

ASPERGILLUS NİGER KULLANILARAK SİTRİK ASİT ÜRETİMİ
SIRASINDA BAZI POLİOLLERİN VERİM ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Ayşegül PEKSEL, Ali Kortay TOKATMAN, İnci ARISAN ATAÇ

Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Davutpaşa-İSTANBUL

Geliş Tarihi: 28.06.2002

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME POLYOLS ON YIELD DURING CITRIC ACID
FERMENTATION BY ASPERGILLUS NIGER

ABSTRACT

Citric acid is one of the most important chemicals produced by industrial fermentation using a filamentous fungus. *Aspergillus niger* is an imperfect fungus and capable of producing very high levels of citric acid when cultivated optimum conditions. Citric acid is accumulated only under conditions of high glycolytic metabolism and can be induced by the addition of an excess amount of sucrose or other carbohydrates which induce a high rate of glycolytic catabolism. In this study, effect of mannitol and xylitol which added into fermentation media, was investigated during citric acid production by *A. niger* ATCC 11414. The effect of these polyols on citric acid production was demonstrated using replacement, submerged and surface culture. Citric acid accumulation exhibited an increase on media supplemented with mannitol. High amount of citric acid was obtained from surface culture.

ÖZET

Sitrik asit, küflerin kullandığı endüstriyel fermantasyon ile üretilen en önemli kimyasallardan biridir. İmparfekt bir küf olan *Aspergillus niger*, uygun koşullarda üretildiğinde yüksek miktarlarda sitrik asit elde edilir. Sitrik asit sadece yüksek glikolitik koşullarda birikir ve glikolitik katabolizmayı indükleyen aşırı miktarda sakkaroz ya da diğer karbohidratların katılımı ile indüklenir. Bu çalışmada *A. niger* ATCC 11414 suşu kullanılarak sitrik asit üretimi sırasında fermantasyon ortamına ilave edilen poliollerden mannitol ve ksilitolün etkileri araştırıldı. Bu poliollerin sitrik asit üretimi üzerine olan etkileri, yerdeğiştirme, derin kültür ve yüzey kültür yöntemleri kullanılarak incelendi. Mannitol kullanılan ortamlarda sitrik asit üretiminin arttığı saptandı. En fazla artış yüzey kültür yönteminden elde edildi.

1. GİRİŞ

Sitrik asit (2-hidroksi-1,2,3-propan trikarboksilik asit), ekşi tadı, düşük toksisitesi, emiliminin kolay olması ve suda çözünürlüğünden dolayı gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde, asitliği düzenleyici, aroma arttırıcı, koruyucu, şelat oluşturucu, oksidasyonu önleyici ve emülgatör olarak geniş kullanım alanına sahiptir [1].

Günümüzde kullanılan sitrik asitin yaklaşık %70'i küflerin özellikle *Aspergillus niger*' in çeşitli mutantlarının kullandığı endüstriyel fermantasyon ile üretilir [2]. Üretim, uygun *A. niger* suşu tarafından sakkaroz veya glukozun uygun dönüşümü ile gerçekleşir. Sitrik asit birikimi hem kullanılan suşa hem de bazı kültür parametrelerine bağlıdır. Yüksek verimde sitrik asit üretilmesi, şeker konsantrasyonu, hidrojen iyonları ve çözünmüş oksijen miktarı gibi faktörlerin aşırı

bulunduğu, ancak iz element, azot ve fosfat miktarının minimum düzeyde olduğu koşullarda gerçekleşir [3, 4, 5, 6].

A. niger tarafından sitrik asit birikiminde rol oynayan bazı enzimler, çeşitli inhibitörler, aktivatörler, protein fosforilasyonu ve defosforilasyonu ile düzenlenerek bir kontrol mekanizması oluştururlar. Bu mekanizmada yer alan anahtar enzimler fosfofruktokinaz, piruvat kinaz, NADP⁺ bağımlı izositrat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenazdır [7,8].

