



SİTRİK ASİT ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Meltem Öztürk, Mustafa Erbaş*

Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş / Received: 26.11.2020; Kabul / Accepted: 02.02.2021; Online baskı / Published online: 10.02.2021

Öztürk, M., Erbaş, M. (2021). Sitrik asit üretimi ve saflaştırılması. GIDA (2021) 46(2) 296-310 doi: 10.15237/gida.GD20133

Öztürk, M., Erbaş, M. (2021). Citric acid production and purification. GIDA (2021) 46(2) 296-310 doi: 10.15237/gida.GD20133

ÖZ

Sitrik asit, oksidatif solunum yapan bütün canlı organizmaların metabolizmasında bulunan önemli bir organik asittir. Bu organik asit; yüksek ekonomik potansiyeli, düşük maliyeti ve düşük toksisitesi nedenleriyle gıda, ilaç, kimya, tarım ve kozmetik endüstrilerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Sitrik asit özellikle gıda endüstrisinde asitlik düzenleyici, lezzet verici, koruyucu, kıvam arttırıcı ve stabilize edici olarak kullanılmaktadır. Dünyada her yıl 2 milyon tondan fazla sitrik asit üretilmesine rağmen ülkemizde sitrik asit üretimi ve bu konu üzerine bilimsel çalışmalar sınırlıdır. Sitrik asit üretimi doğal kaynaklardan izolasyon, biyokimyasal sentez veya mikrobiyel fermantasyon yöntemleriyle yapılmaktadır. Sitrik asit üretim miktarının %99'undan fazlası *Aspergillus niger* ve *Yarrowia lipolytica* mikroorganizmaları kullanılarak mikrobiyel fermantasyon ile gerçekleştirilmektedir. Sitrik asit üretildikten sonra farklı saflaştırma yöntemleri ile izole edilerek ticari bir ürüne dönüştürülmektedir. Bu çalışmada sitrik asidin bazı özellikleri, kullanım alanları, sağlık üzerine etkileri, üretim ve saflaştırma yöntemleri derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Sitrik asit üretimi, fermantasyon, *Aspergillus niger*, *Yarrowia lipolytica*, saflaştırma

CITRIC ACID PRODUCTION AND PURIFICATION

ABSTRACT

Citric acid is an important organic acid found in oxidative metabolism of all living organisms. It has common usage in food, medicine, chemical, agricultural, and cosmetic industries because of its high economic potential and low cost and toxicity. Citric acid is used in food industry as acidity regulator, flavoring, preservative, thickener, and stabilizer. Although more than 2 million tons/year of citric acid is produced in the world, citric acid production and scientific research on this subject in Turkey are limited. Its production is conducted by isolation from natural sources, synthesis or microbial fermentation. More than 99% of total citric acid production is performed with microbial fermentation by using *Aspergillus niger* and *Yarrowia lipolytica*. After the production, it is isolated by different purification methods and turned into a commercial product. In this study, some properties of citric acid, its usage area, effects on human health, production and purification methods were reviewed.

Keywords: Citric acid production, fermentation, *Aspergillus niger*, *Yarrowia lipolytica*, purification

* Yazışmalardan sorumlu Yazar / Corresponding author

✉ : erbas@akdeniz.edu.tr

☎ : (+90) 242 310 6575

☎ : (+90) 242 310 6309

Mustafa Erbaş; ORCID No: 0000-0002-9485-2356

Meltem Öztürk; ORCID No: 0000-0002-4206-2037

GİRİŞ

Sitrik asit, oksijenli solunum yapan organizmaların metabolizmasında yer alan bir trikarboksilik asittir (Amato vd., 2020). Düşük maliyet ve toksisiteye sahip olması nedenleriyle yüksek bir ekonomik potansiyele sahiptir. Farklı endüstri alanlarında yaygın olarak kullanılan sitrik asidin %70 kadarı gıda, %18 kadarı ilaç ve %12 kadarı ise kimya, tarım, kozmetik ve diğer endüstri dallarında kullanılmaktadır (Kamzolova ve Morgunov, 2017; Ciriminna vd., 2017; Wang vd., 2019). Sitrik asit özellikle gıda endüstrisinde koruyucu, asitlik düzenleyici, lezzet verici, antioksidan maddelerin etkinliğini artırıcı, stabilizasyon sağlayıcı ve kıvam artırıcı olarak kullanılmaktadır (Francisco vd., 2019).

Sitrik asidin üretim ve tüketimi yıllara bağlı olarak artmakta olup 1993 yılında 0.7 milyon ton olan üretimin, 2004 yılında 1.4 milyon tona ve 2015 yılında ise 2 milyon tona ulaştığı bildirilmiştir (Yalçın vd., 2010; Addo vd., 2016; Ciriminna vd., 2017; Wang vd., 2019). Günümüzde ise dünyada her yıl iki milyon tondan fazla sitrik asit üretimi yapılmaktadır (Steiger vd., 2017; Ding vd., 2018; Morgunov vd., 2018). Yıllık sitrik asit talep artış oranı %3.5 ile %5.0 arasında değişmekte olup, bu talebin ortalama %4 artış oranıyla 2022 yılında 2.8 milyon tona kadar ulaşacağı tahmin edilmektedir (Ciriminna vd., 2017). Sitrik asidin başlıca üretici ve tüketicileri arasında Çin, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği ülkeleri gelmektedir (Berovic ve Legisa, 2007; Wang vd., 2019). Çin'de yıllık yaklaşık 1.3 milyon ton sitrik asit üretilmektedir (Zhang vd., 2017a).

Sitrik asit üretimi doğal kaynaklardan izolasyon, biyokimyasal sentez ve mikrobiyel fermantasyon olmak üzere üç farklı yöntem ile gerçekleştirilmektedir (Yin vd., 2017; Yu vd., 2018). Ancak mikrobiyel fermantasyon yöntemi ile sitrik asit üretimi yüksek ticari potansiyele sahip olduğundan günümüzde sitrik asit üretiminin %99'undan fazlası bu yöntem ile gerçekleştirilmektedir (Berovic ve Legisa, 2007; Wang vd., 2019). Sitrik asidin mikrobiyel fermantasyon yoluyla üretimi uygun besiyeri ortamında bakteri, küf ve mayalar kullanılarak yapılmaktadır. Ticari sitrik asit üretiminde daha

çok *Aspergillus niger* küfü tercih edilmekle birlikte, *Yarrowia lipolytica* mayası da üretim için kullanılmaktadır (Alnassar vd., 2016; Singh vd., 2016). Mikrobiyel fermantasyon yolu ile sitrik asit üretimi yüzey kültür, derin kültür ve katı hal fermantasyon yöntemleri ile yapılabilmektedir (Wang vd., 2019). Bu fermantasyon yöntemlerinden en fazla kullanılan ve en etkili olanı ise derin kültür fermantasyon yöntemidir (Chen ve Nielsen, 2016; Dezam vd., 2017; Wang vd., 2019). Son yıllarda sitrik asit üretimi için kullanılabilen katı hal fermantasyon yöntemi, fermantasyonda çok çeşitli ve ucuz tarımsal endüstriye dayalı atıkların substrat olarak kullanılmasına imkân vermesine rağmen yöntem ile ilgili çeşitli teknolojik zorluklar bu yöntem ve hammaddelerin kullanılmasını kısıtlamaktadır (Dhillon vd., 2011).

Sitrik asidin, fermantasyondan sonra ortamdaki ayrılması ve saflaştırılması farklı saflaştırma yöntemlerinin kullanıldığı kritik bir aşamadır. Sitrik asidin saflaştırılması için kullanılan yöntemler, fermantasyon yöntemine ve kullanılan substrata bağlı olarak değişmektedir. Ayırma ve saflaştırma işlemleri için çöktürme, membran filtrasyon, renk giderme, elektrodiyaliz, solvent ekstraksiyonu, mikroorganizmaların hareketsizleştirilmesi, adsorpsiyon, absorpsiyon ve iyon değiştirme gibi yöntemler kullanılarak ticari sitrik asit elde edilmektedir (Dhillon vd., 2011; Wang vd., 2019). Bu çalışma ile; sitrik asidin özellikleri, kullanım alanları, sağlık üzerine etkileri ve üretiminin derlenmesi amaçlanmıştır.

SİTRİK ASİT VE ÖZELLİKLERİ

Sitrik asit (2-hidroksi-1,2,3-propan trikarboksilik asit), Latince "*citrus*" kelimesinden türetilen ve oksijenli solunum yapan canlılarda meydana gelen biyokimyasal sitrik asit döngüsünde bir ara madde olarak oluşan bir trikarboksilik asittir (Max vd., 2010; Zhang vd., 2017a; Sawant vd., 2018). Sağlıklı bir yetişkin tarafından dışarıdan alınanlar hariç biyokimyasal olarak her gün ortalama 1.5 kg kadar sitrik asit üretildiği ve metabolize edildiği bildirilmiştir (Vandenbergh vd., 2017).

