



**YEREL *Candida zeylanoides* SUŞLARININ
SİTRİK ASİT ÜRETİM KAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Bilge SAYIN BÖREKÇİ

Doktora Tezi

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

2020

(Her hakkı saklıdır)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**YEREL *Candida zeylanoides* SUŞLARININ SİTRİK ASİT ÜRETİM
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

(Determination of Citric Acid Production Capacity of Autochthonous *Candida zeylanoides*
Strains)

DOKTORA TEZİ

Bilge SAYIN BÖREKÇİ

Danışman: Prof. Dr. Güzin KABAN

Erzurum
Temmuz, 2020

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

YEREL *Candida zeylanoides* SUŞLARININ SİTRİK ASİT ÜRETİM KAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

Prof. Dr. Güzin KABAN danışmanlığında, Bilge SAYIN BÖREKÇİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE
Atatürk Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Güzin KABAN
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Mükerrerem KAYA
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Prof. Dr. M. Yekta GÖKSUNGUR
Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
Çukurova Üniversitesi

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN

Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1002-Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 1190739

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Güzin KABAN danışmanlığında sunulan “Yerel *Candida zeylanoides* Suşlarının Sitrik Asit Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	13	30
Kuramsal Temeller	6	30
Materyal ve Yöntem	9	35
Bulgular	4	20
Tartışma	0	20
Tezin Geneli	6	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Bilge SAYIN BÖREKÇİ	Prof. Dr. Güzin KABAN
05.08.2020	05.08.2020

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

- Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.
- Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmak istediğim alanda yol açan ve bu konuyu önerip her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, akademik gelişimimde büyük emeği olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güzin KABAN'a (Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) minnet ve şükranlarımı sunar, içtenlikle teşekkür ederim. Çalışmalarına değerli katkılarda bulunan, engin bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren Tez İzleme Komitesi üyelerinden değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mükerrerem KAYA'ya (Atatürk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmanın sürdürülmesi adına 1002 Hızlı Destek Programı kapsamındaki projemize maddi destek veren TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışmamın laboratuvar aşamasını gerçekleştirmem için her türlü imkânı sağlayan Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında yanımda olan sevgili arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Kübra ÇINAR TOPÇU, Öğr. Gör. Pınar ANLAR ve doktora öğrencisi Zerrin POLAT'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olup, binbir emekle beni bugünlerime taşıyan canım aileme; annem Saadet SAYIN, babam Serdar SAYIN, kardeşim Efe SAYIN'a ve teyzelerim Neriman KAYA, Muhterem KAYA ve Deniz KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tanıştığımız günden beri hayatıma anlam katan ve her konuda desteğini hissettiren çok değerli eşim Nihat Emre BÖREKÇİ ve güzel ailesine teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Bilge SAYIN BÖREKÇİ

ÖZET

Doktora Tezi

YEREL *Candida zeylanoides* SUŞLARININ SİTRİK ASİT ÜRETİM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Bilge SAYIN BÖREKÇİ

Danışman: Prof. Dr. Güzin KABAN

Amaç: Bu çalışmada, on altı yerel *Candida zeylanoides* suşunun bazı teknolojik özelliklerinin incelenmesi ve elde edilen sonuçlar dikkate alınarak seçilen *C. zeylanoides* 7.12 suşunun farklı şartlarda sitrik asit üretim kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: *C. zeylanoides* suşları asit üretim kapasitesi yönünden incelenmiş ve asit üretim kapasitesi yüksek iki *C. zeylanoides* (7.12 ve 12.3) suşu sitrik asit üretim kapasitesi açısından da değerlendirilerek üretici suş olarak *C. zeylanoides* 7.12 seçilmiştir. Kontrol suşu olarak üç farklı *Yarrowia lipolytica* suşu arasından en fazla asit üretim kapasitesine göre seçilen *Y. lipolytica* Y-1094 kullanılmıştır. Suşların sitrik asit üretimi üzerine başlangıç pH değeri (5,5-6,5), fermantasyon süresi (4-6 gün) ve başlangıç glukoz miktarı (125-175 g/L) faktörlerinin etkileri cevap yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Suşların sitrik asit üretim miktarlarının yanı sıra izositrik asit, biyokütle ve fermantasyon boyunca tüketilen glukoz miktarları belirlenerek biyoprosese ait çeşitli verim değerleri de hesaplanmıştır.

Bulgular: Deneysel tasarımda elde edilen sonuçlarla kontrol suşu için optimum koşullar belirlenmiş (pH 5,97, 6 gün ve 125 g/L glukoz) ve 33,57 g/L sitrik asit elde edilmiştir. Model ile *C. zeylanoides* 7.12 suşu kullanılarak elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliğinin önemli olduğu, pH değerini periyodik olarak ayarlamamanın ise üretim için yetersiz kaldığı saptanmıştır. Bundan dolayı, sabit pH değerine ayarlanan besiyerinde, sadece başlangıç substrat miktarı ve fermantasyon süresi esas alınarak gerçekleştirilen deneysel tasarımda *C. zeylanoides* 7.12 suşunun optimum koşullarda (125 g/L glukoz ve 6 gün) 11,95 g/L sitrik asit ürettiği tespit edilmiştir. Buna karşın bu tasarımda kontrol suşunun ürettiği maksimum sitrik asit miktarı 20,95 g/L olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Yerel *C. zeylanoides* 7.12 suşunun sitrik asit üretimi açısından uygun bir suş olduğu ve değişik faktörler denenerek üretim kapasitesinin artırılacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sitrik asit, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, izositrik asit, biyokütle, HPLC

Temmuz 2020, 71 sayfa

ABSTRACT

Doctoral Dissertation

DETERMINATION OF CITRIC ACID PRODUCTION CAPACITY OF AUTOCHTHONOUS *Candida zeylanoides* STRAINS

Bilge SAYIN BÖREKÇİ

Supervisor: Prof. Dr. Güzin KABAN

Aim: In this study, it was intended for examining some technological properties of sixteen autochthonous *Candida zeylanoides* strains and to determining the citric acid production capacity of *C. zeylanoides* 7.12 strain selected under different conditions.

Method: *C. zeylanoides* strains were investigated according to acid production capacity and two *C. zeylanoides* strains (7.12 and 12.3) with high acid production capacity were also evaluated in terms of citric acid production capacity and *C. zeylanoides* 7.12 was selected as producer strain. As control strain *Y. lipolytica* Y-1094 was selected according to the highest acid production capacity among three different *Yarrowia lipolytica* strains. The effects of initial pH value, fermentation time and initial glucose amount factors on the citric acid production of the strains were examined using the response surface methodology. In addition to the citric acid production amounts of the strains, various yield values of bioprocess were calculated by determining the isocitric acid, biomass amount and amount of glucose consumed during the fermentation.

Results: Optimum conditions were determined for the control strain (pH 5,97, 6 days and 125 g/L glucose) with the responses obtained in the experimental design, and 33,57 g/L citric acid was obtained. It was detected that the lack of fit between the model and the data obtained by using *C. zeylanoides* 7.12 strain was significant, and adjusting the pH periodically was insufficient for production. Therefore, it was determined that *C. zeylanoides* 7.12 strain produced 11,95 g/L citric acid in optimum conditions (125 g/L glucose and 6 days) in the medium adjusted to constant pH value which performed only based on the initial substrate amount and fermentation time in the experimental design. However, in this design, the maximum amount of citric acid produced by the control strain was calculated as 20,95 g/L.

Conclusion: It was concluded that the autochthonous *C. zeylanoides* 7.12 strain is a suitable strain in terms of citric acid production and the production capacity can be increased by trying different factors.

Keywords: Citric acid, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, isocitric acid, biomass, HPLC

July 2020, 71 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	11
KAYNAK ÖZETİ	21
MATERYAL ve YÖNTEM	27
Materyal	27
Mikroorganizmalar.....	27
Besiyerleri	27
Yöntem.....	28
Suşların bazı özelliklerinin belirlenmesi	28
Sitrik ve izositrik asit miktarının belirlenmesi	28
Fermentasyon sonrası biyokütle ve pH değerinin belirlenmesi	30
Fermentasyon sonrası kalan glukoz miktarının belirlenmesi.....	30
Verim hesaplamaları	31
Deneysel tasarım	31
İstatistiksel analizler.....	31
ARAŞTIRMA BULGULARI	33
Sitrik Asit Üretimi için Uygun Suşların Seçimi.....	33
Suşların farklı koşullarda gelişim düzeyleri.....	33
Suşların asit üretim yetenekleri	34
Mikrobiyal gelişim eğrileri	36
Sitrik Asit Üretimi.....	37
Sitrik Asit Üretiminin Optimizasyonu	37
Üç faktörlü deneysel tasarımda <i>C. zeylanoides</i> 7.12 suşuna ait sonuçlar	39
Üç faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşuna ait sonuçlar	39
İki faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşuna ait sonuçlar	50

İki faktörlü deneysel tasarımda <i>C. zeylanoides</i> 7.12 suşuna ait sonuçlar	51
SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR.....	61



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Sitrik asidin gıda endüstrisinde kullanım alanları ve işlevleri.....	13
Tablo 2. Sitrik asit üretimi için kullanılan modifiye besiyeri bileşimi	27
Tablo 3. Sitrik asit üretiminde etkisi incelenecek parametreler ve seviyeleri	32
Tablo 4. <i>C. zeylanoides</i> suşlarının farklı koşullardaki gelişim düzeyleri	34
Tablo 5. <i>C. zeylanoides</i> ve <i>Y. lipolytica</i> suşlarının asit üretim kapasitelerinin karşılaştırılması	35
Tablo 6. Seçilen iki <i>C. zeylanoides</i> suşunun glukoz ve gliserol içeren besi ortamında sitrik asit üretimlerinin karşılaştırılması	37
Tablo 7. Cevap yüzey yönteminde kullanılan deneysel tasarım ve sistemin yanıtları	38
Tablo 8. Üç faktörlü deneysel tasarımda <i>C. zeylanoides</i> 7.12 ile yapılan üretimde elde edilen sonuçlar.....	39
Tablo 9. Üç faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşu ile yapılan üretimde elde edilen sonuçlar	42
Tablo 10. Kontrol suşu ile yapılan üretime ait verim değerleri	43
Tablo 11. Kontrol suşu ile yapılan üretime ait ikinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi	44
Tablo 12. Kontrol suşunun ürettiği sitrik asit miktarları için tahmin edilen regresyon katsayıları	46
Tablo 13. Cevap yüzey yönteminde kullanılan iki faktörlü deneysel tasarım ve sistemin yanıtları	50
Tablo 14. İki faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşu kullanılarak yapılan üretimde elde edilen sonuçlar	51
Tablo 15. İki faktörlü deneysel tasarımda <i>C. zeylanoides</i> 7.12 kullanılarak yapılan üretimde elde edilen sonuçlar.....	52
Tablo 16. <i>C. zeylanoides</i> 7.12 ile yapılan sitrik asit üretimine ait verim değerleri	53
Tablo 17. <i>C. zeylanoides</i> 7.12 ile yapılan üretime ait ikinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi	54
Tablo 18. <i>C. zeylanoides</i> 7.12 ile yapılan üretime ait sitrik asit miktarları için tahmin edilen regresyon katsayıları	55
Tablo 19. <i>C. zeylanoides</i> 7.12 suşu ile 7 ve 8 gün yapılan fermantasyona ait veriler	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sitrik asit döngüsü.....	12
Şekil 2. Çalışmada uygulanan sitrik asit üretim prosesi.....	29
Şekil 3. Çalışmada kullanılan sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatör.	29
Şekil 4. <i>C. zeylanoides</i> 7.12 ve kontrol suşunun asit oluşumuna ait zon görüntüleri.	36
Şekil 5. <i>C. zeylanoides</i> 7.12 ve kontrol suşunun ters (inverted) ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.	36
Şekil 6. <i>C. zeylanoides</i> 7.12, 12.3 ve kontrol suşunun gelişim eğrileri.....	37
Şekil 7. Sabit pH değerinde kontrol suşunun üretimine ait fermantasyon süresi ve substrat miktarının kontur ve yüzey grafiği.	47
Şekil 8. Sabit substrat değerinde kontrol suşunun üretimine ait fermantasyon süresi ve pH değerinin kontur ve yüzey grafiği.	48
Şekil 9. Sabit fermantasyon süresinde kontrol suşunun üretimine ait substrat miktarı ve pH değerinin kontur ve yüzey grafiği.	49
Şekil 10. Sabit pH değerinde <i>C. zeylanoides</i> 7.12 suşunun üretimine ait substrat miktarı ve fermantasyon süresinin kontur ve yüzey grafiği.	57

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
ADH	Alkol dehidrogenaz
AH	Akonitat hidrataz
ALDH	Aldehit dehidrogenaz
AMP	Adenosine monophosphate
C/N	Karbon/nitrojen oranı
CO ₂	Karbon dioksit
CYY	Cevap yüzey yöntemi
FDA	American Food and Drug Administration
G	Gram
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
Mm	Milimetre
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
TCA	Trikarboksilik asit

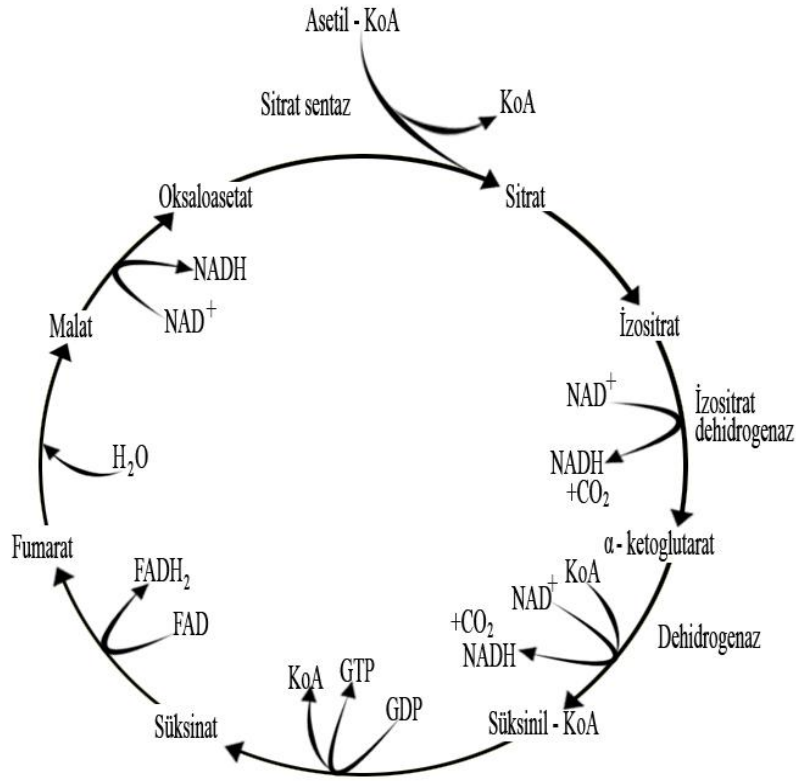
GİRİŞ

Sitrik asit (2-hidroksi-propan-1,2,3-trikarboksilik asit), renksiz, kokusuz, su ve alkolde kolayca çözünebilen, oda sıcaklığında katı halde bulunan ve 153°C’de eriyen bir trikarboksilik asittir (Abonama *et al.* 2014). Bu asit Latince “Citrus” kelimesinden türetilmiştir (Papagianni 2007). Molekül ağırlığı 192,12 g/mol olan sitrik asit, 3,13, 4,76 ve 6,39 olmak üzere üç farklı pKa değerine sahiptir (Cavallo *et al.* 2017).

Sitrik asit, ilk olarak 1784 yılında İsveçli kimyager Carl Scheele tarafından limon suyundan izole edilmiştir (Swain *et al.* 2012). İlk ticari sitrik asit 1860 yılında İngiltere’de kalsiyum sitrat olarak piyasaya sürülmüştür (Abou-Zeid and Ashy 1984). Ayrıca, Wehmer’in (1893) *Penicillium* türlerinin şeker ve inorganik tuzlar içeren ortamda sitrik asit üretebildiğini gösteren ilk araştırmacı olduğu bildirilmiştir (Max *et al.* 2010). 1917’de Amerikalı gıda kimyacı James Currie, belirli *Aspergillus niger* suşlarının sitrik asit üretim kapasitesine sahip olduğunu keşfetmiş ve Pfizer şirketi bu prosesi kullanarak endüstriyel üretime başlamıştır (Shetty 2015).

Sitrik asit, Krebs (trikarboksilik asit-TCA) döngüsünde oluşan bir ara üründür (Holness *et al.* 2015) (Şekil 1). Bu organik asit, bütün canlı organizmaların oksidatif metabolizmasında yer alan bir metabolittir (Höfer 2015). Ancak, bu metabolitin hücrede birikimi belirli koşullarda gerçekleşmektedir (Karasu-Yalçın 2007).

Narenciye türü meyveler başta olmak üzere pek çok gıdada doğal olarak bulunan sitrik asit (Ramesh and Kalaiselvam 2011), gıda ve ilaç gibi endüstrilerde yaygın bir şekilde kullanılan önemli bir katkı maddesidir (Soccol *et al.* 2006). Bu asit, JECFA tarafından GRAS olarak kabul edilmiştir (Torres and Voit 2002; Shetty 2015). Üretilen sitrik asidin %70’i gıda sanayinde, %12’si ilaç ve %18’i diğer endüstrilerde kullanılmaktadır (Theron and Lues 2011; Sato and Kawaguti 2016). Yıllık sitrik asit üretiminin yaklaşık 1,600,000 metrik ton olduğu ve dünyadaki en büyük üreticinin %40’lık pay ile Çin olduğu bildirilmektedir (Sato and Kawaguti 2016). Sitrik asit için yapılan değerlendirmelere göre, küresel pazarın 2020 yılına kadar 3,6 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmiş ve 2015’ten 2020’ye kadar yıllık %5,5’lik bir bileşik büyüme oranı beklenmiştir (Markets and Markets 2018). Sitrik asit günümüzde dünyanın en büyük ikinci fermantasyon ürünü olmuştur. Nanoteknoloji ve doku mühendisliğindeki uygulamaları sebebiyle küresel talebi artmaya devam etmektedir (Wang *et al.* 2016).



Şekil 1. Sitrik asit döngüsü (Holness *et al.* 2015)

Sitrik asidin gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahip olmasının nedenleri arasında; hoş lezzeti ve toksik olmaması, antioksidan (Anastassiadis *et al.* 2008), asit düzenleyici, aroma ajanı (Waites *et al.* 2001; Anastassiadis *et al.* 2008; Csutak and Sarbu 2018), koruyucu ve emülsifiyer (Csutak and Sarbu 2018) gibi özelliklere sahip olması gösterilmektedir. Sitrik asidin gıda endüstrisinde kullanım alanları ve işlevleri Tablo 1’de verilmiştir.

Sitrik asit üretimi birçok metabolik ve morfolojik değişiklikten etkilenen karmaşık bir süreç olarak değerlendirilmektedir (Anastassiadis *et al.* 2002). Mayalar, küfler ve bakterilerin sitrik asit döngüsüne katıldığı, ancak sadece bazı mikroorganizmaların sitrik asit üretimini artırma kabiliyetine sahip olduğu belirtilmektedir (Crolla and Kennedy 2001). Sitrik asit, mikrobiyal proseslerle tonajda üretilen en önemli organik asit olarak tanımlanmaktadır (Sauer *et al.* 2008; Darvishi *et al.* 2009; Patel and Pandya 2017). Bunun yanında, dünyada üretilen sitrik asidin %90’ından fazlası fermantasyon yoluyla elde edilmektedir (Soccol *et al.* 2006, 2008; Swain *et al.* 2012).

Tablo 1. Sitrik asidin gıda endüstrisinde kullanım alanları ve işlevleri

Endüstri	Fonksiyon	Referanslar
Şaraplar ve elma suları	➤ Beyaz şaraplarda esmerleşmenin önlenmesi	Grewal and Kalra 1995; Soccol <i>et al.</i> 2006, 2008
	➤ Bulanıklığın önlenmesi	
	➤ pH'nın ayarlanması	
Alkolsüz içecekler ve şuruplar	➤ Ekşilik sağlanması	Soccol <i>et al.</i> 2006
	➤ Doğal meyve tadının artırılması	
	➤ Gazlı ve sukroz bazlı içeceklerde asitliğin düzenlenmesi	
Jöleler, reçeller ve koruyucular	➤ pH'nın ayarlanması	Soccol <i>et al.</i> 2006
	➤ Asitliğin düzenlenmesi	
	➤ Lezzet verme, keskin tat ve ekşiliğin önlenmesi	
	➤ Antimikrobiyal koruyucuların etkinliğinin artırılması	
Jelatinli tatlılar	➤ pH'nın ayarlanması	
Bitkisel ve hayvansal yağlar	➤ Diğer antioksidanlarla sinerjik etkinin sağlanması	Grewal and Kalra 1995
Donmuş meyveler	➤ pH değerini düşürerek oksidatif enzimlerin inaktive edilmesi	
Et ürünleri	➤ Antioksidan	Madhavi <i>et al.</i> 1996
	➤ Mezbahalarda taze kanın pıhtılaşmasının önlenmesi	
Deniz ürünleri	➤ İz metallerin şelatlanmasıyla istenmeyen koku ve tat oluşumunun ve renk bozulmalarının önlenmesi	Dhillon <i>et al.</i> 2011
	➤ Endojen enzimleri etkisiz hale getirerek, deniz mahsullerinin stabilitesinin ve lezzetinin korunması	Sahasrabudhe and Sankpal 2001
	➤ Antioksidanların etkilerinin artırılması	
Şekerlemeler	➤ Ekşiliğin sağlanması	Patel and Pandya 2017
	➤ Sükroz inversiyonunun azaltması	
	➤ Akide şekerlerinde koyu renk oluşumunun sağlanması	
	➤ Asitliğin düzenlenmesi	
Süt ürünleri	➤ Dondurma ve işlenmiş peynirlerde emülsifiyer	Grewal and Kalra 1995; Patel and Pandya 2017
	➤ Birçok peynir ürününde asitliğin düzenlenmesi	
	➤ Antioksidan	

Sitrik asit üretimi için kullanılabilir potansiyel mayalar arasında *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Torulopsis*, *Kloekera*, *Trichosporon*, *Torula*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Endomyces*, *Nocardia*, *Nematospora*, *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* türleri yer almaktadır (Kristiansen *et al.* 2002). *Saccharomyces cerevisiae* dışındaki *Candida* türlerinin yüksek büyüme hızı ve düşük jenerasyon süresi gibi özelliklerinden dolayı sitrik asit

fermantasyonu için uygun bulunduğu belirtilmiştir (Napitupulu *et al.* 2020). Bunun yanında; *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. oleophila*, *C. intermedia*, *C. guillermondii* (Kristiansen *et al.* 2002; Berovic and Legisa 2007), *C. paratropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. catenulata*, *C. parapsilosis* (Csutak and Sarbu 2018), *C. citroformans* (Murphy and Horgan 2005), *C. fibriae*, *C. subtropicalix* (Berovic and Legisa 2007), *C. albicans*, *C. atmosphaerica*, *C. brumptii*, *C. chalmersii*, *C. hitachinica*, *C. krusei*, *C. melibiosa*, *C. mycoderma*, *C. pelliculosa*, *C. petrophilum*, *C. pulcherrima* ve *C. rugosa* (Anastassiadis *et al.* 2008) ise üretim için uygun *Candida* türleri arasında gösterilmektedir.

1960'ların sonunda, *Yarrowia lipolytica* ile gerçekleştirilen sitrik asit üretimlerinde substrat olarak n-alkanlar kullanıldığında oldukça yüksek verimler elde edildiği ve bu üretimlerin *A. niger* ile yapılan üretimlerle yarışabileceği bildirilmektedir (Demain *et al.* 1998). Bununla birlikte, düşük izositrik asit üretimi nedeniyle glukoz içeren ortamların n-alkan içeren ortamlar yerine tercih edilmesi gerektiği de vurgulanmaktadır (Wojtatowicz *et al.* 1991).

Aspergillus niger geleneksel olarak, melas, sükröz veya glukoz içeren ortamlarda geliştirilerek ticari sitrik asit üretiminde kullanılmaktadır (Kamzolova *et al.* 2011a). Bununla beraber, üretimde mayaların tercih edilmesinin bazı avantajları vardır. Bunlar arasında, pek çok karbon kaynağının kullanılabilme imkanı, yüksek substrat konsantrasyonlarına, metal iyonlarına (Antonucci *et al.* 2001), düşük oksijen seviyelerine karşı tolerans ve kolay proses kontrolü gösterilmektedir (Holz *et al.* 2009). Ayrıca, daha az rafine substratların kullanılabilmesi, substrat, atık arıtımı ve geri kazanım maliyetlerinde azalma (Antonucci *et al.* 2001) ve moleküler tekniklerle daha kolay genetik modifikasyonlar yapılabilmesi (Liu *et al.* 2010), sağlık açısından daha az tehlike (Hesham *et al.* 2020) de diğer önemli nedenler arasında yer almaktadır.

