

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

106304

**SİTRİK ASİT ÜRETİMİNDE VERİM ÜZERİNE
BAZI POLİOLLERİN ETKİSİ**

Kimyager Ali Kortay TOKATMAN

**F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

1. Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Volkan Sözer

2. Tez Danışmanı : Doç. Dr. İnci Arısan - Ataç

Prof. Dr. Hüseyin Sönmez

İSTANBUL, 2001

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

106304



***Rahmetli babam
A. Koray TOKATMAN' a
ithaf ederim.***

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÇİZELGE LİSTESİ	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. SİTRİK ASİT	2
2.1 Kullanım yerleri	2
2.2 Üretimi	3
2.2.1 Kimyasal sentez	3
2.2.2 Limon ve narenciye atıkları	4
2.2.3 Fermantasyon	4
3. ASPERGİLLUS NİGER' DE SİTRİK ASİT BİRİKİMİNİN BİYOKİMYASI	5
3.1 A.niger hakkında genel bilgi	5
3.2 A.niger' de glikoz katabolizması ve düzenlenmesi	7
3.2.1 Sitrik asidin biyosentetik yolu	7
3.3 Glikoz metabolizması ve düzenlenmesi	11
3.4 Sitrik asit biyosentezinin düzenlenmesi	11
3.5 Sitrat birikiminde sitrat yıkılmasının rolü	16
3.6 Solunum aktivitesi ve NAD rejenerasyonunun rolü	18
3.7 Sitrik asidin A.niger' den salınması	19
4. MATERİYAL VE METOTLAR	22
4.1 Kullanılan aletler	22
4.2 Uygulanan metotlar	22
4.2.1 Organizma	22
4.2.2 Katı besi yeri hazırlanması, ekimi ve saklama koşulları	22
4.2.3 Spor çözeltisi , ekim	22
4.2.4 Dekatyonize şeker çözeltisinin hazırlanması	23
4.2.5 Fermantasyon ortamı	23
4.2.6 Fermantasyon yöntemleri	25
4.2.6.1 Yüzey kültür yöntemi	25
4.2.6.2 Derin kültür yöntemi	27
4.2.6.2.1 Yer değiştirme (Replacement) Yöntemi	27
4.2.7 Sitrik asidin tayini	28
4.2.7.1 Titrasyon yöntemi	28
4.2.7.2 Enzimatik yöntem.....	28
4.2.8 Sterilizasyon	31
5. SONUÇLAR	32

5.1	Yüzey kültür yöntemiyle alınan sonuçlar	32
5.2	Derin kültür yöntemiyle alınan sonuçlar	35
5.3	Yer değiştirme yöntemiyle alınan sonuçlar	40
TARTIŞMA		42
KAYNAKLAR		43
ÖZGEÇMİŞ		47



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Sitrik asit sentezi 3
Şekil 3.1	A.niger' de miselyum oluşumu 6
Şekil 3.2	A.niger' in üreme çevrimi 6
Şekil 3.3	Sitrik asit oluşumunun metabolik yolları 8
Şekil 3.4	A.niger' de sakkarozdan sitrik asit biyosentezinin metabolik ve düzenleyici ağı 10
Şekil 3.5	A.niger' de Mn ve Fe' in (a) bulunmadığı, (b) yüksek konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda miselyum oluşumunun morfolojisi 14
Şekil 4.1	Yüzey kültür yöntemi ve derin kültür yöntemi ile sitrik asit üretiminin akış şeması 26
Şekil 5.1	%5 sakkaroz içeren yüzey fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 32
Şekil 5.2	%5 sakkaroz' a ilaveten %1 mannitol içeren yüzey fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 33
Şekil 5.3	%5 sakkaroz' a ilaveten %4 mannitol içeren yüzey fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 34
Şekil 5.4	%10 sakkaroz içeren derin kültür fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 35
Şekil 5.5	%10 sakkaroz' a ilaveten %1 mannitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 36
Şekil 5.6	%10 sakkaroz' a ilaveten %1 xylitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 37
Şekil 5.7	%10 sakkaroz' a ilaveten %1 sorbitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 38
Şekil 5.8	%10 sakkaroz' a ilaveten %1 sorbitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 39
Şekil 5.9	%5 sakkaroz içeren yer değiştirme yöntemiyle yapılan derin kültür fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 40
Şekil 5.10	%10 sakkaroz içeren yer değiştirme yöntemiyle yapılan derin kültür fermantasyon ortamında A.niger' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi 41

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Sitrik asitin uygulama alanları	3
Çizelge 4.1 Seyreltme çizelgesi	29
Çizelge 4.2 Enzimatik yöntemle ölçüm çizelgesi	30



TEŐEKKÜR

Çalıőmamın hazırlanmasında başından sonuna kadar, sonsuz bilgi, deneyim ve en önemlisi sabırları ile yardımcı olan Saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. İnci ARISAN-ATAÇ' a ve Yrd. Doç. Dr. Volkan SÖZER' e, çalıőmamın son bölümünde sıkıőtıđım her anda yardım, destek ve yol göstericiliğini esirgemeyen Sayın Dr. Ayőegöl Peksel' e, en önemlisi hayatım boyunca bana destek ve sevgilerini veren anneme, ablama ve eniőtme, sonsuz saygı, sevgi ve teőekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.



ÖZET

Aspergillus niger uygun ortamda yüksek verimde sitrik asit üretebilen bir küf mantarıdır.

Bu çalışmada, A.niger tarafından sitrik asit üretme yöntemlerinden; Yüzey kültür, derin kültür ve yer değiştirme yöntemleri karşılaştırıldı. Derin kültür yönteminin en uygun olan yöntem olduğuna karar verildi.

Bazı poliollerin sitrik asit üretiminin verimi üzerine etkisi incelendi. Sorbitol ve mannitol' ün sitrik asit verimi üzerinde olumlu etkisi gözlemlendi. Xylitol' de ise benzer bir etki saptanmadı.



ABSTRACT

Aspergillus niger is a filamentous fungus which accumulates high amount citric acid when cultivated optimum conditions.

In this study, three methods which are surface, submerged and replacement culture have been compared. It is concluded that submerged method is the optimum citric acid production method.

The effect of polyols during citric acid accumulation by A.niger were investigated. According to the results, sorbitol and mannitol increased the efficiency of citric acid accumulation. No effect was found by using Xylitol.



1. GİRİŞ

Aspergillus niger gibi filamentöz mantarlar, yüksek miktarda şeker içeren besi yerlerinde uygun koşullarda kulture edildiklerinde ortama bazı organik asitleri salgılamalarıyla bilinirler. Bunlardan sitrik asit ve itakonik asit ticari yönden önem taşır.

Çok aktif bir glikoliz sonucu oluşan substratların sitrat çevrimini tamamlamaları sonucu organik asitler ve özellikle de sitrik asit oluştuğu bilinmektedir.

Küf mantarlarının kullanıldığı organik asit fermantasyonlarından en iyi bilineni *A.niger*' in çeşitli mutantları ile yapılan sitrik asit fermantasyonudur. Bu fermantasyon son 50 senede pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir.

Sitrik asit (2-hidroksi propan-1,2,3-trikarboksilik asit) ilk olarak limondan izole edildiğinden önceleri sadece limona özgü bir madde olarak düşünülmüştür. Daha sonraları ise sitrat çevrimin bir parçası olduğu ve dolayısıyla da her canlıda bulunduğu tespit edilmiştir. Toksik olmaması nedeniyle endüstride geniş kullanım alanına sahiptir.

Sitrik asidin dünya yıllık üretimi 0,5 milyon ton kadardır. Fermantatif sitrik asit üretiminde daha çok *A.niger* türü küf mantarları kullanılmakla birlikte nadiren *Yarrowia lipolytica* adlı maya da kullanılmaktadır.

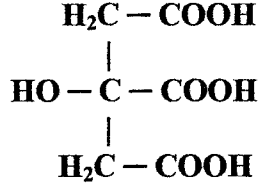
Yüzey kültür yöntemi eski bir teknik olmasına rağmen halen bir çok fabrikada fermantasyonla sitrik asit üretiminin en önemli uygulamalarından biridir. Bu nedenle çalışmalarımızda önce bu yöntemi kullanmayı uygun bulduk.

A.niger' den sitrik asit eldesinde oksijenin katkısı göz önüne alınarak zamanımızda daha çok derin kültür yöntemine geçilmiştir. Biz de verim arttırmada poliollerin etkisini araştırmayı amaçladığımız için çalışmalarımızın ikinci aşamasında derin kültür yöntemini laboratuvar koşullarına uygulamayı öngördük.

Daha önce yapılan çalışmalarda sitrik asit üretiminde gliserol' ün verim arttırmadaki etkisi incelenmiştir. Buna dayanarak diğer poliollerin de verim arttırmada etkin olabileceği düşünülerek mannitol, xylitol ve sorbitol' ün etkisi araştırılmıştır.

2. SİTRİK ASİT

Kimyasal olarak sitrik asit: 2-hidroksi-1,2,3-propan tri karboksilik asit' tir.



2.1 Kullanım Yerleri

Sitrik asit, pasta, şekerleme vb. yiyeceklerde, içeceklerde, eczacılıkta, kozmetik sanayii ve diğer endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Buralarda kullanılmasının nedeni; asitliği, tat vermesi ve tuz oluşturması gibi üç önemli özelliğinden kaynaklanır.

Sitrik asit Cu, Fe, Mn, Mg ve Ca metalleri ile çeşitli metalik tuzlar oluşturmaktadır. Bu tuzlar endüstriyel proseslerde çelat oluşturucu etkilerinden dolayı ve kanda antikoagülan (pıhtılaşmayı önleyen) madde olarak kullanılır. Ayrıca katı ve sıvı yağlarda, eser miktarda bulunan demir gibi metallerle çelat yaparak metal katalizli oksidasyonu azalttığı için antioksidan olarak da kullanılır. Sitrik asit hafif, hoş, ekşimsi bir tat bıraktığı için gıda sanayiinde ekşi tat verici madde olarak kullanılır.

Sülfür dioksidi akıcı gazlardan uzaklaştırmak için yapılan proseslerde ovalayıcı olarak kullanılmaktadır. Kompleks yapıcı iyon olarak kullanılmakta ve sonra H₂S ile elementel sülfürü verecek şekilde reaksiyona girmekte ve sitrati yeniden oluşturmaktadır. Bu proses çevresel basınç arttırıldığında daha verimli hale gelmektedir.

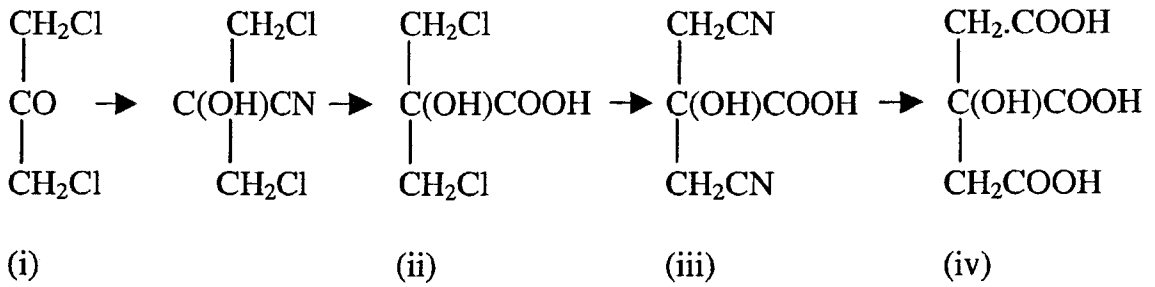
Sitrik asidin bir çok alkol ile yaptığı esterleri; trietil, bütil ve asetiltribütil esterler olarak bilinir ve plastik filmlerde plastize edici olarak kullanılır. Monositril sitrat, sitrik asit yerine katı ve sıvı yağlarda antioksidan olarak kullanılır. Çizelge 2.1 de sitrik asidin uygulama alanları özet olarak verilmiştir.

Çizelge 2.1 Sitrik asitin uygulama alanları

Endüstri	Özellik	Kullanımı	Market payı
Yiyecek			%75 civarı
İçecek	Asitliği düzenleyici	Ekşi tat verici	
Marmelat, reçel vb.	Ekşi tat verici	Aside edici	
Katı ve sıvı yağlar	Antioksidan	Metal kompleks yapıcı	
Donmuş yiyecekler	Antioksidan		
İlaç			%10 civarı
Köpürücü	Asit	Ekşi tat verici	
Vitaminler	Anti oksidant		
Anti koagulanlar	Bağlayıcı, çöktürücü	Tampon	
Demir preparatları	Tuz formasyonu		
Kozmetik	Tampon		
Endüstriyel			%15 civarı
Temizleyici(Metaller)	Bağlayıcı, çöktürücü		
Deterjan	Tampon	Bağlayıcı, çöktürücü	
Fotoğrafik	Tampon		
Birinci bağlayıcı	Bağlayıcı, çöktürücü		
Polimerizasyonlar	Bağlayıcı, çöktürücü		

2.2 Üretimi

2.2.1 Kimyasal Sentez



Şekil 2.1 Sitrik asit Sentezi

Sitrik asit, ilk olarak Grimoux ve Adams (1880) tarafından gliserolden sentezlenmiştir. Sonra simetrik dikloroaseton (i) hidrojen siyanür ve hidroklorik asit etkisi ile dikloroasetonik asiti (ii) verir, ve potasyum siyanür ile disiyano-asetonik aside dönüştürülür (iii), hidroliz sonucunda da sitrik asit (iv) oluşmaktadır. (Şekil 2.1)

Başlangıç maddesi değişik olan birçok çalışma yapılmıştır. Bütün kimyasal metotlar ekonomik olarak hiç uygun değildir ve diğer metotlarla yarışmamaktadır, ürün başlangıç maddesinden çok daha azdır, sentezin basamaklarının sayısına bağlı olarak daha az verim oluşmaktadır ve tehlikeli bileşikler beraberinde taşıdığından bu problemi önceden uyararak gerekmektedir.

2.2.2 Limon ve narenciye atıkları

Sitrik asit ismini Latince *citrus* kelimesinden almıştır, sitron ağacı, limona benzer bir meyve vermektedir. Sitrik asit ilk olarak 1784 yılında İsviçreli bir kimyager olan Carl Scheele tarafından limon suyundan izole edilmiştir.

Belçika' da 1919 yılında ilk olarak *A. niger* endüstriyel proseslerde kullanılmaya kadar limon suyu ticari kaynak olarak kullanılmıştır. Limon suyu yine de önemli bir ürün olarak kalmıştır.

2.2.3 Fermantasyon

Pasteur' ün fermantasyon üzerine olan öncü çalışmalarını takip eden küf mantarları ve bakteriler üzerine yapılan sistematik araştırmaların sonucu olarak mikrobiyolojik olaylarla çok kullanışlı ürünlerin elde edildiği görülmüştür. İlk olarak Wehmer 1983 yılında *Citromyces pfefferianus*' un şeker ve inorganik tuzları içeren ortamda sitrik asit ürettiğini bulmuştur. Bu çalışma direkt olarak ticari amaçlı kullanılsa da sonradan gelen araştırmalarda diğer organizmaların da bu sentezi yapabildiği anlaşılmıştır. Bu organizmaların arasında *A. niger* ve *A. awamori* suşları yüksek sitrik asit üretme verimlerinden dolayı en çok kullanılanlardır.

Currie 1917 yılında *A. niger* suşlarının, düşük pH değerleri, yüksek konsantrasyonda şeker ve mineral tuzlarının bulunduğu ortamlarda kültürlendiğinde sitrik asit ürettiğini bulmuştur. Yaptığı çalışmalarda *A. niger*' in düşük pH' larda (2,5-3,5) sitrik asit ürettiğini ve yükselen pH değerlerinde toksik olabilen okzalik asit ve çok fazla miktarda glukonik asit ürettiğini bulmuştur.

