

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİKve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK KATMA DEĞERLİ ÜRÜNLER ELDE ETMEK İÇİN
BİYOATIKLARIN BİYOTEKNOLOJİK ARITIMI

GİZEM GÜNEÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK KATMA DEĞERLİ ÜRÜNLER
ELDE ETMEK İÇİN BİYOATIKLARIN
BİYOTEKNOLOJİK ARITIMI

GİZEM GÜNEÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. AHMET KARAGÜNDÜZ

GEBZE
2013



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....13.06.2013..... tarih ve ..2013./...31... sayılı kararıyla oluşturulan
jüri tarafından ..10.07./2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan
.....Gizem GÜNEÇ.....'ın tez çalışması
....Gercek Mühendisliği...Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak
kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) :

Doç. Dr. Ahmet Karagündüz

U. Karpuzlu

ÜYE

: Prof. Dr. Bülent Keskinler

ÜYE

: Prof. Dr. Aziz Tanrıseven

A-Tanrıseven

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Dünyada son yıllarda biyoatıklardan fermentasyon yöntemiyle yüksek değerli kimyasal üretim potansiyeli üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bu kapsamda, Türkiye ve Yunanistan da belirlenen tarımsal atıklar özellikle Yunanistan'ın elinde bulundurduğu mevcut kültürler kullanılarak (aerobik, anaerboik) fermentasyon metabolitlerinin belirlenmesi, oluşacak ürün çeşitliliğinin tespit edilmesi, bu ürünler içerisinde yüksek değere sahip kimyasalların seçimi, seçilen kimyasalın tam kontrollü fermentörde üretim optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Tarımsal ve tarımsal ürünlerin işlenmesine dayanan faaliyetler Yunanistan'da olduğu kadar Türkiye'de de oldukça büyük miktarda biyolojik atık (mikrobiyal aktiviteye elverişli atıklar) ortaya çıkarır. Bu tür materyaller atıktan çok üretim artışı olarak değerlendirilmeli ve biyoteknolojik ve kimyasal proseslerde karbon kaynağı olarak kullanılmalıdır. Bunlar bol miktarda ve bundan dolayı ucuz olup aslında bazı durumlarda negatif ticari değere sahiptir. Yaygın bazı atıklar şunlardır: ham gliserol (biyodizel üretim süreci sırasında oluşur), zeytin yan ürünleri (OMW), peyniraltı suyu, melas, şilempe, turunçgil küspesi, bira fabrikasında kurutulmuş tahıl tanecikleri, üzüm posası, buğday kepeği, ayçiçeği çekirdeği küspesi, elmanın sıvı atık veya yarı katı yan ürünleri, pancar kökü ve domates sanayii atıkları. Çoğu atık kendilerini değerlendirecek uygun bir yöntemin bulunmayışı nedeniyle daha beklerken kolaylıkla çürüyerek değersiz hale gelir. Üreticilerin endüstriyel yönetim sistemlerinde büyük ölçekte sorunlara neden olmasının yanında bu atıklar birer çevre kirliliği kaynağıdır ve doğada depolanarak bertaraf edilmesi oldukça maliyetlidir.

Anahtar Kelimeler: Biyoatık, Biyoteknoloji, Yüksek Katma Değerli Ürünler.

SUMMARY

The recent years have witnessed intensive studies aimed at finding out the potentials to derive high added value chemicals from biowastes by fermentation method all over the world. Within this framework, the agricultural wastes identified in Turkey and Greece have been subjected to the following studies, notably by use of the cultures that are currently possessed by Greece: determination of (aerobic, anaerobic) fermentation metabolites, detection of the prospective product range, selection of high value chemicals from among these products, and production optimization of the selected chemicals at fully-controlled fermenter. Production activities that are based on the processing of agricultural products and their derivatives in Turkey lead to a huge amount of biowastes (which are inclined to microbial activity) just like the case in Greece. The materials of this kind must be considered as production wastes rather than simply wastes, and be used as a source of carbon in biotechnological and chemical processes. These materials are very cheap, and as a matter of fact, they have negative commercial value in some cases as they are available abundantly. The common wastes include the following: crude glycerol (which results from the process of biodiesel production), olive by-products (OMW), whey, molasses, vinasse, citrus pulp, brewery-dried cereal granules, grape pulp, wheat bran, sunflower bean pulp, liquid or semi-solid by-products of the apple, industrial wastes of beetroot and tomato. In reality, most of these wastes may readily lose their usefulness while waiting for value-adding processes due to unavailability of any suitable method. In addition to posing large-scale problems to the manufacturers' industrial management systems, each of these wastes acts as a source of environmental pollution; what is worse, the cost of storing and disposing of these wastes in nature is considerably high.

Key Words: Biowaste, Biotechnology, High Added Value Products.

TEŞEKKÜR

Tez döneminde bana rehberlik eden, desteğini esirgemeyen çok değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. BÜLENT KESKİNLER, Sn. Prof. Dr. AZİZ TANRISEVER, Sn. Doç. Dr. AYHAN ÇELİK ve danışman hocam Sn. Doç. Dr. AHMET KARAGÜNDÜZ'e teşekkür ederim.

103Y379 no'lu proje ile tez çalışmalarımı maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında, manevi desteğini eksik etmeyen ve hayatım boyunca her koşulda yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	4
2. MİKROORGANİZMALAR VE ÖNEMİ	5
2.1. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri	6
2.1.1.Yarrowia Lipolytica Mayası ve Biyoteknolojik Uygulamaları	6
2.1.2.Mantarlar ve Biyoteknolojik Uygulamaları	8
3.MAYA VE MANTARLAR KULLANILARAK MELASLI BESİYERİNDE LİPİD VE SİTRİK ASİT ÜRETİMİ	14
4. MATERYAL VE METOTLAR	33
4.1. Materyal	33
4.2.Metod	33
4.2.1. Mikroorganizmaların Büyütülmesi ve Ürün Eldesi	33
4.2.2. Melasa Uygulanan Ön İşlemler	36
4.2.3. DNS Metodu İle İndirgen Şeker Ölçümü	37
4.2.4. Lipid Ekstraksiyonu (Folch Metodu)	37
4.2.5. Yağ Asitlerinin Metil Esterlerine Dönüştürülmesi Ve Gaz Kromatografi Analizi	38
4.2.6. Sitrik Asit Miktarının Belirlenmesi	38
4.2.7. Sitrik Asidin Anyon Değiştirici Rezin İle Saflaştırılması	39
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	40

5.1. Farklı Maya Ve Mantarlarla Lipid Üretimi	40
5.1.1. Elde Edilen Biyokütle Ve Lipid Miktarı	40
5.1.2. Lipid Fraksiyonlarının Yağ Asidi Kompozisyonu	46
5.2. <i>Yarrowia Lipolytica</i> Mayası İle Sitrik Asit Üretimi	50
5.2.1. Elde Edilen Sitrik Asit Miktarı	50
5.2.2. Elde Edilen Sitrik Asidin Saflaştırılması	50
 KAYNAKLAR	 54
ÖZGEÇMİŞ	66
EKLER	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
C. A 7 dk	: Sitrik asit numunesinin 7.dk eluatı
C. A Sv	: Sitrik asit sıvı standart
S ₀	: Başlangıç şeker miktarı
S _c	: Harcanmış olan şeker miktarı
S _T	: Toplam şeker miktarı
Y _{CA/Sc}	: Harcanan şeker miktarı başına oluşan toplam sitrik asit miktarı
Y _{L/Sc}	: Harcanan şeker miktarı başına oluşan toplam lipid miktarı.
Y _{X/Sc}	: Harcanan şeker miktarı başına oluşan biyokütle miktarı
w/w	: Kütlece
v/v	: Hacimce
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum Klorür Dihidrat
Ca(NO ₃) ₃ .H ₂ O	: Kalsiyum nitrat monohidrat
CH ₃ COSCoA	: Asetil koenzim A
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır sülfat pentahidrat
FeCl ₃ .6H ₂ O	: Demir (III) Klorür Hekzahidrat
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
HCl	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
MnSO ₄ .5H ₂ O	: Mangan sülfat pentahidrat
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat
Na_2SO_4	: Sodyum Sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Çinko sülfat heptahidrat
AMP	: Adenin mono fosfat
AP	: Elma posası
ARA	: Araşidonik asit
ATP	: Adenin tri fosfat
C/N	: Karbon/Azot oranı
DDT	: 1,1,1-trikloro-2,2-bis (4-klorofenil) etan
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
DNS	: Dinitro Salisilik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik asit
GC	: Gaz kromatografi
GLA	: Gama Linoleik Asit
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP^+	: Nikotinamid adenin dinükleotit mono fosfat
OMW	: Zeytin karasuyu
PDA	: Potato Dextrose Agar
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
SCO	: Tek hücre yağı
SMG	: Tüketilmiş malt tahılları
TLC	: Thin Layer Chromatography
TWH	: Domates atığı hidrolizatı
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Proses Akış Şeması	33
4.2 Glukoz ve dinitro salisilat arasındaki indirgeme/yükseltgeme reaksiyonu	37
5.1 T.elegance (a) ve A. niger (b) mikroorganizmalarının küçükölçekte büyütülmesi	42
5.2 Kullanılan maya ve mantarların büyütülmesinde kullanılan fermentör	42
5.3 Anyon değıştirici rezin kullanılarak sitrik asidin saflaştırılması	52
5.4 Sitrik asit sıvı standart (1 mg/ml) ve 7.dk'da toplanmış numuneye aitIR spektrumu	52
5.5 Sitrik asit saflaştırılması	53

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Aspergillus niger mantar suşları kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri	20
3.2 Cunninghamella echinulata ve Mortierella isabellina mantarı kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri	24
3.3 Yarrowia lipolytica mantar suşları kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri	25
3.4 Farklı fermentasyon şartlarında kültüre alınan çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen tek hücre lipid (SCO) ve gama linolenik asit (GLA) miktarları	27
3.5 Maksimum sitrik asit üretimi ile ilgili yakın zamana ait veriler	32
4.1 Maya ve mantarların büyütülmesi ve ürün eldesinde kullanılan besiyerlerinin içerikleri	36
5.1 Thamnidium elegans mantarı kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri	43
5.2 İçeriği farklı çeşitli besiyerlerinde büyütülen T.elegans, Aspergillus niger, Cunninghamella echinulata, Mortierella isabellina, Pleurotus ostreatus mantarları ve Yarrowia lipolytica mayasına ait lipid verileri	45
5.3 G ve H besiyerinde büyütülen M.isabellina mantarına ait veriler. M.isabellina kültürüne 3., 5. ve 7.günlerde melas ilavesi yapılmıştır. Bununla birlikte melas miktarı toplam melas olarak verilmiştir (T.melas miktarı)	45
5.4 G ve H besiyerinde büyütülen M.isabellina mantarına ait lipid verileri.	46
5.5 Farklı besiyerlerinde büyütülen maya ve mantarlara ait lipid fraksiyon verileri.	49

5.6 I ve D besiyerinde büyütülen *Y.lipolytica* mantarına ait sitrik 50
asitverileri

1. GİRİŞ

Son yıllarda özellikle zirai atıkların hammadde olarak kullanılarak değerli kimyasal maddelerin üretimiyle ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır. Bilindiği gibi yüksek katma değere sahip bazı kimyasalların kimyasal ve katalitik proseslerle üretilmesi ya çok zor olmakta ya da imkansız olmaktadır. Örneğin karbohidratlardan propiyonik asit üretimi anaerobik şartlarda bakteriler tarafından gerçekleştirilmesine rağmen kimyasal olarak gerçekleştirilememektedir. Bazı değerli kimyasalların ise kimyasal proseslerle üretilmesi mümkün olmasına rağmen içermiş olduğu reaksiyon basamakları ve üretim maliyetleri dikkate alındığında ekonomik olmamaktadır. Ancak bu kimyasalların fermantasyon teknolojisiyle üretilmesi, proses basamaklarını kısaltması yanında prosesi daha ekonomik hale getirmektedir. Çeşitli biyoatıkların biyolojik veya kimyasal yolla karbohidrata dönüştürüldükten sonra karbohidratı hammadde olarak kullanarak elde edilen şeker yüksek değerli yapısal kimyasallara dönüştürülebilir. Bu yapısal kimyasallar, üzerlerinde taşımış oldukları çok fonksiyonlu gruplar nedeniyle daha faydalı ve değerli kimyasallara kolayca dönüştürülebilirler.

Tarım sanayi atıklarından kaynaklanan biyolojik atıklar pektin, nişasta, ksilan ve çoğunlukla selüloz gibi çeşitli polisakkaritlerden meydana gelir [Bellou et al., 2012]. Meyve ve sebze işleme faaliyetleri sırasında inanılmaz miktarlarda üretilen bu maddeler ya çevreye deşarj edilir ya da düşük değerli hayvan yemi olarak kullanılır [Bellou et al., 2012].

Devasa boyuttaki düşük değerli yan ürünleri kazançlı bir şekilde yeniden kullanıma sokacak yeni yöntemlerin geliştirilmesi tarım sanayisinin gelecekteki karlılığı açısından kritik bir öneme sahiptir. Bu yan ürünlerin yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülmesi daha fazla çevresel ve ekonomik yararlar sağlayabilir [Bellou et al., 2012]. Biyoteknoloji, yan ürünlerin işlenmesi alanında çok sayıda avantajlar sağlar. Birçok biyoteknolojik proses yan ürünlerin değerlendirilmesi amacıyla geliştirilmiş olmakla birlikte mikrobik fermentasyon bunlar arasındaki en önemli teknolojidir. Mikrobiyal proseslerde ihtiyaç duyulan karbon kaynaklarının yerine yan ürünlerin kullanılması biyolojik proses maliyetlerinin azalmasını sağlayacaktır. Yan ürünleri oluşturan polisakkaritler, proteinler, lipidler gibi değerli maddelerin enzimlere, proteinlere, biyogaza, gübreye, organik asitlere, polimerlere

ve birçok diğ er  r nler  fermentasyon yoluyla biyolojik olarak d n    m   ld     basittir [Bellou et al., 2012]. Ayrıca yan ürünler, biyolojik prosesin maliyetini azaltacak inorganik maddeler, vitaminler ve b y  me faktörleri içerebilir.

Zeytinyağı  retimi sırasında yüksek miktarlarda (işlenen her ton zeytin başına 0,5 ile 0,8 m³) zeytinyağı üretim atıksuyu (OMW) oluşur. Akdeniz  lkelerinde her yıl 30 milyon m³'ten fazla bu tür atık oluşmaktadır [Bellou et al., 2012]. Yunanistan'da bu tür atık üretimi yıllık yaklaşık 1,5 milyon m³'tür[Bellou et al., 2012]. Zeytinyağı  retim atıksuyu (OMW) (karasu) günümüzde açık havuzlarda buharlaştırılarak konsantre edilmektedir. Ancak bu metot siyah, pis kokulu ve bertarafı zor bir atık çamur üretimi içerdiğinden dolayı memnun edici bir metot değildir. Türkiye'de söz konusu karasu atıkları sektörün içinde bulunduğ  ekonomik sıkıntı nedeniyle arıtılamamakta ve önemli  evre kirliliğ ne neden olmaktadır. Her ne kadar arıtma teknolojileri geliştirilmiş olsa da özellikle küçük ölçekli endüstrilerde finansman yetersizliğı nedeniyle bu tür arıtma teknolojilerinin uygulanması  ld     zordur. Kaldı ki  ld     zengin bile ime sahip karasuyun fermentasyon ortamı olarak kullanılarak daha değ erli bileşiklere d n    r lmesi daha uygun gözükmektedir.

Endüstriyel atıksular,  zelle tirilmi  mikroorganizmalar vasıtasıyla giderilebilecek yağlı maddelerde içerebilir. Çeşitli bakteri su ları kirl  sulardaki yağ ve gresi ayrı tırabilirken daha az işlenmiş su lar ve seçilmiş mutantlardan oluşan karışık kültürlerin kullanılması bazı metal bileşiklerinin giderim verimliliğ ni tek türlerin kullanıldığı durumlara göre arttırır ve en yüksek giderim verimliliğ ne ulaşma süresini iyileştirir [Bellou et al., 2012]. Kimyasal ve biyolojik arıtma metotları arasında endüstriyel ve evsel atıksu karışımlarından en etkili şekilde azot ve fosfor giderimi konusunda bir karşılaştırma yapılmış ve biyolojik arıtmanın, özellikle azot yönünden, daha yüksek verimliliğ e ulaştığı tespit edilmiştir [Bellou et al., 2012].

Sebze, patates ve meyve işleme faaliyetleri sırasında ortaya çıkan biyolojik atıkların yanısıra organik evsel atıklar da fermentasyon proseslerinde kullanılabilirler [Bellou et al., 2012].  z m atıkları mikrobiyal selüloz ve  arapla mayı başlatıcı kültür üretiminde substrat olarak kullanılabilirler [Bellou et al., 2012]. Armut posasında büyüyen *Mortierella isabellina* türü bakteri önemli miktarda gama-linolenik asitçe zengin lipitler üretmiştir [Bellou et al., 2012].

Domates posası başlıca pektin, selüloz ve protein içeren domates işleme endüstrisinin yarı katı bir yan ürünüdür. Akdeniz kıyı şeridinde büyük miktarlarda üretilmekte olan domates posası ciddi çevre sorunlarına yol açmaktadır. Şimdiye kadar bir çok domates posasını değerlendirme prosesi ortaya konmasına rağmen bunların hiçbiri şu anda uygulamada değildir. Biyogaz, proteince zengin mikrobiyal biyokütle, ksantan, vitamin B12 ve esteraz üretimi bildirilmiştir [Bellou et al., 2012]. Yakın geçmişte domates atıklarının hidrolizatı başarılı bir şekilde mikrobiyal yağa dönüştürülmüştür [Bellou et al., 2012].

Polisakkaritlerin (pektin, selüloz vb.) değerlendirmesi işlemi mikrobiyal biyoteknolojistler için zorlu bir işlemdir. Bu karbon substratları gezegenimizin organik karbon kaynaklarının büyük bir yüzdesine karşılık gelirken aynı zamanda en az yararlanılan kısmıdır [Bellou et al., 2012]. Birçok çeşit biyolojik atık enzimler, antibiyotikler, amino asitler, vitaminler gibi saf kimyasalların ve ilaçların üretiminde substrat olarak kullanılabilir. Farklı biyolojik atıklardan yalıtılan çok sayıda bakteri, maya ve mantar, biyokütle içindeki polisakkaritleri ayrıştırma ve protein veya yüksek değerli ürünler üretme kabiliyetlerine göre ayrılmıştır [Bellou et al., 2012].

Biyodizel üretim sürecinin bir yan ürünü olan ham gliserol çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda karbon substratı olarak kullanılır. *Clostridium butyricum* türü bakteri kullanılarak anaerobik kesintili kültürlerde 1,3-propandiol üretilmiş ve bu işlem sırasında substrat kullanım oranı ortamdaki gliserol konsantrasyonuyla birlikte artmıştır [Bellou et al., 2012]. Kesintisiz kültürlerde ise, mikrobiyal davranış kemostat kabına 1,3-propandiol eklendikten sonra geçici safhalar halinde çalışılmıştır. Butirik asit ve asetik asit konsantrasyonları artarken, mikrobiyal gelişim 1,3-propandiol (kemostat kabına eklenmiştir) konsantrasyonundan etkilenmemiştir. İki aşamalı kesintisiz kültürlerde, toplam hacimsel verimliliği 1.33 g/L.h olan 43.5 g/L'lik 1,3-propandiol üretilmiştir. Alışılmadık bir maya türü olan *Yarrowia lipolytica* başarılı bir şekilde ham gliserolu tek hücreli yağlara (SCO'lara) veya sitrik aside dönüştürmüştür [Bellou et al., 2012]. Daha detaylı açıklamak gerekirse, ham gliserollü ortamdaki azot kısıtlı aerobik kültürlerde bulunan *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 yüksek gliserol konsantrasyonlarında bile gözle görülür biyokütle üretimi sergilerken yüksek gliserol konsantrasyonlarında tüketim hızında bir azalma yaşanmıştır [Bellou et al., 2012].

Reaksiyon ortamındaki azot azalması sonrasında sitrik asit üretimi litrede 62,8 gram ve gliserol tüketimine bağlı verim 0.56 g g^{-1} olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Toplam hücresel lipidin içerisindeki yağ asitlerinin analizi, gliserol miktarındaki artışın lipidlerdeki doymamış yağ asitlerinin miktarını bir şekilde arttırmıştır [Bellou et al., 2012]. Sınırlayıcı miktarda azot ve karbon kaynağı olarak gliserin içeren aerobik kültürde, *Mortierella isabellina* ATHUM 2935'nin büyümesi tatmin edici şekilde gerçekleştirilmiştir. Başlangıç kültüründe yüksek miktarda (örneğin 100 g L^{-1}) gliserin kullanıldığında, 4.4 g L^{-1} lipid oluşumu gerçekleştirilmiştir. Bu değer yaklaşık olarak toplam kuru kütlenin %51'lik kısmına tekabül etmektedir. [Bellou et al., 2012].

İlaveten, ham gliserol Zygomycete *Thamnidium elegans* için etkili substrat özelliğine sahiptir. Yağ veren bu mikroorganizma yüksek miktardavegamma-linolenik asit (7.3 % w/w) yönünden zengin olan SCO üretiminde kullanılmaktadır. [Bellou et al., 2012].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu çalışmanın amacı, biyoteknolojik proseslerde substrat olarak kullanılan ve her iki ülkenin de tarımsal faaliyetlerinin tipik bir özelliği olan tarım endüstrisi atıklarının değerlendirilmesi alanındaki olanakları açığa çıkarmak ve bu atıklardan elde edilebilecek ürünleri belirlemektir. Her iki laboratuarda yetiştirilen mikroorganizmaların (Zygomycete'ler, mayalar, bakteriler v.b.) tümü Mikrobik lipidlerin, organik asitlerin (sitrat v.b.) ve diğer değerli metabolitlerin üretiminde kullanılmıştır. Buna ek olarak uygun mikroorganizmalarla yan ürünlerden belirlenecek değerli ürünleri üretebilme kabiliyetleri ölçülmüştür. Kültür deneyleri ilk olarak erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Üretilen metabolitler GC, TLC ve UV cihazlarında analiz edilmiştir. En güçlü üreticiler belirlendikten sonra, belirli metabolik ürünlerin üretimi biyoreaktörlerde gerçekleştirilmiştir.

2. MİKROORGANİZMALAR VE ÖNEMİ

Mikroorganizma mikroskobik organizmaların genel adıdır. Mikroorganizmalar ilk kez Anton van Leewenhoek tarafından keşfedilmiştir. Anton van Leewenhoek kendi tasarımı olan mikroskobu kullanarak mikroorganizmaları gözlemlemiştir. Mikroorganizmalar insan aktivitelerinde ve dünyadaki yaşam ağında önemli bir rol oynamaktadırlar. Mikroorganizmalar var olmasaydı daha yüksek yaşam formları ortaya çıkamayacaktı. İnsan, bitki ve hayvanlara ait organik maddelerin yıkımı ve anahtar besinlerin dönüşümü ve soluduğumuz hava mikrobiyal aktiviteler neticesinde meydana gelmektedir.

Mikroorganizmalar çok çeşitlidir. Sınıflandırma yapıldığında bakteriler, planktonlar, mantarlar, protistalar, mikroskopik bitkiler (yeşil algler), mayalar mikroorganizma alemi içerisinde yer alan canlılardır. Aynı zamanda plankton, planarya ve amoeba gibi mikro hayvanlarda mikroorganizma içerisinde kabul edilmektedir. Bazıları virusleri mikroorganizma içine dahil etse de, bunlar canlı olarak da kabul edilmemektedir [Rybicki, 1990].

Mikroorganizmalardan aynı zamanda biyoteknoloji sayesinde hem geleneksel besin ve yiyecek hazırlama yöntemlerinde hem de genetik mühendisliğini kullanarak modern teknolojilerde de kullanılabilir. 21. yüzyıl içerisindeki teknolojik gelişmeler ve bilgi birikimi endüstriyel üretim ve hizmete yeni potansiyel alanlar oluşturmaktadır. Bu alanlardan biri de biyoteknolojidir. Biyoteknolojiyi basitçe tarif edecek olursak;“tek veya çok hücreli canlıların, organ doku veya hücrelerin ekonomik değeri olan ürünlerin elde edilmesinde kullanılmasıdır” [Yakıcıer, 2009]. Biyoteknoloji yeni bir bilim dalı değildir. Ekmek, peynir, sirke ve şarap gibi ürünlerin üretilmesi için yüzyıllardır kullanılan bir tekniktir. Bu teknik insan sağlığı tarım, kimya mühendisliği, çevre koruma, gıda üretimi ve enerji üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Biyoteknolojide mikroorganizmaların sahip olduğu yeteneklerle sınırlı kalınmayıp genetik müdahalelerle yeni mikroorganizma üretimi de sağlanmaktadır. Bu sayede yeni aşı maddelerinin üretilmesi, ucuz kimyasal maddelerin üretilmesi, Çevre dostu, sağlık dostu yiyecek katkımaddelerinin üretilmesi ve katı ve sıvı atıkların zararsızlaştırılması, arıtılması sağlanabilmektedir.

Bu çalışmanın özgün değeri, son yıllarda biyoatıklardan çeşitli organizmalar kullanılarak fermantasyon teknolojisiyle değerli kimyasalların biyoteknolojik

yöntemle üretilmesidir. Halen dünyada belirli bir biyoatıktan üretilebilecek değerli kimyasalların ne olacağı tam olarak bilinmemektedir. Üretilecek değerli kimyasalın tipi kullanılan substrat (biyoatık) ve seçilen mikroorganizma türüne göre değiştiği gibi prosesin aerobik veya anaerobik olması da önemli bir faktördür.

2.1. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Bu çalışmada Yunan tarafında mevcut koleksiyonda yer alan mikroorganizmalar kullanılacaktır. Çalışma esnasında kullanılacak mikroorganizmalar şunlardır: Maya türünde *Yarrowia lipolytica*, *Zygomycetes* ailesine ait olan mantarlardan *Thamnidium elegans*, *Cunninghamella echinulata*. Bu mantarların yanı sıra, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* türleri de kullanılacak mikroorganizma türleri arasındadır.