Gliserolün, izositrat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek sitrik asit birikimini azalttığı Legisa ve Matthey tarafından öne sürüldü [9]. Arısan-Ataç ve Kubicek' in yaptığı çalışmalarda, bu enzim üzerinde gliserolün etkisinin olmadığı, inhibisyonun sitrat tarafından sağlandığı ve gliserolün sitrik asit üretiminde uyarıcı etkisinin olduğu kanıtlandı [10]. Ayrıca, bazı alkoller veya polisakkaritlerle desteklenen fermantasyon ortamlarında sitrik asit veriminin arttığı görüldü [11, 12, 13]. Bu çalışmada, *A. niger* ATCC 11414 kullanılarak sitrik asit üretiminde ortama ilave edilen mannitol ve ksilitolün verim üzerine olan etkileri, yüzey kültür, derin kültür ve yer değiştirme yöntemleri kullanılarak incelendi.

2. DENEYSEL ÇALIŞMA

2.1. Mikroorganizma

Bu çalışmada yüksek verimde sitrik asit üreten *Aspergillus niger* ATCC 11414 suşu kullanıldı. Suş, Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü'nden temin edildi. Saf kültür, %3 malt ekstraktı ve %2 agar içeren besiyeri üzerinde üretildi. İnkübasyon süresi 30°C sıcaklıkta 3-4 gündür. Bu şekilde hazırlanan suş +4°C sıcaklıkta 4 ay muhafaza edilir.

2.2. Aşılama

Malt ekstraktı-agar besiyerinde üretilen sporların üzerine %0.9 NaCl (w/v) çözeltisi ilave edildi. Oluşan sporlar öze yardımıyla kazanarak çözeltiliye alındı. Sporların sayma işlemi Thoma Lamı sayma kamarası kullanılarak yapıldı. Aşılama için 1×10^8 spor/ml olacak şekilde hazırlanan spor çözeltisi kullanıldı.

2.3. Üretim Ortamı

Sitrik asit üretimi için Shu ve Johnson standart fermantasyon ortamı [14] kullanıldı. Bu ortamın içeriği (g/l); dekatonize sakkaroz, 100; NH₄NO₃, 2.5; KH₂PO₄, 1.0; MgSO₄.7H₂O, 0.25; Fe³⁺ [(NH₄)₂SO₄.Fe₂(SO₄)₂.24H₂O olarak], 0.1×10^{-3} ; Zn²⁺ (ZnSO₄.7H₂O olarak), 0.1×10^{-3} ; Cu²⁺ (CuSO₄.5H₂O olarak), 0.06×10^{-3} 'dir. pH, 1 N HCl ile 3 olarak ayarlandı. Sakkaroz çözeltisi, eser elementleri uzaklaştırmak amacıyla Dowex W-50AG 1-X8 iyon değiştirici (Biorad) üzerinde dekatonize edildikten sonra kültür ortamında kullanıldı [15]. Kültür ortamları poliöl etkisini incelemek amacıyla mannitol veya ksilitol ile desteklendi. Hazırlanan ortamlar 121°C sıcaklıkta 20 dakika steril edildi. Daha sonra %1 (v/v) spor çözeltisi ile aşılama yapıldı.

Yüzey Kültür Yöntemi

150 ml standart fermantasyon ortamı 1 litre hacimli geniş ağızlı erlenlere konuldu. Erlenler üç gruba ayrıldı: %10 (w/v) sakkaroz içeren Grup 1 (kontrol grubu); %10 (w/v) sakkaroz içeren ve %1 (w/v) mannitol ile desteklenen Grup 2; %10 (w/v) sakkaroz içeren ve %1 (w/v) ksilitol ile desteklenen Grup 3. Başlangıç pH=3 olarak 1 N HCl ile ayarlandı. 25 °C sabit oda sıcaklığında gerçekleştirilen inkübasyon sırasında 24 saat aralıklarla 264 saat süresince fermantasyon sıvısından örnekler alındı. Alınan örneklerde sitrik asit tayini yapıldı.