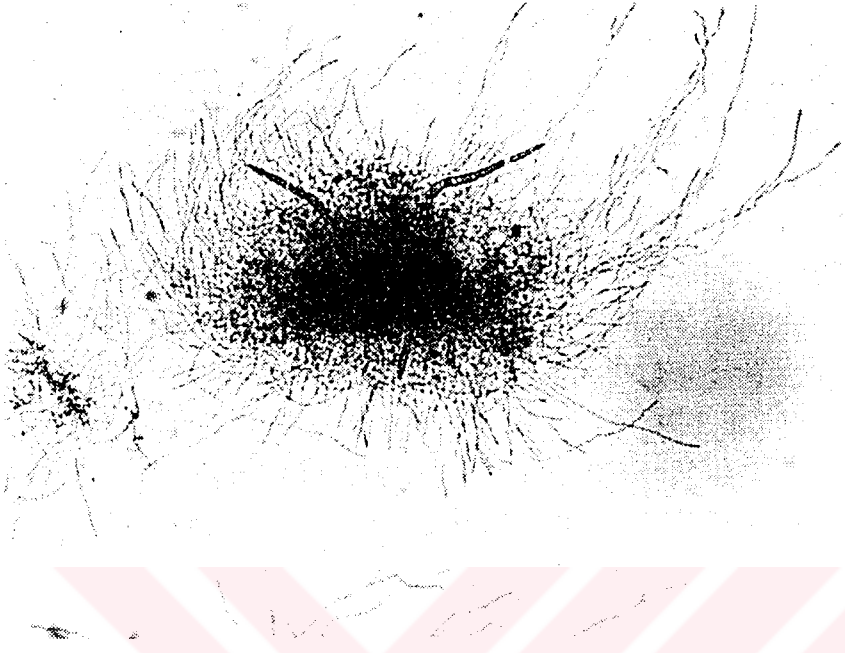
3. ASPERGİLLUS NİGER' DA SİTRİK ASİT BİRİKİMİNİN BİYOKİMYASI

A.niger' da sitrik asit birikiminin biyokimyasal mekanizması, 1930' ların sonlarında ticari uygulamaların başlamasıyla birlikte araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Yüksek verimli sitrik asit birikimini açıklamak için çeşitli teoriler önerilmiş ve yapılan araştırmalardan genel biyokimyasal bilgiler de elde edilmiştir. Bu araştırmalara son elli yıldır yüksek bilgi girdisi olduğu halde, bu fermantasyonda gözlenmiş faktörlerin biyokimyasal temellere etkisini tam olarak açıklayan hiç bir bilgi yoktur. Sitrik asit birikimi ya şeker konsantrasyonu, hidrojen iyonları ve çözünmemiş oksijen miktarı gibi faktörlerin aşırı bulunduğu ya da iz elementleri, nitrojen ve fosfat miktarının uygun miktarlarının bulunduğu koşullarda olmaktadır. Yüksek miktarda asit birikimi için bütün bu faktörler bir arada bulunmalıdır. Bu olay multifaktoriyel etkinin konusudur. Bu yüzden tek bir biyokimyasal olay sitrik asit birikiminden sorumlu değildir.

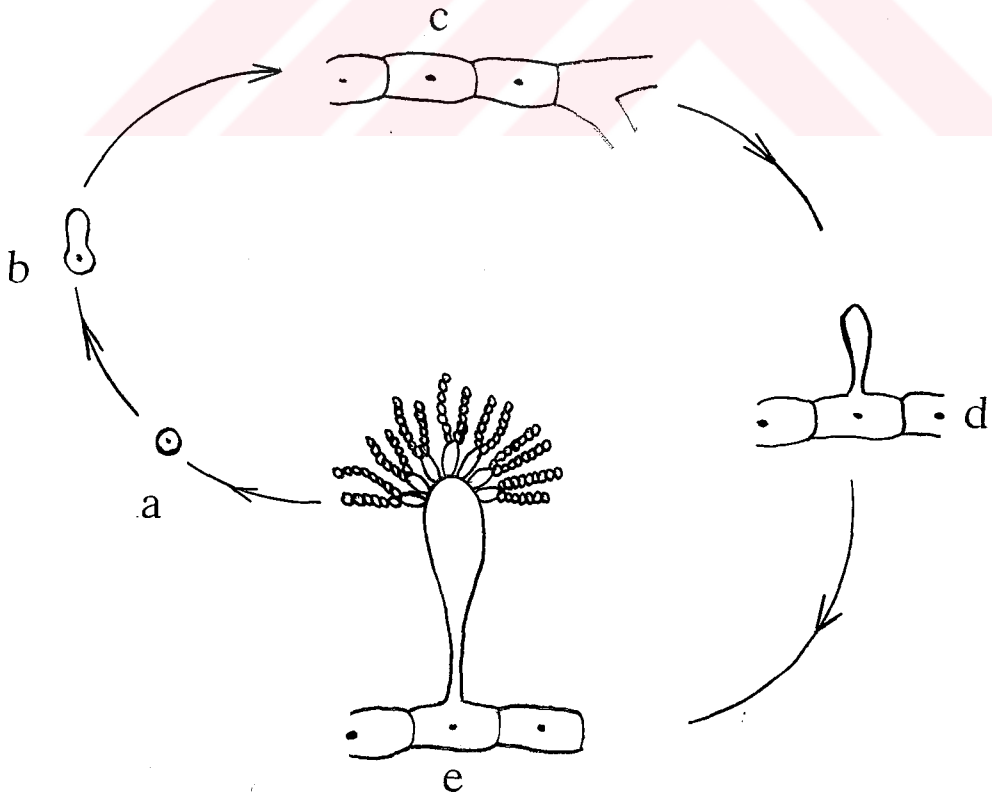
3.1 A.niger Hakkında Genel Bilgi

A.niger endüstride yaygın olarak kullanılan bir küf mantarıdır. Mantarlar, fotosentetik olmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Görünüm bakımından iki tür yapı gösterirler. Küf' ler diye isimlendirilen türü çok hücreli iplikli yapılar oluşturarak gelişirler. Maya diye isimlendirilen mantarlar tek hücreler şeklinde üremek suretiyle bir bakıma bakterilerin görünümüne benzerlik gösterirler.

Küflerin vegetatif biçimlerinin temel elementi hif (hypha) adını alır. Hifler yaklaşık 2-10 µm eninde, bakterilerden daha geniş ve dallanan ipçik biçiminde oluşumlardır. Uygun bir ortamda çoğalan bu mantarların oluşturdukları, gözle görünen sınırlı kitlelerine miselyum (mycelium) adı verilir. Miselyumlar, hiflerin uçlarından uzamaları, dallanmaları ve birleşmelerinden oluşmuş bir örgüdür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *A.niger*' de miselyum oluşumu.



Şekil 3.2 *A.niger*' in üreme çevrimi; a: konidiaspor, b: hif oluşumu, c: hif, d: vesikül oluşumu
e: konidiofor (konidiasporları taşıyan)

A.niger küf mantarlarının fungi imperfecti (deuteromycotina) alt grubundadır. Bu grupta bulunan mantarlar A.niger' de olduğu gibi hiflerin uçlarında konidiosporlar (conidia) oluştururlar.

Konidiosporları (konidyumları) taşıyan hifler özel görünümde olup bunlara konidiofor adı verilir. Örneğin Aspergillus cinsinde bu konidioforların ucu tokmak gibi şişer, bu kısma vesikül (vesicel) denir. Bunun etrafında bir çiçek dizisi gibi sıralı uçları sivri ve oval oluşumlara sterigma denir. Konidiumlar bu sterigmaların ucundan itibaren boncuk dizisi gibi sıralanırlar (Şekil 3.2).

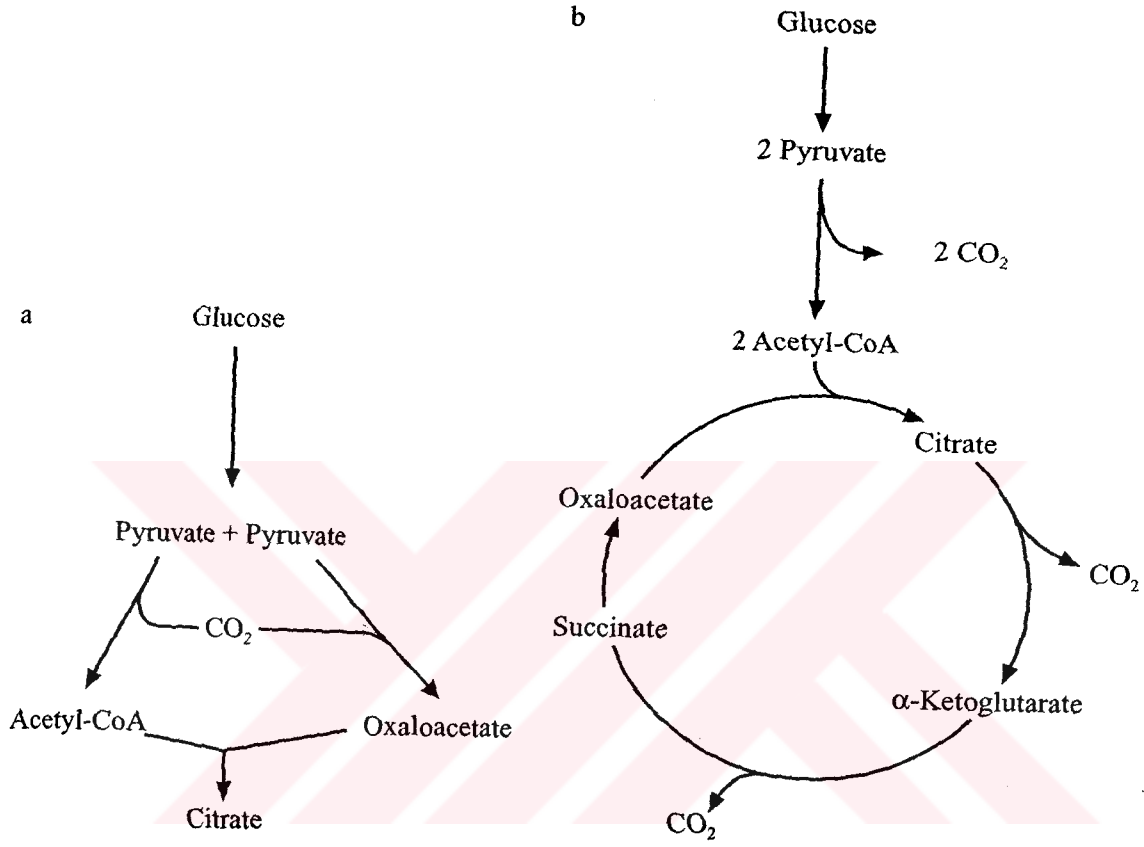
3.2 A. niger' de Glukoz Katabolizması ve Düzenlenmesi

3.2.1 Sitrik Asit' in Biyosentetik yolu

Cleland ve Johnson (1954), Martin ve Wilson' un (1951) ünlü çalışmalarından dolayı bu yol iyi bilinmektedir. Sitrik asit başlıca glikolitik yol reaksiyonları ile oluşmaktadır. Glukoz ve diğer şekerler, A. niger ve diğer mantarlarda olduğu gibi sırasıyla glikolitik yol ve pentoz fosfat yolundaki reaksiyonlar sayesinde hem enerji kazanılması hem de hücre sentezi için kaynak olarak kullanılmaktadır. Sitrik asit fermantasyonunda kullanılan karbon' un sadece küçük bir kısmı pentoz fosfat yolunda kullanılmaktadır, uzun süreli kültürasyonlarda ise pentoz fosfat yolu daha da az kullanılır (Legisa ve Matthey, 1986).

Legisa ve Matthey (1988) bu olayın sitratın 6-fosfoglukonat dehidrogenazı inhibe etmesi sonucu olduğunu tahmin etmektedirler. Fakat bu olayı kanıtlayacak bilgiler eksiktir. Fermantasyonun son safhalarına kadar arabitol ve eritritol yan ürün olarak birikmektedir (Roehr, 1987). Bu da pentoz fosfat yolunun tam olarak bloke olmadığını gösterir.

A.niger glukoz oksidaz enzimi ile katalizlenen glukoz katabolizma yoluna sahiptir. Bu enzim yüksek glukoz konsantrasyonlarında, diğer besin maddelerinin düşük konsantrasyonlarında ve güçlü havalandırmada indüklenmektedir. Şartlar yüksek verimli sitrik asit fermantasyonu için tipiktir. Glukoz oksidaz mutlaka sitrik asit fermantasyonunun başlangıç safhasında oluşur ve önemli miktarda glukoz' u glukonik aside çevirmektedir, bununla birlikte enzimin hücre dışında oluşu nedeniyle dışarının pH' ı ile direkt olarak etkilenmekte ve $\text{pH} < 3.5$ ise inaktif hale gelmektedir. Sitrik asit miktarı ile pK arasındaki ilişki nedeniyle sitrik asit birikimi kültür ortamının pH' ını 1.8' e düşürecek, bunun sonucu olarak glukoz oksidaz inaktif olacaktır. Glukonik asidin sitrik aside yıkılışının olup olmadığı veya hangi mekanizma ile olduğu bilinmemektedir (Matthey ve Kristiansen, 1999).



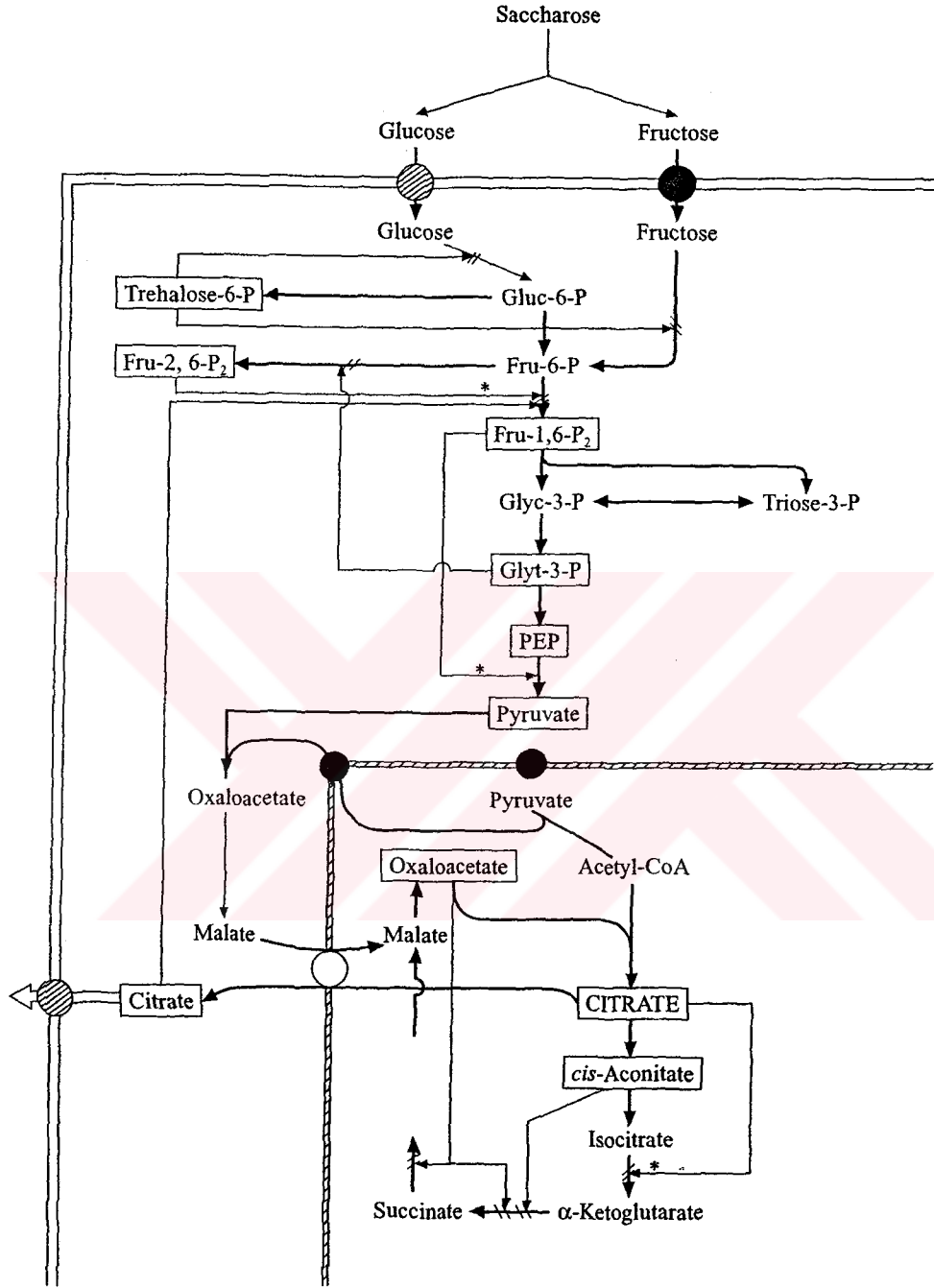
Şekil 3.3 Sitrik asit oluşumunun metabolik yolları; a) Anaplerotik karbondioksit katılımı olduğunda, b) Sadece sitrik asit çevrimi ile, sitrik asit eldesi.

Glukozun yıkılışı glikoliz yoluyla iki mol piruvata kadar olur ve piruvatın sıralı dönüşümleri sonucu sitratın öncü maddeleri oluşur. (ör: oksalasetat vb.) Cleland ve Johnson(1954), *A.niger*' in asetil-CoA oluşumu sırasında ortama bırakılan karbon dioksidi kullandığı ve bir mol oksalasetat oluşturduğunu bulmuştur (şekil 3.3a). Bu reaksiyon yüksek sitrik asit verimi için önemlidir. Çünkü sitrik asit siklüsünün bir dönüşünde bir molekül oksalasetat oluşabilecekti, böylece iki molekül karbon dioksit kaybı olacaktı ve glikozun sadece üç' de iki karbonu sitrik asit olarak birikecekti (şekil 3.3b). Bu reaksiyonu katalizleyen enzimin piruvat karboksilaz olduğu bulunmuştur.

Diğer birçok ökaryotlardaki enzimlerden farklı olarak A. nigerdeki piruvat karboksilaz sitoplazmada bulunmaktadır (Bercovitz, 1990; Jaklitsch, 1991).

Glikolitik piruvat daha sonra oksalasetata dönüşmekte ve sonra da sitoplazmik malat dehidrogenaz izoenzimi ile malata dönüşmektedir. Dolayısıyla glikolitik üretilen NADH' ın yüzde ellisi rejenere edilmektedir (şekil 3.4) (Kubicek, 1988). Bu olay esas olarak yüksek ökaryotlar ile benzerlik göstermektedir. Sitoplazmik malat, mitokondriyal trikarboksilik asit siklusu taşıyıcılarının substratı gibi görev yapar ve artan malat konsantrasyonu sonucu mitokondriden sitoplazmaya sitrat taşınmasını uyarır. Karbon dioksit aşırı düşüklüğün fermantasyonun erken safhalarında meydana geldiği gözlenmemiştir .