2.1.1. *Yarrowia lipolytica* Mayası ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Yarrowia lipolytica, önemli metabolitler üreten ve güçlü salgı mekanizmasına sahip olan aerobik bir organizmadır. Bu maya endüstriyel alanda (biyokataliz), moleküler biyoloji ve genetik alanlarda oldukça fazla kullanılan bir canlıdır. Patojenik olmayan bir mayadır ve bu organizmaya dayanan pek çok proses İlaç ve Gıda Kurumu (FDA, USA) tarafından güvenli olarak onaylanmıştır.

Yarrowia lipolytica, akademik amaçlar için protein üretiminde güvenli, çok yönlü ve popüler bir ve mevcut diğer ticari uygulamalar kadar etkin bir sistemdir. Düşük overglycosylation, yüksek salgılama verimi, iyi ürün verimi, üreme verimi *Y.lipolytica*'nın diğer özellikleridir.

Bu mikroorganizma tarafından salgılanan çok önemli ürünlerden biri lipazdır. Bu enzim hidrolizin yanı sıra esterifikasyon, interesterifikasyon ve transesterifikasyon gibi endüstriyel açıdan önemli pek çok reaksiyonu katalizlemektedir.

Bu enzimin yanı sıra gıda sanayisinde kullanılan bir aroma olan γ -Dekalakton üretimi de bu maya sayesinde gerçekleştirilmektedir. Risinoleik asit hidroksillenmiş 18 karbonlu bir yağ asididir. Bu yağ asidi γ -Dekalaktonun üretilmesinde kullanılan

bir öncüdür. γ -Dekalakton besi yeri içerisindeki birikimi hücre tarafından üretilme ve parçalanma hızına bağlıdır.

Yarrowia lipolytica aynı zamanda TCA çevriminin ara ürünleri olan sitrik asit, izositrik asit, α -ketoglutarik asit ve pürivik asit gibi organik asitleri de üretmektedir [Kamzolova, 2003; Rymowicz, 2008a]. Bu proseslerde kullanılan karbon kaynakları n-alkanlar, bitkisel yağlar, etanol, melas ve hidrolizlenmiş nişasta (mineral bileşikler veya fosfat, tiamin, azot kaynağı gibi farklı besin faktörlerinden kaynaklanan büyümenin sınırlandırıldığı şartlarda hidrolizlenmiş nişasta).

Gliserol önemli yenilenebilir bir hammaddedir. Bu madde özellikle biyodizel üretim prosesinin ham maddesidir. Makri ve arkadaşları *Y.lipolytica* mayasını kullanarak gliserol başarılı bir şekilde tek hücre yağı ve sitrik asit gibi çeşitli biyoteknolojik ürünlere fosforilasyon metabolik yolu ile çevirmişlerdir [Makri, 2010]. Yine gliserol karbon kaynağını kullanarak, Levinson ve arkadaşları *Y.lipolytica* NRRL YB-423 türünü kullanarak yüksek verimde sitrik asit elde etmişlerdir [Levinson, 2008].

Papanikolaou ve arkadaşları Zeytinyağı üretim atıkları (OMW) gibi farklı endüstriyel atıkları sitrik asit üretimi için alternatif substrat olarak kullanmışlardır [Papanikolaou, 2008].

Aynı yöntemle, karbon kaynağı olarak ananas atığı Imandi ve arkadaşları tarafından sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu üretim için *Y.lipolytica* NCIM3589 türü kullanılmıştır [Imandi, 2008].

Çevresel şartlara bağlı olarak maya hücreleri serbest yağ asitlerini mobilize etme yeteneğine veya trigliseroller ve steril esterler olarak (lipid bodies: LB) depolayabilmektedirler. yağ asidi veya trigliserid besiyerindeki kültürleme boyunca LB birikimi gözlemlendiğinden, *Y.lipolytica* glukoz içeren besiyerinde büyütüldüğü zaman few lipid bodies *Y.lipolytica*' da gözlenebilmektedir. Aggelis ve arkadaşları *Y.lipolytica* ve endüstriyel gliserol kullanarak kuru hücrede % 43 lipid içeren maya hücreleri elde etmişlerdir [Aggelis, 1999].

Bu mikroorganizma çevresel sistemlerde de biyoremediasyon olarak ta kullanılabilir. *Y.lipolytica* IMUFRJ 50682 mayası, n-alkanları, fenantren grubu ve naftalin grubu gibi aromatik hidrokarbonları ve izoprenoidleri tüketebilme yeteneğine sahip olduğundan biyoremediasyon proseslerinde geniş bir uygulamaya sahiptir[Ferreira, 2009].

2.1.2 Mantarlar ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Mantarlar da mayalar gibi ökaryotik mikroorganizmalardır. Mantarlar bakterilerden daha karmaşık bir yapıya sahiptir. Mikroskobik boyutta olan mantarlar olduğu gibi makroskobik boyutta olan mantarlar da bulunmaktadır [Maier, 2002].

Bu canlılar heterotrofturlar ve basit şeker, kompleks yapıdaki hidrokarbonları, selüloz ve lignin gibi bitkisel polimerleri karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler [Maier, 2002]. Yapısal olarak bakıldığında bu canlılar rijid, polisakkarit bakımından zengin hücre duvarına sahiptirler. Flimantoz mantarlar, hiflerin büyümesi veya dallanması yolu ile veya eşeysiz sporlarla eşeysiz olarak çoğalırlar. Eşeyli üreme eşeyli sporlarla oluşur [Kayser, 1998]. Eşeyli üremenin hiç bulunmadığı mantarlar Fungi imperfecti veya Deuteromycetes'ler olarak adlandırılır [Kayser, 1998]. Deuteromycetes'lerin vejetatif yapısı ya tek hücreli veya Ascomycota ya da basidiomycota' a benser olan septalı miselyum halindedir. *Aspergillus* ve *penicillium* gibi bu gruba ait türler ekonomik olarak büyük bir öneme sahiptirler.

Aspergillus familyasında isimlendirilmiş endüstriyel olarak ta kullanılan türleri (*A.niger*, *A.oryzae*, *A.awamori*, *A.sojae*, *A.terreus*) içeren 250 civarında tür mevcuttur

. Olağanüstü metabolik çok yönlülükleri nedeni ile, *Aspergilli* organik asitler, tıbbi ürünler, proteinler ve enzimler gibi çeşitli ürünlerin üretilmesi için biyoteknolojide kullanılır [Meyer, 2008].

Aspergillus niger, sitrik ve glukonik asitlerin üretiminde kullanılır. *Aspergillus oryzae*, proteolitik ve amilolitik enzimlerin endüstriyel üretiminde ve soya, pirinç ürünlerinin fermentasyonlarında yemek endüstrisinde kullanılmaktadır [Glazer, 2007].

Koritala ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yağların mikroorganizmalar kullanılarak modifikasyonu gerçekleştirilmiştir [Koritala, 1987]. Bu mikroorganizmalardan bir olan *Aspergillus oryzae* yağları %95 oranında hidroliz ettiği belirtilmiştir. *Aspergillus flavus* fermentasyonundan elde edilen yağ asitlerinin orjinal soya yağından daha az linolenik asit içerdiği de çalışmanın gözlemlenen sonuçlarından biridir. Bu mikroorganizmalar soya yağında büyütüldüğü zaman intra ve ekstraselüler olarak lipaz enzimini bulundurlar [Koritala, 1987].

Papanikolaou ve arkadaşları [Papanikolaou 2011] tarafından yapılan başka bir çalışma da *Aspergillus sp.* ve *Penicillium expansum* türleri atık yemeklik zeytinyağında büyütülmüştür. Papanikolaou bu çalışmada lipid bakımından zengin hücreler elde etmeyi amaçlamıştır. Bunun paralelinde, diğer ekstraselüler ürünler (organik asitler), enzim (lipaz) ve bu türlerin özgül yağ asidi substratları üretilmeye çalışılmıştır [Papanikolaou 2011].

Çalışma neticesinde *Aspergillus sp.* ATHUM 3482 kuru mantar hücresinde %64 (w/w) olacak şekilde lipid biriktirdiği ifade edilmiştir [Papanikolaou 2011].

Aynı zamanda çalışmada ekstraselüler lipaz aktivitesi de ölçüldü. *Aspergillus niger* NRRL 363 türünün kullanıldığı çalışmada lipaz aktivitesi maksimum 645 U ml⁻¹ olarak ölçülmüştür. Başlangıç materyali olarak yağ kullanıldığında, selüler ve rezidüel lipidlerin her ikisinde oluşan farklı yağ asidi kompozisyonlarının gözlemlendiği belirtilmiştir [Papanikolaou 2011].

Çalışmanın sonuçlarından birisi de çeşitli koşullarda, araşit asid ile zenginleştirilen ve doyurulan pek çok selüler lipidlerin üretildiğidir. *Aspergillus* türlerinin 5.0 gL⁻¹ düzeyinde okzalik asit ürettiği de belirtilmiştir [Papanikolaou, 2011].

Ayrıca *Aspergillus* ve *penicillium* türleri tarafından ikinci metabolit olarak antibiyotik gibi önemli kimyasallarda üretilmektedir. Penicillin Alexander Fleming tarafından keşfedilen ve *penicillium* türü tarafından üretilen bir antibiyotiktir. Bunun gibi bir çok antibiyotik bu mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Lovastatin insan ve hayvan serumundaki kolesterol düzeyini düşürücü bir maddedir. Bu madde 1980 yılında, *Aspergillus terreus* 'tan izole edilmiştir ve bugün marketlerde lovastatin ticari ismi ile satılmaktadır [Glazer, 2007]

Mikroorganizmalardan elde edilen pektinaz enzimlerinin biyoteknoloji alanında önemli bir yeri vardır. Kağıt, tekstil ve meyve işletme endüstrileri gibi pek çok alandaki uygulamaları nedeni ile biyoteknoloji alanında dünya çapında önemli bir paya sahiptir [Pandit, 2011]. Bu enzimlerden biri olan poligalakturanoz galakturonik asit rezidülerindeki glikozidik bağları hidroliz etmektedir. Rashad ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Pleurotus ostreatus* NRRL-0366 mikroorganizmasından ekstraselüler poligalakturanoz başarılı bir şekilde saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Mikroorganizmanın büyütüldüğü besi yerinde substrat olarak limon kabuğu kullanılmıştır.

Pleurotus spp. Medikal alanda umut verici bir mikroorganizmadır. Çünkü hematolojik, antiviral, antitümör, antibakteriyel, hipokolesterolik, antibiyotik aktiviteleri göstermektedir [Miller, 1959]. Medikal alandak iüretimlere örnek verecek olursak; Mycelia antibiyotiğı [Madigan and Martinko, 2010] *Pleurotus spp.* Mikroorganizması kullanılarak, antibakteriyel özelliğı sahip olan β -D-Glucan (pleuran)[Rybicki, 1990]*P. ostreatus* sayesinde üretilmektedir.

Pleurotus ostreatus organziması kullanılarak buğıday çöpü ve pamuk sapından hayvan yemi üretimine dair çalışmalar mevcuttur [Rybicki, 1990], [Rymowicz et al, 2008].

Kocaoba ve Arısoy tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışma ile *Pleurotus ostreatus*Amberlite XAD-4 adlı resine immobilize edilerek eser elementlerin belirlenmesinde biyosorbent olarak işlev görmesi sağlanmıştır [Levinson et al, 2008].

DDT (1,1,1-trikloro-2,2-bis (4-klorofenil) ethan) ile kontamine olmuş toprağıın kazanılması amacıyla biyoremediasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve bu çalışmada *Pleurotus ostreatus*mikroorganizması kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edildiğı ifade edilmiştir [Papanikolaou et al, 2008].

Aggelis ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile *Pleurotus* türlerinin yağ asidi profilleri belirlenmiştir [Imandi et al, 2008]. Bu çalışmada *P.ostreatus*'un da içinde olduğı 10 farklı *pleurotus* türü kullanılmıştır. Çalışma neticesinde *P. eryngii* türü için en fazla üretilen yağ oleik asit olurken, *Pleurotus abalonus*, *P. calyptratus*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*,*P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* and *P. sapidus* türleri için linoleik asit baskın olan yağ asidi olmuştur [Imandi et al, 2008].

Çeşitli *Pleurotus spp.* türlerinin zeytinyağı üretim atıklarından fenolik bileşiklerinin fenolik oksidaz enzimi sayesinde uzaklaştırıldığı belirtilmiştir [Fickers et al, 2005], [Aggelis and Komaitis, 1999].

Yağ içeren mantarlar lipid üretimi için alternatif kaynaklardır, üretim için atık içeren besi yeri kullanılması ekonomik yönden bir avantajdır [Ferreira, 2009]. Fungal lipidler 3 önemli fraksiyon içerirler: Nötral lipidler, sfingolipidlerinde yer aldığı glikolipidler ve fosfolipidlerdir [Maier et al, 2002]. Yağ içeren Zygomycetes'lerde bu lipid fraksiyonları genellikle peroksidasyona duyarlı çoklu doymamış yağ asitleri içerir [Maier et al, 2002], [Meyer, 2008]. Ancak şu ana kadar fungal lipid peroksitlerin bölünmesine dair bir bilgi rapor edilmemiştir. Aggelis ve arkadaşları

tarafından yapılan çalışmada yağ içeren bir mantar olan *Cunninghamella echinulata*'ın lipid fraksiyonları içerisinde yer alan hidroperoksitlerin mantarın büyümesi boyunca bölünmesi incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre toplam lipidlerin hidroperoksit içeriği büyüme boyunca artmıştır. Fosfolipidlerin hidroperoksit içeriğinin büyüme boyunca mükemmel bir şekilde arttığı belirtilirken, Nötral lipidlerde az miktarda hidroperoksit içerdiği ifade edilmiştir. Sfingolipidleri de içerisinde bulunduran glikolipidlerin ise büyük oranda hidroperoksit içerdiği belirtilmiştir [Lubertozzi and Keasling, 2011].

Aggelis ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Cunninghamella echinulata* ve *Mortierella isabellina* mikroorganizmaların tüm büyüme adımlarındaki rezerv lipidin yağ asidi kompozisyonu belirlenmiştir [Glazer and Nikaido, 2007]. Çeşitli besiyeri şartları denenerek *Cunninghamella echinulata* ve *Mortierella isabellina* hücrelerindeki rezerv lipid biyosentezi ve bunların bozunması ile ilgili başka bir çalışma Aggelis ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [Glazer and Nikaido, 2007]. Zygomycetes türü bu canlılarda lipid birikiminin NAD⁺-bağımlı izositrat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin azalması ile başladığı belirlenmiştir. Sadece azot sınırlandırılmasının lipid birikimini başlatmak için yeterli olduğu ifade edilirken, çoklu sınırlandırmaların bu canlılardaki lipid döngüsünü baskılamak için gerekli olduğu da belirtilmektedir [Glazer and Nikaido, 2007].

Cunninghamella echinulata mikroorganizmasının büyütülmesi boyunca lipogenez üzerindeki organik azot etkisini belirlemek amacı ile bu organizma domates atık hidrolizatında (TWH) büyütülmüştür. Bu çalışma sonucunda, domates atık hidrolizatında yer alan azotun glikoz alımını ve lipid depolanmasını arttırdığı gözlemlenmiştir [Koritala et al, 1987], [Papanikolaou et al, 2011].

Lipid depolanmasında kullanılan substratın etkisini ölçmek amacı ile *Mortierella isabellina* ATHUM 2935 ve *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 ksiloz, ham gliserol ve glukoz gibi substratların yer aldığı besiyerlerinde azot miktarı sınırlandırılmış şartlar altında büyütülmüştür. Her iki hücrenin biyokütle veriminin ve lipid üretiminin gliserollü besiyerinde ksilozdan daha az olduğu gözlemlenmiştir [Moreira et al, 2001].

Cunninghamella echinulata mikroorganizmasının iki türü azot bulunduran çeşitli substratları içeren (mısır gluteni, mısır maserasyon sıvısı, konsantre peynir altı suyu, yeast extract ve domates atık hidrolizatı (TWH) besiyerlerinde büyütüldüğünde

çeşitli miktarlarda linolenik asit bakımından zengin hücrel lipidleri içeren biyokütle miktarının önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir [Simao et al, 1997]. Mikroorganizmanın özellikle domates atık hidrolizatında büyütülmesi verimi büyük ölçüde arttırmıştır [Simao et al, 1997].

Cunninghamella echinulata mikroorganizmasının glukozda büyütülmesinin besiyerindeki biyokütle verimini ve hücrel lipidleri yüksek C/N oranı ile arttırdığı belirtilmiştir [Kadowaki et al, 1997]. Büyüme besiyerindeki azot tükendikten sonra glukozun harcanması ile lipid veriminin arttığı, fakat hücrel yağdaki γ -linolenik asit (GLA) sistematik olarak lipid depolama prosesi boyunca azaldığı ifade edilmiştir. Lipid depolanması tamamlandıktan sonra, hücrel lipidlerdeki γ -linolenik asit (GLA) konsantrasyonunun devamlı olarak arttığı gösterilmiştir. En yüksek linolenik asit üretiminin portakal kabuğu içeren besiyerinde elde edildiği belirtilmiştir [Kadowaki et al, 1997].

Toprakta, soğukta, ılıman bölgelerde büyüeyebilen tek tür mantar *T.elegans*'tır. Bu mikroorganizma psikrofilidir yani soğuk seven bir mikroorganizmadır. 1-2 $^{\circ}\text{C}$ 'de bile büyümeyi sürdürebilmektedir. Optimum büyüme sıcaklığı 18 $^{\circ}\text{C}$ ve büyüeyebildiği maksimum sıcaklık ise 27-31 $^{\circ}\text{C}$ arasındadır [Moubasher and Mostafa, 1994].

Papanikolaou ve arkadaşları [Panda, 1989] 15 farklı mikroorganizmayı biyodizel türevi atık olan gliserolü sindirme yeteneklerini ölçmek amacı ile test etmişlerdir. Bu mikroorganizmaların içerisinde *Thamnidium elegans*'ta yer almaktadır [Panda, 1989]. Çalışmada denenen mantarların misellerinde yüksek oranda lipid biriktirdikleri belirtilmiştir. Bu lipidler değişik oranlarda γ -linolenik asit içermektedirler. Araştırmacılar, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia membranifaciens* ve *Thamnidium elegans* mikroorganizmaları ile çalışırken besiyerinde yer alan gliserol miktarını giderek arttırmışlardır [Panda, 1989]. Bu koşullar altında *T.elegans*'ın yüksek oranda biyokütle meydana getirdiği ve biyokütlenin %71' i oranında yağ depoladığı belirtilmiştir. Aynı zamanda maksimum oranda linolenik asit üretiminin sağlandığı da ifade edilmiştir [Panda, 1989].

γ -Linolenik asit üretimi için yapılan bir başka çalışmada elma posası kullanılıp katı substrat fermentasyonu kullanılmıştır [Panda et al, 1987]. Elma posası (AP) ve tüketilmiş malt tahılları (SMG), biyolojik olarak aktif olan γ -linolenik asidi yüksek oranda içeren yüksek değerlikli fungal yağ üretimi için bu çalışmada kullanılmış olan

önemli substratlardır [Panda et al, 1987]. Katı substrat fermentasyon prosesinin substrat kompozisyonundan, nemden, havalandırma ve çalkalamadan etkilenen γ -linolenik asit üretimi için geliştirildiği belirtilmiştir. Bu proses ve substratlar sayesinde verimin arttığı ifade edilmiştir [Panda et al, 1987].

3.MAYA VE MANTARLAR KULLANILARAK MELASLI BESİYERİNDE LİPİD VE SİTRİK ASİT ÜRETİMİ

Lipidler yapısal bileşenler veya karbon ve enerji deposu olarak çok önemli hücre bileşenleridir [Dekker, 2004]. Bu temel moleküller prostoglandin ve tromboksanlar gibi hayvansal hücrelerin fizyolojisinde önemli yeri olan bileşiklerin öncül bileşenleri olarak bilinir [Dekker, 2004]. Hayvansal hücreler yağları enerji kaynağı olarak kullanırlar, fakat çoklu doymamış yağ asidi gibi ihtiyaç duydukları çok spesifik molekülleri sentezleyemezler [Dekker, 2004]. Linoleik ($18:2 \Delta^{9,12}$), γ -linolenik asit ($18:3 \Delta^{6,9,12}$), α -linolenik asit ($18:3 \Delta^{9,12,15}$) gibi doymamış yağ asitlerini dışarıdan almak zorundadırlar [Dekker, 2004].

Mikroorganizmalar hayvansal ve bitkisel kaynaklara alternatif olarak lipidlerin üretiminde göz ardı edilmeyecek canlılardır [Certik and Shimizu, 1999]. Mikrobiyal lipidlerin hayvansal ve bitkisel yağlara benzerliği nedeniyle diğer lipid üreticileri ile kaçınılmaz bir yarış halindedir [Certik and Shimizu, 1999]. Bu nedenle tek hücre lipid sentezinde kaynak olarak düşünülen canlılardır [Certik and Shimizu, 1999]. Mikroorganizmalardan elde edilen lipidler yüksek spesifikliğe sahiptir. Bu tür lipidlerin hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilmesi mevcut durumda pahalıya mal olmakta ya da genellikle bu kaynaklar tarafından üretilmemektedir [Certik and Shimizu, 1999].

Çoklu doymamış yağ asitleri tek hücre lipidleri (SCO) olarak adlandırılmaktadır ve bu lipidler mikrobiyal lipidler arasında önemli bir yere sahiptir. Yapı olarak iki veya daha çok çift bağ içermektedirler [Gunstone et al, 1994], [Horrobin, 1995]. Çoklu doymamış yağ asitleri ökaryotik canlıların ana bileşenleridir. Sahip oldukları esneklik, akışkanlık ve seçici geçirgenlik hücre membran yapısının ana özellikleridir [Urquiza et al, 2000]. En önemli çoklu doymamış yağ asitleri gama linolenik asit (GLA), araşidonik asit (ARA), dokosaheksaenoik asit (DHA) ve eikosapentaenoik asittir (EPA) [Ward and Singh, 2005]. Beyin araşidonik asit (ARA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) bakımından zengindir [Urquiza et al, 2000]. Eikosapentaenoik asit (EPA) ise kardiyovasküler sistem üzerinde faydalı etkileri mevcuttur [Ward and Singh, 2005].

Mantarların ürettikleri toplam lipid miktarı kuru hücre ağırlıklarının %1'i ile %87'si arasında değişir [Weete, 1980]. Oleaginous zygomycetes türü

mikroorganizmalar farmakolojik ve besinsel değeri yüksek olan çoklu doymamış yağ asitlerini içeren lipidlerini (tek hücre yağı, SCO) çok miktarda biriktirebilme yeteneğine sahiptir [Dekker, 2004]. Bu canlılar peyniraltı suyu [HNAA, 1994], atık yağ [Funtikova et al, 1999a], kloroanilinler [Funtikova et al, 1999b.] ve elma posasını [Stredansky et al, 2000] içeren atık substratları kullanarak kuru hücre ağırlıklarının %48'i ile % 66'si arasında lipid üretimini gerçekleştirirler.

Çoklu doymamış yağ asitlerinden olan gama linolenik asit linoleik asitten prostaglandin sentezinde önemli bir ara bileşiktir. Bu bileşiğin normal hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerini öldürdüğü yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [Fan and Chapkin, 1998], [Kenny et al, 2000], [Reddy et al, 1998]. Antikanser özelliğinin yanı sıra eklem iltihabına karşı da etkilidir [Belch and Muir, 1998]. Aynı zamanda kardiovasküler [Horrobin and Huang, 1987] ve hiper kolesterolemi [Horrobin and Manku, 1983] hastalıklarının tedavisinde, ciltle alakalı kesin tedavi uygulamaları ve bunun gibi çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi ve engellenmesinde etkili bir bileşen olduğu raporlanmıştır. Günümüzde, gama linolenic acid (GLA) ticari olarak akşam çuha çiçeği ve hodan bitkisinden üretilmektedir [Carvalho et al, 1999]. Ancak gama linoleik asidin çekirdek ya da tohum yağından elde edilmesi düşük miktarlarda gerçekleşmektedir. Bu şekilde yüksek miktarda ürün etmek için hem geniş zaman periyodu hem de geniş arazi gerekmektedir [Gunstone, 1992]. Bu problemlerin üstesinden gelmek için alternatif GLA kaynakları araştırılmıştır ve mikroorganizmalardan bazı elverişli türler önerilmiştir. *Mortierella isabellina*[Hansson and Dostálek, 1988], *Mucor sp.*[Shin, 1988], *Cunninghamella japonica* [Galanina et al, 1988] ve *Entomophthora exitalis* [Kendrick and Ratledge, 1992] gama linolenik asit (GLA) üretimi için öngörülen mikroorganizmalardır. Araştırmacılar özellikle *Mortierella*, *Mucor* ve *Cunninghamella* türlerinin depoladıkları toplam lipidin %15-25'i arasında gama linolenik asit (GLA) ürettiklerini ispat etmişlerdir [Ward and Singh, 2005]. Bu mikroorganizmalar katı kültürde büyütüldüğü zaman gama linolenik asit miktarının yaklaşık olarak 1,3 g GLA/kg substrat gün olduğunu rapor etmişlerdir [Ward and Singh, 2005]. Son zamanlarda yalnızca Japonya *Mortierella* türü mantarı kullanarak ticari gama linolenik asit (GLA) üretimini gerçekleştirmektedir [Ratledge, 1993].

Aggelis ve çalışma grubunun yaptığı farklı bir çalışmada karbon kaynağı olarak gliserol kullanılmıştır [Bellou et al, 2012]. Kullanılan gliserolün başlangıç

miktarı 25 g/L olarak belirtilmiştir [Bellou et al, 2012]. *T.elegans* CCF-1465 suşunun büyütülme şartları bizim şartlarımız ile aynıdır [Bellou et al, 2012]. Buna göre elde ettikleri en yüksek verim kuru hücre başına %37,2 olarak rapor edilmiştir [Bellou et al, 2012].

