

ŞEKER PANCARI MELASINDAN ASPERGİLLUS NIGER KULLANILARAK SİTRİK ASİT FERMENTASYONU

Ahmet Balamir *

(Dergiye geliş tarihi : 2 Temmuz 1976)

ÖZET

Ankara Şeker Fabrikası melası, yüzey kültürü metodu ile fermente edilerek sitrik asidi üretimine uygunluğu araştırıldı. Havadan A. Niger küf'ünün orjinal suşları elde edildi ve en yüksek verimi veren suş saptandı. $K_4Fe(CN)_6$ ile muamele edilmiş ve edilmemiş ortamda sitrik asit fermentasyonu verim bakımından karşılaştırıldı ve arada çok büyük bir fark gözlemlendi. Titrimetrik ve kolorimetrik sitrik asit tayinlerinin eşit sonuçlar vermesi kullanılan suşun saf olduğunu gösterdi. Ferro, magnezyum, fosfat, nitrat iyonlarının ve aerasyonun fermentasyona etkisi araştırıldı. Bu inorganik iyonların hiçbirinin sporulasyona etkili olmadığı gözlemlendi. Sporulasyonla ferrosiyanyür konsantrasyonu arasındaki ilişki tartışıldı. 11 Günlük fermentasyon sonucu % 69.2 şeker dönüşümü ve harcanan şekere göre % 93.5 sitrik asit oluşumu sağlandı.

SUMMARY

The molasses produced by Ankara Sugar Factory is utilized as the raw material. Original strains of *Aspergillus Niger* are isolated from air and are used in surface culture method of citric acid fermentation. The effects of varying concentrations of iron, magnesium, phosphate, nitrate and of aeration on fermentation are examined. The relationship between sporulation and potassium ferrocyanide concentration is discussed. A sugar conversion of 69.2 % and a citric acid yield of 93.5 % on the basis of sugar consumed was attained in eleven days.

Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Araştırma Bölümü Asistanı

GİRİŞ :

Şeker fabrikalarında sakkaroz elde edilişi sırasında, şekerin kristallenmesini önleyen bazı maddeler ortamda giderek artar ve sonuçta, içinden, ekonomik yollarla daha fazla şeker elde edilemeyen ve yaklaşık % 50 sakkaroz bulunduran viskoz, kahverengi bir sıvı kalır. Şeker fabrikasının bu en önemli yan ürününe «Melas» adı verilir (1, 2, 8, 12).

Melas esas olarak etil alkol fabrikalarında, şekerden alkol elde edilmesinde kullanılır. Ayrıca hayvan yemi olarak ta önemli oranda tüketilir. Bunların yanı sıra melas fermente edilerek; bütil alkol, aseton, sirke, gliserin ve sitrik, laktik, glukonik, okzalik, itakonik, akonitik asit gibi önemli organik asitlerin eldesinde kullanılmaktadır.

Bu asitler içinde sanayide en fazla tüketilen sitrik asittir. Sitrik asit esas olarak alkolsüz içki yapımında kullanılır.

Türkiye'de melasın önemli bir kısmı 1971 yılına kadar çokdüşük fiatla ihraç edilmekteydi. Bu oran 1970 te % 15, 1971 de ise % 22 di. (18, 19). Bugün ise dışarı satılan melasın bir bölümü Fermentasyon Ürünleri Sanayii (FÜRSAN) tarafından işlenmektedir.

Sitrik asit önceleri Akdeniz Ülkelerinde limon ve ananastan elde edilmekteydi. Bugün, sadece fermentasyon metodu ile sakkarozdan üretilmektedir (13, 15).

Sitrik asit fermentasyonu iki türlü yapılabilmektedir. Bunlardan birincisi «yüzey kültür metodu» ile alçak kaplarda, diğeri ise tank tipi fermentörlerde yapılan fermentasyondur (10, 11, 13, 15). İlk metot daha kararlı olması ve yüksek verimi bakımından, ikincisi ise fermentasyonun devamlı yapılabilmesi bakımından avantajlıdır.

