

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLE GAMMA DEKALAKTON
ÜRETİMİ

HATİCE DURMUŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2018

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLE
GAMMA DEKALAKTON ÜRETİMİ

HATİCE DURMUŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2018

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF
GAMMA DECALACTONE

HATİCE DURMUŞ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2018

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17/01/2018 tarih ve 2018/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/01/2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Hatice DURMUŞ'un tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

A-Tanriseven

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

Melek Ozkan

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Fatih AKTAŞ

Fatih Aktaş

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Bu tez çalışmasında, ilk kez kullanılan *Yarrowia Lipolytica* MGW399 suşu ile endüstriyel olarak değerli bir aroma bileşeni olan γ -dekalaktonun optimal şartlarda üretimi yapılmıştır. Mikroorganizmanın γ -dekalakton üretebilirliği üzerine çalışmalar yapılarak verimin artırılmasına odaklanıldı. Çalışmada karbon kaynağı olarak risinoleik asit içeriği yüksek olan hint yağı kullanılarak büyüme besiyeri, azot kaynağı, sıcaklık, pH, karıştırma etkisi ve substrat miktarının γ -dekalakton üretimine etkisi araştırıldı. Büyüme besiyeri olarak hazır besiyerleri yerine özel olarak formüle edilen besiyeri kullanıldığında daha iyi verimler elde edildi. Azot kaynağı olarak amonyum sülfat, amonyum klorür, pepton ve üre kullanıldığında en yüksek verim pepton ile 190.5 mg/L elde edildi. Başlangıç pH seviyesinin ürün üretimine etkisini incelemek için farklı pH'lar (4-8) denendi ve başlangıç pH'sı 7 olan besiyerinde 218.7 mg/L ürün elde edildi. Sıcaklığın üretim üzerine etkisini görmek için değişik sıcaklıklarda (27°C, 30°C, 33°C) yapılan üretimler sonucunda en yüksek miktar 27°C'de 315 mg/L elde edildi. Karıştırma hızının γ -dekalakton üretimine etkisi farklı hızlarda (180 rpm, 200 rpm, 220 rpm, 240 rpm) incelenerek en yüksek ürün miktarı 220 rpm hızında 339 mg/L elde edildi. Son parametre olarak substrat miktarının γ -dekalakton üretime etkisi farklı konsantrasyonlarda (10g/L, 20g/L, 30g/L, 40g/L, 50g/L) üretim yapılarak incelendi. En yüksek değer 40g/L hint yağı içeren besiyerinde 490 mg/L elde edildi. Optimizasyon sonucunda elde edilen parametrelere göre yapılan üretim 18 - 72 saat aralığında takip edildi ve en yüksek γ -dekalakton miktarı 53. saatte 562 mg/L olarak ölçüldü. Ürün miktarında bu saatten sonra düşme gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ticari bir ürün olan doğal γ -dekalaktonun *Yarrowia lipolytica* MGW399 tarafından üretilebileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: γ -dekalakton, *Yarrowia lipolytica*, Hint yağı, HPTLC.

SUMMARY

In this thesis work, *Yarrowia Lipolytica* MGW399 strain was used for the first time to produce γ -decalactone, an industrially valuable flavour component under optimal conditions. Studies have been focused on increasing efficiency of the microorganism to produce γ -decalactone. Effects such as growth nutrient, nitrogen source, temperature, pH, mixing speed and substrate concentrate on γ -decalactone production were investigated. Castor oil was used as a carbon source since it has high ricinoleic acid content. Higher yields were obtained when using specially formulated nutrients instead of ready-to-grow media. When ammonium sulfate, ammonium chloride, peptone and urea were used as the nitrogen source, the highest yield was 190.5 mg / L with peptone. To investigate the effect of initial pH level on product production, different pH (4-8) were studied and 218.7 mg / L product was obtained on medium with initial pH of 7. Productions at different temperatures (27°C, 30°C, 33°C) yielded highest amount of product at 27°C (315 mg / L). The effect of mixing speed on γ -decalactone production was examined at different speeds (180, 200, 220, 240 rpm) and the highest product yield was 339 mg / L at 220 rpm. As a final parameter, the concentration of substrate was studied for the production of γ -decalactone at different concentrations (10g / L, 20g / L, 30g / L, 40g / L, 50g / L). The highest value was 490 mg / L in medium containing 40 g / L of Castor oil. According to the parameters obtained as a result of optimization, the production was followed at 18-72 hours and the highest amount of γ -decalactone was obtained in time 562 mg / L at 53 hours. The quantity of the product has been observed to decrease after this time. In the present study, a commercial product, natural γ -decalactone, was shown to be produced by *Yarrowia Lipolytica* MGW399.

Key Words: γ -decalactone, *Yarrowia lipolytica*, Castor oil, HPTLC.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın bir kısmını laboratuvarında gerçekleştirdiğim değerli hocam Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a,

Eğitimimi destekleyen Aromsa A.Ş.'ye ve Aromsa A.Ş. Genel Müdürü Sayın Murat YASA'ya

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan Dr. Zehra ÖLÇER ve Dr. Aişe ÜNLÜ'ye,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Fatma ERTAN, Arzu ŞEN ve Gülden YETİŞ'e,

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Bursu ile tezimi destekleyen TÜBİTAK'a,

Çalışmalarım boyunca maddi, manevi desteği ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli eşim Gürsoy DURMUŞ ve biricik oğlum Atakan DURMUŞ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	2
2.1. Biyoteknolojik Yöntemle Aroma Maddelerinin Üretimi	2
2.1.1. Mikrobiyal Yöntemle Üretim	3
2.1.2. Enzimatik Yöntemle Üretim	4
2.2. Laktonlar	5
2.2.1. Biyoteknolojik Yöntemle Laktonların Üretimi	6
2.2.2. γ -Dekalakton Üretimi	7
2.2.3. γ -Dekalakton Oluşum Mekanizması	8
2.3. Yarrowia lipolitica	11
2.3.1. Yarrowia lipolitica'nın Endüstriyel Kullanım Alanları	12
2.4. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi ve Densitometre	13
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	15
3.1.2. Mikroorganizma	16
3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar	16
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	18
3.2. Metot	18
3.2.1. Sterilizasyon	18
3.2.2. Kuru Hücre Analizi	18

3.2.3. Y. lipolytica'nın Aktifleştirilmesi	19
3.2.4. Y. lipolytica'nın Büyüme Besiyerinde Büyütülmesi	19
3.2.5. Büyüme Besiyerinin Verime Etkisi	19
3.2.6. Azot Kaynağının Verime Etkisi	19
3.2.7. pH'nın Verime Etkisi	20
3.2.8. Sıcaklığın Verime Etkisi	20
3.2.9. Karıştırma Hızının Verime Etkisi	20
3.2.10. Substrat Miktarının Verime Etkisi	20
3.2.11. Optimum Şartlarda Üretim Metodu	21
3.2.12. Üretim Besiyerinden γ -Dekalakton Ekstraksiyonu	21
3.2.13. HPTLC ve Densitometre ile γ -Dekalakton Kantitatif Analiz Metodu	21
3.2.14. GC-MS ile γ -Dekalakton Karakterizasyon Metodu	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Mikroorganizmanın Büyütülmesi	23
4.2. γ -Dekalaktonun GC-MS Analizi	24
4.3. γ -Dekalaktonun HPTLC-Densitometre Analizi	26
4.4. Üretim Optimizasyonu	28
4.4.1. Büyüme Besiyerinin Verime Etkisi	28
4.4.2. Azot Kaynağının Verime Etkisi	28
4.4.3. pH'nın Verime Etkisi	29
4.4.4. Sıcaklığın Verime Etkisi	30
4.4.5. Karıştırma Hızının Verime Etkisi	31
4.4.6. Hint Yağı Miktarının Verime Etkisi	32
4.4.7. Optimum Şartlarda Üretim	33
5. SONUÇLAR	36
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	42

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
G	: Gram
OD	: Optik yoğunluk
µg	: Mikrogram
pH	: $-\log[H^+]$
L	: Litre
Zn	: Çinko
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NaCl	: Sodyum klorür
T80	: Tween 80
µL	: Mikrolitre
NaCl	: Sodyumklorür
Nm	: Nanometre
Rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
TLC	: İnce tabaka kromatografi
HPTLC	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
ICA	: İzositrik asit
CA	: Sitrik asit
B	: Beta
Γ	: Gamma
Ω	: Delta
Kg	: Kilogram
GS	: Gaz kromatografisi
MS	: Kütle spektrometresi
FID	: Alev iyonlaşma Dedektörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Aroma maddelerinin üretimi için biyoteknolojik prosesler.	3
2.2: Mikrobiyal lipazla L-mentol üretimi.	5
2.3: Mikrobiyal γ -dekalakton üretimi.	8
2.4: Triaçilgliserol ve yağ asitlerinin <i>Y. lipolytica</i> tarafından metabolize edilmesi.	8
2.5: <i>Yarrowia lipolytica</i> tarafından risinoleik asitten γ -dekalakton üretimi.	10
2.6: Tez çalışmasında kullanılan Camag marka HPTLC-Dnsitometre sistemi.	14
4.1: Petride büyütülen <i>Yarrowia lipolytica</i> MGW399 kolonileri.	23
4.2: Değişik besiyerleride büyütülen <i>Yarrowia lipolytica</i> optik yoğunluk değerleri.	24
4.3: Saflaştırılmış ürüne ait gaz kromatografisi (GS) sonucu.	25
4.4: Saflaştırılan ürünün kütle spektrometresi (MS) benzerlik analizi sonucu.	25
4.5: Saflaştırılan ürünün kütle spektrumu.	26
4.6: γ -dekalakton üretim besiyerinden ekstrakte edilen ürünlerin TLC analizi.	26
4.7: γ -dekalakton üretim besiyerinden ekstrakte edilen numuneye ait kromatogram.	27
4.8: γ -dekalaktonun kantitatif hesaplamalarında kullanılan kalibrasyon grafiği.	27
4.9: Farklı büyüme besiyerlerinin <i>Yarrowia lipolytica</i> 'nın ürettiği γ -dekalakton miktarına etkisi.	28
4.10: Azot kaynağının γ -dekalakton miktarına etkisi.	29
4.11: Başlangıç pH değerinin dekalakton üretimine etkisi.	30
4.12: Sıcaklığın γ -dekalakton verimine etkisi.	31
4.13: Karıştırma hızının γ -dekalakton verimine etkisi.	32
4.14: Hint yağı miktarının γ -dekalakton verimine etkisi.	33
4.15: Optimum şartlarda büyütülen <i>Yarrowia lipolytica</i> kuru hücre miktarının zamanla değişimi.	34
4.16: Optimum şartlarda büyütülen <i>Yarrowia lipolytica</i> γ -dekalakton miktarı.	35

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Gıda aroma vericilerinde kullanılan bazı aroma maddeleri, organoleptik özellikleri ve kullanıldıkları aroma çeşitleri.	1
2.1: Şarapta bulunan aromatik bileşenler.	3
2.2: Birada bulunan aromatik bileşenler.	4
2.3: Mikrobiyal yöntemle üretilen bazı aroma maddeleri.	4
2.4: Bazı gamma, delta ve makrosiklik laktonlar.	5
2.5: Mikroorganizmalar yardımıyla üretilen bazı laktonlar.	6
2.6: γ -dekalaktona ait bazı kimyasal ve fiziksel özellikler.	7
2.7: <i>Y. lipolytica</i> 'nın bazı endüstriyel uygulamaları.	13
3.1: Deneyde kullanılan malzeme ve maddeler.	15
3.2: YPD yatık agar besiyeri.	16
3.3: Eser element çözeltisi.	16
3.4: YPD besiyeri.	16
3.5: Sentetik büyüme besiyeri.	17
3.6: PDB besiyeri.	17
3.7: Ürün üretim besiyeri.	17
3.8: Deneylerde kullanılan cihazlar.	18
4.1: γ -dekalakton üretim şartları.	35

1. GİRİŞ

Aroma maddeleri, koku alma ve tat alma duyusu ile algılanan, uçucu özellikte alifatik ve aromatik yapılu kimyasal bileşiklerdir. Bu maddeler gıdalarda mg/kg düzeyinde kullanılmalarına rağmen gıdanın duyusal özelliklerini belirleyen önemli faktörlerin başında gelmektedir. Günümüzde doğal gıdalarla beslenme eğilimi, başlıca gıda bileşenlerinden olan aroma maddelerinin de doğal yollardan elde edilmesini bir ihtiyaç haline getirmiştir [1]. Aroma endüstrisinde kullanılan bazı aroma bileşenleri Tablo 1.1’de verilmiştir. Aroma vericilerde aldehytler, alkoller, ketonlar, pirazinler, esterler, kısa zincirli yağ asitleri, fenolik bileşikler, sülfürlü bileşikler ve laktonlar kullanılmaktadır [2]. Aroma endüstrisinde çok kullanılan laktonlardan olan γ -dekalakton çilek, şeftali, kayısı, tereyağı ve süt aromalarının önemli bileşenlerinden biridir.

Tablo 1.1: Gıda aroma vericilerinde kullanılan bazı aroma maddeleri, organoleptik özellikleri ve kullanıldıkları aroma çeşitleri.

