

GLİSERİNİN BIYOKİMYASAL YOLLARLA ÜRETİMİ VE ŞARAP FERMENTASYONLARINDAKİ ÖNEMİ

PRODUCTION OF GLYCEROL BY BIOCHEMICAL ROUTES AND ITS IMPORTANCE IN WINE FERMENTATIONS

Seda KARASU YALÇIN, Z. Yeşim ÖZBAŞ

Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe, 06532, Ankara

ÖZET: Gliserin, gıda endüstrisi ve diğer bir çok endüstride farklı amaçlarla kullanılabilen önemli bir polialkoldür. Gliserinin ayrıca, alkollü içkilerde fermentasyon sırasında oluşan bir yan ürün olduğu ve özellikle şarabin duyasal özelliklerini olumlu yönde etkilediği de belirtilmektedir. Kimyasal sentez yoluyla üretilmesinin yanı sıra, gliserinin mikroorganizmaların kullanıldığı biyokimyasal prosesle de üretiltiği bilinmektedir. Son yıllarda özellikle ozmofilik mayalar tarafından gliserin üretimi konusundaki çalışmalar artmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'nun şarapta kullanılan suşları ile yapılan çalışmaların ise daha çok, yüksek miktarda gliserin üretebilen suşların eldesine yönelik genetik uygulamalar olduğu bildirilmektedir. Bu derlemede, mikrobiyal gliserin üretim yöntemleri üzerinde durulmuş, ayrıca gliserinin alkollü içkilerdeki önemine ve bu konudaki son gelişmelere yer verilmiştir.

ABSTRACT: Glycerol is an important polyalcohol which can be used for different purposes in food industry and other many industries. It is determined that glycerol is formed as a by-product during the fermentation process in alcoholic beverages, making positive effect especially on wine's sensory properties. Besides production by chemical synthesis, glycerol is also known to be produced by biochemical processes, in which microorganisms are used. Studies especially on production of glycerol by osmophilic yeasts have widely increased in recent years. It is reported that studies on wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* have been mostly about genetic applications yielding high glycerol producing strains. In this review, microbial routes of glycerol production are introduced; importance of glycerol in alcoholic beverages and recent developments on this subject are also pointed out.

GİRİŞ

İlk olarak 1779'da Scheele tarafından keşfedilen gliserin, kimyasal olarak 1,2,3 propantriol olup, kapalı formülü $C_3H_8O_3$ olarak ifade edilmektedir. Berrak, kokusuz, higroskopik ve tatlı bir madde olan gliserinin erime noktası $18.17^{\circ}C$, kaynama noktası $290^{\circ}C$ 'dir. Gliserin, su ve alkolde kolaylıkla çözünebilen bir polialkoldür (KIRK ve OTHMER, 1967; AGARWAL, 1990; KAYAHAN, 1998). Gliserin, bütün hayvansal ve bitkisel yağlardır ortak yapitaşı olarak, coğunuylukla yağ asitleri ile esterleşmiş halde trigliserid formunda bulunmaktadır (KAYAHAN, 1998). Gliserin ilaç, kozmetik, diş macunu, sentetik reçineler, dericilik ve gıda endüstrisi gibi pek çok alanda yaygın kullanımı olan bir maddedir (KIRK ve OTHMER, 1967; AGARWAL, 1990; ZHUGE ve ark., 2001). Gliserinin, bir çok alkollü içkisinin yapısında aromaya katkıda bulunan bir madde olduğu belirtilmektedir. (SCANES ve ark., 1998; REMIZE ve ark., 2000).

Gliserin, endüstride mikrobiyal veya kimyasal sentez yoluyla üretilebilmektedir. Mikrobiyal yolla üretim, 150 yıldan beri bilinmekte beraber, ilk kez I. Dünya Savaşı sırasında, bu yolla ticari üretiminin gerçekleştirildiği ve bu maddenin nitroglycerin bazlı patlayıcılarında kullanıldığı belirtilmektedir (SPENCER, 1968; WANG, 2001). Gliserinin kimyasal yolla üretimi iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar; yağ ve sabun endüstrisinden yan ürün olarak üretim ve propileninden sentez yoluyla üretimdir. Gliserinin propileninden sentezinin ilk kez II. Dünya Savaşı sırasında gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Ancak 1970'lerden itibaren bu yöntemin kullanımının azaldığı, propilenin fiyatının artışı nedeniyle özellikle gelişmekte olan ülkelerde biyokimyasal yolla gliserin üretimi'ne yönelme olduğu belirtilmektedir. Gliserinin biyokimyasal yolla üretimde kullanılan en önemli mikroorganizmaların mayalar olduğu bilinmektedir. Mayalar tarafından gliserin üretiminin sülfit kontrollü proses kullanılarak, ortam alkali pH'da tutularak veya ozmofilik mayalar kullanılarak gerçekleştirilebilediği belirtilmektedir. Ticari açıdan

öneMLİ olmamakla birlikte, bakteriler ve alglerin de gliserin üretebildikleri bildirilmektedir (AGARWAL, 1990; ZHUGE ve ark., 2001). Gliserinin endüstriyel bir madde olmasının yanı sıra, alkollü içkilerin duyusal kalitesi üzerindeki önemi nedeniyle, son yıllarda özellikle şarap mayaları ile yapılan çalışmalarda, yüksek miktarda glicerin üretebilen genetik suşların eldesi çalışmaları dikkat çekmektedir. (SCANES ve ark., 1998; DEQUIN, 2001).

Bu makalede mikroorganizmalar tarafından glicerin üretiminde kullanılan farklı yöntemler irdelenmiş ve bu konudaki son gelişmelere de yer verilmiştir.

GLİSERİNİN KULLANIM ALANLARI

Glycerin bir çok endüstride geniş kullanım alanları bulan bir maddedir (Çizelge 1). Glycerinin toksik olmayıp, vücutta kolaylıkla sindirilebildiği bilinmektedir. Lipidlerin yapısında bulunmasına rağmen, metabolizmasının karbonhidratlara benzediği belirtilmektedir. Glycerinin, 1959'dan beri gıda ve gıda ambalajlarında kullanımının Food and Drug Administration (FDA) tarafından güvenli kabul edildiği bilinmektedir.

