

**NARENCİYE ATIKLARININ TEK HÜCRE PROTEİN ÜRETİMİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ECE ÜMMÜ DOĞAN

**Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Çevre Mühendisliği
Ana Bilim Dalı**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mustafa ÖZYURT**

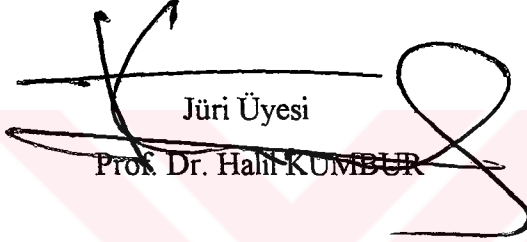
**MERSİN
HAZİRAN-2002**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy çokluğu (oy birliği) ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.



Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mustafa ÖZYURT



Jüri Üyesi
Prof. Dr. Halil KUMBUR



Jüri Üyesi

Prof. Dr. H. İbrahim EKİZ

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulunun 20/08/2002 tarih ve 2002/11-26 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. İbrahim EKİZ



Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eseleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZ

Bu çalışmada, narenciye atıkları Tek Hücre Proteini oluşturmak amacı ile kullanılmıştır. Narenciye atıkları, katı ve çürük suyu formunda olup mevsimsel olarak ülkemizde ve dünyada oluşmaktadır. Çeşitli funguslar narenciye atıklarının protein değerini yükseltmek amacı ile kullanılmıştır. Narenciye atıklarından Tek Hücre Proteini üretmek için gerekli olan optimum laboratuvar koşulları bu çalışma ile belirlenmiştir.

Substrat olarak kullanılan narenciye posaları (Portakal, Greyfurt posaları) ETAP Gıda Meyve Suyu Fabrikasından, narenciye çürük suları (Portakal, Greyfurt, Limon) ise evlerden çıkan çürük meyvelerinden alınıp narenciye meyve suyu sıkacağına sularının alınmasıyla elde edilmiştir. Fermente edilmiş çürük sularında ham protein miktarı portakal için *Aspergillus niger* kullanıldığında % 27,8, *Penicillium roquefortii* kullanıldığında % 28,7 limon için *A. niger* kullanıldığında % 34,22, *P. roquefortii* kullanıldığında % 19,9 olduğu belirlenmiştir. Çürük sularının fermentasyon sonrası kültür ortamında pH değerlerinde belirgin bir azalma ve kuru madde ağırlığında belirgin artış tespit edilmiştir.

Narenciye posalarının fermentasyonlarından elde edilen sonuçlara göre fermentasyon sonrası ham protein içeriğinin kullanılan narenciye türüne bağlı olarak değiştiği, indirgemiş şeker miktarında, kuru madde ağırlığı ve pH değerlerinde azalış olduğu tespit edilmiştir. Narenciye posalarından elde edilen sonuçlara göre ham protein içeriği portakal posasında *A. niger* kullanıldığında % 22,33., *P. roquefortii* kullanıldığında % 21,26; limon posasında *A. niger* ile % 20,07, *P. roquefortii* ile % 17,87; greyfurt posasında *A. niger* ile % 24,06, *P. roquefortii* ile % 21,19 olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Tek Hücre Proteini, Narenciye Posası, Narenciye Çürük Suyu, Atıkların değerlendirilmesi.

ABSTRACT

In this study, wastes from citrus fruits were used to produce Single Cell Protein. Wastes from citrus pulp in solid and decayed liquid forms are formed seasonally in Turkey and other parts of the World. Various fungi are used to enrich the protein value of these wastes. Optimum laboratory scale conditions required for Single Cell Protein production from citrus fruit wastes were determined in this study.

Citrus pulp (orange and grapefruit pulp) was obtained taken from ETAP Tarım Gıda Factory. To prepare Citrus decayed water (orange, grapefruit, lemon) decayed citrus was collected from home wastes and dewatered using fruit dewatering machine.

Crude protein content of fermentated decayed water for orange was determined as 27,8 % by using *Aspergillus niger* and as 28,7 % using *Penicillium roquefortii*. For lemon this value was 34,22 % found as using *Aspergillus niger* and as 19,9 % using *Penicillium roquefortii*. Following fermentation of citrus decayed water, pH was found to decrease and dry solid content was found to increase in culture conditions.