Papanikolaou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yüksek C/N oranında maksimum verimde lipid elde edildiği, bu oranın azaldıkça lipid veriminin azaldığı ifade edilmiştir [Papanikolaou et al, 2010]. Ancak genel durumun aksine *Rhodospiridium toruloides* mayasında olduğu gibi bazı hallerde başlangıç C/N oranının yüksek olmasının (örneğin, >70) lipid birikimini azalttığı belirtilmiştir [Moreton, 1988]. Aksi durumlarda çok yüksek başlangıç C/N oranları bile tercih edilmektedir [Papanikolaou et al, 2007], [Angerbauer et al, 2008].

Papanikolaou yaptığı çalışma esnasında mikroorganizma olarak *Thamnidium elegans* CCF-1465 suşu kullanılmıştır [Papanikolaou et al, 2010]. Ticari şeker olarak glukoz, fruktoz ve sukroz kullanmıştır. Şekerlerin kullanılan başlangıç miktarları 80 g/l olarak belirtilmiştir. Bu şekerlerden elde edilen maksimum verim sırası ile glukozdan % 69,5; fruktozdan % 70,4 ve sukrozdan %70,0 olarak rapor edilmiştir [Papanikolaou et al, 2010]. Yapılan kinetik ölçümlere göre şeker harcama hızı ve lipid birikim hızının amonyum tuzu tükendikten sonra arttığı belirtilmiştir [Papanikolaou et al, 2010]. Çalışma neticesinde harcanan şeker başına elde edilen lipid miktarının yüksek olduğunu (%20, wt/wt) belirtmişlerdir. 1 mol gliseridin oluşması için 30 mol civarında CH_3COSCoA gerekmektedir ve 2 mol CH_3COSCoA 1 mol heksozun parçalanması ile elde edilmektedir. Buna göre teorik olarak elde edilen tek hücre yağı (SCO) yaklaşık olarak %32 (wt/wt) civarındadır [Papanikolaou et al, 2010].

Vamvakaki ve arkadaşları tarafından yapılan ve *T.elegans* CCF-1465 suşunun kullanıldığı çalışmadaki harcanan laktoz miktarları (peyniraltı suyu kaynaklı) 8,9 ve 11,2 g/L olarak belirtilmiştir [Vamvakaki et al, 2010]. Harcanan şeker birimi başına elde edilen lipid miktarı sırası ($Y_{L/SC}$) ile %4 ve %0,9 olarak rapor edilmiştir [Vamvakaki et al, 2010].

Aggelis ve ekibinin *Cunninghamella echinulata* ve *Mortierella isabellina* suşları ile yaptığı çalışmalar neticesinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir [Bellou et al, 2012]. *Cunninghamella echinulata* mantarı fermentörde 144 saat boyunca inkübe edilmiş olup elde edilen biyokütle 2,1 g/L lipid miktarı ise 0,46 g/l olarak elde

edilmiştir [Bellou et al, 2012]. Flask çalışmasında ise bu değer 144 saat sonunda biyokütle için 3,9 g/L lipid için ise 1,26 g/L olarak rapor edilmiştir [Bellou et al, 2012]. *Mortierella ramaniana* ile yapılan fermentör çalışmasında elde edilen biyokütle 9,7 g/L lipid miktarı ise 3,17 g/L olarak belirtilmiştir [Bellou et al, 2012]. Flask çalışmasındaki biyokütle miktarı 7.0 g/L, lipid miktarı ise 3,72 olarak verilmiştir [Bellou et al, 2012]. *Mortierella Ramaniana* mantarından elde edilen sonuçların 216 saat inkübasyon neticesinde elde edildiği rapor edilmiştir [Bellou et al, 2012]. Çalışmada karbon kaynağı olarak gliserol kullanılmıştır [Bellou et al, 2012].

Fakas tarafından gerçekleştirilen farklı bir çalışmada *C.echinulata* ATHUM 4411 mantarı ksilozda büyütülmüştür, buna göre elde edilen toplam tek hücre lipidi (SCO) 6,7 g/L olarak ifade edilmiştir. Elde edilen biyokütle miktarı 5,8 g/L olarak rapor edilmiştir.

Aggelis ve ekibi tarafından gerçekleştirilen farklı bir çalışmada kullanılan mikroorganizmaların içerisinde *Thamnidium elegans* CCF-1465 suşunun yanı sıra *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411, *Mortierella ramanniana* MUCL 9235, *Mucor sp.* LGAM 36, *Zygorhynchus moelleri* MUCL 143 mikroorganizmaları da kullanılmıştır [Bellou et al, 2012]. Karbon kaynağı olarak gliserolün kullanıldığı çalışmada en iyi verim *Mortierella ramanniana* mantarından elde edilmiştir [Bellou et al, 2012].

Papanikolaou ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek C/N oranının olduğu besiyerinde büyütülen *Mortierella isabellina* mantarında lipid üretiminin oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan karbohidratlar nişasta, pektin ve laktozdur. *Mortierella isabellina* ATHUM 2935 suşunda en iyi verim (%37) laktoz şekerinden elde edilmiştir. *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 şusundan ise en iyi verim (%54) nişasta şekerinden elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada Yüksek C/N oranının *Mortierella isabellina* mantarının şeker alım hızını etkilemediği belirtilmiştir ve bu canlının 3,5-4 gün gibi kısa sürede besiyerinde yer alan şekeri tükettiği ifade edilmiştir [Papanikolaou et al, 2007]

Cunninghamella echinulata ATHUM 4411 suşu ile yapılan çalışma neticesinde C/N oranının artışının şeker alım hızını 2 kat arttırdığı ifade edilmiştir [Papanikolaou et al, 2007]. Her iki mikroorganizmada da hücre içi NAD⁺- ve NADP⁺ dehidrogenaz enzim aktivitesinin lipid birikim süresi boyunca çok düşük olduğu ve bununla hücre

içerisine şekerin alım hızını düzenleyen enzim olan NADP⁺-malik enzimin aktivitesini etkileyebileceği ifade edilmiştir [Papanikolaou et al, 2004-Wynn et al, 1999]. *Mortierella isabellina* mantarından en iyi verim glukoz şekerinin kullanıldığı besiyerinden, *Cunninghamella echinulata* mantarında ise en iyi verim laktoz şekerinden elde edilmiştir [Papanikolaou et al, 2007].

Kavadia ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *M.isabellina* ATHUM 2935 ve *Cunninghamella sp.* LGAM(9)2 şuşları kullanılmıştır [Kavadia et al, 2001]. Çalışmada kullanılan tüm türlerde glukoz karbon kaynağında büyümenin ve lipid birikiminin yüksek olduğu ifade edilmiştir [Kavadia et al, 2001]. Yağ birikiminin tipik olarak azot tükendikten sonra gerçekleştiği ifade edilmiştir [Kavadia et al, 2001]. Bu özelliğin glukoz gibi karbohidratlarda büyütülen oleaginous mayaları ve küflerinde sıklıkla karşılaşıldığı ifade edilmiştir [Kavadia et al, 2001]. Bu türlerde besiyerinde yer alan azot tükendikten sonra amonyum iyonlarının AMP'den serbest bırakıldığı ve mikroorganizmaların büyümeye devam ettiği rapor edilmiştir [Kavadia et al, 2001]. Böylelikle depolanmış olan lipid de karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kavadia glukozda büyüyen oleaginous mayalarında depolanan lipidin degradasyona uğradığını ifade etmiştir [Kavadia et al, 2001]. Azot sınırlandırılması ve karbon açlık koşullarında lipid dönüşümü hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir [Kavadia et al, 2001]. *Mortierella isabellina* 2935 mantarından elde edilen biyokütle miktarı 10,5 g/L; *Cunninghamella echinulata* LGAM (9)2 mikroorganizmasından ise 7,8 g/L biyokütle, 2,18 g/L lipid elde edildiği raporlanmıştır [Kavadia et al, 2001].

Ksilozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyeri ortamında büyütülen *C.echinulata* ve *M.isabellina* mantarlarından sırası ile %57,7 ve %65,5 oranında verim elde edilmiştir [Fakas et al, 2009]. Bu karbon kaynağı kullanılarak *C.echinulata* mantarından elde edilen verim nişasta [Chen and Chang, 1996] ve glukozdan [Papanikolaou et al, 2004], [Aggelis et al, 2002] yüksek olmuştur. Ksiloz bu nedenle *C.echinulata* için lipid üretiminde etkili bir substrattır. Literatüre bakıldığında *M.isabellina* suşu için ksilozdan elde edilen verimin glukozdan daha yüksek olduğu görülmüştür [Papanikolaou et al, 2004]. Yine yapılan bu çalışma neticesinde alınan sonuçlara göre *M.isabellina* mantarının ham gliserolü yağa çevirme oranı *C.echinulata* mantarından daha yüksektir [Fakas et al, 2009].

Chatzifragkou ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada kullanılan *C.echinulata* ve *M.isabellina* suşları kullanılmıştır [Chatzifragkou et al, 2010]. Kullanılan karbon kaynakları ticari glukoz, fruktoz, sukroz atık olan melas kullanılmıştır [Chatzifragkou et al, 2010]. *C.echinulata* suşunda 356 saat inkübasyondan sonra melas karbon kaynağının kullanıldığı besiyerinden elde edilen biyokütle miktarı 12,1 g/L, lipid miktarı ise 3,8 g/L olarak rapor edilmiştir [Chatzifragkou et al, 2010]. *M.isabellina* suşunda elde edilen miktarlar 150 saat inkübasyon süresinden sonra biyokütle için 9,5 g/L, lipid için 5,1 g/L olarak rapor edilmiştir [Chatzifragkou et al, 2010].

Son yıllardaki melas kullanılarak yapılan lipid üretim çalışmalarına bir örnek de *Chlorella zofingiensis* suşu ile yapılan çalışmadır [Liu et al, 2012]. Bu çalışma neticesinde lipidin yanı sıra güçlü bir antioksidan olan astaxanthin bileşeni de sentezlenmiştir. Elde edilen lipid ve astaxanthin miktarı sırası ile 0,71 g/L.gün ve 1,7 mg/L.gün olarak belirtilmiştir [Liu et al, 2012]

Fakas en yüksek yağ oranının uzun süreli (300 saat) fermentasyondan sonra elde edildiğini belirtmiştir [Fakas et al, 2009]. Tek hücre yağ üretiminin yapıldığı fermentasyon sisteminde bu şekildeki uzun süreli inkübasyonların yaygın olduğu ifade edilmiştir, örneğin *C.echinulata* glukoz şeker bakımından zengin besiyerinde 480 saat boyunca inkube edildiğinde yüksek oranda lipid ve gama linolenik asit elde edildiği raporlanmıştır. [Aggelis et al, 2002].

Aspergillus sp. türleri lipaz üretme potansiyelleri nedeni ile çeşitli fermentasyon koşullarında çalışılmış ve rapor edilmiştir [Ohnishi et al, 1994], [Fakas et al, 2010]. Papanikolaou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen lipid üretiminde mikroorganizma olarak *Aspergillus* suşlarından *Aspergillus* sp. ATHUM 3482, *A.niger* NRRL 363, *A.niger* 364, *A.niger* LFMB 1 Ve *A.niger* LFMB 2 kullanılmıştır. Tek hücre lipid üretimi besiyerine ilave edilen yemeklik atık zeytinyağı vasıtası ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre kuru hücre başına elde edilen en yüksek verimler sırası ile *Aspergillus* sp. ATHUM 3482, %64; *Aspergillus niger* NRRL 363, %49; *Aspergillus niger* NRRL 364, %42; *Aspergillus niger* LFMB 1, %56; *Aspergillus niger* LFMB 2 olarak elde edilmiştir. Mikroorganizmaların inkübasyon süreleri sırası ile 191 saat, 116 saat, 95 saat, 73 saat, 96 saat olarak rapor edilmiştir.

Literatür çalışmalarına bakıldığında *Aspergillus nidulans* ve *Aspergillus sydowii* türlerinin sukroz şekeri kullanılarak lipid üretimi yapıldığı ve verimlerinin sırası ile %50 ve %42 olduğu gözlemlenmiştir [Azeem et al, 1999]. Biyodizel atığı gliserol kullanılarak yapılan çalışmada *Aspergillus niger* mantarından elde edilen verim %57 olarak rapor edilmiştir [Andre et al, 2010] .

Tablo 3.1:*Aspergillus niger* mantar suşları kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri

Mikroorganizma	Besiyeri	Substrat Miktarı (g/L)	İnkübasyon süresi (Saat)	Biyokütle (g/L)	Lipid (g/L)	Verim (%)	Referans
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 363	Yemeklik Atık Zeytinyağı	15	116	14,4	7,1	49,3	[Papanikolaou, S]
			122	14,8	6,1	41,2	
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 364			95	8,4	3,5	41,6	[Papanikolaou, S]
			215	11,7	2,8	23,9	
<i>Aspergillus niger</i> LFMB 1			73	9,1	5,1	56,0	[Papanikolaou, S]
			168	13,3	2,3	17,3	
<i>Aspergillus sp.</i> ATHUM 3482			191	12,0	7,7	64,1	[Papanikolaou, S]
			215	13,1	5,3	40,4	
<i>Aspergillus niger</i> LFMB 2			215	10,6	3,9	36,8	[Papanikolaou, S]
			96	17,9	3,9	21,8	

Papanikolaou ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Y.lipolytica* şusu ile stearin olarak adlandırılan enüstriyel hayvansal yağ türeği kullanılarak tek hücre yağı üretilmeye çalışılmıştır [Papanikolaou et al, 2001]. Büyüme esnasında az miktarda organik asit üretimi başlasa bile pH değerinde önemli bir düşmenin olmadığı belirtilmiştir [Papanikolaou et al, 2001]. Lipid birikim prosesinin besiyerinin başlangıç pH değeri ve azot miktarından etkilendiği ifade edilmiştir [Papanikolaou et al, 2001]. Aynı zamanda inkübasyon sıcaklığı ve karbon kaynağının başlangıç miktarının da lipid biriktirme prosesinde etkili olduğu ifade edilmiştir [Papanikolaou et al, 2001]. 38,5 saat inkübasyon neticesinde stearin karbon kaynağından elde edilen biyokütle miktarı 8,7 g/L iken lipid miktarı da 3,8 g/l olarak rapor edilmiştir. ayrıca literatürde inkübasyon süresinin 60 saatten 100 saate çıkarıldığında besiyerinde harcanmamış halde çok miktarda stearin yer almasına rağmen hücrel lipidin degrade edildiği raporlanmıştır [Papanikolaou et al, 2001].

Yarrowia lipolytica mayası ile yapılan flask çalışmalarından birisi de Zhao ve yardımcıları tarafından gerçekleştirilmiştir [Zhao et al, 2010]. Çalışma neticesinde

elde edilen inulin karbon kaynağından elde edilen biyokütle miktarı 13,3 g/L, kuru hücre başına oluşan lipid miktarı ise 48,3 olarak ifade edilmiştir [Nakahara et al, 1992]. Yine aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada yer elması ekstraktını kullanılarak 14,6 g/L *Y.lipolytica* biyokütlesi elde edilmiştir [Zhao et al, 2010]. Kuru hücre başına düşen lipid miktarı ise 50,6 olarak rapor edilmiştir [Zhao et al, 2010].

Literatürde maya kullanılarak melastan lipid üretiminin gerçekleştirildiği diğer bir çalışma El-Fadaly ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [El-Fadaly et al, 2009]. 28 °C'de, 200 rpm, 5,5 pH değerinde 72 saat boyunca büyütülen mikroorganizmadan elde edilen hücre miktarı 3,2 g/L, tek hücre protein miktarı ise 1,8 g/L olarak belirtilmiştir [El-Fadaly et al, 2009].

Trichosporon capitatum mikroorganizmasının melas ve glukoz kullanılarak yapılan kültürlenmesinden elde edilen biyokütle miktarları sırası ile 17,0 g/L ve 15,4 g/L şeklinde olduğu belirtilmiştir [Dimou et al, 2002]. Kuru hücre başına düşen lipid miktarı ise sırası ile 35,2 ve 43,0 g/L olarak raporlanmıştır [Dimou et al, 2002].

Dimou ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Pleurotus ostreatus* için kullanılan karbon kaynağının patates dekstroz broth olduğu belirtilmiştir [Dimou et al, 2002]. Mantar 180 rpm'de 28 °C'de 17 gün boyunca büyütüldüğü rapor edilmiştir [Dimou et al, 2002]. Çalışmada Kullanılan suşlardan *Pleurotus ostreatus* türünün toplam lipidin %33-68 oranında linoleik asit ürettiğini rapor etmişlerdir [Dimou et al, 2002]. Kullanılan türlere göre oleik asit ve palmitik asit miktarlarının da yüksek olduğu belirtilmiştir [Dimou et al, 2002].

Bellou yapmış olduğu çalışmada *M.ramanniana* mikroorganizmasındaki çoklu doymamış yağ asidinin biyosentezinin primer metabolik aktivite olduğunu göstermek amacı ile organizmaya büyüme koşullarının olmadığı ortamda, çeşitli sıcaklıklarda büyütülmüştür [Bellou et al, 2012]. Bu koşullar altında (büyüme için engelleyici koşullar, nitrogen kaynağı tükenmiş) çoklu doymamış yağ asidi üretiminde özellikle linoleik asit üretiminde büyük bir düşüş gözlemlenmiştir [Bellou et al, 2012]. Dyal ve Narine göre sıcaklık çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) biyosentezinde önemli bir faktördür [Dyal and Narine, 2005]. Buna göre düşük sıcaklıklarda yapılan inkübasyon neticesinde desaturaz aktive olmakta ve çoklu doymamış yağ asidi üretimi artmaktadır [Dyal and Narine, 2005]. Bu hipotez *Mortierella* türü ile yapılan bazı çalışmalarla desteklenmektedir [Hansson and Dostálek, 1988]. Yapılan bu çalışmaların sonucuna göre düşük sıcaklıklarda büyütülen organizmadan elde edilen

çoklu doymamış yağ asidi miktarı normal büyüme sıcaklığında büyütülen organizmadan elde edilen miktara göre biraz fazladır. Fakat, Bellou ve ekibinin *M.ramanniana* organizması ile yaptığı çalışma neticesinde gliserol ortamında uzun süre inkube edilen canlıda palmitik asit ve stearik asit miktarı artıka üretilen çoklu yağ asidi miktarı da azalmaktadır [Bellou et al, 2012]. Bu durum çoklu yağ asidi sentezi ve mikroorganizmanın büyümesi arasında güçlü bir bağ mevcuttur. Bu bulgu Nakahara ve ekibi tarafından da *Mortierella spp.* Türü ile yaptıkları çalışma tarafından desteklenmektedir [Nakahara et al, 1992]. Buna göre, aslında azalan sıcaklıkla birlikte nötral ve polar lipid fraksiyonlarındaki gama linolenik asit miktarı azalmaktadır.

Benzer eğilim armut posasında büyütülen *M.isabellina* [Fakas et al, 2009], şeker içeren ortamda büyüyen *T.elegans* [Papanikolaou et al, 2010], [Fakas et al, 2006] ve domates atığında büyüyen *C.echinulata* mikroorganizmasında da gözlemlenmektedir. Fakat Bellou tarafından gerçekleştirilen çalışmada *C.echinulata* ve *Z.moelleri* mikroorganizmalarında gözlemlenen durum farklıdır. Özellikle *C.echinulata* türünde artan inkübasyon süresi boyunca tüm lipid fraksiyonlarındaki linoleik ve gama linolenik asit miktarında artış gözlemlenmektedir. İnkübasyon süresince palmitik ve stearik asit miktarları azalmaktadır. Buna göre bu iki türde desaturaz aktivitesinin ikincil metabolik büyüme ile alakalı olduğu raporlanmıştır [Bellou et al, 2012]. Benzer fizyolojik davranışların glukoz içeren besiyerinde büyütölmüş olan *C.echinulata* mikroorganizmasında da gözlemlendiğı belirtilmiştir [Meng et al, 2009].

Mucor sp. türü ile yapılan çalışma da ise bu mikroorganizmanın oleik asidi desature etme aktivitesinin düşük, fakat linoleik asit üzerindeki desaturaz aktivitesi yüksek düzeyde olduğu ve zamanla azalmadığı gözlemlenmiştir [Bellou et al, 2012]. Buna göre mikroorganizmadaki linoleik asit miktarı zamanla azalmaktadır. Aynı çalışmada yer alan diğer türlerde linoleik asit miktarı artmaktadır. Sonuç olarak bu mikroorganizmadaki lipid fraksiyonları oleik asit ve gama linolenik asit bakımından zengindir. Bu durum *T.elegans* mikroorganizmasında da aynı şekildedir.

Bellou ve ekibinin gerçekleştirdiğı çalışmaya göre üretilen tüm lipid fraksiyonlarında oleik asit miktarı maksimum düzeydedir [Bellou et al, 2012]. Bunu sırası ile palmitik asidin ve linoleik asidin izlediğı belirtilmektedir [Bellou et al, 2012]. Çalışma esnasında kullanılmış türler olan *Z.moelleri*, *C.echinulata*, *Mucor sp.*

türlerinden elde edilen gama linolenik asit (GLA) miktarı sırası ile % 21,4, %19,9 ve %19,8 olarak belirtilmiştir [Bellou et al, 2012]. Çeşitli kaynaklarda bu mikroorganizmaların gama linolenik asit üreticisi olduğu ifade edilmiştir [Aggelis, 2002], [Çertik et al, 1993], [Ahmed et al, 2008].

Fosfolipitler çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezinin bir parçasıdır [Certik and Shimizu, 1999] ve bu nedenle fosfolipidin yağ asidi kompozisyonu miseldeki desaturaz aktivitesini belirlemektedir [Certik and Shimizu, 1999]. Fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asitlerine geçişi pek çok çalışma ile gösterilmiştir [Bellou et al, 2012]. Çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezini gerçekleştiren sistemlerde planlanan bir takım değişikliklerin özellikle gama linolenik asit üretiminin artışını sağladığı yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir [Bellou et al, 2012].

Yakın zamanlarda yapılan benzer çalışmalarda, *M.circinelloides* mikroorganizmasından elde edilen toplam lipidteki linoleik asit ve gama linolenik asit miktarının yüksek oranda (sırası ile %12,7 ve %22,7) olduğu belirtilmiştir [Vicente et al, 2010].

Zygomycetes türü mikroorganizmalar ile yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada da oleik asit farklı tür ve farklı fermentasyon zamanlarından elde edilen lipid fraksiyonlarında en yüksek düzeydedir [Kavadia et al, 2001]. Palmitik asitte göz ardı edilmeyecek düzeydedir. Bazı türlerde (*Z.moelleri* 1703, *M.ramanniana*, *M.isabellina*) bu yağ asidinin büyüme süresi boyunca azaldığı belirtilmiştir [Kavadia et al, 2001]. *Zygorhynchus* spp., *Rhizopus* spp. ve *Cunninghamella* sp.türlerinde GLA düzeyinin yüksek (%15-20, w/w) olduğu ifade edilmiştir [Kavadia et al, 2001]. Linoleik asit miktarının GLA'dan düşük olduğu raporlanmıştır [Kavadia et al, 2001].

Daha önce de belirttiğimiz gibi kullanılan şeker türüne göre toplam lipidteki yağ asidi fraksiyonları da değişiklik göstermektedir. Hanssen ve Dostalek tarafından gerçekleştirilen çalışma bu duruma örnek olarak gösterilebilir [Hansson and Dostálek, 1988]. Çalışmaya göre nişastanın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde büyüyen *M.ramanniana* mikroorganizmasından elde edilen gama linolenik asit (GLA) miktarı (%25,7, w/w) glukoz (%14,7, w/w) ve ksilozdan (%19,5, w/w) elde edilen miktardan yüksektir [Hansson and Dostálek, 1988].

Fakas tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *C.echinulata* ksiloz içeren besiyerinde büyütülmüştür, bu şekilde elde edilmiş olan hücresel lipid miktarı 6,7 g/L, gama linolenik asit (GLA) miktarı ise 1119 mg/L olarak raporlanmıştır [Fakas et

al, 2009]. *Cunninghamella echinulata* ile yapılan bu çalışmalara ek olarak yapılan bir başka çalışmada ise *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840 suşu kullanılmıştır. Nişasta içeren ortamda büyütülen mantardan elde edilen gama linolenik asit miktarı ilk aşamada 964 mg/L, inokulasyon optimizasyonundan sonra ise bu değer 1349 mg/L'e yükseldiği belirtilmiştir [Chen and Chang,1996], [ChenandLiu, 1997].

Tablo 3.2:*Cunninghamella echinulata* ve *Mortierella isabellina* mantarı kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri

Mikroorganizma	Besiyeri	Melas Miktarı (%)	İnkübasyon Süresi (Saat)	Biyokütle (g/L)	Lipid (g/L)	Verim (%)	Referans
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411	Glukoz	30	410	9,2	3,2	34,8	[Papanik olaou, S]
	Nişasta	30	410	13,3	3,8	28,1	[Papanik olaou, S]
	Pektin	30	410	4,1	0,45	10,9	[Papanik olaou, S]
	Laktoz	30	410	0,6	0,03	5	[Papanik olaou, S]
<i>Mortierella isabellina</i> ATHUM 2935	Glukoz	30 71	95 205	10,9 24,1	5,2 13,0	47,71 54	[Papanik olaou, S]
	Nişasta	30	95	10,4	3,7	33,9	[Papanik olaou, S]
	Pektin	30	95	8,4	2,0	23,8	[Papanik olaou, S]
	Laktoz	30	95	9,5	3,5	36,8	[Papanik olaou, S]

M.isabellina mantarı için laktoz ve nişasta içeren besiyeri ortamları ile glukoz içeren besiyeri ortamını gama linolenik asit (GLA) bakımından karşılaştırdığımızda laktoz ya da nişasta şekerinin glukozdan daha iyi olduğu bildirilmiştir [Papanikolaou et al, 2007].

Yukarda bahsettiğimiz karbon kaynaklarından farklı bir ürün olan zeytinyağı da lipid üretimi için kullanılmıştır. Bu çalışmalardan birinde *Mucor mucedo* mikroorganizması kullanılmıştır ve üretim neticesinde açığa çıkan gama linolenik asit miktarı 373 mg/L olarak belirlenmiştir [Certik et al, 1997].