Çizelge 1. Glycerinin Çeşitli Endüstrilerdeki Kullanım Oranları (WANG ve ark., 2001)

| Kullanıldığı endüstri | Kullanım yüzdesi | | | |
|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------|
| | ABD (160000 ton/yıl) | Avrupa (1900000 ton/yıl) | Japonya (50000 ton/yıl) | Çin (80000 ton/yıl) |
| İlaç | 39.5 | 23.1 | 34.0 | 5.2 |
| Tütün | 15.8 | 2.5 | 5.3 | 7.3 |
| Glycerinriasetat | — | 14.4 | — | — |
| Gıda | 14.5 | 5.6 | — | — |
| Polieter | 10.5 | 13.1 | 11.6 | 5.2 |
| Boya | 9.2 | 13.1 | 19.5 | 49.0 |
| Selofan | 2.0 | 4.4 | 3.8 | 1.5 |
| Dinamit | 0.6 | 3.1 | 1.9 | 3.1 |
| Diş macunu | — | — | — | 16.0 |
| Kozmetik | — | — | — | 6.3 |
| Digerleri | 7.9 | 20.6 | 23.9 | 7.2 |

—: İlgili veri bulunmamaktadır.

Gıdalarda aroma ve renk maddeleri için gözücü olarak yararlanılabilen glycerin, nem verici veya şuruplarda taşıyıcı bileşen olarak da kullanılabilir. Şekerli ürünlerde şekerin kristalizasyonunu önlemektedir. Poliglycerol ve esterleri ise margarinlerde kullanılmaktadır. Gıdaların hızlı dondurulması prosesinde, ısı aktarım ortamı olarak glycerinden yararlanılmaktadır (KIRK ve OTHMER, 1967).

Glycerinin, gelecekte yeni endüstriyel fermentasyonlar için iyi bir substrat kaynağı olacağı da düşünülmektedir. *Acetobacter suboxidans* tarafından glycerinin dihidroksiasetona dönüştürülmesi, buna örnek olarak gösterilmektedir. Derin fermentasyon yöntemi ile, bu bakterinin % 5-15'lik bir glycerin çözeltisinden % 75-90 ve- rimele dihidroksiaseton üretebildiği bildirilmektedir. Dihidroksiaseton, daha sonra dihidroksiaseton kinaz enzimi ile dihidroksiasetonfosfata çevrilebilmektedir. Dihidroksiasetonfosfat, optikçe aktif şeker türevlerinin üretiminde bazı aldolazlar için önemli bir substrat olarak kabul edilmektedir (ZHUGE ve ark., 2001).

GLİSERİNİN ŞARAPLARDAKİ ÖNEMLİ

Glycerin, bira, şarap gibi alkollü içkilerde duyusal özelliklere katkıda bulunan bir bileşik olarak bilinmektedir. Şarap mayası olan *Saccharomyces cerevisiae*'nın yüksek veya düşük miktarda glycerin üretiminin kontrolünün, içki endüstrisinde şarap kalitesi açısından oldukça önemli olduğu kabul edilmektedir (KILIÇ, 1990; SCANES ve ark., 1998; DEQUIN, 2001; WANG ve ark., 2001). Glycerin, şarapta fermentasyon sırasında üretilen bir yan ürün olup, etanol ve karbondioksitten sonra derişimi en yüksek olan ürün olarak kabul edilmektedir. İlk olarak Pasteur, şarapta kullanılan şekerin % 3.6'sının glycerine dönüştüğünü bulmuştur. Daha sonra ya-

pilan çalışmalar maya suşuna, ortam kompozisyonuna ve proses koşullarına bağlı olarak, karbon kaynağının % 4-10'unun gliserine dönüştüğünü göstermiştir.

Üzüm suyunda gliserin konsantrasyonu çok düşük olmasına rağmen, küfle enfekte olmuş üzümllerin kulanılması sonucunda, maya fermentasyonundan önce gliserin üretilmesi nedeni ile, şarapta gliserin miktarının normalden daha fazla olabileceği belirtilmektedir. Kullanılan üzümün türü ve olgunluğunun da şaraptaki gliserin miktarını etkilediği belirtilmektedir. Şaraptaki gliserin miktarının 1-15 g/L düzeyinde ve ortalama 7 g/L olduğu bildirilmektedir. NewYork, California ve Avustralya'da kırmızı şarapların gliserin oranlarının beyaz şaraplar-dakinden daha fazla olduğu bildirilmektedir (EUSTACE ve THORNTON, 1987; SCANES ve ark., 1998).

Gliserinin, uçucu bir bileşik olmaması nedeni ile şarabın aroması üzerine doğrudan bir etkisinin olmadığı ancak tadın yumuşaklıği üzerine etkisinin olduğu belirtilmektedir. Gliserinin, tatlı ve yağımı bir madde olduğu için duyasal kaliteyi etkilediği bildirilmektedir (KILIÇ, 1990). Şarabın viskozitesi üzerindeki değişikliğin ise, sadece gliserin düzeyinin 25 g/L değerine ulaştığında gerçekleştiği belirtilmektedir. Bu değerlendirmeler, gliserinin dolaylı olarak şarap kalitesi üzerine etki ettiğini ve *S. cerevisiae* tarafından yüksek gliserin üretiminin, şarabın duyasal özelliklerini geliştirdiğini göstermektedir (SCANES ve ark., 1998). Şarabın duyasal kalite kontrolünde, görsel değerlendirme sırasında bir kriter kabul edilen dalgalanmalı görünümün, şaraptaki gliserin ve şekerin miktarına bağlı olduğu bildirilmektedir. Gliserin ve şeker derişimi fazla olan şaraplarda daha belirgin ve zarif göz yaşlarının oluştuğu belirtilmektedir (AKTAN ve KALKAN, 2000). Diğer fermenterdeki gliserin oranının şaraba benzer veya daha az olduğu bildirilmektedir. Örneğin üst fermentasyon biralarında gliserin miktarının 1.5-2.9 g/L arasında değiştiği belirtilmektedir. Gliserin üretiminin ozmotik stres karşısında artması nedeni ile, gliserinin yüksek konsantrasyona sahip fermentasyonlarda önemli olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda bira endüstrisinde de üreticilerin yüksek viskoziteli bira fermentasyonuna yönelmeleri nedeni ile, gliserinin bira'daki öneminin de giderek artacağı düşünülmektedir (SCANES ve ark., 1998; DEQUIN, 2001).