Aroma bileşeni	Organoleptik özelliği	Bulunduğu aromalar
İzoamil asetat	Tatlı meyvemsi, muz	Muz, elma, kavun
Cis-3 hegzanol	Keskin yeşil, çimen	Elma, kivi
Metil dihidrojasmonat	Çiçeğimsi, yasemin	Çilek, ahududu
Sitral	Kabuk limon	Limon, portakal
Geraniol	Çiçeğimsi	Sardunya, bergamot
2-asetil pirazin	Patlamış mısır, fındık	Gofret, fındık

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, yoğurttan izole edilen ve daha önce γ -dekalakton üretim kapasitesi incelenmemiş olan *Yarrowia lipolytica* MGW399 suşunun γ -dekalakton üretim optimizasyonu yapılmıştır. Çalışmada ürün üretim besiyerinde karbon kaynağı olarak hint yağı kullanılarak büyüme besiyeri, azot kaynağı, sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve substrat konsantrasyonunun γ -dekalakton üretimine etkisi araştırıldı. Numunelerdeki γ -dekalaktonun kantitatif analizi literatürdeki çalışmalardan farklı olarak ilk kez yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) - densitometre ile yapıldı. Yapılan çalışma, literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslandı.

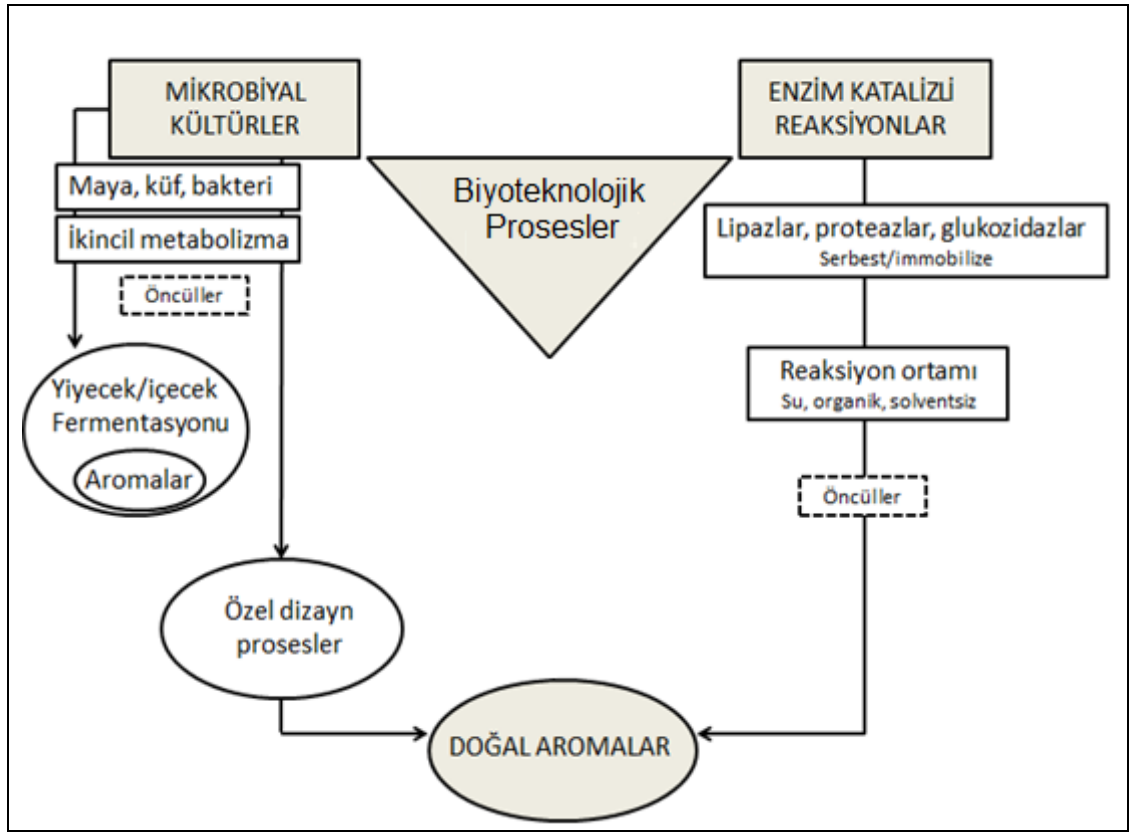
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyoteknolojik Yöntemle Aroma Maddelerinin Üretimi

Aromalar gıda endüstrisinde çok kullanılan gıda katkı maddelerindendir. Dünya çapında aroma pazarı 2016 yılı verilerine göre 11.5 milyar dolardır ve doğal aromalara artan talebinde etkisi ile 2021 yılında 16.5 milyar dolara ulaşması beklenmektedir [3]. Asırlardır bitki ve meyve ekstraktları aroma verici olarak kullanılmışlardır. Ancak artan tüketim miktarı, iklim değişikliği ve bitki hastalıkları nedeniyle aroma maddelerinin tarımsal kaynaklardan elde edilmesi zor ve pahalı bir hal almıştır. Bu sebeple gıda endüstrisinde organik sentezle üretilen aroma maddeleri daha fazla kullanılmaya başlanmıştır [4]. 1980 yılından sonra ise doğal gıdalara olan yoğun talep nedeni ile bu konudaki çalışmalar artmıştır.

Doğal aroma maddelerinin tarımsal kaynaklardan üretimlerinde yüksek fiyat, sınırlı kaynak gibi sorunlar biyoteknolojik yöntemlerin kullanımının sorgulanmasının yolunu açmıştır. Modern biyoteknolojide yaşanan gelişmeler sayesinde aroma maddelerinin mikroorganizmalar ve enzimler yardımıyla üretilmesi mümkün olmuştur. Biyoteknolojik yöntemle aroma maddeleri üretiminde günümüzde temel olarak iki metod kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Birincisi doğal ve ucuz karbon kaynaklarından mikroorganizmalar yardımıyla biyosentez, ikincisi ise enzimlerle yapılan sentezdir.

Biyoteknolojik yöntemlerle aroma maddelerinin üretiminde, gıda sanayi atıkları karbon ve azot kaynağı olarak kullanılabilir. Bu şekilde hem gıda atıklarının biyodönüşümü hemde ülke ekonomisine katkı sağlanır. Atıklara melas ve alkol üretimi sırasında yan ürün olarak oluşan fusel yağı örnek olarak verilebilir [5].



Şekil 2.1: Aroma maddelerinin üretimi için biyoteknolojik prosesler.

2.1.1. Mikrobiyal Yöntemle Üretim

Mikroorganizmalar aroma maddelerinin üretiminde tarihi bir role sahiptir. Aromatik bileşenler açısından zengin olan şarap ve bira gibi alkollü içecekler mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Bu ürünlerde bulunan bazı aroma maddeleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de verilmiştir [7, 8].

Tablo 2.1: Şarapta bulunan aromatik bileşenler.

Ürün	Aroma bileşeni
Şarap	Dietil süksinat
	γ -oktalakton
	Benzil asetat
	2-fenil etanol
	Fenil asetik asit
	Öjenol
	Etil oktanoat

Tablo 2.2: Birada bulunan aromatik bileşenler.

Ürün	Aroma bileşeni
Bira	Etil dekanolat
	Etil asetat
	İzoamil asetat
	Dekanol
	β-Pinene
	Sitronellol
	Geraniol
	Damascenon
	Farnesol
	Oktanoik asit

Mikroorganizmalar yardımı ile saf aroma maddeleri de üretilebilmektedir. Mesela; doğal vanilin *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Amycolatopsis sp.* *Aspergillus niger* ile ferulik asit, öjenol ve mısır kepeğinden üretilebilmektedir [9-11]. Bu yolla üretilen saf aromatik kimyasallara örnekler Tablo 2.3'te verilmiştir [2, 12, 13].

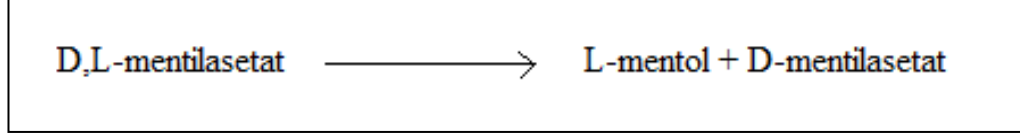
Tablo 2.3: Mikrobiyal yöntemle üretilen bazı aroma maddeleri.

Substrat	Mikroorganizma	Aroma maddesi
L-methionine	<i>Lactobacillus</i>	Metanetiol
Orta zincirli yağ asitleri	<i>Penicillium italicum</i>	Metil ketonlar
Triptofan	<i>Pseudomonas sp.</i>	Indole
Risinoleik asit	<i>Candida sp.</i>	γ-dekalakton
Amil alkol	<i>Williopsis saturnus</i>	İzoamil asetat
L-fenilalanin	<i>Saccharomyces</i>	2-feniletanol

2.1.2. Enzimatik Yöntemle Üretim

Enzimler substratların ürüne dönüşümünde yüksek stereo- ve enansiyoseçiciliğe sahip oldukları için saflık oranı çok önemli olan aroma maddelerinin üretiminde kullanılmaktadırlar [2]. Gerçekleştirilmek istenen reaksiyona uygun bir enzim seçimi ile enansiyomerik olarak saf aroma maddeleri tek basamaklı reaksiyonlarla elde edilebilmektedir [12]. Enzimatik yöntem yaygın olarak ester

üretiminde kullanılmaktadır. Lipazlar yardımı ile alkol ve kısa zincirli yağ asitlerinden esterler sentezlenebilmektedir. Aroma endüstrisinde lipazların yanı sıra proteaz ve esterazlar da sıklıkla kullanılmaktadırlar (Şekil 2.2).

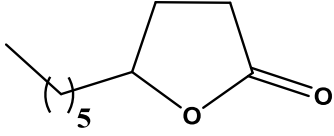
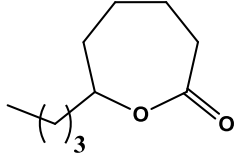
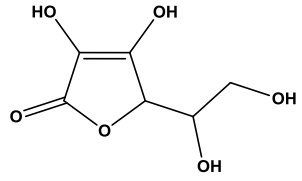


Şekil 2.2: Mikrobiyal lipazla L-mentol üretimi.

2.2. Laktonlar

Laktonlar, aynı moleküldeki karboksil grubu ile bir hidroksi yağ asidinin gamma veya delta hidroksil grubunun molekül içi tepkimesiyle oluşan halkalı yapıdaki esterlerdir. Halkalı yapıdaki bu esterler birçok canlı organizmada ara ürün olarak oluşur ve önemli biyolojik aktivitelere sahiptirler [14]. Laktonların birçoğu meyve ve süt ürünlerinde yüksek miktarlarda bulunur [15]. Örnek olarak bir γ lakto olan C vitamini birçok sebze ve meyvede bulunur. Bazı laktonlar, eritromisin ve nonaktin gibi oldukça büyük moleküller olmasına rağmen doğal laktonlar çoğunlukla 5 veya 6 karbon sayılı yani gamma veya delta laktonlardır [16] (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: Bazı gamma, delta ve makrosiklik laktonlar.

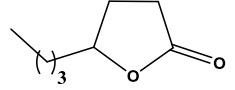
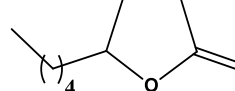
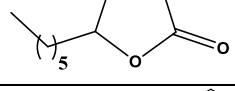
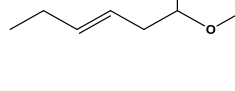
Laktonlar	Molekül yapısı
Gamma dekalakton	
Delta dekalakton	
C vitamini	

2.2.1. Biyoteknolojik Yöntemle Laktonların Üretimi

Laktonlar, gıdalarda doğal olarak bulunan ve aroma endüstrisinde çok kullanılan aroma kimyasalları arasındadırlar. Doğada doymuş veya doymamış gamma ve delta formlarında bulunurlar. Doğal aroma maddelerine olan talep nedeniyle biyoteknolojik olarak üretilmeleri için çalışmalar yapılmaktadır. (Tablo 2.5) Laktonlar genellikle hidroksi karboksilik asitlerin oksidasyonu ile oluşurlar. Çalışmalarda, risinoleik asit, oleik asit, triolein, hint yağı, metil risinoleat, γ -keto asitler, hidroksi stearik asit ve linoleik asit gibi substratlar kullanılmaktadır. Kullanılan substrat ve mikroorganizmanın cinsi oluşacak laktonun yapısını belirlemektedir [17]. Mesela; *Piptoporus soloniensis*, risinoleik asit veya hidroksi stearik asit ile γ -dekalakton üretirken miristik veya palmitik asit varlığında γ -oktalakton üretmektedir [18].

Mikroorganizmalar yardımıyla laktonlar farklı metodlarla üretilmektedir. *R.glutinis*, *A.niger*, *Sporobolomyces odorus*, *Cladosporium suaveolens*, *Yarrowia lipolytica* ve *Mucor miehei* gibi mikroorganizmalar tarafından risinoleik asitten γ -dekalakton üretiminde gerçekleşen β -oksidasyonu, *Acinetobacter* veya *P.Putida* suşlarının gerçekleştirdiği Bayer-Villiger oksidasyonu ve *Mucor javanicus* suşlarının ortama salgıladıkları lipazlar ile gerçekleştirdikleri esterifikasyondur

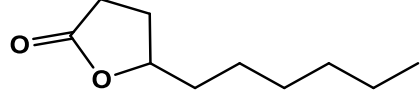
Tablo 2.5: Mikroorganizmalar yardımıyla üretilen bazı laktonlar.