Derin Kültür Yöntemi

50 ml standart fermantasyon ortamı 250 ml hacimli geniş ağızlı erlenlere konuldu. Erlenler yukarıda anlatıldığı gibi üç gruba ayrıldı. Başlangıç pH=3 olarak 1 N HCl ile ayarlandı. 30°C

Aspergillus Niger Kullanılarak Sitrik Asit...

sıcaklıkta ve 250 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen inkübasyon sırasında 24 saat aralıklarla 120 saat süresince fermantasyon sıvısından örnekler alındı. Alınan örneklerde sitrik asit tayini yapıldı.

Yer Değişirme Yöntemi

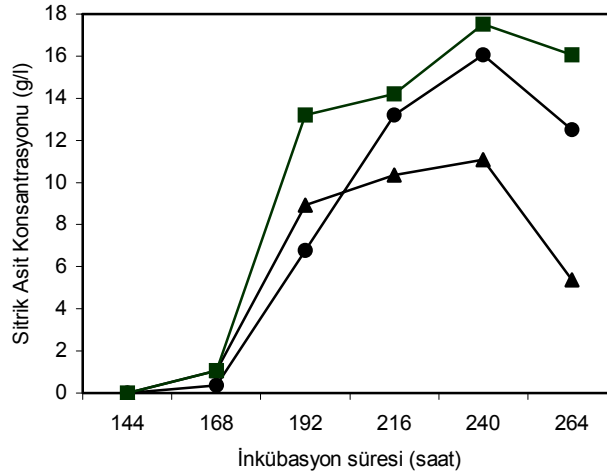
%1 (w/v) sakkaroz içeren ve sitrik asit üretimini indüklemeyen 50 ml üretim ortamı 250 ml hacimli geniş ağızlı erlenlere konularak sadece misel oluşumu amaçlandı. Başlangıç pH=3 olarak 1 N HCl ile ayarlandı. Inkübasyon süresi 30°C sıcaklıkta ve 250 rpm çalkalama hızında 48 saattir. Bu sürenin sonunda oluşan misel, sitrik asit üretimi için, 50 ml standart fermantasyon ortamı içeren ve pH=2 olan 250 ml hacimli geniş ağızlı erlenlere aktarıldı. Inkübasyon, 30°C sıcaklıkta ve 250 rpm çalkalama hızında 120 saat süresince gerçekleştirildi. 24 saat aralıklarla alınan örneklerde sitrik asit miktarı tayin edildi.

2.4. Analitik Yöntemler

Kültür sıvısından 24 saat aralıklarla alınan örneklerdeki sitrik asit miktarı, enzimatik analiz kiti (Boehringer-Mannheim) kullanılarak spektroskopik olarak tayin edildi [16].

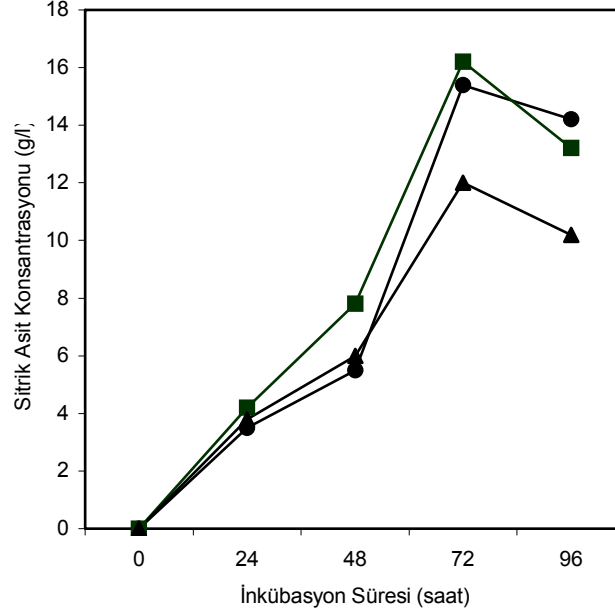
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, mannitol ve ksilitolün sitrik asit üretimine olan etkileri, yüzey kültür, derin kültür ve yerdeğişirme yöntemleri uygulanarak araştırılmıştır. En yüksek miktarda sitrik asit, mannitol ile desteklenen kültür ortamlarından elde edilmiştir. Bu miktar, yüzey kültür (Şekil 1.), yerdeğişirme (Şekil 2.) ve derin kültür (Şekil 3.) yöntemleri için sırasıyla 17.3, 16.3 ve 13.5 g/l olarak bulunmuştur. Sadece sakkaroz kullanılan kontrol gruplarında ise sırasıyla her üç yöntem için elde edilen sitrik asit miktarları 16.0, 15.3 ve 10.5 g/l' dir. Kültür ortamlarının ksilitol ile desteklenmesi sitrik asit üretimini artırmamıştır. Ksilitol destekli ortamlardan elde edilen sitrik asit miktarları her üç yöntem için sırasıyla 11.0, 11.9 ve 10.5 g/l olarak hesaplanmıştır. Bundan dolayı sadece mannitol sitrik asit üretimini artırıcı olarak bulunmuştur.