MAYALAR TARAFINDAN GLİSERİN ÜRETİMİ

Mayaların Gliserin Metabolizması

Gliserin, mayalarda glikoliz sırasında oluşan bir ara ürün olan dihidroksiaseton fosfattan, iki basamaklı ve sırasıyla gliseroltrifosfat dehidrojenaz (Gpd) ve gliseroltrifosfataz (Gpp) enzimleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile üretilmektedir. Her iki enzimin de ikişer izoenzimi bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin, ozmotik koşullarda görev yapan Gpd1p ve Gpp2p ile, normal koşullarda işlev gören Gpd2p ve Gpp1p oldukları belirtilmektedir (SCANES ve ark., 1998; DEQUIN, 2001; WANG ve ark., 2001). Gliseroltrifosfat dehidrojenazı kodlayan GPD1 ve/veya GPD2 genlerinin *S. cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida glycerinogenes* ve *Zygosaccharomyces rouxi*'de belirlendiği bildirilmektedir. *Debaryomyces hanse-nii*'de de gliseroltrifosfat dehidrojenaz aktivitesine rastlandığı belirtilmektedir. Bu veriler, gliseroltrifosfattan gliserin üretiminin yalnız bellİ mayalar tarafından gerçekleştirilebileceğini göstermektedir (WANG ve ark., 2001). *S. cerevisiae*'da bulunan her iki enzim içerisinde, Gpd1p'nin, gliserin üretimi için anahtar enzim olduğu belirtilmektedir (DEQUIN, 2001). Mayalarda gliserin sentezi ile ilgili başka alternatif bir yol olup olmadığını gösteren deneysel bir veriye rastlanmadığı belirtilmektedir.

Mayaların Gliserin Disimilasyonu

Gliserin, *S. cerevisiae* tarafından glukozun yokluğunda karbon kaynağı olarak kullanılabilmektedir. Gliserin disimilasyonunun, mayalarda gliserinin, gliserol-3-fosfata veya dihidroksiasetona dönüştürülmesi şeklinde iki yolla gerçekleştiği belirtilmektedir. *S. cerevisiae*'da gliserin disimilasyonu, GUT 1 geni tarafından kodlanan gliserol kinaz ve GUT 2 geni tarafından kodlanan spesifik, FAD'ye bağlı mitokondriyal gliserol-3-fosfat dehidrojenaz (Gut2p) enzimleri tarafından katalizlenmektedir. GUT1 ve GUT2 genlerinden yoksun mutantların gliserini karbon kaynağı olarak kullanamadıkları belirtilmektedir (COSTENOBLE ve ark., 2000; WANG ve ark., 2001). Gliserol kinaz aktivitesi sonucu oluşan gliserol-3-fosfatın, lipid biyosentezinde kullanılabildiği veya dihidroksiasetona çevrilebildiği belirtilmektedir. Oluşan dihidroksiaseton ise TPI enzimi aracılığı ile gliseraldehit-

3-fosfata çevrilip, metabolik yol izine katıldığı veya diğer metabolitlerin üretilebilmesi için bir substrat vazitesi gördüğü bildirilmektedir. Bu yolla gliserinin karbon kaynağı olarak kullanımı ayrıca *D. hansenii*, *Z. rouxii*, *C. glycerinogenes* ve *S. pombe*'de belirlenmiştir. Dihidroksiaseton üretimi yolu ile gliserin disimilasyonunda ise; gliserol dehidrojenaz enzimi gliserinin dihidroksiasetona okside olmasını sağlamaktadır. Daha sonra da dihidroksiaseton kinaz enzimi tarafından katalizlenen bir tepkime ile dihidroksiasetonfosfat oluşmaktadır. *S. cerevisiae*'da, bu yol izinin iki basamağını kodlayan GCY1 ve DAK1/DAK2 genleri bulunmakta, ancak bu tepkimele-rin önemini tam olarak belirlenemediği bildirilmektedir. (WANG ve ark., 2001).

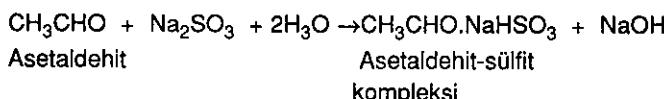
Gliserinin Hücre Metabolizmasındaki Önemi

Gliserin sentezinin, ozmotik koşullara uyum ve redoks dengesinin sağlanması açısından maya hücre metabolizmasına faydalı olduğu bildirilmektedir. Gliserin, mayalarda ozmotik koşullar altında yarıçıl çözünen olarak işlev görmektedir. Hücre dışı su aktivitesinin düşmesi ile birlikte *S. cerevisiae*'nın gliserin üretimini artırdığı belirlenmiştir (PETROVSKA ve ark., 1999; ZHUGE, 2001). Ozmotik şokla birlikte gliseroltrifosfat dehidrojenaz (Gpd1p)'a bağlı sitoplazmik NAD⁺ seviyesinde önemli bir artış gözlemediği bildirilmektedir. Gpd1p'nin ozmotik induksiyonu, GPD1'i regule eden bir özgül sinyal transduksiyon yol izi (HOG yol izi; yüksek ozmolalite gliserin yanıt yol izi) ile, transkripsiyonel seviyede gerçekleşmekte ve gliserin üretiminin artışı ile sonuçlanmaktadır. *S. cerevisiae*'da gliserinin hücre içinde birektirilmesinin, Fps1p-protein kanalı aracılığı ile kontrol edildiği belirtilmektedir. Hiperozmotik stres koşullarında bu kanalın kapandığı, gliserin hücrede birliği ve dış ortamla hücre arasında ozmotik dengenin sağlandığı bildirilmektedir. Hiperozmotik stres yokluğunda ise kanalın açık olduğu ve gliserinin hücreden dışarı çıkabildiği belirlenmiştir (WANG ve ark., 2001).