Sitrik asit, 8. yüzyılda bir simyacı olan Câbir bin Hayyan tarafından keşfedilmiş ve 1784 yılında ise İsveçli kimyacı Carl Wilhelm Scheele tarafından

limon suyundan ilk kez kristalize formda elde edilmiştir (Vandenberghé vd., 2018; Wang vd., 2019). Sitrik asit birçok bitkinin meyve, tohum, gövde ve özsuyu kısımlarında doğal olarak bulunan bir organik asittir. Özellikle kuru maddesinde %8 kadar sitrik asit içeren limon ve misket limonu gibi narenciye türü meyveler sitrik asit açısından önemli doğal kaynaklardır. Ayrıca sitrik asit peynir ve şarap üretiminde de oluşan ve bu ürünlerin atıklarında kalan bir organik asit olarak da dikkat çekmektedir.

Kimyasal formülü $C_6H_8O_7$ şeklinde olan sitrik asidin; molekül ağırlığının 192.124 g/mol, yoğunluğunun 1.665 g/mL, erime sıcaklığının $153^\circ C$, ısıl bozulma sıcaklığının $175^\circ C$ ve kaynama sıcaklığının ise $310^\circ C$ olduğu bildirilmiştir (Cavallo vd., 2017; Vandenberghé vd., 2018). Suda yüksek bir çözünürlüğe sahip olan sitrik asidin $20^\circ C$ sıcaklıktaki suda çözünürlüğünün 59.2 g/100mL olduğu rapor edilmiştir (Anonim, 2020a). Sitrik asit üç karboksil grubuna sahip olması nedeniyle değerleri sırasıyla 3.13, 4.76 ve 6.39 olan üç iyonizasyon sabitine sahiptir (Show vd., 2015).

Sitrik asit ticari olarak anhidrat veya monohidrat olmak üzere iki farklı formda üretilmekte olup, monohidrat formu $78^\circ C$ 'deki ısıl işlem uygulamasıyla anhidrat forma dönüştürülebilmektedir (Cavallo vd., 2017). Sitrik asit, sulu çözeltilerde sitrat iyonlarına dönüşerek sodyum, potasyum ve kalsiyum gibi iyonlarla çeşitli tuzlar oluşturmaktadır (Cavallo vd., 2017). Sitrik asidin bu formları gıda, ilaç, kimya, tıbbi ve kozmetik sektörleri gibi alanlarda çeşitli amaçlarla hammadde olarak kullanılmaktadır.

SİTRİK ASİDİN KULLANIM ALANLARI

Dünyada her yıl üretilmekte olan 2 milyon ton kadar sitrik asit; düşük toksisiteye sahip olması, suda çözünürlüğünün yüksek olması, lezzet ve aroma üzerine olumlu etkilerinin bulunması, oksidasyonu önlemesi ve ürünlerde pH ve asitliğin düzenlenmesinde kullanılması gibi avantajlarından dolayı çoğunlukla gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Steiger vd., 2017; Ding vd., 2018). Gıda koruyucuları arasında GRAS (Generally Recognised As Safe) olarak tanımlanan

ve EFSA (European Food Safety Authority) tarafından E330 kodu ile ifade edilen sitrik asit; gazlı ve gazsız içeceklerde, marmelat ve reçellerde, konservelerde, şekerleme ürünlerinde, dondurulmuş yiyeceklerde ve yağlarda farklı kullanım amaçlarıyla katkı maddesi olarak ilave edilmektedir (Cavallo vd., 2017).

Sitrik asit; gazlı ve gazsız içecekler, meyve suları ve hazır bitki çayları gibi içeceklerde ekşi tat vermek, asitliği düzenlemek ve ürünü korumak gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Şaraplara ise çökmeyi ve oksidasyonu engellemek amacıyla sitrik asit ilavesi yapılmaktadır (Soccol vd., 2006; Ciriminna vd., 2017).

Sitrik asit; reçel, jöle ve marmelat gibi ürünlerde tat ve kıvamın artırılması ve ürünün asitliğin düzenlenmesi için sıklıkla kullanılan bir katkı maddesidir (Vandenberghé vd., 2018). Sitrik asit şekerleme ürünlerinde ise; üründe istenen ekşi ve asidik tadın sağlanması, bu ürünlerde bulunan sakkarozun kristalizasyonunun engellenmesi ve pektin jelinin dayanımının artırılması gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Soccol vd., 2006; Vasanthabharathi vd., 2013; Vandenberghé vd., 2018).

Sitrik asit kimyasal ve mikrobiyel olarak gıdaların kalitesinin korunması ve raf ömürlerinin artırılması bakımından da önem taşımaktadır. Özellikle bitkisel ve hayvansal yağlarda, antioksidan sinerjisti olarak oksidasyonun önlenmesi ve bu ürünlerin stabilizasyonunun korunarak ürünlerdeki kalite kayıplarının azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Dhillon vd., 2011). Ayrıca sitrik asit, toksin üreten *Clostridium botulinum* bakterilerinin neden olduğu botulizme karşı gıdaları korumak için de meyve ve sebze konservelerine koruyucu ve asitlik düzenleyici olarak eklenmektedir (Anderson vd., 2011). Sitrik asit kullanımı ile bu gıdaların pH değeri hedef mikroorganizmaların faaliyet gösteremeyeceği seviyelere düşürülmektedir.

Dondurulmuş ürünlerde de bir katkı maddesi olarak sitrik asit kullanımı oldukça yaygındır. Sitrik asit dondurulmuş meyve ve sebzelerde iz metalleri bağlaması sonucunda üründe bulunan askorbik

asit oksidasyonunun engellenmesi, oksidatif enzimlerin faaliyetlerinin yavaşlatılması ve renk, aroma ve lezzetin bozulmasının önlenmesi için çelatlayıcı olarak da bu ürünlere katılmaktadır (Cavallo vd., 2017; Ciriminna vd., 2017; Vandenberghe vd., 2018). Dondurulmuş et ürünlerinde de ürünün su tutma kapasitesini arttırmak amacıyla sitrik asit kullanılmaktadır (Cheng ve Sun, 2008).

Sitrik asit süt ürünlerinde asitlik düzenleyici, antioksidan ve emülgatör madde olarak kullanılmaktadır (Vandenberghe vd., 2018). Özellikle sütün asitliğini arttırarak pıhtılaşmayı sağlaması bakımından peynir üretiminde pıhtılaştırıcı madde olarak tercih edilen bir katkı maddesidir. Sodyum sitrat kazeini stabilize etmekte ve peynirde su ve yağ fazlarının ayrılmasını engelleyerek emülsifiye edici bir tuz olarak işlev görmektedir (Dhillon vd., 2011).

Sitrik asit gıda endüstrisi dışındaki alanlarda da sıklıkla kullanılan bir üründür. İlaç endüstrisinde, ilaçlarda bulunan aktif bileşenlerin hızlı çözünmesi ve ilaçlarda ekşi tat oluşturulması amaçlarıyla sitrik asit kullanılmaktadır. Ayrıca bikarbonat içeren toz ve tabletlerde suda reaksiyon vererek karbondioksit çıkarması ve koagülasyonu engelleme amaçlarıyla da sitrik asit kullanılmaktadır (Soccol vd., 2006; Cavallo vd., 2017; Vandenberghe vd., 2018). Kimya ve kozmetik endüstrilerinde ise sabun ve dezenfektanların etkinliğini arttırmak, ürünlerin asitliğini düzenlemek ve beyazlatıcı bir özellik kazandırmak amaçlarıyla da sitrik asitten faydalanılmaktadır (Soccol vd., 2006; Ciriminna vd., 2017). Sitrik asit tarım alanında da Fe, Cu, Mg ve Zn gibi iz elementler açısından toprağın eksikliklerini gidermek, bitkilerdeki fosfor kullanımını arttırmak ve fitopatojenlere karşı bitkiyi korumak için kullanılmaktadır (Soccol vd., 2006; Cavallo vd., 2017; Morgunov vd., 2018). Ayrıca ağır metallerle kirlenmiş topraklarda, kurşunu uzaklaştırarak toprağın temizlenmesi için de sitrik asitten yararlanılabilmektedir (Dhillon vd., 2011; Li vd., 2017; Zhang vd., 2017b).

SİTRİK ASİDİN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Sitrik asit Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından kullanımına herhangi bir kısıtlama getirilmemiş ve GRAS listesinde kullanımı kabul edilmiş bir gıda katkı maddesidir (Cavallo vd., 2017; Vandenberghe vd., 2018).

Sitrik asidin sağlık açısından yasal olarak sınırlandırılmış bir günlük tüketim limiti (QS, *quantum satis*, belirlenmemiş miktar) bulunmayıp yalnızca bazı gıdalarda kalite için kullanım limitleri bulunmaktadır (Ciriminna vd., 2017). Kakao ve çikolata ürünlerinde kullanılabilecek maksimum sitrik asit miktarı %0.5 ve bu değer meyve suları için 3 g/L ve şaraplar için ise 1 g/L olarak belirtilmiştir (Anonim, 2020b).