Kubicek (1979b) pilot denemelerde karbon dioksit ve oksijen miktarı gözlemiştir: Fermantasyonun ilk yetmiş saati boyunca solunum katsayısının (verilen karbon di oksit / alınan oksijen) 1' e yakın olduğu daha sonra azalmaya başladığı gözlemlenmiş ve sitrat birikiminin sabit kaldığı fermantasyon safhasında (<120 saat) piruvat karboksilazın reaksiyonunun etki ettiği tahmin edilmektedir (solunum katsayısı: 0.66). Cleland ve Johnson fermantasyonun ileri safhalarında piruvat karboksilaz reaksiyonunun daha önemli olduğunu söylemektedir, oysaki erken safhadaki sitrik asit birikimi anaplerotik karbon dioksit kaynağı olmadan oluşmaktadır.



Şekil 3.4 *A. niger*' de sakkarozdan sitrik asit biyosentezinin metabolik ve düzenleyici ağı. Hücre içine alınımını kolaylaştırmak için sakkaroz ekstrasellüler invertaz enzimi ile glukoz ve fruktoza parçalanmıştır (Mattey ve Kristiansen, 1999) ve sadece monosakkaritler içeri alınmıştır. İçi boş çifte çizgi plazma membranını, içi kesikli çifte çizgi ise mitokondri membranını göstermektedir. Membranlara yerleştirilmiş daireler, bilinen veya varsayılan transport basamaklarıdır (dairelerin, içi çizgili olanlar: *A. niger*' de tanımlanmış olan; içi dolu olanlar: olduğu varsayılan fakat daha tanımlanmamış olan; içi boş olanlar ise: karşılıklı transport olan transport adımlarını göstermektedir.). Kalın çizgiler ve oklar metabolik reaksiyonları; ince çizgiler ise düzenleyici reaksiyonları (*aktivasyon - //inhibisyon) işaret etmektedir. Ortamlar arası önemli düzenleyiciler ise kutu içine alınmışlardır.

3.3 Glukoz Metabolizması ve Düzenlenmesi

Seçilen genlerin çoğaltılmasının *A. niger*' de sitrik asit verimini arttırmadığını görmek hayal kırıklığı yaratmıştır. Bu *A. niger*' de en az birkaç enzimi içeren çok iyi bir kontrol mekanizması olduğunu göstermiştir. Doksanların başından beri bu kontrol mekanizması araştırmaların esas hedefi olmuştur. Bu mekanizmanın iyi tanımlanmış ve karşılaştırılabilir bir çok enzimi içerdiği bulunmuştur. Son zamanlarda *A. niger*' in hücre içindeki metabolitlerinin konsantrasyonu ile ilgili çalışmalar yeniden gözden geçirilmektedir. Elde edilen bilgilere dayanarak Şekil 3.4' de *A. niger*' de sitrik asit biyosentezinin düzenlenmesinde önemli olduğu inanılan enzimlerle metabolitler arasındaki düzenleyici ilişkiler gösterilmektedir. Benzer ilişkiler maya ve ileri ökaryotlarda da vardır. Sitrat ve fosfo enol piruvatın (PEP) glikolitik yolu negatif olarak etkileyen ana faktörler olduğu görülmektedir, oysa Fru-2,6-P₂ ve Fru-1,6-P₂ esas aktivatörler gibi davranmaktadırlar (Mattey ve Kristiansen, 1999).

3.4 Sitrik asit Biyosentezinin Düzenlenmesi

Sitrat, glikolizin en önemli inhibitörlerinden biridir. *A. niger*' de aktif glikolitik yol sebebiyle fazla sitrat üretimi uzun zamandan beri biyokimyacıların ilgisini çekmektedir. Fermantasyon verimi için esas önemli olanın sitrat olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte uygun koşullar altında, *A. niger*' in PFK1, NH₄⁺, inorganik fosfat, AMP, Fru-2,6-P₂ gibi aktivatörlerini birikmesiyle sitrat inhibisyonuna daha çok karşı koymakta olduğu gözlenmiştir. Yani bu sitrat feedback' i oluşmayacaktır (Habison, 1983; Arts, 1987).

Kubicek ve meslektaşları sitrat inhibisyonuna karşı koymada Fru-2,6-P₂' in baş rolü oynadığını varsaymaktadırlar. Kubicek-Pranz (1990) *A. niger*, yüksek konsantrasyonlarda (%14) sakkaroz veya glukoz (Shu ve Johnson, 1948b; Xu 1989a) içeren ortama koyulduğunda hücre içindeki Fru-2,6-P₂ konsantrasyonundaki artış ile sitrik asit birikmesindeki artışın paralellik gösterdiğini gözlemişlerdir. Aynı zamanda yüksek oranda sitrik asit üretebilen karbon kaynakları (Hossain, 1984; Kubicek ve Roehr, 1986; Xu, 1989a) ile yapılan miselya kültürasyonunda Fru-2,6-P₂ konsantrasyonunun arttığı görülmüştür. Fru-2,6-P₂ konsantrasyonu ile sitrat üretimi arasında pozitif bir ilişki vardır. Bu etki PFK1' in sitratın inhibisyonunun azalmasından sorumlu olabilir. Artan Fru-2,6-P₂ seviyesinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. PFK2, Fru-2,6-P₂' nin artmasından sorumlu olduğu için *A. niger*' de bu enzimin düzenlenmesi zayıftır (Harmsen, 1992).

Fru-2,6-P₂' in biyosentezi ve düzenlenmesi ile PFK1' in düzenlenmesi arasında ilişki vardır ve bunlar glikolizin erken basamaklarında gerçekleşmektedir. Teorik çalışmalar sitrik asit üretiminin asıl kontrolünün önemli kısmının heksoz tüketimi ve/veya fosforilasyonunda olduğu sonucuna varmıştır (Mattey ve Kristiansen, 1999). *A.niger* glukolizinin erken safhalarının biyokimyası tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte Steinböck (1994) sitrat ile inhibe edilen ve trehaloz-6-fosfata az duyarlı tek heksoz/glukokinaz' ı sadece sitrik asit üreten soy olan ATCC 11414' de bulmuştur. Sitrik asidin inhibisyonu Mg²⁺ un çelat oluşturması sonucu olmaktadır. ATP' nin ön maddesinin de çelat oluşturması gerekir ve başlangıçtaki fizyolojik koşullar altında Mg²⁺ bulunduğundan büyük bir olasılıkla ilişkisi yoktur. Ancak trehaloz-6-fosfat ile inhibisyonun sitrik aside doğru akımla ilişkili olduğu görülmektedir.

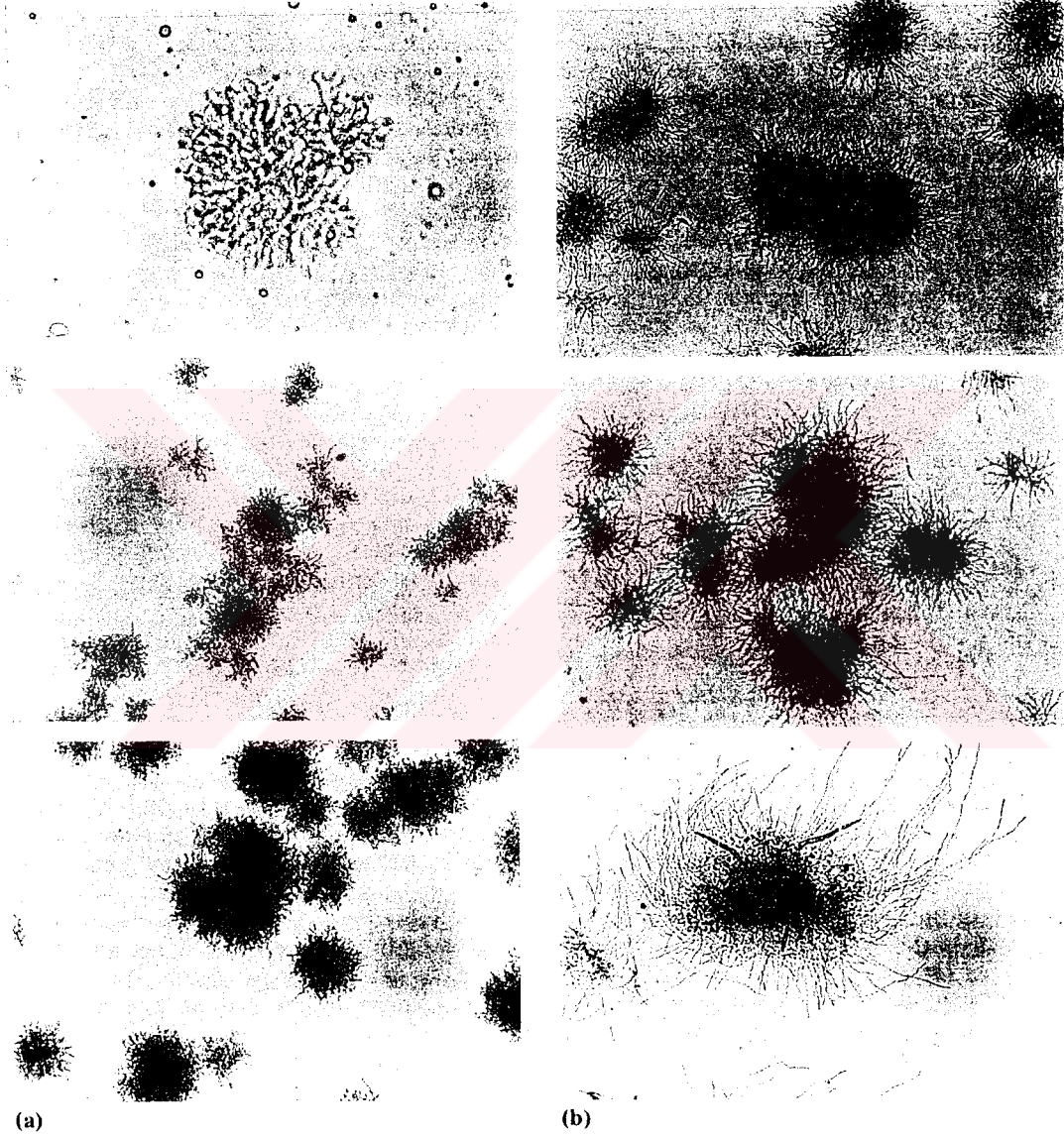
Trehaloz-6-fosfat' ı sentezleyen gen olan tpsA (Wolschek ve Kubicek, 1997) kesilip çıkartılmış olan bir rekombinant zincirli *A. niger*' de sitrik asit üretiminin oranı artmıştır (Arısan-Ataç vd., 1996). Benzer olarak tpsA genlerinin birçok kopyasını içinde bulunduran zincirli *A. niger* bu yüzden aşırı miktarda trehaloz-6-fosfat sentezlemiştir. Bu da sitrat üretimini azaltmıştır. Bu bilgi trehaloz -6-fosfat' ın hücredeki seviyesinin glukozdan sitrik aside doğru akışı düzenlediğini göstermiştir ve bu bilgi Torres' in (1996) sonuçları ile uyumludur. Bu heksokinaz' ın esas önemi glikolizin erken basamaklarını düzenlemesidir. Bu yüzden PFK2 için substratın artan konsantrasyonu gerekmektedir.

Bununla birlikte son zamanlarda Panneman (1996) *A. niger* N400' den glukokinazı izole etmiş ve tanımlamıştır. Bu *A. niger* cinsi sadece düşük seviyede sitrik asit üretmektedir. Bu glukokinaz Steinböck (1994)' in saflaştırdığı hekso/glikokinaz' dan farklı özelliktedir. *A.nidulans* (Rujiter, 1996a)' a benzer olarak en az bir ayrı heksokinazın da bulunduğu sonucuna varmıştır. Steinböck (1994) ve Panneman (1996)' in sonuçları arasındaki fark halen çözülmemiştir.

A.niger ATCC 11414' ün DNA zinciri ile *Kluyveromyces lactis*ın, heksokinaz kodlayıcı geninin hibridizasyonu incelendiğinde sadece tek bir parçanın hibridizasyon olduğu gözlenmiştir. ATCC 11414' in geni son zamanlarda klonlanmaktadır ve genin tanımlanmasının bu durumu açıklayacağı umulmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları Arısan-Ataç' ın sonuçları gibi olabilir. Bu çalışmada trehaloz-6-fosfat inhibisyonunun glikolitik akıma pozitif etkide bulunduğu açıkça gözlenmiştir ve bu yüzden heksoz fosforilasyonu adımı bu fermantasyonun asıl düzenleyici noktasıdır.

Glukozun alımı ve kullanılması Torres (1996) tarafından araştırılmıştır. *A.niger* ATCC 11414, farklı K_m ve V_{max} 'lara sahip iki taşıyıcıya sahiptir. Ancak yüksek afiniteli permeaz enziminin düşük glukoz konsantrasyonunda (%1) olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte az afiniteli permeaz ise yüksek glukoz konsantrasyonunda mantarın büyümesi sırasında glikolitik akımın artmasına yardımcı olmaktadır.

Fru-2,6-P₂ ile PFK1' in düzenlenmesinin sitrik asit birikiminin düzenlenmesinde tek parametre olmadığı çeşitli kanıtlarla öne sürülmüştür. PFK1' in sitrat inhibisyonu in vivo ortamda amonyum iyonları ile antagonize edilmekte gibi görülmektedir (Habison, 1979). Bu antagonizma sitrik asit birikiminde iz metal iyonlarının (özellikle mangan iyonlarının) iyi bilinen etkileri ile fonksiyonel olarak bağlıdır (Shu ve Johnson, 1948). Bu etkilerden biri de manganez eksikliğinin sonucunda *A. niger*' da makromoleküler sentezi bozulmasıdır. Bu da protein sentezinde azalmaya neden olacaktır. NH₄⁺ konsantrasyonunu yükseldiği zaman sonuç olarak miselya birikmektedir (Kubicek, 1979a).



Şekil 3.5 *A.niger*' de Mn ve Fe' ın (a) bulunmadığı, (b) yüksek konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda miselyum oluşumunun morfolojisi.

Mangan içeren ve mangan içermeyen ortamlardaki sitrik asit fermantasyonları karşılaştırıldığında manganın idiofaz metabolizmasını kuvvetlice etkilediği görülmüştür (Şekil 3.5).

Manganlı ortamlarda hücre büyümesi artar, şeker tüketimi azalır ve asidogenezin şiddeti bariz şekilde azalır. Glikolizin, pentozfosfat yolunun, TCA siklüsünün, nitrojen metabolizmasının anahtar enzimleri araştırıldığında mangan yokken anabolik ve TCA siklüsü enzimleri üzerinde sitrat sentez enzimleri hariç baskılama gözlenmiştir. Sitrat sentez enzimleri ve glikoliz enzimlerinin aktivitesi artınca şeker tüketim hızı da artmaktadır. Mangan bulunduğu ortamlarda enzim sentezi üzerine baskı gözlenmemiştir. 2-oksoglutarat dehidrogenaz ve izositrat liyaz aktiviteleri üzerinde de aynı şekilde baskılama gözlenmemiştir. Sonuçta mangan eksikliğinin esas olarak *A. niger*' in biyosentetik reaksiyonlarının sürecini etkilediği hipotezini desteklemektedir, bu da glikolizin son ürünü olan sitrik asidin bol miktarda oluşmasını sağlayacaktır. (Kubicek ve Röhr, 1977)

Manganez rolünün delili olarak bu prosesde *A. niger*' in mutantları izole edilmiştir. Bu mutantların PFK1' leri kısmen sitrata duyarsızdır ve sitrik asit birikimine eş zamanlı olarak Mn^{2+} bulunmasına daha toleranslı olmaktadır (Schrefel, 1986). Aynı zamanda bir çok araştırmacı sitrik asit fermantasyonu sırasında NH_4^+ ilavesinin sitrat üretiminin verimini situmule ettiğini fark etmişti. NH_4^+ un etkisi PFK1 üzerinedir. Son zamanlarda araştırmacılar eklenen NH_4^+ un hem zamanının hem de konsantrasyonunun önemli olduğunu iddia etmektedirler ve NH_4^+ un eklenmesi fermantasyonun kritik fazları sırasında olursa sitrik asit birikimini azaltacaktır (Mattey ve Kristiansen, 1999).

Manganezin olmadığı kültür ortamında makromoleküler sentezin bozulmasının nedeninin esasında translasyon aşamasında olması gerektiği farz edilmiştir. Bununla birlikte *A. niger*' de besin ortamında mangan iyonlarının olmamasının geri dönüşümlü DNA (RNA değil) biyosentezinin inhibisyonuna neden olduğu ispatlanmıştır. Ribonükleotid redüktazın inhibitörü olan hidroksiürenin eklenmesi ile mangan eksikliğinin etkilerinin taklit edilebildiği bulgular ile bu teori desteklenmiştir. Manganezin bulunmamasının esas olarak DNA replikasyonu için gerekli olan dezoksiribonükleotidlerin eksikliğine sebep olarak DNA sentezinin bozulduğu ileri sürülmüştür (Mattey ve Kristiansen, 1999).