FERMENTASYONA ETKİ EDEN FAKTÖRLER :

a) pH : İyi bir fermentasyon için ilk şart kullanılan *Aspergillus Niger* Suş'u için en uygun pH'ın seçilmesidir. Genellikle *A. Niger*ler pH : 5-7 arasında etkilidirler.

b) Havalandırma : Fermentasyon tamamen havasız ortamda veya oksijen yokluğunda olamamaktadır. Çok fazla oksijenli ortamda ise izositrat dehidrogenaz inhibe edilemediği için sitrik asit akümüasyonu engellenmektedir. En iyi sonuçlar sınırlı havalandırma sonucunda alınmaktadır (7, 17).

c) Anyon ve katyonların etkileri : Fe^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , NO_3^- , PO_4^{3-} , iyonlarının tümünün ortamdaki miktarları sınırlandırılmalıdır. Özellikle Mn^{+2} iyonunun sitrik asit oluşumu üzerinde ters etkileri vardır (5). Bu durumun önüne geçmek için ortam sıcakta ve düşük pH'ta potasyumferrosiyandır ile muamele edilir, ve kalsiyum, bakır (II), çinko ve mangan çöktürülür. Mn^{+2} iyonunun milyarda iki oranında olsa dahi oluşan sitrik asidi % 10 oranında azalttığı ve kullanılan organizmanın morfolojisinde değişiklik oluşturduğu bulunmuştur (5).

GEREÇ VE YÖNTEMLER :

1 — Suşların İzolasyonu :

A. Niger suşlarını izole etmek için litresinde 30 gr sukroz, 2 gr sodyum nitrat, 1 gr dipotasyum fosfat K_2HPO_4 , 0.5 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 gr KCl, 0.01 gr $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 15 gr agar bulunduran Czapek Agar'ı kullanıldı (15). Çözelti otoklavda 15 lb/in² basınçta 15 dakika sterilize edildi, sonra sıcakken steril Petri kaplarına konuldu. Oda sıcaklığında katılaştıran agarlı ortamlar Ankara'nın çeşitli yerlerinde bir gece ağzı açık bırakıldı. Sonra kapatılarak 25 derecede inkübatöre kondu. 48 saat içinde kaplarda bir çok diğer bakteri yanında siyah A. Niger küfü suşları da yetişti. A. Niger kolonileri iğne uçlu bir steril bagetle yeni bir agar ortamına nakledildi ve aynı yöntemle bu defa saf kültürler elde edildi. Bunlar 3 - 4 derecelik buzdolabında stok edildi.

2 — Fermentasyon için en uygun suş'un seçilişi :

İzole edilen 5 suş içinden en yüksek verimi veren, pH değişken olarak kullanılarak seçildi. Suşlar pH 2 ve 8 arasında, litrede 265 gr melas bulunduran ve 0.5 gr $K_4Fe(CN)_6$ ile muamele edilmiş ortamda denendi.

3 — Fermentasyon ortamının hazırlanışı ve fermentasyonun yapılışı :

5 x 265 gr 5 lt lik beherlerde eritilip üzerine 30 ml % 10 K_2HPO_4 ve 2 ml % 10 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ilave edildi. Radiometer Copenhagen pH metre ile pH 5.5 a ayarlandı, ve 15 lb/in² basınçta ortam sterilize edildi. Ortam sıcakken 2.4 gr potasyum ferrosiyandır (480 ppm) ile muamele edildi ve 8 derecede bir gece bekletildi (6). Fermentasyon, 1000 cc lik alçak tip beherlere 250 cc çözelti konarak yapıldı. Sukroz

konsantrasyonu bütün deneylerde, başlangıçta 140 gr/lt olarak ayarlandı. Melas'ın % 52.7 lik polarizasyon değeri pratik olarak % 52.7 sukroz olarak kullanıldı.

Uygun potasyum ferrosiyaniür konsantrasyonunun tayini için 500 cc lik uzun tip beherlere 300 ml melas çözeltisi kondu ve değişen potasyum ferrosiyaniür miktarları ilave edildi. Çökme işlemi tamamlandıktan sonra çözeltinin 250 ml si deneyde kullanıldı.

Aerasyonun etkisinin araştırıldığı deneyde iki beher kullanıldı. Steril bir inkübatör içinde birinin ağız parafilmle sıkıca kapatıldı, diğeri ise tamamen açık bırakıldı. İkinci beherde evaporasyondan ötürü meydana gelen su kaybı her gün saf su ile telafi edildi. Bütün diğer deneylerde, sınırlı havalandırma beherler saat camı ile örtülerek sağlandı.