Zeytinyağı ve glukoz karışımını bünyesinde bulunduran besiyerinden *T.elegans* aracılığı ile elde edilen gama linolenik asit (GLA) miktarı 268 mg/L olarak ölçülmüştür.

Papanikolaou ve ekibinin gerçekleştirdiği çalışmada *Aspergillus* türleri yemeklik atık zeytinyağının substrat olarak kullanıldığı besiyerinde inkübe edilmiştir [Papanikolaou et al, 2011]. Çalışma neticesinde oleik asit miktarının maksimum olduğu gözlemlenmiştir. palmitik asit ve linoleik asit miktarı da yüksek düzeyde yer almaktadır. *A.niger* NRRL 363 ve 364 şuşlarında oleik asit miktarı ve palmitik asit miktarı yüksek düzeyde olduğu rapor edilmiştir [Papanikolaou et al, 2011].

Yemeklik atık zeytinyağı ile yapılan bir başka çalışmada *Y.lipolytica* suşu kullanılmıştır [Gutierre et al, 1993]. Substrat olarak kullanılan yağda palmitik asit ve stearik asit miktarı yoğun olmasına rağmen, elde edilen hücresel lipitte oleik asit, laurik asit, miristik asit ve linoleik asit yüksek düzeyde çıkmıştır [Papanikolaou et al, 2001].

Polioller ve şeker türevleri karbon kaynağı olarak kullanıldığında, besiyeri ortamında yer alan azot sınırlandırılmalıdır [André et al, 2009]. Bu koşullar altında 27 saat içerisinde besiyerinde yer alan azotun tamamen tükendiği Andre ve ekibi tarafından gerçekleştirilen deney tarafından ortaya konmuştur [André et al, 2009]. *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033 suşunun kullanıldığı çalışma neticesinde elde edilen toplam lipitteki oleik asit ve palmitik asit konsantrasyonun yüksek olduğu rapor edilmiştir [André et al, 2009]. Türden elde edilen linoleik asit miktarı da fazladır. Büyüme boyunca palmitik ve stearik asit miktarında azalma olduğu ifade edilmiştir [André et al, 2009].

Tablo 3.3: *Yarrowia lipolytica* mantar suşları kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri

Mikroorganizma	Besiyeri	Substrat miktarı (g/L)	İnkübasyon süresi (Saat)	Biyokütle (g/L)	Lipid (g/L)	Verim (%)	Referans
<i>Y.lipolytica</i> LGAM S(7)	İçyağı (Stearin)	10	60	8,7	3,8	43,6	[Papanikolaou, S]
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5033	Gliserol	120	375	6,5	2,0	30,76	[André, A., et al]
<i>Y.lipolytica</i> ACA-DC 50109	İçyağı (Stearin)	20	72	15,19	7,9	52	[Papanikolaou, S]

Lipid üretimine ait atık olarak melasın kullanıldığı çalışmalardan biri Chatzifragkou ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir [Chatzifragkou et al, 2010]. Çalışma esnasında kullanılan suşlar *C. echinulata* ATHUM 4411 ve *M. isabellina* ATHUM 2935'tir. Bu türlerden neticesinde türlerden elde edilen ana yağ asitleri palmitik, oleik, linoleik, gama linolenik (GLA), palmitoleik ve stearik asittir [Chatzifragkou et al, 2010]. *C.echinulata* mantarında sabit büyüme fazının ilk evrelerinde GLA miktarının yüksek olduğu daha sonra azaldığı belirtilmiştir [Chatzifragkou et al, 2010]. Bu durumda tek hücre yağının depolanma hızı desaturaz ile katalizlenen linoleik asidin gama linolenik aside çevrilme hızından yüksek olduğu ifade edilmiştir [Chatzifragkou et al, 2010]. *M.isabellina* türündeki gama linolenik asit miktarı *C.echinulta* ile karşılaştırılınca düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu türde elde edilen maksimum gama linolenik asit miktarı 168 mg/l olarak rapor edilmiştir. Bu miktarın glukozdan elde edilen miktara göre az olmasına rağmen önemli bir miktar olduğu belirtilmiştir [Chatzifragkou et al, 2010].

Papanikolaou ve ekibi yaptığı çalışma neticesinde *C.echinulata* mantarının stok lipidi harekete geçirdiğinde, palmitik, stearik ve oleik asitin parçalandığını ve bu asitlerin miktarının azaldığını belirtmişlerdir. Bununla beraber gama linolenik asit miktarında artış olduğunu ifade etmişlerdir [Papanikolaou et al, 2004].

Tablo 3.4: Farklı fermentasyon şartlarında kültüre alınan çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen tek hücre lipid (SCO) ve gama linolenik asit (GLA) miktarları

Mikroorganizma	Karbon kaynağı	Kültür şekli	L(g/L)	$Y_{L/X}$ (%w/w)	GLA	Referans
<i>M. ramanniana</i>	Glukoz	Shake flask	3.6	24	437	Hansson and Dostalek
<i>C. echinulata</i>	Nişasta	Shake flask	8.1	27	964	Chen and Chang
<i>C. echinulata</i>	Ksiloz	Shake flask	6.7	53	1119	Fakas et al.
<i>M. isabellina</i>	Glukoz	Shake flask	18.1	50	801	Papanikolaou et al.
<i>C. echinulata</i>	Domates atığı	Shake flask	7.8	31	800	Fakas et al.
<i>C. echinulata</i>	Nişasta	Shake flask	11.5	30	1349	Chen and Liu
<i>M. ramanniana</i>	Glukoz	Biyoreaktör	31,3	50	5601	Hiruta et al.
<i>Mucor mucedo</i>	Glukoz/yağ	Shake flask	12.0	62	379	Certik et al.
<i>Mucor sp.</i>	Glukoz	Shake flask	5.8	43	431	Ahmed et al.
<i>M. isabellina</i>	Fruktoz	Shake flask	7.4	61	186	Chatzifragkou et al.
<i>M. isabellina</i>	Glukoz	Biyoreaktör	12,7	72	508	Chatzifragkou et al.
<i>C. echinulata</i>	Glukoz	Shake flask	3.9	30	741	Chatzifragkou et al.
<i>C. echinulata</i>	Melas	Shake flask	3.8	32	490	Chatzifragkou et al.

Pleurotus türlerinin tek hücre yağı üretme potansiyeli incelemek amacı ile Dimou ve ekibi *Pleurotus* türü mikroorganizmalarla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir [Dimou et al, 2002]. Bu çalışmanın sonucuna göre *P.eryngii* türünde linoleik miktarı en fazla olan yağ asidi olmuştur (toplam lipidin %33-68) [Dimou et al, 2002]. Türden elde edilen oleik miktarı ise toplam lipidin % 43-46 arasındadır [Dimou et al, 2002]. Stearik asit miktarının ise düşük olduğu belirtilmiştir. *P.ostretus* türünden elde edilen linoleik asit miktarı ise % 38 olarak rapor edilmiştir [Dimou et al, 2002].

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve endüstriyel açıdan önemli olan diğer bir üründe sitrik asittir. Sitrik asit trikarboksilik asittir [Smith et al, 1974]. Limon, portakal, ananas, erik ve armut gibi meyvelerde, hayvan kemiği, kas ve kanında doğal olarak bulunmaktadır [Sodeck et al, 1981]. Ticari olarak üretimin ilk kez Carl wilhem tarafından gerçekleştirilmiştir [Kapoor et al, 1983]. Wilhem sitrik asidi limon suyunu kristallendirerek elde etmiştir [Smith et al, 1974]. Mikroorganizma tarafından üretilenin aksine meyvelerden elde edilen sitrik asit doğal sitrik asit olarak bilinmektedir. Sitrik asidin kimyasal metodla üretilebilmesine rağmen, mikrobiyal fermentasyondan daha iyi bir kimyasal metod mevcut değildir [Sodeck et al, 1981]. 1983 yılında Wehmer, *Mucor* ve *Penicillium* türü mikroorganizmalarla sukrozdan

sitrik asit üretimini incelemişlerdir [Sodeck et al, 1981]. Deney başarısızlıkla sonuçlanmış ve bu yöntem terk edilmiştir [Sodeck et al, 1981].

1920 yılına kadar sitrik asidin tüm ticari üretimi ıhlamurdan ve limon suyundan sağlanmıştır [Milsom, 1987]. 1917 yılında Curie *Aspergillus niger* ile ilk mikrobiyal üretimi gerçekleştirmiştir. Yaptığı deneyde farklı *Aspergillus niger* mantarının farklı suşları ile çalışmıştır. %15 Sukroz içeren ve pH değeri düşük olan besiyerinde inkubasyonu gerçekleştirmiştir. Elde edilen sonuca göre şekerin %55'inin sitrik aside döndüğü rapor edilmiştir [Johnson, 1949].

1930'lu yıllardan itibaren pek çok üretici sukrozdan yola çıkarak sitrik asit üretmek için *Aspergillus niger* mikroorganizması ile fermentasyon prosesini kullanmıştır [Milsom, 1987]. *Aspergillus niger* mantarı sitrik asit üretiminde en çok kullanılan mantar türüdür. [Perlman and Sih, 1960] Günümüzde sitrik asidin dünya genelindeki üretiminin %99'u yüzey veya sıvı kültür kullanılarak gerçekleştirilen mikrobiyal proseslerle oluşturulmaktadır [Lancini and Parte, 2008]. Üretim susuz veya mono hidrat şeklinde katı olarak gerçekleştirilmektedir [Lancini and Parte, 2008]. Dünya genelindeki üretim miktarına bakıldığında her yıl 1,5 milyon ton sitrik asit üretimi gerçekleştirilmektedir [Lancini and Parte, 2008].

Şeker pancarı ve şeker kamışından elde edilen melas sitrik asit üretimi için yıllardır tercih edilen substrattır. Doelger ve Prescott (1939) sukroz ve inorganik tuzlar içeren besiyerinde *Aspergillus* türünü büyütmeyi başarmıştır [Doulger and Prescott, 1939].

1949 yılında, Perlman *Aspergillus* türü mantarı ve melası kullanarak fermentasyon prosesini geliştirdiğini rapor etmiştir [Perlman and Sih, 1960].

A.niger türü mantar ile yüzey ve sıvı fermentör kültüründe melas kullanılarak üretilmiş olan en yüksek sitrik asit miktarı 60 ile 110 g/L arasında değişmektedir [Clark and Lentz, 1963] . Hamisa, Radwan ve Qazi yüzey ve sıvı fermentasyon yöntemini kullanarak pilot çalışma ile sitrik asit üretimini yapmışlardır [Hamis and Radwan, 1977]. Grup karbon kaynağı olarak şeker kamışından elde edilmiş melas kullanmıştır [Hamis and Radwan, 1977]. Bu deneysel çalışmada yüzey fermentasyonu ile elde edilen sitrik asit miktarı 60,8 g/L, sıvı fermentasyon yöntemi ile elde edilen sitrik asit miktarı ise 67 g/L olarak belirlenmiştir [Hamis and Radwan, 1977].

Jianlong ve yardımcıları fermentasyon besiyerinden sitrik asidi ayırmak için fermentör ile bağlantılı anyon değiştirici rezinin yer aldığı sistemle melastan sitrik asit üretmeye çalışmışlardır [Jianlong, 2000]. Elde edilen bu sonuca göre bu fermentasyon tekniği ile şeker dönüşümü ve sitrik asit oluşumu sırasıyla %82,2 ve 0,338 g/L/h'ten %94,8 ve 0,543 g/L/h'e yükselmiştir [Jianlong, 2000] .

Hossain ve Brooks farklı bir tarımsal atık olan peyniraltı suyunu kullanarak *A.niger* mutant suşundan sitrik asit üretmeye çalışmışlardır [Hossain and Brooks, 1983]. Bu çalışmadan elde edilen en yüksek sitrik asit miktarı 8,3 g/L olarak raporlanmıştır [Hossain and Brooks, 1983]. Peynir altı suyuna son konsantrasyonu 140 g/l olacak şekilde laktoz eklendiğinde bu miktarın 14,8 g/L'e yükseldiği belirtilmiştir [Hossain and Brooks, 1983]. Son olarak bu besiyerine %3 civarında metanol ilave edildiğinde ise sitrik asit miktarının 25 g/L olduğu ifade edilmiştir [Hossain and Brooks, 1983].

Dünya genelinde üretilen sitrik asidin %70'i gıda ve içecek endüstrisinde asit düzenleyici ve antioksidant olarak kullanılmaktadır [Jianlong, 2000]. %12'lik kısmı ise farmasötik endüstride efervesan ve vitaminleri koruyucu antioksidant olarak, pH düzenleyici olarak, vücudun gereksinim duyduğu demiri (demir sitrat) karşılamak, kapatici ve kozmetik preparatları hazırlamak amacı ile kullanılmaktadır [Vandenberghe et al, 2000]. Geriye kalan %18'lik kısım kimya endüstrisinde ve deterjan sanayisinde kullanılmaktadır [Vandenberghe et al, 2000]. Kimya endüstrisinde tekstil alanında tekstil ürünlerinin işleyiş ve yumuşatılmasında köpükleşme ajanı olarak, metal temizleyici olarak kullanılmaktadır. Son olarak eksoz gazında yer alan sülfürü gidermek amacıyla da sitrik asit kullanılmaktadır [Kapoor et al, 1983].

Yakın zamanda biyodizelden elde edilmiş gliserol kullanılarak *Y.lipolytica* suşlarından (LFMB 19, LFMB 20, ACA-YC 5033) sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir [André et al, 2009]. Üretim koşullarına bakıldığında besiyerindeki azot miktarı sınırlandırılmıştır ve üretim shake flask içerisinde gerçekleştirilmiştir [André et al, 2009]. Kullanılan gliserolün başlangıç konsantrasyonunun 30 g/L olduğu belirtilmiştir. Tüm türlerde mikrobiyal büyümenin başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve gliserol tüketiminin yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir [André et al, 2009]. Bu koşullar altında LFMB 19 suşundan elde edilen maksimum sitrik asit miktarı 69 saat sonunda 4,6 g/L, LFMB 20 suşundan elde

edilen miktar ise 90 saat sonunda 3,2 g/L olarak rapor edilmiştir. ACA-YC 5033 suşunda ise 187 saat inkübasyon sonunda bu değer 5,4 g/L olarak belirtilmiştir. ACA-YC 5033 suşu ile yapılan ileri denemelerde gliserol konsantrasyonun arttırıldığı birkaç çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların neticesinde en yüksek verim (50,1 g/L) 120 g/L gliserol içeren besiyerinden elde edilmiştir [André et al, 2009].

Poliollerle yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen en yüksek sitrik asit miktarının 109-148 g/L arasında olduğu raporlanmıştır [Rywinska and Rymowicz, 2009].

Literatürdeki rapor edilmiş en yüksek verim Wojtatowicz ve ekibi tarafından elde edilmiştir, buna göre hidroliz edilmiş patates nişastasını içeren besiyerinde büyütülen *Y.lipolytica* suşundan elde edilen sitrik asit miktarının kuru hücre başına oranı %93 olarak belirtilmiştir [Wojtatowicz et al, 1991]. Rane ve Sims glukoz karbon kaynağı ile büyütülmüş olan *Y.lipolytica* mikroorganizmasında bu değere yakın bir verim (%77) elde ettiklerini rapor etmişlerdir [Rane and Sims, 1993]. Bunun gibi pek çok literatürde poliol ve şekerlerin mayalar tarafından yakın verimlerde (%32-62) sitrik aside dönüştürüldüğü aktarılmıştır [Papanikolaou and Aggelis, 2009].

$Y_{cit/S}$ değerleri harcanan karbon kaynağı başına oluşan ürün miktarını göstermektedir. yüksek karbon içeriğine ve indirgenme derecesine sahip olan substratlar yüksek oranda ürüne dönüşmektedirler. Örneğin *Y.lipolytica* suşu etanol içeren ortamda büyütüldüğü zaman elde edilen sitrik asit verimi %87 olarak belirtilirken ham yağ gibi hidrofobik substratlardaki ürün veriminin oldukça düşük olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Kamzolova et al, 2005].

Klasson ve ekibinin yaptığı çalışmada *C.lipolytica* Y1095, *C.lipolytica* NRRL-Y-7576 suşları kullanılmıştır [Rane and Sims, 1993]. Elde edilen verilere göre *C.lipolytica* Y1095 suşu ile elde edilen sitrik asit miktarı 13,6-78,5 g/L arasında iken diğer maya suşundan elde edilen sitrik asit miktarı 51,5 g/L'dir [Rane and Sims, 1993]. Mayalar kesikli fermentör sisteminde glukoz içeren besiyerinde biyoreaktörde büyütülmüştür [Rane and Sims, 1993].

Y.lipolytica ATCC 20346 suşu glukoz içeren besiyerinde kesikli beslemeli fermentör sisteminde biyoreaktörde büyütüldüğü zaman 50-69 g/L arasında sitrik asit elde edildiği ifade edilmiştir [Moresi, 1994]. Aynı karbon kaynağının kullanıldığı başka bir çalışmada *C.oleophila* ATCC 20177 mayası kullanılmıştır. Bu mayadan

flask ve biyoreaktör kültürlemesinden elde edilen sitrik asit miktarı 50-79 g/L [Anastassiadis et al, 2002] arasında iken sürekli sistemde büyütme gerçekleştirildiğinde ise bu değerin 37,6-57,8 g/L arasına düştüğü belirtilmiştir [Anastassiadis and Rehm, 2005].

ACA-DC 50109 suşunda ise glukoz karbon kaynağı kullanıldığında bu değer 43 g/L [Papanikolaou et al, 2006], biyodizelden elde edilen gliserol kullanıldığında ise bu değer 63 g/L'e yükselmiştir [Papanikolaou et al, 2008].

Biyodizel türevi olan gliserol ile olan çalışmalardan biri de Imandi ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir [El-Hussein et al, 2009]. Biyoreaktörde gerçekleştirilen çalışma neticesinde 78 g/L sitrik asit elde edilmiştir [El-Hussein et al, 2009]. Buna karşın Levinson ve ekibinin aynı şartlarda saf gliserolden elde ettiği sitrik asit miktarı 24-31 g/L arasında elde etmişlerdir [Levinson et al, 2007].

Sonuç olarak maya ile yapılan çalışmalarda en yüksek verim (150 g/L) etanol [Kamzolova et al, 2003], bitkisel yağ [Kamzolova et al, 2005] ve ham gliserolde [Rywinska and Rymowicz, 2009] kültürlenmiş olan mutant *Y.lipolytica* suşundan elde edilmiştir.

Sitrik asidin ticari üretimine baktığımızda *Aspergillus niger* suşları daha çok tercih edilmektedir. *Aspergillus niger* NRRL 599, 364 ve 567 suşları en çok tercih edilen suşlardır [Max et al, 2010]. Üretimin ekonomik olması açısından melasın kullanıldığı bir takım çalışmalar yapılmıştır. Lotfy ve ekibinin gerçekleştirmiş olduğu çalışmayı buna örnek olarak gösterebiliriz. Çalışma neticesinde *Aspergillus niger* suşundan elde edilen sitrik asit miktarı 113,5 g/L olarak rapor edilmiştir (Tablo 3.5) [Lotfy et al, 2007]. Ikram ve ekibi tarafından yapılan bir başka çalışma ise üretilen sitrik asit miktarının 114 g/L olduğunu belirtmektedir. *Aspergillus niger* suşlarının kullanıldığı melas ile yapılan çalışmalarda melasa uygulanan farklı ön işlemlerle verimin arttığı ifade edilmiştir [Khosravi-Darani and Zoghi, 2008], [Ikram-ul-Haq et al, 2001].

Haq ve ekibi tarafından yapılan çalışmada melas içeren ortama 2.0×10^{-5} M CuSO_4 ilavesi yapılmıştır [Haq et al, 2002]. Bu şekilde elde edilen sitrik asit miktarının arttığı belirtilmiştir. Ortama eklenen CuSO_4 besiyerinde yer alan mikroorganizma (*Aspergillus niger* GCB-47 ve onun mutanı GCMC-7) için toksik özelliğe sahip olan Fe^{+2} konsantrasyonunu azaltır ve bu da biyokütle ve ürün artışını sağlar [Haq et al, 2002].

Tablo 3.5: Maksimum sitrik asit üretimi ile ilgili yakın zamana ait veriler

Konsantrasyon (g/L)	Karbon kaynağı	Organizma	Kültür şekli	Referans
200	Glukoz	<i>Aspergillus niger</i>	Shake flask	Rehm et al
113,5	Şeker pancarı, şeker kamışı melası	<i>Aspergillus niger</i>	Shake flask	Lofty et al.
114	Şeker kamışı melası	<i>Aspergillus niger</i>	Shake flask	Ikram et al.
40	n-parafin	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Shake flask	Crolla et al.
42,9	Yağ asidi, glukoz	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Shake flask	Papanikolaou et al.
140	Sukroz	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Shake flask	Lopez-Garcia et al.

Melasın içerisinde yer alan organik ve inorganik bileşikler fermentasyon prosesini inhibe edebilir, bu da ürün veriminin düşmesine neden olur. Bu sebeple yüksek verim elde etmek amacı ile melas yaygın yöntemlerden uygun olan bir tanesi ile muamele edilmelidir. Bu yaygın yöntemlerin içerisinde ferrosiyanad [Baby and Saad, 1996], sülfürik asit, trikalsiyum fosfat, HCl içeren trikalsiyumfosfat, sephadeks fraksiyonu içeren trikalsiyum fosfat (HCl içeriyor) [Kundu et al, 1984] metodlarından biri uygulanabilir. Angumeenal ve Venkappayya yaptıkları çalışma ile melası diamonyum fosfat uygulamasının takip ettiği amonyum okzalat ile muamele metodunu kullanmışlardır [Angumeenal and Venkappayya, 2005]. Grup bu yöntemin yaygın yöntemlere göre ürün veriminde daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir [Angumeenal and Venkappayya, 2005].

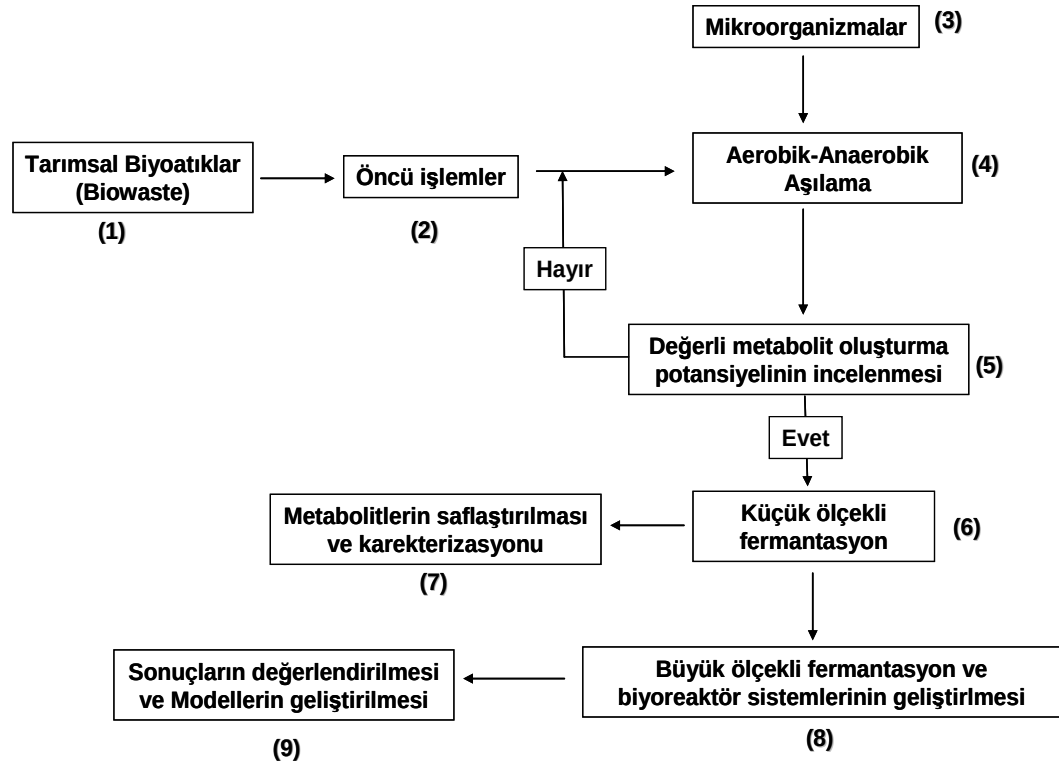
4MATERİYAL VE METOTLAR

4.1.Materyal

Thamnidium elegans CCF-1465, *Aspergillus niger* NRRL 363, *C.echinulata* ATHUM 4411, *M.isabellina* ATHUM 2935, *P.ostreatus* sp., *Y.lipolytica* ACA-DC 50109, melas (Pakmaya A.Ş., Türkiye), KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), potato dextrose agar (Merck), Shimadzu UV-3600 UV spektrometresi, ısıtıcı (Stuart Block Heater), vorteks (BioCote vortex mixer), Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spektrometre, Agilent Technologies 6890N gaz kromatografi cihazı, Sartorius, BIOSTAT B plus Fermentör cihazı.

4.2. Metod

4.2.1. Mikroorganizmaların Büyütülmesi ve Ürün Eldesi



Şekil 4. 1: Proses akış şeması.

Stok besiyeri;

Thamnidium elegans CCF-1465, *Aspergillus niger* NRRL 363, *C.echinulata* ATHUM 4411, *M.isabellina* ATHUM 2935, *P.ostreatus* sp., *Y.lipolytica* ACA-DC 50109 mikroorganizmaları hazırlanmış olan PDA (Potato Dextrose Agar, 39 g/L, pH: $5,6 \pm 0,2$) 28 °C’de büyütüldükten sonra 4 °C’de muhafaza edildi [Chatzifragkou, et al, 2011].

Stok besiyerinde büyütülen mikroorganizmaların ürün besiyerlerine aktarılması ve ürün üretimi;

Yatık besiyerinde büyütülen kültürlerin ürün besiyerine alınması için yatık agar içeren tüp içerisine %0,9 NaCl içeren distile sudan (fizyolojik su) bir miktar ilave edilip vortekste iyice karıştırılmıştır. Solusyona geçen spor besiyerine aktarılmıştır. Besiyerine aktarılan tüm mikroorganizmalar 28 °C’de 180 rpm’de büyütülmüştür. Mikroorganizmaların büyütüldüğü besiyerlerinin pH değeri 6,0 olarak ayarlanmıştır.

