

# FERMANTASYON YOLU İLE SİTRİK ASİT ÜRETİMİNDE FARKLI SUBSTRAT KAYNAKLARININ KULLANILMA OLANAKLARI

Seda Karasu Yalçın<sup>1</sup>, M. Tijen Bozdemir<sup>2</sup>, Z. Yeşim Özbaş<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Abant İzzet Baysal Üniv., Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühend. Bölümü, Bolu

<sup>2</sup> Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara

<sup>3</sup> Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 23.04.2009

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 06.07.2009

Kabul tarihi / Accepted: 07.07.2009

## Özet

Sitrik asit, gıda endüstrisinde asitlendirici, aroma geliştirici, koruyucu, emülsifiyer, stabilizatör ve antioksidan olarak kullanılabilen bir trikarboksilik asittir. Sitrik asit günümüzde büyük ölçüde, fermantasyon yolu ile üretilmekte ve bu amaçla yaygın olarak küflerin ve mayaların kullanıldıkları bilinmektedir. Sitrik asit Krebs (Trikarboksilik asit-TCA) çevriminde bir ara ürün olup, bu ürünün hücrede birikimi ancak belirli koşullarda gerçekleşmektedir. Sitrik asit üretiminin büyük ölçüde suşa ve ortam bileşimine bağlı olduğu ifade edilmektedir. Mikroorganizmalar tarafından sitrik asit üretimini etkileyen en önemli faktörün, kullanılan substratın türü ve derişimi olduğu belirtilmektedir. Bu amaçla kullanılan ve mikroorganizmaya göre değişen birçok substrat seçeneği arasında, çeşitli endüstriyel artıklar veya yan ürünler gibi doğal substrat kaynakları son yıllarda oldukça ilgi çekici hale gelmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Sitrik asit, fermantasyon, *Aspergillus niger*, *Yarrowia lipolytica*, üretim metabolizması, doğal substrat kaynakları

## UTILIZATION OF VARIOUS SUBSTRATE SOURCES IN THE PRODUCTION OF CITRIC ACID BY FERMENTATION

### Abstract

Citric acid is a tricarboxylic acid which can be used in food industry as an acidifier, aroma enhancer, preservative, emulsifier, stabilizer, and antioxidant. Today, citric acid is produced mainly by fermentation, and it is known that molds and yeasts have been widely used for this purpose. Citric acid is an intermediate product in Krebs (Tricarboxylic acid-TCA) cycle, whereby accumulation of this product in the cell can only occur at certain conditions. It is stated that production of citric acid is mainly dependent on the strain and medium composition. It is reported that the most important factor affecting to citric acid production is the type and concentration of the substrate used. Among plenty of substrates that are used for this purpose and varied according to the microorganism, natural substrate sources such as various industrial wastes and by-products have attracted significant interest in recent years.

**Keywords:** Citric acid, fermentation, *Aspergillus niger*, *Yarrowia lipolytica*, production metabolism, natural substrate sources

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author ;

✉ yesim@hacettepe.edu.tr, ☎ (+90) 312 297 7112, 📠 (+90) 312 299 2123

## GİRİŞ

Sitrik asit (2-hidroksi-1,2,3-propan trikarboksilik asit), bütün canlı organizmaların oksidatif metabolizmasında yer alan bir metabolittir (1). Sitrik asidin, başta narenciye türü meyveler olmak üzere pek çok bitkide doğal olarak bulunduğu belirtilmektedir (1, 2). Sitrik asit, pek çok endüstri dalında geniş kullanım alanı bulan bir trikarboksilik asittir. Bu organik asit, gıda endüstrisinde, asitlendirici, aroma geliştirici, koruyucu, emülsifiyer, stabilizatör ve antioksidan olarak kullanılan vazgeçilmez bir gıda katkı maddesidir. Yapılan araştırmalara göre, 1993 yılında dünya sitrik asit üretiminin; 700 bin ton (3), 2004 yılında 1.4 milyon ton (4) ve 2008 yılında ise; 1.6 milyon tona ulaştığı bildirilmektedir (5). Günümüzde, sitrik asit üretiminin %90'ından fazlasının fermantasyon yolu ile gerçekleştirildiği bilinmektedir. Mikroorganizmalar tarafından sitrik asit üretiminin, hücrede birçok metabolik ve morfolojik değişimleri içeren karmaşık bir proses olduğu ve pek çok parametreden etkilendiği bildirilmektedir (6). Mikroorganizmalar tarafından sitrik asit üretimini etkileyen en önemli faktörün, kullanılan substratın türü ve derişimi olduğu belirtilmektedir. Dünyada sitrik asit tüketimindeki artışa paralel olarak, sitrik asit üretiminde de her geçen yıl yeni gelişmelerin kaydedildiği, üretimin daha ekonomik hale getirilmesi ve ürün veriminin artırılması yolundaki çabaların da sürdürüldüğü belirtilmektedir. Sitrik asit üretimi ile ilgili olarak üzerinde durulan son gelişmelerden birisinin, prosesin daha ekonomik hale getirilebilmesi için bazı doğal substrat kaynaklarının kullanılması olanaklarının araştırılması olduğu bildirilmektedir (4, 7). Buna paralel olarak da bazı hammadde-lerin, endüstriyel artık ve atıkların veya yan ürünlerin sitrik asit üretiminde substrat veya destekleyici bileşen olarak kullanımına yönelik çalışmaların arttığı görülmektedir.

Bu derlemede; mikrobiyel yolla sitrik asit üretimi, üretim metabolizması, üretimde kullanılan farklı substrat kaynakları ve bu konularda son yıllarda kaydedilen gelişmelere yer verilmiştir.