Tüm avantajlarının yanı sıra, maya kullanımındaki en büyük problem, üretimde izositrik asit oluşumudur (Antonucci *et al.* 2001; Holz *et al.* 2009; Sanchez-Riera 2010). Bu istenmeyen yan ürün, ilk olarak 1966 yılında *Y. lipolytica* suşlarının n-alkanlar içeren besi ortamında geliştirilmesi sonucunda tespit edilmiştir (Anastassiadis *et al.* 2008). İzositrik asit sitrik asidin yapısal izomeridir. Demir iyonlarının varlığında akonitaz enzimi aracılığıyla cis-akonitattan üretilen izositrik asidin fazla sentezlenmesi yüksek akonitaz ve sitrat sentaz aktiviteleri ve düşük izositrat liyaz ve izositrat dehidrojenaz aktiviteleri ile gerçekleşmektedir (Fickers *et al.* 2020). İzositrik asit oluşumu kullanılan mikroorganizma türüne, substrat ve mevcut üretim koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Antonucci *et al.* 2001; Holz *et al.* 2009). Bu nedenle, üretimde düşük izositrik asit üretim kapasitesine sahip suşların tercih edilmesi büyük önem arz etmektedir (Karasu-Yalçın vd 2010a). Gelişme koşullarına bağlı olarak doğal

suşların, karbonhidratlar veya gliserolden yaklaşık %8-16 oranında, glukoneojenetik substratlar alkanlar ve yenilenebilir trigliseritler, etanol veya asetat kullanılan ortamlarda %35-50 ve karbon kaynağı olarak etanol kullanıldığında ise %35-67 oranında izositrik asit üretebildikleri bildirilmektedir (Holz *et al.* 2009).

Endüstriyel olarak sitrik asit üretiminde farklı fermantasyon tipleri kullanılmakla birlikte, sitrik asit üretiminin yaklaşık %80'i derin fermantasyon yöntemi ile elde edilmektedir (Roehr *et al.* 1996; Vandenberghe *et al.* 1999; Waites *et al.* 2001; Dhillon *et al.* 2011; Swain *et al.* 2012). Derin fermentasyon, kesikli, kesikli beslemeli veya sürekli sistemlerde uygulanabilirken, kesikli sistem en çok tercih edilen yöntem olarak ön plana çıkmaktadır (Swain *et al.* 2012; Patel and Pandya 2017).

Karıştırmalı tanklar (40-200 m³) veya daha büyük hava taşımalı fermentörler (200-900 m³) kesikli sürdürülen derin fermantasyon tekniğinde kullanılabilir (Waites *et al.* 2001). Üretim için kullanılacak biyoreaktörler, sitrik asidin korozif etkisi ve fermantasyon sırasında düşen pH değerleri nedeniyle aside dayanıklı olmalıdır (Murphy and Horgan 2005). Kule tipi fermentörler ise çoğunlukla fiyat, boyut ve işletme açısından tercih edilmektedir. Fermentörler yüksek çözünmüş oksijen seviyesini sürdürmek için bir havalandırma sistemine sahiptir. Soğutma ise harici bir su filmi ile yapılabilmektedir (Patel and Pandya 2017). Bu fermantasyon, mikroorganizma gelişimine bağlı olarak 6-8 gün sürmektedir (Berovic and Legisa 2007).

Derin fermantasyonda karbon kaynağının seyreltilmesi, uygun besinlerin ön işleme tabi tutulması ve hat ya da biyoreaktörde sterilizasyon yapılması gerekmektedir. Bu yöntem, daha az alan (Murphy and Horgan, 2005), ileri kontrol mekanizması (Dhillon *et al.* 2011), yüksek verim, düşük iş gücü maliyeti (Vandenberghe *et al.* 1999; Dhillon *et al.* 2011; Swain *et al.* 2012) ve düşük kontaminasyon riski (Swain *et al.* 2012) gibi bazı avantajlar sağlamaktadır. Öte yandan, yüksek maliyetli besi ortamı, metal iyonlarına karşı duyarlılık ve yüksek miktarda geri kazanım sonrası atık su oluşumu gibi faktörler ise yöntemin dezavantajları olarak değerlendirilmektedir (Dhillon *et al.* 2011).

Tarımsal atıkların sitrik asit üretiminde kullanılmasında alternatif bir yöntem olarak kabul edilen katı hal fermantasyonu (Vandenberghe *et al.* 1999; Patel and Pandya 2017), hem laboratuvarında hem de endüstriyel ölçekte biyolojik olarak aktif metabolitlerin üretilmesi için organik katı atıkların biyodönüşümünde kullanılmaktadır (Abu Yazid *et al.* 2017). Katı hal fermantasyonu küçük ölçekli bir işlemdir (Waites *et al.* 2001). Bu fermantasyon tipi ilk olarak Japonya'da geliştirilmiştir (Koji proses). Katı hal fermantasyonu sitrik asit üretimi için en basit yöntem olarak değerlendirilmektedir (Socol *et al.* 2006; Swain *et al.* 2012; Patel and Pandya 2017). Bu yöntem, öncelikle meyve atıkları ve pirinç kepeği gibi hammaddelerle uygulanmıştır

(Soccol *et al.* 2006; Swain *et al.* 2012). Erlenler, cam inkübatörler, döner ve yatay tambur biyoreaktörler, tek katmanlı ve çok katmanlı dolgulu yatak kolon biyoreaktörler sitrik asit üretimi amacıyla bu yöntem için tercih edilebilmektedir (Soccol *et al.* 2008). Bu fermantasyonda, katı substratın nem derecesi %70'e, kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak ortamın başlangıçtaki pH değeri ve inkübasyon sıcaklığı ise sırasıyla 4,5-6,0 ve 28-30°C'ye ayarlanmaktadır. Fermantasyon optimum koşullar altında 96 saat sürmektedir (Soccol *et al.* 2006). Bu yöntemde *A. niger* en yaygın kullanılan mikroorganizma olmasına rağmen, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailli* gibi bazı maya türlerinin de bu tür üretimde kullanılabileceği belirtilmektedir (Swain *et al.* 2012).

Katı hal fermantasyonunda düşük su aktivitelerinde ortaya çıkan besin ve metabolitlerin düşük difüzyon oranına bağlı olarak, yüksek azot ve fosfor gereksinimine ihtiyaç duyan maya suşlarının kullanımı uygun bulunmamaktadır (Soccol *et al.* 2006). Bu yöntem, daha yüksek safsızlığa sahip ürünlerin kullanımı nedeniyle daha yüksek geri kazanım maliyetlerinin yanı sıra ölçeklendirme, pH, nem, sıcaklık, besin maddeleri gibi işlem parametrelerinin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Öte yandan, bu yöntemin daha basit teknoloji kullanımı, daha yüksek verim, çeşitli mikroorganizmalar için doğal habitatı andıran daha düşük maliyetli ortam, daha iyi oksijen sirkülasyonu, düşük enerji ve maliyet, geri kazanım sonrası daha az atık oluşumu ve daha düşük bakteriyel kontaminasyon riski gibi birçok avantajı vardır (Dhillon *et al.* 2011). İz elementlerin sitrik asit üretimini derin fermantasyondaki kadar etkilememesi de avantajlar arasında yer almaktadır (Vandenberghe *et al.* 1999; Soccol *et al.* 2006). Katı hal fermantasyonu, fermantasyon öncesi işlemlerde daha az su kullanımı ve fermantasyon sonrası uygulanan işlemler sırasında daha az atık su oluşumu sağlamak ve tarımsal kalıntıların kullanımı nedeniyle vitamin gibi bazı kompleks besin maddelerinin eklenmesini gerektirmemektedir (Soccol *et al.* 2008).

Sitrik asit üretimini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Üretim için uygulanacak optimum sıcaklık, kullanılan organizma ve ekipmana bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle 26-35°C arasında değişmektedir (Crolla and Kennedy 2001). Proseste mayalar kullanıldığında ise bu sıcaklığın 22-35°C arasında değiştiği vurgulanmaktadır. Bununla birlikte, fermantasyon koşullarından bağımsız olarak, oksalik asit birikimi 30°C'den yüksek sıcaklıklarda arttığından, uygulanacak sıcaklık derecesinin oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (Angumeenal and Venkappayya 2013).

Karbon kaynağının türü ve konsantrasyonu sitrik asit üretimi için oldukça önemlidir (Soccol *et al.* 2006, 2008). Mayalar, galaktoz, hidrokarbonlar, melas, etanol, bitkisel yağlar, gliserol ve glukoz gibi çeşitli karbon kaynaklarını metabolize edebilmektedir (Anastassiadis *et*

al. 2008). Mikroorganizma tarafından çabuk fermente edilen karbonhidratların iyi bir sitrik asit üretimi için gerekli olduğu bildirilmektedir (Soccol *et al.* 2006, 2008). Glukoz üzerinden verim (g/g) 100 g/L'nin altındaki konsantrasyonda önemli ölçüde azalmakta, 50 g/L'nin altındaki konsantrasyonlarda ise sadece az miktarda sitrik asit üretilebilmektedir (Kubicek 2001).

Sitrik asit üretiminde verimli ve ekonomik bir üretim için karbonhidrat içeren birçok doğal substrat kullanılabilir (Karasu-Yalçın vd 2010a). *Y. lipolytica*, *C. guilliermondii* ve *C. oleophila* gibi mayalar, küflerden daha geniş bir karbon kaynağı kullanımına sahip olabilmektedir. Ayrıca, mayalar metal iyonlarına ve yüksek substrat konsantrasyonlarına daha fazla tolerans göstermekte ve yüksek dönüşüm oranları gibi bazı avantajları nedeniyle daha az rafine edilmiş substratları kullanabilmektedir (Kamzolova *et al.* 2005).

Nişasta hidrolizinden elde edilen glukoz şurubu, şeker pancarı melası ve düşük kalitedeki şeker kamışı yan ürünleri, endüstriyel üretimlerde en çok tercih edilen substratlardır. Sitrik asit üretiminin verimi, kesikli sistemlerde başlangıç şeker konsantrasyonuna veya kemostatta glukozun besleme hızına bağlı olarak artmaktadır (Max *et al.* 2010).

Sitrik asit üretimi, azot kaynağının cinsi ve konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilenmektedir (Soccol *et al.* 2006, 2008). Azot kaynağı olarak amonyum sülfat, amonyum klorür, malt ekstraktı, pepton, üre (Vandenbergh *et al.* 1999), maya ekstraktı, et ekstraktı, soya fasülyesi (Hamissa *et al.* 1981), amonyum, sodyum ve potasyum nitrat (Grewal and Kalra 1995) kullanılabilir. Sitrik asit üretiminde pH değerinde düşüşe neden olduğu için asit amonyum bileşikleri tercih edilebilmektedir (Soccol *et al.* 2006). Üretimde mayalar kullanıldığında azot kısıtlaması yapılması sitrik asit birikimi için gereklidir. Bunun nedeni, sitrat sentazın amonyum iyonlarının varlığından negatif yönde etkilenmesidir (Fickers *et al.* 2020). Azot kısıtlaması yüksek miktarda glukoz ile birleştiğinde mayalar tarafından gerçekleştirilen sitrik asit üretimi için önemli hale gelmektedir. Diğer taraftan, sitrik asit, hücre içi azot kısıtlaması ile uyarılan, enerji bağımlı özel bir taşıma sistemi tarafından salgılanmaktadır (Demain and Sanchez 2012).

Mayalar ile yapılan sitrik asit biyosentezinde yüksek C/N oranı önemli bir rol oynamaktadır. Substrattaki azot eksikliği, hücre içi AMP konsantrasyonunda hızlı bir azalmaya yol açmaktadır. Hücredeki AMP konsantrasyonunun aşırı azalması izositrik asidi α -ketoglutarik asite dönüştüren izositrat dehidrogenaz aktivitesini azaltmaktadır. Bu tür koşullar ise hücre içinde fazla miktarda izositrik asidin birikimine yol açmaktadır (Kieliszek *et al.* 2017).

Melas gibi bazı ortamların azot bakımından zengin olmaları, sitrik asit üretiminde ek nitrojen kaynaklarına ihtiyaç duyulmamasını sağlamaktadır (Max *et al.* 2010). Amonyum nitratın %0,25'ten daha yüksek konsantrasyonlarının oksalik asit birikimine neden olduğu,

ayrıca amonyum sülfatın, oksalik asit birikimine neden olmadan sitrik asit üretimini artırdığı bildirilmektedir (Grewal and Kalra 1995).

Sitrik asit verimi üzerinde ortamdaki fosfat varlığı önemli bir rol oynamaktadır. Düşük fosfat seviyeleri sitrik asit üretimi üzerinde pozitif bir etkiye sahipken, fosfat fazlalığının CO₂ fiksasyonunda bir azalmaya yol açtığı ve bazı şeker asitlerinin oluşumunu ve hücre gelişimini teşvik ettiği bildirilmektedir (Soccol *et al.* 2006). Bunun yanı sıra, yüksek oranda sitrik ve izositrik asit üretiminin, azot veya kükürt, fosfor ve magnezyum gibi maya gelişimini etkileyen bileşenler tarafından kısıtlanmasıyla gerçekleştirildiği vurgulanmıştır (Kamzolova *et al.* 2005).

Üretimde kullanılacak başlangıç pH değeri, mikroorganizma, substrat ve üretim tekniği açısından önemli bir parametredir. pH değeri mikrobiyal metabolik aktivitelere bağlı olarak değişmekte ve sitrik asit vb. organik asitlerin ortama salınımıyla pH değeri düşmektedir (Soccol *et al.* 2008). Mayaların kullanıldığı proseslerde ortamın başlangıç pH değerinin genellikle 5,0-6,5 arasında değiştiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (Hamissa *et al.* 1981; Wojtatowicz *et al.* 1991; Venter *et al.* 2004; Anastassiadis *et al.* 2005; Moeller *et al.* 2007; Papanikolaou *et al.* 2008a, 2008b; Mafakher *et al.* 2010; Morgunov *et al.* 2013; Fu *et al.* 2015; Kamzolova *et al.* 2018). Mayalar ile yapılan sitrik asit üretimlerinde pH değeri 5'in altına düştüğünde sitrik asit yerine eritritol, arabitol ve mannitol gibi polialkollerin üretildiği belirtilmiştir (Karasu *et al.* 2010b). Ayrıca, doğal *Y. lipolytica* suşları ile yapılan üretimlerde düşük pH değerinin sitrik asit oluşumunu engelleyen bir faktör olduğu belirtilmiştir (Rzechonek *et al.* 2019).

Oksijen, mikrobiyal gelişme ve metabolit üretimi için çok önemli bir parametredir (Ferreira *et al.* 2016). Çözünmüş oksijen konsantrasyonu, mayalar tarafından üretilen organik bileşiklerin miktarını ve türünü etkilemektedir (Ferreira *et al.* 2016). Sitrik asit üretimi aerobik bir süreç olduğundan oksijen üretimde önemli bir rol oynamaktadır (Grewal and Kalra 1995; Soccol *et al.* 2006; 2008). Sitrik asit verimi, havalandırma hızındaki artışa bağlı olarak artmakta ve fermantasyon süresi kısalmaktadır (Grewal and Kalra 1995; Soccol *et al.* 2006). Kesikli fermantasyon sırasında havalandırma kesintisi oldukça zararlı bulunmaktadır (Soccol *et al.* 2006). Üretim için çalkalama oranının belirlenmesi çok önemlidir. Bunun sebebi, havalandırma hızı yüksek olduğunda daha az hücre-substrat etkileşimine yol açılması veya hücre canlılığının azaltılabilmesidir (Crolla and Kennedy 2004). Fermantasyonun başlangıcında düşük oksijen seviyelerinin seçilmesi ekonomik olarak avantajlı görülmektedir. Derin fermantasyonda hava ile oksijen kombinasyonu sitrik asit üretimini artırmakta, ancak bu ekonomik olarak mümkün olmamaktadır. Gelişme fazı sırasında yüksek havalandırma seviyeleri ise fazla miktarda köpük oluşumuna neden olabilmektedir. Bu nedenle, köpük önleyici maddelerin eklenmesi ve mekanik köpük gidericilerin kullanılması gerekmektedir (Soccol *et al.* 2008).

Sitrik asit üretiminde etil alkol bir substrat olarak kullanıldığında yüksek verimler elde edilebilmektedir (Arzumanov *et al.* 2000; Finogenova *et al.* 2002). Saf formdaki alkoller sitrik asit üretimini inhibe edebilmekte ancak ham karbonhidrat olarak ilave edildiğinde üretimi artırmaktadır (Soccol *et al.* 2008). Sitrik asit üretiminde kullanılan metanol, etanol, n-propanol veya izopropanol gibi alkoller, %1-5 düzeyinde ilave edildiklerinde metallerin negatif etkilerini genellikle nötralize etmektedir (Soccol *et al.* 2006, 2008). Uygun miktarda metanol ve etanol kullanımı, ortamın türüne ve bileşimine bağlı olarak değişmektedir (Vandenbergh *et al.* 1999; Soccol *et al.* 2006, 2008).

Çinko, demir, bakır, manganez ve magnezyum gibi metal iyonları sitrik asit üretimine etki gösteren önemli minerallerdir (Soccol *et al.* 2006). Çinko ve demir gibi iz elementler bazı metaloenzimlerin integral bileşenleri olarak maya metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Çinko dehidrojenazlar, aldolazlar, polimerazlar ve proteazların bir bileşeni olarak bulunmaktadır. Etanolün substrat olarak kullanıldığı proseslerde, mayalar daha fazla çinkoya ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca, farklı maya türlerinde çinko kısıtlaması altında NAD-bağımlı alkol dehidrojenaz (ADH) aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmektedir. Bunlara ek olarak, hücre yapısının ve bazı organellerin stabilizatörü olarak rol aldığı için çinko önemli bir element olarak değerlendirilmektedir (Finogenova *et al.* 2002).

Demir iyonları, aldehit dehidrojenaz (ALDH), akonitat hidrataz (AH), katalaz, peroksidaz ve mitokondriyal elektron transfer zincirinin bileşenleri gibi enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkili olmaktadır (Finogenova *et al.* 2002). Sitrik asit üretimi için az miktarda demir kullanılarak oluşturulan ortamın daha uygun olduğu, fakat döngüdeki akonitazın demire gereksinim duyduğunun unutulmaması gerektiği vurgulanmaktadır (Waites *et al.* 2001). Ek olarak, sitrik asit üretiminde yüksek verim, az miktarda bakır iyonu ile sağlanabilmektedir (Soccol *et al.* 2006).

Manganez, idiofaz metabolizmasını önemli ölçüde etkilemektedir. Manganez varlığında hücre gelişimi artarken, şeker tüketimi ve asidogenez ise şiddetli bir şekilde azalmaktadır. Manganez eksikliği, sitrat sentaz hariç, TCA döngüsü enzimlerinin baskılanmasıyla sonuçlanmakta ve bu olay, sitrik asidin fazla birikimine yol açmaktadır. Öte yandan, magnezyum sitrik asit üretimi ve hücre gelişiminde rol alan bir metal olarak önemlidir (Grewal and Kalra 1995).

Candida lipolytica, *Endomycopsis lipolytica* ve *Saccharomycopsis lipolytica* isimleriyle de bilinen *Yarrowia lipolytica* (Barth and Gaillardin 1997) patojenik olmayan bir tür olup FDA tarafından GRAS olarak sınıflandırılmaktadır (Cavallo *et al.* 2017). Bu maya “*lipolytica*” tür adını lipitleri hidrolize edebilme kabiliyetinden almaktadır. Hemiascomycetes ailesine ait

olduğu bildirilmiştir (Nicaud 2012). *Y. lipolytica*'nın peynir, yoğurt, sosis (Cavallo *et al.* 2017), çığ kümes hayvan etleri (Coelho *et al.* 2010) gibi ürünlerden izole edildiği bildirilmektedir.

Y. lipolytica, mayalarda dimorfizm çalışmaları için uygun bir model olarak değerlendirilmektedir. Bu maya türü ayrıca, heterolog proteinlerin ekspresyonu için çok yönlü bir sistem haline gelmektedir. Bu mikroorganizma tarafından salgılanan en önemli ürünlerden biri de lipaz enzimidir. *Y. lipolytica* suşlarının diğer bir avantajı ise zeytindeğirmeni atık suyu bulunan besiyerinde gelişebilmeleri ve yüksek değerli bileşikler üretebilmeleridir. Bu maya, hücre duvarı özellikleri ve sürfektan üretimi nedeniyle, biyoremediasyon uygulamaları için de kullanılmaktadır. Bir çok *Y. lipolytica* suşu alifatik ve aromatik hidrokarbonlar dahil çeşitli organik bileşiklerin ayrıştırılması için biyosürfektan üretimi sağlayabilmektedir (Coelho *et al.* 2010). Bunlara ilaveten, *Y. lipolytica* sitrik asit üretimi için iyi bir üretici olarak nitelendirilmektedir (Rzechonek *et al.* 2019).

Y. lipolytica'nın yanı sıra farklı maya türleri de sitrik asit üretiminde kullanılabilir. *Candida zeylanoides* sitrik asit üretebilen mayalar arasında değerlendirilirken (Csutak and Sarbu 2018), ticari lipaz üretimi için de iyi bir kaynak olduğu belirtilmektedir (Klein and Favreaou 1995). Bununla birlikte, *C. zeylanoides*'in süksinik asit üretebildiği de bildirilmiştir (Kamzolova *et al.* 2009; Mitrea *et al.* 2019). Ayrıca, eritritol üretimi (Hattori and Suzuki 1974) ve azo boyalarının degradasyonunda (Martins *et al.* 1999; Ramalho *et al.* 2002; Jafari *et al.* 2014; Šlosarčíková *et al.* 2020) da bu türden yararlanılmaktadır. Bunların yanı sıra *C. zeylanoides*, lipid metabolizması çalışmaları için bir model olarak önerilmektedir (Dallé da Rosa *et al.* 2014).

Askılı mantar sınıfında olan *C. zeylanoides* (Ramalho *et al.* 2002) diğer adıyla *C. cylindraceae*'nin toprak, bazı bitkiler (yonca) su, et, balık derisi gibi bazı kaynaklardan izole edilen bir maya olduğu bildirilmiştir (Klein and Favreaou 1995). *C. zeylanoides*, hem düşük sıcaklıklara hem de yüksek tuz konsantrasyonlarına toleranslı olması nedeniyle işlenmiş et ürünlerinden de sıklıkla izole edilebilmektedir (Encinas *et al.* 2000; Mortensen *et al.* 2008; Giarratana *et al.* 2014; Öztürk ve Sağdıç 2014; Öztürk 2015).

Mevcut araştırmada, pastırmadan izole edilen ve genetik olarak tanımlanan 16 *Candida zeylanoides* suşunun bazı teknolojik özellikleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar dikkate alınarak seçilen *Candida zeylanoides* suşunun farklı şartlarda sitrik asit üretim kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada sitrik asit üretiminde farklı koşullar denenmiş ve en iyi sonuç veren optimum üretim şartları belirlenmiştir. Bunun yanı sıra sitrik asit üretim prosesinin bir yan ürünü olan izositrik asit miktarı, fermantasyon sonundaki biyokütle ve kalan glukoz miktarı belirlenerek üretim verimleri de hesaplanmıştır.

KAYNAK ÖZETİ

Sitrik asit, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir katkı maddesidir. Bu asidin endüstriyel üretiminde mayaların kullanılmasının bazı avantajlarının olduğu sıklıkla vurgulanmaktadır (West 2013; Hesham *et al.* 2020). Ancak, bu mikroorganizmaların kullanıldığı proseslerde izositrik asit üretimi bir dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır (Karasu-Yalçın vd 2010b; Höfer 2015; Cavallo *et al.* 2017).

Candida zeylanoides KY6166 suşu kullanılarak 30°C'de 600 rpm çalkalama hızındaki fermentörde gerçekleştirilen sitrik asit üretime yönelik bir çalışmada, substrat olarak %10 (w/v) n-alkan kullanılmış ve 100 saat sonunda en yüksek üretim miktarı pH 5,5'te 87 mg/mL, en düşük üretim miktarı ise pH 3,0'te 10,8 mg/mL olarak belirlenmiştir. Araştırmada, farklı azot kaynaklarının etkisi de incelenmiş ve pH 3,5'te, yine 100 saat sonunda 10 ve 30 mg/mL mısır maserasyon sıvısı kullanıldığında maksimum sitrik asit miktarı sırasıyla 13,4 ve 13,2 mg/mL olarak rapor edilmiştir (Hattori and Suzuki 1974).

Briffaud and Engasser (1979) tarafından yürütülen araştırmada, *Saccharomycopsis lipolytica* D1805 suşu, 100 g/L glukoz içeren ortamda geliştirilmiş ve fermentörde gerçekleştirilen 80 saatlik üretimin sonunda sitrik ve izositrik asit miktarı sırasıyla 95 ve 10 g/L olarak tespit edilmiştir.

Good *et al.* (1985), *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC 20228 ve mutanı NTG9'un sitrik asit üretim miktarlarını karşılaştırmak üzere yürüttükleri araştırmada, kanola yağını substrat olarak değerlendirmiş ve 216 saat sonunda *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC 20228 ve mutanı NTG9'un sitrik asit miktarını sırasıyla 109,3 ve 137,5 g/L olarak, izositrik asit miktarını ise 75,3 ve 49,2 g/L olarak rapor etmiştir.