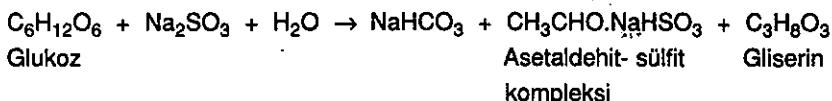
Glukozun alkole fermentasyonu sırasında *S. cerevisiae* tarafından gliserin üretilmesinin bir nedeni de; hücrenin redoks dengesinin sağlanması olarak açıklanmaktadır (SCANES ve ark., 1998). GPD2 ve GPP1 genlerinin hücredeki redoks dengesinin sağlanmasındaki önemleri, bu genlerin ortadan kaldırılmasıyla anlaşılmıştır. Bu genlerden yoksun olan mutantların oksijen yokluğunda gelişemedikleri görülmüştür. GPD1'in aşırı ifadesi ile *S. cerevisiae*'nın gliserin üretimini artırmak için yapılan çalışmaların, hücrenin redoks dengesini bozduğu bildirilmektedir. Bunun sonucunda hücrenin, redoks dengesini sağlamak için piruvat, asetat, asetoin, 2,3-bütandiol ve suksinat gibi yan ürünlerin üretimini artırma yoluna gittiği belirtilmektedir. Gliserin üretimi sırasında NADH, NAD⁺'ya okside olmakta, bu da aerobik koşullarda NAD⁺/NADH dengesini sağlamaktadır. Aerobik koşullarda glukozlu ortamda, fermentasyon ve solunum sırasında gliserin oluşumunun devam ettiği bildirilmektedir. Bu da, glukoz ve oksijenin tükenmesiyle birlikte, hücrenin redoks dengesini sağlamak için gliserin üretimi ne ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Gliserin üretiminde gliserol-3-fosfatın defosforilasyonu sırasında, yüksek miktarda fosfat iyonu serbest kalmaktadır. Bu yolla sitoplazmik fosfat düzeyleri kontrol edilmektedir. Glukoz hücreye fosforilasyona uğramamış formda alındığında, bu fosfatın daha sonraki aşamada serbest kalmasına gerektiği, yoksa hücrede bir fosfat dengesizliği olacağı belirtilmiştir. Bu açıdan gliserin üretiminin, inorganik fosfat döngüsünde de önemli olduğu bildirilmiştir. Gliserin üretiminin, aynı zamanda sitoplazmik oksijen radikallerine karşı bir koruyucu görevi olduğu da düşünülmektedir (COSTENOBLE ve ark., 2000).

Mayalardan Gliserin Üretilmesi Amacıyla Kullanılan Prosesler

Sülfit/Alkali Kontrollü Proses: Gliserin üretimde bilinen en eski yöntemlerden biri sülfit kontrollü proses olup, I. Dünya Savaşı sırasında sıkça kullanılmıştır. Sülfit kontrollü proses, *S. cerevisiae*'nın kullanıldığı, heksozların anaerobik glikolizini içeren bir proses olarak belirtilemektedir (VIJAIKISHORE ve KARANTH, 1984; VIJAIKISHORE ve KARANTH, 1987; SAHOO ve AGARWAL, 2001). Bu prosesin temeli ilk kez Neuberg tarafından keşfedilmiş olup, asetaldehitin sodyumsülfitle bağlanması ve asetaldehit-sülfit kompleksini oluşturmamasına dayanmaktadır (AGARWAL, 1990). Tepkime aşağıda gösterilmiştir:

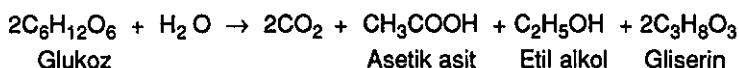


Glikoliz sırasında, ortamda sülfitin yokluğunda asetaldehit etil alkole indirgenmektedir. Bir elektron alıcısı olan asetaldehit sülfitle bağlılığı zaman, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolunda oluşan diğer trioz olan dihidroksiasetonfosfat (DHAP) temel elektron alıcısı olarak görev yapmakta ve gliserine indirgenmektedir. Böylece hücrede etil alkol üretimi durmaka ve glikoliz yolu sadece gliserin üretiminin gerçekleşeceği şekilde yönlendirilmektedir. Prosesin toplam tepkimesi aşağıda verilmektedir:



Pratikte, etil alkol üretimi yönündeki tepkimenin tamamen durdurulması için ortamındaki bütün asetaldehitin sülfit ile bağlanması gereğinden, işlem için aşırı miktarda sodyum sülfit gerekebileceği bildirilmektedir. Bunun da, yöntemin ticari ölçekte uygulanmasını pratik olmaktan uzaklaştıran en önemli sebep olduğu belirtilmektedir. Ticari ölçekte üretimde sülfitin kullanımı 100 g şeker başına en fazla 40 g olarak sınırlanmıştır. Çünkü daha fazla miktarda sülfitin maya metabolizması için toksik olduğu belirtilmektedir. Bu durumda, gliserin veriminin tüketilen şeker başına % 20-25 olduğu belirlenmiştir. Bu verim de teorik verimin % 40-50'si kadarıdır (AGARWAL, 1990; PETROVSKA ve ark., 1999). Bu tip proseste kontrol ajanı olarak sodyum sülfit, sodyum sülfit/bisülfit, amonyum sülfit ve magnezyum/kalsiyum sülfit gibi çeşitli tuzların kullanılabilmesi bildirilmektedir. Çözünen maddelerin gliserin geri kazanımını zorlaştırması, düşük verim (% 20-25), düşük dönüşüm hızı ve gliserin derişiminin düşük olarak elde edilmesi, sülfit kontrollü prosesin terk edilmesinin başlica nedenleri arasında gösterilmektedir. (AGARWAL, 1990; WANG ve ark., 2001).