Ürün	Substrat	Mikroorganizma	Molekül yapısı
γ -oktalakton	Kaprilik asit (C8)	<i>Mortierella isabellina</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i>	
γ -nonalakton	Linoleik asit (C9)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
γ -dekalakton	Risinoleik asit (C10)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
δ -jasminlakton	Linolenik asit (C18)	<i>Cladosporium suaveolens</i> , <i>Cladosporium cucumerinum</i>	

2.2.2. γ -Dekalakton Üretimi

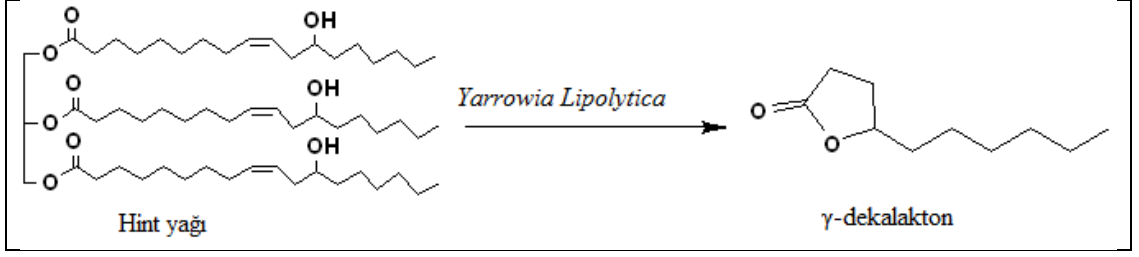
Gamma dekalakton endüstriyel olarak değerli bir aromatik bileşiktir ve birçok meyve ve fermente üründe doğal olarak bulunur. γ -dekalaktona ait bazı kimyasal ve fiziksel özellikler Tablo 2.6’da verilmiştir. Kremamsı, şeftalimsi tat profiline sahip olduğu için şeftali, kayısı, çilek ve süt aromalarında yüksek oranda kullanılmaktadır.

Tablo 2.6: γ -dekalaktona ait bazı kimyasal ve fiziksel özellikler.

Molekül Yapısı	
Molekül Ağırlığı	170.25 g/mol (20 ⁰ C)
Yoğunluk	0.953 g/mL
Kaynama Noktası	281°C
FEMA	2360

Gamma dekalaktonun sentetik formu ilk olarak 1850 yılında sentezlenmiştir. 1980 yılından sonra doğal aromalara artan talep ile γ -dekalaktonun da doğal yollardan üretimi için çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu konu ile ilgili günümüze kadar yapılan birçok çalışma ve alınan patentler mevcuttur [19-21]. Çalışmalarda *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia etchellsii*, *Sporidiobolus ruinenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Polyporus durus*, *C. Moniliformis*, *Geotrichum fragrans* ve *Geotrichum sp*, *Lindnera saturnus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium suaveolens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Piptoporus soloniensis* ve *Pichia etchellsii* mikroorganizmaları ile risinoleik asit, hint yağı, metil risinoleat, gliserol gibi karbon kaynaklarından γ -dekalakton üretimi incelenmiştir. Çalışmalarda elde edilen miktarlar 0.14-12,5 g/L aralığında değişmektedir [18, 20, 22, 23].

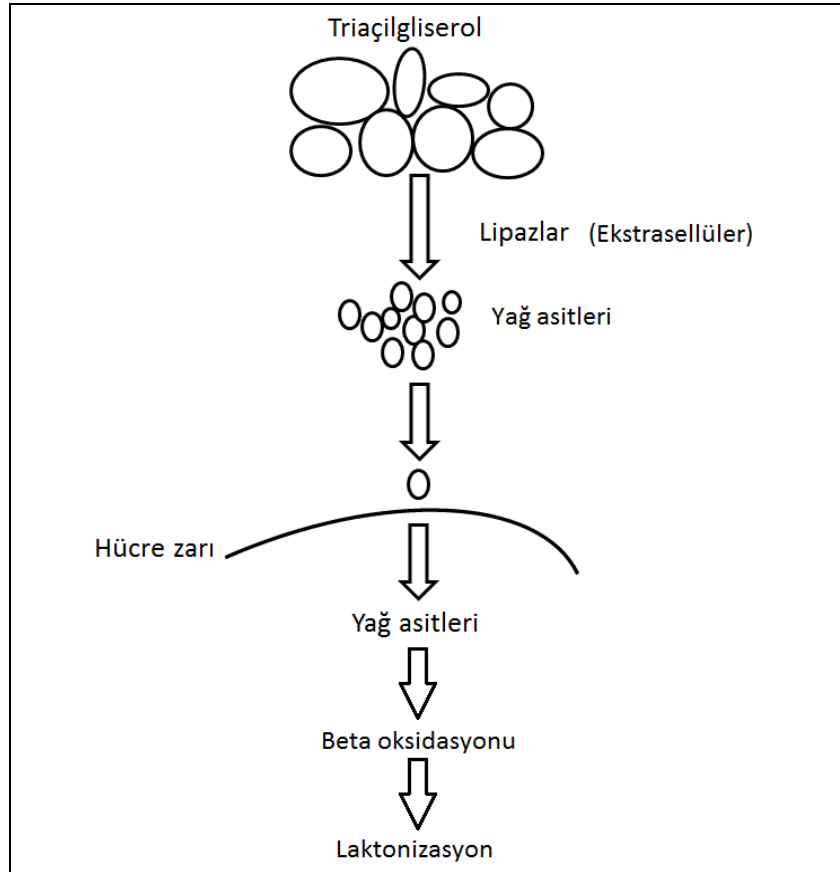
Bu tez çalışmasında *Yarrowia lipolytica* MGW399 suşu ile hint yağından γ -dekalakton üretilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Mikrobiyal γ -dekalakton üretimi.

2.2.3. γ -Dekalakton Oluşum Mekanizması

Gamma dekalakton biyoteknolojik yöntemle hint yağı ile üretilmektedir. Bu reaksiyon *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum sp*, *G.Fragrans* ve bazı *Candida spp* suşlarının ortama salgıladıkları lipaz ile hint yağının ilk olarak 18 karbonlu bir hidroksi yağ asidi olan risinoleik aside hidroliz etmesi ile başlar [24-26]. Şekil 2.4'te *Y.Lipolytica* tarafından γ -dekalakton üretimi özet olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Triaçilgliserol ve yağ asitlerinin *Y. Lipolytica* tarafından metabolize edilmesi.

Yarrowia lipolytica ile risinoleik asitten γ -dekalakton üretebileceği ilk kez Okui tarafından öne sürülmüştür [27]. Okui farklı suşlarla yaptığı çalışmalarda risinoleik asitin mikroorganizma tarafından metabolize edilmesi sırasında 8-18 karbonlu ara ürünlerin oluştuğunu tespit etmiş ve risinoleik asitin 4-hidroksi dekanoik aside indirgenmesinin β -oksidasyon yolunun enzimleri tarafından gerçekleştirilebileceğini önermiştir [28]. Bu ara ürünler daha sonra Wache ve arkadaşları tarafından *Yarrowia lipolytica* suşu ile yapılan çalışmalarda ise tespit edilmiştir [29]. Risinoleik asit 4 kez β -oksidasyonu ile 4-hidroksidekanoik asite okside olur ve daha sonra düşük pH'da 4-hidroksidekanoik asit γ -dekalaktona laktonize olur [10] (Şekil 2.5).

Mikrobiyal olarak üretilen γ -dekalakton doğada şeftali ve diğer meyvelerde bulunan γ -dekalakton ile aynı enansiyomerik yapıya sahiptir.

Risinoleik asitin γ -dekalaktona biyotransformasyonunda üretilen γ -dekalakton ortamda maksimum seviyeye ulaştıktan sonra mikroorganizma tarafından tüketilmesi nedeniyle azalmaya başlar. Bu tüketimin *Candida guilliermondii*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Candida intermedia* ve *Yarrowia lipolytica* suşları ile yapılan çalışmalarda proses verimini çok ciddi bir şekilde düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen γ -dekalaktonun yine mikroorganizma tarafından tüketilmesini açıklamak için β -oksidasyon, ω -oksidasyon veya delaktonizasyon içeren birçok hipotez ortaya atılmıştır [27, 30, 31].

2.3. *Yarrowia lipolytica*

Mayalar ökaryotik mikroorganizmalardır. Yeryüzünde 15000 kadar maya çeşidi olduğu tahmin edilmesine rağmen bunların yalnızca 1500 kadarı tanımlanmıştır. *Yarrowia lipolytica*, ilk olarak Harrison tarafından 1928 yılında izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Önceleri *Mycotorula*, *Monilia*, *Torula*, *Pseudomonilia*, *Proteomyces*, *Azymoprocandida*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Torulopsis* veya *Saccharomycopsis* gibi isimlerle biliniyordu fakat 1972 yılında David Yarrow tarafından tekrar sınıflandırmasından sonra *Yarrowia lipolytica* olarak isimlendirilmiştir. Bu maya doğada süt ürünleri, et ve et ürünleri, karides, atık sular ve yağ ile kirlenmiş deniz sularından izole edilebilmektedir [22, 32, 33].

Yarrowia lipolytica, alkanlar, uzun zincirli hidrokarbonlar ve ham petrolü metabolize edebilmesi nedeniyle biyoteknoloji endüstrisinin ilgi odağı olmuştur. Bu maya ucuz karbon kaynaklarını (hidrokarbonlar, yağ, yağ asitleri) verimli bir şekilde kullanarak pahalı ürünlerin (organik asitler, aroma kimyasalları, biyosurfaktanlar, enzimler, polialkoller) üretimini yapabilmektedir [34].

Y. lipolytica aerobik bir maya olması nedeniyle ortamdaki oksijen miktarı metabolit üretimi için çok kritiktir. Bu nedenle bazı çalışmalarda büyüme ortamındaki oksijen miktarını arttırmak için perflorodekalin ilavesi ve hiperbarik hava uygulaması yapılmıştır [32].

Y. lipolytica suşları çeşitli kirli ortamlardan izole edilebilmektedir. Bu gibi yerlerde bulunan yerli mikrobik popülasyonlar kirleticilerin varlığı ile sürekli tehdit

altındadır ve bu nedenle enzim yapılandırmalarının detoksifikasyon için etkinlik kazandığı düşünülmektedir [35].

Evrimsel bakış açısı altında, ortamda damla şeklinde dağılmış olan hidrofobik yapıdaki zengin sulu ortamlarda çoğalan mikroorganizmaların hidrofobik substratların kullanılmasını kolaylaştırmak için bir mekanizma geliştirdiğine inanılmaktadır. *Y. lipolytica*'nın, alifatik ve aromatik hidrokarbonlar da dahil olmak üzere çeşitli organik bileşikleri parçalamadaki yeteneği, her zaman biyo-yüzey aktif cisimciklerin üretilmesini ve ağırlıklı olarak glikolipidlerden oluşan, temas yüzeyini arttıran moleküllerin üretilmesine eşlik eder. Hidrofobik substrat içeren ortamlardaki mikroorganizmaların büyümesi, organik fazdaki hidrofobik substrat ile hücre yüzeyi arasında bir temas oluşumuna ihtiyaç duyar. Bu temas, hidrofobik damlacıkların hücrenin yüzeyi üzerinde doğrudan adsorbe edilmesiyle veya biyolojik sürfaktanların etkisiyle oluşabilir. Öngörülen her iki mekanizma da *Y. lipolytica* için rapor edilmiştir. Hidrofobik moleküller ile hücreler arasındaki etkileşim, hücre duvarında bulunan proteinler veya glikoproteinler aracılığıdır ve salınan yüzey aktif madde bu etkileşimi kolaylaştırabilir [36]. *Y. lipolytica* tarafından üretilen hücre dışı lipaz da hidrofobik substrat üzerinde trigliseridlerin hidrolizini yapar. Biyolojik sürfaktan ve lipazın etkisi, substratın taşınmasını kolaylaştıran birkaç damlacık oluşuktan sonra aşamalı olarak gerçekleşir.

2.3.1. *Yarrowia lipolytica*'nın Endüstriyel Kullanım Alanları

Yarrowia lipolytica endüstriyel değeri yüksek olan enzimler (lipaz, lakkaz ve proteaz), değerli organik asitler (sitrik ve süksinik asit), gıda endüstrisinde kullanılan aromatik maddeler, polialkoller ve ilaç endüstrisinde kullanılan ofloksasin, L-Dopa gibi kıymetli endüstriyel bileşikleri ucuz karbon kaynaklarını (yağ, yağ asitleri ve yağ ile kirlenmiş atık sular) kullanarak üretebildiği için endüstride çok kullanılan mayalar arasındadır [32, 37]. Mayanın endüstriyel kullanım alanlarına örnekler Tablo 2.7'de verilmiştir.

Tablo 2.7: *Y. Lipolytica*'nın bazı endüstriyel uygulamaları.