Y. lipolytica mutanı ile yürütülen çalışmada, tek karbon kaynağı olarak kullanılan etanol besisi ortamına periyodik olarak eklenmiş ve miktarı 1,2 g/L'yi geçmeyecek şekilde ayarlanmıştır. Araştırmada, tekrarlanan kesikli sistemdeki en iyi sonuçların her 3 günde bir %50 ve %80 beslemeyle elde edilmesinin, kesikli ve tekrarlanan kesikli sistemler karşılaştırıldığında ise en fazla sitrik asit miktarına (116,8 g/L) kesikli sistemde ulaşılmasının çalışmanın önemli sonuçlarından olduğu özellikle vurgulanmıştır (Arzumanov *et al.* 2000).

Pazouki *et al.* (2000) yaptıkları araştırmada, *Aspergillus niger* NCIM 548 ve *Candida lipolytica* NCIM 3472 suşlarının sitrik asit üretime substrat, substrat başlangıç oranı ve metanol ilavesi faktörlerinin etkilerini incelemiştir. Analizler sonucunda, en yüksek sitrik asit miktarının (12 g/L) *A. niger* NCIM 548 suşunun 60 g/L melas bulunan ortama metanol ilave

edilip geliştirildiğinde ulaşıldığı rapor edilmiştir.

Crolla and Kennedy (2001) tarafından *Y. lipolytica* NRRL-Y-1095 suşu kullanılarak erlenlerde gerçekleştirilen sitrik asit üretiminde, Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile üretim şartları optimize edilmiş ve en yüksek sitrik asit miktarına (9,8 g/L) %10-12 başlangıç biyokütle, %10-15 n-paraffin, 10 mg/L demir nitrat seviyesi ve 26-30°C sıcaklık koşullarında erişildiği sonucuna varılmıştır. Aynı araştırmacılar tarafından fermentörde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise sadece üre ve kalsiyum karbonat içermeyen ve başlangıç substrat konsantrasyonu 157 ml/L'den 166 ml/L'ye yükseltilmiş aynı besi ortamında 168 saat sonunda 12 g/L düzeyinde sitrik asit elde edilmiştir (Crolla and Kennedy 2004).

Anastassiadis *et al.* (2002) tarafından *Candida oleophila* ATCC 20177 ile yürütülen bir araştırmada, sitrik asit miktarı erlenlerde 50,1 g/L, beslemeli kesikli fermentasyonda ise 80 g/L olarak saptanmıştır. Ayrıca, amonyum nitrojenin sitrik asit oluşumu için sınırlayıcı substrat olduğu, sitrik asit salınımının ortamdaki azotun tükenmesinden birkaç saat sonra başladığı, biyokütlenin, gelişme fazında daha az karbon ve daha fazla iz element içerdiği ve düşük hücre içi azot içeriği ve hücre içi NH_4^+ konsantrasyonunun artmasının sitrik asit üretimini tetiklediği vurgulanmıştır.

Y. lipolytica N1 mutanı kullanılarak yürütülen bir çalışmada, etanol, çinko, demir (Fe^{+2} ve Fe^{+3}) konsantrasyonu ve oksijen seviyesinin hücre gelişimine, sitrik asit ve izositrik asit üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Analizler neticesinde; azotla maya gelişiminin sınırlanmasıyla sitrik asit üretiminin arttığı, sitrik asit ve izositrik asidin etanolden elde edilmesi sırasında yüksek konsantrasyonlarda çinko ve demir iyonlarına gereksinim duyulduğu, hücre içi demir konsantrasyonunun sitrik asit ve izositrik asit üretiminde önemli bir etken olduğu, 2,5 mg/g hücre içi demir içeriği ve %20 düzeyinde hava doygunluğu kombinasyonunda sitrik ve izositrik asit miktarının sırasıyla 23,2 g/L ve 1,3 g/L olduğu rapor edilmiştir (Finogenova *et al.* 2002).

Kamzolova *et al.* (2005) yürüttükleri araştırmada, fermentörde 144 saat süre ile kolza tohumu yağı bulunan ortamda geliştirilen *Y. lipolytica* 187/1 suşunun ürettiği maksimum sitrik asit miktarını 135 g/L olarak tespit etmişlerdir. Aynı araştırmada kütle verimi ve enerji verimi ise sırasıyla 1,55 ve 0,41 olarak tespit edilmiştir.

Biyoreaktörde bulunan ham gliserolde geliştirilen 3 farklı *Y. lipolytica* (K-1, AWG-7 ve 1.31) suşu kullanılarak yürütülen bir çalışmada, *Y. lipolytica* 1.31'in daha fazla sitrik asit ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, başlangıç ham gliserol konsantrasyonunun 200 g/L düzeyinde olması durumunda 124,5 g/L sitrik asit elde edildiği ve bu şartlarda biyokütle ve izositrik asit miktarının ise sırasıyla 16,5 ve 3,9 g/L olduğu belirlenmiştir (Rymowicz *et al.* 2006).

Karbon kaynağı olarak sükrözün kullanıldığı bir çalışmada, *Y. lipolytica* H222-S4 (p67ICL1) T5 suşu ile fermentörde gerçekleştirilen üretimde, besiyeri başlangıç pH değerlerinin sitrik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Analizler sonucunda pH 5,0, 6,0 ve 6,8 için sırasıyla 87, 127 ve 140 g/L sitrik asit miktarı tespit edilmiştir (Förster *et al.* 2007).

Imandi *et al.* (2007) tarafından yürütülen çalışmada, *Y. lipolytica* NCIM 3589 suşunun sitrik asit üretim koşulları CYY yöntemi kullanılarak optimize edilmiş ve 0,2682 g/L maya ekstraktı, 54,4081 g/L ham gliserol ve %13,6936 tuz içeren besi ortamında optimum koşullarda 77,4 g/L sitrik asit üretildiği tespit edilmiştir.

Yirmi yedi *Y. lipolytica*, 2 *Aciculoconidium aculeatum* (NRRL YB-4297 ve YB-4298) ve 3 *Candida* (*C. hispaniensis* NRRLY-5579, NRRLY-5580 ve *C. bentonensis* NRRL YB-2364) suşunun sitrik asit üretim kapasitesinin incelendiği bir çalışmada, *Aciculoconidium aculeatum* ve *Candida* suşlarının sitrik asit üretmediği, en iyi sitrik asit/izositrik asit oranının ise *Y. lipolytica* NRRL YB-423 suşu ile elde edildiği tespit edilmiş ve maksimum sitrik asit miktarına (21,8 g/L) C/N oranı 686 olarak ayarlandığında ulaşılmıştır (Levinson *et al.* 2007).

Y. lipolytica UOFS Y-1701 suşunun ayçiçek yağı (30 g/L) içeren bir ortamda geliştirildiği bir çalışmada, besi ortamına 10 g/L sodyum asetat ilavesinin sitrik asit miktarını 0,5 g/L'den 18,7 g/L'ye artırdığı tespit edilmiştir (Venter *et al.* 2004). Yine ayçiçek yağı kullanılan bir besiyeri ortamında geliştirilen *Y. lipolytica* VKM Y-2373 suşunun mevcudiyetinde ise 144 saatin sonunda 68 g/L sitrik ve 55 g/L izositrik asit elde edildiği rapor edilmiştir (pH 4,5). Aynı çalışmada, pH 6,0'da izositrik asit miktarında artış (70 g/L), sitrik asit miktarında ise düşüş (50,5 g/L) tespit edilmiştir. *Y. lipolytica* N 15 mutanı ve ayçiçek yağı kullanılarak yürütülen bir çalışmada ise sitrik asit üretiminin ortamdaki azotun tükenmesinden sonra başladığı ve maksimum sitrik asit miktarının 144 saat sonunda 150 g/L'ye ulaştığı rapor edilmiştir (Kamzolova *et al.* 2008).

Papanikolaou *et al.* (2008b) yürüttükleri bir çalışmada, *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 suşunu gliserol bulunan azot sınırlı ortamda geliştirmiş ve bu suşun yüksek gliserol konsantrasyonlarında bile iyi derecede biyokütle üretimi sergilediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar maksimum sitrik asit miktarının ise 600 saat sonunda 7,4 g/L biyokütle ve substrat üzerinden 0,56 verimle 62,5 g/L olduğunu belirtmişlerdir.

Y. lipolytica Wratistlavia K1 suşu ve karıştırmalı tank reaktör kullanılarak yürütülen bir çalışmada, 150 g/L gliserol (toplam gliserol konsantrasyonu 250 g/L) içeren bir ortamda 168 süre sonunda 110 g/L sitrik asit tespit edilmiştir. En yüksek biyokütle (34 g/L) ve en düşük sitrik asit miktarı (72 g/L) ise 30 g/L başlangıç gliserol konsantrasyonu içeren ortam varlığında

(toplam gliserol konsantrasyonu 200 g/L) 100 saat sonunda elde edilmiştir (Rymowicz *et al.* 2008).

André *et al.* (2009) tarafından 3 farklı *Y. lipolytica* suşu (LFMB 19, LFMB 20 ve ACA-YC 5033) kullanılarak yürütülen bir çalışmada, 30 g/L gliserol seviyesinde tüm suşların iyi bir gelişme sergilediği, en yüksek sitrik asit miktarını *Y. lipolytica* ACA-YC 5033 suşunun verdiği tespit edilmiştir. Seçilen bu suşun mevcudiyetinde, substrat konsantrasyonunun 70 g/L'den 120 g/L'ye artırılmasının (artan süre ile beraber), biyokütle ve sitrik asit miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Maksimum sitrik asit miktarı (50,1 g/L) ise 120 g/L gliserol içeren üretim ortamında 375 saat sonunda elde edilmiştir.

Karasu-Yalçın vd (2009a) tarafından yürütülen çalışmada, *Y. lipolytica* 57 suşu 160 g/L gliserol içeren ortamda geliştirilmiş ve 418 saat sonunda 32,8 g/L sitrik asit elde edilmiştir. Aynı sürede, başlangıç gliserol konsantrasyonlarının 80 veya 120 g/L olması durumunda ise sitrik asit miktarı sırasıyla 14,6 ve 29,3 g/L olarak hesaplanmıştır.

Makri *et al.* (2010) *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 suşuyla yürüttükleri çalışmada, 27,8 g/L başlangıç gliserol seviyesinde 3,87 g/L, 104,9 g/L gliserol içeren ortamda ise aynı süre sonunda 13,83 g/L sitrik asit elde etmişlerdir. Ayrıca başlangıç substrat konsantrasyonunun artırılmasının biyokütle miktarını da önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir.

Rymowicz *et al.* (2010) yaptıkları araştırmada, biyoyakıt endüstrisinin gliserol içeren atığı ile oluşturulan besi ortamında geliştirilen *Y. lipolytica* A-101-1.22 suşunun 112 g/L sitrik asit ürettiğini, biyosentezin başlangıcında maksimum olan spesifik sitrik asit üretim hızının son üretim aşamasında yavaş yavaş azaldığını ve işlemin 100 saat boyunca devam ettiğini bildirmişlerdir.

Biyoyakıt üretiminden elde edilen gliserol ve gliserol içeren atığın karbon kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada, 66 maya suşu (*Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* ve *Yarrowia*) asit üretim potansiyeli açısından incelenmiştir. Sonuç olarak, *Yarrowia* türüne ait 41 suşun asit üretebildiği, asit üreten bu suşlardan *Y. lipolytica* N15'in üretici suş olarak değerlendirilebileceği tespit edilmiştir. Seçilen bu suşun saf gliserol içeren besiyerinde 144 saat geliştirildiğinde 98 g/L sitrik asit ve 3,3 g/L izositrik asit, gliserol içeren atık ortamında geliştirildiğinde ise 71 g/L sitrik asit ve 5,6 g/L izositrik asit ürettiği rapor edilmiştir (Kamzolova *et al.* 2011a).

Kamzolova *et al.* (2011a) tarafından *Y. lipolytica* NG40/UV7 mutanı kullanılarak yürütülen çalışmada, bu mutantın 168 saatin sonunda 175 g/L sitrik asit ve 5,6 g/L izositrik asit ürettiği ve sitrik asit/izositrik asit oranının 32:1 olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu sonucun

kolza tohumu yağı üzerinde geliştirilen bu mutantın düşük miktarda yan ürün, yüksek miktarda sitrik asit üretmesinden ileri geldiğini de vurgulamışlardır.

Lazar *et al.* (2011) yaptıkları araştırmada, *Y. lipolytica* A-101-B56-5 suşunu gliserol, sükröz ve glukoz içeren ortamlarda geliştirmiş ve sitrik asit miktarını sırasıyla 57,15 g/L, 45,02 g/L ve 46,25 olarak saptamışlardır. Konu ile ilgili diğer bir çalışmada ise *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 suşu kullanılarak yapılan üretimde, 550 saat sonunda 22,2 g/L biyokütle varlığında sitrik ve izositrik asit miktarı sırasıyla 97,8 ve 5,1 olarak saptanmıştır (Rywińska *et al.* 2011). Aynı suş ile biyoreaktörde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise substrat olarak gliserol kullanılmış ve 16,4 g/L biyokütle varlığında ve pH 5,5'te sitrik asit ve izositrik asit miktarının sırasıyla 85,7 ve 3,1 g/L olduğu rapor edilmiştir (Tomaszewska *et al.* 2014).

Çalkalama hızı ve havalandırma hızının sitrik asit miktarı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yürütülen bir çalışmada, çalkalama hızı (>800 rpm) ve havalandırma hızındaki (>0,36 vvm) artışın çözünmüş oksijen konsantrasyonu ve sitrik asit üretimi üzerinde etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmada ayrıca, maksimum sitrik asit miktarı (92,8 g/L) ve verimin (0,63 g/g) *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 suşu ile 0,24 vvm havalandırma hızında elde edildiği bildirilmiştir (Rywińska *et al.* 2012).

Morgunov *et al.* (2013) tarafından yürütülen bir araştırmada, saf gliserol kullanarak hazırlanan üretim ortamında geliştirilen *Y. lipolytica* NG40/UV7 suşu ile 192 saat süren kesikli beslemeli üretimde 115 g/L sitrik asit elde edildiği bildirilmiştir. Aynı araştırmada, kütle verim katsayısı 0,64 g/g ve izositrik asit miktarı 4,6 g/L olarak hesaplanmıştır. Substrat olarak ham gliserolün kullanılması durumunda ise sitrik asit, izositrik asit ve kütle verim katsayısı değerleri sırasıyla 112, 5,3 g/L ve 0,90 g/g olarak rapor edilmiştir.

Çelik *et al.* (2014) 22 *Y. lipolytica* suşunun organik asit üretim kapasitelerini belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmada, seçici bir besi ortamında iki suşun (*Y. lipolytica* TEM YL 3 ve *Y. lipolytica* TEM YL 20) en yüksek organik asit üretme kabiliyetine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca ayçiçek yağı içeren üretim ortamında en yüksek sitrik asit üretimi *Y. lipolytica* TEM YL 3 için 66,2 g/L, *Y. lipolytica* TEM YL 20 için ise 50 g/L olarak saptanmıştır.

Souza *et al.* (2014) *Y. lipolytica* UFLA CM-Y9.4 suşu ile optimum sitrik asit üretim koşullarını belirlemek amacıyla yürüttükleri araştırmada, başlangıç substrat konsantrasyonunu, çalkalama ve sıcaklık parametrelerini faktör olarak belirlemişlerdir. Analizler sonucunda maksimum sitrik asit miktarı için belirlenen optimum koşullar; 38,4 g/L başlangıç ham gliserol miktarı, 184 rpm çalkalama hızı ve 30°C olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, sitrik asit üretiminin hücre dışı azot gelişme için sınırlayıcı bir faktör olduğunda ve durağan fazdan sonra gerçekleştiğini vurgulamışlardır.

Kim *et al.* (2015) tarafından yürütülen araştırmada, *C. tropicalis* (ATCC 20115, *C. oleophila* ATCC 20373 ve ATCC 20177), *C. zeylanoides* ATCC 20367, *Y. lipolytica* (ATCC 20237, ATCC 20346, ATCC 46330) ve *Saccharomycopsis lipolytica* IFO1658 suşlarının sitrik asit üretim kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Üretim derin fermantasyon tekniği kullanılarak suşların melas bulunan ortamda geliştirilmesiyle gerçekleştirilmiş ve *C. zeylanoides* ATCC 20367 suşununun 91,4 g/L ile en yüksek üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sabra *et al.* (2017) *Y. lipolytica* ACA DC 50109 suşu ile gerçekleştirdikleri sitrik asit üretiminde, çözünmüş oksijen konsantrasyonunun kontrolünün, glukozun tek veya çift substrat halinde kullanılması durumunda sitrik asit üretimini önemli ölçüde artırdığını saptamışlardır. Substrat olarak sadece gliserol kullanılması durumunda, çözünmüş oksijen konsantrasyonunun sitrik asit üretimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı da belirlenmiştir. Ayrıca glukoz ve gliserol ile karışırılmış substrat bulunan fermantasyon ortamında geliştirilen üretici suşun substrat olarak gliserolü tercih ettiği, çözünmüş oksijen konsantrasyonu kontrolü ile optimum koşullarda glukoz ve karışım kullanılan besi ortamlarında ise sırasıyla 55 ve 50 g/L sitrik asit elde edildiği tespit edilmiştir.

Etanolden izositrik asit üretmek amacıyla yürütülen bir çalışmada, üretim üzerinde sıcaklık, pH ve havalandırma faktörlerinin etkileri incelenmiş ve üretici suş olarak *Y. lipolytica* VKM Y-2373 seçilmiştir. Araştırmada, 29°C’de gerçekleştirilen kültivasyon boyunca, gelişme fazında pH 5,0 ve %20-25 hava doygunluğu, asit üretim fazında ise pH 6,0 ve %50-55 hava doygunluğuunda besi ortamına çinko (0,6 mg/L), demir (1,2 mg/L) ve 30 mM itakonik asit (izositrat liyaz inhibitörü – izositrik asit metabolizmasının anahtar enzimi) dahil edilmiştir. Belirlenen fermentasyon koşullarında 90,5 g/L izositrik asit elde edildiği, en düşük sitrik asit miktarının (12,10 g/L) pH 7,0’de, en yüksek sitrik asit miktarının (40,15 g/L) ise pH 4,5’te belirlendiği rapor edilmiştir. Ayrıca, en yüksek (59 g/L) ve en düşük (12,33 g/L) izositrik asit miktarları sırasıyla pH 6,0 ve 7,0’de belirlenmiştir (Kamzolova *et al.* 2018).

Glukozun substrat olarak kullanıldığı azot sınırlı ortamda geliştirilen *Y. lipolytica* W29 suşununun sitrik asit ve lipit üretiminin araştırıldığı bir çalışmada, sitrik asit miktarının nötr pH değerinde arttığı saptanmıştır (Zhang *et al.* 2019).

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Mikroorganizmalar

Araştırmada pastırmadan izole edilen ve genetik olarak tanımlanan 16 adet *Candida zeylanoides* suşu (3.13, 4.1, 4.6, 4.12, 4.14, 7.9, 7.10, 7.12, 8.1, 8.3, 8.4, 11.9, 12.3, 13.5, 13.7 ve 13.13) kullanılmıştır (Kaya *et al.* 2017). *Y. lipolytica* Y-1094 (ATCC 8662), *Y. lipolytica* YB 423 (ATCC 18942) ve *Y. lipolytica* IFP29 (ATCC 20460) suşları ise kontrol olarak değerlendirilmek üzere incelenmiştir. *Y. lipolytica* Y-1094 (ATCC 8662) kontrol olarak seçilerek deneysel tasarıma dahil edilmiş elde edilen sitrik asit miktarları seçilen yerel *C. zeylanoides* 7.12 suşu ile karşılaştırılmıştır. Suşlar, Malt Extract Broth (MEB) besiyerinde geliştirilmiş ve MEB besiyeri+gliserol içerisinde (%50 v/v) -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Besiyerleri

Mayaların aktifleştirilmesi için MEB besiyeri kullanılmıştır. Aktif kültürler daha sonra Tablo 2’de verilen modifiye besiyerine aktarılmış ve Tablo 7’de verilen deneysel tasarıma uygun olarak yürütülen şartlarda sitrik asit üretimi açısından test edilmiştir.

Tablo 2. Sitrik asit üretimi için kullanılan modifiye besiyeri bileşimi (Rane and Sims, 1993; Papanikolaou *et al.* 2002)

Bileşen	Miktar (g/L)
Glukoz	125/150/175
Maya ekstraktı	0,5
NH ₄ Cl	1,5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5
CaCl ₂	0,15
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,15
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ 7H ₂ O	0,06
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
CuSO ₄	0,02
Tiamin	0,001

Yöntem

Suşların bazı özelliklerinin belirlenmesi

Suşların farklı koşullarda gelişimlerinin incelenmesi

Mikroorganizmaların farklı koşullarda gelişim düzeylerinin belirlenmesi amacıyla MEB besiyerinde geliştirilen aktif kültürler, farklı glukoz ve gliserol oranlarında (%10, 15 ve 17,5) ve pH (1,5, 2,5, 4,5 ve 6,5) değerlerinde hazırlanmış besiyerlerine (5mL besiyeri/tüp) inoküle edilmiş (100 µl) ve 28°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Besiyeri pH değerlerinin ayarlanmasında 5N NaOH ve 5N HCl kullanılmıştır. Her bir suşun gelişim düzeyi inkübasyon süresinin sonunda spektrofotometre (Aquamate 9423 AQA 2000E, Thermo Scientific, England) ile 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek belirlenmiştir.

Suşların asit üretme yeteneklerinin belirlenmesi

16 *C. zeylanoides* suşundan en yüksek asit üretim yeteneğine sahip suşu belirlemek amacıyla, Tablo 2’deki besiyerine 0,4 g/L bromkrezol yeşili ve 20 g/L agar katılarak bir besiyeri hazırlanmış (Çelik *et al.* 2014) ve otoklav öncesi pH değeri 6,0’ya ayarlanmıştır. Petri plaklarına dökülen ve katı forma gelen her bir petri plağındaki besiyerine kuyular açılmış (her petri plağına bir kuyu) ve her kuyuya içinde MEB besiyeri bulunan 250 mL’lik erlenlerde (50 mL besiyeri) geliştirilen aktif maya kültürleri (50µl) ayrı ayrı ilave edilmiştir. Daha sonra 28°C’de 6 gün inkübasyona bırakılan kültürlerin asit oluşumu sonucu meydana gelen sarı renkli zon çapları ölçülmüştür. En fazla zon çapına sahip olan iki suş ise diğer testlere de tabi tutulmak üzere seçilmiştir.

MEB besiyerine 15 g/L agar katılarak hazırlanan besiyerinde, 24 saat geliştirilen aktif kültürlerden (50 mL besiyeri/250mL’lik erlen) yayma usulü ekim yapılmış ve fermantasyon ortamına ilave edilen kültürlerin inokülasyon düzeyleri belirlenmiştir.

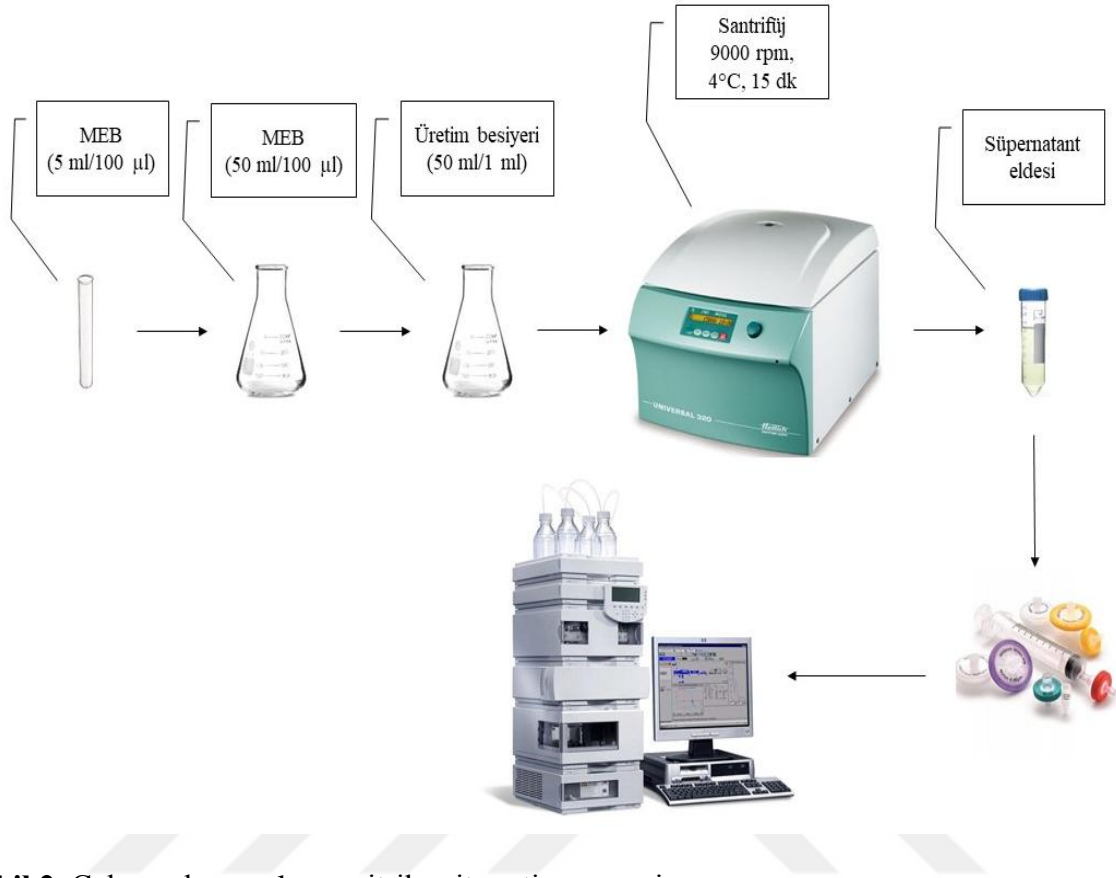
Mikrobiyal gelişim eğrilerinin oluşturulması

MEB besiyerinde (5mL besiyeri/tüp) geliştirilen aktif kültürler yine MEB besiyerlerine (50 mL besiyeri/250mL’lik erlen) aktarılmış (100 µL) ve 28°C’de 180 rpm çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde (JSR, JSSI-100, Korea) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim düzeyleri inkübasyon boyunca kültürlerden iki saatte bir alınan örneklerle belirlenmiştir. Alınan her bir örneğin absorbans değeri spektrofotometrede (600 nm) ölçülmüş ve zamana karşı elde edilen absorbans değerleri ile gelişim eğrileri oluşturulmuştur.