Legisa ve meslektaşları tarafından PFK1' in düzenlenmesinin esas mekanizmasının PFK1' in siklik-AMP' ye bağlı protein kinaz A tarafından düzenlenmekte olduğu ileri sürülmüştür (Legisa ve Bencina, 1994). Yüksek sakkaroz konsantrasyonunda PFK' ın, fosforilasyonuna neden olan miselyal siklik-AMP' nin düzeyinin artmasına neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu yüzden inaktif (fosforillenmemiş) PFK1, aktif (fosforillenmiş) PFK' a dönüşmektedir (Legisa ve Gradisnik-Grapulin, 1995). Alkali fosfataz ile muamele edilen PFK1' in inaktif olmasını gözlemlenmeleri bu modele destek olmuştur (Legisa ve Bencina, 1994).

Bununla birlikte bu model kanıtlanmamış olmakla birlikte üstünde sağlam kanıtlar bulununcaya kadar çalışılmalıdır. PFK1' in molekül ağırlığı Legisa ve Bencina (1994) tarafından bulunmuş ve çalışmalarında 48 kDa olarak kullanılmıştır, ancak bu değer doğal PFK1' in ağırlığı değildir (84 kDa), ayrıca çalışmaların metodik kısmı, alkali fosfataz' in uzaklaştırılmış olup olmadığını veya PFK1' in öncelikle inaktive edilip edilmediğini göstermemektedir. Eğer bu olaylar yapılmamış ise PFK1' in aktivasyonu Fru-6-fosfat' in uzaklaştırılması yoluyla olmuştur ve bu olay bir yan etki nedeniyledir. PFK' in düzenlemesinin fosforilasyon ile olmasının kanıtı bu nedenden sağlanır (Mattey ve Kristiansen, 1999).

Sitrik asit birikiminin, siklik-AMP düzeyinin artırılması yolu ile stimule edilmesi önce (Mattey ve Kristiansen, 1999) stimule edici etkilerin ortamdaki Zn^{2+} konsantrasyonuna bağlı olduğu iddia edilmiştir. A. niger' deki adenilat siklazın Zn^{2+} a bağlı olduğu gösterilmiştir. Araştırmaların dezavantajı ise ne yazık ki %1' lik sakkaroz kullanmalarıdır ve bu yüzden sitrik asit fermantasyonunda çinkonun etkileri ile ilgili bilgiler açık değildir. Xu (1986b) A. niger' de sitrik asit biyosentezi boyunca siklik-AMP' nin hücre içi konsantrasyonu ile ilgili çalışmalarını, ortamda Mn^{2+} iyonları varken ve yokken , yüksek (%14) ve düşük (%1) sakkaroz konsantrasyonlarında yapmıştır. Siklik-AMP miktarı ile büyüme oranları birbirlerine bağlıdır. Siklik AMP' nin gerçekten sitratin fazla üretiminin düzenlenmesi için gerekip gerekmediği hakkında daha çok araştırma yapılması gerekmektedir.

3.5 Sitrata Birikiminde Sitrata Yıkılmasının Rolü

Sitrik Asit Siklüsünün Rolü

A.niger' in büyük miktarlarda sitrik asit biriktirmesinin nedeni birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Sitratin aşırı üretim ürünü olduğu kabul edilmekle birlikte Foster (1949) limitli katabolizmadan ziyade aşırı substrat kaynağının sonucu sitrat birikimi olduğunu belirtmiştir. Bir çok araştırma sitratin aşırı birikiminin sonucu trikarboksilik asit siklüsünü engellemesini açıklamaya çalışmıştır. Birçok araştırmacı enzim azaltılması sonucu (akonitaz veya izositrat dehidrogenaz) sitratin inaktivasyonunun sitrik asit birikimi için gerekli olduğunu iddia etmektedirler (Roehr 1983b, 1996; Kubicek ve Roehr 1986).

Bazı metal iyonlarının eksikliğinde (Mn^{2+} , Fe^{3+}) TCA-siklüsünde bazı enzimlerin inhibisyonu olduğu ve böylece sitrik asit birikimi olduğu bilinmektedir (Kubicek ve Roehr, 1986). Demir eksikliğinin akonitazı inhibe ettiği iddia edilmiştir Sitrik asit birikimi süresince bu enzimin aktivitesi in vitro, in vivo ortamda olduğu kadar iyi korunmaktadır. Düzenleme

mekanizmasındaki demire bağımlı enzimlerin sitrik asit birikimi boyunca yüksek aktiflikte olduğu unutulmamalıdır. Benzer mantıkla Mn^{2+} eksikliğinde iki izositrat dehidrogenazdan aktivitesi için iki değerlikli metal iyonu gereken dehidrogenazın inhibe olduğu iddia edilmektedir. Bununla beraber çelat oluşumu için substrat gerekmektedir. Mg^{2+} iyonunun (başlangıçta bulunmaktadır) etkisine baktığımızda Mn^{2+} 'nın çelat oluşturma görevini ele aldığı düşünülmektedir. Bu yorum Mn^{2+} 'nın bilinen etkisinden farklıdır (Mattey ve Kristiansen, 1999).

Sitrik asit birikimi ile ilgili diğer birçok açıklamalar sitrat (Mattey, 1977) veya gliserol (Legisa ve Mattey, 1986) tarafından NADP'ye spesifik izositrat dehidrogenaz'ın metabolik inhibisyonu üzerine kurulmuştur. Trikarboksilik asit siklüsünde engel yaratması ve akonitazın K_{eq} 'ı nedeniyle sitrat üzerine bu rol düşmektedir. Ne yazık ki in vivo ortamda yapılmış araştırmalarla desteklenmiş NAD veya NADP'ye spesifik izositrat dehidrogenaz'ın inhibisyonu temeline dayanan hiçbir açıklama yoktur.

“Gliserol teorisi” (Legisa ve Mattey, 1986; Gradisnik–Grapulin ve Legisa, 1996) son zamanlarda, artan miselyal gliserol konsantrasyonlarının miselya ile *A. niger*'den izole edilmiş mitokondride $1,5-^{14}C$ -sitrat'ın oksidasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır (Arısan-Ataç ve Kubicek, 1996). İşaretli pozisyonda ki ($1,5-^{14}C$ -sitrat) eklenmesi sonucu oluşan ^{14}C işaretli CO_2 sadece sitrat'ın α -ketoglutarata metabolik dönüşümü boyunca ortaya çıkar. Bu olayda gliserol konsantrasyonunun hiçbir etkisi yoktur. Bu yüzden gliserolün izositrat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi vardır tezini açıkça çürütmektedir. Ayrıca hücre dışında ekstraktlardan elde edilmiş enzimlerle tezatlık göstermektedir (Legisa ve Mattey, 1986). Saflaştırılmış NADP-spesifik izositrat dehidrogenaz, sitrat tarafından inhibe edilmektedir (Arısan-Ataç ve Kubicek, 1996).

Bizi şaşırtan soru TCA-siklüsünün izositrat dehidrogenaz basamağının sitrik asit fermantasyonu süresince aktif olup olmadığıdır. Şimdiye kadar hiç gözlenmemiş teorik bir bakış açısı vardır. Glikozdan α -ketoglutarata metabolik akışta indikatör gibi davranan protein bağlı veya serbest glutamik asitin hücre içi konsantrasyonunu kullanmak, mantar büyümesinin durduğu (glutamik asit için istenen) fermantasyonun son safhalarına kadar bu akışta önemli bir değişimin olduğunun delili yoktur. Normalden % 78 daha az sitrik asit birikimi olan kültürde oluşandan %17 daha az sitrik asit birikmektedir (Zehentgruber ve Kubicek, 1980). Bu yüzden de sitrik asit birikimi mekanizmasının araştırılmasına büyük ilgi olmamaktadır.

Sitrat birikiminin ilk başladığı mekanizmanın mitokondride olduğu kabul edilmektedir. Trikarboksilat transporter (Taşıyıcısı)' ının aktivitesini bulabilmekten çok uzaktayız. Bu taşıyıcı akonitaz ile sitrat için yarışmaktadır, sitrata ilgisi akonitazınkinden daha fazla ise TCA-siklüsü enzimlerinin birisinin inhibisyonuna gerek duymadan sitratı mitokondriden dışarı atmaktadır. Memelilerin dokularında mantarların da malata karşı trikarboksilat taşıyıcıları vardır (Mattey ve Kristiansen, 1999), bu durum sitoplazmada malat birikimi olunca oluşmaktadır. Gerçekten de malat birikiminin sitrik asit birikimi gibi olduğu görülmektedir (Roehr ve Kubicek, 1981). Bununla birlikte *A. niger*' de sitrat taşıyıcıları henüz araştırılmamıştır ve bu hipotez için daha çok araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Aynı zamanda hangi basamağın akış yolunu değiştirdiği, NAD-bağımlı veya NADP-bağımlı izositrat dehidrogenazın mı, α -ketoglutarat veya suksinat dehidrogenazın mı mitokondri içi sitrat konsantrasyonuna katkıda bulunduğu bilinmemektedir. Bu enzimlerin mitokondriyal NADH/NAD ve NADPH/NADP oranları ile düzenlendiği bilinmektedir. AMP ile düzenlenen cis-akonitaz ve okzalasetatın (Meixner-Monori, 1985,1986) mitokondriyal TCA metabolitlerinin düzeylerinin değişimleri de aynı şekilde olmaktadır.

3.6 Solunum Aktivitesi ve NAD Rejenerasyonunun Yolu

Sitrik asit oluşumu kuvvetli havalandırmaya bağlıdır ve *A. niger*' in istem dışı büyümesi için gerekenden daha fazla çözülmüş oksijen basıncının olması sitrik asit fermantasyonunu uyaracaktır. Diğer yandan, havalandırmanın birden kesilmesi miselyal büyümeye zararlı bir etki olmaksızın sitrik asit birikimini geri dönüşümsüz olarak bozmaktadır (Kubicek, 1980; Dawson, 1988). Bu araştırmanın temelini, yüksek oksijen basıncı ile glikolitik olarak üretilen NADH' ın yeniden oksidasyonu sonucu oluşan alternatif solunum yolu ile ilişkisi olduğu görülmektedir (Zehentgruber, 1980; Kubicek, 1980). Bu yolun aktivitesinin hava kaynağının kısa süreli kesilmesi ile zayıfladığı görülmektedir. Sitrik asit birikiminde standart ve alternatif solunum yollarının rolü ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Proton pompalayıcı NADH' ın biriktiği bulunmuştur. Alternatif yolun aktivitesinin önemini nedeni olabilecek ubikinon oksidoredüktazın sitrik asit birikimi süresince zayıfladığı gözlemlenmiştir (Mattey ve Kristiansen, 1999). NADH bağlayıcı kompleks I' in alt ünitesini kodlayan geni çıkardıklarında sitrik asit üretimi az olan *A. niger* cinsinde katabolik akışın arttığı görülmüştür. Fakat bu cins *A. niger*' de akrabalarına göre daha az sitrat üretmektedir. Bu bulgular sitrik asit birikiminin tek bir nedene dayalı bir proses olmadığı gerçeğini

kuvvetlendirmiştir. Büyük miktarda sitrat birikimi henüz birbirleri ile etkileşimleri tam olarak anlaşılmayan birçok faktörün ince dengesine dayanmaktadır.

Yüksek oksijen sağlanmasının gerekmesi *A. niger* üzerine Mn^{2+} iyonlarının diğer bir etkisidir; Ör: mantarın morfolojisi üzerine etkisi : *A. niger* Mn^{2+} iyonlarının uygun konsantrasyonlarında düz ve uzun iplikler gibi büyür (Şekil 3.5 b).

Mn^{2+} eksikliğinde büyüyen miselya kuvvetlice vakule edilmiş (küçük boşluklar oluşmuş) yüksek sayıda dallanmış, kuvvetli kalın hücre duvarları ve ampul şeklinde hücreler gibi görülmektedir (3.5 a). Bu çeşit morfolojinin daha iyi reoloji sağladığı ve daha yüksek oksijen transferi yapabildiği görülmüştür ve bu şartlar da optimum sitrik asit verimi için gerekmektedir (Mattey ve Kristiansen, 1999).

NAD- rejenerasyonu ile pH' ın sitrik asit fermentasyonu üzerine etkisi arasında ilişki vardır. Glikozun sitrik aside kantitatif dönüşümü fermentasyonun hemen idiofaz döneminde oluşmaktadır, 1ATP ve 3NADH oluşmaktadır. NADH havuzunun bir kısmı alternatif olarak reokside edilmektedir, salisil hidroksumik aside (SHAM) duyarlı solunum yolunun tanımlandığının üstünde ATP miktarını aşmaması için hücre korunması gerekmektedir. Roehr (1992) ekstrasellüler ortam ve de sitozol arasında pH derecesinin korunması süresince ATP' nin plazma-membran bağlı ATPaz tarafından harcandığı tahmin etmektedir. Mattey (1988) *A. niger*' da sitrik asit üretimi sırasında pH derecesinin korunması için ATPaz' ın gerektiğini iddia etmektedir. Sitrik asit birikimi için düşük pH değeri gerekmesinden dolayı birden çok turn-over' lu ATP oluşumu gerekmektedir. Yoksa metabolik dengesizlik oluşması ve asidogenezisi durdurması gerekmektedir. Bununla beraber bu hipotezler için hala deneysel çalışma yapılmalıdır. Son zamanlarda bitki ATPaz' ın tek noktali mutajenezinde ve bunun mantarlarda gösterdiği sonuçlarda H^+ pompalanmasının arttığı ve düşük pH' da büyüme oranının arttığı görülmüştür (Mattey ve Kristiansen, 1999).

3.7 Sitrik Asidin *A. niger*' den Salınması

Torres (1994a) mitokondriden sitoplazmaya ve miselya' dan kültür ortamına olmak üzere iki sitrik asit transport basamağı olduğu tezini ileri sürmüştür ve bunlar yüksek verimler elde etmek için çok önemli düzenleme noktalarıdır.

Mitokondriyal sitratın sitoplazma sıvısına transportu hala tam olarak bilinmemektedir, glikolitik yan ürün olarak fazla üretilen malat ile sitratın ters transport prensibine göre taşındıkları kabul edilmektedir.

ATP-sitrat liyaz, diğ er hücrelerde sitoplazmik sitratın lipit biyosentezinde kullanılan bir enzimdir, bu enzimin yüksek akışı yönetemeyecek gibi oldu ğ u düşünölmektedir. Fakat sitrik asit üretimi koşulları altında düzenlenmesi tam olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda araştırmacılar benzer kinetik ve fizikokimyasal özellikler gösteren sitoplazmik ve mitokondriyal karnitine asetiltransferazı *A. niger*' den saflaştırmışlardır (Mattey ve Kristiansen, 1999). Bu enzimin aktivitesi sonucu ATP-sitrat liyazın da önemli derecede arttığını görmüşlerdir, bunun sonucu karnitin esterinin transferinin lipit biyosentezi için asetil-CoA' nın esas fizyolojik kaynak oldu ğ u sonucuna varmışlardır. Eğer bu gerçekten oluyor ise sitoplazmik sitrat havuzunun neden sabit oldu ğ unu açıklayacaktır. Karnitin asetil transferazın sitoplazmik izo enziminin bulunmasından dolayı, bu enzimin asetil-CoA' yı sitrat biyosentezi için mitokondriye transfer ettiği tahmin edilmektedir (Mattey ve Kristiansen, 1999). Bu merak edilen bir spekülasyondur, fakat pirüvattan asetil-CoA' ya giden yolun tanımlanması gerekmektedir.

Mattey ve meslektaşları (1992) sitratın geniş pH derecelerinde plazma membranından sitoplazma ile hücre dışı ortam arasında taşınmasını açıklamışlardır, hücrelerden sitrat akışının 2(-) sitrat anyonunun difizyonu ile ve pH derecesinin etkisi ile oldu ğ u tezini önermişlerdir. Eğer bu varsayım doğru ise, düşük pH değerı transport için gerekli sitrat miktarından sorumludur ve sonuç olarak daha yüksek pH değerlerinde daha az sitrat salgılanacaktır. Bununla birlikte son zamanlarında yapılan laboratuvar çalışmaları, sitrat taşınması için ATP gerektiği ve V_{max} ' ının dış ortamın pH' ın dan kuvvetlice etkilendiğini açıkça göstermektedir (Netik, 1997); bu olay difüzyon hipotezinden tam tersi farklıdır. Netik (1997) manganez eksikliği altında büyüyen miselyalarda sitrat taşınmasının arttığını bulmuşlardır. Önceki çalışmalarda manganezin yeterli miktarda bulundu ğ u ve bulunmadığı ortamlarda büyüyen miselyalarda hücreler arası sitrat konsantrasyonunun önemli miktarlarda farklı olmadığı gözlenmiştir (Kubicek ve Roehr, 1985; Legisa ve Kidric, 1989). Sonraki ortamlar altında 5-7 kat yüksek ekstra sellöler seviye gözlemlenmiştir. Sitrat taşınması için manganez eksikliğinin gerekmesinin nedeni tam olarak anlaşılamamıştır fakat sitrat' ın kullanılması için mangan iyonlarının gerekmesi ile alakalı olabilir, belki de sitrat' ın permeaz için substrat olması için çelatlanmış olması gerekmektedir (Netik, 1997).