4 — Ortamın Aspergillus Niger ile aşılması :

Spor oluşumu tamamlandıktan sonra steril bir spatül ile sporlar kazandı ve 100 cc lik bir erlene aktarıldı, erlenin ağız steril pamukla kapatılıp bir gece 26 derecelik bir inkübatörde kurutuldu. Fermentasyon ortamı, iğne uçlu bir baget yardımıyla, çok az spor ile aşılandı.

5 — Sitrik Asit Tayini :

a) Kolorimetrik tayin : Önce bilinen miktar sitrik asit kullanılarak standard bir eğri elde edildi. Bilinmeyen numuneler için elde edilen kolorimetrik okuma değerleri bu eğri vasıtasıyla sitrik asit miktarına çevrildi. Fermentasyon ortamından 0,2 ml lik numuneler pipetlenerek 100 ml ye seyreltildi, ve bunun 1 ml sindeki sitrik asit Perlman, Lardy ve Johnson metoduna göre, sülfürik asitli ve potasyum bromürlü ortamda potasyum permanganat ile pentabromo asetona çevrilerek kantitatif olarak tayin edildi (14). Pentabromo aseton'un sodyum sülfürle verdiği açık sarı renk Carl Zeiss PMQ₂ II spektrofotometrede 450 m μ da okundu.

b) Titrimetrik Tayin : Fermentasyon ortamında 1 ml lik numuneler 250 ml lik erlenler içinde 100 ml ye tamamlandı, ve ısıtılarak, sodyum okzalata karşı standardize edilen 0.1 N KMnO₄ ile titre edildi.

6 — Başlangıç ve son sukroz konsantrasyonlarının polarimetre ile tayini :

Fermentasyondan önce ve tamamlanmasından sonra ortamdaki 100 ml çözelti alındı ve sukroz dışındaki maddeleri çöktürmek için 10 ml bazik kurşun asetat ilave edildi. Ayrıca rengi açmak için birkaç gr aktif kömür kondu ve süzüldü. Süzüntünün 10 ml si, dairesel ölçeği olan bir Carl Zeiss Polarimetre tübüne aktarıldı ve konsantrasyon direkt olarak, rotasyon derecesi, polarimetre sabitesi olan 1.503 ile çarpılarak bulundu.

SONUÇLAR :

1 — Suş'un Seçilişi :

Ankara'nın değişik bölgelerinden izole edilen beş A. Niger suş'u içinden ,en iyi sitrik asit oluşturanı, pH değişken olarak kullanılarak saptandı. Tablo I de görüldüğü gibi en üstün verim Küçükkesat'tan izole edilen suş'tan, pH 5.5 ta elde edildi.

Tablo I : En iyi Suş'un seçilişi

| İzole edildiği yer | Suş'un Sembolü | 10 gün içinde oluşan sitrik asit (Normalite cinsinden) | | | | | | | | | |
|--------------------|----------------|--|---|-----|----|------|------|------|------|------|------|
| | | pH | 2 | 3 | 4 | 4.5 | 5 | 5.5 | 6 | 7 | 8 |
| ODTÜ | M I | | | | AB | 0.22 | 0.56 | 0.66 | 0.70 | 0.80 | 0.60 |
| ODTÜ | M I I | | | | AB | AB | 0.51 | 0.60 | 0.72 | 0.65 | 0.60 |
| Küçükkesat | K I | | | B.Y | BY | BY | 0.72 | 0.85 | 0.79 | 0.81 | 0.50 |
| Türküzü | T I | | | | BY | BY | BY | 0.38 | 0.65 | 0.60 | 0.63 |
| Y. Mahalle | Y M I | | | | BY | BY | 0.42 | 0.55 | 0.50 | 0.53 | 0.30 |

BY = Büyüme yok, AB = Az Büyüme

2 — Potasyum ferrosiyaniür'ün sitrik asit fermentasyonuna etkisi :

Potasyum ferrosiyaniür kullanılmayan deneylerde çok yoğun bir sporulasyon oluştuğu ve sitrik asit miktarının hiçbir zaman

25 mg/ml yi aşmadığı gözlenmişti. Optimum potasyum ferrosiyaniür konsantrasyonunun tayinini gösteren tablo II de, potasyum ferrosiyaniür'ün sporulasyonu önlediği de açıkça görülmektedir.