Alkali kontrollü prosesin tepkimesi ise, aşağıdaki gibi ifade edilmektedir :



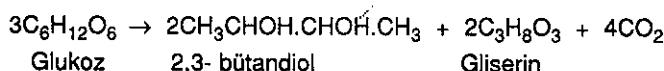
Tepkime, pH 7 veya üzerinde normal alkol fermentasyonu sürecinde gerçekleşmektedir. Tepkimedeki asetik asit, optimum pH'sı 8.75 olan aldehit dehidrojenaz enziminin aktivitesinin artışı nedeniyle oluşmaktadır. Alkali kontrollü maya prosesinin yürütülebilmesi için sodyum karbonat veya magnezyum karbonat/magnezyum hidroksitin kullanımı bildirilmektedir (VIJAIHIKISHORE ve KARANTH, 1984; WANG ve ark., 2001). Bu proses ile gliserin üretimi, sülfit kontrollü proseseki gibi nispeten basit olmakla birlikte, bazı teknik problemlerin ticari ölçekteki uygulamaları sınırlandırıldığı bildirilmektedir (WANG ve ark., 2001).

Ozmotolerant Mayaların Kullanıldığı Proses: 1945'te, bir ozmotolerant maya olan *Zygosaccharomyces acidifaciens* (*Saccharomyces baillii*)'nın gliserin üretebildiği ve bunun için sülfit, bisülfit gibi bir kontrol ajanının gerekliliği keşfedilmiştir. Bu çalışma, aynı zamanda ozmofilik/ozmotolerant mayaların biyoteknolojik özelliklerinin incelenmesi için yapılan çalışmalarla da öncü olmuştur. Daha sonra ozmofilik mayaların erititol, D-arabitol, mannositol gibi başka polihidroksi alkoller ürettikleri de keşfedilmiştir (ONISHI, 1958; ONISHI, 1963; AGARWAL, 1990; WANG ve ark., 2001). 1950'lerde de çiçeklerden, bozulmuş baldan, kurutulmuş meyvelerden ozmofilik mayalar izole edilmiş, bunlar; *Saccharomyces rouxii* ve *Torulopsis magnoliae* suşları olarak belirlenmiştir. Bu mayalardan birincisinin gliserin ve arabitol, ikincisinin ise gliserin ve erititol üretikleri belirlenmiştir (AGARWAL, 1990). Yapılan bir araştırmada, onbir *Zygosaccharomyces* suşu üzerinde çalışılmış ve bunlardan dört tanesinin (*Z. nadsonii*, *Z. nusbaumerii*, *Z. richteri* ve *Z. rogos*) % 15 ve daha fazla oranda gliserin üretikleri saptanmıştır. Bu çalışmalar, yüksek düzeyde gliserin üreten mayaların, yüksek şeker konsantrasyonuna dayanıklı mayalar olduğunu göstermiştir. Daha sonra yapılan araştırmalarda yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı mayaların da gliserin üretebildikleri belirlenmiştir. Örneğin, *Pichia miso*'nın D-arabitol, erititol ve gliserin üretebildiği belirtilmektedir (ONISHI, 1959; AGARWAL, 1990). Gliserin üretiminde kullanılabilcek başlıca ozmotolerant mayaların *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* ve *Torulopsis* cinslerine ait oldukları bildirilmektedir (PETROVSKA ve ark., 1999; WANG ve ark., 2001). Ozmofilik maya prosesinin sülfit ve alkali kontrollü proseslere göre üstün yön-

leri şu şekilde açıklanmaktadır: a) Mikroaerofilik veya anaerobik koşullar yerine aerobik koşullarda uygulanabilmektedir b) Kontrol ajanları gerekmemektedir c) Ozmofilik mayalar yüksek şeker derişimlerini tolere edebilmektedirler d) Şekerin ürüne dönüşüm hızı ve ürün verimi çok daha yüksek olarak belirtilmektedir e) Kontaminasyon riski düşük olup, daha basit bir proses olarak kabul edilmektedir (PAREKH ve PANDEY, 1985; AGARWAL, 1990; WANG ve ark., 2001).

BAKTERİLER TARAFINDAN GLİSERİN ÜRETİMİ

Lactobacillus lycopersici ve *Bacillus subtilis* bakterilerinin gliserin üretebildikleri belirtilmektedir (WANG ve ark., 2001). *Bacillus subtilis* tarafından gliserin üretimi ilk kez 1945'te keşfedilmiştir. Ancak bu prosese başka bir ana fermentasyon ürünü olan 2-3-butandiolun de elde edildiği bilinmektedir (VIJAIKISHORE ve KARANTH, 1984). Tepkime aşağıdaki şekilde gösterilmektedir:



Bu bakterinin farklı suşlarının, farklı verimlerde gliserin üretimi gerçekleştirdiği belirtilmektedir. Fermentasyon hızı ve verimin düşük olması nedeniyle bu proses endüstriyel anlamda hiçbir zaman önem kazanmamış olup, 1940'lardaki ilk araştırmalardan sonra bu yolla gliserin üretimi konusunda bir çalışma rapor edilmemiştir (VIJAIKISHORE ve KARANTH, 1984; VIJAIKISHORE ve KARANTH, 1986; WANG ve ark., 2001).

Gliserin üretebilen maya veya bakterilerden, üretimde rol oynayan genlerin bazı bakterilere klonlanmasıının, glukozu 1,3-propandiole fermenten rekombinant bakterilerin eldesiyle sonuçlandığı belirtilmektedir. Ancak bunun ticari boyutta önem kazanabilmesi için özellikle proses verimliliği açısından daha fazla araştırma ya ihtiyaç duyulduğu da bildirilmektedir (WANG ve ark., 2001).