Sitrik asidin salınması (export) ve içeri alınmasında (import) Mn^{2+} nın karşılıklı etki etmesinin nedeni manganez eksikliğinin diğ er bir etkisi olabilir, örneğin bütün miselyal lipitlerin doymuş yağ asitleri ile doymamış yağ asitlerinin oranları değiştirilirse bu olay trigliserid ve fosfolipid sentezini inhibe etmektedir. İzole edilmiş membranların sentezi de

inhibe edilmektedir (Meixner, 1985). Örneğin adi alkollerin, lipitlerin veya üçüncü dereceden aminler gibi membran etkileyici bileşiklerin manganaz' ın zararlı etkilerini antagonize etmesi gibi önceki bilgilerin ışığında *A. niger*' in sitratın salınması (export) ve içeri alınması (import) sistemlerinin değişik davranışları anlaşılabilir (Mattey ve Kristiansen, 1999).

Cu^{2+} iyonlarının önemli teknik kabiliyetlerinden biri olan Mn^{2+} iyonlarının zararlı etkilerini antagonize etmesi sitrat salınması ile ilişkili olabilir, Cu^{2+} ortamda sitrik alınması ve kullanılmasını kuvvetli şekilde inhibe eder (Netik, 1997). Cu^{2+} iyonlarının etkisi, aynı zamanda *A. niger*' da Mn^{2+} ' nın alınması ve kullanılmasını inhibe etmesi olarak yerini alacaktır. Spesifik ve yüksek afiniteli transport sistemleri böylece oluşur. Alım, kullanılma ve salınma sistemlerinin özellikleri birbirine benzerdir ve aynı enzim sistemleri ile katalizlendiği sanılmaktadır (Mattey ve Kristiansen, 1999).



4. MATERYAL VE METOTLAR

4.1 Kullanılan aletler

- Sterilizasyon işlemi için, fissler marka 10 L hacimli düdüklü tencere kullanılmıştır.
- Enzimatik yöntemle sitrik asit tayininde aşağıda belirtilen spektrofotometre kullanılmıştır; Philips PU 8740 UV/VIS Spektrofotometer
- Derin kültür yöntemi ile yapılan çalışmalarda fermantasyon şartlarını (ısı ve oksijen alınımını) sağlamak amacıyla Nüve marka çalkalayıcı su banyosu kullanılmıştır.
- Dekatyonize şeker çözeltisinin hazırlanması sırasında katyon değiştirici reçine olarak: AG 50W- \times 8 100-200 mesh 'H⁺ form'; Biorad kullanılmıştır.

4.2 Uygulanan Metotlar

4.2.1 Organizma

Bu çalışmada yüksek verimde sitrik asit üreten *Aspergillus niger* ATCC 11414 suşu kullanılmıştır (Shu ve Johnson, 1947).

4.2.2 Katı Besi yeri Hazırlanması, Ekimi ve Saklama Koşulları

Katı besi yeri olarak %3' lük malt ekstresi ve %2' lik agar agar destile suda çözülür ve buharlı basınçla sterilize edilir. Kontamine olmaması için steril koşullarsa tüplere konur. Tüpler soğuma esnasında eğik tutulur. Bu şartlarda hazırlanan katı besi yerine saf kültür ekilir. 30 °C inkübatörde 3-4 gün tutulur. Yüzey tamamen sporlarla kaplanmış olur (*A.niger*' de siyah). Bu şekilde hazırlanan saf kültür (suş) +4 °C de 3 ay kadar saklanabilir. Daha uzun süre için kültürün yenilenmesi gerekir.

4.2.3 Spor çözeltisi, Ekim

4.2.2' de açıklandığı gibi hazırlanmış tüpün içine yaklaşık 3 ml %0.9' luk NaCl çözeltisi ilave edilir ve ekim iğnesi yardımıyla sporlar kazınarak çözeltiliye alınır. Bu şekilde hazırlanan spor çözeltisinden 0,5 ml alınır, hazırlanan sıvı besi yerine koyularak ekim işlemi tamamlanır.

4.2.4 Dekatyonize Şeker Çözeltisinin Hazırlanması

Bütün karbohidratların dekatyonize edilerek metal iyonlarının uzaklaştırılması gerektiği (yoksa sitrik asit üretimine müdahale ettiği) Kubicek ve Roehr (1977) tarafından gösterilmiştir.

%10 sakkaroz çözeltisi hazırlanır. 1 litrelik şeker çözeltisi için 50 gr. katyon değiştirici reçine kullanılır. Şeker çözeltisi reçine ile 10 dakika magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak muamele edilir. Sonra reçine rejenere edilmesi için 1 N HCl ile 10 dakika karıştırılır ve su ile 10 dakika karıştırılarak yıkanır. Yıkanan reçine yeniden şeker çözeltisine ilave edilir ve aynı işlem üç defa tekrarlandıktan sonra dekatyonize şeker çözeltisi hazırlanmış olur. 1N NaOH ile pH 7' ye ayarlanır ve 4 °C' de saklanır.

4.2.5 Fermantasyon Ortamı

Karbon Kaynağı

Sitoplazmanın esas maddeleri olan polisakkarit, lipit ve proteinlerin yapısındaki karbonun sağlanması için bütün mikroorganizmaların bir veya çeşitli karbon kaynaklarına gereksinimi vardır. Mikroorganizmalar karbon gereksinimlerini CO₂, karbonatlar veya çeşitli organik kaynaklardan sağlarlar (Bilgehan, 1999).

A. niger' da sitrat üretiminde çeşitli karbon kaynaklarının ve onların konsantrasyonlarının etkisi halen araştırılmaktadır. Maltoz, sakkaroz, mannoz ve fruktoz şekerleri karbon kaynakları olarak yazılma sırasına göre sitrik asit üretiminde yüksek verim vermektedir. En uygun verimler şeker konsantrasyonunun % 10'luk olduğu zaman gözlenmiştir. Glikozda bu değer %7,5' dir. %2,5' den daha az şeker içeren ortamlarda sitrik asit üretimi olmamıştır (Xu, 1989 vd.).

Azot kaynağı

Özellikle ototrof ve bir kısım heterotrof mikroorganizmalar tek azot kaynağı olarak amonyum tuzlarından yararlanabilme yeteneğindedirler. Azot, mikroorganizmaların proteinlerinin yapısına girdiği gibi özellikle nükleik asitlerin buna bağlı pürin ve pirimidinlerin, çeşitli enzimlerin yapısına girer (Bilgehan, 1999).

Mineraller

Mikroorganizmalar çeşitli yapı maddeleri ve enzimlerinin yapılarına göre çeşitli mineralleri gereksinirler. Bunlardan kükürt birçok organik madde ve enzimlerin yapısına girer. Organik

kükürt ve sülfat şeklini alır. Fosfor, nükleik asitlerin, ATP' nin ve bazı koenzimlerle flavinlerin yapısına girer. Hücre içerisine çoğu kez inorganik fosfat şeklinde alır. Bunlardan başka çeşitli enzimlerin aktivasyonunda rol oynayan Mg^{++} , Fe^{++} , K^+ , Cl^+ , Zn^{++} , Cu^{++} gibi iyonların ve daha başka eser miktardaki mineraller mikroorganizmaların beslenmesinde yer almaktadırlar (Bilgehan, 1999).

Sitrik asit üretimi için, Shu ve Johnson fermantasyon ortamı (Shu ve Johnson, 1948) kullanılmıştır.

1 litre sıvı besi yeri :

Sakkaroz	100 g	
KH_2PO_4	1 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g	
$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g	içermektedir.

Yukarıda belirtilen maddelere ilaveten;

Yüzey kültür yöntemi ile yapılan denemelerde aşağıda gösterildiği şekilde hazırlanmış iz element çözeltisi ilave edilir;

İz element çözeltisi 1 litresinde;

Zn^{++}	0,086 g	
Fe^{+++}	0,04 g	içermektedir.

Daha sonraki aşamada çalıştığımız derin kültür yönteminde sıvı besi yeri hazırlanırken iz element çözeltisinde literatüre göre bazı değişiklikler yapılmıştır.

Derin kültür yöntemi için hazırlanan iz element çözeltisinin 1 litresinde;

Cu^{+++}	0,06 μg	
Zn^{++}	0,25 mg	
Fe^{+++}	1,3 mg	içermektedir.

Ortamdaki hidrojen iyonları yoğunluğunun derecesi (pH) özellikle enzimatik etkinlikler için önem taşır. *A.niger*' de sitrik asit salgılanması pH değişiminden etkilenmektedir. Sitrik asit üretmek için ortamın pH' ı HCl ile 3.5' e ayarlanmıştır.

4.2.6 Fermantasyon Yöntemleri

4.2.6.1 Yüzey Kültür Yöntemi

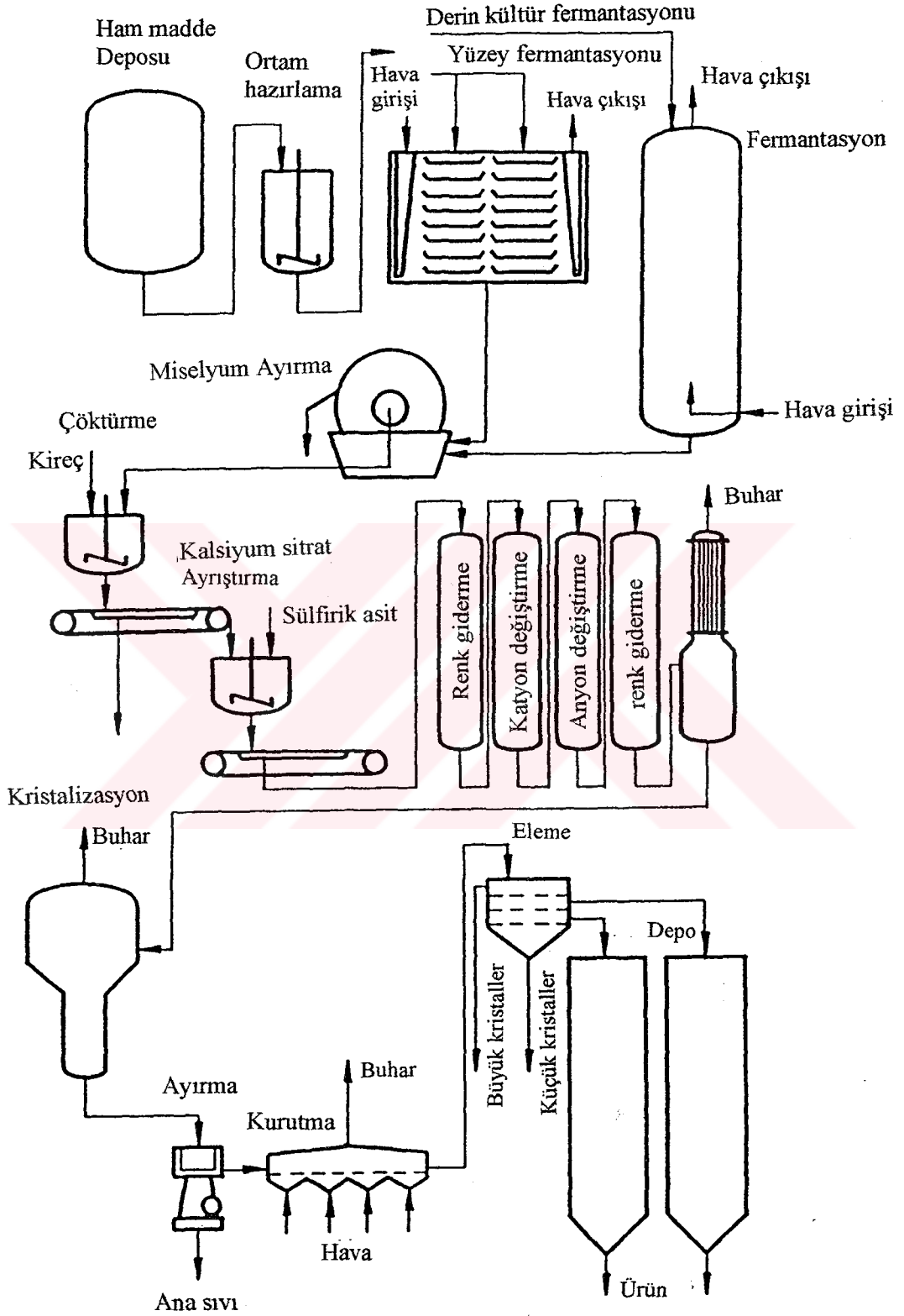
Sitrik asit üretimi için klasik bir yöntemdir. Kültür çözeltileri tepsilere tutulur ve mantar, misel (birbirine tutulmuş iplik şeklinde ince uzantıların oluşturduğu mantar gövdesi) şeklinde ortamın yüzeyinde gelişir. Bu, sıvı faz ile miselyum arasında daha fazla temas alanı sağlamaktadır ve hava destekleyici oksijen gerekmektedir. Sıvının derinlerine doğru konsantrasyon ve sıcaklık arttığından sıvı fazın karışması gerekmektedir. Sistem, sabit raflar üzerine dizilmiş çok sayıda tepsilere meydana gelmektedir. Tepsiler genellikle alüminyum veya özel paslanmaz çelikten yapılmaktadır. Tepsilerin boyutları 2 m x 2,5m x 0,25m ile 2,5m x 4m x 0,25m arasında değişmektedir ve kullanılabilen sıvı derinliği 0,1-0,18m arasındadır.

Fermantasyon odalarında özellikle sıcaklık ayarını yapan ayrıca oksijen sağlayan ve nem kontrolünü yapan etkili hava sirkülasyon sistemleri vardır (Şekil 4.1). Yüzey yönteminde şeker kaynağı olarak genellikle melas kullanılmaktadır.

Aşılama değişik yollarla yapılabilir. Gerekli miktardaki (100-150 mg/m³) *Conidia* süspansiyon veya kuru sporlar şeklinde hava akımı ile karıştırılıp sisteme verilir. Filizlenme için 1-2 gün gerekmektedir. Bu sürede sıcaklığın azalması sıcak nemli hava verilerek engellenebilir. Bu safhada ve soğutma safhalarında kirlenmeden kaçınmak çok önemlidir. Bu yüzden Messing ve Wamser (1975) bu safhada özel sterilize edilmiş bir hava kullanılmasını tavsiye etmektedir, asıl fermantasyon safhasında ise filtre edilmiş hava kullanılmalıdır (Roehr, 1996). Miselyum oluşumunun başlaması ile, sitrik asit üretimi de başlamakta ve pH değeri düşmektedir (<2), ve 6-8 gün içinde proses tamamlanmaktadır.

Pratikte uygulanması

Çalışmalarımız küçük çapta ve laboratuvar koşullarında olduğundan imkanlarımız dahilinde yüzey kültür yönteminde fermantasyon 1litrelik erlenlerde içinde yapılmıştır. 1 litrelik erlene 200 ml hazırlanan besi yeri konduktan sonra ekim yapıldı ve belli aralıklarla yüzeyde oluşan mantarı sarsmadan kültür sıvısından örnek alındı.



Şekil 4.1 Yüzey kültür yöntemi ve derin kültür yöntemi ile sitrik asit üretiminin akış şeması (Roehr, 1992).

4.2.6.2 Derin Kültür Yöntemi

Derin kültür yöntemi daha karışık teknolojilerden biri olmasına rağmen sitrik asit üretiminde kullanılması sürekli olarak çoğalmaktadır (Şekil 4.1). Yaklaşık olarak dünya sitrik asit üretiminin %80' i derin kültür fermantasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Daha yüksek verim eldesi, üretim ve işgücü maliyetinin düşük olması bu yöntemin tercih edilmesini sağlamaktadır.

Organizma özellikle Fe ve Mn gibi geçiş iz elementlerine aşırı derecede duyarlıdır (Clark vd., 1966). Fe iyonları için kritik konsantrasyon değeri 1 mg/L, Mn iyonları için ise 2 µg/L' dir (Snell ve Schweiger, 1949) (Roehr, 1996).

Sistemin havalandırmasının çok iyi olması gerekmektedir. Oksijen konsantrasyonu doyumununun %25' ten fazla olması gerekmektedir. Oksijen teminindeki kesintiler zararlı olabilir.

Pratikte uygulanması

Laboratuvarımızda fermantörümüz bulunmadığından çalışmamızı erlenlerde yürüttük. 250 ml lik erlenler içine 50 ml sıvı besi yeri konduktan sonra çalkalayıcılı su banyosunda belli bir ısıda (30 °C) ve hızda sürekli çalkalayarak oksijen miktarını belli bir düzeyde tutmaya çalıştık. Ortamın kontamine olmaması için erlenlerin üstü sterilize edilirken pamuk ile kapatıldı.

4.2.6.2.1 Yer Değiştirme (Replacement) Yöntemi

Aspergillus niger %1 sakkaroz içeren ön kültürasyon ortamında üretildikten sonra elde edilen misel, %14 şeker içeren yeni ortama transfer edilirse sitrat birikiminin arttığı görülmüştür. Bu fermantasyon yöntemi maltoz, sakkaroz, glikoz mannoz, fruktoz ve hatta normal fermantasyonla sitrik asit birikimi görülmeyen gliserol gibi şekerlere uygulansa bile sitrik asit birikiminde artışa neden olmaktadır (Xu, 1989a; Hossain, 1984).