## SİTRİK ASİT ÜRETİMİ

Sitrik asidin ilk olarak, 1784 yılında Scheele tarafından, limon suyundan kristallendirilerek elde edildiği bilinmektedir (8). İlk olarak Wehmer'in, 1893'te *Citromyces (Penicillium)* küfü ile yaptığı bir

araştırmada, sitrik asidin mikrobiyel bir metabolit olduğunu keşfettiği rapor edilmiştir. Bundan sonra, bu metaboliti üretebilen diğer mikroorganizmalar üzerinde yapılan araştırmaların, mikrobiyel yolla sitrik asit üretiminin ticari olarak uygulanmasına öncü oldukları bilinmektedir. 1917'de Currie'nin, bir *A. niger* suşunun şeker içeren bir ortamda önemli miktarda sitrik asit ürettiğini keşfettiği belirtilmektedir. Daha sonra, başka *Aspergillus* türlerinin de sitrik asit üretebildikleri belirlenmiştir. Bu türler; *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus luchuensis* ve *Aspergillus fonsecaeus* olarak bildirilmiştir. Ancak yapılan çeşitli çalışmalarda sitrik asit üretimi için en uygun türün; *A. niger* olduğu belirtilmiştir (9, 10).

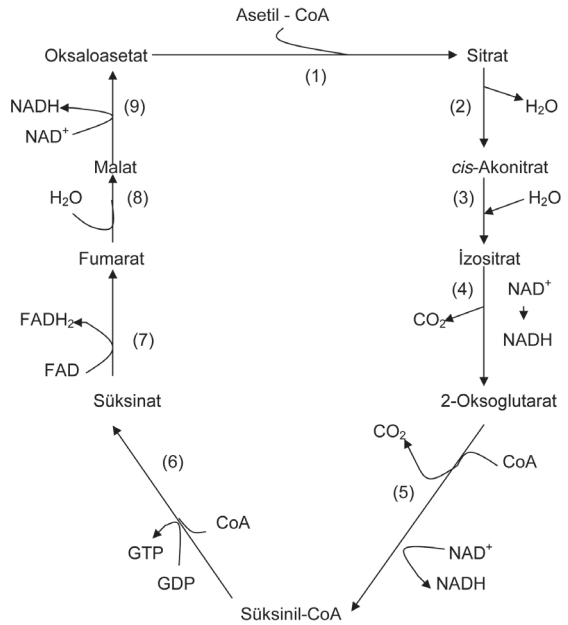
1960'ların sonunda, hidrokarbon içeren bir ortamda *Candida lipolytica*'nın yüksek miktarda sitrik asit üretebildiği ve sitrik asit veriminin *A. niger* ile elde edilenin iki katı olduğu rapor edilmiştir (11). 1970'li yıllarda, Japonya'da *Candida* türleri ile düz zincirli parafın kullanılarak endüstriyel sitrik asit üretiminin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. İlerleyen yıllarda, mayaların sitrik asit üretiminde kullanılmasına yönelik çalışmaların yoğunlaştığı görülmektedir. Mayaların sitrik asit üretiminde kullanılmalarının, *A. niger*'in kullanıldığı proseslere kıyasla bazı avantajlarının olduğu vurgulanmaktadır. Mayaların kullanıldığı proseslerin en önemli avantajları arasında; geniş karbon kaynağı kullanım olanaklarının yanı sıra, substratların yüksek derişimlerine karşı tolerans, yüksek dönüşüm oranları, yüksek verim değerleri, metal iyonu sızdırmalarına karşı küflerle karşılaştırıldığında duyarlılığın olmaması ve mayaların tek hücreli olmaları nedeniyle proses kontrolünün daha kolay yapılabilmesi verilmektedir (12, 13). Sitrik asit üretimi için uygun olarak bildirilen mayalar arasında; *Yarrowia (Candida) lipolytica*, *Candida paratropicalis*, *Candida intermedia*, *Candida oleophila*, *Candida guilliermondii*, *Candida zeylanoides*, *Candida catenulata*, *Candida parapsilosis*, *Pichia anomala* ve bazı *Rhodotorula* türleri yer almaktadır (3, 7). Ancak günümüzde, endüstriyel ölçekte sitrik asit üretiminde kullanılan tek mayanın, *Y. lipolytica* olduğu bilinmektedir (8). Sitrik asit üretiminde mayaların kullanılmasının bir dezavantajı olarak; izositrik asit üretimi gösterilmektedir. Bazı maya suşlarının ürettikleri toplam asidin %50'sine varan mik-

tarlarda izositrik asit üretebildikleri, ancak bu özelliğin suşa bağlı olarak değişebildiği belirtilmektedir. Bu nedenle, proste izositrik asit üretimi düşük olan suşların seçilmesinin gerektiği bildirilmektedir (14).