ALGLER TARAFINDAN GLİSERİN ÜRETİMİ

Algler tarafından gliserin üretimi bugün spesifik klimatik koşullar gerektirdiğinden, tercih edilen bir yol olmamakla birlikte, güneş ışığı dışında çok az enerji gerektirdiğinden en ucuz proses olarak belirtilmektedir (VIJAIKISHORE ve KARANTH, 1986). Bu yolun gelecekte gliserin üretimi için, özellikle tropikal ülkelerde potansiyel bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Yaşam mekanizması olarak, yüksek konsantrasyonda tuza karşı hücre içi gliserin üreten pek çok alg türü bulunmaktadır. Uygun koşullarda *Dunaliella* ve *Asteromonas* gibi yeşil alg türlerinin kuru ağırlıklarının % 50'si kadar gliserin üretebildikleri bildirilmektedir (CHEN ve CHI, 1981). Ancak gliserinin geri kazanım işlemlerinin bir çok proses gerektirdiği belirtilmektedir. Bu prosesin en avantajlı yönü olarak, doğrudan güneş enerjisinin kullanılması ve yan ürün olarak da hayvan yemi ile β-karotenin üretilmesi gösterilmektedir (CHEN ve CHI, 1981; AGARWAL, 1990).

GLİSERİN SENTEZİNE ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN ETKİSİ

Sıcaklık derecesi, havalendirme hızı, başlangıç substrat konsantrasyonu, ozmotik stres gibi faktörler mayalar tarafından gliserin üretimini etkileyen başlıca etmenler arasında bildirilmektedirler (SPENCER, 1968; REMIZE ve ark., 2000). Gliserin üretimi için optimum sıcaklık derecesinin genellikle maya üremesi için gerekli optimum sıcaklık derecesine yakın olduğu belirtilmektedir. Örneğin *S. cerevisiae*, *Candida magnoliae* ve *Z. rouxii* ile yapılan çalışmalarda maksimum gliserin üretiminin 30-35°C'ler arasında olduğu belirlenmiştir (WANG ve ark., 2001). XIE ve ark (2001), ozmofilik mayalarca gliserin üretiminin 30-40°C arasında optimuma ulaşlığını belirtmektedirler. *C. glycerinogenes* için ise bu değerin, 29-33°C arasında olduğu bulunmuştur (ZHUGE ve ark., 2001). *C. magnoliae*'nın hücre üremesi ve gliserin veriminin 40°C'de oldukça düşüğü belirlenmiştir. *S. cerevisiae*'nın şarap üretiminde kullanılan suşları için optimum gliserin üretim sıcaklık derecelerinin 22-35°C arasında değiştiği belirtilmektedir (GARDNER ve ark., 1993; SCANES ve ark., 1998).

Havalandırma hızı, ozmotolerant mayalar tarafından gliserin üretiminde oldukça önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (SPENCER, 1968). *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalar; yeterince havalandırma yapılan ortamlarda polialkol veriminin daha fazla olduğunu kanıtlamıştır (SCANES ve ark., 1998). Artan oksijen miktarı ile etanol veriminin de düştüğü belirtilmiştir. Bu durum, ortamda etanol miktarının yetersiz havalandırma için bir kriter olabileceğini göstermektedir. Aynı şekilde, düşük poliol verimleri de oksijen miktarının optimumun altında olduğunu gösterecektir. Optimum seviyeden daha yüksek havalandırma yapıldığında glukoz kullanımında bir azalma olduğu, ürün verimlerinde ise, daha düşük bir azalma olduğu bildirilmektedir. Maksimum verim için gerekli oksijen miktarı değişmekte olup, bunun kültürdeki hücre yoğunluğuna bağlı olduğu belirtilmektedir. (SPENCER, 1968)

Polialkol üretiminde sıkça kullanılan mayalar olan *S. rouxii*, *C. magnoliae* ve *P. miso*'nun çok az türde şeker kullandıkları bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar, mannoz ve fruktozun poliolere dönüştürüldüğünü göstermektedir. *S. rouxii* tarafından maltozun, glukoza göre daha az oranda gliserine dönüştürüldüğü belirlenmiştir. *P. miso*'nun da glukoz, fruktoz ve mannoz kullanarak gliserin ve D-arabitol üreterek, ancak galaktoz ve sükrozdan gliserin üretemediği belirtilmektedir (ONISHI ve ark., 1960; SPENCER, 1968). *Zygosaccharomyces* türleri ve *C. magnoliae*'nın kullanıldığı fermentasyonlarda, glukoz konsantrasyonunun yükseltilmesinin polialkol verimini fazla değiştirmediği bulunmuştur. (SPENCER, 1968; VIJAIKISHORE ve KARANTH, 1986). Şeker konstantrasyonundaki artış, gliserin sentezini artırmasının bir nedeninin, hücrenin çevresinde oluşan ozmotik stres olduğu bildirilmektedir. *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalar, sürekli kültürde gliserin veriminin 0.971 su aktivitesi değerinde, 0.994'e göre dörtte üç oranında arttığını göstermektedir (SCANES ve ark., 1998; WANG ve ark., 2001). *C. glycerinogenes* ile yapılan bir çalışmada glukoz derişiminin 150 g/L'den 250 g/L'ye çıkartılmasının gliserin miktarını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Ancak kesikli kültürde glukozun kullanım hızının düştüğü, bunun da gliserin üretim hızını azalttığı bildirilmiştir. Bu nedenle ortamın su aktivitesinin azaltılması, gliserin üretimde verimin artırılması için tek başına yeterli olmayacağı da belirtilmektedir (ZHUGE ve ark., 2001; WANG ve ark., 2001).

Azot kaynağı ve derişiminin polialkol verimini oldukça etkilediği bildirilmektedir. Maya özütünün kullanıldığı çalışmalarında misir şurubu likörü kullanılan ortamlara göre daha fazla gliserin üretildiği belirtilmektedir. Maya özütü derişiminin % 0.5'ten % 1.0'e çıkartılmasının fermentasyon süresini 17 günden 7 güne indirdiği, gliserin verimini de önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Fermentasyon ortamına azot kaynağının yanında amonyum sulfat, amonyum fosfat gibi azotlu maddelerin eklenmesinin gliserin verimini düşürdüğü belirtilmektedir (SPENCER, 1968). Besiyerine aminoasit katılaşmasının da gliserin üretimini etkilemediği veya azalttığı bildirilmiştir. *S. cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada, glutamik asit veya aminoasit karışımlarının kullanılan ortamlarda, amonyum tuzlarının kullanılacağı ortamlara göre daha düşük miktarlarda gliserin elde edildiği görülmüştür (ALBERS ve ark., 1996).