%2' den daha düşük konsantrasyonlarda sakkaroz içeren ortamlarda sitrik asit birikimi olmaz. Bu nedenle %1 fermantasyon ortamında sadece misel oluşumu sağlanır. Bu ön kültürasyon ortamında üretilen misel yüksek sakkaroz içeren ortamlara transfer edilirse sitrik asit birikiminin arttığı gözlenir. İnkübasyon çalkalayıcılı su banyosunda 30 °C de yapılmaktadır.

Pratikte uygulanması

%1 Sakkaroz içeren ön kültürasyon ortamında (pH 3.5) 48 saat inkübe edilen misel steril ortamda filtrasyonla alınarak önceden hazırlanmış sterilize edilmiş yüksek konsantrasyonda sakkaroz içeren (%5-10) yeni ortama (pH 2.0) transfer edilir.

4.2.7 Sitrik asidin tayini

4.2.7.1 Titrasyon Yöntemi

Kültür sıvısı içindeki toplam asit miktarının saptanması için kültür sıvısından alınan örnekler fenol ftalein indikatörlüğünde 1 N NaOH ile titre edilir.

10 ml kültür sıvısı içine birkaç damla fenol ftalein damlatılır ve pembe renk dönüşümü görülünceye kadar 1 N NaOH eklenmeye devam edilir. Bulunan NaOH sarfiyatından aşağıdaki formül kullanılarak asit miktarı belirlenir.

$$C = \frac{S - 0,3}{0,14} \text{ [g/l]} \quad (4.1)$$

C = Asit konsantrasyonu (g/l)

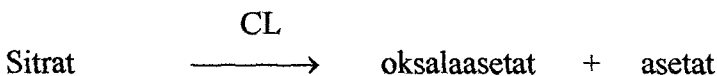
S = NaOH sarfiyatı

4.2.7.2 Enzimatik Yöntem

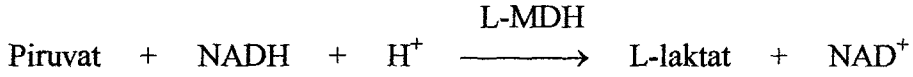
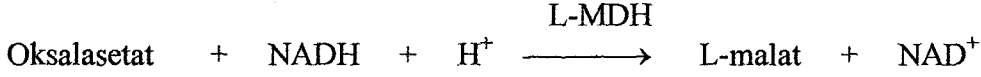
Kültür sıvısı içindeki sitrik asit miktarı, sitrik asit tayin kiti (Boehringer, Mannheim, Almanya) kullanılarak enzimatik analiz (Dagley, 1974) ile kesin olarak bulunur. Bu yöntem son derece spesifik, hassas ve kesin sonuç vermektedir.

Prensibi

Bu metodun prensibi sitrat liyaz enziminin (CL) reaksiyonu katalizlemesi ile sitrik asidin oksalaasetat ve asetat'a dönüştürülmesidir.



L-malat dehidrogenaz (L-MDH) enzimi oksalasetat' ı NADH yardımı ile L-Malata, L-laktat dehidrogenaz da oksalasetat' ın dekarboksilasyon ürünü piruvat' ı yine NADH yardımıyla L-Laktat' a dönüştürür.



Bu reaksiyonlarda okside edilmiş NADH' ın miktarı stoikometrik olarak ortamda bulunan sitrat' ın miktarına eşittir. NADH' ı saptadığımızdan dolayı onun absorbansı olan 340 nm de ölçüm yapılır.

Prosedür:

Örnek çözeltisi temiz ve pH' ı nötral olmalıdır. İlk olarak kültür sıvısı santrifüj edilerek katı safsızlıklar uzaklaştırılır, 1N NaOH eklenerek pH 7-8 arasına ayarlanır. Örnek daha sonra sitrik asit konsantrasyonu 0,04-0,4 g/l arasında olacak şekilde seyreltilir.

Seyreltme, absorbans farkının (ΔA) 1,00' dan büyük olduğu durumlarda yapılır. Örnek çözeltisine seyreltme çizelge 4.1' e göre yapılır.

Çizelge 4.1 Seyreltme tablosu.

Örneğin litresinde bulunan tahmini sitrik asit miktarı	Su ile Seyreltme	Seyreltme Faktörü (F)
0,4 g	-	1
0,4-4,0 g	1 + 9	10
4,0 - 40 g	1 + 99	100
40 g	1 + 999	1000

Bütün enzimatik denemeler 1cm' lik kuvars küvetlerde 340 nm' de ölçülür. Ölçüm işlemi çizelge 4.2 de gösterildiği şekilde gerçekleştirilir.

Çizelge 4.2 Enzimatik yöntemle ölçüm tablosu.

Küvetlere koyulan	Blank	Örnek	Standart
Çözelti 1	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Örnek çözeltisi	-	0,20 ml	-
Standart çözelti	-	-	0,20 ml
Distile Su	2,00 ml	1,80 ml	1,80 ml
Karışıma, çözelti 1 eklendikten yaklaşık 5 dakika sonra absorbanslar ölçülür (A1) ve aşağıdakiler eklenerek yeni reaksiyon başlatılır.			
Çözelti 2	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
Karışıma, çözelti 2 eklendikten yaklaşık 5 dakika sonra reaksiyon biter, absorbanslar ölçülür (A2).			

Hesaplamalar

Absorbans farkları ($A_1 - A_2$) hem blank hem de örnek için hesaplanır, Örneğin absorbans farkından blank'ın absorbans farkı çıkartılır.

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{örnek}} - (A_1 - A_2)_{\text{blank}} \quad (4.2)$$

Konsantrasyon 4.3 kullanılarak hesaplanır;

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad [\text{g/l}] \quad (4.3)$$

V = son hacim [ml]

v = örnek hacmi [ml]

MW = ölçülen maddenin Molekül ağırlığı [g/mol]

d = ışın yolu [cm]

ϵ = NADH için batma (extinction) katsayısı 340 nm' de = 6,3 [$l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

4.3' de değerler yerine koyulduğunda řu şekli alır.

$$C = \frac{3,020 \times 192.1}{6,3 \times 1,00 \times 0,200 \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]} = 0,46 \times \Delta A \quad (4.4)$$

Eğer 6rnek seyreltilmişse bu denklemin seyreltme fakt6r6 ile 7arpılması gerekir;

$$C = 0,46 \times \Delta A \times F \text{ [g/l]} \quad (4.5)$$

4.4, 4.5 şeklini alır ve hesaplamalarda kullanılır.

4.2.8 Sterilizasyon

Mikroorganizmalarla 7alışılırken en 6nem kazanan konulardan biri de sterilizasyondur. Hazırlanan besi yerleri, kullanılan aletler ve cam eşyanın steril olması kadar 7alışma esnasında da ortamın steril olmasına 7alışılarak kontaminasyonun engellenmesi gerekir.

Sıvı besi yerlerinin buharlı basın7la yani otoklavlarda sterilize edilmesi zorunludur. B6l6m6m6zde otoklavın bulunmaması ve maddi imkansızlıklar nedeniyle projeden alınan bir d6d6kl6 tencere ile basın7lı buharla sterilizasyon sağlanmaya 7alışılmıştır.

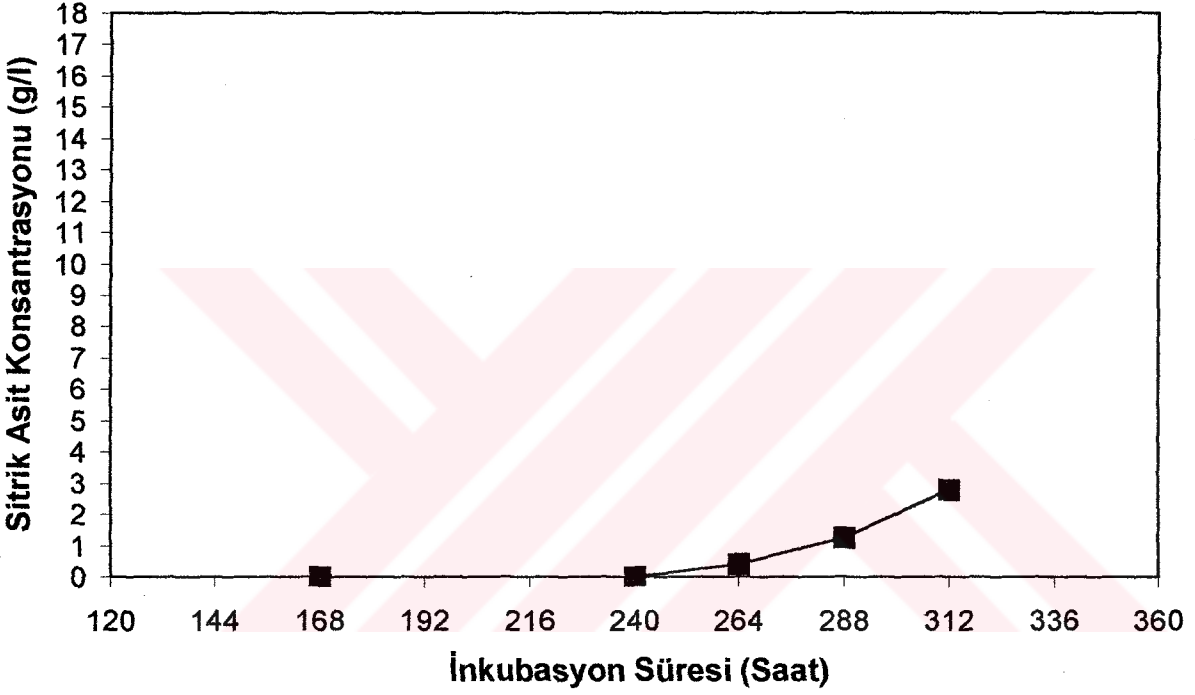
Normalde 121 °C ve 1,2 atmosfer basın7ta 15 dakika tutulması gereken sıvı besi yeri d6d6kl6 tencerede yaklaşık 120 °C olduğu bilinen basın7ta ortalama 30 dakika tutularak içi sterilizasyon tamamlanmıştır. Ayrıca sterilizasyonun kontrol6n6 sağlayan bantlardan da yararlandık.

Cam eşyaların sterilizasyonu ise (erlen, pipet vb.) 110 °C ye getirilmiş et6vde bir gece tutularak sağlandı.

5. SONUÇLAR

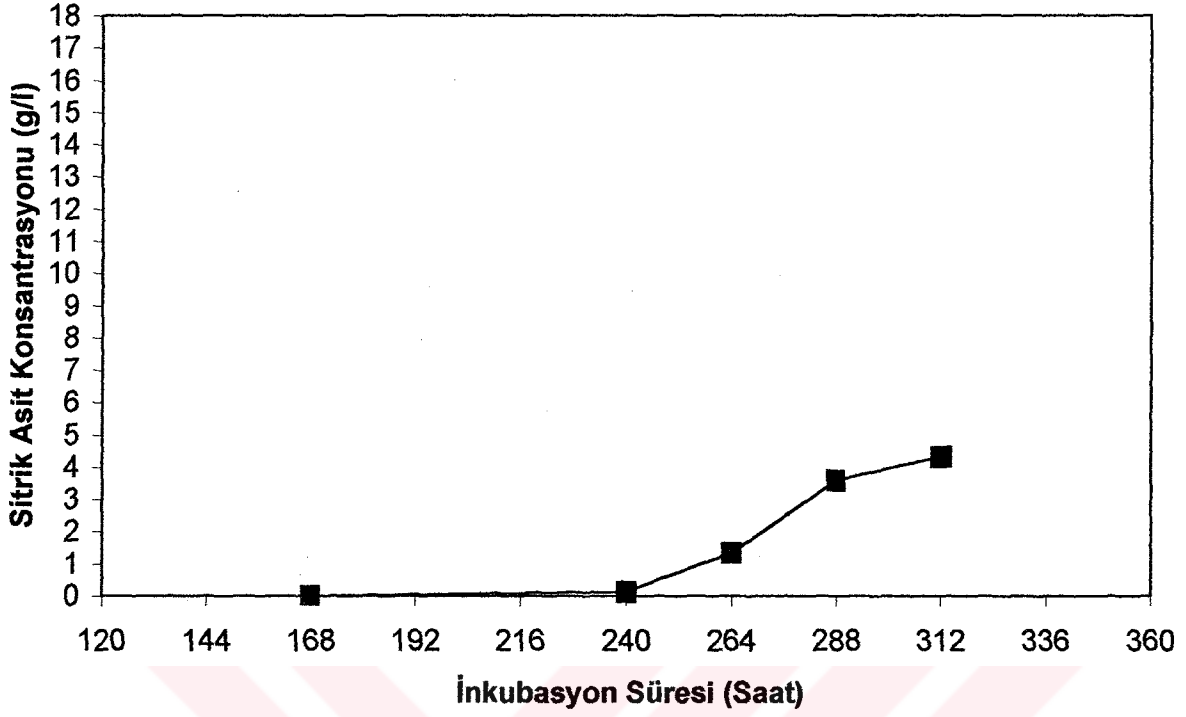
Materyal ve metod (4.2.5-4.2.6)' da anlatıldığı şekilde fermantasyon ortamları hazırlanarak yapılan bir seri denemelerde 24 saat aralıklarla örnekler alınmış, elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak grafikler çizilmiştir.

5.1 Yüzey kültür yöntemiyle alınan sonuçlar



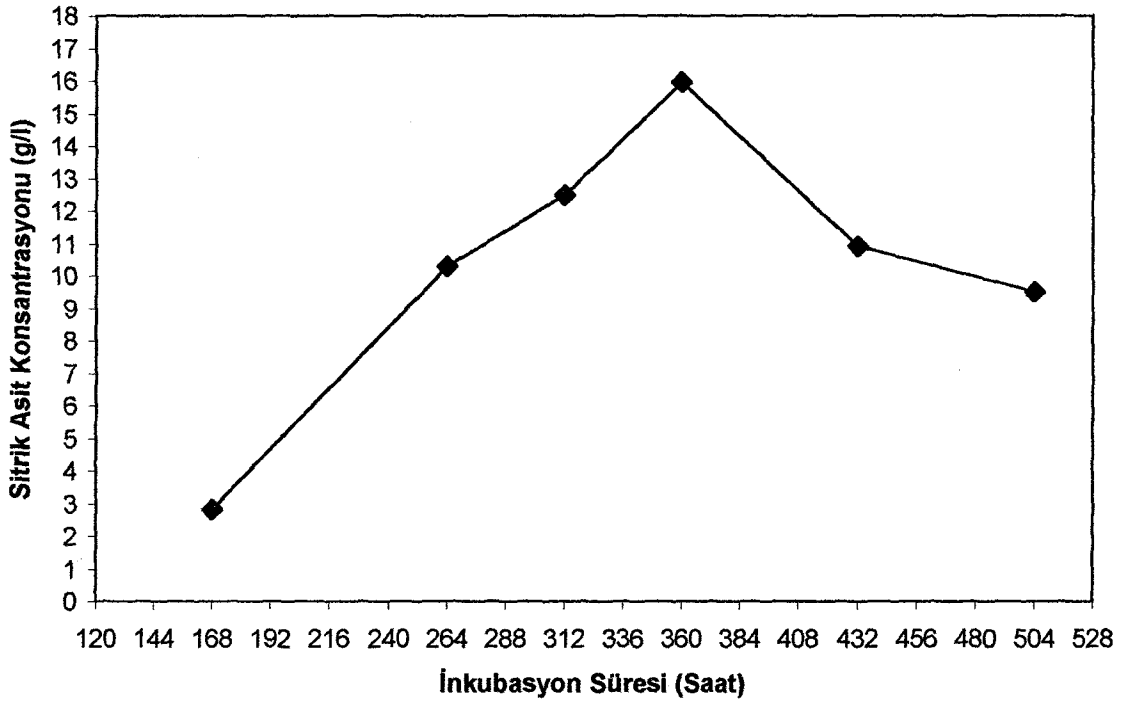
Şekil 5.1 %5 sakkaroz içeren yüzey fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

Sitrik asit üretiminin 240. saatte artmaya başladığı görülmüş. 264. saatte çok az bir miktar sitrik asit oluşmuştur.