Dünya sitrik asit üretiminin %90'ından fazlasının fermantasyon yolu ile gerçekleştirildiği bilinmektedir (4). Endüstriyel olarak sitrik asit üretimi üç farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. Bunlar; derin fermantasyon, yüzey fermantasyonu ve Koji prosesi olarak da bilinen; katı hal fermantasyonudur. Bunlar arasında en fazla kullanılan tekniğin; derin fermantasyon olduğu ve dünyadaki sitrik asidin %80'inin bu yolla üretildiği belirtilmektedir (4). Büyük ölçeklerde gerçekleştirilen derin fermantasyon prosesinde, karmaşık bir donanımın ve etkin bir kontrol sisteminin gerekliliği üzerinde durulmaktadır. Derin fermantasyon yönteminin diğer fermantasyon yöntemlerine göre bazı üstünlüklerinin olduğu bilinmektedir. Yüksek verim ve üretkenlik, düşük maliyet ve kontaminasyon riskinin daha az olması belirtilen üstünlükler arasında gösterilmektedir. Derin fermantasyon yönteminin kesikli, kesikli beslemeli veya sürekli sistemlerle gerçekleştirilebildiği, ancak daha çok kesikli prosesin kullanıldığı bildirilmektedir (4, 15). Sıvı yüzey fermantasyonu yönteminin ise klasik bir yöntem olduğu, sitrik asit üretimi amacıyla kullanımının derin fermantasyon yönteminden önce başladığı belirtilmektedir. Yüzey fermantasyonunun küçük ve orta ölçekli işletmelerde halen kullanılabilirdiği bilinmektedir. Buna neden olarak da, gereksinim duyulan iş gücü, donanım ve enerji maliyetlerinin daha az olması gösterilmektedir. Bir diğer yöntem olan katı hal fermantasyonu, Koji prosesi olarak da bilinmektedir. Sitrik asit üretimi için en kolay yöntem olarak belirtilen bu proses, endüstriyel artıkların değerlendirilmesi için de alternatif bir yol olarak gösterilmektedir (15). Yöntem; mikroorganizmaların fiziksel destek materyali ve besin kaynağı olarak işlev gören, düşük su aktivitesi ve çözünmez özellikteki katı materyaller üzerinde geliştirilmesi şeklinde uygulanmaktadır (16, 17). Mikroorganizmanın yüzeyde gelişmesi yönünden, katı hal fermantasyonunun yüzey fermantasyonuna benzer özellikler taşıdığı belirtilmektedir. Katı hal fermantasyonu ile sitrik asit üretiminde en sık kullanılan mikroorganizmanın *A. niger* olduğu bilinmektedir. Ancak, mayaların kullanıldığı çalışmalar da rapor edilmiştir (4).

## MİKROBİYEL SİTRİK ASİT ÜRETİM METABOLİZMASI

Sitrik asidin hücrede üretimi ve birikimi, birçok metabolik ve morfolojik değişimleri içeren, oldukça karmaşık bir proses olarak tanımlanmaktadır (6). Mikroorganizmalar tarafından sitrik asit üretiminin biyokimyasının incelenmesi amacıyla yapılan araştırmaların, öncelikle *A. niger* üzerinde yoğunlaştığı bilinmektedir (18). Sitrik asidin, Krebs (Trikarboksilik asit – TCA) çevriminde bir ara ürün olduğu bilinmektedir (Şekil 1). Mikroorganizmanın kullanabildiği her substratın Asetil-CoA'ya parçalanması ve TCA çevrimine katılması doğal bir olay olmakla birlikte, hücrede sitrik asit birikiminin yüksek düzeyde olmasının bazı nedenlere bağlı olduğu bildirilmektedir. *A. niger* ile sitrik asit üretiminin, TCA çevriminde yer alan reaksiyonların alışılmamış bir boyutta gerçekleşmesinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (7). Sitrik asit üretimi ile ilgili, üzerinde detaylı olarak çalışılmış iki anahtar enzimin; akonitaz ve izositrat dehidrogenaz oldukları belirtilmektedir. Sitrik asidin birikimi sırasında, bu iki enzimin aktivitelerinin oldukça düşük düzeyde oldukları, sitrik asit sentezinden sorumlu enzimlerin spesifik aktivitelerinin ise arttığı ortaya konulmuştur.



Şekil 1. Trikarboksilik asit (Krebs) döngüsü (19).

(1: Sitrat sentetaz, 2,3: Akonitaz, 4: İzositrat dehidrogenaz, 5: 2-oksooglutarat dehidrogenaz, 6: süksinat tiyokinaz, 7: süksinat dehidrogenaz, 8: fumaraz, 9: malat dehidrogenaz)