Şekil 1. Yüzey kültür ortamında *A. niger*'in gelişimi sırasında sitrik asit konsantrasyonundaki değişimler. ●= %10 sakkaroz, ■= %10 sakkaroz+%1 mannitol ve ▲= %10 sakkaroz+%1 ksilitol

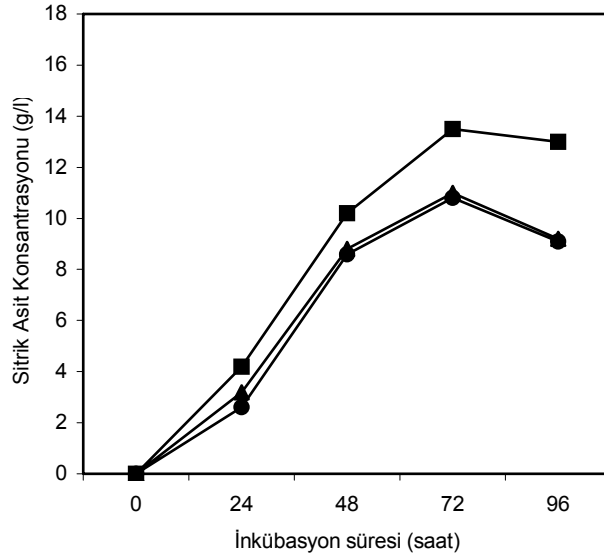
Yüzey kültür yönteminde sitrik asit konsantrasyonu kontrol grubunda 16.0 g/l, mannitol ile destekli grupta ise 17.3 g/l olarak hesaplanmıştır. Değerler arasındaki fark 1.3 g/l'dir. Derin kültür yönteminde ise bulunan sonuçlar aynı yaklaşımla değerlendirildiğinde fark 3.5 g/l olarak bulunmuştur. Buna göre mannitol'ün, -kontrol grubu ile karşılaştırıldığında- derin kültür yönteminde sitrik asit konsantrasyonunu artırıcı etkisi çok daha fazladır.



Şekil 2. Yerdeğiştirme kültür ortamında *A. niger*'in gelişimi sırasında sitrik asit konsantrasyonundaki değişimler. ●= %10 sakkaroz, ■= %10 sakkaroz+%1 mannitol ve ▲= %10 sakkaroz+%1 ksilitol

Sonuç olarak mannitol, sitrik asit biyosentezinde indükleyici etkiye sahiptir. Bu etki, mannitol'ün hücre membranında bulunan taşıyıcı sistemleri indüklemesi [17] ve bunun sonucunda hücre membranının geçirgenliğinin artması [18, 19] ve hücrelerden sitrik asitin daha iyi salgılanması ile sonuçlanır. Sitrik asit fermantasyonu ortamda bulunan bileşenlere karşı son derece duyarlıdır [20]. Bu çalışmada sitrik asit üretiminde %1 konsantrasyonda mannitol desteği ile en yüksek asit miktarı elde edilmiştir. Buna göre, sitrik asit üretimi için uyarıcı olan ve mannitol ile indüklenen enzim aktiviteleri olduğu söylenebilir.

Aspergillus Niger Kullanılarak Sitrik Asit...