Şekil 5.2 %5 sakkaroz' a ilaveten %1 mannitol içeren yüzey fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

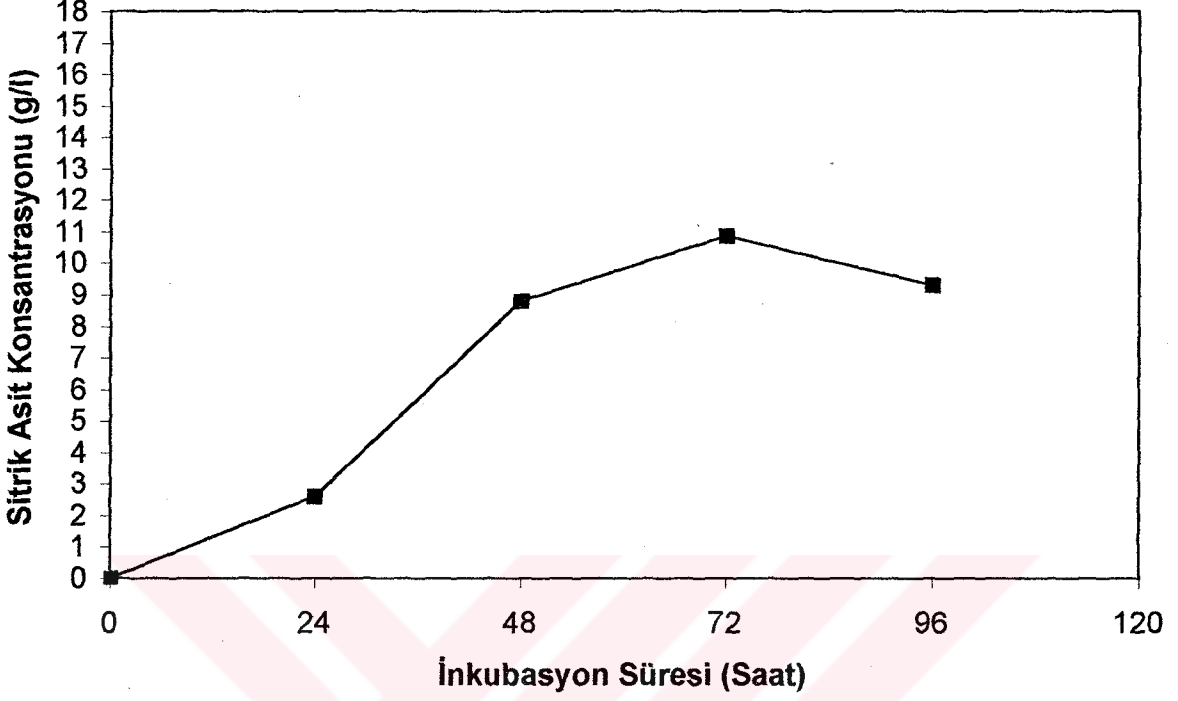
Sitrik asit üretiminin 240. saatte artmaya başlamış, %1 mannitol ilavesi verimi esas olarak verim 264., saatten sonra arttırdığı görülmüştür.



Şekil 5.3 %5 sakkaroz' a ilaveten %4 mannitol içeren yüzey fermantasyon ortamında *A.niger*' ın büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

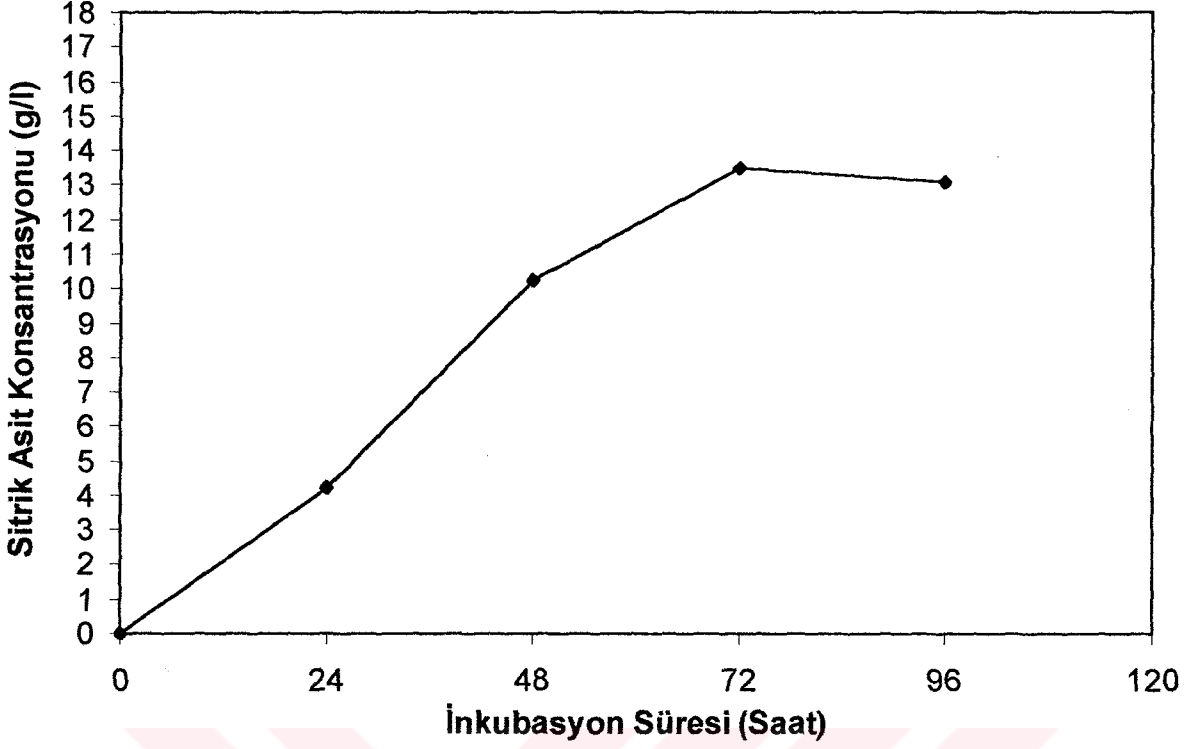
Ortama ilave edilen mannitol miktarı arttıkça sitrik asit birikiminin 168. saatten önce başladığı, daha sonra hızla arttığı ve 360. saatten sonra düşmeye başladığı gözlenmiştir.

5.2 Derin kültür yöntemiyle alınan sonuçlar



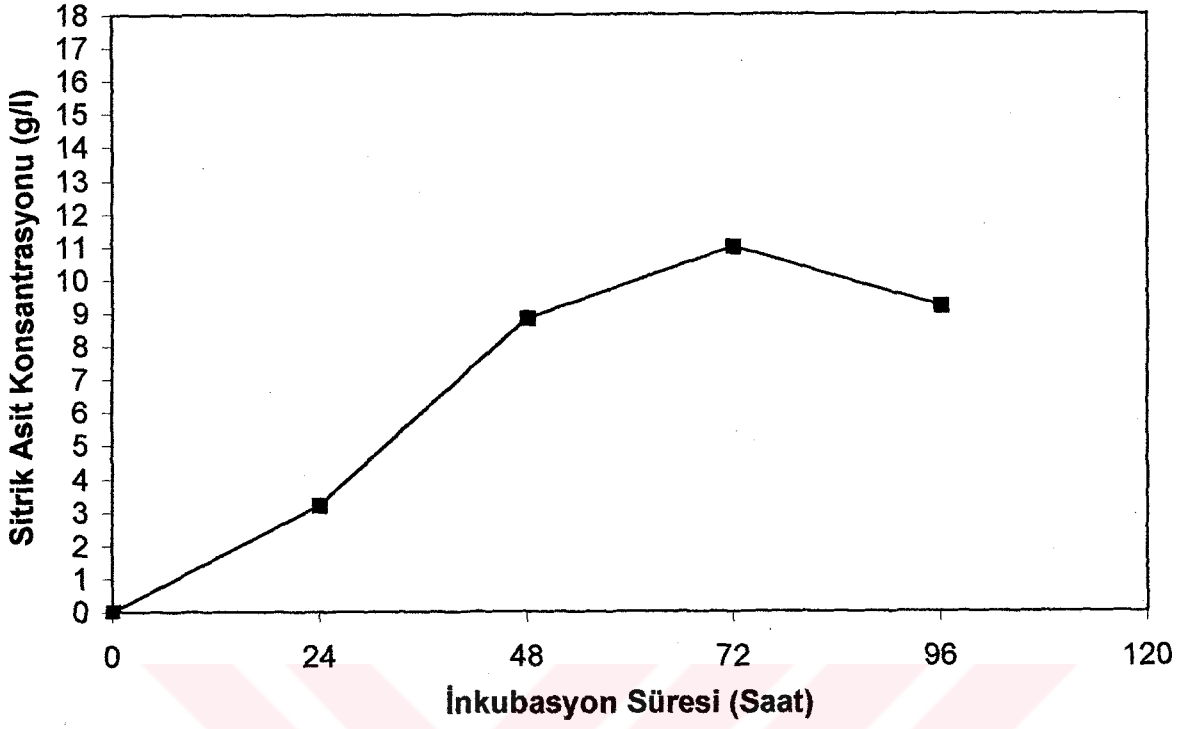
Şekil 5.4 %10 Sakkaroz içeren derin kültür fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

Sitrik asit üretiminin 72.saatte maksimum değere ulaştığı, daha sonra azalmaya başladığı görülmüş, bu saatten sonra deney bitirilmiştir. Bu yöntemle yüzey kültür yöntemine göre çok daha kısa süre içinde ve çok daha fazla miktarda sitrik asit birikiminin olduğu görülmüştür.



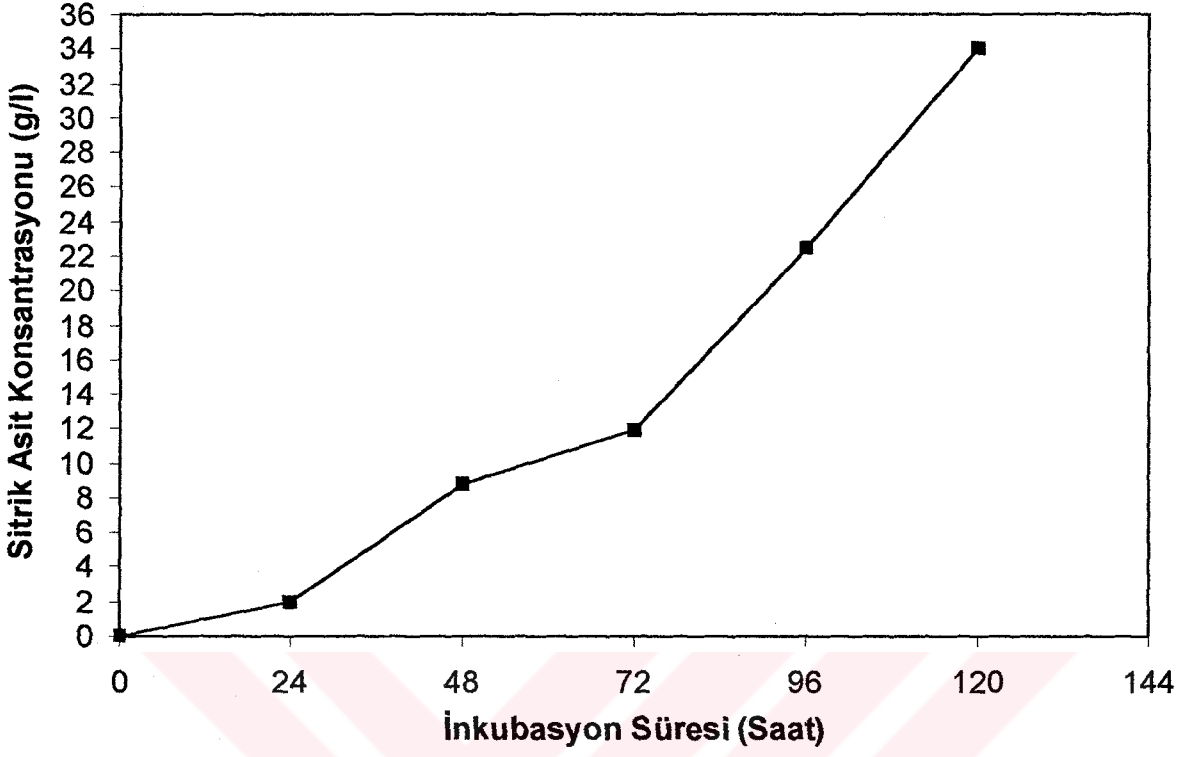
Şekil 5.5 %10 sakkaroz' a ilaveten %1 mannitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında *A.niger*' ın büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

Mannitol ilavesinin sitrik asit üretiminin verimini arttırdığı görülmüştür. 72. saatten sonra sitrik asit üretimi maksimum değerine ulaşmış ve sonra azalmaya başlamıştır. Sadece %10 sakkaroz içeren ortama nazaran daha az bir düşüş gözlenmiştir.



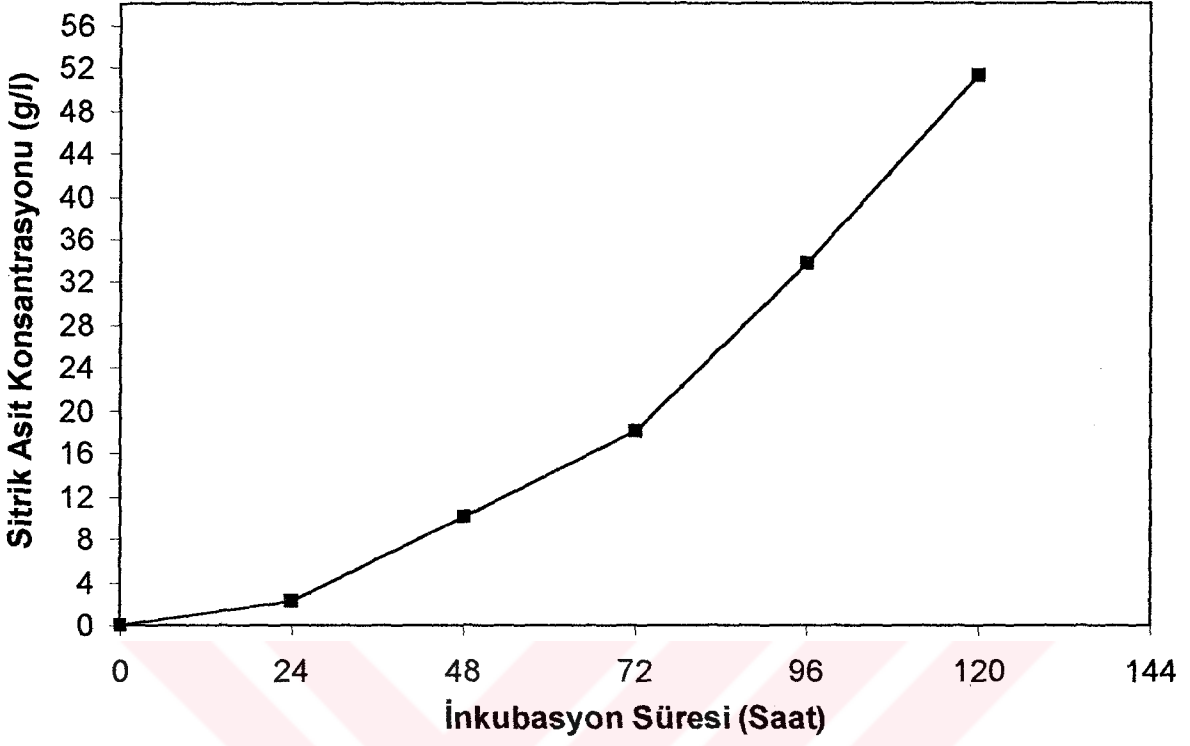
Şekil 5.6 %10 sakkaroz' a ilaveten %1 xylitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

Xylitol' ün, sitrik asit veriminde herhangi bir değişiklik yapmadığı görülmüştür.