Sitrik asidin çeşitli virüslere karşı antimikrobiyel etki göstermesi nedeniyle kullanıldığı bildirilmektedir. Sitrik asit özellikle hapsirme ve öksürme sonucunda küçük damlacıklar şeklinde yayılan soğuk algınlığı ve grip virüslerini inhibe etmektedir. Bu nedenle yüzeylerin dezenfeksiyonu için kullanılabilmektedir (Ciriminna vd., 2017). Ayrıca sitrik asidin sodyum tuzunun çok bulaşıcı bir virüs türü olan ve insanlarda kusma ve ishal gibi belirtiler gösterebilen norovirüslerin bulaşmasını önlemeye veya norovirüs ile enfekte olan hastalarda semptomların şiddetini azaltmaya yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Koromyslova vd., 2015; Ciriminna vd., 2017). Sitrik asit tuzları kan transfüzyonunda antikoagülan madde olarak da kullanılabilmektedir (Dhillon vd., 2011; Cavallo vd., 2017).

Sitrik asidin insan sağlığı üzerine doğrudan olumlu etkilerinin bulunmasının yanı sıra dolaylı olarak da olumlu etkileri bulunmaktadır. Sitrik asit iyi bir metal bağlayıcıdır ve bu özelliği nedeniyle radyonüklidlerle kirlenmiş nükleer sahalar ile sanayi bölgelerine yakın olan ağır metallerle kirlenmiş topraklardan bu metallerin temizlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Li vd., 2017; Zhang vd., 2017b). Böylelikle insan sağlığı üzerine zararlı etkileri bulunan bu ağır metallerin bitki, hayvan veya su yoluyla insanlara geçmesine engellemeye yardımcı olmaktadır.

Sitrik asidin polimerler arası çapraz bağlanmayı artırması nedeniyle de çevresel iyileştirme uygulamalarında kullanılabilmesi bildirilmektedir (Awadhiya vd., 2016; Cavallo vd., 2017; Ciriminna vd., 2017).

Sitrik asit sağlık açısından faydalı özelliklerinin yanı sıra bazı olumsuz etkilere de yol açabilmektedir. Uzun süreli ve yüksek miktarda tüketimi karın ağrısına neden olabilmektedir (Sweis ve Cressey, 2018). Özellikle küçük çocuklarda sitrik asidin tüketimi, diş minesini olumsuz etkileyerek dişlerin aşınmasına yol açabilmektedir (Asher ve Read, 1987; Johansson vd., 2001; Zheng vd., 2009). Ayrıca, cilt ile temas ettiğinde sitrik asidin tahriş edici bir etkisinin bulunabileceği, ciltte ve gözde kızarıklık ve ağrıya neden olabileceği de bildirilmektedir (Tang ve Yang, 2018). Toz formda bulunan sitrik asidin solunması ile solunum sistemi ve mukozada tahrişin meydana gelebileceği ve bu durumun boğaz ağrısı, öksürük ve nefes darlığına neden olabileceği rapor edilmiştir (Sweis ve Cressey, 2018). Ayrıca çok nadir olmakla birlikte bazı insanlarda sitrik asit içeren gıdaların tüketimi ile çeşitli alerjik reaksiyonların da ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Asher ve Read, 1987; Sweis ve Cressey, 2018).

SİTRİK ASİT ÜRETİMİ

Endüstriyel boyutlardaki ilk sitrik asit üretimi 1860 yılında İtalyan narenciye endüstrisi tarafından sitrik asidin, kalsiyum tuzları ile çöktürülmesiyle doğal kaynaklardan izolasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Cavallo vd., 2017). 1880 yılında Adams ve Grimaux tarafından kimyasal yöntemle gliserolden sitrik asit sentezi yapılmıştır (Max vd., 2010). 1893 yılında Wehmer, *Penicillium glaucum* küf, şeker ve inorganik tuzlar içeren bir kültür ortamında sitrik asit birikimi olduğunu bildirmiştir (Soccol vd., 2006). 1917 yılında ise James Currie, *A. niger* küfünün bazı suşlarının düşük pH ortamında, yüksek şeker konsantrasyonunda ve bazı mineral tuzların varlığında sitrik asit üretimi yapabildiğini tespit etmiştir (Sawant vd., 2018). Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalarda farklı *Aspergillus* türlerinin de sitrik asit üretebildikleri, ancak sitrik asit üretimi için en uygun ve verimi en yüksek olan türün *A.*

niger olduğu belirtilmiştir (Sawant vd., 2018). Böylece 1923 yılında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki "Pfizer" firması şeker ve inorganik tuz çözeltilerine *A. niger* küfünü ilave ederek mikrobiyel yöntemle ticari olarak sitrik asit üretimine başlamış ve daha sonra ise 1970'li yıllarda Japonya'da *Yarrowia* türlerinden endüstriyel sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir (Berovic ve Legisa, 2007; Cavallo vd., 2017).

Günümüzde sitrik asit üretimi doğal kaynaklardan izolasyon, biyokimyasal sentez ve mikrobiyel fermantasyon olmak üzere üç temel yöntemle üretilebilmektedir (Yin vd., 2017; Yu vd., 2018). Sitrik asidin doğal yolla üretimi limon suyundan sitrik asidin kristalize edilerek ayrılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Meksika, Yunanistan ve bazı Güney Amerika ülkelerinde bu yöntemle turuncgillerin olgunlaşmamış meyvelerinden sitrik asit üretimi yapılmaktadır (Berovic ve Legisa, 2007). Bu yöntem günümüzde ticari açıdan çok tercih edilmemekle birlikte uygulama açısından doğal kaynaklardan sitrik asit izolasyonu için pratik bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Sitrik asidin biyokimyasal sentez ile üretimi; glikozun pirüvata dönüşümü, pirüvatin oksidatif dekarboksilasyonu ve karboksilasyonu ve sitrik asit birikimi olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır (Vandenberghe vd., 2018). Sitrik asit döngüsünün (Krebs döngüsü) ilk aşamasında sitrat sentetaz enzimi ve metal iyonları gibi bazı kofaktörlerin etkisine bağlı olarak asetil-CoA ve oksaloasetik asitten sitrik asit elde edilebilmektedir (Vandenberghe vd., 2018). Bu yöntem ticari sitrik asit üretimi için ekonomik olmadığından genellikle tercih edilmemektedir.

Günümüzde sitrik asit üretiminin %99'undan fazlası mikrobiyel fermantasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir (Berovic ve Legisa, 2007). Bu yöntem; üretim tesisleri ve proseslerinin genellikle daha az karmaşık olması, kullanımı kolay olan kontrol sistemlerine ihtiyaç duyulması ve daha az iş gücü ve enerji tüketimi gerektirmesi nedenleriyle diğer üretim yöntemlerine göre önemli avantajlara sahiptir (Soccol vd., 2006). Ayrıca kimyasal ve biyokimyasal sentez yöntemine göre de daha güvenli ve çevre dostu bir yöntem

olduğu için sitrik asit üretiminde mikrobiyel fermentasyon yöntemi tercih edilmektedir (Sun vd., 2017).

Mikrobiyel Fermentasyon Yöntemi ile Sitrlik Asit Üretimi

Sitrlik asidin mikrobiyel fermentasyon yoluyla üretimi uygun besiyeri ortamında bakteri, (*Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium* vd.), maya (*Y. lipolytica*, *Candida oleophila*, *C. guilliermondii*, *C. citroformans*, *C. tropicalis*, *Hansenula anamola* vd.) veya küf (*A. niger*, *A. wentii*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fonscaeus*, *A. phoenicis*, *Penicillium janthinellum* vd.) ilave edilerek yapılmaktadır (Tan vd., 2016; Cavallo vd., 2017; Hu vd., 2018; Francisco vd., 2019; Monrroy vd., 2019). Ancak ticari sitrik asit üretiminde çoğunlukla maya ve küfler kullanılmakta olup, maya olarak *Y. lipolytica* ve küf olarak ise *A. niger* mikroorganizmaları üretim özellikleri açısından diğer türler arasında öne çıkmaktadır (Alnassar vd., 2016; Singh vd., 2016; Tan vd., 2016; Cavallo vd., 2017).

Y. lipolytica, lipit açısından zengin ortamlarda gliserol ve sakkaroz gibi karbon kaynaklarını kullanarak çoğalabilmekte ve böylece sitrik asit üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Kamzolova ve Morgunov, 2017). Mayaların yüksek substrat derişimleri ve metal iyonlarına karşı dirençli olması, tek hücreli olmaları nedeniyle üretim proseslerinin kontrolünün daha kolay yapılabilmesi ve proseslerdeki dönüşüm oranları ile verimin daha yüksek olması gibi özelliklerinden dolayı kullanım açısından küflere göre daha avantajlı oldukları bildirilmektedir (Liu vd., 2014; Cavallo vd., 2017). Ayrıca mayalar genetik olarak kolaylıkla modifiye edilebilmekte ve böylelikle suşlar sitrik asit üretimini arttırmak üzere tasarlanabilmektedir (Liu vd., 2014; Cavallo vd., 2017). Bazı *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. oleophila*, *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. fibriae*, *C. catenulate*) ve *Brettanomyces*, *Debaromyces*, *Endomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Saccharomyces* türlerinin çeşitli karbon kaynaklarını kullanarak önemli düzeyde sitrik asit üretebildikleri bildirilmiştir (Cavallo vd., 2017; Hu vd., 2018; Kamzolova ve Morgunov, 2017). Ancak tüm bu

avantajlarına rağmen sitrik asit üretiminde bazı suşların yan ürün olarak yüksek miktarda izositrik asit üretmeleri maya ile fermentasyonun en önemli dezavantajı olup, bu da mayaların sitrik asit üretiminde kullanımlarını sınırlandırmaktadır (Tan vd., 2016; Cavallo vd., 2017; Kamzolova ve Morgunov, 2017).