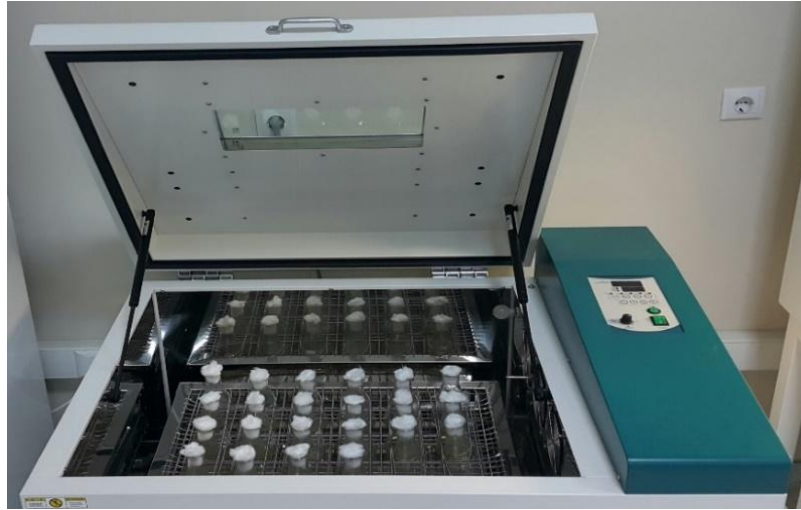
Sitrik ve izositrik asit miktarının belirlenmesi

Sitrik asit üretim prosesi ve fermantasyon süresince kullanılan çalkalamalı inkübatör

sırasıyla Şekil 2 ve Şekil 3’te verilmiştir.



Şekil 2. Çalışmada uygulanan sitrik asit üretim prosesi



Şekil 3. Çalışmada kullanılan sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatör

Suşlar MEB besiyerinde (50 mL besiyeri/250 mL'lik erlen) geliştirilmiş (28°C, 180 rpm, 24 saat) ve aktif kültürler deneysel tasarımdaki koşullara uygun olarak hazırlanan üretim ortamına (50 mL besiyeri/250mL'lik erlen) aktarılarak (1 mL) çalkalamalı inkübatörde (28°C, 180 rpm) fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon sırasında pH düşüşünü engellemek için

besi ortamına periyodik olarak (üretim ortamına yapılan inokülasyondan sonraki ilk 18 saat ve bu süreden sonraki her 24 saatte bir olmak üzere) 5N NaOH ilave edilerek pH değerinin 5,0-6,0 arasında kalması sağlanmıştır. Fermantasyon sonrası besi ortamından hücrelerin ayrılması için 9000 rpm'de 15 dk süre ile 4°C'de santrifüj işlemi uygulanmış (Hettich Universal 320R, Germany) ve elde edilen süpernatant şırınga ucu filtreden (0,45µm) geçirilerek 0,5 mL'si eşit hacimde %8'lik HClO₄ ile seyreltilip iyice karıştırıldıktan sonra sitrik ve izositrik asit ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler 210 nm'de HPLC'de (Agilent Technologies 1100 Series, USA) yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C, mobil fazın akış hızı ise 1 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Sistemde mobil faz olarak 0,01 M H₂SO₄ ve kolon olarak ters faz kolon (Inertsil ODS-3, 4.6x250 mm, GL Sciences Inc., Japan) kullanılmıştır (Kamzolova and Morgunov 2017). Sitrik asit ve izositrik asit miktarının belirlenmesinde standartlar kullanılarak çizilen kurveden yararlanılmıştır. Bu amaçla sitrik ve izositrik sit standartları (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hazırlanmış ve miktarlar bu standartlar kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi vasıtasıyla belirlenmiştir. Örnekler HPLC'de miktar tayinleri yapılanaya kadar -20°C'de bekletilmiştir.

Fermentasyon sonrası biyokütle ve pH değerinin belirlenmesi

Kuru biyokütle, fermentasyon sıvısı santrifüj edildikten sonra süpernatantın uzaklaştırılıp kalan hücrelerin bir defa distile su ile yıkandıktan sonra 80°C'ye ayarlanmış etüvde 24 saat kurutulmasıyla elde edilmiştir. Hücre biyokütlesi (g/L) sıvı besiyerinin litresinde üretilen kuru hücre ağırlığı (g/L) olarak hesaplanmıştır (Papanikolaou *et al.* 2002).

CaCO₃ kullanılarak hazırlanan besiyerinde yapılan denemelerdeki biyokütle miktarı ise fermantasyondan sonra alınan örneklerin üzerine 6N HCl ilave edilerek CaCO₃'ün çözündürülüp, ardından santrifüj edilmesiyle ayrılan hücrelerin yine 80°C'de 24 saat kurutulmasıyla elde edilmiştir (Karasu-Yalçın vd 2010c). Fermantasyon sonrası pH değeri ise santrifüj işleminden önce erlenlerde bulunan fermentasyon sıvısında pH metre (Mettler Toledo Ion S220, Switzerland) ile ölçülmüştür.

Fermentasyon sonrası kalan glukoz miktarının belirlenmesi

Fermentasyondan sonra ortamda kalan glukoz miktarı, HPLC (Shimadzu, Japan) kullanılarak belirlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant filtreden geçirildikten sonra sisteme verilmiştir. Sistemde kolon olarak, Intersil NH₂ (5µm, 250 x 4.6 mm) kolon (GL Sciences Inc., Japan) ve mobil faz olarak %75 asetonitril (%25 su) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı ise 1,3 mL/min olacak şekilde ayarlanmıştır (Anastassiadis and Rehm, 2006).

Verim hesaplamaları

- Biyokütle verimi: $Y_{X/\text{glukoz}(\text{tüketilen})}$ (g/g)
- Sitrik asit üretiminin kütle verim katsayısı: $Y_{SA/\text{glukoz}(\text{tüketilen})}$ (g/g)
- Biyokütle üzerinden sitrik asit verimi: $Y_{SA/X}$ (g/g)
- Hacimsel verimlilik: $Y_{SA/t}$ (g/L h)
- Spesifik ürün oluşum hızı: $q_{SA}=SA/(X.t)$ (g/g h)
- Glukoz alım hızı: Tüketilen glukoz miktarı/(X.t) (g/g h)
- Sitrik asit üretimi için biyoprosesin seçimliliği: S_{SA} (%)

$$S_{SA} = \frac{100 \times SA}{SA + iSA}$$

Deneysel tasarım

Asit üretim yetenekleri besiyerinde oluşan zonlar yardımıyla belirlenen suşlardan zon çapı en fazla ölçülen 2 suş (*C. zeylanoides* 7.12 ve 12.3) karbon kaynağı olarak 150 g/L düzeyinde glukoz ve gliserolün kullanıldığı besi ortamlarında (pH 6,0) 5 gün boyunca sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatörde (28°C, 180 rpm) fermentasyona bırakılmış ve HPLC’de elde edilen sonuçlara göre üretici suş ve üretimde kullanılacak substrat belirlenmiştir. Üretim için en uygun suş ve karbon kaynağı (glukoz/gliserol) belirlendikten sonra üretimin optimizasyonu için oluşturulan deneysel tasarımdaki koşullar uygulanarak sitrik asit miktarları belirlenmiştir. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY, Response Surface Methodology) kullanılarak deneysel tasarım oluşturulurken, sitrik asit üretimine etki eden önemli parametreler olduğu bilinen başlangıç pH değeri, fermentasyon süresi ve başlangıç substrat konsantrasyonu faktörleri seçilmiştir. CYY kullanılarak bu parametrelerin en yüksek sitrik asit üretimi için gerekli optimum seviyeleri belirlenmiş, ayrıca bu parametrelerin sitrik asit üretimine doğrusal, üssel ve interaksiyon etkileri de tespit edilmiştir. Bu amaçla Minitab 17.1.0 istatistik paket programından yararlanılmıştır. Program kullanılarak oluşturulan deneysel tasarım sonucunda elde edilen yanıtlar ile matematiksel bir model oluşturulmuş ve elde edilen bu model yardımıyla proses için optimum koşullar belirlenmiştir. Son aşamada, sitrik asit üretiminde bahsi geçen parametrelerin optimum seviyeleri belirlendikten sonra, bir doğrulama denemesi de gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analizler

CYY işlemdeki bağımsız değişkenlerin tek veya kombinasyon şeklinde cevap üzerindeki etkilerini incelemektedir. Bu yöntemde öncelikli olarak bağımsız parametreler ve seviyeleri belirlenmektedir. Daha sonra deneysel tasarımın seçimi ve model denkleminin

tahmini ve doğrulanması yapılmaktadır. Son olarak, kontur ve yüzey grafiğini elde etmek için optimum noktalar tespit edilmektedir. Çalışmada, sitrik asit üretiminin optimizasyonu için uygulanacak CYY kapsamında incelenecek parametreler Tablo 3'te verilmiştir. Bu parametrelerin seviyeleri yapılan ön denemeler sonucunda tespit edilmiştir.

Tablo 3. Sitrik asit üretiminde etkisi incelenecek parametreler ve seviyeleri

Faktörler	Bağımsız Değişkenler	Değişkenlerin seviyeleri		
		-1	0	+1
X_1	Başlangıç pH değeri	5,5	6,0	6,5
X_2	Fermentasyon süresi (gün)	4	5	6
X_3	Başlangıç substrat miktarı (g/L)	125	150	175

Çalışmada, 20 deneysel noktadan (14 farklı kombinasyona sahip ve merkezde altı tekrarlı) oluşan ve üç değişken ile oluşturulan yüzey merkezli istatistiksel dizayn (face central statistical design, $\alpha=1$) kullanılmıştır. Seviyeler, 0 merkez noktası olmak üzere, -1, 0, +1'dir. Her faktörün merkez noktasındaki gerçek seviyesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kodlanmış değer} = \frac{\text{Gerçek seviye} - (\text{yüksek seviye} + \text{düşük seviye}) / 2}{(\text{yüksek seviye} - \text{düşük seviye}) / 2}$$

Proses değişkenlerinin sitrik asit üretimini tahminleyen ikinci derece polinomial denklem aşağıda verilmiştir. Denklemden, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{23}$ regresyon katsayılarını, X_1, X_2, X_3 bağımsız değişkenleri ifade etmektedir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Oluşturulan bu modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güvenlik seviyesinde Fischer (F testi) uygulanarak bulunmuştur. Bir model sistemin gerçek cevaba uygun bir yaklaşım olup olmadığına uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz ($P>0,05$) ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun %95 güvenlik seviyesinde önemli olması koşulu ile karar verilmiştir.

Yapılan analizler iki tekerrürlü olacak şekilde uygulanmış ve standart sapmalar SPSS 24.0 paket programı kullanılarak belirlenmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Sitrik Asit Üretimi için Uygun Suşların Seçimi

Suşların farklı koşullarda gelişim düzeyleri

C. zeylanoides suşlarının farklı glukoz, gliserol ve pH seviyelerindeki gelişim düzeyleri Tablo 4’te sunulmuştur. Suşların farklı oranlarda glukoz ve gliserol içeren ortamlarda gelişme durumları substrat türü ve miktarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Suşların düşük pH değerlerinde gelişim gösterebilmesi ise fermantasyon boyunca düşen pH değerleri açısından önem arz etmektedir. Bundan dolayı, mikroorganizmaların seçiminde yalnızca asit üretim kapasiteleri değil farklı glukoz, gliserol ve pH seviyelerindeki gelişim düzeyleri de dikkate alınmıştır.

Tablodan da anlaşılacağı gibi, yerel suşların %5 ve %10 glukoz seviyelerinde çok iyi gelişme gösterdiği, *C. zeylanoides* 8.1 ve 13.5 suşlarının %15 glukoz seviyesinde iyi, diğerlerinin ise çok iyi seviyede gelişebildiği tespit edilmiştir. *C. zeylanoides* 4.1, 8.1, 8.3, 8.4, 11.9 ve 13.5 suşları %17,5 glukoz seviyesinde iyi derecede, diğer suşlar ise çok iyi derecede gelişim göstermiştir.

Farklı gliserol düzeylerindeki mikrobiyal gelişim sonuçları değerlendirildiğinde, *C. zeylanoides* 4.14 ve 13.7 suşlarının tüm seviyelerde çok iyi, *C. zeylanoides* 3.13, 7.9, 7.12, 11.9 ve 12.3 suşlarının ise %5, 10 ve 15 seviyelerinde iyi derecede gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. *C. zeylanoides* 4.1 suşu %15 ve 17,5 seviyelerinde zayıf gelişme gösteren tek suş olarak dikkat çekmiştir.

Mikroorganizmaların farklı pH seviyelerindeki mikrobiyal gelişim düzeyleri incelendiğinde ise pH 1,5 seviyesinde yalnızca *C. zeylanoides* 7.9 ve 12.3 suşlarının gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. *C. zeylanoides* 4.1 ve 4.14 suşlarının pH 2,5 seviyesinde de gelişemediği, *C. zeylanoides* 8.1, 8.3, 8.4, 11.9 ve 13.5 suşlarının ise zayıf derecede gelişebildiği belirlenmiştir. Suşların tamamı pH 4,5 ve 6,5 değerlerinde iyi veya çok iyi seviyede gelişme göstermiştir.

Tablo 4. *C. zeylanoides* suşlarının farklı koşullardaki gelişim düzeyleri

Suş	Glukoz (%)				Gliserol (%)				pH			
	5	10	15	17,5	5	10	15	17,5	1,5	2,5	4,5	6,5
<i>C. zeylanoides</i> 3.13	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	GY	+++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 4.1	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	GY	GY	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 4.6	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	GY	+++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 4.12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	GY	+++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 4.14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	GY	GY	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 7.9	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 7.10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	GY	+++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 7.12	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	GY	+++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 8.1	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	GY	+	++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 8.3	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	GY	+	++	++
<i>C. zeylanoides</i> 8.4	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	GY	+	++	++
<i>C. zeylanoides</i> 11.9	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	GY	+	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 12.3	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 13.5	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	GY	+	++	++
<i>C. zeylanoides</i> 13.7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	GY	+++	+++	+++
<i>C. zeylanoides</i> 13.13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	GY	+++	+++	+++

Absorbans<0,1=Gelişme yok (GY), 0,1-0,5= + (zayıf gelişme), 0,5-1= ++ (iyi gelişme), >1=+++ (çok iyi gelişme)

Suşların asit üretim yetenekleri

Sitrik asit üretimi için kullanılacak potansiyel üretici suşların asit üretim yeteneklerini belirlemek amacıyla, 16 yerel *C. zeylanoides* suşu ve kontrol suşunun belirlenmesi için incelenen 3 *Y. lipolytica* suşu hazırlanan seçici besiyerlerine inoküle edilmiş ve zon çapları 6 gün boyunca ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, en fazla asit üretim kapasitesine sahip olan suş 26 mm zon oluşumu ile *C. zeylanoides* 7.12 suşu olarak belirlenmiş ve onu 25 mm zon oluşumu ile *C. zeylanoides* 12.3 suşu takip etmiştir. Kontrol suşu seçimi için 3 farklı *Y. lipolytica* suşu Y-1094 (ATCC 8662), YB 423 (ATCC 18942) ve IFP29 (ATCC 20460) denenmiştir. Bu suşlardan *Y. lipolytica* Y-1094 ve *Y. lipolytica* IFP29 suşu bahsedilen besi ortamında zon oluştururken, *Y. lipolytica* YB 423 suşu zon oluşturmamıştır. Sonuç olarak, en fazla zon çapına sahip (35 mm) *Y. lipolytica* Y-1094 deneysel tasarıma dahil edilecek kontrol suşu olarak seçilmiştir. En fazla zon oluşturan yerel *C. zeylanoides* 7.12 suşu ve kontrol olarak seçilen *Y. lipolytica* Y-1094 suşunun 6 gün sonunda oluşan zon görüntüleri ise Şekil 4'te verilmiştir.

Tablo 5. *C. zeylanoides* ve *Y. lipolytica* suşlarının asit üretim kapasitelerinin karşılaştırılması

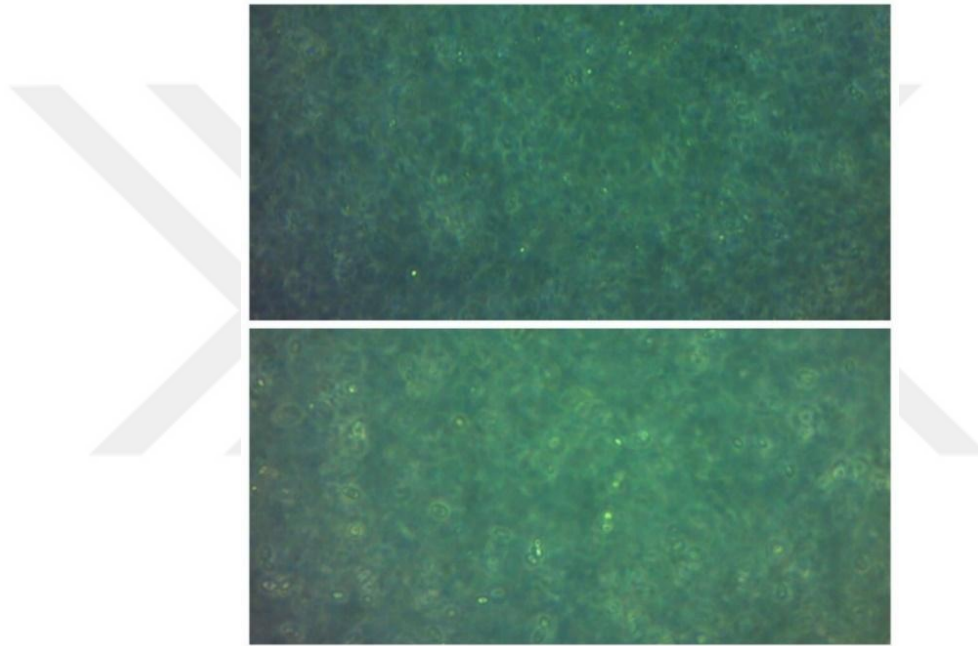
Suş	Zon çapları (mm)					
	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün
<i>C. zeylanoides</i> 3.13	5,00±1,41	11,00±1,41	15,00±0,00	18,00±0,00	20,00±1,41	23,00±0,00
<i>C. zeylanoides</i> 4.1	0,50±0,71	7,50±0,71	12,00±0,00	13,50±0,71	14,50±0,71	15,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 4.6	4,50±2,83	11,00±1,41	15,00±1,41	16,00±0,00	18,50±0,71	21,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 4.12	5,50±2,12	11,00±0,00	15,00±0,00	16,50±0,71	21,00±0,00	24,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 4.14	3,00±0,00	8,50±0,71	12,00±0,00	14,00±0,00	17,00±1,41	19,00±0,00
<i>C. zeylanoides</i> 7.9	6,00±0,00	11,00±0,00	16,50±0,71	19,00±1,41	21,50±0,71	24,00±0,00
<i>C. zeylanoides</i> 7.10	5,00±0,00	11,00±0,00	15,00±1,41	18,00±0,00	19,00±1,41	24,00±0,00
<i>C. zeylanoides</i> 7.12	6,50±0,71	11,00±1,41	16,00±0,00	20,00±0,00	23,50±0,71	26,00±0,00
<i>C. zeylanoides</i> 8.1	0,50±0,71	3,00±1,41	8,00±0,00	10,50±0,71	15,00±2,83	17,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 8.3	1,00±0,00	4,00±0,00	8,50±0,71	12,00±1,41	15,00±1,41	17,50±0,71
<i>C. zeylanoides</i> 8.4	0,50±0,71	6,00±1,41	10,00±0,00	12,50±0,71	16,00±0,00	18,00±0,00
<i>C. zeylanoides</i> 11.9	2,00±1,41	5,50±0,71	8,50±0,71	10,50±0,71	14,00±0,00	15,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 12.3	6,00±0,00	11,50±0,71	16,50±0,71	20,00±0,00	24,00±0,00	25,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 13.5	1,00±1,41	4,00±0,00	8,50±0,71	12,50±0,71	17,00±1,41	19,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 13.7	4,00±1,41	11,50±0,71	15,50±0,71	18,00±0,00	21,00±1,41	23,00±1,41
<i>C. zeylanoides</i> 13.13	5,00±2,83	11,50±0,71	13,00±2,83	16,50±0,71	19,50±0,71	22,00±1,41
<i>Y. lipolytica</i> Y-1094	2,75±0,35	7,50±2,12	18,00±2,83	23,00±1,41	34,00±0,00	35,00±0,00
<i>Y. lipolytica</i> IFP29	1,50±0,71	4,00±0,00	10,00±1,41	19,00±1,41	26,00±1,41	30,00±1,41

Kamzolova *et al.* (2011a) CaCO₃ ile tamponlanmış katı besiyerinde 28°C'de 7 gün inkübasyona bıraktıkları 41 maya suşunun asit üretim kabiliyetini araştırmış ve *C. zeylanoides* VKM Y-6, VKM Y-14, VKM Y-2324 ve VKM Y-2595 suşlarının hiç zon oluşturmadığını, *C. paludigena* VKM Y-2443 ve bazı *Y. lipolytica* suşlarının ise zon oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Şekil 5'te görünen maya hücreleri (50 mL MEB besiyerinde gelişen aktif maya kültürlerinden alınan örneklerle/10⁷ kob/mL) ters (inverted) ışık mikroskobu ile incelenmiş ve kontrol suşunun hücre boyutunun (alt tarafta) *C. zeylanoides* 7.12 suşuna göre (üst tarafta) oldukça büyük olduğu görülmüştür.



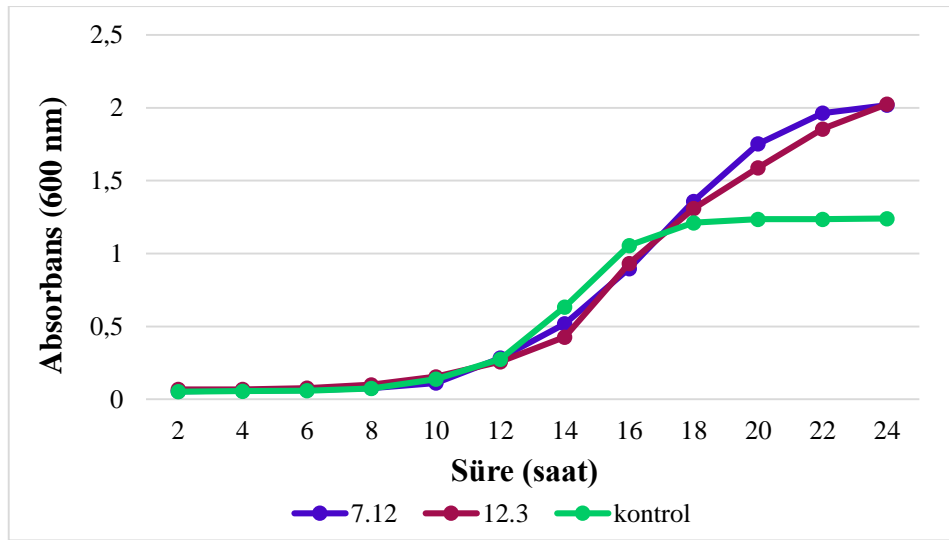
Şekil 4. *C. zeylanoides* 7.12 ve kontrol suşunun asit oluşumuna ait zon görüntüleri



Şekil 5. *C. zeylanoides* 7.12 ve kontrol suşunun ters (inverted) ışık mikroskobu altındaki görüntüleri

Mikrobiyal gelişim eğrileri

Asit üretim yetenekleri ölçülen 16 suştan zon çapları en yüksek ölçülen *C. zeylanoides* 7.12 ve 12.3 suşları ile kontrol suşu (*Y. lipolytica* Y-1094) 250 mL'lik erlenler içerisinde bulunan 50 mL'lik MEB besiyerinde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu besiyeri aynı zamanda fermantasyon için kullanılacak besiyerine inoküle edilen kültürlerin aktiveleştirildiği besiyeridir. İnkübasyon sırasında iki saatte bir alınan örneklerin spektrofotometrede (600 nm) ölçülen absorbans değerleri ile zamana karşı oluşturulan grafik ile Şekil 5'teki gelişme eğrileri elde edilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere, suşlar yaklaşık 8 saat olan lag fazından sonra log fazına geçmiştir. Bununla birlikte, kontrol suşunun 18 saat, *C. zeylanoides* 7.12 suşunun ise 22 saat sonra durağan faza geçtiği görülmektedir.