Karbon kaynağı	Azot kaynağı	Ürün
Glikoz	Amonyum nitrat	Sitrik asit
Etil alkol	Amonyum sülfat	Sitrik asit
Gliserol	Amonyum sülfat	Sitrik asit
Stearin	Pepton	Lipid
Mısır yağı	Pepton	Lipaz
Risinoleik asit	Amonyum klorür	γ -dekalakton

2.4. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi ve Densitometre

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) hem nicel hem de nitel analiz için kolay, hızlı ve düşük maliyetle birçok maddenin aynı anda analiz edilmesini sağlayan bir ayırma tekniğidir. Kolay uygulanabilmesi nedeniyle de hemen hemen tüm laboratuvarlarda basit ve hızlı ayırmalar için kullanılmaktadır.

Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) ise, ince tabaka kromatografisinin üstün ayırıştırma kapasitesine sahip, kalitatif ve kantitatif analiz için geçerliliği onaylanmış versiyonudur. HPTLC ile hassas ayırımlar yapılmakta ve kantitatif değerlendirmesinde densitometre kullanılmaktadır. HPTLC sistemi başlangıç, bakım ve örnek başına düşen maliyetler açısından diğer benzer yöntemlere göre ekonomiktir. Yapılan çalışmalar HPTLC-Densitometre ile yapılan miktar analizi sonuçlarının HPLC ve GC ile rekabet edebilir düzeyde olduğunu ortaya koymuştur [38, 39]. HPTLC'nin çok kullanılan bazı yöntemlerle kıyaslandığında avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Standartlar ve numuneler tek bir plakaya uygulanır. Dolayısı ile analiz süresi çok kısadır.
- İç standart kullanımı gerektirmez.
- Solvent tüketimi çok düşüktür.
- Özel saflıkta solvent kullanımı veya çözünmüş gazların giderilmesi için gaz giderme düzenekleri gerektirmez.

- Bir cihazda birbirinden bağımsız çok farklı örneklerin analizleri aynı zamanda yapılabilir. Bu özellik sayesinde birden fazla kullanıcının birlikte çalışmasına olanak sağlar.
- Kompleks numune hazırlama yöntemleri gerektirmez.

HPTLC ile yapılan ölçümlerde esas, miktarı bilinen bir maddenin bilinmeyenle karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Hazırlanan standart numuneler yardımıyla bir kalibrasyon grafiği çizilmektedir. Standartlar ve ölçümü yapılacak numuneler aynı plakaya uygulanır. Görüntülenmeye hazır hale getiren plakalar spektral seçiciliği olan HPTLC dansitometre ile 200–700 nm dalga boyu aralığında monokromatize ışın kullanılarak söz konusu maddenin maksimum absorbands/floresansını yakalayıp yüksek hassaslıkta ölçüm sağlamaktadır [39]. Tez çalışmamızda kullandığımız HPTLC-Dansitometre sistemi Şekil 2.6’da verilmiştir.



Şekil 2.6: Tez çalışmasında kullanılan Camag marka HPTLC-Densitometre sistemi.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Kullanılan sarf malzemelerin listesi Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Deneyde kullanılan malzeme ve maddeler.

Malzeme adı	Firma adı	Katalog no
Sodyum asetat	Sigma-Aldrich	S7899
Asetik asit	Riedel	27225
Demir (II) Sülfat Heptahidrat	Merck	1.03965.1000
Fenol	Sigma-Aldrich	33522
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	451614
Sodyum hidroksit	Merck	1.06462.1000
Glukoz	Fluka	49162
Hint yağı	Panreac	144564
Pepton	Bd	211693
Yeast Extract	Merck	1.07363
Hegzan	Merck	1.04368.2500
Amonyum sülfat	Sigma-Aldrich	A3920
Sodyum klorür	Merck	1.064.001.000
Amonyum klorür	Sigma-Aldrich	A9434
Disodyum fosfat	Riedel	4243
Magnezyum fosfat	Sigma-Aldrich	M1265
Etil Alkol	Sigma-Aldrich	459844
Sülfürik asit	Merck	1.00731.1000
Magnezyum Sülfat	Sigma-Aldrich	M2643
Potasyum fosfat	Riedel	4243
Dietil eter	Merck	1.00921
HPTLC Tabaka	Merck	1.05841.0001
Çinko klorür	Merck	1.08815.1000
Bakır sülfat pentahidrat	Merck	1.02790.0250
Potaton Dextrose Broth	Dıfco	BD 254920
Tween 80	Sigma-Aldrich	P6474
Etanol	Lichrosolve	1.11727.2500
Üre	Sigma-Aldrich	15604

3.1.2. Mikroorganizma

Bu çalışmada yoğurttan izole edilen *Yarrowia lipolytica* MGW399 kullanılmıştır. Bu yerel suş Patras Üniversitesi öğretim üyesi George Aggelis tarafından sağlanmıştır. (Atina, Greece) Mikroorganizmanın saklandığı koşullar Tablo 3.2’de verilmiştir.

3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar

Hazırlanan besiyerleri 121°C’da, 1.5atm basınç altında 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş ve ortam pH değeri 6 ± 0.1 olarak ayarlanmıştır. Deneylerde kullanılan çözelti ve besiyerleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.2: YPD yatık agar besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Yeast extract	1
Pepton	2
Glikoz	2
Agar	2
Saf su	93

Tablo 3.3: Eser element çözeltisi.

İçerik	% (w/w)
Demir (II) Sülfat Heptahidrat	0.0914
Çinko Klorür	0.005
Bakır sülfat	0.0156
Saf su	99.888

Tablo 3.4: YPD besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Yeast extract	1
Pepton	2
Glikoz	2
Saf su	95

Tablo 3.5: Sentetik büyüme besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Glikoz	1.5
Amonyum klorür	0.25
Yeast extract	0.01
Disodyum fosfat	0.451
Potasyum fosfat	0.21
Eser element çözeltisi	1
Magnezyum sülfat	0.02
Sodyum klorür	0.01
Saf su	96.549

Tablo 3.6: PDB besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Potato dextrose broth	2.4
Saf su	97.6

Tablo 3.7: Ürün üretim besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Hint yağı	1
Tween 80	0.03
Yeast extract	0.67
Amonyum klorür	0.5
Saf su	98.8

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.8: Deneylerde kullanılan cihazlar.

Cihaz adı	Firma adı	Modeli
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph	MR Hei-Tec
Otoklav	Varioklav	300
UV-Vis spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601
Santrifüj Cihazı	Centurion Scientific	K241R
Vakum fırını	VWR	1450M
İnkübatör	Nüve	FN 500
TLC Dansitometre	Camag	Scanner 4
TLC uygulama sistemi	Camag	Linomat 5
GC-MS	Shimadzu	QP2010 Ultra
Mikropipet Seti	Thermo Scientific	Finnpipette
Steril Kabin	Tez-San	Clas II
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter	Microfuge 18
Hassas Terazı	Sartorius	BL210S, BL3100
-80 Derin Dondurucu	Thermo Scientific	Forma -86 ULT
pHmetre	InoLab	WTW
Isıtıcı	Camag	TLC Plate Heater III
Rotavapor	BUCHI	R-200
Vorteks	Vortex	Genie

3.2. Metot

3.2.1. Sterilizasyon

Hazırlanan besiyerleri 121⁰C’de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi.

3.2.2. Kuru Hücre Analizi

Besiyerinden elde edilen pelletler %1 Tween 80 içeren saf su ile yıkanarak vakumlu fırında 60⁰C’de 48 saat kurutuldu.

3.2.3. *Y. lipolytica*'nın Aktifleştirilmesi

Yarrowia Lipolytica MGW399 suşu YPD yatık katı agardan 15 ml'lik tüpteki 5 ml'lik YPD besiyerine inoküle edildi. Tüp 19 saat 30°C'de 150 rpm karıştırma hızı ile inkübasyona tabi tutuldu.

3.2.4. *Y. lipolytica*'nın Büyüme Besiyerinde Büyütülmesi

YPD besiyerinde büyütülen *Yarrowia Lipolytica* MGW399 1 ml örnek alınarak 250 ml'lik erlendeki 100 ml sentetik besiyerine ekim yapıldı ve 30°C'de 150 rpm karıştırma hızı ile 24 saat inkübe edildi. 19 saat sonunda *Yarrowia Lipolytica* MGW399 üreme takibi Shimadzu UV-1601 UV-Vis spektrofotometre ile yapıldı. Büyütülen mikroorganizma 5600 rpm hızda 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelletler 40ml fizyolojik su ile yıkandıktan sonra 100ml'lik ürün üretim besiyerine başlangıç optik yoğunluğu 0.5 olacak şekilde inoküle edildi.

3.2.5. Büyüme Besiyerinin Verime Etkisi

Farklı büyüme besiyerlerinin γ -dekalakton üretimine etkisini araştırmak amacıyla hazırlanan YPD, PDB ve sentetik büyüme besiyerlerinde büyütülen *Yarrowia lipolytica* MGW399 pH'sı 6'ya ayarlanmış 500 ml hacimli erlenmeyerlerde 100 ml γ -dekalakton üretim besiyerine inoküle edildi. Erlenler 30°C'de, 180 rpm karıştırma hızı ile 72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Belirli aralıklarla numuneler alınarak γ -dekalakton analizi yapıldı.

3.2.6. Azot Kaynağının Verime Etkisi

Farklı azot kaynaklarının γ -dekalakton üretimine etkisinin tespiti amacıyla 500 ml hacimli erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde hazırlanan üretim besiyerlerine azot kaynağı olarak %0.5 pepton, %0.5 amonyum klorür, %0.5 üre ve %0.5 amonyum sülfat eklendi ve *Y. lipolytica* MGW399 pelletleri başlangıç pH'sı 6 olan ürün üretim besiyerine inoküle edildi. Erlenler 30°C'de, 180 rpm karıştırma hızı ile 72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Belirli aralıklarla numuneler alınarak γ -dekalakton analizi yapıldı.

3.2.7. pH'nın Verime Etkisi

Değişen pH değerlerinin γ -dekalakton üretimine etkisinin tespiti amacıyla 500 ml hacimli erlenmeyerlerde 100 ml olacak şekilde azot kaynağı olarak pepton içeren ürün üretim besiyerlerinin başlangıç pH değerleri 4, 5, 6, 7 ve 8 olacak şekilde ayarlandı. *Y. lipolytica* MGW399 pelletleri ürün üretim besiyerlerine inoküle edildi. Erlenler 30°C'de 180 rpm karıştırma hızı ile 72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Belirli aralıklarla numuneler alınarak γ -dekalakton analizi yapıldı.

3.2.8. Sıcaklığın Verime Etkisi

Sıcaklığın γ -dekalakton üretimine etkisi incelemek için azot kaynağı olarak pepton içeren ve pH değeri 7'ye ayarlanmış 500 ml hacimli erlenmeyerlerde 100 ml ürün üretim besiyerleri hazırlandı. *Y. lipolytica* MGW399 pelletleri hazırlanan besiyerlerine inoküle edildi. Erlenler 27°C, 30°C ve 33°C sıcaklıklarda 180 rpm karıştırma hızı ile 72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Belirli aralıklarla numuneler alınarak γ -dekalakton analizi yapıldı.

3.2.9. Karıştırma Hızının Verime Etkisi

Değişen karıştırma hızının γ -dekalakton üretimine etkisi incelemek için azot kaynağı olarak pepton içeren ve pH değeri 7'ye ayarlanmış 500 ml hacimli erlenmeyerlerde 100 ml ürün üretim besiyerleri hazırlandı. *Y. lipolytica* MGW399 pelletleri hazırlanan besiyerlerine inoküle edildi. Erlenler 30°C'de, karıştırma hızları 180, 200, 220 ve 240 rpm olacak şekilde 72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Belirli aralıklarla numuneler (19, 24, 29, 43, 48, 72) alınarak γ -dekalakton analizi yapıldı.

3.2.10. Substrat Miktarının Verime Etkisi

Azot kaynağı olarak pepton içeren ve pH değeri 7'ye ayarlanmış 500 ml hacimli erlenmeyerlerde 10g/L, 20g/L, 30g/L, 40g/L ve 50g/L hint yağı içerecek şekilde 100 ml ürün üretim besiyerleri hazırlandı ve inokülasyon gerçekleştirildi. Ortama eklenen Tween 80 gram yağ başına 0.03 gram olarak ilave edildi. Erlenler 30°C'de, karıştırma hızı 220 rpm olacak şekilde 72 saat inkübasyona tabi tutuldu.

Belirli aralıklarla (19, 24, 29, 43, 48, 72) numuneler alınarak γ -dekalakton analizi yapıldı.

3.2.11. Optimum Şartlarda Üretim Metodu

Belirlenen optimum şartlardaki γ -dekalakton miktarını belirlemek için 1000 ml hacimli erlenmeyerlerde 200ml optimum değerlere göre ürün üretim besiyeri hazırlandı. *Y. lipolytica* MGW399 pelletleri hazırlanan besiyerlerine inoküle edildi. Erlenler 30°C’de, karıştırma hızı 220 rpm olacak şekilde 72 saat inkübasyona tabi tutuldu.

3.2.12. Üretim Besiyerinden γ -Dekalakton Ekstraksiyonu

Ürün üretim besiyerlerinden belirli aralıklarla alınan numuneler (5 ml) falkonlara (50ml) alınarak 15 dakika santrifüj edildi (5600 rpm). Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar 5ml dietil eter ile 2 dk karıştırıldı ve 1-2 dakika sonra su fazından ayrılan eter fazı ayrı bir tüpe alındı. Bu işlem her numune için 3 kez tekrarlandı. Ekstrakte edilen numunelerden dietil eter uçurularak uzaklaştırıldı. Son olarak elde edilen numune etanol (500 μ l) ile çözüldü.