A. niger küfünün çeşitli suşları (ATTC 9142, YW-112, BC1, NRRL 2001 vd.) kullanım kolaylığı, substrat olarak çeşitli düşük maliyetli hammaddeleri fermente edebilme yeteneği, 2.5-3.5 gibi düşük pH aralığında çoğalabilmesi, toksik yan ürün oluşturmaması, yüksek üretim verimi ve besiyeri ortamının şeker konsantrasyonunu arttırarak verimin de arttırılabilmesi gibi nedenlerle ticari sitrik asit üretimi için en fazla tercih edilen mikroorganizmalardır (Soccol vd., 2006; Max vd., 2010; Show vd., 2015; Vandenberghe vd., 2017; Hu vd., 2018; Sawant vd., 2018). Ticari sitrik asit üretiminde *A. niger* küfünün üretim özelliklerine en yakın türün *A. wentii* olduğu belirtilmiştir (Amato vd., 2020).

A. niger mikroorganizması tarafından sitrik asit üretim verimini etkileyen önemli faktörler fermentasyon ortamının kimyasal bileşenleri ve fiziksel koşullarıdır. Sitrlik asit üretiminde; karbon, azot ve fosfat kaynakları ve bunların konsantrasyonları, iz elementlerin konsantrasyonları, fermentasyon ortamının sıcaklığı ve pH değeri, fermentasyon süresi, havalandırma ve karıştırma gibi faktörler fermentasyon verimini etkilemektedir (Vandenberghe vd., 2017).

Kullanılan karbon kaynağının türü sitrik asit üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Karbon kaynağının türü, kullanılan mikroorganizmaya göre değişmekte olup, besiyeri ortamında mikroorganizma tarafından hızla tüketilebilen karbonhidratların varlığı sitrik asit üretimi için elzemdir. *A. niger* ile sitrik asit üretiminde kullanılacak en iyi substratın sakkaroz olduğu ve bu mikroorganizmanın sakkarozun yanı sıra glikoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, mannoz, ksiloz ve arabinoz gibi basit şekerleri de metabolize edebildiği rapor edilmiştir (Vandenberghe vd., 1999; Yalçın vd., 2010; Morgunov vd., 2018). Selüloz, etanol, sorboz, mannitol, laktik asit ve

malik asit gibi diğer karbon kaynakları da sitrik asit üretimini sınırlı miktarda desteklemektedir. Ayrıca sitrik asit üretiminde melas, çeşitli nişastaca zengin maddeler, hidrokarbonlar ve tarımsal atıklar da hammadde olarak kullanılabilir (Liu vd., 2014). Tarımsal atık olarak mısır koçanı, buğday samanı ve soya, sorgum ve pirinç gibi tahılların işlenmesi ile oluşan atık yan ürünler tercih edilmektedir (Yalçın vd., 2010; Addo vd., 2016; Wang vd., 2019; Amato vd., 2020). Düşük maliyeti ve %40-55 gibi yüksek şeker içeriği nedeniyle şeker endüstrisinin bir yan ürünü olan melas, sitrik asit üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Morgunov vd., 2018). Ancak melas, sitrik asit üretimi üzerinde geciktirici bir etkiye sahip olan kalsiyum, magnezyum, manganez, demir ve çinko gibi mineralleri içermektedir. Bu maddelerin melas içerisindeki konsantrasyonlarının düşük olmasına rağmen, hammadde olarak kullanılmadan önce melastan bu iz metallerin uzaklaştırılması gerekmektedir (Vandenberghé vd., 1999; Vandenberghé vd., 2017). Bunun için genellikle potasyum ferrosiyaniür kullanılarak bu iz elementler çöktürülmektedir (Soccol vd., 2006).

Sitrik asit üretimi için karbon kaynağının türü kadar bu kaynağın konsantrasyonu da önemli bir parametredir. Şeker konsantrasyonunun %14 ila %22 arasında olduğu şartlarda daha iyi bir üretim verimi elde edilebilmektedir (Soccol vd., 2006; Dhillon vd., 2011). Şeker konsantrasyonunun %2.5 düzeyinden daha düşük olması durumunda sitrik asit üretiminin gerçekleşmediği rapor edilmiştir.

Sitrik asit üretimi, azot kaynağının doğasından ve konsantrasyonundan doğrudan etkilenmektedir. Üre, amonyum nitrat ve sülfat, pepton, malt ekstraktı gibi fermantasyon için gerekli olan azot kaynakları ortam pH değerinin düşmesine yol açmaktadır (Vandenberghé vd., 1999). Azot hücre yapısının bir parçası olarak metabolizmaya katıldığından sitrik asit üretimi için uygun bir azot dengesi elzemdir. Sitrik asit fermantasyonu için gerekli olan azot konsantrasyonunun amonyum sülfat için 0.1-0.4 g/L olduğu bildirilmiştir (Cavallo vd., 2017). *A. niger*, düşük azot konsantrasyonundaki bir ortama konulduğunda

metabolik yol değişebilmekte ve sitrik asit yerine oksalik asit üretimi meydana gelebilmektedir (Soccol vd., 2006). Yüksek azot konsantrasyonları ise küf gelişimini ve şeker tüketimini artırırken, üretilen sitrik asit miktarını ise azaltmaktadır (Vandenberghé vd., 1999; Soccol vd., 2006; Vandenberghé vd., 2018).

Sitrik asit bileşimini etkileyen bir diğer faktör de fosfat kaynağıdır. Sitrik asit üretimi için en uygun fosfat kaynağının potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) olduğu ve değerinin 0.5-5.0 g/L aralığında olması gerektiği bildirilmiştir (Soccol vd., 2006; Dhillon vd., 2011). Manganez (<1 mg/kg), demir (1.3 mg/kg), bakır (0.1-500 mg/kg), magnezyum sülfat (%0.02-0.025) ve çinko (0.3 mg/kg) gibi elementler yalnızca belirli değerlerde bulunduğu fermantasyon prosesini olumlu yönde etkilemektedir (Soccol vd., 2006; Dhillon vd., 2011; Vandenberghé vd., 2018). Bununla birlikte sitrik asit üretimi aerobik bir işlem olduğundan, oksijen düzeyinin üretim üzerinde belirleyici bir etkisi olup, oksijen konsantrasyonunun %25 doygunluğun üzerinde tutulması gereklidir (Soccol vd., 2006; Max vd., 2010; Vandenberghé vd., 2017).

Fermantasyon ortamının sıcaklığı ve pH değerinin yüksek olması ve uzun fermantasyon süresi de sitrik asit üretimini engellemektedir. Fermantasyon için en uygun sıcaklık aralığının 28-30°C olduğu bildirilmiştir (Vandenberghé vd., 2018). *A. niger*'in yüksek miktarda sitrik üretebilmesi için pH düzeyinin ise 2.5-3.5 aralığında olması gerektiği ve daha yüksek pH değerlerinde gerçekleştirilen fermantasyonda yan ürün olarak oksalik ve glikonik asitlerin oluştuğu belirtilmiştir (Show vd., 2015).

Sitrik asit üretimi genellikle düşük pH değerlerinde ve 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra başlamakta olup, bu işlem 4-6 gün boyunca devam etmektedir (Vandenberghé vd., 2018). Sitrik asit üretimini etkileyen parametrelerden biri de metanol, etanol, izopropanol ve n-propanol gibi düşük molekül ağırlıklı alkollerin varlığı olup, bu alkollerin konsantrasyonları %1 ila %4 arasında iken sitrik asit verimini arttırdıkları bildirilmiştir (Dhillon vd., 2011).

Belirtilen tüm bu faktörlerin yanı sıra bir diğer önemli parametre ise uygulanacak mikrobiyel fermantasyon yöntemidir. Mikrobiyel fermantasyon ile sitrik asit üretimi yüzey kültür, derin kültür ve katı hal fermantasyon yöntemleri ile yapılmaktadır (Wand vd., 2020).

Yüzey Kültür Fermantasyonu

Sitrik asit üretimi için uygulanan ilk özgün fermantasyon yöntemi sıvı yüzey kültür yöntemidir. Yüzey kültür fermantasyonu, mikroorganizmaların substrat üzerinde geliştiği sabit bir fermantasyon işlemidir. Çok eski bir uygulama olmasına rağmen günümüzde de bazı küçük ve orta ölçekli tesislerde bu yöntemin kullanıldığı belirtilmektedir (Show vd., 2015). Bu yöntem basit ekipmanlar kullanılarak, daha az enerji ve düşük maliyetle üretime imkân vermesi gibi bazı avantajları nedeniyle günümüzde de kullanılmakta ve dünyada sitrik asit ihtiyacının %5 ila %10 kadarı bu yöntem ile karşılanmaktadır (Berovic ve Legisa, 2007; Dhillon vd., 2011). Yüzey kültür yöntemi, besiyeri ortamı için çalkalama ve karıştırmaya ihtiyaç duyulmaması nedeniyle enerji açısından daha ekonomik bir yöntemdir. Bu yöntemin bir diğer avantajı ise ürünün ortamdaki ayrılmasına gerek olmamasıdır. Bu yöntemde işletim, kurulum ve enerji maliyetleri daha ekonomik olmasına rağmen, üretim için daha fazla işçilik gereksinimi bulunmaktadır (Sawant vd., 2018).