Şekil 6. *C. zeylanoides* 7.12, 12.3 ve kontrol suşunun gelişim eğrileri

Sitrik Asit Üretimi

Üretim için seçilmesi planlanan mikroorganizmalarla yapılacak sitrik asit üretiminin optimizasyonu için başlangıç pH değeri, substrat tipi ve konsantrasyonu ve fermantasyon süresi faktörleri ve bunların seviyeleri yapılan ön denemeler neticesinde belirlenmiştir. Belirlenen faktör ve seviyeleri için CYY (Cevap Yüzey Yöntemi) yardımıyla deneysel bir tasarım oluşturulmuş ve her bir koşul tekerrürlü olacak şekilde uygulanarak sitrik asit miktarları tespit edilmiştir. Sitrik asit üretimi için seçici katı besi ortamında en fazla zon çapına sahip iki suş olan *C. zeylanoides* 7.12 ve 12.3 üretim besi ortamında (Tablo 2), başlangıç pH değeri 6,0'ya ayarlanarak, 5 gün süreyle fermantasyona bırakılmıştır. Tablo 6'daki sonuçlardan anlaşılacağı gibi, deneysel tasarıma dahil edilmek üzere kullanılacak olan suşun *C. zeylanoides* 7.12, karbon kaynağının ise glukoz olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 6. Seçilen iki *C. zeylanoides* suşunun glukoz ve gliserol içeren besi ortamında sitrik asit üretimlerinin karşılaştırılması

Suş	Karbon kaynağı	pH _F	X (g/L)	SA(g/L)	iSA (g/L)
<i>C. zeylanoides</i> 7.12	Glukoz	5,38	6,01	2,33	6,97
	Gliserol	5,59	16,34	1,02	0,53
<i>C. zeylanoides</i> 12.3	Glukoz	5,42	6,60	0,62	9,24
	Gliserol	5,55	21,88	0,30	1,63

pH_F: fermantasyon sonrası ölçülen pH değeri; X: biyokütle; SA: sitrik asit; iSA: izositrik asit

Sitrik Asit Üretiminin Optimizasyonu

Sitrik asit üretiminde önemli proses parametreleri olan başlangıç pH değeri, başlangıç substrat konsantrasyonu ve fermentasyon süresinin üretime etkilerini incelemek ve bu proses

değişkenlerinin optimum seviyelerini belirlemek için CYY kullanılmıştır. Kullanılan deneysel tasarım ve analiz sonuçları Tablo 7’de verilmiştir. *C. zeylanoides* 7.12 ve *Y. lipolytica* Y-1094 suşları MEB besiyerinde (50 mL/250 mL erlen=10⁶-10⁷ kob/mL) geliştirilmiş (28°C, 180 rpm, 24 saat) ve Tablo 7’de verilen deneysel tasarımdaki koşullara uygun olarak hazırlanan üretim besiyerlerine aktarılarak (1 mL) sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatörde fermantasyona bırakılmıştır. Optimizasyon için sadece üretilen sitrik asit miktarı dikkate alınmıştır. Sitrik asit miktarıyla birlikte izositrik asit, biyokütle ve fermantasyon boyunca tüketilen glukoz miktarları da belirlenmiş ve oluşturulan matematiksel model ile elde edilen yanıtlar arasındaki uyum eksikliği önemsiz olduğu zaman denenen her bir nokta için verim hesaplamaları da yapılmıştır.

Tablo 7. Cevap yüzey yönteminde kullanılan deneysel tasarım ve sistemin yanıtları

Çalışma sırası	pH ₀	Süre (gün)	Glukoz miktarı (g/L)	Sitrik asit miktarı (g/L)	
				<i>C. zeylanoides</i> 7.12	<i>Y. lipolytica</i> Y-1094
1	6,0	5	150	1,65±0,84	16,85±1,00
2	6,5	6	175	2,25±0,43	24,30±7,54
3	6,5	5	150	1,68±0,66	13,65±0,62
4	5,5	5	150	1,71±0,59	16,52±2,25
5	6,0	5	150	2,17±0,05	17,93±3,94
6	6,0	5	150	2,05±0,05	17,04±3,86
7	5,5	6	125	2,31±0,57	30,31±0,47
8	6,0	5	150	2,11±0,32	16,27±0,43
9	5,5	4	125	2,42±0,09	12,77±0,06
10	6,0	4	150	2,16±0,14	8,87±2,06
11	6,5	4	125	2,56±0,29	11,64±0,67
12	5,5	4	175	1,13±0,13	11,91±2,69
13	5,5	6	175	1,47±0,50	26,58±2,06
14	6,0	5	175	1,71±1,35	21,40±0,76
15	6,5	6	125	2,07±0,22	29,74±1,82
16	6,0	5	150	2,28±0,12	16,96±0,00
17	6,5	4	175	2,18±0,25	8,56±2,17
18	6,0	6	150	1,91±0,04	26,03±6,11
19	6,0	5	150	2,12±0,00	17,64±0,01
20	6,0	5	125	2,32±0,17	25,36±0,37

pH₀: başlangıç pH değeri

Üç faktörlü deneysel tasarımda *C. zeylanoides* 7.12 suşuna ait sonuçlar

Yerel suşun sitrik asit miktarının 1,13-2,56 g/L arasında olduğu, miktarların oldukça düşük ve birbirine yakın olduğu ve yan ürün olan izositrik asidin sitrik asite oranla oldukça fazla üretildiği tespit edilmiştir (Tablo 8). Biyokütle değerleri tüm noktalar dikkate alındığında 5,23-10,08 g/L arasında değişiklik göstermiştir. İzositrik asit miktarları ise 2,66-13,48 g/L arasında değişmiştir.

Tablo 8. Üç faktörlü deneysel tasarımda *C. zeylanoides* 7.12 ile yapılan üretimde elde edilen sonuçlar

Çalışma sırası	pH ₀	Süre (gün)	Glukoz (g/L)	SA (g/L)	iSA (g/L)	X (g/L)	G _K (g/L)	pH _F
1	6,0	5	150	1,65±0,84	8,64±0,23	6,57±0,34	2,20±1,03	5,37±0,06
2	6,5	6	175	2,25±0,43	6,40±1,28	7,37±0,37	1,36±1,32	5,31±0,39
3	6,5	5	150	1,68±0,66	6,64±0,48	6,12±0,17	1,81±0,63	5,45±0,05
4	5,5	5	150	1,71±0,59	2,66±0,47	5,85±0,16	2,41±2,41	5,52±0,31
5	6,0	5	150	2,17±0,05	6,97±1,63	6,64±0,15	1,96±0,59	5,45±0,16
6	6,0	5	150	2,05±0,05	7,38±0,18	6,79±0,29	0,64±0,74	5,30±0,08
7	5,5	6	125	2,31±0,57	4,21±1,58	9,06±0,89	1,23±1,73	7,87±0,30
8	6,0	5	150	2,11±0,32	6,96±0,01	5,99±0,04	2,27±0,66	5,68±0,42
9	5,5	4	125	2,42±0,09	8,86±5,72	7,11±1,29	2,05±0,13	5,37±0,13
10	6,0	4	150	2,16±0,14	8,73±2,52	6,35±0,01	2,05±1,06	5,26±0,13
11	6,5	4	125	2,56±0,29	10,01±0,20	7,43±0,47	1,85±0,11	5,37±0,33
12	5,5	4	175	1,13±0,13	3,91±0,44	5,23±0,23	1,84±0,33	5,19±0,00
13	5,5	6	175	1,47±0,50	6,99±0,15	7,32±0,08	1,59±0,12	5,39±0,08
14	6,0	5	175	1,71±1,35	13,48±4,94	7,04±0,76	1,47±0,13	5,45±0,01
15	6,5	6	125	2,07±0,22	2,96±0,19	10,08±0,55	1,29±1,82	8,12±0,06
16	6,0	5	150	2,28±0,12	7,25±1,00	6,55±0,18	2,85±2,61	5,40±0,01
17	6,5	4	175	2,18±0,25	9,82±0,83	6,97±0,04	0,87±0,30	5,19±0,30
18	6,0	6	150	1,91±0,04	6,76±0,77	6,53±0,19	0,21±0,30	5,43±0,18
19	6,0	5	150	2,12±0,00	6,80±0,52	6,69±0,77	0,81±0,70	5,39±0,02
20	6,0	5	125	2,32±0,17	8,81±0,01	7,52±0,25	1,19±1,25	5,77±0,21

pH₀: başlangıç pH değeri; **SA**: sitrik asit; **iSA**: izositrik asit; **X**: biyokütle; **G_K**: kalan glukoz miktarı; **pH_F**: fermantasyon sonrası ölçülen pH değeri

Üç faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşuna ait sonuçlar

Kontrol suşu ile yapılan üretimler neticesinde elde edilen sitrik asit, izositrik asit,

biyokütle, tüketilen glukoz miktarları ve fermantasyon sonundaki pH değerleri Tablo 9’da verilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı gibi, en düşük biyokütle miktarı 12. noktadaki (8,77 g/L), en yüksek biyokütle miktarı ise 15. noktadaki şartlar uygulandığında (13,60 g/L) tespit edilmiştir. Merkez noktada (pH 6,0, 5 gün ve 150 g/L glukoz) biyokütle değerleri 9,71-11,83 g/L arasında değişkenlik göstermiştir. En yüksek ve en düşük sitrik asit miktarları ise sırasıyla 30,31 ve 8,56 g/L olarak 7. ve 17. noktalardaki fermantasyon koşulları uygulandığında hesaplanmıştır. Bu durumda elde edilen izositrik asit miktarı ise sırasıyla 5,57 ve 1,08 g/L olarak tespit edilmiştir.

Deneysel tasarımda mevcut olan ve uygulanan her noktada, kontrol suşunun glukozun neredeyse tamamını tükettiği tespit edilmiştir. Fermantasyon sonunda ölçülen pH değeri (pH_F) ise fermantasyon boyunca periyodik olarak ayarlanan pH değerinin doğru sınırlar içinde kaldığının bir sağlaması niteliğini taşımakla birlikte genelde asit üretiminin hala devam ettiğini göstermektedir.

Literatürde bu çalışmada elde edilen sitrik asit miktarına yakın düzeyde sonuç elde edilen araştırmalar olmakla birlikte (30,3-39 g/L), (Rymowicz *et al.* 1993; Papanikolaou *et al.* 2002; Karasu-Yalçın vd 2009a; Makri *et al.* 2010; Liu *et al.* 2015; Aslan *et al.* 2016; Dourou *et al.* 2016), erlenlerde yapılan bazı üretimlerde daha düşük miktarda sitrik asit elde edilen çalışmalar da mevcuttur (8,4-28,9 g/L) (Pazouki *et al.* 2000; Crolla and Kennedy 2001; Venter *et al.* 2004; Levinson *et al.* 2007; Papanikolaou *et al.* 2008a; Mafakher *et al.* 2010; Sarris *et al.* 2011; Abonama *et al.* 2014; Çarşanba *et al.* 2019).

Sitrik asit üretiminde biyoreaktör kullanıldığında genellikle erlenlerde yapılan üretimden daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Buna rağmen, üretimde biyoreaktör tercih edildiği halde çalışmamızda elde edilen sitrik asit miktarından daha düşük seviyede sitrik asit elde edilen bazı çalışmalar da bulunmaktadır (Finogenova *et al.* 2002; Crolla and Kennedy 2004).

Rane and Sims (1993) fermentörde gerçekleştirdikleri sitrik asit üretiminde, başlangıçta 50 g/L glukoz bulunan ortamda geliştirdikleri *C. lipolytica* Y 1095 suşunun 27 saat sonunda ürettiği 13,6 g/L olan sitrik asit miktarının, 150 g/L glukoz kullanılan ortamda 128 saat geliştirildiğinde 78,5 g/L’ye yükseldiğini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, en yüksek sitrik/izositrik asit oranı 13 olarak, suş 96 saat boyunca 100g/L glukoz kullanılan ortamda geliştirildiğinde hesaplanmıştır.

Karasu-Yalçın vd (2009b) yaptıkları çalışmada, *Y. lipolytica* 57 suşunu 100 g/L glukoz bulunan bir besiyerinde 280 saat fermantasyona bırakmış ve 37,66 g/L sitrik asit elde

etmişlerdir. Başlangıç glukoz konsantasyonu 150 g/L'ye ayarlandığında suşun ürettiği sitrik asit miktarı 44,39 g/L'ye yükselmiş fakat 200 ve 235 g/L başlangıç glukoz konsantrasyonları ile hazırlanan besi ortamlarında üretilen sitrik asit miktarının ise sırasıyla 32,54 ve 29,19 g/L'ye düştüğü tespit edilmiştir.

Çelik *et al.* (2014) yaptıkları araştırmada, *Y. lipolytica* TEMYL 20 suşunu 100 g/L glukoz bulunan ortamda 72 saat geliştirmiş ve en düşük sitrik asit miktarını (1,26 g/L sitrik ve 0,10 g/L izositrik asit) bu şartlarda hesaplamıştır. Suş aynı koşullarda 408 saat boyunca fermantasyona bırakıldığında ise 36,3 g/L sitrik ve 4,43 g/L izositrik asit elde edilmiştir. Bu sonuç çalışmamızda elde edilen maksimum sitrik asit miktarına oldukça yakın olsa bile fermantasyon süreleri arasında ciddi bir fark bulunmaktadır. Mevcut çalışmada, fermantasyon süresi arttıkça sitrik asit miktarının arttığı fakat en yüksek sitrik asit miktarına kullanılan en düşük substrat miktarı olan 125 g/L varlığında ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Papanikolaou *et al.* (2006) yaptıkları araştırmada *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 suşunu glukoz bulunan fakat farklı C/N oranına sahip besi ortamlarında geliştirmiş ve sonuç olarak C/N oranları (110-500 mol/mol) ve başlangıç glukoz oranı arttıkça, biyokütle ve sitrik asit miktarlarında da artış meydana geldiğini belirlemişlerdir. Erlenlerde gerçekleştirilen üretimde maksimum sitrik asit 550 saat sonunda, başlangıçta 149,5 g/L glukoz kullanıldığında ve C/N oranı 500 olduğunda 42,9 g/L olarak hesaplanmıştır.

Çarşamba vd (2019) yürüttükleri çalışmada, 10 *Y. lipolytica* suşunu sitrik asit üretim potansiyelleri açısından incelemiştir. Erlenlerde (28°C, 185 rpm, 8 gün) glukoz içeren ve pH değeri 5,0-6,0 arasına ayarlanan (12 saatte bir KOH ile) besi kullanılarak yapılan üretimde *Y. lipolytica* K57 suşunun 21,29 g/L sitrik asit ürettiğini tespit etmişlerdir. Seçilen suş ile biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimde ise C/N oranı 367 olan besi ortamında 72,12 g/L sitrik asit elde edilmiştir.

Çalışmamızda, en fazla sitrik asit en düşük başlangıç glukoz konsantrasyonu yani en düşük C/N oranına sahip besi ortamında tespit edilmiştir. Erlenlerde yapılan üretim biyoreaktörde gerçekleştirildiğinde ise çözünmüş oksijen konsantrasyonu, çalkalama hızı, sıcaklık gibi faktörlerin de optimum değerlerinin belirlenmesi, uygun üretim zamanının tespiti ve sürekli pH kontrolü sayesinde üretilen sitrik asit miktarının artırılacağı tahmin edilmekte ve mevcut sonuçların gelecekteki bu çalışmalar için yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Tablo 9. Üç faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşu ile yapılan üretimde elde edilen sonuçlar

Çalışma sırası	pH ₀	Süre (gün)	Glukoz (g/L)	SA (g/L)	iSA (g/L)	X (g/L)	G _K (g/L)	pH _F
1	6,0	5	150	16,85±1,00	2,62±1,10	9,88±0,35	0,17±0,23	4,93±0,14
2	6,5	6	175	24,30±7,54	2,92±1,34	12,27±1,48	0,21±0,30	5,19±0,21
3	6,5	5	150	13,65±0,62	1,47±0,00	9,69±0,06	0,20±0,28	4,55±0,27
4	5,5	5	150	16,52±2,25	1,76±0,69	10,20±0,77	1,00±1,41	4,61±0,19
5	6,0	5	150	17,93±3,94	2,49±1,24	10,86±1,40	0,19±0,26	4,67±0,43
6	6,0	5	150	17,04±3,86	1,68±0,24	9,71±0,45	0,20±0,28	4,68±0,31
7	5,5	6	125	30,31±0,47	5,57±1,30	13,42±0,33	2,00±0,01	5,00±0,13
8	6,0	5	150	16,27±0,43	3,07±0,32	11,53±1,58	0,00±0,00	4,78±0,21
9	5,5	4	125	12,77±0,06	2,52±0,42	10,24±0,86	0,86±1,21	4,96±0,17
10	6,0	4	150	8,87±2,06	1,17±0,25	9,25±1,53	0,27±0,38	4,43±0,45
11	6,5	4	125	11,64±0,67	2,64±0,25	12,95±2,98	0,71±1,00	4,78±0,08
12	5,5	4	175	11,91±2,69	1,73±0,23	8,77±1,58	0,69±0,98	4,53±0,33
13	5,5	6	175	26,58±2,06	3,03±0,11	12,42±0,98	0,81±0,54	4,88±0,22
14	6,0	5	175	21,40±0,76	3,22±0,03	11,32±1,50	0,20±0,28	4,88±0,05
15	6,5	6	125	29,74±1,82	5,38±1,07	13,60±0,63	0,28±0,40	5,12±0,08
16	6,0	5	150	16,96±0,00	1,93±0,11	11,83±1,46	0,29±0,41	5,08±0,29
17	6,5	4	175	8,56±2,17	1,08±0,25	9,44±0,45	0,31±0,25	4,84±0,37
18	6,0	6	150	26,03±6,11	4,54±1,64	12,86±0,40	1,24±0,90	4,91±0,27
19	6,0	5	150	17,64±0,01	4,04±2,09	11,80±0,65	0,30±0,42	4,96±0,19
20	6,0	5	125	25,36±0,37	4,37±0,66	12,15±1,01	1,08±0,68	4,96±0,03

pH₀: başlangıç pH değeri; **SA**: sitrik asit; **iSA**: izositrik asit; **X**: biyokütle; **G_K**: kalan glukoz miktarı **pH_F**: fermantasyon sonrası ölçülen pH değeri

Kontrol suşu ile yapılan üretime ait verim değerleri Tablo 10’da sunulmuştur. Tablodan da görüldüğü gibi, en yüksek biyoproses seçimliliği (%91,03) ve sitrik: izositrik asit oranı (10,1:1) 6. noktadaki şartların uygulandığı koşullarda elde edilmiştir. Bununla beraber, en yüksek spesifik sitrik asit oluşum hızı (qSA:0,02) 7, 14, 15 ve 20. noktalardaki, en yüksek YX/glukoz, ve YSA/t verimleri 7. ve 15. noktalar, YSA/glukoz ve YSA/X verimleri ise 7. noktadaki şartlar uygulandığında hesaplanmıştır. En düşük YSA/t verimleri, 10. ve 17. noktalarda 0,09 olarak, YX/glukoz verimi ise 12. ve 17. noktalarda 0,05, YSA/glukoz ve YSA/X verimleri ise 17. ve 11. noktalardaki şartlar uygulandığında sırasıyla 0,05 ve 0,90 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, en yüksek glukoz alım hızı 12. noktadaki (0,21) en düşük glukoz alım hızı (0,06) ise 7. ve 15. noktadaki fermantasyon koşulları uygulandığında hesaplanmıştır.

Moeller *et al.* (2007) fermentör kullanarak yürüttükleri çalışmada, *Y. lipolytica* H222 suşunu glukoz bulunan besiyerinde geliştirerek yaptıkları sitrik asit üretimi üzerine sıcaklık ve pH faktörlerinin etkilerini ayrı ayrı incelemiştir. pH faktörü değerlendirildiğinde, 92 saat sonunda en yüksek sitrik asit miktarı (24,91 g/L), en yüksek seçimlilik (%89,87) ve $g_{SA/glukoz}$ veriminin (0,22) pH 6,0'da elde edildiği ve bu şartlarda spesifik ürün oluşum hızının 0,026 olduğu belirlenmiştir.

Fu *et al.* (2015) tarafından *Y. lipolytica* PR32 suşuyla erlenlerde yapılan üretimde, farklı glukoz oranlarının (50-120 g/L) sitrik asit üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Başlangıç glukoz oranı arttıkça biyokütle, sitrik asit ve tüketilen glukoz miktarı da artış göstermiştir. 120 g/L glukoz bulunan fermantasyon ortamında geliştirilen suşun 6 gün sonunda ürettiği maksimum sitrik asit 64,58 g/L olarak rapor edilmiştir. Tüketilen glukoz ve hacimsel verimlilikler ise sırasıyla, 0,72 ve 0,45 olarak hesaplanmıştır.

Konu ile ilgili diğer bir araştırmada, *Y. lipolytica* wt W29 suşunun glukoz bulunan bir üretim ortamında 315 saat geliştirilmesiyle 49 g/L sitrik asit elde edilmiş ve $Y_{X/glukoz}$ ve $Y_{SA/glukoz}$ verimleri sırasıyla 0,09 ve 0,85 olarak saptanmıştır (Papanikolaou *et al.* 2009). Kamzolova *et al.* (2017) ise *Y. lipolytica* VKM Y-2373 suşunu glukoz bulunan besiyerinde geliştirerek erlenlerde yaptıkları üretimde 17,6 g/L sitrik asit ve 2,62 g/L izositrik asit elde etmişlerdir. $Y_{SA/X}$ verimi ise 5,30 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 10. Kontrol suşu ile yapılan üretime ait verim değerleri

Çalışma Sırası	SA/iSA	$Y_{X/glukoz}$	$Y_{SA/glukoz}$	$Y_{SA/X}$	$Y_{SA/t}$	q_{SA}	Glukoz alım hızı	S_{SA} (%)
1	6,4:1	0,07	0,11	1,71	0,14	0,01	0,13	86,54
2	8,3:1	0,07	0,14	1,98	0,17	0,01	0,10	89,27
3	9,3:1	0,06	0,09	1,41	0,11	0,01	0,13	90,28
4	9,4:1	0,07	0,11	1,62	0,14	0,01	0,12	90,37
5	7,2:1	0,07	0,12	1,65	0,15	0,01	0,12	87,81
6	10,1:1	0,06	0,11	1,75	0,14	0,01	0,13	91,03
7	5,4:1	0,11	0,25	2,26	0,21	0,02	0,06	84,48
8	5,3:1	0,08	0,11	1,41	0,14	0,01	0,11	84,13
9	5,1:1	0,08	0,10	1,25	0,13	0,01	0,13	83,52
10	7,6:1	0,06	0,06	0,96	0,09	0,01	0,17	88,35
11	4,4:1	0,10	0,09	0,90	0,12	0,01	0,10	81,51
12	6,9:1	0,05	0,07	1,36	0,12	0,01	0,21	87,32

Tablo 10. (devam)

13	8,7:1	0,07	0,15	2,14	0,18	0,01	0,10	89,77
14	6,6:1	0,06	0,12	1,89	0,18	0,02	0,13	86,92
15	5,5:1	0,11	0,24	2,19	0,21	0,02	0,06	84,68
16	8,8:1	0,08	0,11	1,43	0,14	0,01	0,11	89,78
17	7,9:1	0,05	0,05	0,91	0,09	0,01	0,19	88,80
18	5,7:1	0,09	0,17	2,02	0,18	0,01	0,08	85,15
19	4,4:1	0,08	0,12	1,49	0,15	0,01	0,11	81,37
20	5,8:1	0,10	0,20	2,09	0,21	0,02	0,09	85,30

SA: sitrik asit; **iSA:** izositrik asit; **SA: iSA:** sitrik asit: izositrik asit oranı; **X:** biyokütle; **t:** fermantasyon süresi; **Ssa:** sitrik asit üretimi için biyoprosesin seçimliliği

Tasarım matrisi ve her bir terimin uyum varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Tablo 11’de verilmiştir. Deneysel veriler ve tahmin edilen veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,989 olarak belirlenmiştir. Bu değer yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %98,9 doğrulukta açıklanabileceğini ifade etmektedir. Bu sonuç 20 deneysel nokta kullanılarak elde edilen model denklemin sitrik asit üretimi için incelenen bağımsız değişken aralığında yüksek doğrulukta kullanılabilirliğini göstermektedir. Tablodan da görüldüğü gibi, regresyon için F testinin %5 önem derecesinde anlamlı olduğu ($P<0,05$), ayrıca model ile elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliğinin (lack of fit değeri) 0,292 olarak belirlendiği ve bu değer %5 önem derecesinde önemsiz olduğu ($P>0,05$) tespit edilmiştir. Bunun anlamı, başlangıç pH değeri, fermantasyon süresi ve başlangıç substrat konsantrasyonunun *Y. lipolytica* Y-1094 (ATCC 8662) suşuyla yapılan sitrik asit üretimine etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanıp tahminlenebileceğidir.