Şekil 3. Derin kültür ortamında *A. niger*'in gelişimi sırasında sitrik asit konsantrasyonundaki değişimler. ●= %10 sakkaroz, ■= %10 sakkaroz+%1 mannitol ve ▲= %10 sakkaroz+%1 ksilitol

TEŞEKKÜR

Yazarlar, bu çalışmayı 95-B-01-02-02 numaralı proje ile destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

- [1] Kristiansen B., Matthey M., Linden J., "Citric Acid Biotechnology", Taylor & Francis, London, 1999, 1-9.
- [2] Roehr M., Kubicek C.P., Kominek J., "Citric Acid" In: Biotechnology, Vol.6, Verlag Chemie, Weinheim, 1996, 308-345.
- [3] Kubicek-Pranz E.M., Mozelt M., Roehr M., et. al., "Changes in the concentration of fructose-2,6-biphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration" Biochim. Biophys. Acta, 1033, 250-255, 1990.
- [4] Arısan-Ataç I., Wolschek M., Kubicek C.P., "Trehalose-6-phosphate synthase A affects citrate accumulation by *Aspergillus niger* under conditions of high glycolytic flux" FEMS Microbiol. Lett., 140, 77-83, 1996.
- [5] Peksel A., "Biochemical Aspects of the Stimulation of Citric Acid Accumulation by the Sugar Concentration in *Aspergillus niger*", PhD thesis, Technical University of Vienna, 1999.
- [6] Wolschek M., Kubicek C.P., "Biochemistry of Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*" In: Citric Acid Biotechnology, Taylor & Francis, London, 1999, 11-32.
- [7] Habison A., Kubicek C.P., Roehr M., "Partial purification and regulatory properties of phosphofruktokinase from *Aspergillus niger*" Biochem. J., 209, 669-676, 1983.

- [8] Meixner-Monori B., Kubicek C.P., Roehr M., "Pyruvate kinase from *Aspergillus niger*: a regulatory enzyme in glycolysis" Can. J. Microbiol., 30, 16-22, 1984.
- [9] Legisa M., Matthey M., "Glycerol synthesis by *Aspergillus niger* under citric acid accumulating conditions" Enzym. Microbiol. Technol., 8, 607-609, 1986.
- [10] Arisan-Ataç I., Kubicek C.P., "Glycerol is not an inhibitor mitochondrial citrate oxidation in *Aspergillus niger*" Microbiol. UK, 142, 2937-2942, 1996.
- [11] Ul-Haq I., Sikander A., Qadeer M.A., Iqbal J., "Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy-D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47" Bioresource Technology, 86, 227-233, 2003.
- [12] Ateş S., Dingil N., Bayraktar E., Mehmetoğlu Ü., "Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil" Process Biochemistry, 38, 433-436, 2002.
- [13] Zhuang X.L., Zhang H.X., Yang J.Z., Qi H.Y., "Preparation of levoglucosan by pyrolysis of cellulose and its citric acid fermentation" Bioresource Technology, 79, 63-66, 2001
- [14] Shu P., Johnson M., "Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*" Ind. Engineer. Chem., 40, 1202-1205, 1948.
- [15] Kubicek C.P., Roehr M., "Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*" Eur. J. Appl. Microbiol., 4, 167-175, 1977.
- [16] Dagley S., "Methoden der enzymatischen Analyse" Vol.3, Verlag Chemie, Weinheim, 1607-1611, 1974.
- [17] Torres N., Riol-Cimas J.M., Wolschek M., Kubicek C.P., "Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations" Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 790-794, 1996.
- [18] Roehr M., Kubicek C.P., Zehentgruber O., Orthofer R., "Accumulation and partial re-consumption of polyols during citric acid fermentation by *Aspergillus niger*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 235-239, 1987.
- [19] Witteveen C.F., Visser J., "Polyol pools in *Aspergillus niger*", FEMS Microbiol. Lett., 134, 57-62, 1995.
- [20] Karaffa L., Sandor E., Fekete E., Szentirmai A., "The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*", Acta Microbiol. Immunol. Hung., 48, 429-440, 2001.