Lipid üretiminin gerçekleştirildiği tüm mikroorganizmalar inkübasyon süresi dolduktan sonra filtre kağıdından süzüldü. Süzme işleminin ardından soğuk distile su ile iki defa yıkandı. Besiyerinden arındırılan mikroorganizmalar kurutulması için 80 °C’deki etüve alındı ve 24 saat boyunca etüvde bırakıldı.

Yarrowia lipolytica mayası ürettiği sitrik asidi hücre dışına salmaktadır. Bu nedenle mayanın üretmiş olduğu sitrik asit besiyerinde yer almaktadır. Bu nedenle besiyerinde yer alan mikroorganizma çöktürülüp berrak supernatant elde edildikten sonra besiyerinden sitrik asidin saflaştırılması yapılmıştır.

Ürün besiyerleri;

Besiyeri A;6 gram melas tartılıp toplam hacim 150 ml (%4 melas) olacak şekilde distile su ile seyreltildi. Hazırlanmış olan melas solusyonu sterilizasyon için otoklav edildi. Besiyeri için kullanılmış olan melas ön işlemden geçmedi (Tablo 4.1).

Besiyeri B;KH₂PO₄ 7(g/L), Na₂HPO₄.2H₂O 2,5 (g/L), MgSO₄.7H₂O 1,5 (g/L), CaCl₂.2H₂O 0,1 (g/L), FeCl₃.6H₂O 0,08 (g/L), ZnSO₄.7H₂O 0,001 (g/L), CuSO₄.5H₂O 0,0001 (g/L), Ca(NO₃)₃.H₂O 0,0001 (g/L), MnSO₄.5H₂O 0,0001 (g/L), melas (%4, w/v), pH: 6.00. Besiyerinde yer alan eser elementlerin solusyonu hazırlanıp besiyerine ekleme yapıldı. Eklenen melas ön işleme tabi tutulmadı (Tablo 4.1).

Besiyeri C;besiyeri B'den tek farkı içerdiği melas miktarının farklılığıdır. Besiyerinin içerdiği melas miktarı % 5 (w/v)'dır. Aynı zamanda bu besiyerinde kullanılan melas ön işlemden geçti (Tablo 4.1). Eser element solusyonu içermektedir.

Besiyeri D; mevcut melas miktarı % 5 (w/v)'dır ve fosfat ve magnezyum tuzlarının miktarı besiyeri B'de öngörüldüğü gibidir. Melas ön işlemden geçti. Besiyerine eser element solusyonu yerine distile su ile %50 oranında seyreltilmiş şilempeden 2 ml ilave edildi (Tablo 4.1).

Besiyeri E ve F; içerdiği melas miktarı %10 (w/v)'dur (Tablo 4.1). Bu besiyerlerinden birine eser element solusyonu diğerine de şilempeden (distile su ile %50 oranında seyreltilen şilempe) 2 ml ilave edildi (Tablo 4.1).

Besiyeri G ve H; içeriği besiyeri B'nin içeriği gibidir. Yalnız besiyerinde kullanılan melas ön işleme tabi tutuldu (Tablo 4.1). Besiyeri H'de eser element yerine şilempe yer almaktadır (Tablo 4.1). *Cunninghamella echinulata* büyüme besiyerinde 28 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra G ve H besiyerlerine aktarılmıştır. Büyüme besiyerindeki melas oranı %1 (w/v) şeklinde belirlenmiştir. Büyüme besiyeri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Eser element solusyonu içeren büyüme besiyerinde büyüyen mantar G besiyeri, şilempe (distile su ile %50 oranında seyreltilmiş,1 ml) içeren büyüme besiyerinde yer alan *Cunninghamella echinulata* H besiyerine aktarılmıştır. *M.isabellina* mantarında ise 3. 5. ve 7.günde sırası ile 1:0,6:2,5 gram melas ilavesi gerçekleştirilmiştir.

Besiyeri I;besiyerinin besiyeri C'den farkı eser element solusyonunun içeriğidir. Ön işlem uygulanmış olan melasın besiyerindeki oranı %5 (w/v)'dir.

Eser element solusyonu: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 (g/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,15 (g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 (g/L), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,06 (g/L) [Papanikolaou et al, 2006].

Besiyeri J ve K; bu besiyerlerinde bulunan fosfat ve eser element miktarları besiyeri B'de olduğu gibidir, besiyerleri magnezyum tuzları içermemektedir. Besiyeri J'da ön işlem görmüş melastan % 4 (w/v), besiyeri K'de ise %8 (w/v) oranında yer almaktadır.

Tablo 4. 1: Maya ve mantarların büyütilmesi ve ürün eldesinde kullanılan besiyerlerinin içerikleri

Besiyerleri	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	Eser Element	Şilempe	Melas	
						M ^a	M ^b
A	-	-	-	-	-	-	+
B	+	+	+	+	-	-	+
C	+	+	+	+	-	+	-
D	+	+	+	-	+	+	-
E	+	+	+	+	-	+	-
F	+	+	+	-	+	+	-
G	+	+	+	+	-	+	-
H	+	+	+	-	+	+	-
I	+	+	-	+	-	+	-
J	+	+	-	+	-	+	-
K	+	+	-	+	-	+	-

a: Ön işlem görmüş melas, b: ön işlem görmemiş melas

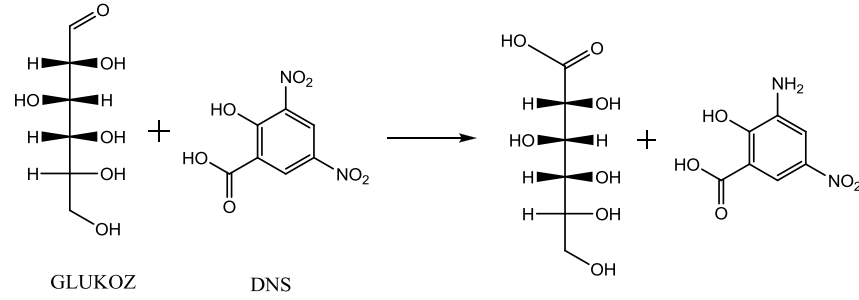
4.2.2. Melasa Uygulanan Ön İşlemler

50 gram melas (ıslak ağırlık) tartılıp distile su ile 250 ml'ye tamamlandı [Karaalp, 2007]. Çözelti homojen oluncaya kadar karıştırıldı ve katı partiküllerin ayrılması için 6000 rpm'de 20 °C'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi [Karaalp, 2007]. Çöken kısım süzülerek ayrıldı. Süzülen melas solüsyonu ısıtma işlemine maruz bırakıldı. Isıtma işleminde, çözelti 120 °C'de 15 dakika boyunca otoklav edildi [Karaalp, 2007] ve 25°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün çözelti 6000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilip süzüldü. Süzme işleminden sonra 4 N H₂SO₄ çözeltisi ile pH değeri 3,00'e ayarlanıp oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün aynı koşullarda santrifüj edilip vakum altında filtre kağıdından süzüldü. Süzülen sıvı kısım tekrar otoklavlanıp oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün santrifüj ve vakum altında süzme işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyonun sağlanması için son kez otoklava atıldı. Melasta yer alan sukrozun parçalanması ve elde edilen indirgen

şekerler TLC metodu takip edildi [Karaalp, 2007]. Toplam indirgen şeker miktarı DNS metodu [Miller, 1959] ölçüldü.

4.2.3. DNS Metodu İle İndirgen Şeker Ölçümü

DNS solüsyonu (100 ml): 0,2 gram fenol, 50 mg Na_2CO_3 ve 1,6 gram NaOH 100 ml su içerisinde çözöldü [Karaalp, 2007].



Şekil 4. 2: Glukoz ve dinitro salisilat arasındaki indirgeme/yükseltgeme reaksiyonu

Numune hazırlanması: 100 µl numune ve 100 µl DNS solüsyonu mikrosantrifüj tüpü içerisine eklenip ve vorteks vasıtası karıştırıldı [Karaalp, 2007]. Daha sonra 100 °C’de 5 dakika süresince kaynatıldı. Örnekler soğutulduktan sonra distile su ile 1 ml ye seyreltildi [Karaalp, 2007]. Örneklerin absorbans değeri 575 nm’de ölçüldü. Standartlar ticari glukoz veya fruktoz şekerinden hazırlanabilir. Fruktozdan hazırlanmış olan standart konsantrasyonları (mg/ml) 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75 şeklinde belirlendi.

4.2.4. Lipid Ekstraksiyonu (Folch Metodu)

Kurutulmuş olan mikroorganizma üzerine kloroform: metanol (2:1, v/v) çözeltisi ilave edilip Homojenizasyon işlemi uygulandı. Mikroorganizma üzerine solusyon 1 gram üzerine 20 ml olacak şekilde eklendi [Folch and Sloane, 1957]. Homojenize edilmiş olan çözelti 15 dakika boyunca çalkalayıcıda oda sıcaklığında çalkalandı [Folch and Sloane, 1957]. 14.000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilip berrak supernatant elde edildi. Supernatant hacmi ölçölüp bir tüp içerisine alındı. Hacmi belli olan supernatant üzerine hacminin 0,2 katı kadar %0,9 NaCl çözeltisi ilave edildi [Folch and Sloane, 1957] ve ardından vorteks ile maksimum

derecede 1 dakika boyunca karıştırıldı [Folch and Sloane, 1957]. İki fazı ayırmak için solusyon 2000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi [Papanikolaou et al, 2008]. Lipid içeren alttaki faz toplandı [Folch and Sloane, 1957]. Lipid ekstraktı % 0,88 (w/v) KCl (3 X 20 ml) çözeltisi ile yıkandı ve susuz Na₂SO₄ çözeltisinden geçirilerek su uzaklaştırıldı. Liyofilizatör veya azot akışı altında solvent buharlaştırılıp ve -80°C’de saklandı.

4.2.5. Yağ Asitlerinin Metil Esterlerine Dönüştürülmesi ve Gaz Kromatografi Analizi

100 mg örnek üzerine 2 ml hekzan ve 4 ml 0,5 M NaOH-metanol çözeltisinden ilave edildi. Karışım 65 °C’de 45 dakika boyunca ısıtıldı. Isıtma işlemi sona erdikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Numune soğuduktan sonra üzerine 200 µl asetik asit ilave edildi. İlave edilen asetik asit ortamda NaOH oluşumunu engellemektedir [Lall et al, 2009]. Asit ilavesinden sonra numune üzerine 5 ml distile su, 5 ml hekzan ilave edildi ve tüp 2 dakika boyunca hızlı bir şekilde karıştırıldı. Fazların ayrılması için 3000 g’de 3 dakika boyunca santrifüj yapıp hekzan fazı ekstrakte edildi. Numune 15-20 saniye boyunca susuz sodyum sülfat üzerinden geçirilerek kurutuldu [Folch and Sloane, 1957]. Tekrar 5 ml hekzan ilave edilip 2 dakika boyunca karıştırıldı. Hekzan fazı tekrar susuz soydum sülfat üzerinden geçirilerek kurutuldu [Lall et al, 2009]. İşlemin ardından numuneler gaz kromatografi cihazında analiz edildi. Estere çevrilmiş olan numuneler 3 mg/ml olacak şekilde heptanla seyreltildikten sonra gaz kromatografi cihazında (Agilent Technologies 6890N) FID detektörde (dedektör sıcaklığı 280 0C) okunmuştur. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı (1 ml/dk akış hızında) kullanılmıştır. Analiz 200 °C’de yürütülmüştür.

4.2.6. Sitrik Asit Miktarının Belirlenmesi

Test tüpü içerisindeki 1 ml örnek üzerine 1,3 ml pridin ve ardından 5,7 ml asetik anhidrit ilave edildi [Marier and Boulet, 1958]. Karışım maksimum hızda karıştırıldı ve hemen su banyosuna (32 ± 0,5) alındı ve renk dönüşümünün sağlanması için su banyosunda 30 dakika inkübe edildi [Marier and Boulet, 1958]. Renk dönüşümünün gözlemlendiği numunen absorbans değeri 420 nm’ de Uv spektrometrede ölçüldü [Marier and Boulet, 1958]. Ölçüm için gerekli olan

standartlar granüler sitrik asidin distile suda çözünmesi ile hazırlandı. Ölçümde kör nokta olarak kültür filtratının distile su ile seyreltilmiş hali ya da granüler sitrik asitten hazırlanmış olan seyreltik standart kullanılabilir.

4.2.7. Sitrik Asidin Anyon Değiştirici Rezin İle Saflaştırılması

Anyon değiştirici rezinin hazırlanması; Anyon değiştirici rezin sitrik asidin besiyerinden ayrılması için kullanıldı. Rezin kullanılmadan önce ön işleminden geçirildi. Öncelikle rezinin su ile doyurulması için üzerine distile su ilave edilip 24 saat boyunca bekletildi [Jianlong et al, 2000]. İkinci aşama olarak rezine 2 M HCl çözeltisi ilave edildi ve bir saat bekletildi [Jianlong et al, 2000]. Bir saat sonra rezin distile su ile yıkandı ve üzerine 2 M NaOH çözeltisi ilave edildi [Jianlong et al, 2000]. Rezin NaOH çözeltisi içerisinde 1 saat bekletildi [Jianlong et al, 2000]. Süre sonunda rezin bazik çözelti uzaklaşana kadar distile su ile iyice yıkandı [Jianlong et al, 2000]. Son aşama olarak rezin kolon içerisine dolduruldu [Jianlong et al, 2000].

Sitrik asidin rezinden elüsyonu; Ön işleminden geçirilmiş olan rezin üzerine berrak supernatant ilave edilip 2ml/ hızda dk rezinden akıtıldı [Jianlong et al, 2000]. Rezin üzerine absorbe olan sitrik asit 1 N H₂SO₄ ile elüe edildi [Jianlong et al, 2000]. H₂SO₄ ilave edildikten sonra rezinden 2 ml/dk hızda akıtıldı. Toplanan numunenin konsantrasyonu UV-spektrometre ile ölçüldü [Marier and Boulet, 1958].

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1.Farklı Maya ve Mantarlarla Lipid Üretimi

5.1.1. Elde Edilen Biyokütle ve Lipid Miktarı

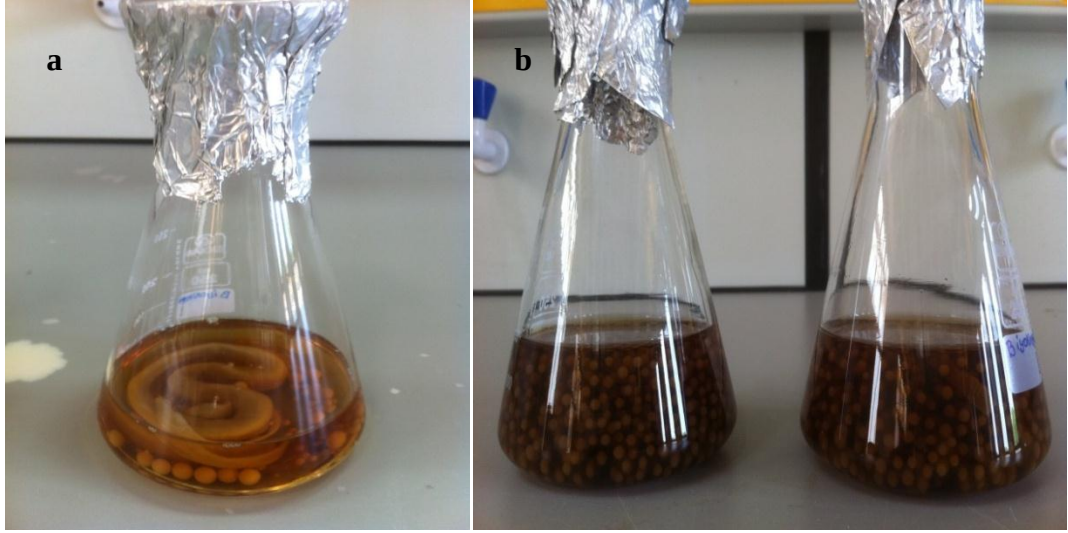
T.elegans mantarı temel olarak içeriği aynı olan farklı besiyerlerinde büyütüldü (Tablo 5.1). Bu besiyerlerinin birbirinden farkı içerdiği melas miktarı ve melasın özelliğidir (Tablo 5.1). Besiyerlerinin bir kısmında yer alan melas ön işlem gördü (Tablo 5.1). Yapılan bu büyütme işlemlerinde kuru hücre miktarına göre elde edilen en iyi verim besiyeri C'de büyütülmüş olan mantardan elde edilmiştir. besiyerinde yer alan melas miktarı 50 g/L'dir. Buna göre başlangıç şeker miktarı 26,3 g/L olarak ölçülmüştür. Elde ettiğimiz lipid verimi kuru hücre başına %38,3 olarak ölçülmüştür (Tablo 5.1).

Besiyerine mantarın mineral tuz ihtiyacını karşılamak amacı ile eser element solusyonu ilave edilmiştir. Aynı miktarda melas içeren D besiyerinden elde edilen verim daha düşük olmuştur. Bu besiyerine mineral tuz ihtiyacın karşılamak amacı ile şilempe ilave edilmiştir. E ve F besiyerlerindeki melas miktarı C ve D besiyerlerine göre 2 katı oranındadır (Tablo 5.1). Yapılan şeker ölçümlerine göre içerdikleri şeker miktarı da 2 katına yakın bir oranda olmasına rağmen verim düşük çıkmıştır. Melas miktarı arttıkça artan şeker miktarı ile birlikte azot miktarı da artmaktadır . Besiyerinde yer alan C/N oranı düştükçe lipidin mantar hücrelerindeki birikimi azalmaktadır [Papanikolaou et al, 2010]. 50 g/l melasın kullanıldığı besiyerinde eser element solusyonunun yer aldığı besiyerinden elde edilen ürün miktarı kuru hücre başına verimi % 38.3 iken şilempenin kullanıldığı besiyerinde bu oran %21,1'e düşmektedir (Tablo 5.1).

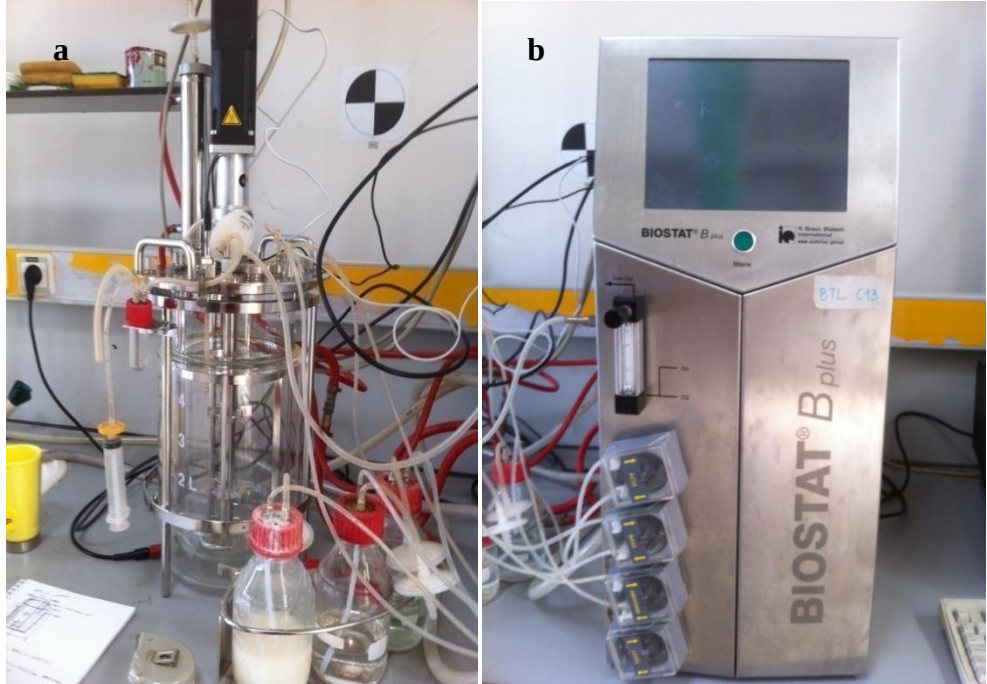
Bizim yaptığımız çalışma neticesinde en yüksek $Y_{L/Sc}$ oranı (%13) 50 g/L melas içeren C besiyerinde ve G besiyerinde üretilen *M.isabellina* mantarından elde edilmiştir (Tablo 5.1 ve 4.1). Kullandığımız şeker miktarı literatürdeki bazı çalışmalara [Papanikolaou et al, 2010] göre düşük kalmaktadır. Karbon kaynağının başlangıç miktarı az olduğu zaman şeker tükenmeye başladığında tek hücre yağları glioksilat döngüsü ile bazı degradasyonlara maruz kalır. ATP: sitrat liyaz enzimi

şekerin depo lipide dönüşümünü sağlayan anahtar enzimdir. İzositrat liyaz enzimi ise trikarboksilik asit ve glioksilat döngü metabolizmasını düzenleyen enzimdir. İzositrat liyaz mikrobiyal hücrelerin C₂ bileşiklerle (etanol, asetat gibi) veya C₂ bileşiklerine (lipidlerin β-oksidasyon metabolik yolu yardımı ile parçalanması gibi) parçalanan substratlarla büyümesine neden olur [Papanikolaou and Aggelis, 2010]. Bu durum lipid miktarının azalmasına neden olur [Holdsworth et al, 1988].

Thamnidium elegans CCF-1465 ile yapılan biyoreaktör çalışmasında elde edilen verim flask çalışmalarına göre düşük olmuştur. Biyoreaktörde elde ettiğimiz biyokütle miktarı 6,335 g/L, lipid miktarı da 0,52 g/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 5. 1: a) *T. elegans* ve b) *A. niger* mikroorganizmalarının küçük ölçekte büyütülmesi



Şekil 5. 2: Maya ve mantarların büyütülmesinde kullanılan fermentör.
a) vessel b) fermentör

Tablo 5. 1:Thamnidium elegans mantarı kullanılarak çeşitli karbon kaynaklarından yüksek verimde üretilen lipidlere ait bir kısım literatür bilgileri

Mikroorganizma	Substrat	Substrat miktarı (g/L)	İnkübasyon Süresi (Saat)	Biyokütle (g/L)	Lipid (g/L)	Verim (%)	Referans
<i>Thamnidium elegans</i> CCF-1465	Gliserol (biyodizel atığı)	30	271 308	6,8 10,1	2,9 5,9	42,6 58,41	[Lall, R., A]
	Gliserol (biyodizel atığı)	90	550	16,3	11,6	71,1	[Lall, R., A]
	Ticari Glukoz	80	350	13,5	9,2	69,5	[Kundu, S., et al]
	Ticari Fruktoz	80	350	12,5	8,8	70,4	[Kundu, S., et al]
	Ticari sukroz	80	350	13,3	9,3	70,0	[Kundu, S., et al]
	Ayçiçeği yağı	15	120	10,37	18,62	55,7	[Max, B.]

Karbon kaynağı olarak melas kullandığımız çalışmalarımız neticesinde besiyeri G'de büyütülen *C.echinulata* ATHUM 4411 suşundan elde ettiğimiz biyokütle miktarı 7,03 gram, lipid miktarı ise 0,5 g/L olarak belirlenmiştir (Tablo 3.1). Mineral kaynağı olarak şilempenin kullanıldığı besiyerinden elde edilen biyokütle miktarı 7,97 g/L, lipid miktarı ise 0,7 g/L olarak ölçülmüştür (Tablo 3.1). *C.echinulata* ATHUM 4411 suşundan elde edilen sonuçlara göre şilempenin yer aldığı besiyerinden elde edilen sonuç eser elemente göre daha iyi verimle sonuçlanmıştır. Şilempe içeren besiyerlerinden H besiyeri dışında diğer besiyerleri distile su ile seyreltilmiş şilempeden 2 ml içerirken H besiyeri 1 ml içermektedir. Toplam azot (binde 3-4) ve toplam fosfor (binde 1-2, P₂O₅) bakımından oldukça fakir olan şilempe potasyum bakımından ise (% 1.0) hayli zengindir, potasyum sülfat şeklinde bulunur. Çok yüksek bir organik kirlilik potansiyeline sahip olan şilempenin tuz içeriği de çok fazladır [Ekmekçi, 1987]. Bu nedenle fazla miktarda şilempenin yer aldığı besiyerlerinde verim düşük olmuştur.

Başlangıç pH değerinin 6,0 olduğu 180 rpm çalkalama hızında ve 28 ° C'de büyütülen mikroorganizmadan elde edilen lipid verimi kuru hücre başına % 44,1 olarak rapor edilmiştir. Çalışmamız esnasında en iyi verim *Mortierella*

*isabellina*şusundan elde edilmiştir, bu mikroorganizma ile elde edilen lipid verimi % 45,14 olarak belirlenmiştir.

Yaptığımız ölçümlerde *Mortierella isabellina* suşunun literatürde belirttiği gibi kısa süre içerisinde şekeri tükettiği gözlenlenmiştir. Bu nedenle besiyeri içerisinde belirli aralıklarla melas ilavesi yapılmıştır. Yapılan bu ilave lipid verimini arttırmıştır.

Bizim elde ettiğimiz sonuçları literatür ile karşılaştırdığımızda *C.echinulata*'dan elde ettiğimiz hücre başına lipid miktarı az iken *M.isabellina* mantarındaki verim literatür ile desteklenmektedir.

Lipid üretiminde kullandığımız suştan elde edilen lipid verimi %2,06 olarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresi 168 saat olarak belirlendi. Kullandığımız melas ön işleme uğradığından içerisinde yer alan şekerler glukoz ve fruktozdur.

Melas karbon kaynağını kullanarak lipid üretmeye çalıştığımız diğer bir mikroorganizma *Y.lipolytica* mayasıdır. Elde ettiğimiz verimlere baktığımızda eser element solusyonunun yer aldığı besiyerindeki biyokütle miktarı 6,63g/L lipid miktarı ise 0,3 g/L iken şilempenin yer aldığı besiyerinde elde edilen biyokütle miktarı 7,95 g/L ve lipid miktarı ise 0,2 g/L olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda *Y.lipolytica* mayası 144 saat inkübe edilmiştir. Bu süre lipid miktarının azalmasında etkili olmuş olabilir.