Tablo 11. Kontrol suşu ile yapılan üretime ait ikinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi

Kaynak	SD	KT	Düz KT	Düz KO	F	P
Regresyon	9	827,773	827,773	91,975	195,70	0,000
Lineer	3	731,933	731,933	243,978	519,14	0,000
İkinci derece	3	90,158	90,158	30,053	63,95	0,000
Etkileşim	3	5,682	5,682	1,894	4,03	0,041
Artık Hata	10	4,700	4,700	0,470		
Uyum Eksikliği	5	2,946	2,946	0,589	1,68	0,292
Saf Hata	5	1,754	1,754	0,351		
Toplam	19	832,472				

SD: serbestlik derecesi, **KT:** kareler toplamı, **Düz. KT:** düzeltilmiş kareler toplamı, **Düz. KO:** düzeltilmiş kareler ortalaması ($R^2=0,989$)

Deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve bulunan regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model denklem üretilmiştir. Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları ise Tablo 12’de gösterilmiştir. Tablo incelendiğinde, pH ve başlangıç substrat konsantrasyonu ile cevap (sitrik asit miktarı) arasında negatif doğrusal bir etki olduğu görülmektedir ($P<0,05$). Bu sonuç artan başlangıç pH değeri ve substrat konsantrasyonunda sitrik asit miktarının azalacağını göstermektedir. Fermantasyon süresi ve cevap arasında ise pozitif doğrusal bir etki olduğu saptanmıştır ($P<0,05$). Bu sonuç, sitrik asit üretiminde fermantasyon süresi ilerledikçe miktarın artacağını ifade etmektedir. Her bir katsayının önemini kontrol etmede bir araç olarak kullanılan P değerinin daha küçük olması ise katsayıya ilişkin korelasyonun önem derecesinin daha fazla olduğu sonucunu vermektedir.

Fermantasyon süresi, en yüksek doğrusal katsayı ile (8,321) sitrik asit miktarı üzerine en büyük etkiye sahiptir. Fermantasyon süresini sırasıyla substrat miktarı (-1,707) ve pH (-1,020) takip etmektedir. Aynı tablodaki veriler değerlendirildiğinde, başlangıç pH değerinin negatif, başlangıç substrat konsantrasyonunun ise cevap üzerinde pozitif kuadratik etkisinin olduğu da görülmektedir ($P<0,05$). Bu sonuç artan substrat konsantrasyonunun artması ile birlikte sitrik asit miktarının azalacağı fakat fermantasyon süresinin artmasıyla sitrik asit miktarının artacağı anlamını taşımaktadır.

Bağımsız değişkenler arasındaki interaksyonlar değerlendirildiğinde fermantasyon süresi ve substrat miktarı arasındaki etkileşimin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Bu faktörler arasındaki negatif interaksyon, her iki parametrede de yapılan artışlarda sitrik asit miktarının artacağı, belli bir değerde üretimin maksimum değerine ulaşacağı ve parametrelerde daha yüksek değerlere çıkıldığında üretim miktarının azalacağı anlamı taşımaktadır. Bununla birlikte, pH-fermentasyon süresi ve pH-substrat konsantrasyonu arasındaki interaksyonun P değeri sırasıyla 0,420 ve 0,070 olarak belirlenmiştir. Bu değerler 0,05’ten büyük olduğu için bu bağımsız değişkenler arasındaki interaksyonların önemsiz olduğu sonucuna varılmıştır.

Genel olarak modele gereksiz etkiler eklendiğinde düzeltilmiş R^2 değeri yükselmekte aksine düşmektedir. Bunun yanında, düzeltilmiş R^2 değeri ciddi bir şekilde düştüğü zaman önemsiz etkilerin model içerisinde kalmasının iyi bir seçenek olabileceği belirtilmiştir (Carley *et al.* 2014). Bu nedenle, yapılan çalışmada önemsiz bulunan ($p>0,05$) etkilerin (fermantasyon süresinin kuadratik etkisi, pH-fermentasyon süresi ve pH-substrat konsantrasyonu arasındaki interaksyon) oluşturulan modelin tahminleyici gücü üzerinde negatif bir etki sağlamamasından dolayı bu etkiler modelden çıkarılmamıştır. Tam tersi şekilde bu etkiler modelden çıkarıldığında modelin düzgün bir şekilde çalışmadığı saptanmıştır.

Tablo 12. Kontrol suşunun ürettiği sitrik asit miktarları için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH. Kat	T	P
Sabit	17,436	0,236	73,99	<0,001
pH	-1,020	0,217	-4,71	0,001
T	8,321	0,217	38,38	<0,001
SM	-1,707	0,217	-7,87	<0,001
pH x pH	-2,833	0,413	-6,85	<0,001
t x t	-0,468	0,413	-1,13	0,284
SM x SM	5,462	0,413	13,21	<0,001
pH x t	0,204	0,242	0,84	0,420
pH x SM	-0,491	0,242	-2,03	0,070
t x SM	-0,654	0,242	-2,70	0,022

SH kat.: standart hata katsayıları, SM: substrat miktarı, t: fermantasyon süresi

Y: Sitrik asit miktarı

X₁: pH

X₂: Fermantasyon süresi

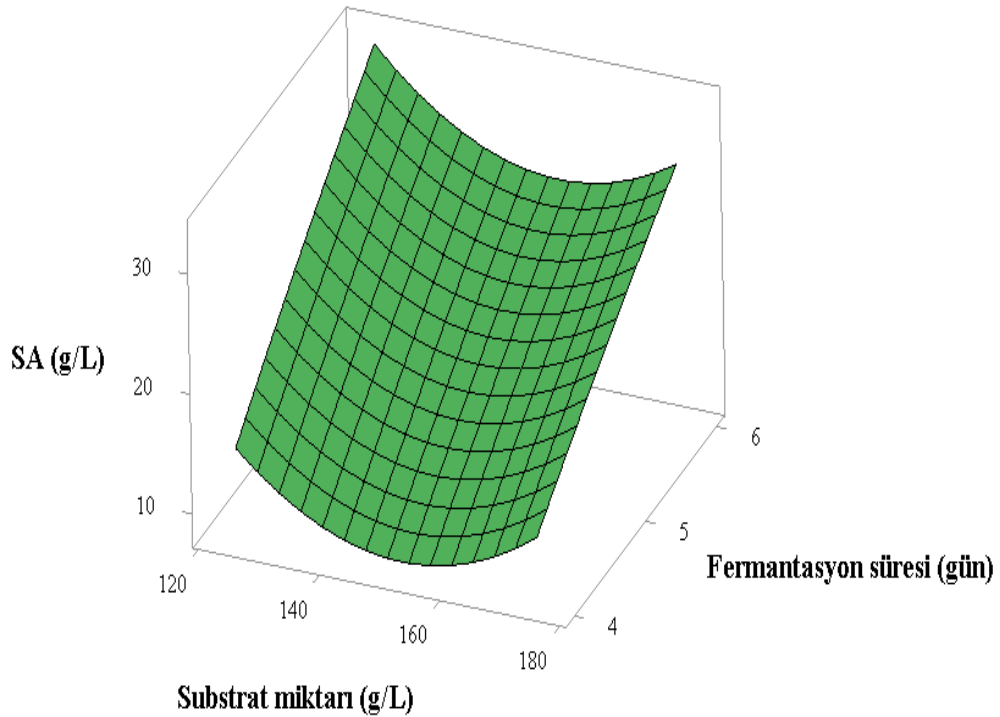
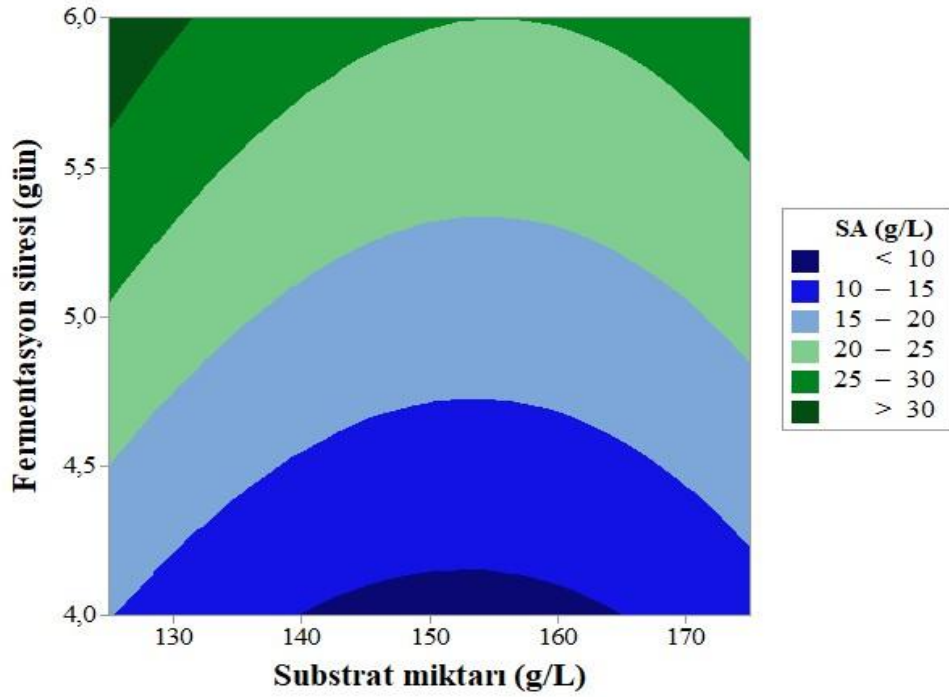
X₃: Başlangıç substrat miktarı

$$Y = -267,5 + 137,8 X_1 + 14,48 X_2 - 2,323 X_3 - 11,33 X_1^2 - 0,468 X_2^2 + 0,008739 X_3^2 + 0,407 X_1 X_2 - 0,0393 X_1 X_3 - 0,02615 X_2 X_3$$

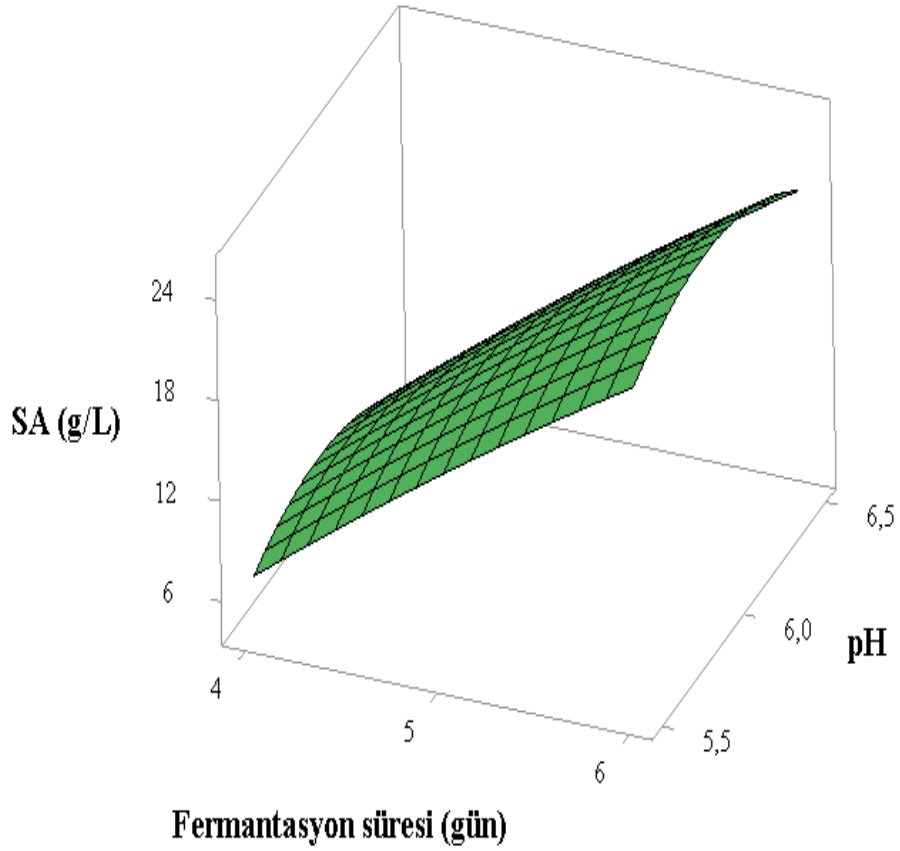
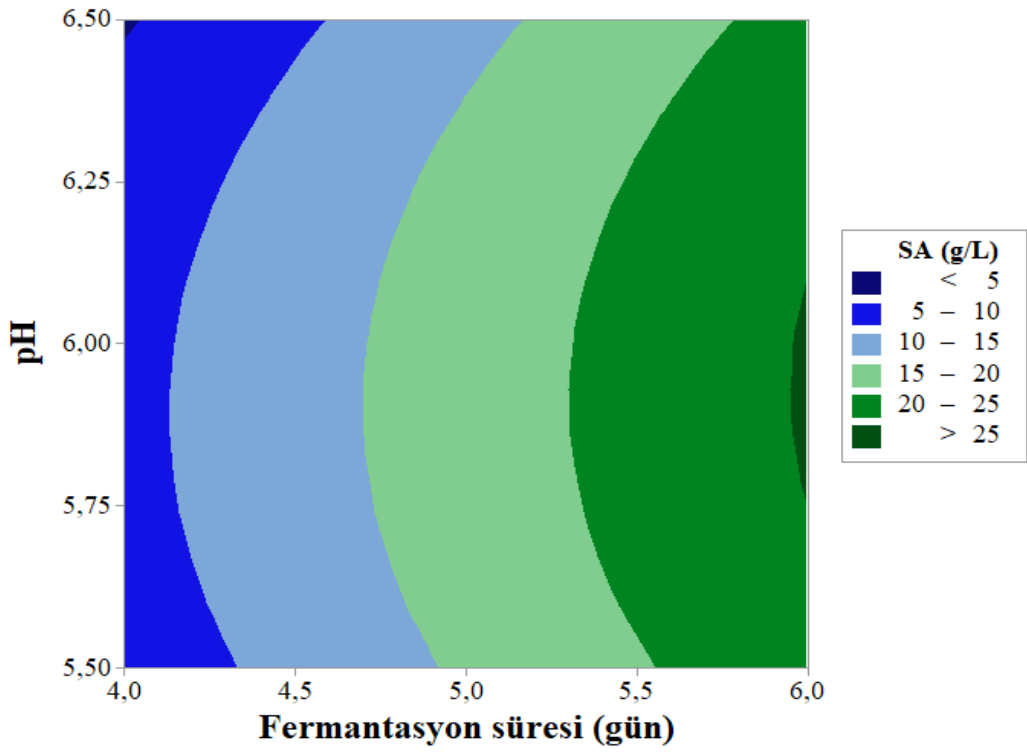
Şekil 7, 8 ve 9'da faktörlerden biri merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin sitrik asit üretimi üzerine olan etkileri kontur ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Şekil 7'de pH değeri sabit iken (pH 6,0), sitrik asit miktarının merkez noktaya kadar arttığı ve sonrasında da artışın devam ettiği belirlenmiştir. Şekil 8'de sabit substrat konsantrasyonunda (150 g/L), merkez noktaya kadar artan sitrik asit miktarının, merkez noktadan sonra da artmaya devam ettiği belirlenmiştir. Şekil 9'da fermantasyon süresi sabit iken (5 gün) merkez noktaya kadar sitrik asit miktarının azaldığı belirlenmiştir.

Sitrik asit miktarını modellemek için oluşturulan ikinci derece polinomial eşitlik çözülmüş ve proses için optimum koşullar belirlenmiştir. Bu optimum koşullar, başlangıç pH değeri 5,97 (X₁), fermantasyon süresi (6 gün) (X₂) ve başlangıç substrat konsantrasyonu 125 g/L (X₃)'dir ve bu koşullarda model, fermantasyon sonunda maksimum 33,12 g/L sitrik asit elde edilebileceğini tahminlemiştir. Bu veriler *Y. lipolytica* Y-1094 (ATCC 8662) suşu ile glukoz içeren üretim ortamında maksimum sitrik asit üretimi için en uygun seviyeler olarak belirlenmiştir.

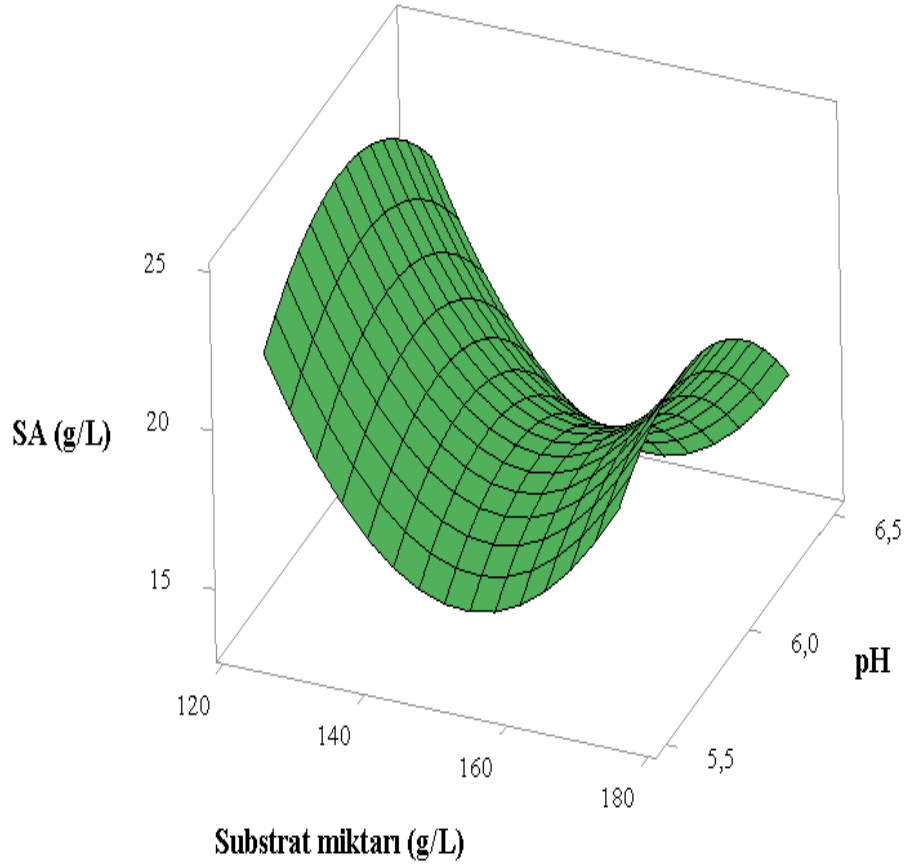
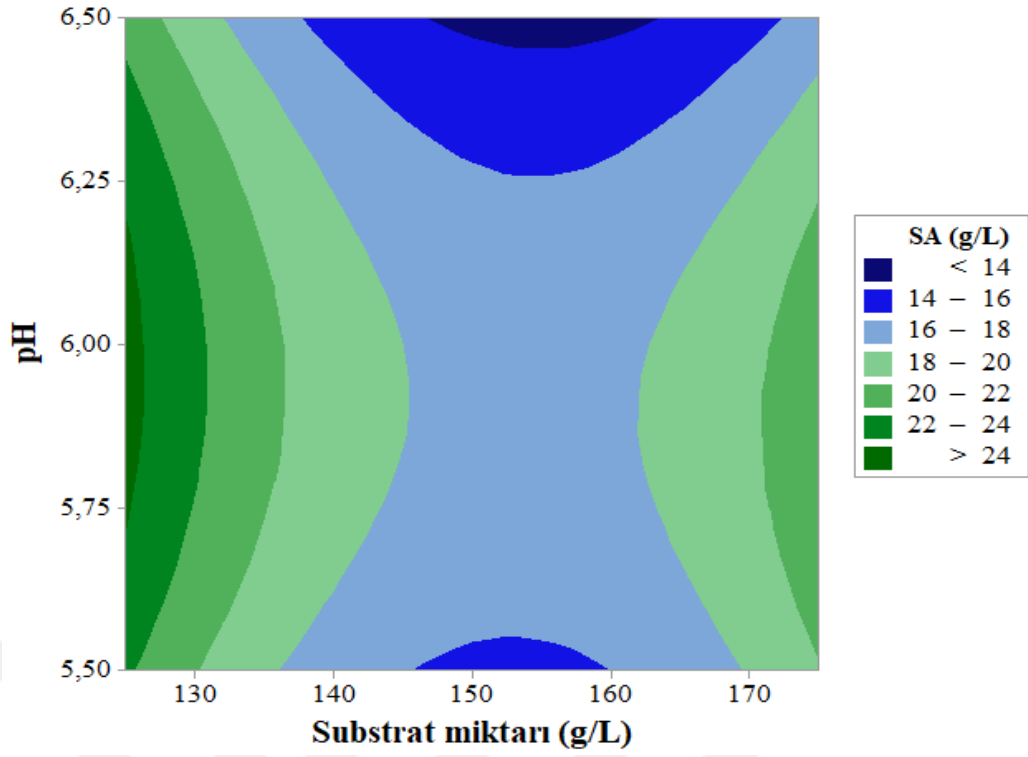
CYY kullanılarak belirlenen optimum koşullarda kontrol suşu ile bir sitrik asit üretimi (doğrulama denemesi) gerçekleştirilmiş ve 33,57 g/L sitrik asit elde edilmiştir. Bu miktar modelin tahminlediği değer olan 33,12 g/L'ye oldukça yakın bir değerdir.



şekil 7. Sabit pH değerinde kontrol suşunun üretimine ait fermentasyon süresi ve substrat miktarının kontur ve yüzey grafiği



Şekil 8. Sabit substrat değerinde kontrol suşunun üretimine ait fermantasyon süresi ve pH değerinin kontur ve yüzey grafiği



Şekil 9. Sabit fermantasyon süresinde kontrol şuşunun üretimine ait substrat miktarı ve pH değerinin kontur ve yüzey grafiği

C. zeylanoides 7.12 suşunun deneysel tasarımıdaki koşullar uygulandığında verdiği yanıtlar değerlendirildiğinde, sitrik asit miktarlarının çok düşük ve birbirine oldukça yakın olmasından dolayı başka bir deneysel tasarım oluşturulması amaçlanmıştır. Yapılan ön denemeler neticesinde pH değerinin yerel suşun sitrik asit üretimini önemli ölçüde etkilediği saptanmıştır. Bunun sonucunda, fermentasyon ortamının başlangıç pH değeri otoklav öncesi (fermentasyon süresince müdahale edilmesine gerek duyulmaması için) 35 g/L CaCO₃ ile 6,5'e ayarlanmıştır. Dolayısıyla, pH değeri sabit tutularak sadece başlangıç glukoz miktarları ve fermentasyon süresi faktörleri kullanılarak yeni bir deneysel tasarım oluşturulmuş ve elde edilen veriler Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Cevap yüzey yönteminde kullanılan iki faktörlü deneysel tasarım ve sistemin yanıtları

Çalışma sırası	Glukoz miktarı (g/L)	Süre (gün)	Sitrik asit miktarı (g/L)	
			<i>C. zeylanoides</i> 7.12	<i>Y. lipolytica</i> Y-1094
1	125	4	8,34±0,63	19,71±0,52
2	125	6	11,36±0,21	18,75±0,04
3	175	5	5,77±0,27	19,43±0,11
4	150	5	6,80±0,31	17,39±2,11
5	150	4	6,35±0,61	20,95±0,08
6	175	4	5,63±0,21	19,99±0,21
7	125	5	9,36±0,04	19,20±0,03
8	150	5	6,64±0,57	16,86±0,56
9	150	5	6,82±0,03	18,29±0,36
10	175	6	6,39±0,08	15,43±1,83
11	150	5	6,62±0,11	18,56±2,93
12	150	6	8,37±1,14	17,45±0,87
13	150	5	6,84±0,59	17,36±0,03

İki faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşuna ait sonuçlar

Bağımsız değişken olarak seçilen başlangıç substrat miktarı ve fermentasyon süresi faktörleri kullanılarak oluşturulan deneysel tasarımıdaki koşullara göre kontrol suşu ile yapılan sitrik asit üretimine ait sonuçlar Tablo 14'te verilmiştir. Sitrik asit miktarları 15,43-20,95 g/L arasında değişiklik göstermiş ve izositrik asit miktarları NaOH ile tamponlama yapılan ortamda elde edilen yan ürün miktarlarına göre oldukça yüksek bulunmuştur (4,26-10,97 g/L). En yüksek ve en düşük biyokütle miktarı ise 2. ve 6. noktalardaki şartlarda sırasıyla 14,19 ve 5,98 g/L olarak belirlenmiştir.