3.2.13. HPTLC ve Densitometre ile γ -Dekalakton Kantitatif Analiz Metodu

Γ -dekalaktonun HPTLC-densitometre ile kantitatif analizi için yeni bir metod geliştirildi. Bu metodda sabit faz olarak Merck HPTLC silica gel 60 FX₂₅₄, mobil faz olarak hekzan/dietil eter/asetik asit (80:30:0.3 v/v/v) kullanıldı. Referans olarak, γ -dekalakton etil alkolde hazırlanmış 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 8 μ g, 16 μ g ve 32 μ g’lık standart numuneleri kullanıldı. Besiyerinden ekstrakte edilen numuneler ve standart numuneler Camag Linomat 5 ile bir plakaya 6 standart ve 9 numune olmak üzere 8mm’lik bantlar halinde uygulandı. Mobil faz içerisinde 9cm’e kadar yürütüldü ve plaka saç kurutma makinesi ile kurutuldu. Reaksiyon ürünlerinin görüntülenebilmesi için, yürütülen plaka renklendirme çözeltisine (%95 etil alkol, %5 sülfirik asit ve %0.5 α -naftol) daldırılarak hot plate üzerinde 150°C’de 10 dakika ısıtıldı. TLC plaka üzerinde görünür hale gelen ürünler Camag scanner 4 ile analiz edildi.

3.2.14. GC-MS ile γ -Dekalakton Karakterizasyon Metodu

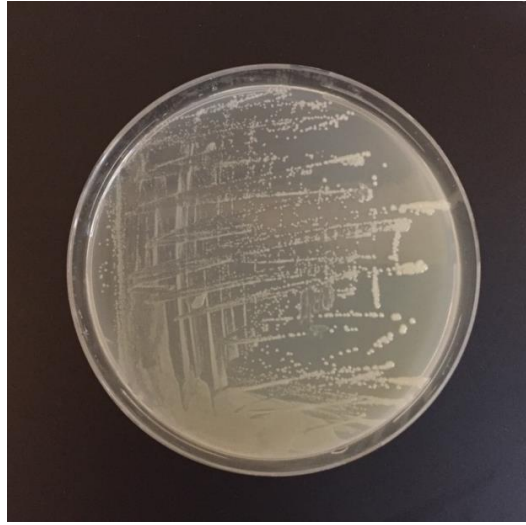
Üretilen γ -dekalaktonun GC-MS ile analizi için Camag Linomat 5 ile bir plakanın 1 adet başına ve 1 adet sonuna olmak üzere 2 adet γ -dekalakton standardı ve ürün üretim besiyerinden ekstrakte edilen numune 14 adet olmak üzere 8mm'lik bantlar halinde uygulandı. Mobil faz içerisinde 9cm'e kadar yürütülen plakalar kurutuldu ve plakada standartların olduğu kısımlar kesildi. Ayrılan kısımların görüntülenebilmesi için, renklendirme çözeltisine (%95 etil alkol, %5 sülfirik asit ve %0.5 α -naftol) daldırılarak hot plate üzerinde 150°C'de 10 dakika ısıtıldı. Görünür hale gelen plaka parçaları ayrıldıkları noktalara tekrar birleştirilerek γ -dekalaktonun plakadaki R_f değeri belirlendi. Bu aralıktaki silika plakadan kazınarak diklor metan ile ekstrakte edildi ve Shimadzu GC-MS-QP2010 Ultra cihazı ile analiz edildi. Analizde Rxi®-5ms Crosbond® %5 diphenyl/ %95 dimethyl polysiloxane 30 meter, 0.25 mmID 0.25 μ m df (max prog. Temp 350°C) MS kolonu kullanıldı. Kolon fırın sıcaklığı 90 °C, enjeksiyon sıcaklığı 250 °C enjeksiyon modu split ve split oranı 100:1 olarak ayarlandı. Kullanılan GC programı; 90°C'den başlayıp 10°C/dk hızla 280°C'ye çıkmış ve bu sıcaklıkta 5 dakika kaldı. MS programında iyon kaynağı sıcaklığı 200°C'e ve arayüz (interface) sıcaklığı 210°C'e ayarlandı. MS dedektörü 3-29 dk ve 50-550 m/z aralığında scan mod ile data toplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Yarrowia Lipolytica* MGW399 suşunun γ -dekalakton üretiminde kullanılabileceği gösterildi ve maksimum üretim için büyüme besiyeri, azot kaynağı, besiyeri başlangıç pH değeri, sıcaklık, karıştırma hızı ve karbon kaynağı optimal şartları analiz edildi. Yapılan çalışmalarda her bir deney 3 (üç) kez tekrarlanmıştır. Ürünün kalitatif ve kantitatif tayinlerinde GS-MS ve HPTLC-densitometre metodları kullanıldı.

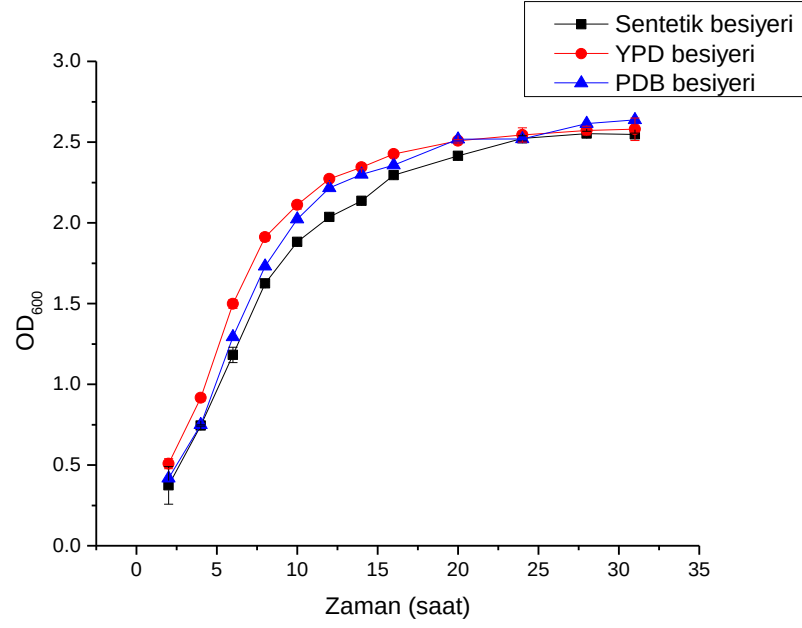
4.1. Mikroorganizmanın Büyütülmesi

Yarrowia Lipolytica MGW399 suşu YPD yatık agar besiyerinde 4°C'de stoklanmıştır. Çalışma süresince bu besiyerinden YPD besiyerine inokülasyon yapılmıştır. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1: Petride büyütülen *Yarrowia lipolytica* MGW399 kolonileri.

Mikroorganizmanın büyütülmesinde YPD, PDB ve sentetik besiyerleri kullanıldı ve büyüme eğrileri Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



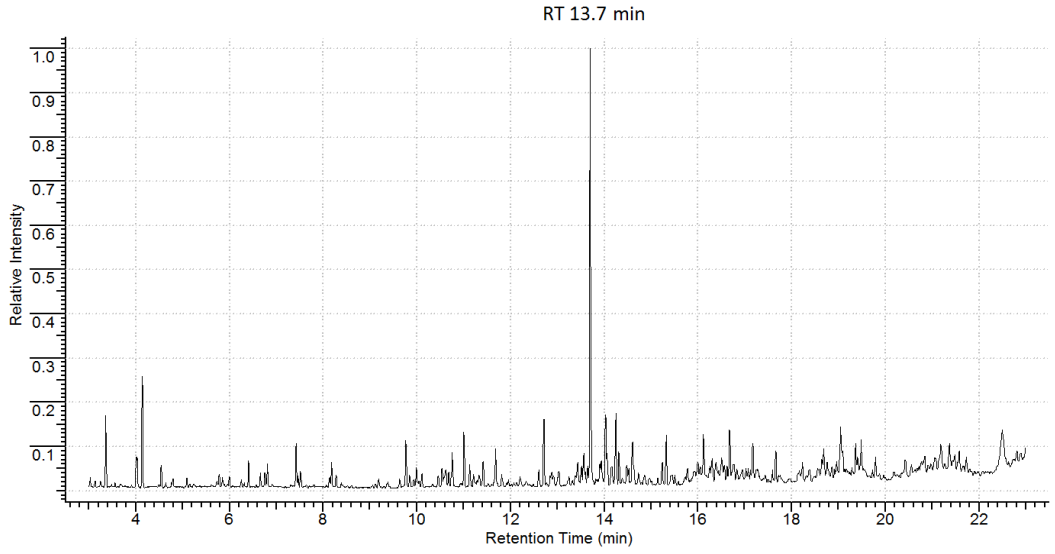
Şekil 4.2: Değişik besiyerleride büyütülen *Yarrowia lipolytica* optik yoğunluk değerleri.

İlk saatlerde sentetik besiyerinde optik yoğunluk daha düşük olmasına rağmen ilerleyen saatlerde değerler birbirine yaklaştı. Değişik besiyerleri kullanılmasına rağmen 24. saatten sonra hücre büyümesi açısından bir fark görülmemiştir.

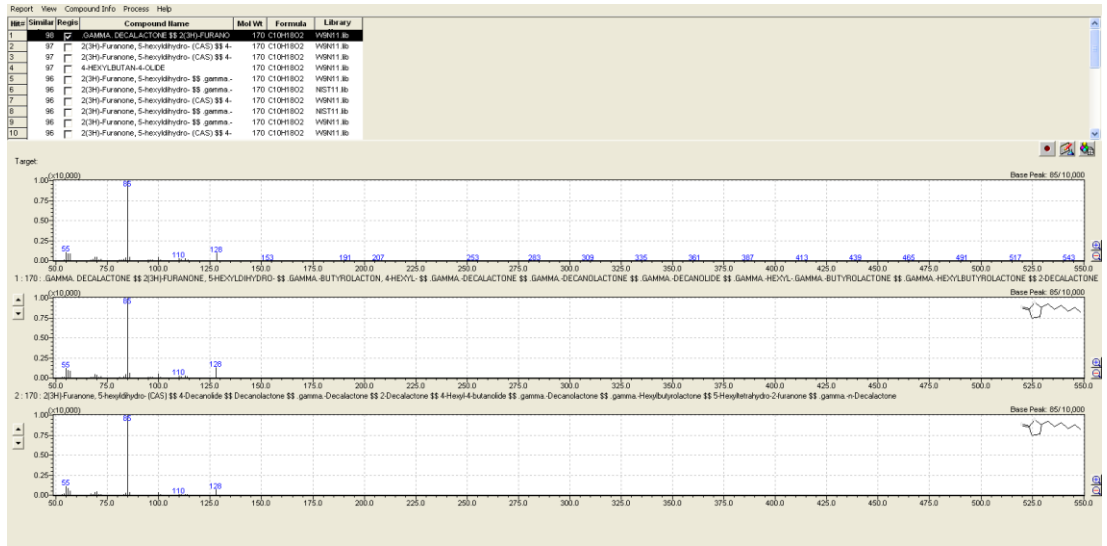
4.2. γ -Dekalaktonun GC-MS Analizi

Şekil 4.3'deki kromatogram incelendiğinde ürün üretim besiyerinden ekstrakte edilen numunenin yüksek saflıkta olduğu ve analiz sonucunda belirlenen pikin γ -dekalaktona ait olduğu belirlenmiştir.

Analiz sonucu elde edilen kromatogram Şekil 4.3'de verilmiştir.



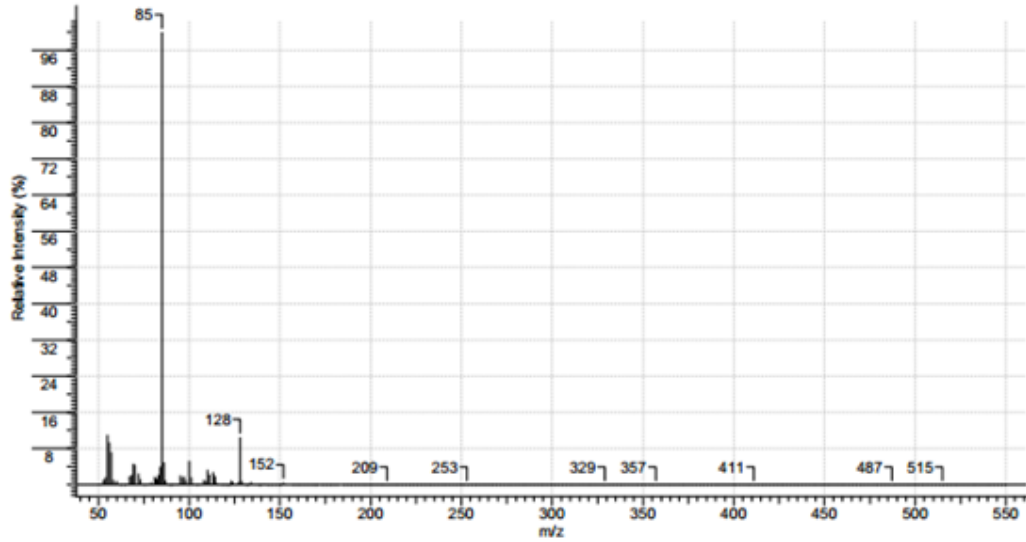
Şekil 4.3: Saflaştırılmış ürüne ait gaz kromatografisi (GS) sonucu.