Literatürden de anlaşıldığı gibi melastan elde edilen kuru hücre miktarı ticari şekerden elde edilenden yüksek olmuştur. buna rağmen kuru hücre başına düşen lipid miktarı ticari şekerden düşük olmuştur. Bu da bize melasın mikroorganizmanın büyümesi için iyi bir kaynak olduğunu göstermektedir. Bu açıdan bizim çalışmamız bu literatür ile de desteklenmektedir. Melas yüksek oranda azot ve mineral madde içermektedir. Melas içerisinde yer alan azotun çok miktarda olması biyokütle artışını olumlu şekilde etkilerken lipid üretiminde sıkıntıya sebep olmaktadır.

Çalışmamız esnasında lipid üretimini gerçekleştirdiğimiz en son mikroorganizma *Pleurotus ostreatus* mantarıdır. Yapılan çalışmada en düşük lipid verimi bu canlıdan elde edilmiştir. Kullanılan melas miktarı ve melastan gelen şeker miktarına göre biyokütlede artış gözlenmesine rağmen lipid miktarında bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir.

Tablo 5. 2:İçeriği farklı çeşitli besiyerlerinde büyütülen *T.elegans*, *Aspergillus niger*, *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella isabellina*, *Pleurotus ostreatus* mantarları ve *Yarrowia lipolytica* mayasına ait lipid verileri

Mikroorganizma	Besiyeri	Melas Miktarı (g/L)	S ₀ (g/L)	S _c (g/L)	İnkübasyon Süresi (Saat)	Biyokütle (g/L)	Y _{X/Sc}	Lipid (g/L)	Y _{L/Sc}	Verim (%)
<i>Thamnidiu m elegans</i> CCF-1465	A	33,08	ND	ND	120	5,53	-	1,00	-	18
	B	33,08	ND	ND	216	3,25	-	0,905	-	27,8
	C	41,35	26,3	23,1	288	7,83	0,34	3	0,13	38,3
	D	41,35	26,8	22,3	288	9,01	0,40	1,90	0,08	21,1
	E	82,7	46,8	41,8	288	12,60	0,30	3,70	0,09	29,4
	F	82,7	43,3	37,3	288	8,80	0,23	2,10	0,05	23,8
	G*	33,08	20,0	15,5	216	6,335	0,41	0,65	0,04	10,3
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 363	B	33,08	ND	ND	168	4,37	-	0,09	-	2,06
<i>C.echinula ta</i> ATHUM 4411	G	33,08	24,8	19,5	264	7,03	0,36	0,5	0,02	7,11
	H	33,08	23,3	19,9	264	7,97	0,40	0,7	0,03	8,78
<i>P.ostreatus</i>	J	26,30	20,1	15,6	408	4,60	0,3	0,1	6,4.10 ⁻³	2,17
	K	52,6	43,1	28,5	408	6,70	0,2	0,1	3,5.10 ⁻³	1,49
<i>Y.lipolytica</i> ACA-DC 50109	I	41,35	32,5	26,0	144	6,63	0,25	0,3	0,01	4,52
	D	1,35	32,2	29,3	144	7,95	0,30	0,2	0,01	2,52

*:Mantar biyoreaktörde büyütüldü, ND: Ölçüm alınmadı.

Tablo 5. 3: G ve H besiyerinde büyütülen *M.isabellina* mantarına ait veriler.

Mikroorganizma	Besiyeri	Melas Miktarı (g/L)	T.Melas Miktarı (g/L)	İnkübasyon Süresi (Saat)
<i>M.isabellina</i> ATHUM 2935	G	33,08	62,25	240
	H	33,08	62,25	240

Tablo 5. 4: G ve H besiyerinde büyütilen *M.isabellina* mantarına ait lipid verileri.

Mikroorganizma	Besiyeri	S ₀ (g/L)	S _T (g/L)	S _c (g/L)	Biyokütle (g/L)	Y _{X/Sc}	Lipid (g/L)	Y _{L/Sc}	Veri m (%)
<i>M.isabellina</i>	G	25,0	41,5	36,0	10,5	0,3	4,74	0,13	45,14
ATHUM 2935	H	24,0	45,5	40,0	12,09	0,3	2,20	0,05	18,20

5.1.2. Lipid Fraksiyonlarının Yağ Asidi Kompozisyonu

Thamnidium elegans türü ile yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen lipid analiz edildiğinde oleik asit miktarının fazla olduğu palmitik asit miktarının da göz ardı edilemeyeceği belirtilmiştir [Meng et al, 2009]. Mikrobiyal lipidin yağ asidi profilinin substrat olarak kullanılan şeker tarafından etkilendiği belirtilmiştir [Vicente et al, 2009]. Sukroz içeren besiyerinde büyütilen mantardan elde edilen lipidin gama linolenik asit miktarı fruktoz ve glukoz içeren besiyerinde büyütilen mikroorganizmadan daha fazla olduğu belirtilmiştir [Papanikolaou et al, 2010]. Grubun çalışma neticesinde elde ettikleri maksimum gama linolenik asit miktarı sukroz şekerinden elde edilmiş olup bu miktarın 510 mg/L (9,3 g/L toplam tek hücre yağ asidinde) olduğu rapor edilmiştir. Buna göre gama linolenik asidin toplam tek hücre yağına oranı % 5,48 olarak belirtilmiştir. Bizim *T.elegans* CCF-1465 suşu ile yaptığımız çalışmada literatürden [Papanikolaou et al, 2010] farklı olarak stearik asit miktarı maksimum düzeyde çıkmıştır (Tablo 5.5). B, D ve F besiyerlerinde inkube edilen *T.elegans* mantarında oleik asit oluşumu gözlemlenmiştir (Tablo 5.5). Bu besiyerlerinden elde edilen gama linolenik asit miktarı da diğer besiyerlerindeki göre fazla miktardadır (Tablo 5.5). Bu duruma zıt olan biyoreaktörde inkübe edilmiş olan *T.elegans* çanlısında gözlemlenmiştir. Biyoreaktörde büyütilen bu canlıdan elde edilen lipidin büyük bir kısmını kaprik, laurik ve gama linolenik asit oluşturmaktadır. Bu canlının farklı besiyerlerinde inkube edilmesi neticesinde elde edilen palmitik asit miktarı da azımsanacak ölçüde değildir. Tamponsuz besiyerinde (Besiyeri A) üretilen mikroorganizmadaki palmitik asitin toplam yağ asidine oranı tamponlu besiyerinde (Besiyeri B) üretilen mantara göre daha düşüktür. Stearik asit miktarı ise besiyeri A'da inkube edilen *T.elegans*'ta daha fazla olmuştur (Tablo 5.5). Besiyeri A'da üretilen gama linolenik asit üretilmediği ya da ölçülemeyecek kadar az miktarda üretildiği gözlemlenirken besiyeri B'de üretilen mantardan elde edilen bu

yağ asidinin oranı % 7,4'e yükselmiştir (Tablo 5.5). Bu besiyerlerindeki oleik asit miktarlarını karşılaştırdığımızda A besiyerinde inkube edilen mantarda oleik asit üretimi ölçülemeyecek miktarda iken besiyeri B'deki mantarda bu yağ asidinin oranı %7'e yükselmiştir. Gama linolenik asit miktarı bakımından değerlendirildiğinde ise oleik Lipid fraksiyonları içerisinde oleik asidin miktarının fazla olmaması bu mantarların sentezlenmiş olan oleik asidi etkili bir şekilde desaturaz edebildiğini ya da bu yağ asidinin yeterince üretilmediğini göstermektedir. Bellou tarafından yapılan çalışma sonucunda oleik asit miktarının fazla miktarda olduğu belirtilmiş ve bu durumun desaturaz aktivitesinin düşük olmasına bağlanmıştır [Bellou et al, 2012]. B besiyerinde inkube edilen *T.elegans* mantarından elde edilen linoleik asit miktarı daha yüksek olmuştur. C, D, E ve F besiyerlerinde inkübe edilen *T.elegans* mantarındaki lipid fraksiyonunu incelediğimiz zaman palmitik asit, palmitoleik asit ve stearik asit miktarının yüksek oleik asit miktarının bu yağ asitlerine göre düşük olduğunu görmekteyiz. Papanikolaou ve ekibi *M.isabellina* suşu ile yaptıkları çalışmada benzer sonuçları almışlardır. Buna göre pektin içeren besiyerinde büyütülen *M.isabellina* suşu farklı lipid profili sergilemiştir. Literatüre göre oleik asit miktarı az iken stearik, miristik ve gama linolenik (GLA) asidin miktarının fazla olduğu belirtilmiştir [Papanikolaou et al, 2007]. *T.elegans* mantarı ile yapılan biyoreaktör çalışmasından elde edilen lipid profili de literatürden farklı bir şekilde olmuştur. Elde edilen verilere göre kaprik, laurik asit ve gama linoleik asit miktarı yüksek düzeyde iken stearik, oleik, palmtik asit miktarları ölçülemeyecek düzeyde gerçekleşmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada *T.elegans* mikroorganizmasının büyütüldüğü besiyerlerinden A besiyeri tampon içermemektedir. İçerisinde mikroorganizmanın büyümesi için gerekli olan fosfat tuzları mevcut değildir. B besiyeri ise büyüme koşullarını barındıran bir besiyeridir. Bu besiyerlerinden elde edilen sonuçlara baktığımızda A besiyerinde büyütülen mikroorganizmadan elde edilen stearik asit miktarı B besiyerinde elde edilen miktarlara göre çoktur (Tablo 5.5). Bu sonuçlarla paralel olarak A besiyerinden elde edilen gama linolenik asit miktarı B besiyerinden elde edilenden daha azdır. İnkübasyon sürelerini karşılaştırdığımızda B besiyerindeki inkübasyon süresi daha uzun olmuştur. A besiyerinde elde edilen palmitik asit miktarı çok az olmuştur (Tablo 5.5). Stearik asit ve gama linolenik asit miktarındaki

değişimlere baktığımızda bizim elde ettiğimiz sonuçlar Bellou ve Nakahara'nın elde ettiği sonuçlarla örtüşmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanmış olduğumuz tüm suşlarda linoleik asit miktarı yok denecek kadar azdır. B, C, D, E, F ve G^{*} besiyerlerinde büyütülen *T.elegans*, H besiyerinde büyütülen *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella isabellina* ve *Yarrowia lipolytica* türü mikroorganizmalarda linoleik asit yok denecek kadar az iken gama linolenik asit (GLA) mevcuttur. Buna göre mucor sp. türünde olduğu gibi bu mikroorganizmalarda da desaturaz aktivitesinin linoleik asit üzerinde yüksek olabileceğini söyleyebiliriz (Tablo 5.5).

Çalışmış olduğumuz çoğu suşlarda linoleik asit miktarı yok denecek kadar az iken gama linolenik asit miktarı mevcuttur (Tablo 5.5). Sadece besiyeri A'da büyütülen *T.elegans*, *Aspergillus niger* ve G besiyerinde büyütülen *C.echinulata* mikroorganizmasında gama linolenik asit üretimi gerçekleşmemiştir (Tablo 5.5). *Aspergillus niger* suşunun büyüme evresini tamamlayamadığı için bu şekilde bir sonuç elde edildiği düşünülmektedir.

C.echinulata mikroorganizması ile yapmış olduğumuz çalışma neticesinde H besiyerinde üretilen mikroorganizmadan %7,4 (w/w) verimle gama linolenik asit (GLA) elde edilmiştir (Tablo 5.5).

Mortierella isabellina mantarından elde edilen en iyi gama linolenik asit verimi % 4,5 olarak belirlenmiştir (Tablo 5.5).

Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre genel olarak palmitik asit ve stearik asit miktarları fazla çıkmıştır.

Bizim *Y.lipolytica* ile gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada en iyi gama linolenik asit (GLA) verimi besiyeri H'dan elde edilmiştir. bu türde stearik asit ve palmitik asit miktarı diğer yağ asitlerine göre yüksek çıkmıştır.

Elde ettiğimiz verilere göre *C.echinulata* mantarında palmitik ve oleik asit miktarı azaldığında, *Y.lipolytica* mayasında oleik ve palmitik asit azaldığında ve *P.ostreatus* sp. suşunda palmitik ve stearik asit miktarı azaldığında gama linolenik asit miktarı artmıştır (Tablo 5.5).

Kavadia ve ekibi tarafından yapılan bir başka çalışmada elde ettikleri sonuçlara göre miseldeki lipid miktarı arttıkça gama linolenik asit konsantrasyonunda azalıştan bahsedilmiştir. Linoleik asit miktarının gama linolenik asit miktarından az olduğu belirtilmiştir. Bahsedilen bu durum *T.elegans* numunelerinde elde edilmiştir. Buna

göre biyoreaktör, besiyeri B, besiyeri D, besiyeri F ve besiyeri C'den elde edilen toplam lipit miktarları (g/L) sırası ile 0,65; 0,90; 1,90; 2,10; ve 3,00 şeklindedir (Tablo 5.5). Elde edilen gama linolenik asit verimi ise sırası ile 41,2; 7,4; 6,0; 4,3 ve 3,7 şeklindedir (Tablo 5.5).

P.ostreatus mantarını büyütmek için kullandığımız karbon kaynağı literatürden farklı bir kaynak olan melastır. Yapılan çalışma neticesinde literatür verilerine ters düşen sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 5.5). Elde edilen verilere göre stearik asit miktarı ve palmitik asit miktarı diğer yağ asitlerine göre yüksek çıkmıştır. Linoleik asit miktarı yok denecek kadar azken literatürden farklı olarak gama linolenik asit üretimi her iki besiyerinde de sağlanmıştır (Tablo 5.5).

Tablo 5. 5:Farklı besiyerlerinde büyütülen maya ve mantarlara ait lipid fraksiyon verileri. Tabloda toplam yağ asitleri içerisindeki fraksiyonların % miktarı belirtilmiştir. C18:3 GLA'nın toplam yağ asidi içerisindeki % miktarını göstermektedir.

Wt-%												
Mikroorganizma	Besiyeri	C10:	C12:	C14:	C15:	C16:	C16:	C17:	C18:	C18:	C18:	γC18:
a	i	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	3
<i>T. elegans</i> CCF-1465	A	-		-	-	2,6	-	-	94,0	-	-	-
	B	-		0,48	0,15	14,5	-	0,85	69,6	7,0	-	7,4
	C	-		-	-	12,4	2,0	2,5	79,3	-	-	3,7
	D	-		-	-	13,2	2,5	2,7	72,9	2,8	-	6,0
	E	-		-	-	10,8	1,2	1,0	82,2	-	-	4,7
	F	-		-	-	12,3	8,4	-	71,6	3,4	-	4,3
	G*	3,6	55,0	-	-	-	-	-	-	-	-	41,2
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 363	B	-	-	-	-	0,73	-	-	99,0	-	-	-
<i>C. echinulata</i> ATHUM 4411	G	0,7	-	0,7		18,57	0,8	0,6	66,4	12,04	-	-
	H	1,1	-	-	-	12,52	1,30	-	72,0	5,6	-	7,4
<i>Mortierella isabellina</i> ATHUM 2935	G	0,1	-	0,7	-	15,33	3,0	0,2	72,7	3,57	-	4,5
	H		-	0,5	-	16,30	3,0	-	74,3	2,30	-	3,60
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50109	D	0,1	-	-	-	19,6	9,0	-	63,8	5,0	-	2,15
	I	-	-	-	-	16,23	9,4	-	67,7	1,1	-	3,6
<i>Pleurotus ostreatus</i> sp.	J	0,7	-	-	-	21,3	2,7	-	68,6	4,0	-	2,8
	K	-	-	-	-	17,0	18,5	-	50,6	6,8	-	7,3

G*: Mantar biyoreaktörde büyütüldü.

5.2. *Yarrowia lipolytica* Mayası ile Sitrik Asit Üretimi

5.2.1. Elde Edilen Sitrik Asit Miktarı

Elimizde mevcut olan *Y.lipolytica* suşu yaklaşık %5 oranında melas içeren besiyeri ortamında 144 saat boyunca inkube edilmiştir. Şilempe içeren besiyerinde eser element solusyonu içeren besiyerine göre az da olsa verim yüksek çıkmıştır (Tablo 5.6). Eser element içeren solusyondan elde edilen biyokütle miktarı 6,63 g/l iken şilempe içeren besiyerinden elde edilen biyokütle miktarı 7,95 g/L olarak belirlenmiştir (Tablo 5.6). Kullanılan şeker miktarına göre elde edilen biyokütle verimi her ikisinde de %25 oranında çıkmıştır (Tablo 5.6). Oluşan sitrik asit miktarına bakıldığında ise şilempe içeren besiyerinden elde edilen ürün miktarı daha yüksek çıkmıştır (Tablo 5.6). Harcanan şeker miktarına göre verim şilempe içeren besiyerinde daha yüksektir (Tablo 5.6).

Tablo 5.6:I ve D besiyerinde büyütülen *Y.lipolytica* mantarına ait sitrik asit verileri.

Mikroorganizma	Besiyeri	Melas Miktarı (g/L)	S ₀ (g/L)	S _c (g/L)	İnkübasyon süresi (Saat)	Biyokütle (g/L)	Y _{X/Sc}	Sitrik Asit (g/L)	Y _{CA/Sc}	Verim (%)
<i>Y.lipolytica</i> ACA-DC 50109	I	50	32,5	26,0	144	6,63	0,25	1,085	0,04	16,36
	D	50	32,2	29,3	144	7,95	0,25	1,371	0,05	17,24

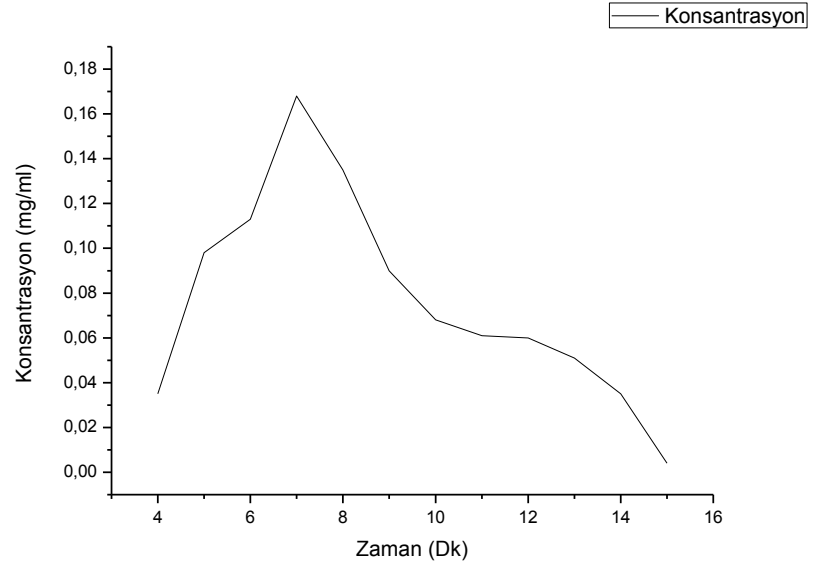
Yaptığımız çalışma neticesinde elde ettiğimiz ürün verimi düşük olmuştur. Melasa uyguladığımız ön işlem yetersiz geldiğinden ya da C/N oranı düşük olduğundan verimin düşük olduğu düşünülmektedir.

5.2.2. Elde Edilen Sitrik Asidin Saflaştırılması

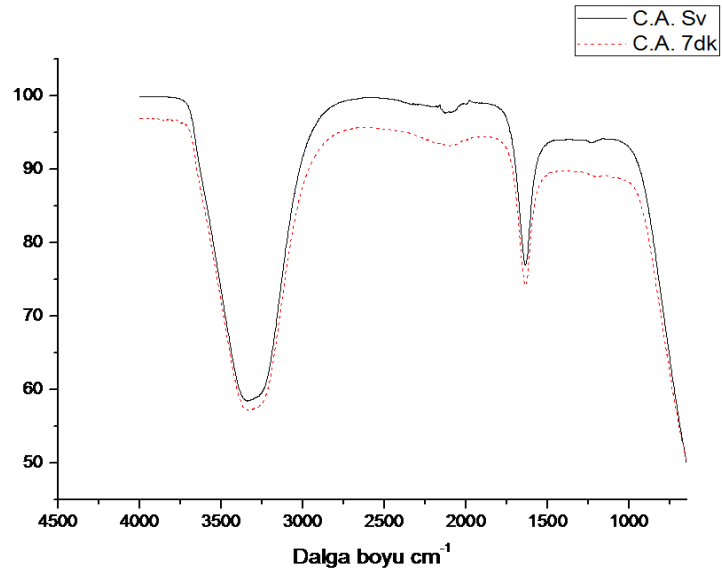
Elde etmiş olduğumuz sitrik asidi kullandığımız anyon rezini (Ambersep 900 OH, Fluka) ile kültür besiyerinden saflaştırdık. Kolonu hazırladıktan sonra ilave etmiş olduğumuz besiyerini 2 ml/dk hızla kolondan akıttık. Topladığımız numunelerde sitrik asit konsantrasyonunu belirledikten sonra saflaştırmanın % 84, 70 oranında olduğunu hesapladık. Kolona uyguladığımız besiyerinin pH değeri 6,00

olarak ölçülmüştür. Sitrik asidin kolona bağlanıp bağlanmadığını anlamak amacı ile kolondan çıkan numuneye pH ölçümü gerçekleştirdik ve bu değerin 12,00 olduğunu belirledik. Kolondan gelen elüsyonları zamana karşı topladık ve en yüksek konsantrasyonun 7.dk'da geldiğini gözlemledik (Şekil 3.3, 3.4). Gelen elüsyonların da pH değerleri ölçüldü. 9.dk'daki elüsyonun pH değeri 2,05 olarak ölçüldü. Katı sitrik asitten hazırlanmış olan sitrik asit standardının (3,0 mg/ml) pH değeri de 2,22 olarak ölçülmüştür.

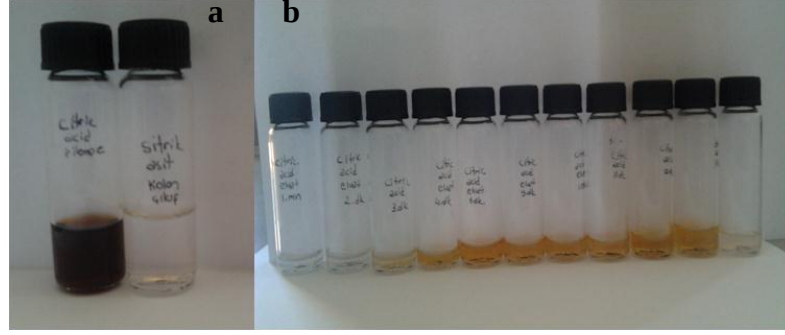
7.dk'da toplamış olduğumuz elüsyona ve hazırlamış olduğumuz sitrik asit standardına IR spektrumu çekildi ve iki spektrumun çakıştığı gözlemlendi (Şekil 3.3). Bu da bize kolondan gelen numunenin sitrik asit olduğunu göstermektedir.



Şekil 5. 3: Anyon değıştirici rezin kullanılarak sitrik asidin saflaştırılması



Şekil 5. 4: Sitrik asit sıvı standart (1 mg/ml) ve 7.dk'da toplanmış numuneye ait IR spektrumu; C.A Sv: Sitrik asit sıvı standart (1 mg/ml), C.A 7 dk: Sitrik asit numunesinin 7.dk eluatı



Şekil 5. 5: Sitrik asit saflaştırılması; a) Soldaki şişe kolona verilmeden önceki numune görüntüsü, sağdaki şişe kolondan çıkan numuneye ait görüntü, b) Sırası ile 1.dk, 2.dk, 3.dk, 4.dk, 7.dk, 9.dk, 11.dk, 13.dk, 15.dk, 17.dk, 24.dk’da reçineden elüe edilen numune görüntüler

KAYNAKLAR

- A. M. D., (2000), "Docosahexaenoic Acid, a Ligand for the Retinoid X Receptor in Mouse Brain. " Science. 294.
- Abdel-Sater M., El-Said A., (2001), "Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes". Intern. Biodeter. & Biodegr, 15-21
- Acuna-Arguelles M., Gutierrez-Rojas M., Viniengra-Gonzalez G., Favela-Torres E., (1994), "Effect of Water Activity on Exo-Pectinase Production by *Aspergillus niger* CH4 on Solid State Fermentation" Biotechnol. Lett, 23–28.
- Aggelis (2002), "Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel". Applied Microbiology and Biotechnology, 58(3), 303-307.
- Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G., Tsagou V., Papanikolaou S., (2003), "Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process". Water Res, 37, 3897-3904.
- Ahmed S. U., (2006), "Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation". Food Technol Biotechnol, 44, 283-287.
- Ahmed S. U., (2008), "Fatty acid profiling during microbial lipid production under varying pO₂ and impeller tip speeds". Applied Biochemistry and Biotechnology, 151(2-3), 599-609.
- Alkorta I., Garbis, C., Llama, J. M., Serra, J.L., (1998), "Industrial applications of pectic enzymes: a review". Process Biochem, 33, 21-28.
- Al-Wandawi H., Abdul-Rahman M., Al-Shaikly K., (1985), "Tomato processing wastes as essential raw materials source". J. Agric. Food Chem., 33, 804-807.
- Anastassiadis S., Rehm H. J., (2005), "Continuous Citric Acid Secretion by a High Specific pH Dependent Active Transport System in Yeast *Candida oleophila* ATCC 20177". Electron J. Biotechnol, 8, 146-161.
- Anastassiadis S.A., Aivasidis A.A., Wandrey C.W., (2002), "Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation". Applied Microbiology and Biotechnology, 60(1), 81-87.
- André A., (2009), "Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains". Engineering in Life Sciences, 9(6), 468-478.
- Andre A., Diamantopoulou P., Philippoussis A., Sarris D., Komaitis M., Papanikolaou S., (2010), "Biotechnological Conversions of Bio-diesel Derived Waste Glycerol into Added Value Compound by Higher Fungi: Production of Biomass, Single Cell Oil and Oxalic Acid". Ind. Crops. Prod, 31, 407-416.