Yüzey fermantasyon yönteminde, mikroorganizmalar substrat yüzeyinde çoğalmakta ve substrat olarak genellikle rafine veya ham sakkaroz ve şeker kamışı veya şeker pancarı melası kullanılmaktadır (Vandenberghede vd., 2017). Ayrıca buğday kepeği, patates nişastası ve glikoz şurubu gibi besin maddeleri de substrat olarak değerlendirilebilmektedir (Alnasaar vd., 2016). Hazırlanan steril substrat ortamı çelik veya alüminyumdan yapılmış 1-2.5 cm derinliğe sahip sığ tepsilere ince tabakalar halinde yayılmaktadır. Çoğaltılmış *A. niger* sporları da ortama aşılandıktan sonra tepsilere 50-100 L kapasiteye sahip özel fermantasyon odalarına yerleştirilmektedir (Vandenberghede vd., 2017). Sitrik asit üretimi 28-30 °C sıcaklıkta ve %40-60 nispi nem aralığında 8-12 gün süre ile gerçekleştirilmektedir.

Bu yöntemde havalandırma, soğutma ve ısıtma sistemleri büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle üretimin yapıldığı fermantasyon odaları sıcaklık kontrollü, nemli ve hava sirkülasyonludur. Fermantasyon işlemi tamamlandığında, ham fermantasyon sıvısı boşaltılmakta ve üretilen sitrik asit kristallendirilmektedir. Genellikle fermantasyon verimi başlangıçtaki şeker içeriğine bağlı olarak %70-75 değerlerine kadar ulaşabilmektedir. Oluşan küf miselleri yeniden taze ortama eklenerek tekrar kullanılabilir.

Üretim sürecinde hava ve besin maddelerinin eşit olmayan dağılımı, taban alanının verimsiz kullanımı ve kontaminasyon nedenleriyle sorunlar yaşanabilmektedir (Show vd., 2015). Fermantasyon odalarına sıklıkla *Penicillium* türleri, diğer *Aspergillus* türleri, mayalar ve laktik asit bakterileri tarafından bulaşma olabilmektedir (Vandenberghede vd., 1999; Vandenberghede vd., 2017). Bu nedenle fermantasyon odalarının özellikle küf sporlarının çimlendiği ilk 2 gün boyunca aseptik koşullar altında korunması gerekmektedir (Vandenberghede vd., 2017).

Papadaki ve Mantzouridou (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *A. niger* mikroorganizması kullanılarak yüzey kültür fermantasyon yöntemi ile beyaz üzüm posasından elde edilen şekerlerle zenginleştirilmiş ve İspanyol usulü işleme prosesi ile üretilmiş yeşil zeytin atık sularından sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon yapılarak, küçük ölçekten (250 mL) ölçek büyütme (5 L) işlemi uygulanmıştır. Prosesin miktarı artırılınca optimizasyonda aynı şekilde sonuç elde edilmiştir. Optimizasyon faktörleri; başlangıç sakkaroz içeriği, devir hızı, fermantasyon zamanı, optimizasyonun cevapları ise sitrik asit içeriği (85 g/L), verimi (0.54 g/g), biyokütle içeriği (49 g/L) olarak belirlenmiştir. Sitrik asit üretimi için beyaz üzüm posası ve yeşil zeytin atık suyunun karıştırılmasıyla, hammaddede yeterli seviyede şeker (110 g/L) ve asitlik (pH 5.2) elde edilmiştir. Optimum fermantasyon koşulları; 30°C sıcaklıkta, pH değeri 4 ila 6 arasında, fermantasyon süresi ise 5 ila 12 gün arasındadır. Yapılan fermantasyon sonrasında filtrasyon işlemi ile mikroorganizmanın biyokütlesi ayrılmış kalan sıvıya saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda, %97

verim ve %95 saflıkta sitrik asit elde edildiği bildirilmiştir.

Sitrik asidin üretiminde uygulanan ilk yöntem yüzey kültür yöntemi olmakla birlikte günümüzde sitrik asit üretiminin %80'den fazlası nişasta veya sakkaroz içeren bir besiyeri ortamına *A. niger* küfü ilave edilerek gerçekleştirilen derin kültür fermantasyon yöntemidir (Berovic ve Legisa, 2007; Chen ve Nielsen, 2016; Dezam vd., 2017; Campanhol vd., 2019).

Derin Kültür Fermantasyonu

Bu yöntem sıvı kültür veya batık kültür fermantasyonu yöntemi olarak da bilinmektedir. Derin kültür fermantasyon yöntemi yüksek üretim verimi, düşük maliyeti ve kontaminasyon riskinin daha az olması gibi avantajları nedeniyle en fazla tercih edilen üretim yöntemidir (Yalçın vd., 2010; Show vd., 2015; Vandenberghe vd., 2017). Yüksek enerji maliyeti ise bu prosesin dezavantajıdır. Ayrıca diğer yöntemlere göre daha karmaşık kontroller gerektirdiğinden üretimde iyi eğitilmiş iş gücüne ihtiyaç duyulmaktadır (Berovic ve Legisa, 2007). Derin kültür fermantasyon yöntemi ile üretimde sitrik asit verimi; kullanılan mikroorganizmaların morfolojisi, karbon kaynağı, başlangıç karbon ve azot konsantrasyonları, iz elementlerin türü ve konsantrasyonları ile sistemin sıcaklığı, pH düzeyi ve havalandırma hızı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Vandenberghe vd., 2017).

Derin kültür fermantasyonu fermentörde kesikli, yarı sürekli veya sürekli sistemlerle gerçekleştirilmektedir (Yalçın vd., 2010). Mekanik olarak sürekli karıştırılmalı tank ve kabarcıklı kolon reaktörü olmak üzere iki tip fermentör kullanılmaktadır. Ancak maliyeti, boyutları ve işlevselliği açısından avantajları nedeniyle kabarcıklı kolon reaktörü daha çok tercih edilmektedir (Vandenberghe vd., 2017). Derin kültür yönteminde sitrik asit üretimi iki basamaklı bir processten oluşmaktadır. Prosesin ilk aşamasında sporlar çoğalma ortamına aşılınmakta ve 3-4 gün sonra çoğalan miseller ayrılmaktadır. İkinci aşamada ise ayrılan miseller fermentöre alınan steril besiyeri ortamına eklenmektedir. Fermantasyon 25-30°C sıcaklıkta ve 3-5 gün

süresince gerçekleştirilmektedir. Fermantasyon sırasında sistemin karıştırma ve havalandırma hızı kontrol edilmekte ve sitrik asit üretimi şartlara bağlı olarak 5-12 gün içerisinde tamamlanmaktadır (Soccol vd., 2006; Dhillon vd., 2011). Fermantasyon tamamlandıktan sonra elde edilen ortam sitrik asit ekstraksiyonu için boşaltılmakta ve miseller ayrılarak tekrar kullanılabilir.

Kamzolova ve Morgunov (2017) tarafından derin kültür yöntemi ile glikoz, sakkaroz ve ksiloz kullanımıyla ve azot, fosfor ve kükürt varlığında birçok maya tür ve suyu kullanılarak yapılan bir çalışmada; *Y. lipolytica* mayası ile %92.5-95.3 verimde, 80-85 g/L sitrik asit üretimine ulaşılmış ve bu değer endüstriyel açıdan yeterli olarak değerlendirilmiştir.

Katı Hal Fermantasyonu

Katı hal fermantasyonu, Koji yöntemi olarak da bilinmektedir (Show vd., 2015). Sitrik asit üretimi için en kolay üretim tekniği olarak belirtilen bu yöntem ilk kez 1935 yılında Japonya'da meyve atıkları ve pirinç kepeği gibi bol miktarda hammaddenin bulunduğu bölgelerde geliştirildiğinden sitrik asit üretimi için uygulanan geleneksel Japon yöntemi olarak da bilinmektedir (Vandenberghe vd., 2017; Monrroy vd., 2019). Katı hal fermantasyonu yönteminde doğal substrat kaynakları olarak çoğunlukla meyve suyu endüstrisi artıkları kullanılmakta olup, lignoselülozik tarımsal endüstriyel atıklar da substrat olarak değerlendirilmektedir (Yalçın vd., 2010; Dhillon vd., 2013; Campanhol vd., 2019). Derin kültür fermantasyon yöntemine göre çeşitli avantajlara sahip olması nedeniyle katı hal fermantasyon yönteminin kullanımı son yıllarda artış göstermiştir (Campanhol vd., 2019). Bu yöntem substrat nem içeriğinin düşük olması nedeniyle daha az bakteriyel kontaminasyon riski taşımaktadır. Ayrıca üretim için daha basit fermantasyon tesisleri kullanılmakta ve daha az enerji tüketimi gerekmektedir (Barrington ve Kim, 2008). Katı hal fermantasyonu yönteminde iz elementlerin varlığı sitrik asit üretimini olumsuz etkilemediğinden substrata bir ön işlem yapılmasına gerek yoktur (Soccol vd., 2006; Berovic ve Legisa, 2007). Katı hal fermantasyonunda en yaygın kullanılan

mikroorganizma *A. niger* olmakla birlikte, bu yöntemin daha düşük su aktivitesi düzeyinde uygulanması nedeniyle besinlerin ve metabolitlerin difüzyon hızlarının düşmesine bağlı olarak özellikle azot ve fosfat ihtiyacı yüksek olan suşların katı hal fermantasyon yöntemi için uygun olmadığı bildirilmiştir (Monrroy vd., 2019).