Şekil 4.4: Saflaştırılan ürünün kütle spektrometresi (MS) benzerlik analizi sonucu.

Şekil 4.3’de görülen ve kolonda tutulma süresi 13.7 min.ve molekül ağırlığı 170 olan pikin, (Şekil 4.4) kütle spektrometresi benzerlik analizi incelendiğinde W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre %98 benzerlikle γ -dekalaktona ait olduğu belirlenmiştir. Bu pike ait detaylı kütle spektrumu Şekil 4.5’te verilmiştir.

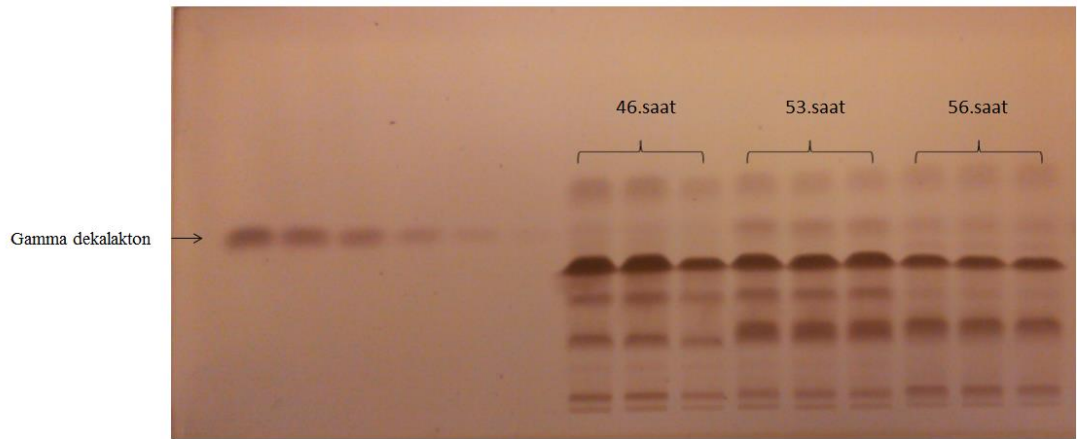
Saf γ -dekalakton şeftali kokusundadır. Elde ettiğimiz saf ürününde aynı kokuya sahip olduğu görüldü



Şekil 4.5: Saflaştırılan ürünün kütle spektrumu.

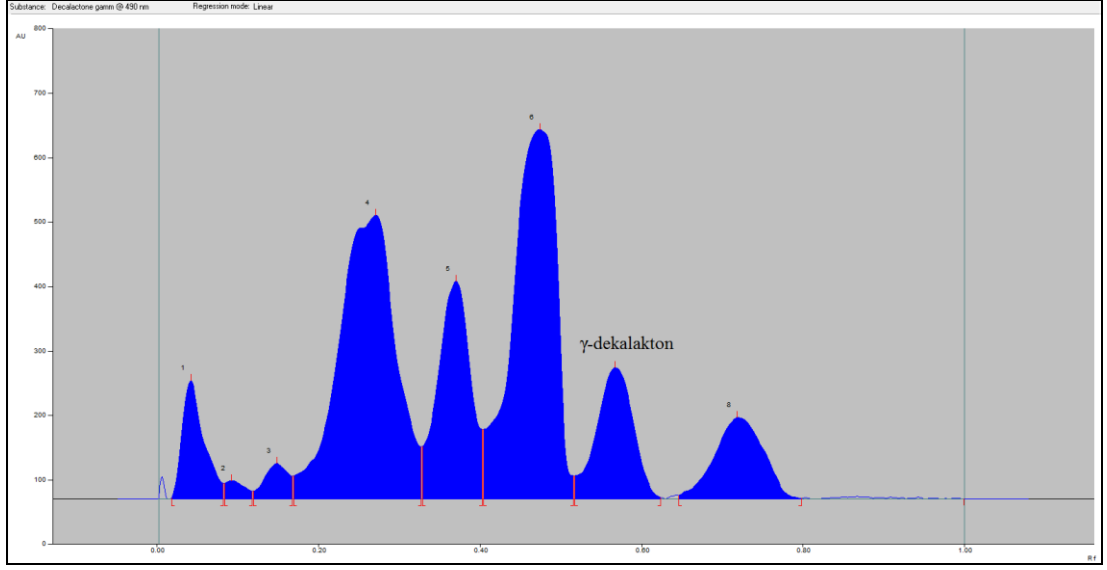
4.3. γ -Dekalaktonun HPTLC-Densitometre Analizi

Üretilen γ -dekalaktonun miktar analizi HPTLC-densitometre (Camag) ile yapıldı. Elde edilen ürünlere ait TLC analizi Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



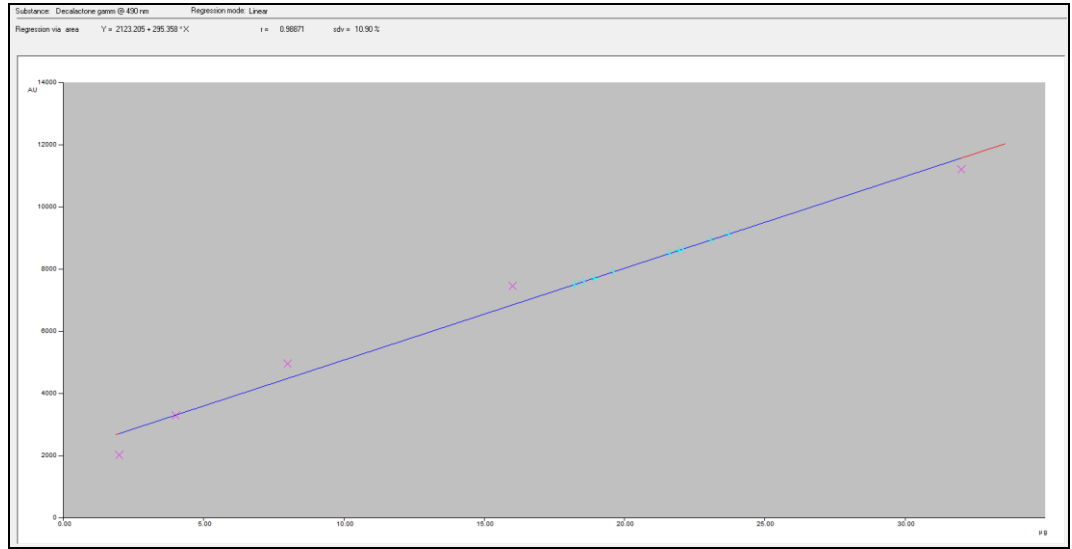
Şekil 4.6: γ -dekalakton üretim besiyerinden ekstrakte edilen ürünlerin TLC analizi.

Ekstrakte edilen ürünlere ait HPTLC- densitometre kromatogramı Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: γ -dekalakton üretim besiyerinden ekstrakte edilen numuneye ait kromatogram.

Saf γ -dekalakton çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi 2–32 $\mu\text{g}/\text{spot}$ konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Hesaplanan korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9887$, kalibrasyon eğrisi denklemi $Y = 2123.205 + 295.358 \cdot X$ 'tir (Şekil 4.8).

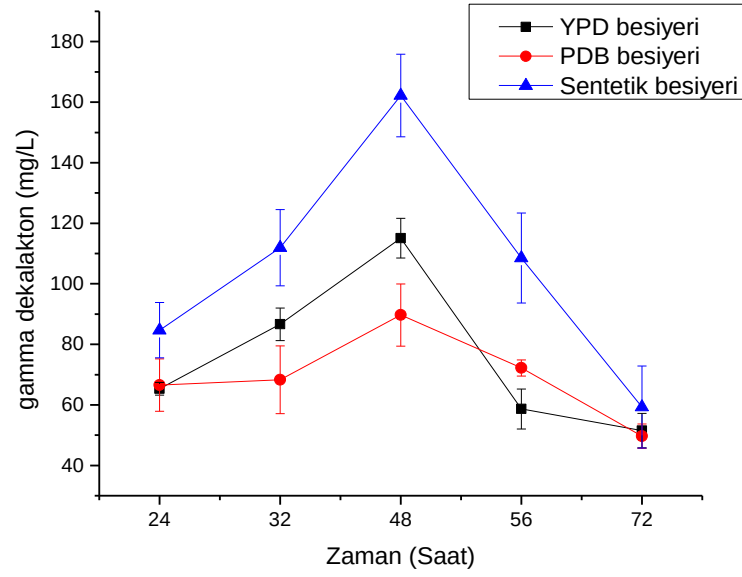


Şekil 4.8: γ -dekalaktonun kantitatif hesaplamalarında kullanılan kalibrasyon grafiği.

4.4. Üretim Optimizasyonu

4.4.1. Büyüme Besiyerinin Verime Etkisi

Mikroorganizma YPD, PDB ve sentetik besiyerine inoküle edildi ve büyütüldü. Farklı büyüme besiyerlerinde mikroorganizma tarafından üretilen γ -dekalakton miktarları tespit edildi (Şekil 4.9).

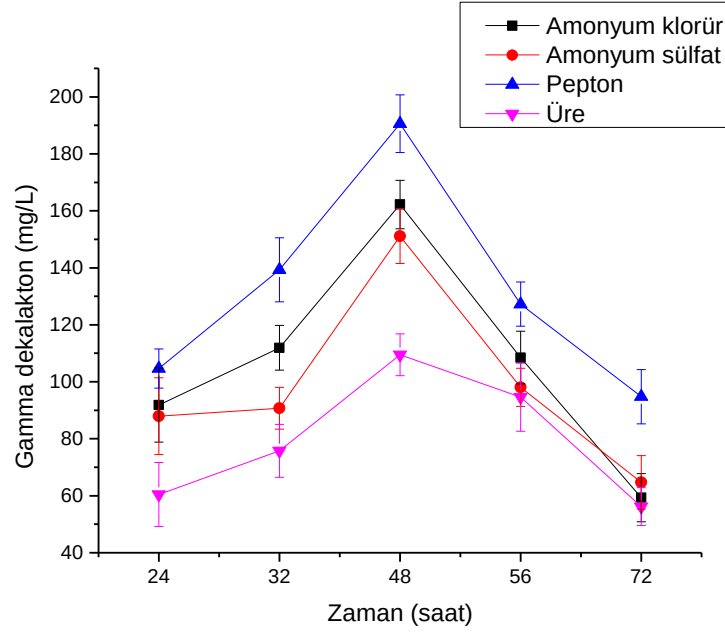


Şekil 4.9: Farklı büyüme besiyerlerinin *Yarrowia lipolytica*'nın ürettiği γ -dekalakton miktarına etkisi.

Mikroorganizmanın, PDB, YPD ve sentetik besiyerlerindeki büyüme eğrileri birbirine çok yakın olmasına rağmen Şekil 4.9'da görüldüğü gibi en yüksek γ -dekalakton, sentetik besiyerinde büyütülen mikroorganizmadan elde edilmiştir (162 mg/L). Bu nedenle çalışmaya sentetik besiyeri kullanılarak devam edildi.

4.4.2. Azot Kaynağının Verime Etkisi

Farklı azot kaynaklarının γ -dekalakton üretimine etkisi Şekil 4.10'da verilmiştir.

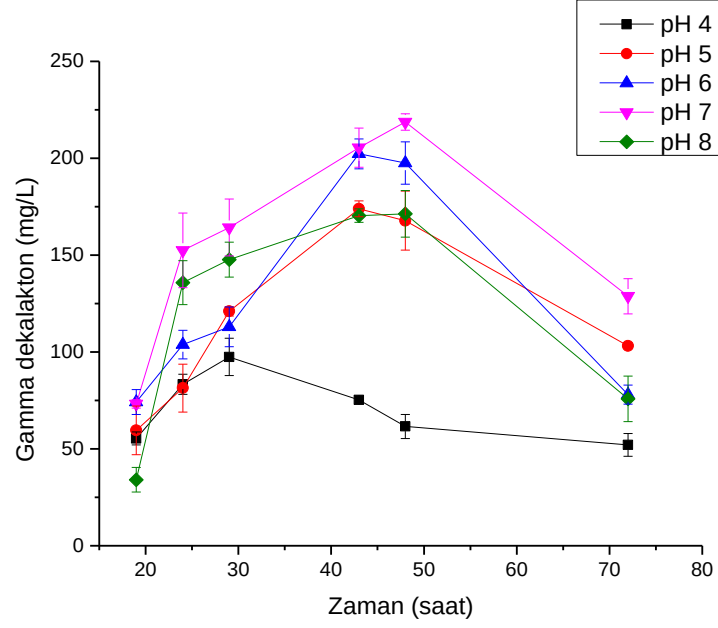


Şekil 4.10: Azot kaynağının γ -dekalakton miktarına etkisi.