Angerbauer C., (2008), "Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production". *Bioresource Technology*, 99(8), 3051-3056.

Angumeenal A.R., Venkappayya D., (2005), "Effect of Transition Metal ions on the Metabolism of *Aspergillus niger* in the Production of Citric Acid with Molasses as Substrate". *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64, 125-128.

Antier P., Miniñares A., Roussos S., Viningra-Gonzalez G., (1993), "New approach for selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation". *Biotechnol. Lett.*, 11, 429-440.

Azeem A., Neelagund Y.F., Rathod V., (1999), "Biotechnological Production of Oil: Fatty Acid Composition of Microbial Oil". *Plant Foods Hum. Nutr.*, 53, 381-386.

Baby E.A., Saad M., (1996), "Production of Citric Acid by a Heavy Metal Adapted *Aspergillus niger* NRRL 595". *African Journal of Mycology and Biotechnology*, 4, 59-69.

Belch J.J.F., Muir A., (1998), "n-6 and n-3 Essential Fatty Acids in Rheumatoid Arthritis and Other Rheumatic Conditions". *Proceedings of the Nutrition Society*, 57, 563-569.

Bellou S., (2012), "Lipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids Synthesized by *Zygomycetes* Grown on Glycerol". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(1), 146-158.

Berovic M., Cimerman A., (1979), "Foaming in Submerged Citric Acid Fermentation on Beet Molasses". *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 313-319.

Carvalho P.O., Oliveira J.G., Pastore G. M., (1999), "Enhancement of Gamma-Linolenic Acid Production by the Fungus *Mucor* sp. LB-54 by Growth Temperature". *Revista de Microbiologia*, 30, 170-175.

Certik M., Balteszova L., Sajbidor J., (1997), "Lipid Formation and gamma-linolenic Acid Production by *Mucorales* Fungi Grown on Sunflower Oil". *Letters in Applied Microbiology*, 25, 101-105.

Čertík M., Berhan S.S., Šajbidor J., (1993), "Lipid production and fatty acid composition of selected strains belonging to *Mucorales*". *Acta Biotechnologica*, 13(2) 193-196.

Certik M., Shimizu S., (1999), "Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1-14.

Chatzifragkou A., (2010), "Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 1048-1057.

Chatzifragkou A., (2011), "Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species". *Energy*, 36(2), 1097-1108.

Chaudhary K., Ethiraj S., Lakshminarayana K., Tauro P., (1978), "Citric Acid Production from Indian Cane Molasses by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Conditions". J. Ferment. Technol, 56, 554-557.

Chen H. C., Chang C.C., (1996), "Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840". Biotechnology Progress, 12(3), 338-341.

Chen H. C., Liu T. M., (1997), "Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840". Enzyme and Microbial Technology, 21(2), 137-142.

Clark D. S., Lentz C. P., (1963), "Submerged citric acid fermentation of beet molasses in tank-type fermenters". Biotechnology and Bioengineering, 5(3), 193-199.

Crolla A., Kennedy K. J., (2004), "Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. Journal of Biotechnology", 110(1), 73-84.

De Gregorio A., Mandalari G., Arena N., Nucita F., Tripodo M. M., Lo Curto R. B., (2002), "SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps". Biores. Technol, 83, 89-94.

Dekker M., (2004), "Handbook of Fungal Biotechnology". Newyork: Madison avenue.

Dimou D.M., (2002), "Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation". Mycological Research, 106(8), 925-929.

Doulger W.P., Prescott S.C., (1939), "Citric Acid Fermentation", Ind. Eng. Chem. 26, 1142-1149.

Dyal S.D., Narine S. S., (2005), "Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids". Food Research International, 38(4), 445-467.

Edwinoliver N.G., (2009), "Corn Steep Liquor as a Nutrition Adjunct for the Production of *Aspergillus niger* Lipase and Hydrolysis of Oils Thereof". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(22), 10658-10663.

Ekmekçi S., (1987), "Mikrobiyal Yöntemler ile Beta karoten Üretimi ve Verimliliğin Artırılması", İzmir.

El-Bestawy E., Abou El-KHeir E., Abd El-Fatah H. I., Hassouna M.S., (1998), "Enhancement of bacterial efficiency for metal removal using mutation techniques". World J. Microbiol. Biotechnol, 14, 853-856.

El-Fadaly H., El-Naggar N., Marwan E., (2009), "Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium". Research Journal of Microbiology, 4(8), 301-313.

El-Hussein A. A., Tawfig S. A. M., Mohammed S. G., El Siddig M. A. and Mohammed M. S., (2009), "Citric Acid Production from Kenana Cane Molasses by *Aspergillus niger* in Submerged Fermentation". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 7(2), 51-57.

Ellaiah P., (2004), "Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*". *Process biochemistry*, 39(5), 525-528.

Fakas S. (2006), "Biotechnological valorization of the by-products of the tomato industry: production and study of the bioactive lipids of the *Zygomycetes Cunninghamella echinulata*. PhD Thesis in preparation". Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece.

Fakas S., Bellou S., Makri A., Aggelis G., (2009b), "Single cell oil and gamma-linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol". In: Aggelis, G. (Ed.), *Microbial conversions of raw glycerol*. Nova Science Publishers Inc., New York, 85-99.

Fakas S., Bellou S., Makri A., Aggelis G., (2009), "Microbial conversion of raw glycerol, ed. I.G.A. (Ed) ". Hauppauge: Nova Science Publishers Inc.

Fakas S., (2006), "Lipids of *Cunninghamella echinulata*; with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 676-683.

Fakas S., (2007), "Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*". *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1321-1327.

Fakas S., (2009), "Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*". *Biomass and Bioenergy*, 33(4), 573-580.

Fakas S., (2009), "Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation". *Bioresource Technology*, 100(23), 6118-6120.

Fakas S., (2010), "Characterization of olive fruit microflora and its effect on olive oil volatile compounds biogenesis". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 1024-1032.

Fakas S., Makri, A., Mavromati, M., Tselepi, M., Aggelis, G., (2009a), "Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation". *Bioresour. Technol*, 100, 6118-6120.

Fan Y. Y., Chapkin R. S., (1998), "Importance of Dietary γ -Linolenic Acid in Human Health and Nutrition". *Journal of Nutrition*, 128, 1411-1414.

Ferreira T. F., (2009), "Emprego de *Yarrowia lipolytica* na degradação de óleo cru". Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro.

Fiestas Ros De Ursinos J. A., (1981). "Differentes utilisations des margines". In Proceedings of Seminaire International sur la Valorisation des Sous-produits de l'Olivier, Monastir, Tunisie, F.A.O. ed, 93-110.

Folch J. L. M., Sloane-Stanley G. , (1957), "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". J Biol Chem, 199, 833–841.

Funtikova N. S., Konova I. V., (1999a), "Utilization of Fat from Wastewater and Synthesis of Gamma Linolenic Acid by Fungi of the Genus Mucor". Prikl Biokhim Mikrobiol, 35(3), 345–348.

Funtikova N. S., Poglazova M. N., (1999b), "Morphogenesis and Lipid Composition of Mucor Fungi Grown in the Presence of Chloroanilines in Submerged Culture". Mikrobiologiya, 68(4), 467–472.

Galanina L. A. B., Pavlova T. A.; Tsvetkova E. V., (1988), "Utilization of Individual Monosaccharides from Their Mixtures by the Microscopic Fungus Cunninghamella japonica and Its Effect on Lipid Synthesis". Mikrobiologiya, 57, 213-217.

Glazer A., Nikaido H., (2007), "Microbial biotechnology". Cambridge: Cambridge University press.

Gunstone F. D., (1992), "Gamma Linolenic Acid Occurrence and Physical Chemical Properties". Prog. Lip. Res, 31, 145-161.

Gunstone F. D., Harwood J. H., Padley F. B., (1994), "The Lipid Handbook". Chapman & Hall.

Gutierrez N. A., (1993), "Repression of galactose utilization by glucose in the citrate-producing yeast <i>Candida guilliermondii</i>". Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 11(3), 143-146.

Hamisa F. A., Radwan A., (1977), "Production of Citric Acid from Cane Molasses on a Semi Pilot Scale". J. Gen. Appl. Microbiol, 23, 325-329.

Hansson L., Dostálek M. (1988), "Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus <i>Mortierella ramanniana</i>". Applied Microbiology and Biotechnology, 28(3), 240-246.

Haq I. U., (2002), "Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media". Process biochemistry, 37(10), 1085-1090.

Hiruta O., (1997), "Application of Maxblend Fermentor® for microbial processes". Journal of Fermentation and Bioengineering, 83(1), 79-86.

HNAA A., (1994), "Production of fats and lipids by yeast utilizing whey". Egyptian J Microbiol, 29(1), 73–80.

Holdsworth J. E., Veenhuis M., Ratledge C. (1988), "Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous or endogenous lipids". Journal of general microbiology, 134(11), 2907-2915.

Horrobin D., Manku M. (1983), "How do polyunsaturated fatty acids lower plasma cholesterol levels? *Lipids*", 18(8), 558-562.

Horrobin H., "Polyunsaturated Fatty Acids", England: Cambridge University Press.

Horrobin D. F., Huang Y. S. (1987), "The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease". *International Journal of Cardiology*, 17(3), 241-255.

Hossain M., Brooks J. D., (1983), "Production of Citric Acid from Whey Permeate by Fermentation using *Aspergillus niger*". *N.Z. J. Dairy Sci. Tech*, 18, 161–168.

Ikram-ul H., (2004), "Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses". *Bioresource Technology*, 93(2), 125-130.

Ikram-ul-Haq I.-u.-H., (2001), "Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 35-37.

Ilczuk Z., (1983), "Attempts at improving citric fermentation on molasses solutions". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 69-72.

Imandi S. B., (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.

Jianlong W., (2000), "Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using n-dodecane as an oxygen-vector". *Process biochemistry*, 35(10), 1079-1083.

Jianlong W., Xianghua W., Ding Z. (2000), "Production of citric acid from molasses integrated with in-situ product separation by ion-exchange resin adsorption". *Bioresource Technology*, 75(3), 231-234.

Johnson M. V., (1949), "The citric acid fermentation In: *Industrial Microbiology*", ed. S. S Prescott, C.G. Dunn, eds. New York: New York: McGraw-Hill.

Kadowaki M. K., Souza C. G. M., Simao R. C. G., Peralta R. M., (1997), "Applied Biochemistry and Biotechnology", 66, 97-106.

Kamzolova S. V. F., Morgunov I. G., (2008), "Microbiological Production of Citric and Isocitric Acids from Sunflower Oil". *Food technol. Biotechnol*, 46, 51-59.

Kamzolova S. V., (2003), "Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*". *FEMS Yeast Research*, 3(2), 217-222.

Kamzolova S. 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., Yuspova A.I., Dedyukhina E. G., Chistyakova T. I., Kozyreva T. M., Morgunov I. G., (2009), "Succinic acid synthesis by ethanol-grown yeasts". *Food technol. Biotechnol*, 47, 144-152.

Kamzolova S., (2007), "Characteristics of the growth on rapeseed oil and synthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* yeasts". Microbiology, 76(1), 20-24.

Kapoor K. K., Chaudhary K., Tauro P., (1983), "Citric acid. In: Prescott and Dunn's Industrial Microbiology,, ed. G. Reed, ed". UK: MacMillan Publishers Ltd.

Karaalp T., (2007), "Bakteriyel Selüloz Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Değerlendirilmesi Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji". İstanbul Teknik Üniversitesi: İstanbul.

Kavadia A., (2001), "Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of *Zygomycetes* growing on glucose". Journal of the American Oil Chemists' Society, 78(4), 341-346.

Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M., (1998), "Medizinische Microbiologie". Stuttgart: Georg Thieme Verlag Rüdigerstabe 14.

Kendrick A., Ratledge C., (1992), "Lipid formation in the oleaginous mould *Entomophthora exitalis* grown in continuous culture: effects of growth rate, temperature and dissolved oxygen tension on polyunsaturated fatty acids". Applied Microbiology and Biotechnology, 37(1), 18-22.

Kenny F. S., (2000), "Gamma linolenic acid with tamoxifen as primary therapy in breast cancer". International Journal of Cancer, 85(5), 643-648.

Khosravi-Darani K., Zoghi A., (2008), "Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: Experimental design for citric acid production". Bioresource Technology, 99(15), 6986-6993.

Koritala S., Hesseltine C. W., Pryde E. H., Mounts T. L., J. (1987), Am. Oil Chem. Soc, 64, 509–513.

Kundu S., (1984), "Pretreatment of indian cane molasses for increased production of citric acid". Biotechnology and Bioengineering, 26(9), 1114-1121.

Lall R., Proctor A., Jain V. (2009), "A Rapid, Micro FAME Preparation Method for Vegetable Oil Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography". Journal of the American Oil Chemists' Society, 86(4), 309-314.

Lancini G., (2008), "Parte I – L'uso Industriale dei Microrganismi. Storia e Campi di Applicazione". Biotecnologie Microbiche, ed. S.M. In: Donadio, G. (eds.). Milan: Casa Editrice Ambrosiana. 5-35.

Levinson W. E., Kurtzman C. P., 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.

Li N., Zong M. H., (2010), "Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications". Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66(1–2) 43-54.

Liu J., (2012), "Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*". *Bioresource Technology*. 107(0): p. 393-398.

Lopez-Garcia R., (2002), "Citric Acid". In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.

Lotfy W. A., Ghanem K. M., El-Helow E.R., (2007), "Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies". *Bioresource Technology*, 98(18), 3464-3469.

Lubertozzi D., Keasling J. D., (2009), *Biotechnol Adv*, 27, 53-75. AP-GR-01
Güncelleme Tarihi 15/8/2011

Madigan M. T., Martinko J. M., (2010), "Biology of Microorganisms", Pearson Education, Inc. Publishing as prentice Hall.

Mahadik N. D., (2004), "Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation". *Process biochemistry*, 39(12), 2031-2034.

Maier R. M., Pepper J. I., Gerba C. P., (2002), *Enviromental Microbiology*.

Makri A., Fakas S., Aggelis G., (2010), *Bioresource Technology*, 101, 2351-2358.

Mallouchos A., Reppa P., Aggelis G., Kanelaki M., Koutinas A. and Komaitis M., (2002), "Grape skins as a natural support for yeast immobilization". *Biotechnol. Lett*, 24, 1331-1336.

Marier J. R., Boulet M., (1958), "Direct Determination of Citric Acid in Milk with an Improved Pyridine-Acetic Anhydride Method". *Journal of Dairy Science*, 41(12), 1683-1692.

Max B., Salgado M. J., Rodriguez N., Cortes S., Converti A., Dominguez J. M., (2010), "Biotechnological Production of Citric Acid", *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 862-875.

Meng X., (2009), "Biodiesel production from oleaginous microorganisms". *Renewable Energy*, 34(1), 1-5.

Meyer V., (2008), *Biotechnol Adv*, 26, 177-185.

Miller G. L., (1959), "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Milsom P. E., (1987), "Organic Acids by Fermentation, Especially Citric Acid". In: *Food Biotechnology*, ed. R.D. King, P.S.J. Cheetham, eds. London: Elsevier Applied Science.

Moeller L., (2007), "Optimization of Citric Acid Production from Glucose by *Yarrowia lipolytica*". *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 504-511.

- Moreira F. G., Lenartovicz V., Souza C. G. M., Ramos E. P., Peralta R. M., (2001), *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 15-19.
- Moresi M., (1994), "Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica*". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 60(4), 387-395.
- Moreton R. S., (1988), "Single cell oil". Harlow: Longman Scientific & Technical.
- Moubasher M. H., Mostafa M. E., (1994), *Cryptogamie Mycologie*, 15(3), 175-186.
- Nakahara T., Yokochi T., Kamisaka Y., & Suzuki O., (1992), "Industrial Applications of Single Cell Oils". Champaign: American Oil Chemists Society Press.
- Ohnishi K., Yoshida Y., Sekiguchi J. (1994), "Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*", 77(5), 490-495.
- Panda T., Bisaria V. S., Ghose T. K., (1987), *Biotechnol Bioeng*, 30(7), 868-74.
- Panda, T., (1989), *Process Biochemistry*, 24(3), 104-108
- Pandit P., (2011), *International journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(3), B-242-B-249
- Papanikolaou S., Aggelis G., (2003), "Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3 propanediol by *Clostridium butyricum*". *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 78, 542-547.
- Papanikolaou S., Aggelis G., (2003), "Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(11), 651-655.
- Papanikolaou S., Aggelis G., (2009), "Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*". *Lipid Technol*, 21, 83-87.
- Papanikolaou S., Aggelis G., (2009), "Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*". *Lipid Technol*, 21, 83-87.
- Papanikolaou S., Aggelis G., (2010), "*Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), 639-654.
- Papanikolaou S., (2007), "Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica* ".
- Papanikolaou S., (2001), "Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats". *Antonie van Leeuwenhoek*, 80(3), 215-224.

Papanikolaou S., (2002), “*Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol”. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 737-744.

Papanikolaou S., (2004), “Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media”. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 867-875.

Papanikolaou S., (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., (2007), “Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources”. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(11), 1060-1070.

Papanikolaou S., (2008), “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., (2008), “Effect of Citrus essential oil addition upon growth and cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* yeast”. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(11), 997-1006.

Papanikolaou S., (2010), “Suitability of Low-Cost Sugars as Substrates for Lipid Production by the Fungus *Thamnidium elegans*”. *Energy & Fuels*, 24(7), 4078-4086.

Papanikolaou S., (2011), “Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains”. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1138-1150.

Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis G., (2008), “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 & Bioenergy*, 32, 60-71.

Papanikolaou S., M. Komaitis, G. Aggelis, (2004), “Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media”. *Bioresource Technology*, 95(3), 287-291.

Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I., (2002), “*Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol”. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 737-745.

Perlman D., Sih C.J., (1960), “Fungal Synthesis of Citric, Fumaric and Itoconic Acids In: *Progress in Industrial Microbiology*”. Vol. 2. Newyork: New York: Interscience Publishers.

Rane K. D., 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.

Ratlledge C., (1993), "Single cell oils — have they a biotechnological future? " Trends in Biotechnology, 11(7), 278-284.

Reddy D. R., Prasad V. S. S. V., Das U. N., (1998), "Intratumoural injection of gamma linolenic acid in malignant gliomas". Journal of Clinical Neuroscience, 5(1), 36-39.

Riou C., Freyssinet G., Feure M., (1992) "Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*". Appl. Environ. Microbiol, 58 578:583.

Rybicki E. P., (1990), S Aft J Sci, 86, 182-186.

Rymowicz W., (2006), "Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*". Chemical Papers, 60(5), 391-394.

Rymowicz W., Rywinska A., Gładkowski W., (2008), "Simultaneous Production of Citric Acid and Erythritol from Crude Glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratistavia K1". Chemical Papers, 62(3), 239-246.

Rywinska A., Rymowicz W., (2009), "Citric Acid Production from Raw Glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratistavia 1.31", ed. E. In G. Aggelis. New York: Nova Science Publishers Inc.

Rywinska A., Rymowicz W., Arowska B., Wojtatowicz M., (2009), "Biosynthesis of Citric Acid from Glycerol by Acetate Autants of *Yarrowia lipolytica* in Fed-batch Fermentation". Food Technol. Biotechnol. Adv, 47, 1-6.

Shin Y. C. S., (1988), "Screening of γ -linolenic Acid Producing Fungi". Kor. J. Food Sci. Tecnol, 20, 724-731.

Simao R. C. G., Souza C. G. M., Peralta R. M., (1997), Canadian Journal of Microbiology, 43(1), 56-60.

Smith J. E., Nowakowska-Waszcuk, A., Anderdson, J.G., (1974), "Organic Acid Production by Mycelial Fungi". Ind. Aspects Biochem, 297–317.

Sodeck G., Modl J., Kominek J., Salzburn W., (1981), "Production of Citric Acid According to the Submerged Fermentation Process". Process. Biochem, 9-11.

Stredansky M., (2000), " γ -Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace". Bioresource Technology, 73(1), 41-45.

Tsioulpas A., Dimou D., Ikonomou D., Aggelis, G., (2002), "Phenolic removal in olive oil mill waste-water by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity". Bioresour. Technol, 84, 251-257.

Vamvakaki A. N., (2010), "Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by *Zygomycetes*". Engineering in Life Sciences, 10(4), 348-360.

Vandenberghe L. P. S., Soccol C. R., Pandey, A., Lebault, J.M., (2000), "Solid State Fermentation for the Sythesis of Citric Acid by *Aspergillus niger*". *Biores. Technol*, 74, 175-178.

Vicente G., (2009), "Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus". *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), 22-27.

Vicente G., (2010), "Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel". *Energy & Fuels*, 24(5), 3173-3178.

Ward O. P., Singh A., (2005), "Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production". *Process biochemistry*, 40(12), 3627-3652.

Weete J. D., (1980), "Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms". New York: Plenum Press.

Wojtatowicz M., Rymowicz W., 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.

Wolski E., (2009), "Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental design". *Letters in Applied Microbiology*, 49(1), 60-66.c

Wynn J. P., Bin Abdul Hamid A., Ratledge C., (1999), "The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi". *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 8), 1911-1917.

Yadav R., (1998), "Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species". *Folia Microbiologica*, 43(4), 373-378.

Yakıcıer C., (2009), "Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Alanındaki Gelişmeler ve Modern Tıp Alanına Etkileri", Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü.

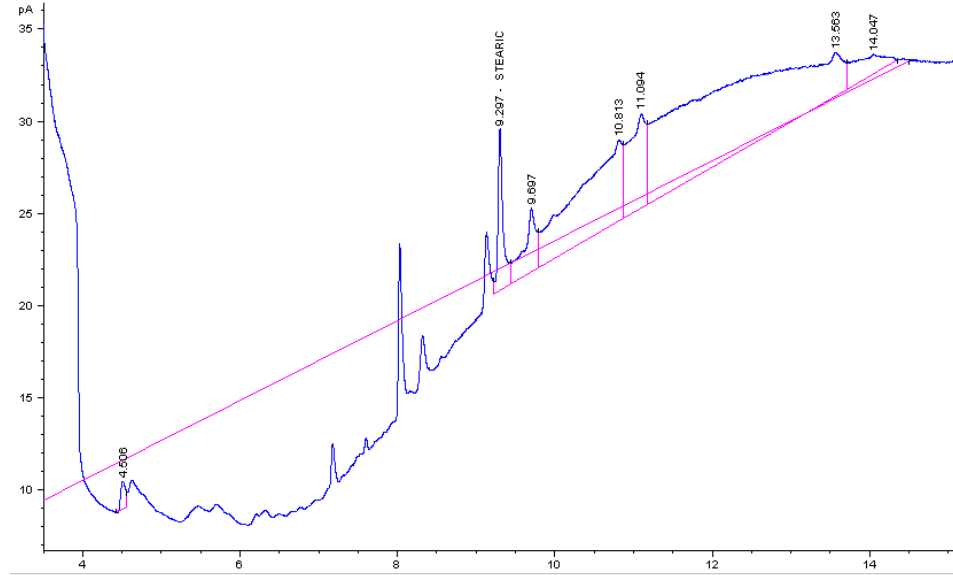
Zhao C. H., (2010), "Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials". *Metabolic Engineering*, 12(6), 510-517.

ÖZGEÇMİŞ

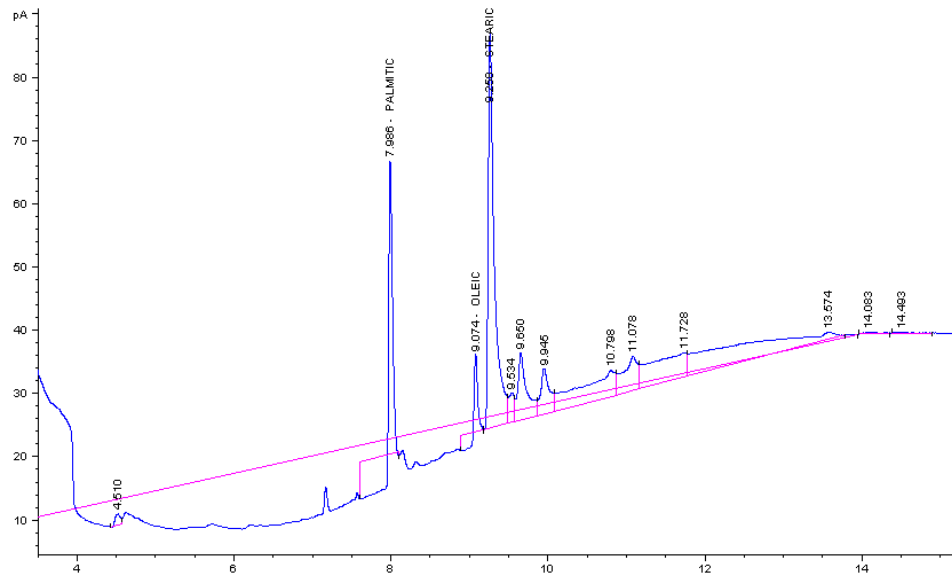
Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’den 2009 yılında mezun olarak 2010 yılında Gebze Yüksek Teknolojisi Enstitüsü’nde Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı. Bu süre içerisinde ‘‘Yüksek Katma Değerli Ürünler Elde Etmek İçin Biyoatıkların Biyoteknolojik Arıtımı’’ adlı Tübitak projesinde yer alarak aynı konu üzerinde tez çalışmalarını tamamladı.