Sitrat sentetaz, Asetil-CoA ve oksaloasetik asidin reaksiyonu sonucunda, sitrik asit biyosentezi ni gerçekleştiren enzimdir. Bu iki ve dört karbonlu bileşiklerin reaksiyonu, sitrat sentezi için temel basamağı oluşturmaktadır. Düzenleyici bir enzim olan sitrat sentetazın, bütün hücrelerdeki sitrik asit döngüsünün çalışma hızını ayarladığı belirtilmektedir (20). Sitrat sentetaz enziminin düşük bir allosterik regülasyona sahip olduğu belirtilmektedir. Sitrik asit üretiminde rol oynayan oksaloasetik asit, TCA çevriminde anaplerotik bir reaksiyon sonucu oluşmakta ve yüksek düzeyde sitrik asit üretiminin gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Sitrik asit döngüsünde, sitrik asitten sonra gelen ürün olan izositrik asidin yıkımı, TCA çevriminde izositrat dehidrogenaz ve glioksilat çevriminde izositrat liyaz enzimleri ile gerçekleşmektedir (7, 8). Glioksilat çevrimi, bitkiler ve bazı mikroorganizmalarda görülen, sitrik asit döngüsünün bir modifikasyonu olarak bilinmektedir. Bu çevrimde izositrik asidin yıkımının izositrat dehidrogenaz ile değil, izositrat liyaz ile gerçekleştirildiği bildirilmektedir (20). Sitrik asit birikimi sırasında ortamda, izositrat liyaz enziminin bulunmadığı rapor edilmiştir. Elektron akseptörü olarak NAD<sup>+</sup> veya NADP<sup>+</sup> kullanan iki farklı izositrat dehidrogenaz enziminin bulunduğu bilinmektedir (20). *A. niger*'in içerdiği izositrat dehidrogenazın NADH ve NADPH bağımlı olabildiği ve her iki enzimin de tanımlandığı bildirilmektedir. NADH-bağımlı enzim sitoplazmada, NADPH-bağımlı enzim ise mitokondride yer almakta ve bu enzim ortamda sitratın artması ile inhibe olmaktadır. NADPH-bağımlı mitokondriyal izositrat dehidrogenaz enzimini sitrik asidin kendisinin inhibe ettiği rapor edilmiştir (21). Bu ileri besleme mekanizmasının, sitrik asit birikiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu açıklama doğru kabul edilmesine rağmen, sözü edilen mekanizmanın sitrik asit üretiminin başlamasından sorumlu olamayacağı da belirtilmektedir. (7, 8). Sitrik asidin hücrede birikimini açıklamak üzere, bir başka mekanizmanın daha öne sürüldüğü bilinmektedir. *A. niger* tarafından %1'in üzerinde gliserinin hücrede biriktirilmesi, NADP-bağımlı izositrat dehidrogenazın ilk inhibisyonu için bir neden olarak gösterilmiştir. Bu inhibisyonun da sitrat birikimini başlattığı belirtilmiştir. Sitrat derişimi kritik bir değere ulaştığında ise; ileri besleme mekanizması ile, ortamdaki gliserinin asimilasyonu yerine, NADP-bağımlı izositrat

dehidrogenazın inhibisyonunun devam ettiği bildirilmektedir (7, 8).

Hücrede sitrik asit düzeyinin artışından sonra, biriken sitrik asidin hücreden dışarı salınımı gerekmektedir. Bu salınım mekanizmasının *A. niger*'de kesin olarak açıklanamadığı belirtilmektedir (8). Sitrik asidin hücre içinde biriktirilmesi ve hücre dışına salınımının, birbirlerinden oldukça farklı iki mekanizma oldukları bildirilmektedir. Sitrik asidin mitokondriden sitoplazmaya, sitrat malat translokaz enzimi aracılığı ile geçişinin iyi bilinmesine rağmen, sitoplazmadan ortama geçişinin nasıl gerçekleştiğinin yakın zamana kadar çok iyi anlaşılamadığı bildirilmektedir. 1980 yılında, *C. lipolytica* ile yapılan bir çalışmada, hücre içi ve dışındaki sitrik asit ve izositrik asit derişimlerinin hemen hemen eşit oldukları belirlenmiş, bu nedenle bu asitlerin hücre membranından geçişlerinin pasif difüzyon yoluyla olduğu öne sürülmüştür (22). Yapılan bir başka çalışmada da, hücre içi ve dışındaki sitrat/izositrat oranının eşit olduğu ve hücre dışına taşınma mekanizmasının pasif difüzyon yoluyla olabileceği bildirilmiştir. Sitrik asidin, hücre membranından izositrik aside göre öncelikli olarak geçişi için bir spesifik aktif taşıma mekanizmasının, ilk olarak *C. oleophila* ile yapılan bir çalışmada ortaya koyulduğu belirtilmektedir. Bu çalışmanın, hücre içi ve dışındaki büyük bir derişim farkı olduğunda bile, sitrik asidin hücre dışına taşınabildiğini gösterdiği bildirilmiştir (22).

Mayalar tarafından sitrik asit üretiminin de, *A. niger*'dekine benzer bir metabolizma ile gerçekleştiği bilinmektedir. Mayalarda, yüksek miktarda sitrik asit birikiminin gerçekleşmesinin belirli koşullara bağlı olduğu bildirilmektedir. Sitrik asit, üremenin logaritmik evresinde değil, durgun fazında üretilen bir üründür. Mayalar ile sitrik asit üretiminin artırılması için, çevrimin yeterli enerjiyi üretmesine izin verecek şekilde, metabolizmanın sitrat bileşğinde bloke edilmesinin gerektiği bilinmektedir (18). Maya üremesinin, ortamdaki azot miktarının azalması ile yavaşlaması, ortamda kalmış olan karbon kaynağının metabolize edilmesi ile sonuçlanmaktadır. Bunun, ATP derişiminin artmasına, AMP ve ADP'nin azalmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, aktivite göstermesi için AMP'ye ihtiyaç duyan izositrat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin yavaşladığı ve durduğu belirtilmektedir (18). Anastasiadis ve ark. (2002) tarafından, *C. oleophila* ile yapılan bir çalışmada; azot kaynağının tükenmesinin, maya metabolizmasını



hücre üremesinden, ürün üretimi yönüne çevirdiği bildirilmiştir (6).

Sitrik asit metabolizması ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, çok farklı sonuçlar ortaya çıkabildiği için, literatürde bu konunun karmaşıklığından sıkça söz edildiği rapor edilmiştir (23). Buna neden olarak da, çalışmalardaki suşlar ve kullanılan ortamların farklılıkları ve bu farklılıkların metabolizmayı etkilemesi gösterilmektedir. Sitrik asit üretiminin biyokimyası incelenirken, bu konuların da dikkate alınması gerektiği bildirilmektedir (23). Sitrik asit üretim verimini artırmak için; ortam bileşimi ve fiziksel koşulların optimizasyonlarının yanısıra, suş seçimi ve genetik çalışmaların da önem kazandığı bildirilmektedir. Akonitaz aktivitesinin azalması ile sonuçlanan bir mutasyonun, sitrik asit üretim verimini oldukça artırdığı bildirilmektedir. Mutasyonun gerçekleştirilebilmesi amacıyla, gama ışınları, UV ışınları veya mutajenik etkili kimyasal maddelerin kullanılabilmesi bildirilmektedir (4).