En düşük miktar üre ile elde edilirken en yüksek γ -dekalakton üretimi azot kaynağı olarak pepton içeren besiyeri ortamında olmuştur. Gamma dekalakton üretiminde çoğunlukla amonyum klorür olmak üzere üre ve peptonun azot kaynağı olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Yanqiong ve arkadaşları azot kaynağı olarak pepton kullandıkları çalışmalarında 900mg/L, Erandi ve arkadaşları azot kaynağı olarak amonyum klorür kullandıkları çalışmalarında ise 360 mg/L ürün elde etmişlerdir [21, 40, 41]. Tez çalışmasında amonyum klorür kullanarak elde edilen 162 mg/L olan γ -dekalakton miktarını pepton ile 190.5 mg/L'ye çıkarıldı.

4.4.3. pH'nın Verime Etkisi

Besiyeri başlangıç pH'sının verime etkisi 4-8 aralığında çalışılarak incelendi. (Şekil 4.11)

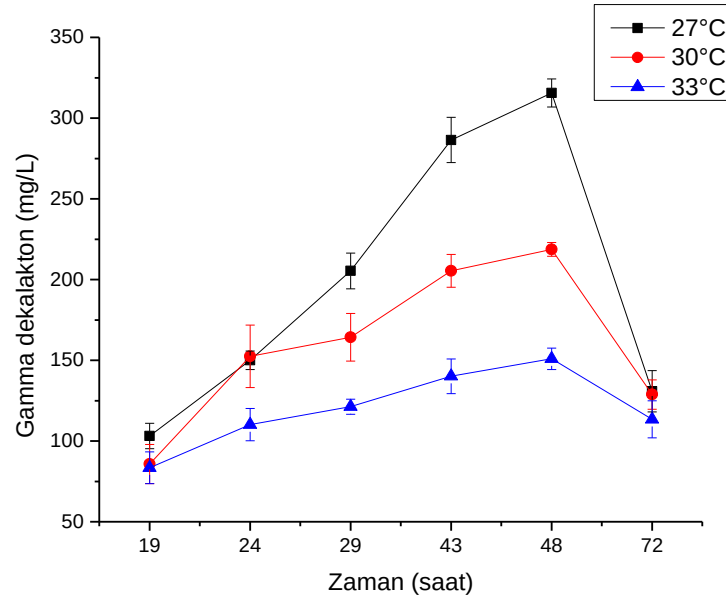


Şekil 4.11: Başlangıç pH değerinin dekalakton üretimine etkisi.

Gamma dekalakton üretiminde çok farklı türde mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Shiove ve arkadaşları *Sporidiobolus salmonicolor* ile γ -dekalakton üretiminde pH 4-8 aralığında çalışmış ve en iyi verimi pH 4'te elde etmişlerdir [42]. Géssyca, *Yarrowia lipolytica* CCMA 0357 ile yaptığı çalışmasında pH 7'de, Hamideh ise *Y. lipolytica* DSM 3286 ile pH 6'da yüksek verimler elde etmişlerdir. *Yarrowia lipolytica* ile yapılan çalışmalarda pH 6-7 aralığında yüksek verimlerin elde edildiği birçok çalışma mevcuttur [23, 43]. Bu çalışmada elde edilen değer, literatürde bu mikroorganizmanın farklı suşları ile elde edilen değerlerle uyumludur. Bu aşamada en yüksek γ - dekalakton miktarına (218 mg/L) başlangıç pH değeri 7 olan besiyerinde ulaşıldı (Şekil 4.11).

4.4.4. Sıcaklığın Verime Etkisi

En yüksek verim 27°C inkübasyon sıcaklığında elde edildi. (Şekil 4.12)

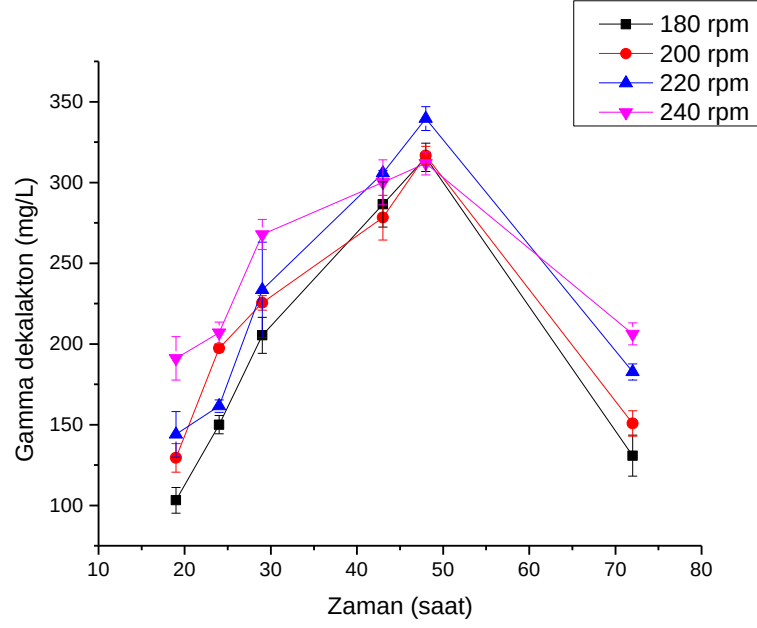


Şekil 4.12: Sıcaklığın γ -dekalakton verimine etkisi.

Bu sonuçlar, sıcaklığın *Yarrowia lipolytica* mayasının γ -dekalakton üretimi için kritik bir parametre olduğunu göstermektedir. Literatürde *Yarrowia lipolytica*'nın farklı suşları ile yapılan çalışmalarda 27-30°C aralığında birbirinden çok farklı verimler elde edilmiştir. Hamideh ve arkadaşları *Y. lipolytica* (DSM 3286) ile 29°C'de yaptıkları çalışmalarında en yüksek 220 mg/L ürün elde etmişlerdir [44]. Nelma ve arkadaşları substrat olarak hidrolize hint yağı kullandıkları çalışmalarında *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC20460) ile 27°C'de 1839 mg/L ürün elde etmişlerdir [45]. Shiow ve arkadaşları ise immobilize *Sporidiobolus salmonicolor* CCRC 21975 ile yaptıkları çalışmalarında 25°C'de 120 mg/L γ -dekalakton elde etmişlerdir [46].

4.4.5. Karıştırma Hızının Verime Etkisi

En yüksek verim 220 rpm karıştırma hızında 339 mg/L elde edildi (Şekil 4.13).

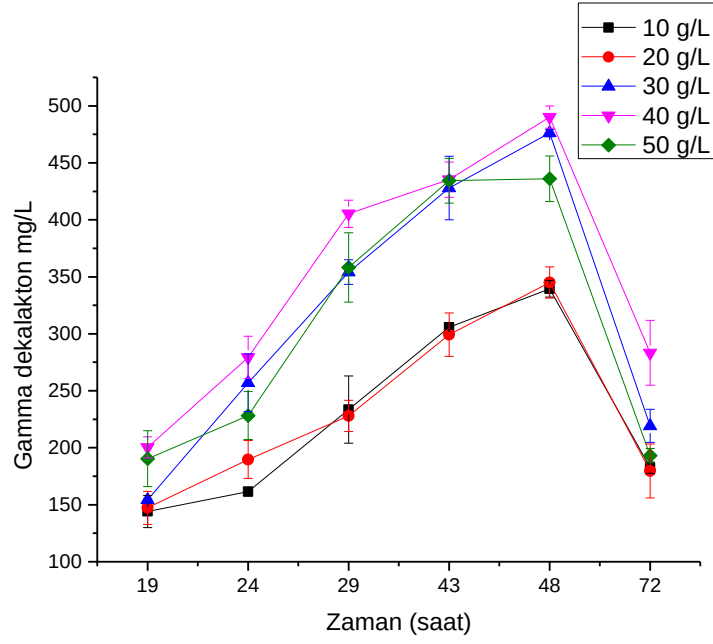


Şekil 4.13: Karıştırma hızının γ -dekalakton verimine etkisi.

20.saatte görüldüğü üzere karıştırma hızının γ -dekalakton üretimine büyük bir etkisi vardır. Bunun nedeni yüksek hızda çözünen oksijen miktarının fazla olması, substrat ve nutrientlerin mikroorganizma tarafından daha etkin bir şekilde alınmasıdır. 48.saatte ise 240 rpm karıştırma hızındaki besiyerlerindeki γ -dekalakton miktarının 220 rpm hızında karıştırılan besiyerlerinden daha düşük olması mikroorganizmanın nutrientleri hızla tüketmesinden kaynaklanmaktadır. Braga ve arkadaşları da 400, 500 ve 650 rpm karıştırma hızlarını kıyasladıkları çalışmalarında ilk saatlerde en yüksek miktarı 650 rpm hızında elde etmelerine rağmen en yüksek γ -dekalakton miktarını ilerleyen saatlerde 400 rpm karışma hızında elde etmişlerdir [47]. Çalışmada en yüksek verim 48. saatte 220 rpm karıştırma hızında elde edildi.

4.4.6. Hint Yağı Miktarının Verime Etkisi

En yüksek verim 40g/L hint yağı içeren besiyerinde elde edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Hint yağı miktarının γ -dekalakton verimine etkisi.

Elde edilen verilere göre 10g/L ve 20g/L hint yağı içeren besiyerlerindeki γ -dekalakton miktarı 30g/L, 40g/L ve 50g/L hint yağı içeren besiyerlerine göre çok düşük kalmıştır. Bu sonuçlar 10-20g/L aralığındaki substrat miktarının yetersiz olduğunu göstermektedir. 30g/L ve 40g/L hint yağı içeren besiyerlerinden elde edilen γ -dekalakton miktarı birbirine yakın olmakla birlikte en yüksek ürün 40g/L hint yağı içeren besiyerinden elde edildi (490 mg/L). Nelima yaptığı tez çalışmasında 10, 30 ve 50g/L başlangıç substrat miktarı ile yaptığı çalışmasında en yüksek verimi 30g/L ile elde etmiştir. Flasklarda yaptığı çalışmasında besiyerlerindeki lipaz aktivitesini ölçerek en iyi lipaz aktivitesini 30g/L substrat içeren numunede bulmuştur. 50g/L substrat içeren besiyerindeki düşük verimi mikroorganizmanın ürettiği lipazın bu konsantrasyonda enzim aktivitesini kaybetmesine bağlamıştır [27].

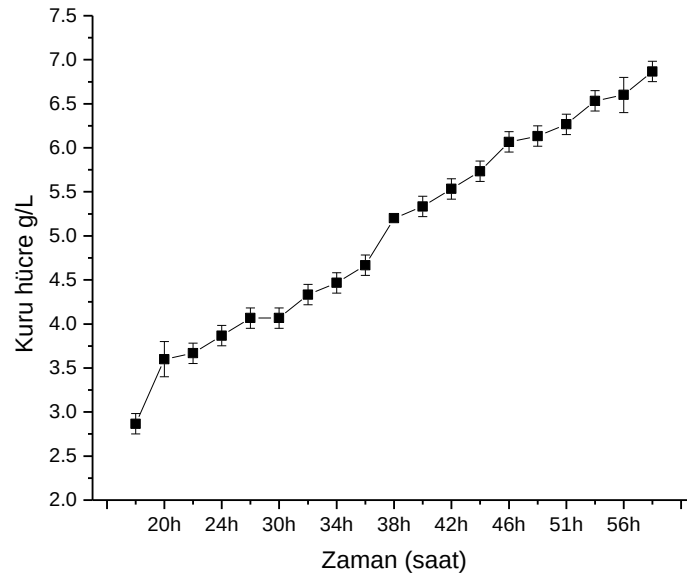
4.4.7. Optimum Şartlarda Üretim

Elde edilen optimum şartlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: γ -dekalakton üretim şartları.

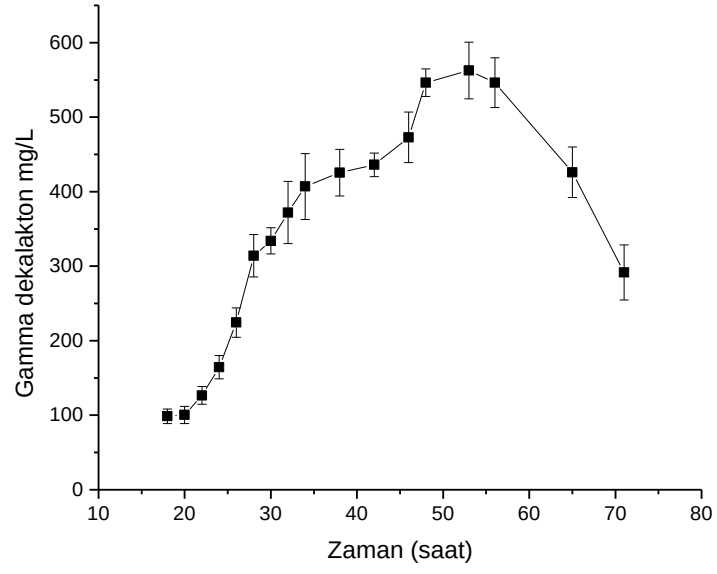
Besiyeri	Sentetik besiyeri
Azot kaynağı	Pepton
pH	7
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	27
Karıştırma hızı (rpm)	220
Substrat miktarı (g/L)	40

Optimum şartlarda üretim gerçekleştirildi ve besiyerinden alınan numunelerde kuru hücre (Şekil 4.15) miktar tayini yapıldı.