Tablo 14. İki faktörlü deneysel tasarımda kontrol suşu kullanılarak yapılan üretimde elde edilen sonuçlar

Çalışma sırası	Glukoz (g/L)	Süre (gün)	SA (g/L)	iSA (g/L)	X (g/L)	G _K (g/L)
1	125	4	19,71±0,52	6,30±0,42	8,47±1,00	0,33±0,03
2	125	6	18,75±0,04	6,80±0,23	14,19±0,86	0,00±0,00
3	175	5	19,43±0,11	7,42±1,18	11,04±0,22	1,44±0,34
4	150	5	17,39±2,11	8,08±1,97	8,13±1,17	1,30±1,83
5	150	4	20,95±0,08	10,97±0,02	7,61±0,04	1,28±0,12
6	175	4	19,99±0,21	6,65±1,05	5,98±0,04	1,70±0,19
7	125	5	19,20±0,03	5,79±0,01	13,68±0,13	0,13±0,01
8	150	5	16,86±0,56	6,79±0,01	8,30±1,70	1,97±0,66
9	150	5	18,29±0,36	9,09±0,47	8,87±0,06	1,74±0,23
10	175	6	15,43±1,83	4,26±1,49	11,08±1,80	0,00±0,00
11	150	5	18,56±2,93	7,99±1,32	9,35±1,87	1,12±0,01
12	150	6	17,45±0,87	6,90±1,27	10,57±1,74	0,46±0,15
13	150	5	17,36±0,03	7,51±0,04	8,18±0,03	0,56±0,78

SA: sitrik asit; iSA: izositrik asit; X: biyokütle; G_K: kalan glukoz miktarı

İki faktörlü deneysel tasarımda *C. zeylanoides* 7.12 suşuna ait sonuçlar

Yerel suşun iki faktörlü deneysel tasarımdaki koşullar uygulandığında verdiği yanıtlar Tablo 15’te sunulmuştur. En yüksek sitrik asit miktarı (11,36 g/L) 125 g/L glukoz bulunan besi ortamında 6 gün sonunda elde edilirken, en düşük sitrik asit miktarı (5,63 g/L) 175 g/L glukoz bulunan ortamda 4 gün sonunda tespit edilmiştir. Deneysel tasarımdaki tüm şartlarda glukozun neredeyse tamamının yerel suş tarafından tüketildiği belirlenmiştir.

Ayrı ayrı tüm substrat konsantrasyonlarında fermantasyon süresi ilerledikçe sitrik asit miktarı artarken izositrik asit miktarının düştüğü tespit edilmiştir. Biyokütle miktarları 11,87-18,50 g/L arasında değişkenlik göstermiştir. En yüksek biyokütle miktarı ise 2. noktadaki şartlar uygulandığında sırasıyla 18,50 g/L olarak hesaplanmıştır.

Tablo 15. İki faktörlü deneysel tasarımda *C. zeylanoides* 7.12 kullanılarak yapılan üretimde elde edilen sonuçlar

Çalışma sırası	Glukoz (g/L)	Süre (gün)	SA (g/L)	iSA (g/L)	X (g/L)	G _K (g/L)
1	125	4	8,36±0,63	0,20±0,21	17,02±0,10	0,00±0,00
2	125	6	11,36±0,21	0,02±0,01	18,50±0,42	0,00±0,00
3	175	5	5,77±0,27	0,94±0,10	12,22±0,37	0,00±0,00
4	150	5	6,80±0,31	0,32±0,02	14,79±0,72	0,05±0,06
5	150	4	6,35±0,61	0,52±0,08	14,47±2,26	0,04±0,02
6	175	4	5,63±0,21	0,94±0,00	12,18±0,32	0,13±0,01
7	125	5	9,36±0,04	0,03±0,02	17,85±1,17	0,00±0,00
8	150	5	6,64±0,57	0,48±0,52	13,97±0,95	0,11±0,06
9	150	5	6,82±0,03	0,53±0,18	15,30±0,13	0,17±0,08
10	175	6	6,39±0,08	0,76±0,01	11,87±0,26	0,17±0,23
11	150	5	6,62±0,11	0,33±0,04	15,54±0,54	0,23±0,01
12	150	6	8,34±1,14	0,07±0,03	15,03±0,95	0,44±0,51
13	150	5	6,84±0,59	0,32±0,04	15,08±0,52	0,10±0,13

SA: sitrik asit; iSA: izositrik asit; X: biyokütle; G_K: kalan glukoz miktarı

Tablo 16 incelendiğinde, en yüksek SA/iSA oranı $Y_{X/\text{glukoz}}$, $Y_{SA/\text{glukoz}}$, $Y_{SA/X}$ ve biyoprosesin seçimliliği en fazla sitrik asidin elde edildiği 2. noktadaki şartlar uygulandığında sırasıyla 568:1, 0,15, 0,09, 0,61 ve 99,82 olarak hesaplanmıştır. Çok düşük miktarlarda yan ürün (izositrik asit) oluşumu SA/iSA'nın dolayısıyla biyoproses seçimliliğinin çok yüksek değerlere ulaşması ile sonuçlanmıştır. En yüksek $Y_{SA/t}$ verimine (0,09) 1. noktadaki ve en yüksek q_{SA} verimine (0,005) 1, 5 ve 6. noktalardaki koşullar sağlandığında ulaşılmıştır. En yüksek ve en düşük glukoz alım hızları ise 6. ve 2. noktalardaki koşullar sağlandığında 0,15 ve 0,05 olarak hesaplanmıştır.

Kamzolova and Morgunov (2017), *C. zeylanoides* VKM Y-6, VKM Y-14 ve VKM Y-2324 suşlarının sitrik asit miktarını sırasıyla 3,81, 3,60 ve 2,90 g/L, izositrik asit miktarlarını ise 1,61, 1,91 ve 1,91 g/L olarak tespit etmişlerdir. $g_{SA}/g_{\text{hücre}}$ verimleri ise sırayla 1,03, 1,13 ve 0,97 şeklindedir. Çalışmamızda daha yüksek sitrik asit ve biyoproses seçimliliği elde edilmişken, hücre üzerinden verimlerin daha düşük olduğu saptanmıştır.

Tablo 16. *C. zeylanoides* 7.12 ile yapılan sitrik asit üretimine ait verim değerleri

Çalışma Sırası	SA/iSA	Y _{X/glukoz}	Y _{SA/glukoz}	Y _{SA/X}	Y _{SA/t}	q _{SA}	Glukoz alım hızı	S _{SA} (%)
1	41,8:1	0,14	0,07	0,49	0,09	0,005	0,08	97,66
2	568,0:1	0,15	0,09	0,61	0,08	0,004	0,05	99,82
3	6,1:1	0,07	0,03	0,47	0,05	0,004	0,12	85,99
4	21,3:1	0,10	0,05	0,46	0,06	0,004	0,08	95,51
5	12,2:1	0,10	0,04	0,44	0,07	0,005	0,11	92,43
6	6,0:1	0,07	0,03	0,46	0,06	0,005	0,15	85,69
7	312,0:1	0,14	0,07	0,52	0,08	0,004	0,06	99,68
8	13,8:1	0,09	0,04	0,48	0,06	0,004	0,09	93,26
9	12,9:1	0,10	0,05	0,45	0,06	0,004	0,08	92,79
10	8,4:1	0,07	0,04	0,54	0,04	0,004	0,10	89,37
11	20,1:1	0,10	0,04	0,43	0,06	0,004	0,08	95,25
12	119:1	0,10	0,06	0,55	0,06	0,004	0,07	99,17
13	21,4:1	0,10	0,05	0,45	0,06	0,004	0,08	95,53

SA: sitrik asit; iSA: izositrik asit; SA: iSA: sitrik asit: izositrik asit oranı; X: biyokütle; t: fermantasyon süresi; S_{SA}: sitrik asit üretimi için biyoprosesin seçimliliği

Tasarım matrisi ve her bir terimin uyum varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Tablo 17’de verilmiştir. Deneysel veriler ve tahmin edilen veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,994 olarak elde edilmiştir. Bu değer yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %99,4 doğrulukta açıklanabileceği anlamını taşımaktadır. Diğer bir deyişle, 13 deneysel nokta kullanılarak elde edilen model denklemin sitrik asit miktarı için incelenen bağımsız değişken aralığında yüksek doğrulukta kullanılabilirliğini göstermektedir.

Tablodan 17’den de anlaşılabilirliği gibi, regresyon için F testinin %5 önem derecesinde anlamlı olduğu ($P<0,05$) saptanmıştır. Model ile elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliği 0,270 olarak belirlenmiş ve bu değer %5 önem derecesinde önemsiz olduğu ($P>0,05$) tespit edilmiştir. Bunun anlamı, başlangıç substrat konsantrasyonu ve fermentasyon süresinin *C. zeylanoides* 7.12 ile gerçekleştirilen sitrik asit üretimine etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğidir. Bununla beraber, kontrol suşu ile elde edilen yanıtlar ile model arasındaki uyum eksikliği değeri %5 önem seviyesinde önemsiz bulunmuştur ($P<0,05$).

Tablo 17. *C. zeylanoides* 7.12 ile yapılan üretime ait ikinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi

Kaynak	SD	KD	Düz KT	Düz KO	F	P
Regresyon	5	31,264	31,264	6,2528	406,45	<0,001
Lineer	2	26,754	26,754	13,3772	869,56	<0,001
İkinci derece	2	3,2552	3,2552	1,6276	105,80	<0,001
Etkileşim	1	1,2544	1,2544	1,2544	81,54	<0,001
Artık Hata	7	0,1077	0,1077	0,0154		
Uyum Eksikliği	3	0,0634	0,0634	0,0211	1,91	0,270
Saf Hata	4	0,0443	0,0443	0,0111		
Toplam	12	31,3717				

SD: serbestlik derecesi, **KT:** kareler toplamı, **Düz. KT:** düzeltilmiş kareler toplamı, **Düz. KO:** düzeltilmiş kareler ortalaması ($R^2= 0,994$)

Deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve bulunan regresyon katsayıları kullanılarak yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model denklem üretilmiş ve aşağıda verilmiştir. Model eşitlikteki terimlere ait regresyon katsayıları Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18 incelendiğinde başlangıç substrat konsantrasyonu ve cevap (sitrik asit miktarı) arasında negatif, fermantasyon süresi ile pozitif doğrusal bir etki olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). Bu sonuç artan substrat konsantrasyonu ile birlikte sitrik asit miktarının azalacağını, fermantasyon süresi ilerlediğinde ise üretim miktarının artacağını ifade etmektedir.

Y: Sitrik asit miktarı

X₁: Başlangıç substrat miktarı

X₂: Fermantasyon süresi

$$Y = 34,25 - 0,3038 X_1 - 0,576 X_2 + 0,001135 X_1^2 + 0,4895 X_2^2 - 0,02240 X_1X_2$$

Başlangıç substrat miktarı, en yüksek doğrusal katsayı ile (-1,8817) sitrik asit üretimi üzerinde en büyük etkiye sahiptir. Bununla birlikte, substrat konsantrasyonu ve fermantasyon süresinin cevap üzerinde pozitif kuadratik etkisinin olduğu da görülmektedir ($P<0,05$). Bunun anlamı artan glukoz konsantrasyonu ve fermantasyon süresinde sitrik asit miktarının azalması ve daha yüksek değerlere çıkılmaya devam edildiğinde miktarın artmasıdır.

Substrat konsantrasyonu ve fermantasyon süresi arasındaki negatif etkileşim, her iki parametrede meydana gelen artışlarda sitrik asit miktarının artacağı, belli bir değerde üretim miktarının maksimuma ulaşacağı ve daha yüksek değerlere çıktığında sitrik asit üretiminin

azalacağı anlamı taşımaktadır. Ayrıca substrat konsantrasyonu ve fermantasyon süresi arasındaki interaksyon anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

Tablo 18. *C. zeylanoides* 7.12 ile yapılan üretime ait sitrik asit miktarları için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH. Kat	T	P
Sabit	6,7759	0,515	131,57	0,000
SM	-1,8817	0,0506	-37,16	0,000
t	0,9583	0,0506	18,93	0,000
SM X SM	0,7095	0,0746	9,51	0,000
t X t	0,4895	0,0746	6,56	0,000
SM X t	-0,5600	0,0620	-9,03	0,000

SH kat.: standart hata katsayıları, **SM:** substrat konsantrasyonu, **t:** fermantasyon süresi

Şekil 10’da faktörlerden biri merkezde sabit tutulduğunda, diğer faktör seviyelerinin sitrik asit miktarı üzerine olan etkileri kontur ve yüzey grafiği ile gösterilmiştir. Şekilde sitrik asit miktarının merkez noktaya kadar azaldığı, merkez noktadan sonra ise azalmaya devam ettiği belirlenmiştir.

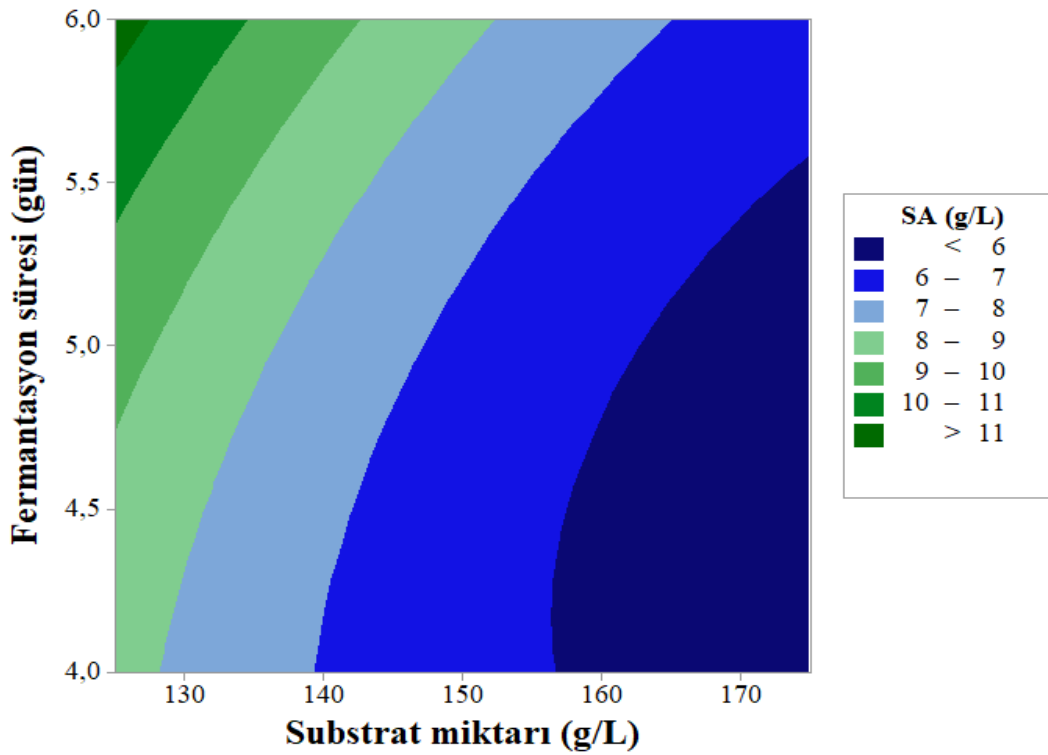
Sitrik asit miktarını modellemek için oluşturulan ikinci derece polinomiyal eşitlik çözülmüş ve proses için belirlenen optimum koşullar belirlenmiştir. Bu optimum koşullar, başlangıç substrat konsantrasyonu 125 g/L (X_1) ve fermantasyon süresi (6 gün) (X_2) şeklindedir. Bu şartlar altında gerçekleştirilen fermantasyon ile maksimum 11,37 g/L sitrik asit elde edilebileceği tahminlemiştir. Bu veriler *C. zeylanoides* 7.12 yerel suşu ile belirtilen koşullarda maksimum sitrik asit üretimi için en uygun seviyeler olarak belirlenmiştir. CYY kullanılarak belirlenen optimum koşullarda yerel suş kullanılarak bir sitrik asit üretimi (doğrulama denemesi) gerçekleştirilmiş ve sonuçta 11,95 g/L sitrik asit elde edilmiştir. Bu miktarın modelin tahminlediği 11,37 g/L’ye oldukça yakın bir değer olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek sitrik asidin elde edildiği koşuldan (125 g/L glukoz bulunan besi ortamında 6 gün fermantasyon) sonraki iki günde de denemeler yapılmış ve üretilen sitrik asit miktarının artmaya devam ettiği tespit edilmiştir. Tablo 19’da yerel suş ile 7 ve 8 günde gerçekleştirilen üretime ait sitrik asit, izositrik asit, biyokütle, tüketilen glukoz miktarları ve verim değerleri sunulmuştur. 6. gündeki sonuçlarla kıyaslandığında, tüm verim değerleri de artış göstermiş ve ileride yapılacak çalışmalar için ürün miktarı ve/veya verimini maksimize etmek amacıyla prosesin tekrar optimize edilebileceği kanıtlanmıştır.

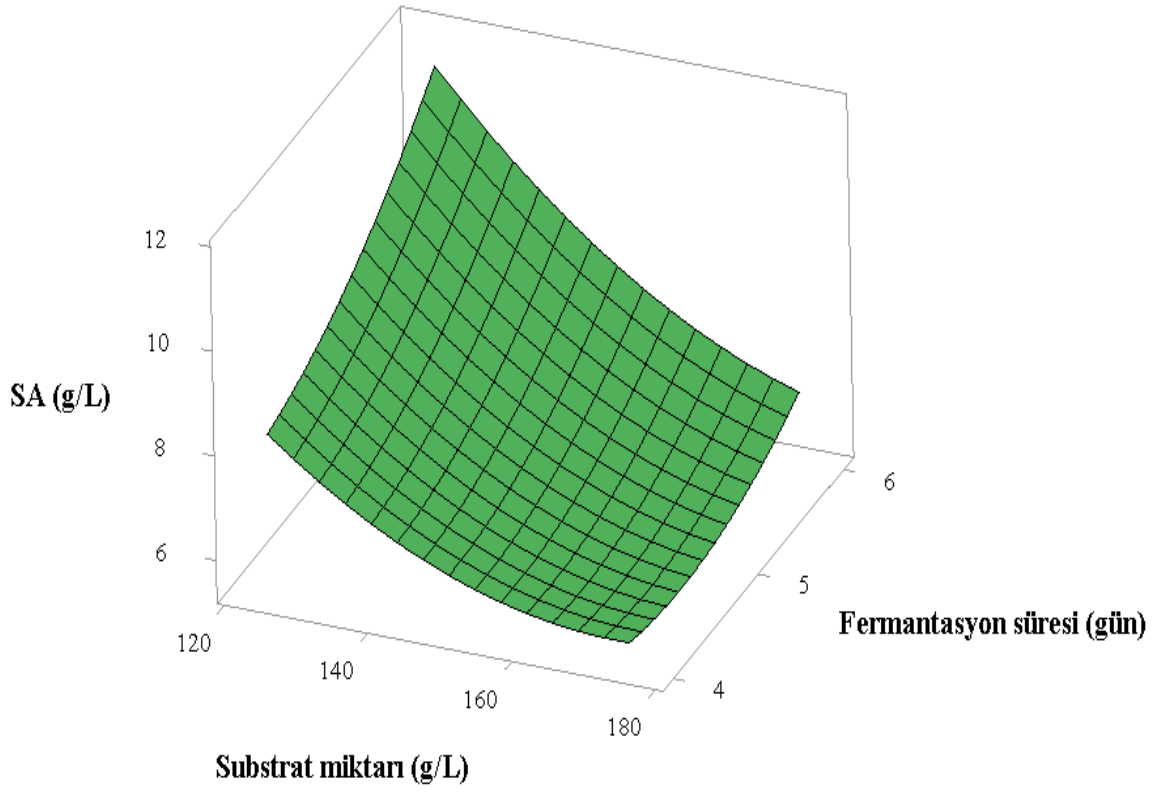
Tablo 19. *C. zeylanoides* 7.12 suşu ile 7 ve 8 gün yapılan fermantasyona ait veriler

Sonuç	7. gün	8. gün
SA (g/L)	14,61	15,38
iSA (g/L)	0,03	0,02
X (g/L)	20,95	20,80
G _K (g/L)	-	-
SA/iSA	487:1	769:1
Y _{X/glukoz}	0,17	0,17
Y _{SA/glukoz}	0,12	0,12
Y _{SA/X}	0,70	0,74
Y _{SA/t}	0,09	0,08
S _{SA} (%)	99,80	99,87

SA: sitrik asit; iSA: izositrik asit; X: biyokütle; G_K: kalan glukoz miktarı; S_{SA}: sitrik asit üretimi için biyoprosesin seçimliliği



Şekil 10. Sabit pH değerinde *C. zeylanoides* 7.12 suşunun üretimine ait substrat miktarı ve fermantasyon süresinin kontur ve yüzey grafiği



Şekil 11. (devam)

SONUÇ

Araştırmada yerel *Candida zeylanoides* suşlarının sitrik asit üretim kapasitelerinin belirlenmesi planlanmıştır. Bu amaçla, 16 *C. zeylanoides* suşu ve 3 farklı *Y. lipolytica* suşunun (kontrol olarak seçilmek üzere) asit üretim kapasiteleri belirlenmiş ve en iyi sonucu veren *C. zeylanoides* 7.12 ve *C. zeylanoides* 12.3 suşları potansiyel üretici suş olarak değerlendirilmek üzere seçilmiştir. Ayrıca tüm *C. zeylanoides* suşların farklı glukoz ve gliserol oranlarında ve farklı pH seviyelerindeki gelişimleri de incelenmiştir. *Y. lipolytica* Y-1094 asit üretim yeteneği dikkate alınarak kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

C. zeylanoides 7.12 ve 12.3 suşları ayrı ayrı hem glukoz hem de gliserol içeren (150 g/L) besi ortamında fermantasyona bırakılmış (pH 6,0, 5 gün ve 180 rpm) ve üretilen sitrik asit miktarları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde, üretici suş olarak *C. zeylanoides* 7.12 ve substrat olarak glukoz deneysel tasarımda kullanılmak üzere seçilmiştir. Deneysel tasarım oluşturmak üzere seçilen faktörler ve seviyeleri, ön denemeler neticesinde belirlenmiştir. Seçilen suşlarla glukoz içeren besi ortamında başlangıç pH değeri (5,5, 6,0 ve 6,5), fermantasyon süresi (4, 5 ve 6. gün) ve substrat miktarı (125, 150 ve 175 g/L) faktörleri esas alınarak Cevap Yüzey Yöntemi istatistiksel metodu kullanılmış ve optimum sitrik asit üretim koşulları belirlenmiştir.

Sitrik asit üretiminde optimum parametrelerin belirlenmesi amacıyla yüzey merkezli tasarıma ait regresyon katsayıları kullanılarak üç değişkenin (pH değeri, substrat miktarı ve fermantasyon süresi) sitrik asit üretimine lineer, kuadratik ve interaksiyon etkileri tespit edilmiştir. Oluşturulan modelin, kontrol suşu ile elde edilen yanıtlara göre proses değişkenlerinin etkilerini yeterli düzeyde açıklayabildiği belirlenirken, *C. zeylanoides* 7.12 suşu için elde edilen yanıtlarla model arasındaki uyum eksikliğinden kaynaklanan hatanın önemli olduğu ve üretilen sitrik asit miktarlarının birbirine yakın ve çok düşük olduğu belirlenmiştir. Kontrol suşu ile yapılan üretimlerde en yüksek sitrik asit miktarı 30,31 g/L olarak pH 5,5, 6 gün, 125 g/L koşullarında elde edilmiştir. Bu şartlarda $Y_{X/\text{glukoz}}$, $Y_{SA/\text{glukoz}}$, $Y_{SA/X}$, $Y_{SA/t}$, q_{SA} , glukoz alım hızı ve biyoprosesin seçimliliği sırasıyla 0,11, 0,25, 2,26, 0,21, 0,02, 0,06 ve %84,48 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, etkileri araştırılan faktörlerin kontrol suşuyla yapılan üretimler için önemli olduğu ve matris çözümlenmeleri sonucunda optimum proses parametrelerinin 5,97 başlangıç pH değeri, 6 gün ve 125 g/L glukoz olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda model, fermantasyon sonunda maksimum 33,12 g/L sitrik asit elde

edilebileceğini tahminlemiştir. Optimum koşullarda bir deneme üretimi de yapılmış ve 33,57 g/L sitrik asit elde edilmiştir.

C. zeylanoides 7.12 suşunun üretim miktarlarının birbirine çok yakın ve oldukça düşük olduğu tespit edildikten ve pH faktörünün yerel suşun sitrik asit üretiminde oldukça etkili olduğu belirlendikten sonra başlangıç pH değeri faktörü devre dışı bırakılarak sabit bir pH değerine ayarlanan (CaCO₃ ile pH 6,5) fermantasyon ortamında substrat miktarı ve fermantasyon süresi faktörleri ve bunların üç farklı seviyesi kullanılarak tekrar bir deneysel tasarım oluşturulmuştur. Deneyler modelin belirlediği 13 noktada yapılmıştır. Elde edilen en yüksek sitrik asit miktarı 11,36 g/L olarak besi ortamında 125 g/L glukoz kullanıldığında 6 gün sonunda hesaplanmıştır. Bu koşullarda $Y_{X/\text{glukoz}}$, $Y_{SA/\text{glukoz}}$, $Y_{SA/X}$, $Y_{SA/t}$, q_{SA} , glukoz alım hızı ve biyoprosesin seçimliliği sırasıyla 0,15, 0,09, 0,61, 0,08, 0,004, 0,05 ve %99,82 olarak belirlenmiştir. Etkileri araştırılan faktörlerin yerel suşla yapılan üretimlerde önemli olduğu belirlenirken, optimum proses parametrelerinin 125 g/L glukoz ve 6 gün olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda model, fermantasyon sonunda maksimum 11,37 g/L sitrik asit elde edilebileceğini tahminlemiştir. Optimum koşullarda bir deneme üretimi de yapılmış ve 11,95 g/L sitrik asit elde edilmiştir. Bununla birlikte, kontrol suşunun oluşturulan bu yeni deneysel tasarımdaki koşullarla yapılan üretimlerde verdiği yanıtlarla model uyumsuzluğundan kaynaklanan hatanın (P<0,05) önemli olduğu belirlenmiştir. En yüksek (20,95 g/L) sitrik asit miktarı ise suşun 150 g/L glukoz bulunan ortamda 4 gün geliştirilmesiyle elde edilmiştir.