## SİTRİK ASİT ÜRETİMİNDE FARKLI SUBSTRAT KAYNAKLARININ KULLANILMALARI

Sitrik asit üretiminin, ortamın kimyasal bileşiminden önemli ölçüde etkilendiği bilinmekte; besiye- rinde kullanılan substratın türü ve başlangıç derişimi, mineral içeriği, azot kaynağının türü ve derişiminin, sitrik asit üretimi üzerinde elzem öneme sahip oldukları bildirilmektedir (4). Yapılan çalışmalarla, mikroorganizmalar tarafından sitrik asit üretimini etkileyen en önemli faktörün, kullanılan substratın türü ve derişimi olduğu belirtilmiştir. Proseste kullanılacak olan karbon kaynağının türü, kullanılan mikroorganizmaya göre değişebilmektedir (3). *A. niger*, glukoz ve fruktoz gibi basit şekerleri hızlı bir şekilde metabolize edebilmektedir. Sitrik asit üretiminde *A. niger*'in kullanıldığı proseslerde en sık kullanılan şekerin ise, sakkaroz olduğu belirtilmektedir (9). Buna neden olarak, *A. niger* miselyumunda yüksek düzeyde hücre dışı invertaz bulunması gösterilmektedir (8, 24). Yapılan bir çalışmada, *A. niger* ile sitrik asit üretiminde kullanılacak, en iyi sonucu veren substratın sakkaroz olduğu, bunu glukoz, fruktoz ve laktozun izlediği belirtilmiştir. Bu küfün, mannoz, ksiloz ve arabinozu da asimile edebildiği ve bunlardan sitrik asit üretebildiği, ancak verimin glukozla elde edilenden daha az olduğu da rapor edilmiştir. Kullanılan substratın derişiminin de sitrik asit üretim prosesinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. *A. niger* ile yapılan çeşitli çalışmalarda en yüksek sitrik asit üretim hızına, %10-22 şeker derişimi aralığında ulaşıldığı bildirilmiştir. %2.5'den daha düşük şeker derişimlerinde sitrik asit üretiminin olmadığı da rapor edilmiştir (7). Sitrik asit üretiminde mayaların kullanıldığı proseslerde karbon kaynağı olarak daha farklı maddelerin kullanıldığı bilinmektedir. 1970'li yıllarda yapılan çalışmalarda, mayalar ile sitrik asit üretiminde genellikle hidrokarbonların kullanıldığı ve yüksek verimde üretimin gerçekleştiği belirtilmektedir. Ancak 1973-74 yıllarında gerçekleşen dünya petrol krizi, *n*-alkanların sitrik asit üretiminde substrat olarak kullanılmasını engellemiştir (3, 9). Aynı yıllarda, mayalar tarafından sitrik asit üretiminde glukozun da önemli bir karbon kaynağı olduğu ve yapılan bir çalışmada en yüksek verimin glukoz içeren ortamda elde edildiği rapor edilmiştir. *Candida* türleri ile yapılan bir başka çalışmada da, sitrik asit üretimi için en uygun substratların; hidrokarbonlar, glukoz ve gliserin olduğu öne sürülmüştür (9). Mayaların kullanıldığı proseslerde, glukoz içeren ortamlarda, alkanları içeren ortamlardakine oranla daha düşük miktarda izositrik asit üretildiği de ifade edilmiştir (25). Sitrik asit üreten bazı maya suşlarının, fruktozu düşük düzeyde asimile ettikleri bilinmesine rağmen, melas veya invert şeker karışımlarının sitrik asit üretiminde kullanıldıkları da bildirilmiştir. *C. lipolytica* ile yapılan bir başka çalışmada da, substrat olarak gliserin, glukoz veya fruktoz kullanıldığında, yüksek sitrik asit verimlerinin elde edildiği bulunmuştur (26). İki farklı *Y. lipolytica* suşu ile yapılan bir araştırmada; sitrik asit üretiminde substrat olarak fermantasyon ortamında; glukoz, fruktoz, sakkaroz, gliserin ve mannitölün kullanılma olanakları araştırılmıştır. Sitrik asit üretimi açısından en iyi sonuçların glukoz ve fruktoz içeren ortamlarda elde edildiği rapor edilmiştir (27). Son yıllarda ise, karbonhidratların yanı sıra, etil alkolün de sitrik asit üretiminde kullanılabilirdiği ve yüksek verim elde edilebildiği bilinmektedir (28-30). Alkanları asimile edebilen bazı mayaların, yağ asitleri, trigliseritler, bitkisel ve hayvansal yağlar gibi hidrofobik substratları da asimile edebildikleri bilinmektedir (31, 32). Bitkisel yağların, maya gelişimi veya bazı ürünlerin üretimi için, son zamanlarda yeni bir substrat olarak öne çıktığı görülmektedir (13, 33). *Y. lipolytica*, *C. tropicalis* ve bazı *Rhodotorula* suşlarının yenilebilir yağları kullanarak, sitrik asit üretebildikleri bildirilmektedir (34). Bu amaçla; ayçiçeği, soya, zeytin ve kol-