S. cerevisiae ile gliserin üretimi için yapılan çalışmalar, en yüksek gliserin veriminin alkali ortamlarda elde edildiğini göstermektedir. Sülfit kontrollü proses için optimum pH'nın 6.7-7.0 arasında olduğu belirtilmiştir (WANG ve ark., 2001). Ancak pH'nın yükseltilmesi, *S. cerevisiae*'nın şarap üretiminde kullanılan suşlarında gliserin üretimini artırmak için başvurulan bir yol olamamıştır. Çünkü bozucu mikroorganizmaların gelişmesinin engellenmesi ve şarabin duyasal kalitesinin korunması açısından üzüm suyunun pH'sı 3.5-4.0 gibi düşük seviyelerde tutulmaktadır (SCANES ve ark., 1998). Ayrıca *S. cerevisiae*'nın ortamda baskın hale gelmesi için en uygun pH'nın 3.5 civarında olduğu belirtilmiştir (HEARD ve FLEET, 1988).

GENETİK ÇALIŞMALAR

Mikroorganizmalar tarafından gliserin üretimini artırmak için başvurulan genetik çalışmalar arasında mutasyon, yeni suşlar geliştirme veya gliserin sentezi ile ilgili genlerin aktarımına yer verilmektedir. Bütün çalışmaların temeli; glikolitik yolu gliserin oluşumunu artırarak, gliserin disimilasyonunu azaltacak şekilde yönlendirmek olarak açıklanmaktadır (WANG ve ark., 2001).

Gliserin, alkol fermentasyonlarında etanol ve CO₂'den sonra konsantrasyonu en yüksek olan ürün olarak kabul edilmektir. Gliserinin, alkollü içkilerden özellikle şarabın duyusal özelliklerini geliştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda şarapta gliserin miktarını artırmak amacıyla *S. cerevisiae* üzerinde gerçekleştirilen bir çok genetik çalışma rapor edilmiştir (EUSTACE ve THORNTON, 1987; SCANES ve ark., 1998; DEQUIN, 2001).

Glikolizde anahtar bir enzim olan triozfosfat izomeras (TPI), fruktoz 1,6 bifosfatın parçalanmasından sonra, dihidroksiasetonfosfatın gliseraldehit-3-fosfata dönüşümünü sağlamaktadır. *S.cerevisiae*'nın TPI ile ilgili geni (TP1) bloke edildiğinde mutantın glukozu kullanarak yüksek gliserin verimine (teorik verimin % 80-90'ı kadar) ve gliserin üretimine (1.5 g/Lh) ulaşabildiği belirlenmiştir. Bu durumda bir kontrol ajanına da gerek duyulmadığı vurgulanmıştır. Ancak bu yöntemde, enerji eksikliğinden dolayı hücre gelişiminin yavaşladığı ve glukozlu ortamda hücrenin glukoza karşı genetik stabilitesini kaybettiği belirtilmektedir (WANG ve ark., 2001).

NAD⁺e bağımlı gliseroltrifosfat dehidrojenaz enzimi, *S. cerevisiae* ve bir çok mayada gliserin sentezi için anahtar enzim olup, bu enzimi kodlayan GPD1 geninin aşırı ifadesinin mayalarda gliserin oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (SCANES ve ark., 1998; DEQUIN, 2001). GPD1 geninin aşırı ifadesi sonucu, Gpd1p aktivitesi 20 kat artmış *S. cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada, gliserin veriminin yabani suşlara oranla 6.5 kat arttığı belirlenmiştir. Şarap suşlarında GPD1 geninin aşırı ifadesine yönelik çalışmaların, fermentasyonda aynı zamanda etanol verimini de düşürdüğü gösterilmiştir. Bu amaçla genetik olarak geliştirilmiş tüm maya suşlarının, şarap üretiminde kullanılan koşullara benzer koşullar altında üretildiklerinde 200 g/L glukozdan 20 g/L gliserin derişiminden daha az miktarda gliserin ürettikleri belirlenmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarla, GPD1 geni aşırı ifade edilmiş rekombinant ozmotolerant maya suşlarının yüksek düzeyde gliserin ürettiklerine yönelik bir veri bulunmamıştır. Ancak mayalarda gliserin metabolizmasının daha iyi anlaşılması ile, genetik olarak işlem görmüş ozmotolerant mayalardan yüksek gliserin üretimi sağlanabileceğinin düşünülmektedir (WANG ve ark., 2001). Aynı yaklaşımıyla bira mayaları üzerinde de çalışılmıştır. Bira mayasının GPD1 geninin artırılması ile daha düşük etanol verimi ve dört kat daha fazla gliserin veriminin elde edildiği bulunmuştur (DEQUIN, 2001).

Aminoasit analoglarına dirençli *S. cerevisiae* mutantlarında lösin ve fenilalanin gibi aminoasitlerin üretimlerinin artığı, bunun da alkoldehidrojenaz aktivitesinin azalmasına, dolayısıyla gliserin üretiminin artmasına yol açtığı belirlenmiştir. *C. glycerinogenes* ile yapılan bir çalışmada da, arabinol sentezinde rol oynayan genlerin bloke edilmesinin gliserin üretiminin 85 g/L'den 100 g/L'nin üzerine çıkardığı belirtilmektedir (WANG ve ark., 2001). Şarap mayalarının seçici hibritleştirilmesi sonucu mayalar tarafından üretilen gliserin miktarının 3.0-6.6 g/L seviyesinden 10-11 g/L seviyesine yükseldiği bildirilmiştir (EUSTACE ve THORNTON, 1987; SCANES ve ark., 1998).

Gliserin üretim verimi artırlan şarap mayası suşlarının durgun fazda fermentasyon hızlarının arttığı belirlenmiştir. Bu da mevcut NADH'in glikoliz için yeterli olmamasına neden olmaktadır. Değişen NADH metabolizması sonucu suşların bazı yan ürünlerinin üretimini artırdıkları belirtilmiştir. Bunların başlıcaları asetat, asetoin, 2,3-bütandiol ve suksinat olarak verilmektedir. Yüksek miktardaki asetat bir dezavantaj oluşturacağından, bu problemin asetaldehit dehidrojenaz enzimini kodlayan ALD6 geninin bloke edilmesi ile çözüleceği belirtilmektedir (SCANES ve ark., 1998; DEQUIN, 2001).