Sitrik asit asit düzenleyici, stabilizatör, aroma geliştirici, koruyucu, emülsifiyer ve antioksidan gibi bazı önemli fonksiyonlarından dolayı gıda, ilaç ve kozmetik gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılan önemli bir katkı maddesidir. Sitrik asit talebinin her yıl artış göstermesi, bu organik asidi daha önemli hale getirmekte ve kimyasal sentezden ziyade fermantasyon yoluyla üretilen bu asidin üretimi için yeni proses arayışları devam etmektedir. Sitrik asit üretiminde ticari olarak *Aspergillus niger* ve *Y. lipolytica* türleri kullanılmakla birlikte literatürde *C. zeylanoides* ve *C. ophelia* gibi mayaların da üretimde kullanıldığı ve yüksek verimler elde edilebildiği rapor edilmiştir. Yeni suşların keşfi, çeşitli genetik müdahalelerle suşların üretim kapasitesinin artırılması, üretimin erlenlerden ziyade biyoreaktörde gerçekleştirilmesi, atıkların kullanılması, besi ortamlarının optimizasyonu gibi üretimi etkileyen parametrelerin birkaçının ya da tamamının uygulanması ile sitrik asit üretiminin artırılacağı tahmin edilmektedir.

Mevcut araştırmada, *Y. lipolytica* Y-1094 suşuyla yapılan üretimlerde 6 gün sonunda 33,57 g/L sitrik asit elde edilmiştir. Bununla birlikte, yerel *C. zeylanoides* 7.12 suşu kullanılarak yapılan üretimde 6 gün sonunda 11,95 g/L, 8 gün sonunda ise 15,38 g/L sitrik asit elde edilmiş

ve oluşan yan ürünün minimum seviyede olduğu belirlenmiştir. Gelecekte, suşların optimize edildikleri koşullar dikkate alınarak üretimin biyoreaktörde yapılıp, fermantasyon sıcaklığı, havalandırma hızı gibi faktörlerin de etkilerinin incelenerek ve fermantasyon süresi uzatılarak daha fazla sitrik asit üretmeleri hedeflenmektedir.



KAYNAKLAR

- Abonama, O.M., Mahrous, H., El baz A.F. and Hamza, H.A., 2014. Production of citric acid by *Candida lipolytica* under fermentation conditions using a Plackett-Burman design. *American Journal of Food and Nutrition*, 2 (3), 43-48.
- Abou-Zeid, A.Z.A. and Ashy, M.A., 1984. Production of citric acid: A review. *Agricultural Wastes*, 9 (1), 51-76.
- Abu Yazid, N., Barrena, R., Komilis, D., and Sánchez, A., 2017. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*, 9 (2), 224.
- Anastassiadis, S. and Rehm, H.J., 2006. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (1).
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A. and Wandrey C., 2002. Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (1-2), 81-87.
- Anastassiadis, S., Morgunov I.G., Kamzolova S.V. and Finogenova T.V., 2008. Citric acid production patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2 (2), 107-123.
- Anastassiadis, S., Wandrey C. and Rehm H.J., 2005. Continuous citric acid fermentation by *Candida oleophila* under nitrogen limitation at constant C/N ratio. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (5), 695-705.
- André, A., Chatzifragkou A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis M. and Papanikolaou, S., 2009. Biotechnological conversions of bio- diesel- derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, 9 (6), 468-478.
- Angumeenal, A.R. and Venkappayya, D., 2013. An overview of citric acid production. *LWT-Food Science and Technology*, 50 (2), 367-370.
- Antonucci, S., Bravi, M., Bubbico, R., Di Michele, A. and Verdone, N., 2001. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (2-3), 189-195.
- Arslan, N.P., Aydoğan, M.N. ve Taşkın, M., 2016. Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose-positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. *Journal of Biotechnology*, 231, 32-39.
- Arzumanov, T.E., Shishkanova, N.V. and Finogenova, T.V., 2000. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53 (5), 525-529.
- Barth, G. and Gaillardin, C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19 (4), 219-237.
- Berovic, M. and Legisa, M., 2007. Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*, 13, 303-343.
- Briffaud, J. and Engasser, J., 1979. Citric acid production from glucose. I. Growth and excretion kinetics in a stirred fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 21 (11), 2083-2092.
- Carley, K.M., Kamneva, N.Y. and Reminga, J. 2004. Response surface methodology: CASOS technical report. Center for Computational Analysis of Social and Organizational Systems, Carnegie Mellon University: Pittsburgh, PA, USA.
- Cavallo, E., Charreau, H., Cerrutti, P. and Foresti, M.L., 2017. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Research*, 17 (8), fox084.
- Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F. and Belo, I., 2010. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.

- Crolla, A. and Kennedy, K.J., 2001. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. *Journal of Biotechnology*, 89 (1), 27-40.
- Crolla, A. and Kennedy, K.J., 2004. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. *Journal of Biotechnology*, 110 (1), 73-84.
- Csutak, O. and Sarbu, I., 2018. Genetically Modified Microorganisms: Harmful or Helpful?. *Handbook of Bioengineering Genetically Engineered Foods*, vol. 6., Ed: Holban, A.M. and Grumezescu, A.M. Elsevier, 143-175.
- Çarşanba, E., Papanikolaou, S., Fickers, P., ve Erten, H., 2019. Screening various *Yarrowia lipolytica* strains for citric acid production. *Yeast*, 36 (5), 319-327.
- Çelik, G., Bahriye Uçar, F., Akpınar, O. ve Çorbacı, C., 2014. Production of citric and isocitric acid by *Yarrowia lipolytica* strains grown on different carbon sources. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (3), 285-290.
- Dallé da Rosa, P., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N. and Valente, P. 2014. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia microbiologica*, 59 (6), 477-484.
- Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. and Momenbeik, F., 2009. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. *BioMed Research International*.
- Demain, A.L. and Sanchez, S., 2012. *Microbial Synthesis of Primary Metabolites: Current Trends and Future Prospects*. *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, 3rd ed., Ed: El-Mansi, E.M.T., Bryce, C.F.A., Dahhou, B., Sanchez, S., Demain, A.L. and Allman, A.R. CRC Press, Boca Raton, FL. 77-100.
- Demain, A.L., Phaff, H.J. and Kurtzman, C.P., 1998. *The Industrial and Agricultural Significance of Yeasts. The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th ed., Ed: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. Elsevier, Amsterdam, 13-19.
- Dhillon, G.S., Brar, S.K., Verma, M. and Tyagi, R.D., 2011. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 4 (4), 505-529.
- Dourou, M., Kancelista, A., Juszczak, P., Sarris, D., Bellou, S., Triantaphyllidou, I.E., Rywinska, A., Papanikolaou, S. and Aggelis, G., 2016. Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *Journal of Cleaner Production*, 139, 957-969.
- Encinas, J.P., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Otero, A. and Moreno, B., 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 54 (3), 203-208.
- Ferreira, P., Lopes, M., Mota, M. and Belo, I., 2016. Oxygen mass transfer impact on citric acid production by *Yarrowia lipolytica* from crude glycerol. *Biochemical Engineering Journal*, 110, 35-42.
- Fickers, P., Cheng, H. and Sze Ki Lin, C. 2020. Sugar alcohols and organic acids synthesis in *Yarrowia lipolytica*: Where are we?. *Microorganisms*, 8 (4), 574.
- Finogenova, T., Kamzolova, S., Dedyukhina, E., Shishkanova, N., Il'chenko, A., Morgunov, I., Chernyavskaya, O. and Sokolov, A., 2002. Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4-5), 493-500.
- Förster, A., Aurich, A., Mauersberger, S. and Barth, G., 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (6), 1409-1417.
- Fu, G.Y., Lu, Y., Chi, Z., Liu, G.L., Zhao, S.F., Jiang, H. and Chi, Z.M., 2015. Cloning and characterization of a pyruvate carboxylase gene from *Penicillium rubens* and overexpression of the gene in the yeast *Yarrowia lipolytica* for enhanced citric acid production. *Marine Biotechnology*, 18 (1), 1-14.
- Giarratana, F., Muscolino, D., Beninati, C., Giuffrida, A., Ziino, G. and Panebianco, A., 2014. Characterisation of yeasts isolated from 'Nduja of Spilinga. *Italian Journal of Food Safety*, 3(2).

- Good, D.W., Droniuk, R., Lawford, G.R. and Fein, J.E., 1985. Isolation and characterization of a *Saccharomycopsis lipolytica* mutant showing increased production of citric acid from canola oil. *Canadian Journal of Microbiology*, 31 (5), 436-440.
- Grewal, H.S. and Kalra, K.L., 1995. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, 13 (2), 209-234.
- Hamissa, F.A., Abou-Zeid, A.Z.A. and Redwan, A.A., 1981. Fermentative production of citric acid by yeasts. *Agricultural Wastes*, 3 (1), 21-33.
- Hattori, K. and Suzuki, T., 1974. Large scale production of erythritol and its conversion to D-mannitol production by n-alkane-grown *Candida zeylanoides*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38 (6), 1203-1208.
- Hesham, A.E.L., Mostafa, Y.S. and AlSharqi, L.E.O., 2020. Optimization of citric acid production by immobilized cells of novel yeast isolates. *Mycobiology*, 48 (2), 122-132.
- Holness, M., Sugden, M. and Naish, J., 2015. *Energy Metabolism. Medical Sciences*, 2nd ed., Ed: Naish, J. and Court, D.S. Saunders Ltd, 57-100.
- Holz, M., Förster, A., Mauersberger, S. and Barth, G., 2009. Aconitase overexpression changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (6), 1087-1096.
- Höfer, R., 2015. Sugar- and Starch-Based Biorefineries. *Industrial Biorefineries&White Biotechnology*, Ed: Pandey, A., Höfer, R., Taherzadeh, M., Nampoothiri, K.M. and Larroche, C. Elsevier, 157-235.
- Imandi, S.B., Bandaru, V.R., Somalanka, S.R. and Garapati, H.R., 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (5), 1367-1372.
- Jafari, N., Soudi, M.R. and Kasra-Kermanshahi, R. 2014. Biodegradation perspectives of azo dyes by yeasts. *Microbiology*, 83 (5), 484-497.
- Kamzolova, S.V. and Morgunov, I.G., 2017. Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 243, 433-440.
- Kamzolova, S.V. and Morgunov, I.G., Aurich, A., Perevoznikova, O.A., Shishkanova, N.V., Stottmeister, U., Finogenova, T.V., 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (2), 113-122.
- Kamzolova, S.V., Fatykhova, A.R., Dedyukhina, E.G., Anastassiadis, S.G., Golovchenko, N.P. and Morgunov, I.G., 2011b. Citric acid production by yeast grown on glycerol-containing waste from biodiesel industry. *Food Technology and Biotechnology*, 49 (1), 65-74.
- Kamzolova, S.V., Finogenova, T.V. and Morgunov, I.G., 2008. Microbiological production of citric and isocitric acids from sunflower oil. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (1), 51-59.
- Kamzolova, S.V., Lunina, J.N. and Morgunov, I.G., 2011a. Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (12), 1965-1976.
- Kamzolova, S.V., Shamin, R.V., Stepanova, N.N., Morgunov, G.I., Lunina, J.N., Allayarov, R.K., Samoilenko, V.A. and Morgunov, I.G., 2018. Fermentation conditions and media optimization for isocitric acid production from ethanol by *Yarrowia lipolytica*. *BioMed Research International*.
- Kamzolova, S.V., Yusupova, A.I., Dedyukhina, E.G., Chistyakova, T.I., Kozyreva, T.M. and Morgunov, I.G. 2009. Succinic Acid Synthesis by Ethanol-Grown Yeasts. *Food Technology & Biotechnology*, 47 (2).
- Karasu Yalçın, S., 2007. *Yarrowia lipolytica* ile Sitrik Asit Üretimine Etki Eden Çeşitli Parametrelerin İncelenmesi ve Bazı Endojen Maya Suşlarının Sitrik Asit Üretim Kapasitelerinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

- Karasu-Yalçın, S., Bozdemir, M.T. ve Özbaş, Z.Y., 2009a. A comparative study of the effects of glycerol and mannitol on citric acid production by two *Yarrowia lipolytica* strains. *Romanian Biotechnology Letters*, 14 (6), 4870-4881.
- Karasu-Yalçın, S., Bozdemir, M.T. ve Özbaş, Z.Y., 2010a. Fermantasyon yolu ile sitrik asit üretiminde farklı substrat kaynaklarının kullanılma olanakları. *Gıda Dergisi*, 35 (2), 135-142.
- Karasu-Yalçın, S., Bozdemir, M.T. ve Özbaş, Z.Y., 2010b. Citric acid production by yeasts: fermentation conditions, process optimization and strain improvement. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 9, 1374-1382.
- Karasu-Yalçın, S., Tijen Bozdemir, M., ve Yeşim Özbaş, Z., 2010c. Effects of different fermentation conditions on growth and citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 24 (3), 347-360.
- Karasu-Yalçın, S.K., Bozdemir, M.T. ve Özbaş, Z.Y., 2009b. A comparative study on citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains in two different media. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 408-417.
- Kaya, M., Çınar, K., Fettahoğlu, K. ve Kaban, G., 2017. Genotypic identification of yeast from pastırma. 3rd International Symposium on Fermented Meat, Clermont-Ferrand, Fransa.
- Kieliszek, M., Kot, A.M., Bzducha-Wróbel, A., Błażejczak, S., Gientka, I. and Kurcz, A., 2017. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biology Reviews*, 31 (4), 185-198.
- Kim, K.H., Lee, H.Y. and Lee, C.Y., 2015. Pretreatment of sugarcane molasses and citric acid production by *Candida zeylanoides*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 43 (2), 164-168.
- Klein R.D. and Favreaou M.A. 1995. The *Candida* Species: Biochemistry, Molecular Biology and Industrial Applications. *Food Biotechnology Microorganisms*, Ed: Hui, Y.H. and Khaatourians, G.G. Wiley-VCH Inc, 297-372.
- Kristiansen, B., Matthey, M. and Linden, J., 2002. *Citric Acid Biotechnology*. Taylor&Francis e-Library.
- Kubicek, C.P., 2001. Organic acids. *Basic Biotechnology*, 2nd ed., Ed: Ratledge, C. and Kristiansen, B. Cambridge University Press, 305-324.
- Lazar, Z., Walczak, E. and Robak, M., 2011. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC⁺ transformants. *Bioresource Technology*, 102 (13), 6982-6989.
- Levinson, W.E., Kurtzman, C.P. and Kuo, T.M., 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*, 41 (3), 292-295.
- Liu, X., Lv, J., Xu, J., Zhang, T., Deng, Y. and He, J., 2015. Citric acid production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b yeast when grown on waste cooking oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175 (5), 2347-2356.
- Liu, X.Y., Chi, Z., Liu, G.L., Wang, F., Madzak, C. and Chi, Z.M., 2010. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metabolic Engineering*, 12 (5), 469-476.
- Madhavi, D.L., Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R., 1996. Technological Aspects of Food Antioxidants. *Food Antioxidants Technological Toxicological, and Health Perspectives*, Ed: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. Marcel Dekker, USA, 159-226.
- Mafakher, L., Mirbagheri, M., Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. and Emtiazi, G., 2010. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology*, 27 (4), 337-340.

- Makri, A., Fakas, S. and Aggelis, G., 2010. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, 101 (7), 2351-2358.
- Markets and Markets. 2018. Citric Acid Market worth 3.6 Billion USD by 2020. <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/citric-acid.asp> (23.05.2018)
- Martins, M.A.M., Cardoso, M.H., Queiroz, M.J., Ramalho, M.T. and Campus, A.M.O., 1999. Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures. *Chemosphere*, 38 (11), 2455-2460.
- Max, B., Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A. and Domínguez, J.M., 2010. Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4), 862-875.
- Mitreá, L., Ranga, F., Fetea, F., Dulf, F.V., Rusu, A., Trif, M. and Vodnar, D.C. 2019. Biodiesel-derived glycerol obtained from renewable biomass-A suitable substrate for the growth of *Candida zeylanoides* yeast strain ATCC 20367. *Microorganisms*, 7 (8), 265.
- Moeller, L., Strehlitz, B., Aurich, A., Zehnsdorf, A. and Bley, T., 2007. Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 7 (5), 504–511.
- Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V. and Lunina, J.N., 2013. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (16), 7387-7397.
- Mortensen, H.D., Jacobsen, T., Koch, A.G. and Arneborg, N. 2008. Intracellular pH homeostasis plays a role in the tolerance of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* to acidified nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15), 4835-4840.
- Murphy, R.A. and Horgan, K.A., 2005. Antibiotics, Enzymes and Chemical Commodities from Fungi. *Fungi Biology and Applications*, Ed: Kavanagh, K. John Wiley&Sons, England, 113-144.
- Napitupulu, T.P., Kanti, A., Purnaningsih, I. and Sudiana, I.M. 2020. Comparison of addition mold and yeast inoculants on the production of citric acid in liquid and solid media from sorghum. *E&ES*, 439 (1), 012038.
- Nicaud, J.M., 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29 (10), 409-418.
- Öztürk, I. ve Sağdıç, O. 2014. Biodiversity of yeast mycobiota in “sucuk,” a traditional Turkish fermented dry sausage: phenotypic and genotypic identification, functional and technological properties. *Journal of Food Science*, 79 (11), M2315-M2322.
- Öztürk, I., 2015. Presence, changes and technological properties of yeast species during processing of pastirma, a Turkish dry-cured meat product. *Food Control*, 50, 76-84.
- Papagianni, M., 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25 (3), 244-263.
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G., 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology*, 82 (1), 43-49.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G., 2008b. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 32 (1), 60-71.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., and Aggelis, G., 2006. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 52 (2), 134-142.

- Papanikolaou, S., M. Galiotou-Panayotou, S. Fakas, Komaitis, M. and Aggelis, G., 2008a. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, 99 (7), 2419-2428.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. and Marc, I., 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (4), 737-744.
- Patel, T. and Pandya, H., 2017. Citric Acid Production Fermentation Process. *International Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education*, 3 (2), 3983-3991.
- Pazouki, M., Felse, P.A., Sinha, J. and Panda, T., 2000. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. *Bioprocess Engineering*, 22 (4), 353-361.
- Ramalho, P.A., Scholze, H., Cardoso, M.H., Ramalho, M.T. and Oliveira-Campos, A.M., 2002. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (6), 848-854.
- Ramesh, T. and Kalaiselvam, M., 2011. An experimental study on citric acid production by *Aspergillus niger* using *Gelidiella acerosa* as a substrate. *Indian Journal of Microbiology*, 51 (3), 289-293.
- Rane, K.D. and Sims, K.A., 1993. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme and Microbial Technology*, 15 (8), 646-651.
- Roehr, M., Kubicek, C.P. and Kominek, J. 1996. Citric acid. *Biotechnology*, vol. 6, 2nd ed., Ed: Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A. and Stadler, P. VCH Publishers, Germany, 307-346.
- Rymowicz, W., Fatykhova, A.R., Kamzolova, S.V., Rywińska, A., and Morgunov, I.G., 2010. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (3), 971-979.
- Rymowicz, W., Kautola, H., Wojtatowicz, M., Linko, Y.Y. and Linko, P., 1993. Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39 (1), 1-4.
- Rymowicz, W., Rywińska, A. and Gładkowski, W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chemical Papers*, 62 (3), 239-246.
- Rymowicz, W., Rywińska, A., Żarowska, B. and Juszczyk, P., 2006. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Papers*, 60 (5), 391-394.
- Rywińska, A., Juszczyk, P., Wojtatowicz, M. and Rymowicz, W., 2011. Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 152 (1-2), 54-57.
- Rywińska, A., Musiał, I., Rymowicz, W., Żarowska, B. and Boruckowski, T., 2012. Effect of agitation and aeration on the citric acid production by *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42 (3), 279-291.
- Rzechonek, D.A., Dobrowolski, A., Rymowicz, W. and Mirończuk, A.M. 2019. Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 271, 340-344.
- Sabra, W., Bommareddy, R.R., Maheshwari, G., Papanikolaou, S. and Zeng, A.P., 2017. Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fluxome analyses. *Microbial Cell Factories*, 16 (1), 78.
- Sahasrabudhe, N.A. and Sankpal, N.V., 2001. Production of Organic Acids and Metabolites of Fungi for Food Industry. *Applied Mycology and Biotechnology*, vol. 1, Ed: Khachatourians, G.G. and Arora, D.K. Elsevier Science, Amsterdam, 307-345.
- Sanchez-Riera, F., 2010. Production of organic acids. *Biotechnology*, 5, 1-9.

- Sarris, D., Galiotou- Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M. and Papanikolaou, S., 2011. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater- based media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86 (11), 1439-1448.
- Sato, H.H. and Kawaguti, H.Y., 2016. *Biotechnological Production of Organic Acids. Biotechnological Production of Natural Ingredients For Food Industry*, 1st ed., Ed: Bicas, J.L., Maróstica, M.R. and Pastore, G.M. Bentham Science Publishers, 164-206.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. and Branduardi, P., 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*, 26 (2), 100-108.
- Shetty, V.G., 2015. Production and optimization of citric acid by *Aspergillus niger* using molasses and corncob. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7 (5), 152–157.
- Šlosarčíková, P., Plachá, D., Malachová, K., Rybková, Z. and Novotný, Č. 2020. Biodegradation of Reactive Orange 16 azo dye by simultaneous action of *Pleurotus ostreatus* and the yeast *Candida zeylanoides*. *Folia Microbiologica*, 1-10.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., Rodrigues, C. and Pandey, A., 2006. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 141-149.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Pedroni Medeiros, A.B., Larroche, C. and Pandey, A., 2008. *Production of Organic Acids. Current Developments in Solid-State Fermentation*, Ed: Pandey, A., Soccol, C.R. and Larroche, C. Asiatech Publishers, New Delhi, 205-230.
- Souza, K.S.T., Schwan, R.F. and Dias, D.R., 2014. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 497-506.
- Swain, M.R., Ray, R.C. and Patra, J.K., 2012. *Citric Acid: Microbial Production and Applications in Food and Pharmaceutical Industries. Citric Acid: Synthesis Properties and Applications*, Ed: Vargas, D.A. and Medina, J.V. Nova Science Publishers, Zagreb, 97-118.
- Theron, M.M. and Lues, J.F.R., 2011. *Nature and Composition of Organic Acids. Organic Acids and Food Preservation*. CRC Press, 21-50.
- Tomaszewska, L., Rakicka, M., Rymowicz, W. and Rywińska, A., 2014. A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14 (6), 966-976.
- Torres, N.V. and Voit, E.O., 2002. *A Model of Citric Acid Production in the Mold Aspergillus niger. Pathway Analysis and Optimization in Metabolic Engineering*, Cambridge University Press, 75-134.
- Vandenberghe, L.P., Soccol, C.R., Pandey, A. and Lebeault, J.M., 1999. Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42 (3), 263-276.
- Venter, T., Kock, J.L.F., Botes, P.J., Smit, M.S., Hugo, A. and Joseph, M., 2004. Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (2), 135-138.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higon, G., 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction. Fuels and Industrial Chemicals*, Blackwell Science, 144-164.
- Wang, B., Chen, J., Li, H., Sun, F., Li, Y. and Shi, G. 2017. Pellet-dispersion strategy to simplify the seed cultivation of *Aspergillus niger* and optimize citric acid production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40 (1), 45-53.
- West, T.P., 2013. Citric acid production by *Candida* species grown on a soy-based crude glycerol. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43 (6), 601-611.
- Wojtatowicz, M., Rymowicz, W. and Kautola, H., 1991. Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from glucose hydrol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31 (2), 165-174.

Zhang, S., Jagtap, S.S., Deewan, A. and Rao, C.V., 2019. pH selectively regulates citric acid and lipid production in *Yarrowia lipolytica* W29 during nitrogen-limited growth on glucose. *Journal of Biotechnology*, 290, 10-15.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Bilge SAYIN BÖREKÇİ
Doğum tarihi:	28.04.1989
Doğum Yeri:	Ankara
Uyruğu:	T.C
Adres:	Ardahan Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
E-mail:	bilgesayin@ardahan.edu.tr
Eğitim	
Lise:	Fatih Sultan Mehmet Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği
Yüksek lisans:	Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	KPDS: 66,25/YÖKDİL: 71,25
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
European Biotechnology Thematic Network Association	
Tez Süresince Üretilmiş Yayınlar	
Kaban, G., Kızılkaya, P., Börekçi, B.S. , Hazar, F.Y., Kabil, E., Kaya, M., 2020. Microbiological properties and volatile compounds of salted-dried goose. Poultry Science.	