tın derişiminin de sitrik asit üretim prosesinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. *A. niger* ile yapılan çeşitli çalışmalarda en yüksek sitrik asit üretim hızına, %10-22 şeker derişimi aralığında ulaşıldığı bildirilmiştir. %2.5'den daha düşük şeker derişimlerinde sitrik asit üretiminin olmadığı da rapor edilmiştir (7). Sitrik asit üretiminde mayaların kullanıldığı proseslerde karbon kaynağı olarak daha farklı maddelerin kullanıldığı bilinmektedir. 1970'li yıllarda yapılan çalışmalarda, mayalar ile sitrik asit üretiminde genellikle hidrokarbonların kullanıldığı ve yüksek verimde üretimin gerçekleştiği belirtilmektedir. Ancak 1973-74 yıllarında gerçekleşen dünya petrol krizi, *n*-alkanların sitrik asit üretiminde substrat olarak kullanılmasını engellemiştir (3, 9). Aynı yıllarda, mayalar tarafından sitrik asit üretiminde glukozun da önemli bir karbon kaynağı olduğu ve yapılan bir çalışmada en yüksek verimin glukoz içeren ortamda elde edildiği rapor edilmiştir. *Candida* türleri ile yapılan bir başka çalışmada da, sitrik asit üretimi için en uygun substratların; hidrokarbonlar, glukoz ve gliserin olduğu öne sürülmüştür (9). Mayaların kullanıldığı proseslerde, glukoz içeren ortamlarda, alkanları içeren ortamlardakine oranla daha düşük miktarda izositrik asit üretildiği de ifade edilmiştir (25). Sitrik asit üreten bazı maya suşlarının, fruktozu düşük düzeyde asimile ettikleri bilinmesine rağmen, melas veya invert şeker karışımlarının sitrik asit üretiminde kullanıldıkları da bildirilmiştir. *C. lipolytica* ile yapılan bir başka çalışmada da, substrat olarak gliserin, glukoz veya fruktoz kullanıldığında, yüksek sitrik asit verimlerinin elde edildiği bulunmuştur (26). İki farklı *Y. lipolytica* suşu ile yapılan bir araştırmada; sitrik asit üretiminde substrat olarak fermantasyon ortamında; glukoz, fruktoz, sakkaroz, gliserin ve mannitölün kullanılma olanakları araştırılmıştır. Sitrik asit üretimi açısından en iyi sonuçların glukoz ve fruktoz içeren ortamlarda elde edildiği rapor edilmiştir (27). Son yıllarda ise, karbonhidratların yanı sıra, etil alkolün de sitrik asit üretiminde kullanılabilirdiği ve yüksek verim elde edilebildiği bilinmektedir (28-30). Alkanları asimile edebilen bazı mayaların, yağ asitleri, trigliseritler, bitkisel ve hayvansal yağlar gibi hidrofobik substratları da asimile edebildikleri bilinmektedir (31, 32). Bitkisel yağların, maya gelişimi veya bazı ürünlerin üretimi için, son zamanlarda yeni bir substrat olarak öne çıktığı görülmektedir (13, 33). *Y. lipolytica*, *C. tropicalis* ve bazı *Rhodotorula* suşlarının yenilebilir yağları kullanarak, sitrik asit üretebildikleri bildirilmektedir (34). Bu amaçla; ayçiçeği, soya, zeytin ve kol-

za yağı gibi yağların kullanılabilirdiği belirtilmektedir (4).

Sitrik asit üretiminde, hem üretim verimini artırmak, hem de prosesin daha ekonomik olmasını sağlamak amacıyla, karbonhidrat içeren birçok doğal substrat kaynağının da kullanılabilirdiği ve bu substratların kullanımına yönelik çalışmaların son yıllarda arttığı görülmektedir (3). Bu proseslerde, bazı gıda endüstrisi artıkları veya çeşitli hammaddelelerin, doğal substrat kaynağı veya destekleyici bileşen olarak fermantasyon ortamına katılabilirdikleri belirtilmektedir (4, 35). Yüksek miktarda şeker içermesi (%40-55) ve ucuz olması nedeni ile melas, *A. niger*'in kullanıldığı derin fermantasyon yöntemi ile sitrik asit üretiminde sıkça kullanılan bir substrat kaynağı olmuştur (7, 36). *A. niger* ile, katı hal fermantasyonu kullanılarak sitrik asit üretimi amacıyla değerlendirilebilecek doğal substrat kaynakları arasında ise, başta meyve suyu endüstrisi artıkları gösterilmektedir. Bu amaçla; elma posası, kivi kabuğu, portakal artığı, ananas artığı, üzüm posası, havuç posası gibi artıkların kullanılabilirdikleri rapor edilmiştir (37-43). Bunların yanı sıra, buğday veya pirinç kepeği, artık irmik, mısır koçanı, keçiyoynuzu kabuğu, şeker pancarı küspesi gibi artık veya atıkların da sitrik asit üretiminde kullanılabilirdiği bilinmektedir (4, 44-46). Yapılan bazı çalışmalarda, et endüstrisi kesimhane artığı olan koç boynuzlarının, toz haline getirildikten sonra hidrolize edildiği ve elde edilen hidrolizatın, sitrik asit üretimi için fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (47, 48). Doğal substrat kaynaklarının değerlendirilmelerinde *Y. lipolytica*'nın kullanıldığı proseslerin genellikle derin fermantasyon ile gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Zeytinyağı, ayçiçeği yağı, hurma yağı, fındık yağı, kanola yağı gibi lipit kaynaklarının yanı sıra, melas, nişasta hidrolizati, ham gliserin gibi maddelerin de mayalar tarafından kullanılabilirdikleri bilinmektedir (13, 49). Patates nişastasından glukoz üretimi prosesinin bir yan ürünü olan glukoz hidrolun da, sitrik asit üretimi amacı ile kullanıldığı bildirilmiştir. Glukoz hidrol içeren bu ortamda mutant bir *C. lipolytica* suşu ile yapılan bir çalışmada, ulaşılan maksimum sitrik asit derişiminin; 100 g/L olduğu ifade edilmiştir (25). Endüstriyel bir başka artık olan peyniraltı suyunun da, sitrik asit üretimi amacı ile kullanımına yönelik çeşitli çalışmaların olduğu bilinmektedir (50-52). *C. lipolytica* ile yapılan bir çalışmada, peyniraltı suyuna farklı derişimlerde glukoz, maltoz, sakkaroz ve hurma çekir-