9. SONUÇ

Mikrobiyal gliserin üretiminde, son yıllarda suş seçimi ve manuplasyonları ile, 20. yüzyılın başlarında kullanılan proseslerle kıyaslandığında önemli bir gelişme kaydedildiği bildirilmektedir. Gliserin üretim verimi ve verimliliğini artırmak için gelecekte yapılacak olan çalışmaların daha çok; fermentasyon prosesinin ekonomik olarak gerçekleştirilebilmesi üzerine yoğunlaşması beklenmektedir. *S. cerevisiae*'nın gliserin metabolizmasının daha iyi anlaşılmasıyla son 10 yılda önemli genetik çalışmaların yapılmış olduğu, ancak bu araştırmaların genellikle şarap suşları ile sınırlı kaldığı da belirtilmektedir (SCANES ve ark., 1998). Diğer ozmotolerant mayaların gliserin metabolizması *S. cerevisiae* kadar araştırılmadığı için, bu mayaların gliserin üretimi ile ilgili çok az genetik çalışmaya rastlanmaktadır. Gelecekte ise biyoteknoloji konusunda çalışanların, gliserinin ekonomik olarak üretimini gerçekleştirmek için uygun suşlar geliştirmeleri ve genetik manuplasyonlara yönelikleri beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- AGARWAL, G.P., 1990. Microbial Bioproducts. 'Alınmıştır. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology', Ed A. Fiechter', Germany, 96-128.
- AKTAN, N., KALKAN, H., 2000. Şarap Teknolojisi. Yayın no: 4. Kavaklıdere Eğitim Yayıncılığı, Ankara, 613 sayfa.
- ALBERS, E., LARSSON, C., LIDEN, G., NIKLASSON, C., GUSTAFSSON, L., 1996. Influence of the Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. and Environ. Microb.* Sept., 3187-3195.
- CHEN, B.J., CHI,C.H., 1981. Process Development and Evaluation for Algal Glycerol Production. *Biotech. Bioeng.* 23 1267-1287.
- COSTENOBLE, R., VALADI, H., GUSTAFSSON, L., NIKLASSON, N., FRANZEN, C.J., 2000. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16 1483-1495.
- DEQUIN, S., 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 577-588.
- EUSTACE, R., THORNTON, R.J., 1987. Selective hybridization of wine yeasts for higher yields of glycerol. *Can. J. Microbiol.* 33 112-117.
- GARDNER, N., RODRIGUE, N., CHAMPAGNE, C.P., 1993. Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7) 2022-2028.
- HEARD, G.M., FLEET, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacter.* 65 23-28.
- KAYAHAN, M. 1998 Lipidler. 'Alınmıştır. Gıda Kimyası', Ed İ. Saldamlı', Yayın No: 1. Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, 525 sayfa.
- KILIÇ, O., 1990. Alkollü İçkiler Teknolojisi. Yayın no:1. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 236 sayfa.
- KIRK, R.E., OTHMER, D.F., 1967 Glycerol. 'Alınmıştır. Encyclopedia of Chemical Technology', Ed A. Standen', Yayın no.2, ABD, 938 sayfa.
- ONISHI, H., 1958. Glycerol production by the salt-tolerant yeasts in the medium with high concentrations of sodium chloride. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.* 23(5) 359-363.
- ONISHI, H., 1959. Polyalcohol production by various genera and species of yeasts . *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.* 24(2) 131-140.
- ONISHI, H., SAITO, N., KOSHIYAMA ,I., 1960. Various factors affecting on polialcohol production by *Pichia miso*. *Agr. Biol. Chem.* 25(2) 124-130.
- ONISHI, H., SAITO, N., 1962. Partial purification of polyol dehydrogenase from *Pichia miso* and the properties of this enzyme. *Agr., biol. Chem.* 26(4) 245-251.
- ONISHI, H., 1963. The effects of high concentrations of sodium chloride on polyalcohol production. *Agr. Biol. Chem.* 27(7) 543-547.
- PAREKH, S.R., PANDEY, N.K., 1985. Production of glycerol by *Hansenula anomola*. *Biotech. Bioeng.* 27 1089-1091.
- PETROVSKA, B., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S., 1999. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Can. J. Microbiol.* 45(8) 695-699.
- REMIZE, F., SABLAYROLLES, J.M., DEQUIN, S., 2000. Re-assesment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *Jour. Appl. Microbiol.* 88 371-378.
- SAHOO, D.K., AGARWAL, G.P., 2001. An investigation on glycerol biosynthesis by an osmophilic yeast in a bioreactor. *Process Biochemistry* 36 839-846.
- SCANES, K.T., HOHMANN, S., PRIOR, B.A., 1998. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19(1) 17-24.
- SPENCER, J.F.T., 1968 Production of polyhydric alcohols by yeasts. 'Alınmıştır. Progress in Industrial Microbiology', Ed D.J.D. Hockenhall' Kanada, 2-42.
- VIIAIKISHORE, P., KARANTH, N.G., 1984. Glycerol production by fermentation. *Appl. Biochem. Biotech.* 9 243-253.
- VIIAIKISHORE, P., KARANTH, N.G., 1986. Glycerol production by fermentation: a review. *Process Biochemistry April* 54-57.
- VIIAIKISHORE, P., KARANTH, N.G., 1987. Glycerol production by fermentation: a fed-batch approach. *Biotech. Bioeng.* 30 325-328.
- WANG, Z.X., ZHUGE, J., HUIYING, F., PRIOR, B.A., 2001. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotech. Advan.* 19 201-223.
- XIE, D.M., LIU, D.H., ZHANG, J.A., 2001. Temperature optimization for glycerol production by batch fermentation with *Candida krusei*. *J. Chem. Techno. Biotechnol.* 76 1057-1069.
- ZHUGE, J., FANG, H.Y., WANG, Z.X., CHEN, D.Z., JIN, H.R., GU, H.L., 2001. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 686-692.