3 — Fe⁺⁺ iyonunun etkisi :

Demir (II) iyonunun fazlasının fermentasyon üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlendi (Tablo III). Bu deneylerde Fe⁺⁺ iyonunun tam çökebilmesi için 445 ppm K₄Fe(CN)₆ kullanıldı.

Tablo II : Sitrik Asit Oluşumu Üzerinde Ferrosiyaniür'ün Etkisi

| Beher nu- ma- rası | ppm cinsinden ilave edilen K ₄ Fe(CN) ₆ | mg/ml olarak | | | 7. Günde miseller üzerindeki % spor |
|-----------------------------|--|--------------------|------|------|---|
| | | 5 | 7 | 9 | |
| 1 | 0 | 7.0 | 23.0 | 25.0 | 100 |
| 2 | 75 | 26.2 | 27.6 | 25.6 | 100 |
| 3 | 150 | 19.2 | 33.9 | 39.0 | 90 |
| 4 | 225 | 19.2 | 36.4 | 42.3 | 50 |
| 5 | 337 | 9.0 | 39.7 | 66.0 | 5 |
| 6 | 450 | 12.2 | 32.0 | 56.4 | 3 |
| 7 | 1125 | 14.1 | 26.9 | 42.3 | 0 |

4 — Mg⁺⁺, PO₄⁻ ve NO₃⁻ iyonlarının etkileri :

Bunlar tablo IV ve V te gösterilmiştir. Fosfat iyonunun sporulasyonu önlemediği gözlendi. Durum nitrat iyonu için de aynı idi, fakat nitrat miktarı arttığında aşırı miktarda misel teşekkülü olduğu ve fermentasyon sıvısının çok azaldığı görüldü. Magnezyum iyonunun optimum konsantrasyonu 0.24 gr/lt olarak bulundu.

Tablo III : Fe⁺² iyonunun asit oluşumuna etkisi

| Beher No: | (mg/lt) olarak demir (II) iyonu miktarı | Gün sonra ml KMnO ₄ cinsinden asitlik derecesi | | | | | | | | | 11. gün sonunda | | Son pH |
|-----------|---|---|-----|-----|-----|------|------|-------------------|---------------|---|-----------------|--|--------|
| | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | Misel'in görünümü | % Spor | | | | |
| 1 | 0.00 | 0.9 | 2.4 | 2.2 | 2.4 | 2.6 | 3.8 | | Kalın | 5 | — | | |
| 2 | 0.05 | 1.3 | 2.5 | 1.8 | 2.0 | 2.2 | 5.6 | | Kalın | 5 | — | | |
| 3 | 0.50 | 2.5 | 3.0 | 2.4 | 3.0 | 5.4 | 6.9 | | Normal (2 cm) | 5 | 4.2 | | |
| 4 | 1.00 | 2.9 | 4.7 | 7.9 | 9.7 | 11.2 | 13.7 | | Normal | 5 | 2.7 | | |
| 5 | 5.00 | 1.5 | 3.1 | 5.2 | 6.8 | 8.4 | 11.0 | | İnce (0,5 cm) | 0 | 3.0 | | |
| 6 | 10.00 | 2.1 | 3.5 | 5.5 | 6.6 | 8.8 | 10.5 | | Çok ince | 0 | 3.2 | | |

Tablo IV : Mg^{++} iyonunun etkisi

| Beher No: | Mg^{++} (gr/lt) | harcanan $KMnO_4$ cinsinden asidite gün sonra | |
|-----------|-------------------|--|-------|
| | | 7 gün | 9 gün |
| 1 | 0.00 | 2.9 | 5.7 |
| 2 | 0.04 | 3.8 | 7.6 |
| 3 | 0.12 | 3.2 | 6.7 |
| 4 | 0.24 | 5.0 | 10.8 |
| 5 | 0.40 | 5.3 | 8.6 |

5 — Havalandırmanın etkisi :

Tablo VI da görüldüğü gibi aşırı havalandırmanın fermentasyona ters bir etkisi olmadı, yalnız tamamen havasız ortamda gerek misel teşekkülü gerekse asit miktarı çok düşük oldu.