EKLER

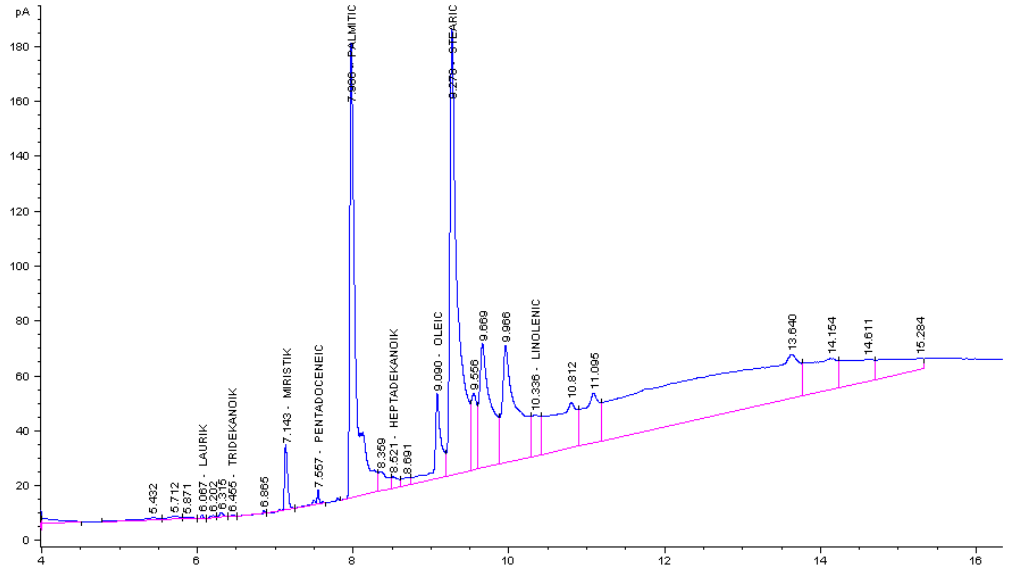
Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Analiz Sonuçları



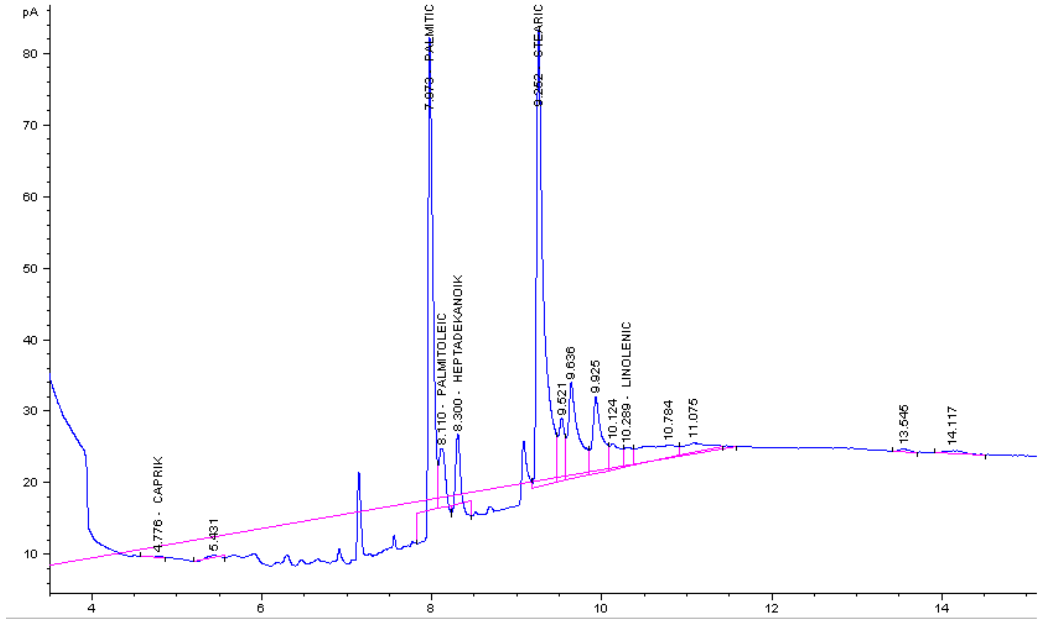
Ek A1: *A.niger* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



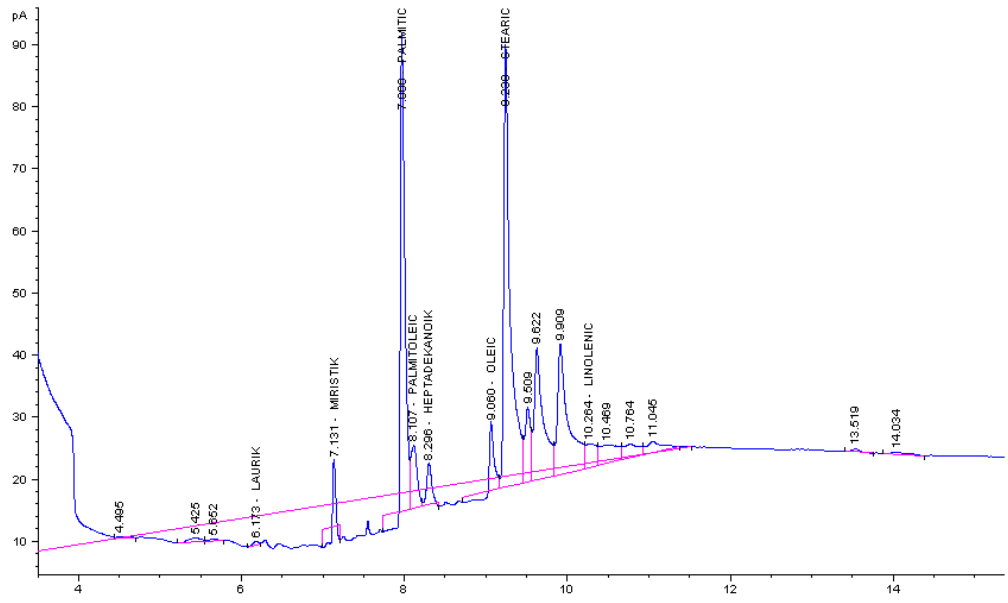
Ek A2: A besiyerinde büyütülen *T.elegans* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



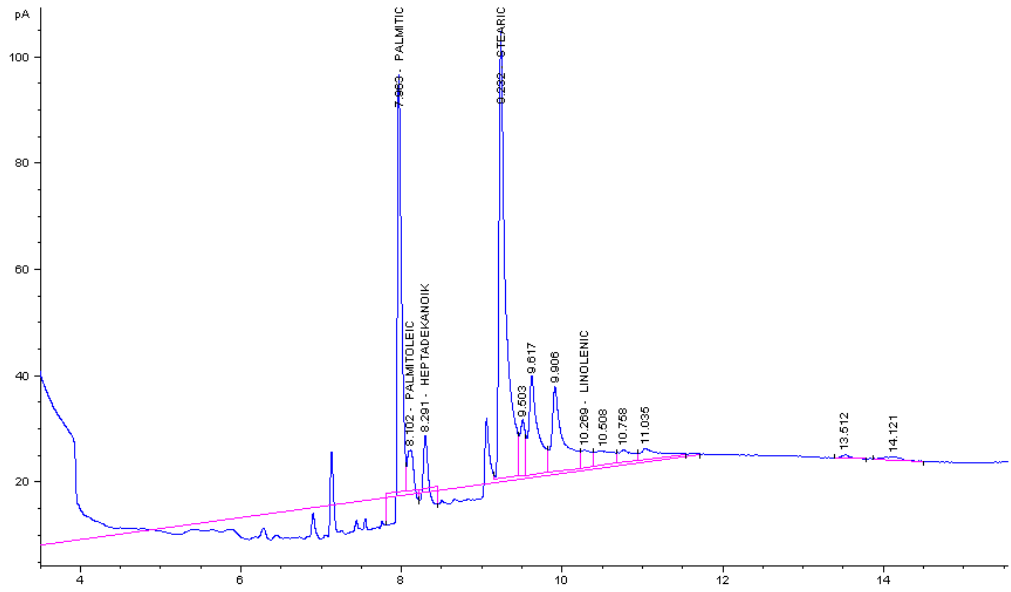
Ek A3: B besiyerinde büyütülen *T.elegans* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



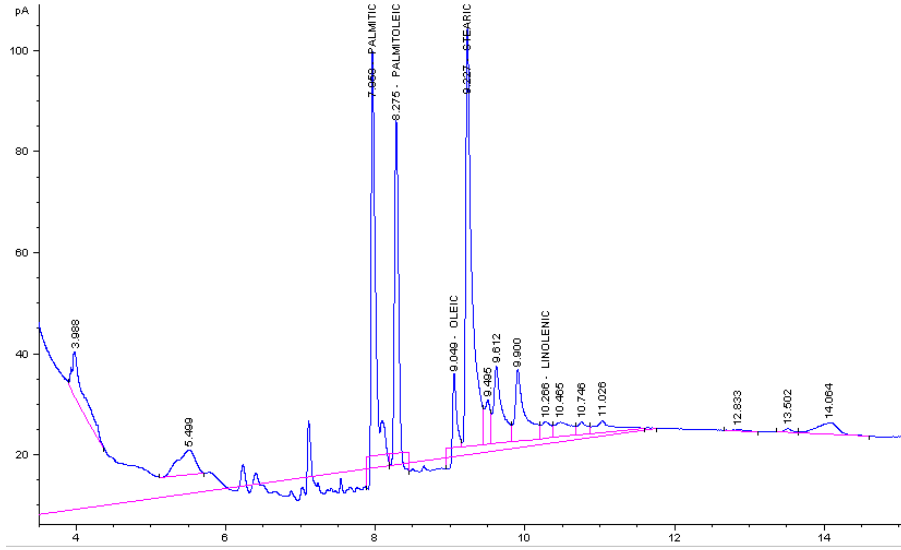
Ek A4: C besiyerinde büyütülen *T.elegans* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



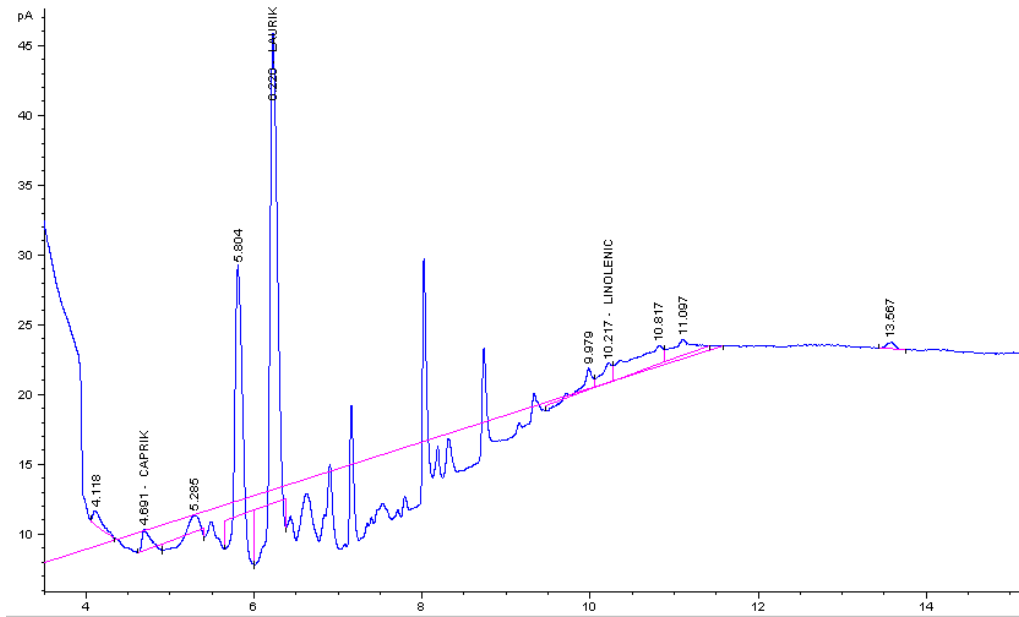
Ek A5: D besiyerinde büyütülen *T.elegans* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



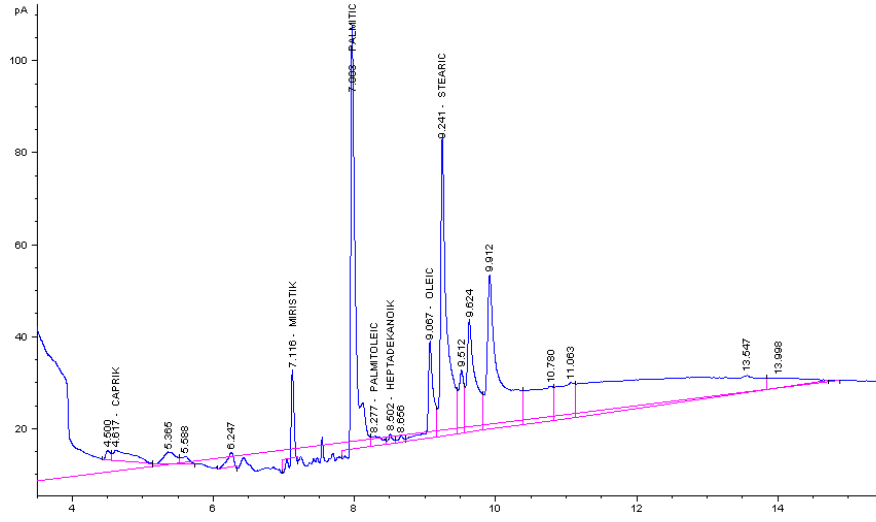
Ek A6: E besiyerinde büyütülen *T.elegans* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



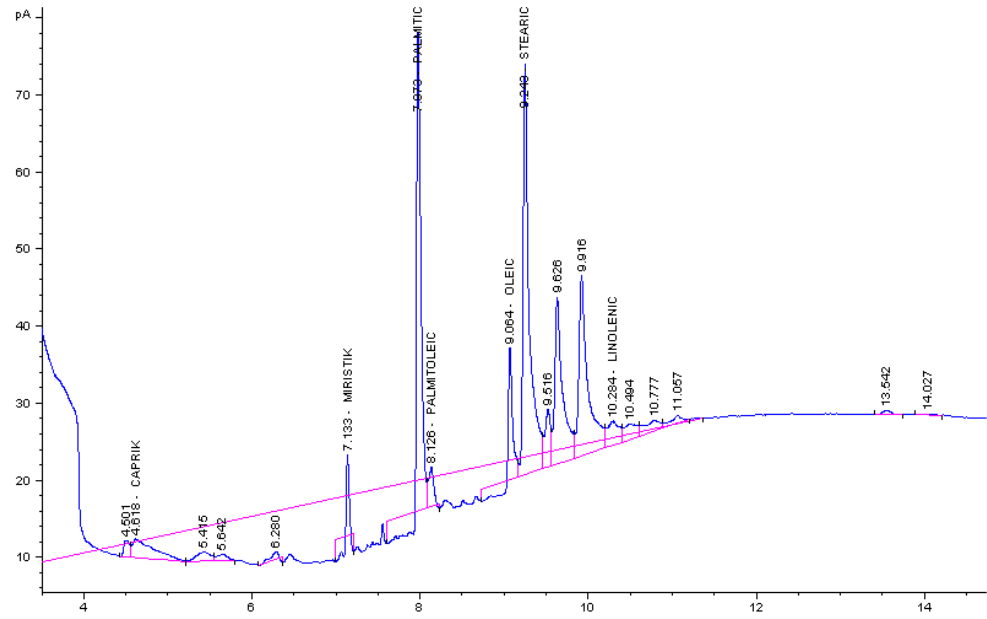
Ek A7: F besiyerinde büyütülen *T. elegans* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



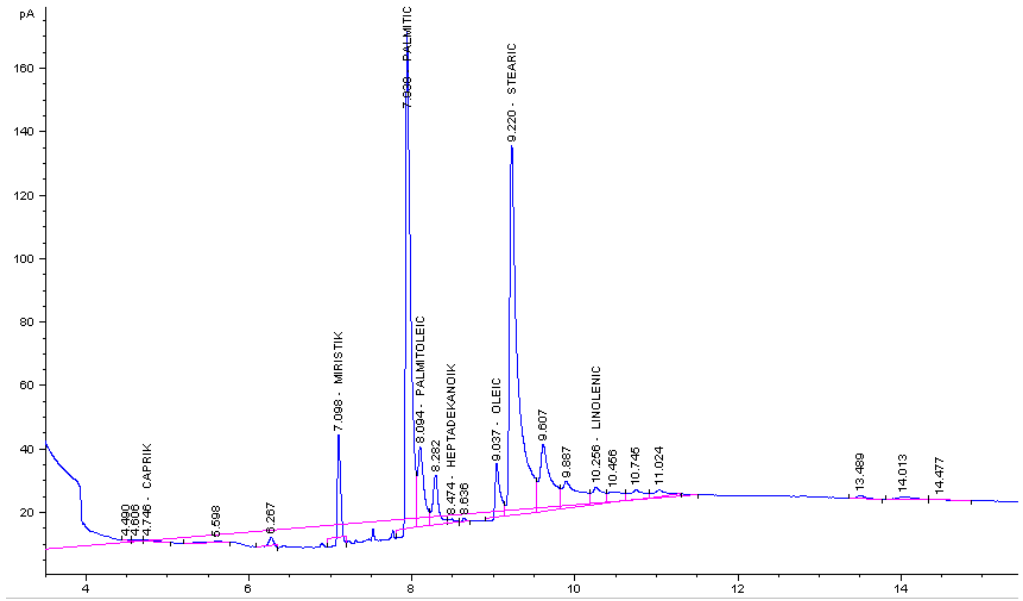
Ek A8: Biyoreaktörde büyütülen *T. elegans* mantarının lipid ürününe ait gaz kromatogramı



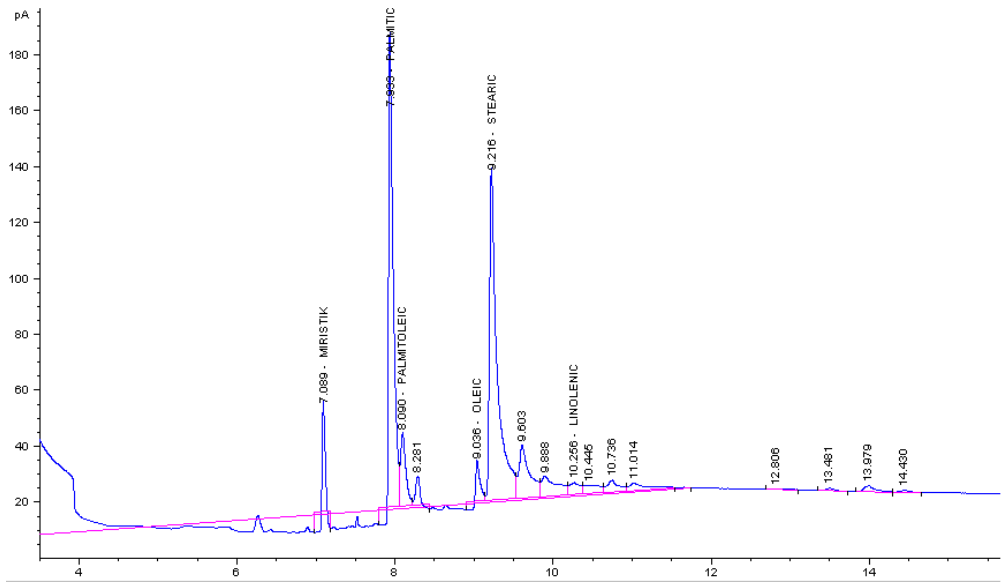
Ek A9: Besiyeri G’de büyütülen *C.echinulata* mantarının lipid ürününe ait kromatogram



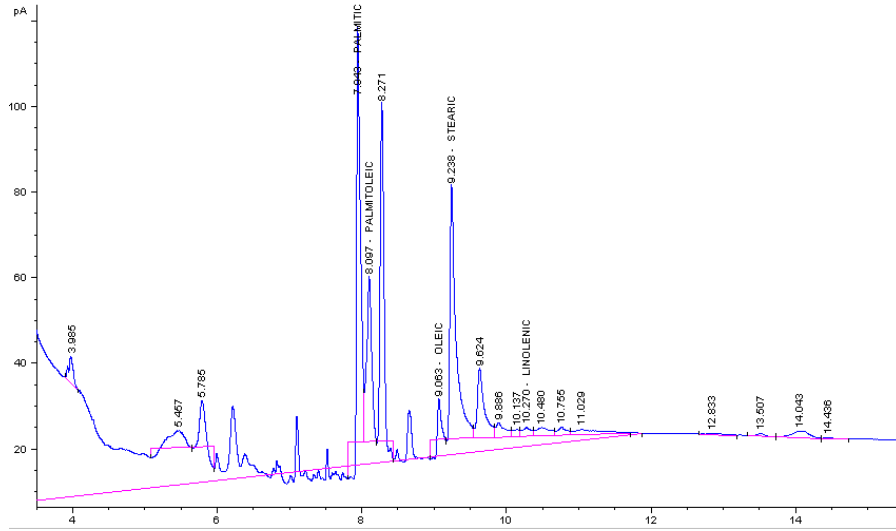
Ek A10: Besiyeri H’de büyütülen *C.echinulata* mantarının lipid ürününe ait kromatogram



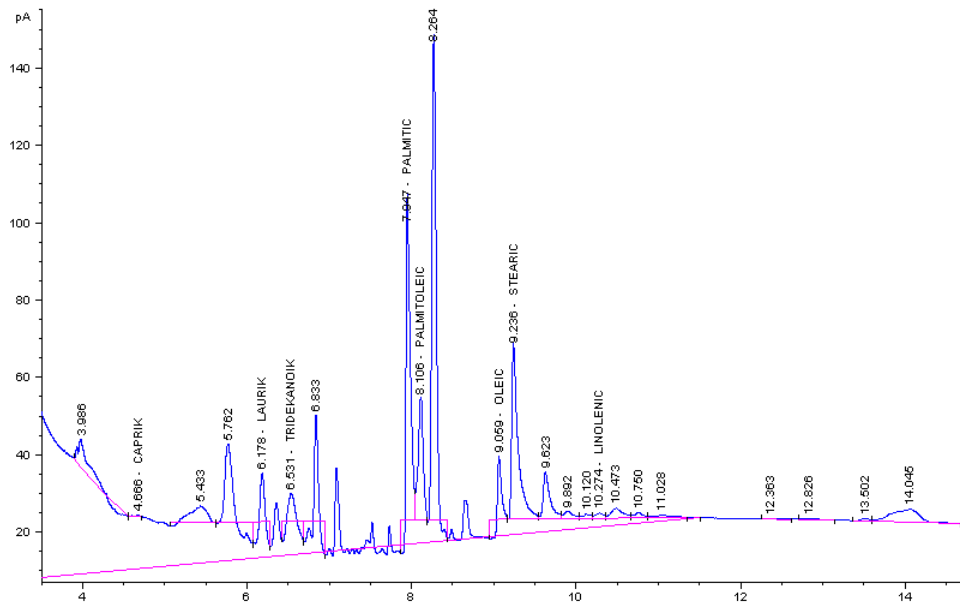
Ek A11: Besiyeri G’de büyütülen *M.isabellina* mantarının lipid ürününe ait kromatogram



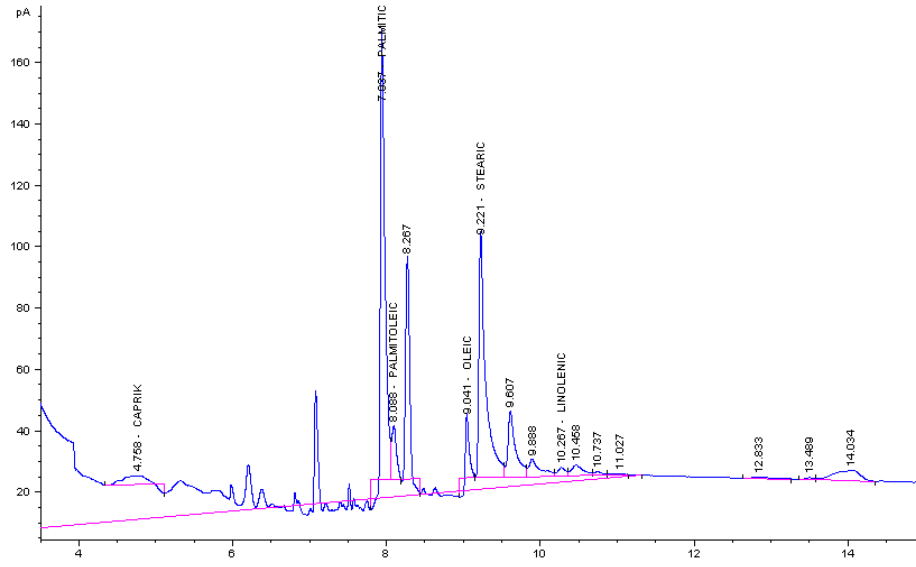
Ek A12: Besiyeri H’de büyütülen *M.isabellina* mantarının lipid ürününe ait kromatogram



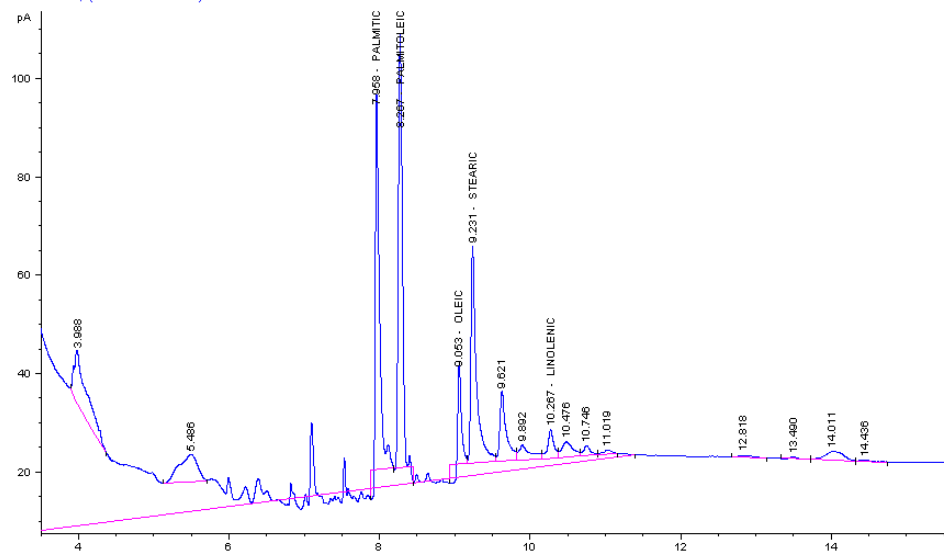
Ek A13: Besiyeri I'da büyütülen *Y. lipolytica* mantarının lipid ürününe ait kromatogram



Ek A14: Besiyeri D'de büyütülen *Y. lipolytica* mantarının lipid ürününe ait kromatogram



Ek A15: Besiyeri J'de büyütülen *P.ostreatus* mantarının lipid ürününe ait kromatogram



Ek A16: Besiyeri K'de büyütülen *P.ostreatus* mantarının lipid ürününe ait kromatogram