deği hidrolizati eklenerek mayanın sitrik asit üretimi incelenmiştir (50). *A. niger* ile yapılan bir başka çalışmada da, peyniraltı suyu farklı derişimlerde galaktoz, sakkaroz ve glukoz ile zenginleştirilmiş ve farklı parametrelerin sitrik asit üretimi üzerine etkileri incelenmiştir (52). Gerçekleştirilen bir diğer çalışmada; peyniraltı suyu, yerelması suyu, zeytin karasuyu, artık şarap, şarap tortusu ve üzüm şirasının *Y. lipolytica* ile sitrik asit üretiminde kullanıma olanakları araştırılmış ve en yüksek sitrik asit üretiminin, fermantasyon ortamı olarak kullanılan peyniraltı suyunun belirli derişimlerde glukoz veya fruktozla desteklenmesi durumunda elde edildiği belirlenmiştir (27).

## SONUÇ

Dünyada sitrik asit kullanımına olan talebin her geçen yıl, artarak devam ettiği bilinmektedir (4, 53, 54). Her yıl, sitrik asit tüketiminin ortalama; %3.5-4.0 oranında arttığı bildirilmektedir (4). Artan talebin karşılanabilmesi ve sitrik asit üretiminin daha ekonomik hale getirilebilmesi için, mikrobiyel sitrik asit üretim metabolizmasındaki regülasyonların iyi anlaşılması, yeni proseslerin geliştirilmesi, genetik çalışmalar ile sitrik asit üretimi yüksek olan yeni suşların elde edilmesi ve ayrıca; endüstriyel artık ve atıklar gibi ucuz ve doğal substratların kullanılması ile proste yer alabilecek farklı ortam seçeneklerinin artırılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Blair G, Staal P. 1999. Citric acid. In: *Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology*. Kroschwitz JI (ed), John Wiley and Sons, Inc., USA, pp. 452-454.
2. Verhoff FH. 2003. Citric acid. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Elvers B, Hawkins S, Harrer R, Pikart-Müller M (eds), Volume 8, Wiley-VCH, Germany, pp. 525-531.
3. Roehr M, Kubicek CP, Komínek J. 1993. Citric acid. In: *Biotechnology* Rehm. HC and Reed G (eds), Volume 6, Verlagsgesellschaft, Germany, pp. 388-395.
4. Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A. 2006. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol Biotechnol*, 44(2): 141-149.
5. Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol*, 26(2): 100-108.
6. Anastassiadis S, Aivaidis A, Wandrey C. 2002. Citric

- ric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 81-87.
7. Grewal HS, Kalra KL. 1995. Fungal production of citric acid. *Biotechnol Adv*, 13(2): 209-234.
  8. Matthey M. 1992. The production of organic acids. *Crit Rev Biotechnol*, 12(1/2): 87-132.
  9. Abou-Zeid AA, Ashy MA. 1984. Production of citric acid: a review. *Agr Waste*, 9: 51-76.
  10. Crueger W, Crueger A. 1990. *Biotechnology, A Textbook of Industrial Microbiology*. Sinauer Associates, Inc., USA, 357p.
  11. Kurtzman. 2000. *Yarrowia van der Walt & von Arx*. In: *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Kurtzman CP and Fell JW (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 420-421.
  12. Rane KD, Sims KA. 1993. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme Microb Technol*, 15: 646-651.
  13. Kamzolova SV, Finogenova TV, Morgunov I. 2006. Biosynthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* grown on vegetable oils. 2<sup>nd</sup> FEMS Congress of European Microbiologists, p. 98, 4-8 July 2006, Madrid, Spain.
  14. Wojtatowicz M, Marchin GL, Erickson LE. 1993. Attempts to improve strain A-101 of *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from *n*-paraffins. *Process Biochem*, 28: 453-460.
  15. Lu MY, Maddox IS, Brooks JD. 1998. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *A. niger*. *Process Biochem*, 33: 117-123.
  16. Vandenberghe LPS, Soccol CR, Pandey A, Lebeault J-M. 2000. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 74: 175-178.
  17. Couto SR, Sanromán MA. 2006. Application of solid state fermentation to food industry – A review. *J Food Eng*, 76: 291-302.
  18. Cartledge TG. 1987. Substrate utilization, non-carbohydrate substrates. In: *Yeast Biotechnology*. Berry DR, Russell I, Stewart GG (eds), Allen & Unwin Inc., United Kingdom, pp. 331-334.
  19. Ratledge C. 2001. Biochemistry and physiology of growth and metabolism. In: *Basic Biotechnology*. Ratledge C and Kristiansen B (eds), Cambridge University Press, UK, pp. 17-44.
  20. Gözükar EM. 2001. *Biyokimya (Cilt-2)*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, 1258s.
  21. Legiša M, Matthey M. 1986. Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol*, 8: 258-259.
  22. Anastasiadis S, Rehm HJ. 2005. Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. *Electron J Biotechnol*, 8(2): 26-42.
  23. Milsom PE, Meers JL. 1985. Citric acid. In *Comprehensive Biotechnology, The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine* (Vol. 3), CW Robinson and JA Howell (eds.), pp. 665-680, Pergamon Press, U.K.
  24. Papagianni M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transfer and modeling. *Biotechnol Adv*, 25: 244-263.
  25. Wojtatowicz M, Rymowicz W, Kautola H. 1991. Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from glucose hydrol. *Appl Biochem Biotechnol*, 31: 165-174.
  26. Hamissa FA, Abou-Zeid AA. 1981. Fermentative production of citric acid by yeasts. *Agr Waste*, 3: 21-23.
  27. Karasu Yalçın S. 2007. *Yarrowia lipolytica* ile sitrik asit üretimine etki eden çeşitli parametrelerin incelenmesi ve bazı endojen maya suşlarının sitrik asit üretim kapasitelerinin değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora tezi, Ankara, Türkiye, 240s.
  28. Arzumano TE, Shishkanova NV, Finogenova TV. 2000. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 525-529.
  29. Finogenova TV, Kamzolova SV, Dedyukhina EG, Shishkanova NV, Il'chenko AP, Morgunov IG, Chernyavskaya OG, Sokolov AP. 2002. Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 493-500.
  30. Morgunov IG, Kamzolova SV, Shishkanova NZ, Finogenova TV. 2004. Overproduction of organic acids from various substrates by *Yarrowia lipolytica* yeast. 19<sup>th</sup> International ICFMH Symposium FoodMicro 2004, 12-16 September 2004, Portoroz, Slovenia, 210 p.
  31. Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM. 2004. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res*, 5: 527-543.
  32. Papanikolaou S, Galiotou- Panayotou M, Chevalot I, Komaitis M, Marc I, Aggelis G. 2006. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol*, 52: 134-142.