Şekil 4.15: Optimum şartlarda büyütülen *Yarrowia lipolytica* kuru hücre miktarının zamanla değişimi.

Optimum şartlarda yapılan üretim sonucu elde edilen γ -dekalakton miktarı Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16: Optimum şartlarda büyütülen *Yarrowia lipolytica* γ -dekalakton miktarı.

Üretim sonucunda 53. saatte 562 mg/L γ -dekalakton elde edildi. Bu satten sonra ürün mikroorganizma tarafından tüketilmeye başlandı ve 72. saate 280 mg/L seviyesine kadar düştü.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, *Yarrowia Lipolytica* MGW399 suşunun γ -dekalakton üretimini gerçekleştirdiği belirlendi ve üretim için optimizasyon çalışması yapıldı. Literatürde yapılan birçok çalışmada γ -dekalaktonun kantitatif analizi GS-FID ile kalitatif analizi ise GS-MS ile yapılmıştır [45, 48]. Bu çalışmada ise literatürden farklı olarak γ -dekalaktonun kantitatif analizi HPTLC-densitometre ile kalitatif analizi ise GC-MS ile yapıldı.

Gamma dekalakton verim artışı için YPD, PDB ve Wache tarafından geliştirilen sentetik büyüme besiyeri kullanıldı [29]. Büyüme besiyerlerinin farklı olması mikroorganizmanın büyüme eğrisinde belirgin bir farklılık oluşturmazken ürün üretiminde ciddi farklılara neden oldu. Sentetik besiyeri kullanıldığında YPD besiyerine kıyasla %40 daha fazla ürün elde edildi. Gamma dekalakton üretimine azot kaynağı etkisini incelemek için amonyum sülfat, amonyum klorür, pepton ve üre ile hazırlanan besiyerleri arasında en yüksek verim pepton ile elde edildi. Amonyum klorüre kıyasla %17 daha fazla ürün elde edildi.

Başlangıç pH seviyesinin γ -dekalakton üretimine etkisini incelemek için başlangıç pH değerleri 4, 5, 6, 7 ve 8'e ayarlanan besiyerlerinde en yüksek üretim başlangıç pH'sı 7 olan besiyerinde, pH 6'da yapılan üretime kıyasla %15 daha fazla elde edildi.

Sıcaklık etkisi için 27°C, 30°C ve 33°C'de yapılan üretimler sonucunda en yüksek miktar 27°C'de elde edildi. 30°C'de yapılan üretime kıyasla %44 daha fazla ürün elde edildi.

Karıştırma hızının γ -dekalakton üretimine etkisi 180, 200, 220 ve 240 rpm karıştırma hızlarında incelenerek en yüksek ürün 220 rpm'de elde edildi. 180 rpm karıştırma hızına oranla %8 verim artışı sağlandı.

Son parametre olarak substrat miktarının γ -dekalakton üretime etkisi 10g/L, 20g/L, 30g/L, 40g/L ve 50g/L hint yağı içeren besiyerlerinde üretim yapılarak incelendi. En yüksek ürün 40g/L hint yağı içeren besiyerinden elde edildi. 10g/L başlangıç substrat miktarına oranla %44 verim artışı sağlandı.

Sonuç olarak optimizasyon sonucunda elde edilen parametrelere göre yapılan üretim 18- 72 saat aralığında takip edildi ve en yüksek γ -dekalakton miktarı 53. saatte 562 mg/L olarak ölçüldü.

Literatürde *Yarrowia Lipolytica* ile yapılan çalışmalarda verim artışı için genetik müdahalelerin yapıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda 7 kata kadar verim artışları elde edilmiştir [29, 40, 49]. Gelecek çalışmalarda *Yarrowia Lipolytica* MGW399 suşu da genetik müdahalelerle daha verimli hale getirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Romero-Guido, C., Belo, I., Ta, T.M., Cao-Hoang, L., Alchihab, M., Gomes, N., Thonart, P., Teixeira, J.A., Destain, J., Wache, Y., (2011), "Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds", *Appl Microbiol Biotechnol*, 89 (3), 535-47.
- [2] Aran, N., (2012), "Gıda Biyoteknolojisi", 6. Baskı, Nobel Akademik Yayıncılık.
- [3] Web 1, (2012), <https://www.researchandmarkets.com>, (Erişim Tarihi: 11/12/2017)
- [4] Yılmaztekin, M., Cabaroğlu, T., Erten, H., (2008), "Biyoteknolojik Yollarla Aroma Maddelerinin Üretimi", *Gıda Dergisi*, (2008) 33 (1):35-41.
- [5] Yılmaztekin, M., (2009), "Biyoteknolojik Yoldan Doğal İzomal Asetat ve Etil Asetat Aromalarının Üretimi Üzerinde Araştırmalar", Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- [6] Longo, M.A., Sanroman, M.A., (2006), "Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies", *Food Technology and Biotechnology*, 44 (3), 335-353.
- [7] Sezgin, D., (2009), "İki Farklı Ticari Şarap Mayasının Portakal Şarabının Aroma Maddeleri Bileşimi Üzerine Etkisi", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi
- [8] Alvim, R.P.R., Gomes, F.D.O., Garcia, C.F., Vieira, M.D.A., Machado, A.M.D., (2017), "Identification of volatile organic compounds extracted by headspace solid-phase microextraction in specialty beers produced in Brazil", *Journal of the Institute of Brewing*, 123 (2), 219-225.
- [9] Graf, N., Altenbuchner, J., (2014), "Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid", *Appl Microbiol Biotechnol*, 98 (1), 137-49.
- [10] Schrader, J., Etschmann, M.M., Sell, D., Hilmer, J.M., Rabenhorst, J., (2004), "Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds--current industrial processes and future prospects", *Biotechnol Lett*, 26 (6), 463-72.
- [11] Lesage-Meessen, L., Lomascolo, A., Bonnin, E., Thibault, J.F., Buleon, A., Roller, M., Asther, M., Record, E., Ceccaldi, B.C., Asther, M., (2002), "A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran", *Appl Biochem Biotechnol*, 102-103 (1-6), 141-53.
- [12] Harzevili, F.D., Chen, H., (2015), "Microbial Biotechnology: Progress and Trends", CRC Press.

- [13] Taylor, A.J., Linforth, R.S.T., (2010), "Food Flavour Technology", 2nd Edition, Wiley-Blackwell Press.
- [14] Lopes, D.B., Macedo, G.A., (2012), "Biotransformation of γ -decalactone and γ -caprolactone by *rhizopus* sp. using castor and linseed oils", *New Biotechnology*, 29, S83.
- [15] An, J.U., Oh, D.K., (2013), "Increased production of gamma-lactones from hydroxy fatty acids by whole *Waltomyces lipofer* cells induced with oleic acid", *Appl Microbiol Biotechnol*, 97 (18), 8265-72.
- [16] Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B., (1999), "Organic Chemistry", 7th Edition, John Wiley Sons Press.
- [17] Labuda, I., (2009), "Flavor Compounds", *Encyclopedia of Microbiology*, Third Edition, Academic Press.
- [18] Okamoto, K., Chimori, M., Iwanaga, F., Hattori, T., Yanase, H., (2002), "Production of γ -lactones by the brown-rot basidiomycete *Piptoporus soloniensis*", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, Issue 2, 182-185.
- [19] Farbood, M.I., Willis, B.J., (1985), "Production of γ -decalactone", U.S. Patent US4560656 A.
- [20] Cardillo, R., Fuganti, C., Sacerdote, G., Barbeni, M., Cabella, P., Squarcia, F., (1990), "Process for the microbiological production of gamma (R) decanolide and gamma (R) octanolide", U.S. Patent US4950607 A.
- [21] Haarmann and Reimer GmbH, (2002), "Method of producing γ -decalactone using *Yarrowia lipolytica* strain HR 145 (DSM 12397)", U.S. Patent US6451565 B1.
- [22] Nicaud, J.M., Le Clainche, A., Le Dall, M.T., Wang, H.J., Gaillardin, C., (1998), "*Yarrowia lipolytica*, a yeast model for the genetic studies of hydroxy fatty acids biotransformation into lactones", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 5 (1-4), 175-181.
- [23] Soares, G.P.A., Souza, K.S.T., Vilela, L.F., Schwan, R.F., Dias, D.R., (2017), " γ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica* and *Lindnera saturnus* in crude glycerol", *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 2017.
- [24] Neto, R.S., Pastore, G.M., Macedo, G.A., (2004), "Biocatalysis and biotransformation producing gamma-decalactone", *Journal of Food Science*, 69 (9), C677-C680.
- [25] Pagot, Y., Endrizzi, A., Nicaud, J.-M., Belin, J.-M., (1997), "Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve g-decalactone production yields", *Letters in Applied Microbiology*, 25, 113-116.
- [26] Goncalves, F.A., Colen, G., Takahashi, J.A., (2014), "*Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry", *Scientific World Journal*, 476207.

- [27] Gomes, N.C.R.L, (2011), “Biotransformation of ricinoleic acid into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica* : bioprocess optimization”, Doktora Tezi, University of Minho.
- [28] García, E.E., Aguedo, M., Gomes, N., Choquet, A., Belo, I., Teixeira, J.A., Belin, J.-M., Waché, Y., (2009), “Production of 3-hydroxy γ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 (1-4), 22-26.
- [29] Wache, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I.L., Nicaud, J.M., Belin, J.M., (2001), “Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*”, *Appl Environ Microbiol*, 67 (12), 5700-4.
- [30] Aguedo, M., Waché, Y., Coste, F., Husson, F., Belin, J.-M., (2004), “Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricinoleate into γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29 (1-6), 31-36.
- [31] Braga, A., Belo, I., (2015), “Production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90 (3), 559-565.
- [32] Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F., Belo, I., (2010), “*Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse”, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 930.
- [33] Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2008), “Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media”, *Bioresour Technol*, 99 (7), 2419-28.
- [34] Harzevili, F.D., (2014), “Biotechnological Applications of the Yeast *Yarrowia lipolytica*”, 2014 edition, Springer.
- [35] Bankar, A.V., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S., (2009), “Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 84 (5), 847-65.
- [36] F. A. G. Gonçalves, G.C., 1 and J. A. Takahashi², (2017), “*Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry”, *Preparative Biochemistry And Biotechnology*, 47, 633-637.
- [37] Zinjarde, S.S., (2014), “Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*”, *Food Chem*, 152, 1-10.
- [38] CAMAG Inc., (1972), “CAMAG is TLC”, *Anal. Chem.*, 1972, 44 (7), 71A–71A.
- [39] Şemen, S., (2009), “Cypermethrinin Toprak Örneklerinden Hptlc Yöntemi ile Tayini”, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi*.

- [40] Yanqiong, G., Song, H., Wang Z., Yongzhi, D., (2011), "Expression of POX2 gene and disruption of POX3 genes in the industrial *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production", *Microbiol Res.* 2012 Apr 20;167(4):246-52. doi: 10.1016/j.micres.2011.10.003.
- [41] Escamilla-García E., O'Riordan, S., Gomes, N., Aguedo, M., Belo, I., Teixeira, J., Belin, J.-M., Waché, Y., (2014), "An air-lift biofilm reactor for the production of γ -decalactones by *Yarrowia lipolytica*", *Process Biochemistry*, 49, Issue 9, September 2014, 1377-1382.
- [42] Lee, S.-L., Cheng, H.-Y., Chen, W.-C., Chou, C.-C., (1999), "Effect of physical factors on the production of γ -decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*", *Process Biochemistry*, 34 (8), 845-850.
- [43] Moradi, H., Asadollahi, M.A., Nahvi, I., (2013), "Improved γ -decalactone production from castor oil by fed-batch cultivation of *Yarrowia lipolytica*", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2- 1, 64-68.
- [44] Zinjarde, S.S., (2014), "Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*", *Food Chemistry*, 152, 1 June 2014, 1-10.
- [45] Gomes, N., Braga, A., Teixeira, J.A., Belo, I., (2013), "Impact of Lipase-Mediated Hydrolysis of Castor Oil on γ -Decalactone Production by *Yarrowia lipolytica*", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90 (8), 1131-1137.
- [46] Lee, S.-L., Cheng, H.-Y., Chen, W.-C., Chou, C.-C., (1998), "Production of γ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*", *Process Biochemistry*, 33 (4), 453-459.
- [47] Braga, A., Mesquita, D.P., Amarala, A.L., Ferreira, E.C., Belo, I., (2015), "Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: Differences in yeast metabolism and morphology", *Biochemical Engineering Journal*, 93, 15 January 2015, 55-62.
- [48] Waché, Y., Aguedo, M., LeDall, M-T., Nicaud, J-M., Belin, J.M, (2002), "Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β -oxidation pathway for γ -decalactone production", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20, 2 December 2002, 347-351.
- [49] Guo, Y., Feng, C., Song, H., Wang, Z., Ren, Q., Wang, R., (2011), "Effect of POX3 gene disruption using self-cloning CRF1 cassette in *Yarrowia lipolytica* on the γ -decalactone production", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (12), 2807-2812.

ÖZGEÇMİŞ

Hatice DURMUŞ, 1981 yılında İstanbul’da doğdu. 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2008-2015 yılları arasında Aromsa A.Ş’de aromatisyen olarak çalıştı. 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.