Mikroorganizmaların çözünmeyen katı substratların bulunduğu ortamdaki gelişimleri, doğal ortamlarına benzer bir gelişme göstermektedir (Barrington ve Kim, 2008). Bu yöntemde, uygun oranda şeker kamışı melası veya nişasta gibi kaynaklar içeren fermantasyon ortamı, gözenekli yapıya sahip çözünmez özellikteki katı materyaller üzerine tutturulmaktadır. Hazırlanan bu ortam üzerine spor süspansiyonu aşılansak 25-30°C sıcaklıkta, %65-70 nispi nem ve 5-5.5 pH değeri aralığında 6-7 günde sitrik asit üretimi gerçekleştirilmektedir (Berovic ve Legisa, 2007; Vandenberghe vd., 2018).

Dhillon ve diğer arkadaşları tarafından (2013), *A. niger* mikroorganizması kullanılarak 12 L hacminde dönen tambur tipi bir biyoreaktörde, katı hal fermantasyon yöntemi ile elma posasından sitrik asit üretimi üzerine etanol ve metanol varlığının ve fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonun optimum koşulları olarak belirlenen; %3 metanol, her 12 saatte 1 saat 200 rpm hızda karıştırma, 1 vvm havalandırma hızı ve 120 saat inkübasyon süresinde 220.6 g/kg kurumadde oranında sitrik asit üretim değerine ulaşıldığı bildirilmiştir.

SİTRİK ASİDİN SAFLAŞTIRILMASI

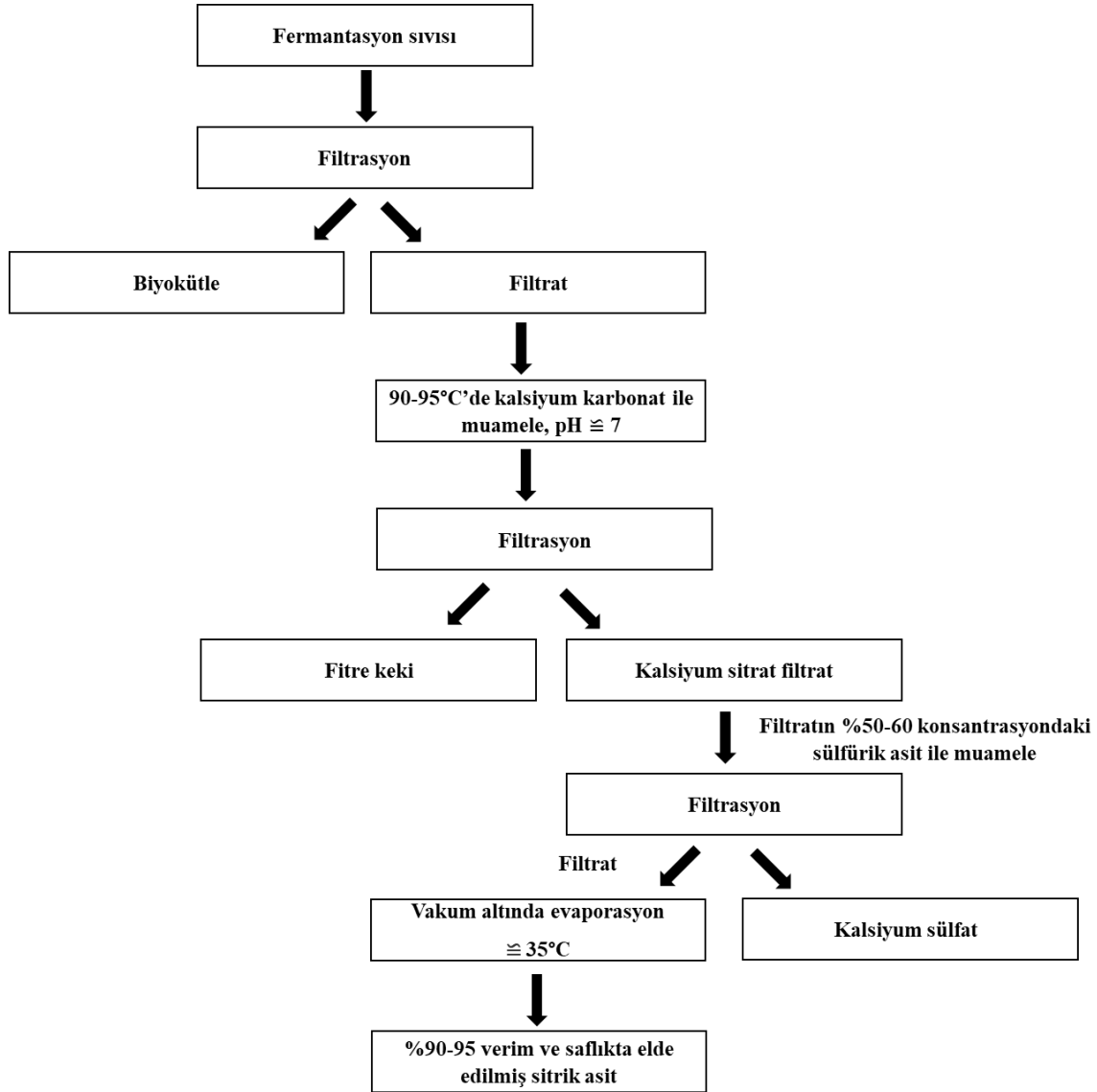
Fermantasyon işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen sitrik asit, miselyum ve mineral tuzları, organik asitler ve proteinler gibi çeşitli safsızlıklar içerebilmektedir. Sitrik asidin fermantasyon ortamından kazanımı saflaştırma işlemleri uygulanarak yapılmaktadır. Sitrik asidin saflaştırılması için kullanılan yöntemler, uygulanan fermantasyon yöntemine ve fermantasyonda kullanılan hammaddeye bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ayırma ve saflaştırma işlemleri için çöktürme, solvent ekstraksiyonu, elektrodializ, membran filtrasyonu, renk

giderme, adsorpsiyon, absorpsiyon, mikroorganizmaların immobilizasyonu ve iyon değiştirme gibi yöntemler kullanılabilirlerdir (Dhillon vd., 2011; Wang vd., 2019). Bu yöntemler içerisinde ise çöktürme ve solvent ekstraksiyonu yöntemleri en çok tercih edilen saflaştırma uygulamalarıdır (Wang vd., 2019). Sitrik asidin fermantasyon ortamından saflaştırılması temel olarak Şekil 1'de gösterilmiştir.

Çöktürme işlemi geleneksel bir ayırma yöntemi olup, kolay uygulanabilirliği nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Çöktürme işleminin verimi sitrik asit konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve kalsiyum karbonat ilave oranı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Sitrik asidin yüksek çözünürlüğü nedeniyle bu ayırmada beklenen kayıp yaklaşık %4-5 kadardır (Soccol vd., 2006). Fermantasyon işlemi tamamlandıktan sonra çöktürme işleminden önce fermantasyon sıvısı ön filtrasyondan geçirilmekte ve biyokütleden ayrılmaktadır (Papadaki ve Mantzouridou, 2019). Filtrasyon yapılmış fermantasyon sıvısına çöktürme işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde sitrik asit içeren karışıma 90-95°C sıcaklıkta, yaklaşık pH değeri 7 olan kalsiyum karbonat (CaCO_3) ilave edilmekte ve sitrik asit çözünmeyen tri-kalsiyum sitrata dönüştürülerek çöktürülmektedir (Papadaki ve Mantzouridou, 2019; Wang vd., 2019; Amato vd., 2020). Çöken kalsiyum sitrat tuzları, konsantre edilmiş %50-60 sülfürik asit (H_2SO_4) ile muamele edilerek kalsiyum sülfat (CaSO_4) ve sitrik asit ayrıştırılmakta ve oluşan kalsiyum sülfat filtrasyon yöntemi ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Kamzolova ve Morgunov, 2017; Delgado Dobladez vd., 2018). Sıvı içerisinde oluşarak kalan sitrik asit monohidrat, yaklaşık 35°C sıcaklıkta vakum buharlaştırıcı ile konsantre edilmektedir. Konsante sitrik asit çözeltisi santrifüjlenerek kurutulmakta ve sitrik asit kristalleri elde edilmektedir (Vandenberghe vd., 2017; Papadaki ve Mantzouridou, 2019). Kurutma işlemi 36.5°C altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilirse kristalize sitrik asit monohidrat, bu geçiş sıcaklığının üzerinde yapılırsa kristalize sitrik asit anhidrat elde edilebilmektedir. Sitrik asit içeren çözelti aktif karbon ile muamele edildiğinde veya iyon değiştiricilerden geçirildiğinde daha fazla

saflaştırma yapılabilmekte ve rengi açılabilir (Vandenbergher vd., 2017). Çöktürme yöntemi kolay uygulanabilir olmasına rağmen yapılan işlemlerden dolayı çok fazla atık ortaya çıkması bu yöntemin dezavantajıdır

(Delgado Dobladez vd., 2018). Ayrıca yüksek enerji tüketimi ve farklı aşamalar içermesi saflaştırma maliyetini de artırmaktadır (Sun vd., 2017).