33. Kamzolova SV, Morgunov IG, Perevoznikova OA, Shishkanova NV, Finogenova TV. 2004. New renewable substrate for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. The 19<sup>th</sup> International ICFMH Symposium FoodMicro 2004, 12-16 September 2004, Portoroz, Slovenia p. 210.
34. Venter T, Kock JLF, Botes PJ, Smit MS, Hugo A, Joseph M. 2004. Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil. *Syst Appl Microbiol*, 27: 135-138.
35. Sarangbin S, Watanapokasin Y. 1999. Yam bean starch : a novel substrate for citric acid production by the protease-negative mutant strain of *Aspergillus niger*. *Carbohydr Polymer*, 38: 219-224.
36. Adham NZ. 2002. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. *Bioresour Technol*, 84: 97-100.
37. Hang YD, Woodams EE. 1986. Utilization of grape pomace for citric acid production by solid state fermentation. *Am J Enol Vitic*, 37(2): 141-142.
38. Hang YD, Luh BS, Woodams EE. 1987. Microbial production of citric acid by solid state fermentation of kiwifruit peel. *J Food Sci*, 52(1): 226-227.
39. Lu M, Brooks JD, Maddox IS. 1997. Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol*, 21: 392-397.
40. Roukas T, Kotzekidou P. 1997. Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. *Enzyme Microb Technol*, 21: 273-276.
41. Roukas T, Liakopolouou-Kyriakides M. 2002. Optimization study for the production of citric and gluconic acid from fig water extract by *Aspergillus niger* in surface fermentation. *Food Biotechnol*, 16(1): 17-28.
42. Shojaosadati SA, Babaeipour V. 2002. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. *Process Biochem*, 37: 909-914.
43. Kumar D, Jain VK, Shanker G, Srivastava A. 2003. Utilization of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochem*, 38: 1725-1729.
44. Hang YD, Woodams EE. 2001. Enzymatic enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* from corn cobs. *Lebens-Wiss Technol*, 34: 484-486.
45. Kumar D, Jain VK, Shanker G, Srivastava A. 2003. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochem*, 38: 1731-1738.
46. Alben E, Erkmen O. 2004. Production of citric acid from a new substrate, undersized semolina, by *Aspergillus niger*. *Food Technol Biotechnol*, 42(1): 19-22.
47. Kurbanoglu EB. 2003. Enhancement of citric acid production with ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 92(1): 97-101.
48. Kurbanoglu EB, Kurbanoglu NI. 2003. Production of citric acid from ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Process Biochem*, 38: 1421-1424.
49. Imandi SB, Bandaru VVR, Somalanka SR, Garapari HR. 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme Microb Technol*, 40: 1367-1372.
50. Abou-Zeid AA, Baghlaif AO, Khan JA, Makhashin SS. 1983. Utilization of date seeds and cheese whey in production of citric acid by *Candida lipolytica*. *Agr Waste*, 8: 131-142.
51. El-Samragy YA, Khorshid MA, Foda MI, Shehata AE. 1996. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. *Int J Food Microbiol*, 29: 411-416.
52. El-Holi MA, Al-Delaimy KS. 2003. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. *Afr J Biotechnol*, 2(10): 356-359.
53. Kamzolova SV, Morgunov IG, Aurich A, Perevoznikova OA, Shishkanova NV, Stottmeister U, Finogenova TV. 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technol Biotechnol*, 43(2): 113-122.
54. Rymowicz W, Rywinska A, Zarowska B, Juszczak P. 2006. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem Pap*, 60(5): 391-394.