Tablo V : Fosfat ve Nitrat iyonlarının sitrik asit oluşumuna etkisi

| Beher No | NO_3 konmadı ilave edilen K_2HPO_4 (gr/lt) | Harcanan $KMnO_4$ cinsinden asidite | | | 9. günde misellerin genel görünümü | % sporulasyon | | |
|----------|--|-------------------------------------|-------|--------|-------------------------------------|---------------|-------|--------|
| | | 7 gün | 9 gün | 11 gün | | 7 gün | 9 gün | 11 gün |
| 1 | 0.00 | 1.3 | 2.7 | 3.5 | İnce; çözeltinin tamamen yüzeyinde | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 0.20 | 1.7 | 4.1 | 3.7 | » » | 100 | 100 | 100 |
| 3 | 0.60 | 1.1 | 2.5 | 5.9 | 2. beherdekinden daha kalın ve sıkı | 20 | 95 | 100 |
| 4 | 1.00 | 1.0 | 4.6 | 8.5 | Orta büyüklükte, yüzeyde | 5 | 15 | 50 |
| 5 | 1.40 | 1.1 | 2.8 | 4.5 | Kalın | 5 | 30 | 80 |
| 6 | 2.00 | 2.5 | 3.6 | 6.5 | Miselin % 50'si çözelti içinde | 3 | 15 | 35 |

PO_4 0,8 gr/lt
ilave edilen NO_3 (gr/lt)

| | | | | | | | | |
|----|------|-----|-----|-----|---|----|----|----|
| 7 | 0.00 | 1.2 | 2.8 | 5.6 | Normal, sıkı | 60 | 80 | 80 |
| 8 | 0.80 | 5.8 | 4.3 | 5.2 | Çok kalın, miselin % 75'i çözelti içinde | 0 | 0 | 5 |
| 9 | 2.00 | 2.2 | 5.0 | 6.4 | » | 0 | 0 | 5 |
| 10 | 3.20 | 3.8 | 5.8 | 8.2 | » | 0 | 0 | 5 |
| 11 | 4.80 | 1.7 | 3.8 | 6.2 | » | 0 | 5 | 5 |

Tablo VI : Havalandırmanın Etkisi

| Hava- landırma | ml KmnO ₄ cinsinden asidite | | | Miselin görünümü | % sporulasyon | | |
|-------------------|---|-------|--------|---------------------|---------------|----|--------|
| | 7 gün | 9 gün | 10 gün | | 7 | 9 | 10 gün |
| Aşırı | 2.4 | 6.8 | 9.0 | Normal | 30 | 40 | 40 |
| Hiç | 0.9 | 1.1 | 1.8 | Çok ince gevşek | 0 | 10 | 20 |

TARTIŞMA :

Tüm deneylerden çıkan sonuçlar, yüzey kültür metoduna göre yapılan sitrik asit fermentasyonunda, ortamın ferrosiyaniür iyonu ile muamelesinin çok önemli olduğunu göstermektedir. Eski araştırmacılar potasyum ferrosiyaniür'ün direkt olarak Krebs döngüsü enzimleri olan izositrik dehidrogenaz ve akonitaz'ı inhibe ettiğini, sitrat sentez enzimini ise aktive ettiğini düşünüyorlardı (15, 16). Daha sonraki araştırmalar ise bu maddenin yalnızca ortamdaki birçok katyonu, özellikle de Mn⁺⁺ iyonunu çöktürmekten sorumlu olduğunu göstermiştir. Ayrıca tank tipi fermentörlerde ferrosiyaniürün 30 ppm'den yüksek konsantrasyonda sitrik asit oluşumunu stimüle ettiği fakat hücrelerin gelişimini engellediği gösterilmiştir (3, 4, 5, 6, 9).