Şekil 1. Sitrik asidin fermantasyon ortamından saflaştırılması

Sitrik asidin geri kazanılmasının alternatif bir yöntemi olan solvent ekstraksiyonu, sulu ortamda çözünmeyen veya sadece az çözünür olan seçici bir çözücü vasıtasıyla sitrik asidin ayrılması uygulamasıdır. Çöktürme işlemi, büyük ölçekli endüstriyel işletmelerde en çok kullanılan yöntem olmasına rağmen, sitrik asidin ayrılması için

solvent ekstraksiyonu ile geri kazanım yöntemi de yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang vd., 2019). Ancak çöktürme işlemi her türlü fermantasyon ortamı için uygulanabilirken, solvent ekstraksiyonu için daha az safsızlık içeren bir fermantasyon sıvısı gerekmektedir. Bu nedenle ekstraksiyondan önce fermantasyon sıvısındaki

küf miselleri ve süspansiyon halindeki maddelerin filtrasyon işlemi ile uzaklaştırılması gerekmektedir (Soccol vd., 2006). Ekstraksiyon işleminde kullanılacak çözücü maksimum miktarda sitrik asit ve minimum miktarda safsızlık ekstrakte edecek özellikte olmalıdır. Bu amaçla bazı alifatik alkoller, ketonlar, eterler, esterler, tri-n-butilfosfat, alkilsülfoksitler ve suda çözünmeyen aminler gibi organofosfor bileşikler ile kısmen veya tamamen suyla karışmayan diğer organik çözücüler sitrik asit ekstraksiyonunda kullanılmaktadır (Berovic ve Legisa, 2007). Aseton, su, etanol ve metanol çözeltileri ile 20-25°C sıcaklıkta yapılan ekstraksiyon işlemi ile sitrik asit izolasyonu yapılabildiği bildirilmiştir (Soccol vd., 2006). Solvent ekstraksiyon yöntemi ile fermantasyon karışımından yaklaşık %90 oranında sitrik asit elde edilebilmektedir. Çözgenlerle ayrılan sitrik asit daha sonra çözücünün damıtılması veya ekstraktın suyla yıkanması ile çözgenlerden ayrılmakta ve konsantre edilerek kristallendirilmektedir (Dhillon vd., 2011).

Sitrik asidin geri kazanımında çevre dostu yöntemlerden biri olarak bilinen elektrodiyaliz, son yıllarda endüstriyel ölçekte yaygın olarak kullanılan klasik metotlara alternatif bir yöntem olarak görülmektedir. Elektrodiyaliz, elektrik yüklü membranların ve elektriksel potansiyel farkın yürütücü gücü altındaki iyonları sulu çözeltilerden ayırmak için kullanılmaktadır. Anyon ve katyon değiştirici membranların birbiri ardına iki elektrot arasına yerleştirilmesi ile oluşturulan ve elektrodiyaliz membran yöntemleri arasında yaygın olarak kullanılan bu yöntem, proseste meydana gelen atık suları azaltmayı amaçlamaktadır (Cavallo vd., 2017). Bu yöntem tuzların, elektrik potansiyel farkı sayesinde asit ve baza dönüştürüldükten sonra elektriksel yüklü monopolar veya bipolar membranlar aracılığıyla çözeltilerden ayrılmasını sağlamaktadır. Yaygın olarak kullanılan bipolar membranlar, bir elektrik alanında suyun H⁺ ve OH⁻ iyonlarına ayrılmasını sağlayan özel iyon değişim membranlarıdır. Bipolar membran elektrodiyalizi, geleneksel yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir (Liu vd., 2015). Teknik olarak gelişmiş bir yöntem olan elektrodiyaliz ile atık miktarı azaltılmakta, geliştirilmiş üretkenlik ile yüksek verim

sağlanmakta ve sürekli prosesler gerçekleştirilmektedir (Liu vd., 2015; Sun vd., 2017). Bu yöntemin en önemli avantajı ise, organik asit tuzlarından organik asitlerin üretilmesidir (Liu vd., 2015; Sun vd., 2017). Ancak elektrodiyaliz yöntemi yüksek maliyet ve özel ekipman ihtiyacı gibi dezavantajlara da sahiptir.

Sitrik asit, adsorpsiyon yöntemi kullanılarak da geri kazanılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan polimer reçineler, yüksek adsorpsiyon kapasitesi ve seçiciliğe sahiptir (Delgado Dobladez vd., 2018). Saflaştırma için kullanılan hafif bazik reçineler üçüncül aminler veya piridin ile yapılmaktadır (Wu vd., 2009; Delgado Dobladez vd., 2018). Ayrıca son yıllarda özellikle derin kültür fermantasyon yöntemi gibi sürekli bir proseste ortaya çıkan bazı sorunları en aza indirmek amacıyla mikrobiyel hücrelerin immobilizasyonu da saflaştırmayı kolaylaştırmak amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Amato vd., 2020). Sitrik asit üretiminde *A. niger* immobilizasyonu kalsiyum aljinat jeli, poliakrilamid jel, poliüretan köpük ve kriyopolimerleştirilmiş akrilamid kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Amato vd., 2020; Behera 2020). Mikroorganizmaların immobilize formda canlı biyokatalizörler olarak uygulanması yöntemi genellikle serbest mikroorganizma uygulamalarından daha iyi üretim verimi sağlamaktadır (Amato vd., 2020).

SONUÇ

Sitrik asit gıda, ilaç, kimya, tarım, kozmetik ve diğer endüstrilerde yaygın olarak kullanılan bir organik asittir. Sitrik aside olan tüketim talebi her geçen yıl artmakta ve artan taleple birlikte sitrik asit üretimine daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Dünyada her yıl 2 milyon tondan fazla miktarda sitrik asit üretilmesine rağmen ülkemizde sitrik asit üretimi ve bu konu üzerine bilimsel çalışmalar son derece sınırlıdır. Sitrik asit konusunda ithalat ve dışa bağımlılığın azaltılabilmesi için sitrik asidin özelliklerinin, üretim ve geri kazanım proseslerinin araştırılması ve incelenmesinin önemli bir konu olduğu değerlendirilmiş ve bu amaçla sitrik asidin özellikleri, kullanım alanları,

sağlık üzerine etkileri, üretim ve saflaştırma yöntemleri bu derlemede açıklanmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu makale ile ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında bir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

Tüm yazarlar makalenin yapılmasında, yazılmasında ve yayınlanmasında eşit katkı sağlamışlardır. Makalenin hazırlanmasında başka kişi ve/veya kurumların katkısı yoktur.

KAYNAKLAR

Addo, M.G., Kusi, A., Andoh, L.A., Obiri-Danso, K. (2016). Citric acid production by *Aspergillus niger* on a corn cob solid substrate using one factor at a time optimisation method. *Int Adv Res J in Sci, Eng Technol*, 3(1): 95-99.

Alnassar, M., Tayfour, A., Afif, R. (2016). The study of lactose effect on citric acid production by *Aspergillus niger* PLA30 in cheese whey. *Int J Chem Tech Res*, 9(1): 318-322.

Amato, A., Becci, A., Beolchini, F. (2020). Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Crit Rev Biotechnol*, 40(2): 199-212.

Anderson, N.M., Larkin, J.W., Cole, M.B., Skinner, G.E., Whiting, R.C., Gorris, L.G.M., Rodriguez, A., Buchanan, R., Stewart, C.M., Hanlin, J.H., Keener, L., Hall, P.A. (2011). Food safety objective approach for controlling *Clostridium Botulinum* growth and toxin production in commercially sterile foods. *J Food Prot*, 74(11): 1956-1989.

Anonim (2020a). Solubility of citric acid. www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/311. [Son Erişim Tarihi: 03.04.2020].

Anonim (2020b). Katkı maddelerinin kısıtlı miktarlarda kullanılabildiği gıda maddeleri. https://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/23172_1.pdf. [Son Erişim Tarihi: 05.04.2020].

Asher, C., Read, M.J. (1987). Early enamel erosion in children associated with the excessive consumption of citric acid. *Br Dent J*, 162(10): 384-387.

Awadhya, A., Kumar, D., Verma, V. (2016). Crosslinking of agarose bioplastic using citric acid. *Carbohydr Polym*, 151: 60-67.

Behera, B.C., (2020). Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. *Crit Rev Microbiol*, 46(6): 772-749.

Berovic, M., Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnol Annu Rev*, 303-343.

