	T — 2
3	9	16	11	14
5	28	37	30	31
7	43	48	40	43

4.4 Sitrik asiti ayırma (izolasyon) : Bu amaçla fermantasyonu bitirmiş sıvı G2 filtresinden geçirilerek miçel ayrılmıştır. Sonra süzük buharlaşma ısısına kadar ısıtılmış ve üzerine % 10 - 15'lik $Ca\ Cl_2$ ilâve edilerek kalsiyum okzalat çökertilmiştir. Alınan sıvı kısmında sitrik asit ve muhtemelen glükonik asit beraber bulunur. Bu nedenle sıvı tekrar buharlaşma ısısına kadar ısıtılmı şve NH_3 ilâvesiyle ortam alkali yapıldıktan sonra takriben 1/3'ü buharlaştırılmıştır. Buharlaştırmada sıvının daima kalevi olmasına dikkat edilmiştir. Çünkü sadece bu şartlar altında kalsiyum sitrat çökmektedir. Çöken kalsiyum sitrat G4 den süzülmüş ve üzerinden kaynar destile su verilmiş ve sonrada % 60'lık alkol ile iyice yıkanmıştır. Elde olunan kalsiyum sitrat kristalleri mikroskapda incelenerek saflığı tesbit edilmeye çalışılmıştır.

4. Tartışma :

Bu çalışmamızda asitlik, Tablo 1'de görüldüğü gibi, 7. günde en yüksek noktasına ulaşmış bulunmaktadır. Ortamın pH'sının henüz 4.5 olduğu ve ortamda % 5 civarında şeker bulunduğu halde (Tablo 2) asit oluşunun durması, hatta gerileme göstermesi, fermantasyonda bir aksamanın işareti olsa gerektir. Başlatıcı kültürün hazırlanmasında da işaret edildiği gibi, **Aspergillus niger**'in suşlarının 4.5 pH'dan aşağı derecelerde çalışmaması bilinenlere aykırı düşmektedir. Gerçekten Prescott ve Dunn (5) sitrik asit fermantasyonun 2.2 - 2.4 pH'larda yaptırıldığını söylemektedir. Bütün bunlar iki ihtimali ortaya çıkarmaktadır. İlk olarak melasda bazı gelişme faktörleri yetersiz bulunmaktadır. İkinci olarak da **Aspergillus**'un bu suşları biyolojik stabilitelerini kaybetmiş bulunmaktadır.

Katkı maddelerinin etkisine gelince, çıkan sonuçlara göre malt çimi extraktının besin tuzları yerine başarıyla kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

6. Özet :

Melasa bir biracılık artığı olan malt çimi extraktından litreye 200 ml. katıldığı zaman, mikroorganizma besin tuzları katılmış substrat kadar iyi bir gelişme gösterebilmiştir. Buna göre maliyeti artıran besin tuzlarının melasa katılması gereksiz bulunmuştur.

Teşekkür : Bu çalışma sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. İ. Şahin'e ve laboratuvar olanaklarından faydalandığımız T. Şeker Fabrikaları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde Kim. Y. Müh. Nazım Taygur'a teşekkürü bir borç biliriz.

LİTERATÜR

1. Akman, V. A. 1962. Şarap Analiz Metodları. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 213.
2. Becker, und Weber. 1962. Die Hefen Band 2
3. Kovats, J. 1975. Submerse Zitronensaueregärung in Melasselösüngen. Die Brannt. 5.
4. Taygun, Nazım. «Melasın Değerlendirilmesi ve Özellikleri» konulu seminer notları.
5. Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1949. Industrial Microbiology.
6. Rehm, H. - JJ. 1967. Industrielle Mikrobiologie. Springer Verlag. Berlin.
7. Schlegel, G.H. 1969. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.

ATATÜRK ORMAN ÇİFTLİĞİ
BALINI DENEDİNİZ Mİ ?