Burada yapılan deneyler yüzey kültür metodu ile yapılan fermentasyonda böyle bir sorunun olmadığını göstermektedir. Tablo II de ferrosiyaniür'ün misel teşekkülünü etkilemediği yalnız sporulasyonu engelliyerek asit teşekkülünü arttırdığı görülmektedir. En yüksek verimler sporulasyon az ve misel teşekkülü orta derecede iken elde edilmiştir. Potasyum ferrosiyaniür sporulasyonu, ya buna sebep olan bir iyonu çöktürerek önüyor olabilir, ya da ferrosiyaniür'ün kendisi sporulasyonu durdurmakta ve asit oluşumunu arttırmaktadır.

Denenen diğer iyonlardan hiçbiri sporulasyondan sorumlu değildir. Fakat araştırılan iyonların dışında ve melas içinde bulunduğu bilinen diğer 17 element'in sporulasyon üzerinde etkisi araştırılmadan kesin bir yargıya varmak olanaksızdır.

Tank tipi fermentasyonda inhibitör etkisinin olduğu bilinen Fe⁺⁺ iyonunun kullanılan suş'a bu deneylerde herhangi bir inhibisyonu gözlenmemiştir.

Nitrat iyonu asit oluşumuna etki etmemekle birlikte aşırı hücre (misel) oluşumu nedeniyle verimi önemli oranda düşürmektedir.

Deneylerin ışığında ortaya çıkan şudur ki : yüzey kültür metodu ile yapılacak bir fermentasyon için yapılacak ilk iş optimum potasyum ferrosiyaniür miktarının saptanmasıdır. Çünkü belirli bir ferrosiyaniür konsantrasyonunda sporulasyon aniden azalmakta ve asit oluşumu artmaktadır.

Deneyler ayrıca Ankara şeker fabrikası melasının sitrik asit üretimi için çok kullanışlı bir hammadde olduğunu da göstermiştir.

KAYNAKLAR

- 1 — Aries, R. S., W. Copulsky, Molasses and its Products, International Sugar Research foundation Inc., New York, (1949), 10.
- 2 — Binkley, W. W., W. L. Melville. Composition of cane juice and cane final molasses, Intern. Sug. Res. Found. Inc., New York, (1953), 23.
- 3 — Clark, L. S., Biotechnology and Bioengineering Vol. IV, (1962), 17.
- 4 — Clark, D. S., I and EC Product Research and Development, Vol. 1, (1962), 59.
- 5 — Clark, D. S., Ito, K. and Horitsu, Biotechnology and Bioengineering Vol. VIII, (1966), 465.
- 6 — Clark, D. S., Ito, K. and P. Tymchuk, Biotechnology and Bioengineering, Vol. VII, (1965), 269.
- 7 — Clark, D. S. and C. P. Lentz, Canadian Journal of Microbiology, Vol. 7, (1961), 447.
- 8 — Deerr, N., International Sugar J., Vol. 47, (1945), 123.
- 9 — Horitsu, H., and D. S. Clark, Canadian Journal of Microbiology, Vol. 12, (1966), 901.
- 10 — Ledingham, C. A., Kamer, R. A. and G. E. Hrudks, Yeast and Citric Acid Production From Sugar Beet Molasses in Germany, London, (1947).
- 11 — Loesecke, H. W. V., Chem. and Eng. news, Vol. 123, (1945), 1952.

- 12 — Olbrich, H., Die Melasse, Institut Für Gärungsgewerbe, Berlin, (1956), 12.
- 13 — Peppler, J. Henry, Microbiol Technology, Reinhold Publishing Corporation, New York, (1967), 183.
- 14 — Perlman, D., Lardy, H. A. and M. J. Johnson, Industrial and Eng. Chem. Anal. Ed., Vol. 16, (1944), 515.
- 15 — Prescott, S. C. and C. G. Dunn, Industrial Microbiology, McGraw Hill Inc., New York, (1959), 523.
- 16 — Rainbow, C. and A. H. Rose, Biochemistry of Industrial Microorganisms, Academic Press, London, (1963).
- 17 — Rhodes, A. and Derek L. Fletcher, Principles of Industrial Microbiology, Pergamon Press, (1966), 197.
- 18 — Şeker Enstitüsü Analitik Şubesi, Kampanya Meluğları Analiz Sonuçları Raporları.
- 19 — Türkiye Şeker Fabrikaları A. Ş. Hissedarlar 37. adı genel kurul toplantısı, 29.4.1972.