Campanhol, B.S., Silveira, G.C., Castro, M.C., Ceccato-Antonini, S.R., Bastos, R.G. (2019). Effect of the nutrient solution in the microbial production of citric acid from sugarcane bagasse and vinasse. *Biocatal Agric Biotechnol*, 19: 101147.

Cavallo, E., Charreau, H., Cerrutti, P., Foresti, M.L. (2017). *Yarrowia lipolytica*: A model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Res*, 17(8).

Chen, Y., Nielsen, J. (2016). Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 37: 165-172.

Cheng, Q., Sun, D.W. (2008). Factors affecting the water holding capacity of red meat products: a review of recent research advances. *Crit Rev Food Sci and Nutr*, 48(2): 137-159.

Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., Pagliaro, M. (2017). Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chem Cent J*, 11(22): 1-9.

Delgado Dobladez, J.A., Águeda Maté, V.I., Uribe Santos, D.L., Torrellas, S.Á., Larriba, M. (2018). Citric acid purification by simulated moving bed adsorption with methanol as desorbent. *Sep Sci Technol*, 54(6): 930-942.

Dezam, A.P.G., Vasconcellos, V.M., Lacava, P.T., Farinas, C.S. (2017). Microbial production of organic acids by endophytic fungi. *Biocatal Agric Biotechnol*, 11: 282-287.

Dhillon, G.S., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi R.D. (2011). Recent advances in citric acid bioproduction and recovery. *Food Bioprocess Technol*, 4: 505-529.

Dhillon, G.S., Brar, S.K., Kaur, S., Verma, M. (2013). Bioproduction and extraction

- optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Ind Crops Prod*, 41: 78–84.
- Ding, N., Peng, C., Ren, Y., Liu, Y., Wang, P., Dong, L., Liu, H., Wang, D. (2018). Improving the dewaterability of citric acid wastewater sludge by Fenton treatment. *J Cl Prod*, 196: 739–746.
- Francisco, J.C.E., Rivera, W.L., Vital, P.G. (2019). Influences of carbohydrate, nitrogen, and phosphorus sources on the citric acid production by fungal endophyte *Aspergillus fumigatus* P316. *Prep Biochem Biotechnol*, 50(3): 292-301.
- Hu, W., Li, W., Yang, H., Chen, J. (2018). Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103: 201-209.
- Johansson, A.K., Sorvari, R., Birkhed, D., Meurman, J.H. (2001). Dental erosion in deciduous teeth—an in vivo and in vitro study. *Journal Dentistry*, 29(5): 333–340.
- Kamzolova, S.V., Morgunov, I.G. (2017). Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*, 243: 433–440.
- Koromyslova, A.D., White, P.A., Hansman, G.S. (2015). Treatment of norovirus particles with citrate. *Virology*, 485: 199–204.
- Li, G., Yang, X., Liang, L., Guo, S. (2017). Evaluation of the potential redistribution of chromium fractionation in contaminated soil by citric acid/sodium citrate washing. *Arabian J Chem*, 10: 539–545.
- Liu, X., Lv, J., Xu, J., Zhang, T., Deng, Y., He, J. (2014). Citric acid production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b yeast when grown on waste cooking oil. *Appl Biochem Biotechnol*, 175(5): 2347–2356.
- Liu, X., Li, Q., Jiang, C., Lin, X., Xu, T. (2015). Bipolar membrane electro dialysis in aqua-ethanol medium: Production of salicylic acid. *J Membr Sci*, 482: 76–82.
- Liu, X., Yan, Y., Zhao, P., Song, J., Yu, X., Wang, Z., Xia, J., Wang, X. (2019). Oil crop wastes as substrate candidates for enhancing erythritol production by modified *Yarrowia lipolytica* via one-step solid state fermentation. *Bioresour Technol*, 294: 122194.
- Max, B., Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., Domínguez, J.M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Braz J Microbiol*, 41(4): 862–875.
- Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V., Lunina, J.N. (2018). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials. *Ferment*, 4(2): 36.
- Monrroy, M., Rueda, L., Aparicio, A.L., García, J.R. (2019). Fermentation of *Musa paradisiaca* peels to produce citric acid. *J Chem*, 2019: 1–8.
- Papadaki, E., Mantzouridou, F.T. (2019). Citric acid production from the integration of Spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 280: 59-69.
- Sawant, O., Mahale, S., Ramchandran V., Nagaraj, G., Bankar A. (2018). Fungal citric acid production using waste materials: a mini-review. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*; 8(2): 821-828.
- Steiger, M.G., Mattanovich, D., Sauer, M. (2017). Microbial organic acid production as carbon dioxide sink. *FEMS Microbiol Lett*, 364(21).
- Singh, P., Draboo, S., Singh, A., Chaturvedi, S., Sharma, S., Verma, P. (2016). Citric acid production from different sources under submerged conditions using *Aspergillus niger*. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 5(5): 483-492.
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol Biotechnol*, 44(2): 141-149.
- Show, P.L., Oladele K.O., Siew Q.Y., Aziz Zakry, F.A., Lan, J.C.W., Ling, T.C. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Front Life Sci*, 8(3): 271–283.
- Sun, X., Lu, H., Wang, J. (2017). Recovery of citric acid from fermented liquid by bipolar membrane electro dialysis. *J Cleaner Prod*, 143: 250–256.
- Sweis, I.E., Cressey, B.C. (2018). Potential role of the common food additive manufactured citric acid in eliciting significant inflammatory reactions

- contributing to serious disease states: a series of four case reports. *Toxicol Rep*, 5: 808–812.
- Tan, M.J., Chen X., Wang Y.K., Liu G.L., Chi, Z.M. (2016). Enhanced citric acid production by a yeast *Yarrowia lipolytica* over-expressing a pyruvate carboxylase gene. *Bioprocess Biosyst Eng*, 39(8): 1289–1296.
- Tang, S.C., Yang, J.H. (2018). Dual effects of alpha-hydroxy acids on the skin. *Mol*, 23(4): 863.
- Vandenbergh, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, A., Lebeault, J.-M. (1999). Microbial production of citric acid. *Braz Arch Biol Technol*, 42(3): 263–276.
- Vasanthabharathi, V., Sajitha, N., Jayalakshmi, S. (2013). Citric acid production from U-V mutated estuarine *Aspergillus niger*. *Adv Biol Res*, 7(3): 89–94.
- Vandenbergh, L.P.S., Rodrigues, C., Carvalho, J.C., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. (2017). Production and application of citric acid. *Curr Dev Biotechnol Bioeng*, 557–575.
- Vandenbergh, L.P.S., Karp, S.G., Oliveira, P.Z., Carvalho, J.C., Rodrigues, C., Soccol, C.R. (2018). Solid-state fermentation for the production of organic acids. *Curr Dev Biotechnol Bioeng*, 415–434.
- Yalçın Karasu, S., Bozdemir, T.M., Özbaş, Z.Y. (2010). Fermantasyon yolu ile sitrik asit üretiminde farklı substrat kaynaklarının kullanılma olanakları. *GIDA*, 35(2): 135–142.
- Yin, X., Shin, H., Li, J., Du, G., Liu, L., Chen, J. (2017). Comparative genomics and transcriptome analysis of *Aspergillus niger* and metabolic engineering for citrate production. *Sci Rep*, 7(1): 410–440.
- Yu, B., Zhang, X., Sun, W., Xi, X., Zhao, N., Huang, Z., Ying, H., Liu, L., Liu, D., Niu, H., Wu, J., Zhuang, W., Zhu, C., Chen, Y., Ying, H. (2018). Continuous citric acid production in repeated-fed batch fermentation by *Aspergillus niger* immobilized on a new porous foam. *J Biotechnol*, 276–277, 1–9.
- Wang, L., Cao, Z., Hou, L., Yin, L., Wang, D., Gao, Q., Wu, Z., Wang D. (2016). The opposite roles of *agdA* and *glaA* on citric acid production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(13): 5791–5803.
- Wang, B., Li, H., Zhu, L., Tan, F., Li, Y., Zhang, L., Ding, Z., Shi, G. (2017). High-efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. *Bioprocess Biosyst Eng*, 40(6): 891–899.
- Wang, J., Cui, Z., Li, Y., Cao, L., Lu, Z. (2019). Techno-economic analysis and environmental impact assessment of citric acid production through different recovery methods. *J Cl Prod*, 249: 119315.
- Wu, J., Peng, Q., Arlt, W., Minceva, M. (2009). Model-based design of a pilot-scale simulated moving bed for purification of citric acid from fermentation broth. *J Chromatogr A*, 1216(50): 8793–8805.
- Zhang, H., Xu, J., Su, X., Bao, J., Wang, K., Mao, Z. (2017a). Citric acid production by recycling its wastewater treated with anaerobic digestion and nanofiltration. *Process Biochem*, 58: 245–251.
- Zhang, H., Gao, Y., Xiong, H. (2017b). Removal of heavy metals from polluted soil using the citric acid fermentation broth: a promising washing agent. *Environ Sci Pollut Res*, 24(10): 9506–9514.
- Zheng, J., Xiao, F., Qian, L.M., Zhou, Z.R. (2009). Erosion behavior of human tooth enamel in citric acid solution. *Tribol Int*, 42(11–12): 1558–1564.