Şekil 5.7 %10 sakkaroz' a ilaveten %1 sorbitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

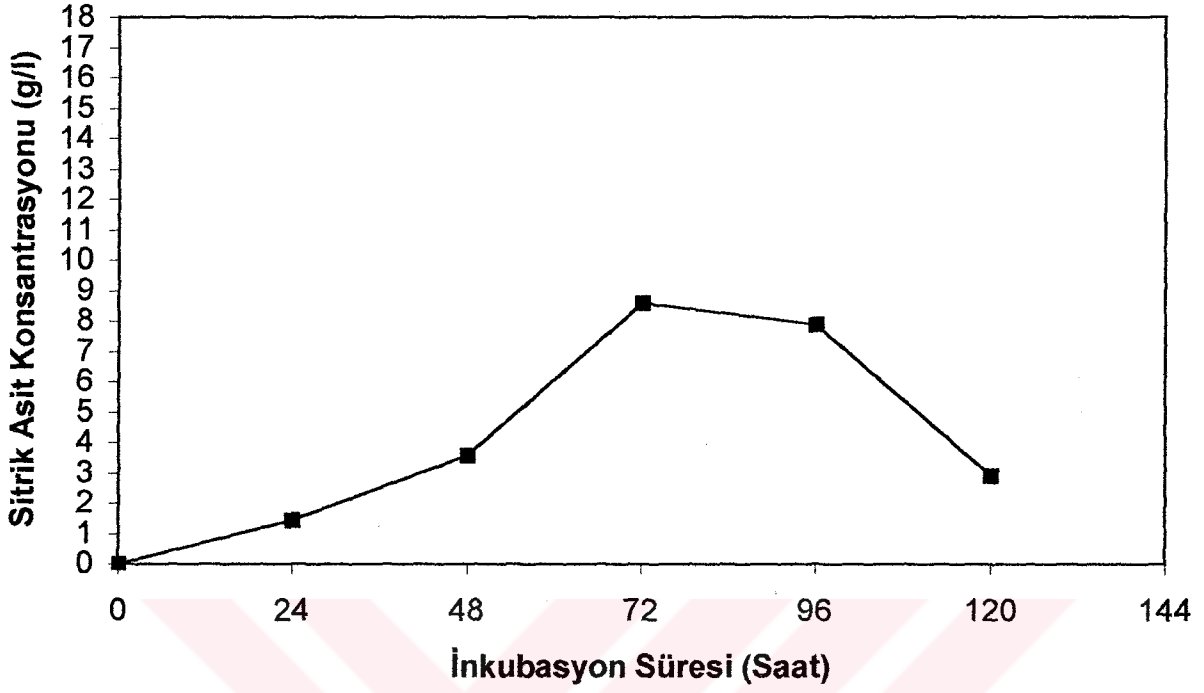
%1 sorbitol eklendiğinde sitrik asit birikiminde 96. saatten sonra düşme görülmediği tersine daha da artarak devam ettiği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.8 %10 sakkaroz' a ilaveten %1 sorbitol içeren derin kültür fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

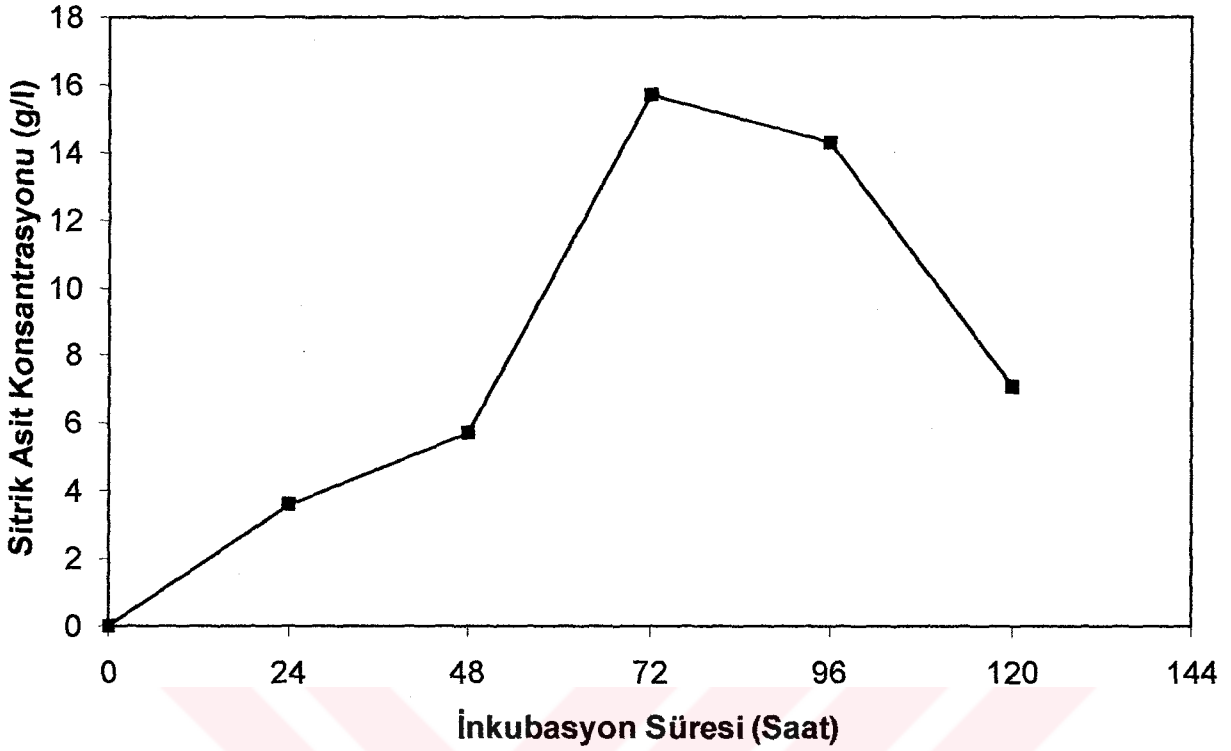
% 4 Sorbitol ilavesinde de sitrik asit üretiminin verimindeki artışın devam ettiği görülmüştür.

5.3 Yer değiştirme yöntemiyle alınan sonuçlar



şekil 5.9 %5 sakkaroz içeren yer değiştirme yöntemiyle yapılan derin kültür fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

Yer değiştirme yönteminde %5 sakkaroz, tek şeker kaynağı olarak kullanılsa bile sitrik asit birikiminde yüksek değerler elde edilmiştir.



Şekil 5.10 %10 sakkaroz içeren yer değiştirme yöntemiyle yapılan derin kültür fermantasyon ortamında *A.niger*' in büyümesi esnasında sitrik asit konsantrasyonu (g/l) değişimi.

Direkt derin kültür yöntemine göre daha yüksek verimde sitrik asit elde edilmiştir. Fakat ekonomik olmaması ve endüstride uygulanmasının zor olması nedeniyle bazı poliollerin sitrik asit verimini arttırmadaki rolünü incelerken direkt kültür yönteminin kullanılması uygun görülmüştür.

6. TARTIŞMA

Endüstride yaygın olarak kullanılan küf mantarı *Aspergillus niger*, yüzyılımızın başlarından beri araştırma konusu olmuştur. Yapılan ilk araştırmalar doğrudan sitrik asit verimini arttırmaya yönelik olmuştur (Hossain, 1984). Sitrik asit birikiminin biyokimyasının araştırılması çalışmaların yönünü değiştirmiştir. Sitrik asit çevrimindeki enzimlerin düzenleyici etkilerini araştırmak çok uzun yıllar sürmüştür (Kubicek, 1980). İz elementlerin etkilerini, örneğin üreme için gerekli olan Mn' in sitrat birikimine olan olumsuz etkisi incelenmiş (Kubicek, 1977), oksijen ve pH gibi dış etkilerin önemi anlaşılmıştır (Roehr, 1983). Son yıllarda genetik mühendisliği çerçevesinde yapılan araştırmalar (Panneman, 1996) sitrik asit verimini arttırmada yeterli olmamıştır. Son yıllarda *A.niger*' in hücre içi metabolitlerinin konsantrasyonları yeniden gözden geçirilmektedir.

Legisa ve arkadaşları (1986), gliserol' ün sitrat birikimine inhibe edici etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalar, izositrat dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine gliserol' ün etkisinin olmadığını, bu enzimin sitrat tarafından inhibe edildiğini ispatlamıştır (Arısan-Ataç, 1996). Buna dayanarak diğer poliollerin sitrik asit verimine etkileri incelenmek istenmiştir. Bu çalışmada endüstride kullanılan yüzey fermantasyonu yöntemi ile oksijenin katkısının da göz önüne alındığı derin kültür yöntemi karşılaştırılmıştır. Derin kültür yöntemi, direkt derin kültür ve yer değiştirme yöntemlerinin tümü kullanılarak uygulanmıştır. Yer değiştirme yönteminin ekonomik olmadığı ve endüstriye uygulanmasının zor olduğu için direkt derin kültür yöntemi seçilmiştir.

Bu çalışmada sitrik asit verimi üzerine bazı poliollerin etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, mannitol, xylitol ve sorbitol içeren fermantasyon ortamları kullanılmıştır. Mannitol ve sorbitol' ün sitrik asit üretiminin verimini arttırdığı bulunmuştur. Xylitol' ün ise etkisi saptanmamıştır.

Direkt derin kültür yönteminde mannitol, ilk 72 saat içinde verimi arttırmış daha sonra inkübasyon zamanlarında verimde azalma gözlenmiştir. Sorbitol' ün verim üzerine etkisi ise daha ileri inkübasyon zamanlarında da artarak devam etmiştir.

Yüzey kültür yöntemi ile yapılan çalışmalar daha uzun zaman almış, inkübasyon zamanı 20-30 güne kadar devam etmiş ve az verimde sitrik asit elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Arısan-Ataç, İ. ve Kubicek, C. P., (1996), "Glycerol is not an inhibitor of mitochondrial citrate oxidation in *Aspergillus niger*", *Microbiology UK*, 142: 2937-2942.
- Arısan-Ataç, İ., Wolschek, M. ve Kubicek, C. P., (1996), "Trehalose-6-phosphate synthase A effects citrate accumulation by *Aspergillus niger* under conditions of high glycolytic flux, *FEMS Microbiology Letters*, 140: 77-83.
- Arts, E., Kubicek, C. Ve Roehr, M., (1987), "Regulation of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*: effect of fructose-2,6-bisphosphate on the action of citrate, ammonium ions and AMP", *Journal of General Microbiology*, 133: 1195-1199.
- Bercovitz, A., Peleg, Y., Battat, E., Rokem, J., S., ve Goldberg, I., (1990), "Localisation of pyruvate carboxylase in organic acid producing *Aspergillus* strains", *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1594-1597.
- Bilgehan, H., (1999), *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*, Barış Yayınları, 9. Baskı, 72-73, İzmir.
- Cleland, W. W. ve Johnson, M. J., (1954), "Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*", *Journal of Biological Chemistry*, 208: 679-692.
- Dagley, S., (1974), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., ed.), Vol. 3, 1607-1611. Verlag Chemie, Weinheim.
- Dawson, D. W., Maddox, I. S. ve Brooks, J. D. (1988), "Effect of interruptions to the air supply on citric acid production by *Aspergillus niger*", *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 37-40.
- Foster, J. W., (1949), *Chemical Activities of Fungi*, Academic Press, London.
- Gradisnik-Grapulic, M. ve Legisa, M., (1996), "Comparison of specific metabolic characteristics playing a role in citric acid excretion between some strains of the genus *Aspergillus*", *Journal of Biotechnology*, 45: 265-270.
- Habison, A., Kubicek, C. P. ve Roehr M., (1979), "Phosphofructokinase as a regulatory enzyme in citric acid accumulating *Aspergillus niger*" *FEMS Microbiology Letters*, 5: 39-42.
- Habison, A., Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1983), "Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*", *Biochemical Journal*, 209: 669-676.
- Harmsen, H., Kubicek-Pranz, E. M., Visser, J., Roehr, M. ve Kubicek, C. P., (1992), "Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase from the citric acid producing fungus *Aspergillus niger*" *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37: 784-787.
- Hossain, M., Brooks, J. D. ve Maddox, I. S., (1984), "The effect of sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19: 383-391.
- Kubicek, C. P., (1988), "The role of the citric acid cycle in fungal organic acid fermentations", *Biochemical Society Symposia*, 54: 113-126.
- Kubicek, C. P., Hampel, W. A. ve Roehr, M., (1979a), "Manganese deficiency leads to elevated amino acid pools in citric acid accumulating *Aspergillus niger*", *Archives of Microbiology*, 123: 73-79.

Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1977), "Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*", *European Journal Applied Microbiology*, 4: 167-175.

Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1980), "Regulation of citrate synthase from the citric acid producing fungus *Aspergillus niger*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 615: 449-457.

Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1985), "Aconitase and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*", *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 1336-1338.

Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1986), "Citric acid fermentation", *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 3: 331-373.

Kubicek, C. P., Schreferl-Kunar, G., Wöhrer, W. ve Roehr, M., (1988), "Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*", *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 633-637.

Kubicek, C. P., Zehentgruber, O., El-Kalak, H. ve Roehr, M., (1980), "Regulation of citric acid production by oxygen: effects of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*", *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9: 101-116.

Kubicek, C. P., Zehentgruber, O. ve Roehr, M., (1979b), "An indirect method for studying fine control of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*", *Biotechnology Letters*, 1: 47-52.

Kubicek-Pranz, E. M., Mozelt, M., Roehr, M. And Kubicek C. P., (1990) "Changes in the concentration of fructose-2,6-biphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1033: 250-255.

Legisa, M. ve Bencina, M., (1994), "Evidence for the activation of 6-phosphofructo-1-kinase by cAMP-dependent protein kinase in *Aspergillus niger*", *FEMS Microbiology Letters*, 118: 327-334.

Legisa, M. ve Gradisnik-Grpulic, M., (1995), "Sudden substrate dilution induces a higher rate of citric acid production by *Aspergillus niger*", *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2732-2737.

Legisa, M. ve Kidric, J., (1989), "Initiation of citric acid accumulation in the early stages of *Aspergillus niger* growth", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 453-457.

Legisa, M., ve Matthey, M., (1986), "Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*", *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 607-609.

Legisa, M., ve Matthey, M., (1988), "Citrate regulation of the change in carbohydrate degradation during the initial phase of citric acid production by *Aspergillus niger*", *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 33-36.

Matthey, M., (1977), "Citrate regulation of citric acid production by *Aspergillus niger*" *FEMS Microbiology letters*, 2: 71-74.

Matthey, M. (1992), "The production of organic acids", *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 12: 87-132.

Mattey, M. Ve Kristiansen, B., (1999), A brief introduction to citric acid biotechnology: Citric acid biotechnology (Kristiansen, B., Mattey, M. And Linden, J., eds.), Taylor & Francis, London, 1-9

Mattey, M., Legisa, M. ve Lowe, S., (1988), "Effect of lectins and inhibitors on membrane transport in *Aspergillus niger*", *Biochemical Society Transactions*, 16: 969-970.

Meixner, O., Mischak, H., Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1985), "Effects of manganese deficiency on plasma membrane lipid composition ve glucose uptake in *Aspergillus niger*", *FEMS Microbiology Letters*, 26: 271-274.

Meixner-Monori, B., Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1984), "Pyruvate kinase from *Aspergillus niger*: a regulatory enzyme in glycolysis?", *Canadian journal of Microbiology*, 30: 16-22.

Meixner-Monori, B., Kubicek, C. P., Habison, A., Kubicek-Pranz, E. M. ve Roehr, M., (1985), "Presence and regulations of the α -ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex in the filamentous fungus *Aspergillus niger*", *Journal of Bacteriology*, 161: 265-271.

Meixner-Monori, B., Kubicek, C. P., Harrer, W., Schrefler, G. ve Roehr, M., (1986), "NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*", *Biochemical Journal*, 236: 549-557.

Netik, A., Torres, T. V., Riol, J. ve Kubicek, C. P., (1997), "Uptake and secretion of citric acid by *Aspergillus niger* is reciprocally regulated by manganese ions", *Biochimica et Biophysica Acta*. 1326: 287-294.

Panneman, H., Ruijter, G. J., Van Den Broeck, H. C., Driever, E. T. M. Ve Visser, J., (1996), "Cloning and biochemical characterisation of an *Aspergillus niger* glukokinase", *European Journal of Biochemistry*, 240: 518-525.

Roehr, M., Kubicek, C. P., (1981), "Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*", *Process Biochemistry*, 16: 34-37.

Roehr, M., Kubicek, C. P. ve Kominek, J., (1983), Citric acid, In: *Biotechnology*, Vol. 3., H. J. Rehm ve G. Reed, Verlag Chemie, Weinheim, 331-373.

Roehr, M., Kubicek, C. P., Zehentgruber, O. ve Orthofer, R., (1987), "Accumulation and partial re-consumption of polyols during citric acid fermentation by *Aspergillus niger*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27: 235-239.

Roehr, M., Kominek, J. ve Kubicek, C. P., (1992), Industrial acids and other small molecules. In *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*, J. W. Bennett and M. A. Klich (Butterworth-Heinemann), 91-131.

Roehr, M., Kubicek, C. P. ve Kominek, J., (1996), Citric acid, in *Biotechnology*, 2. edition, Eds H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler ve P. Stadler, Vol. 6, Ed, M. Roehr (Verlag Chemie, Weinheim), 307-345.

Ruijter, G. J., ve Visser, J., (1996), "Determination of intermediary metabolites in *Aspergillus niger*", *Journal of Microbial Methods*, 25: 295-302.

Schrefler, G., Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1986) "Inhibition of citric acid accumulation by manganese ions in *Aspergillus niger* mutants with reduced citrate control of phosphofructokinase", *Journal of Bacteriology*, 165: 1019-1022.

Shu, P. ve Johnson, M. J., (1948a), "Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*", *Industrial and Engineering Chemistry*, 40: 1202-1205.

Shu, P. ve Johnson, M. J., (1948b), "The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation", *Journal of Bacteriology*, 54: 161-167.

Steinböck, F., Held, I., Choojun, S., Roehr, M., ve Kubicek, C. P., (1994), "Characterization and regulatory properties of a single hexokinase from citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1200: 215-223.

Torres, N., Riol-Cimas, J. M., Wolschek, M. ve Kubicek, C. P., (1996a), "Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 790-794.

Wolschek, M. Ve Kubicek, C. P., (1997), "The filamentous fungus *Aspergillus niger* contains two 'differentially regulated' trehalose-6-phosphate synthase-encoding genes (tpSA, tpsB)", *Journal of Biotechnology, Chemistry*, 272: 2729-2735

Xu, D.-B., Madrid, C. P., Roehr, M. ve Kubicek, C. P., (1989a), "Influence of type and concentration of the carbon source on citric acid production by *Aspergillus niger*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 553-558.

Xu, D.-B., Roehr, M. ve Kubicek, C. P., (1989b), "*Aspergillus niger* cyclic AMP levels are not influenced by manganese deficiency and do not correlate with citric acid accumulation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 553-558.

Zehentgruber, O., Kubicek, C. P. ve Roehr, M., (1980), "Alternative respiration of *Aspergillus niger*", *FEMS Microbiology Letters*, 8: 71-74.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	08.06.1975	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1990-1993	Ataköy Lisesi, İstanbul
Lisans	1993-1997	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Kimya bölümü. İstanbul
Yüksek Lisans	1997-2001	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Ens. Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Prog.
Çalıştığı Kurumlar	2000-2001	Atasay Kuyumculuk, İfraz Bölümü Sorumlusu, Yeni Bosna, İstanbul