Fermentation of citrus pulp results shows that crude protein content after fermentation was changed with citrus type and also reduced sugar, dry solid content and pH values are decreased. Crude protein content of citrus pulp for orange was found to be 22,33 % by using *A. niger* and to be, 21,26 % by using *P. roquefortii*; for lemon pulp this value was 20,07 % by using *A. niger* and 17,87 % by using *P. roquefortii*; for grapefruit pulp 24,06 % by using *A. niger* and 21,19 % using *P. roquefortii* were determined.

KEY WORDS: Single Cell Protein, Citrus Pulp, Citrus Decayed Water, Evaluation of Wastes.

TEŞEKKÜR

Araştırmam sırasında her türlü desteği esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç Dr. Mustafa ÖZYURT'a, Biyoteknoloji Laboratuvarında bulunan çalkalamalı inkübatörü kullanmama izin verdiği için Yrd. Doç. Dr. Ali ÜNYAYAR'a, gerek bilgilendirme gerekse manevi olarak destek olan Yrd. Doç Dr. Nursel IŐIKLI'ya, deneylerin yapılmasına yardımcı olan sevgili İtibar ÇAKIR, Onur UYSAL, Süleyman YALÇIN ve Yařar DİLBAZ'a teşekkür ederim.

Araştırmalarım sırasında substrat olarak kullandığım atıkları temin ettiğim ETAP Tarım Gıda A.Ő. 'ye tüm yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Araştırmalarımda gerek yardım olarak gerekse manevi olarak destek olan sevgili arkadaşım Tayfun DEVECİ'ye, Emel Deniz AVCI'ya ve tüm arkadaşlarıma, tezimin her aşamasında maddi ve manevi olarak yanımda olan camımdan çok sevdiğim aileme teőekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. TEK HÜCRE PTOTEİNİ (THP) NEDİR?.....	6
2.1.1 THP Ürünlerinde Nükleik Asit Azaltılması.....	9
2.1.2 THP Ürünlerinin Aminoasitlerce Zenginleştirilmesi.....	11
2.1.3. Çeşitli Kaynaklardan Elde Edilen THP'nin Kullanılması İçin Sınırlandırmalar.....	12
2.2. THP ÜRETİMİNDE KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR.....	13
2.2.1 Bakteriler.....	15
2.2.2 Algler	16
2.2.3 Mayalar.....	19
2.2.4 Filamentli Funguslar.....	20
2.3. THP ÜRETİMİNDE KULLANILAN SUBSTRATLAR.....	24
2.3.1. THP Üretimde Kullanılan Bazı Substratlar.....	26
2.3.1.1. Alkenlerden THP üretimi.....	26
2.3.1.2. Metandan THP üretimi.....	27

2.3.1.3. Metanolden THP üretimi.....	28
2.3.1.4. Etanolden THP üretimi.....	28
2.3.1.5. Peynir altı suyundan THP üretimi.....	28
2.3.1.6. Lignoselülotik atıklardan THP üretimi.....	30
Kassava küspesi.....	30
Şeker kamışı küspesi.....	31
Narenciye atıkları	34
2.4. THP ÜRETİMİNİN ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİNDEKİ YERİ.....	36
2.4.1. Çevre Mühendisliği Açısından Önemi.....	36
2.4.2. Ekonomik Değeri.....	39
3. MATERYAL ve METOD.....	40
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR VE KÜLTÜRLERİN DEVAMLILIĞI.....	40
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN NARENCİYE ATIKLARININ HAZIRLANIŞI.....	40
3.2.1. Narenciye Çürük Sularının Elde Edilişi:.....	40
3.2.2. Narenciye Posalarının Elde Edilişi.....	40
3.2.3. Narenciye Posalarına Uygulanan Ön İşlem:.....	41
3.2.4. Besiyeri İçeriği.....	41
3.2.4.1. Narenciye çürük suyu için.....	41
3.2.4.2. Narenciye posaları için:.....	42
3.2.5. Besiyerlerinin Sterilizasyonu:.....	42
3.2.6. Besiyerinin pH'sı:.....	42
3.2.7. Besiyerine Fungus Ekimi.....	42
3.2.8. Ortam Sıcaklığı.....	43
3.2.9. İnkübasyon Süresi:.....	43
3.2.10. Biyokütlenin Ortamdan Ayrılması:.....	43

3.3 İNKÜBASYONDAN ÖNCE VE SONRA YAPILAN ANALİZLER.....	43
3.3.1. pH Ölçümü:.....	44
3.3.2. Çözünebilir Katı Madde Derişimi:.....	44
3.3.3. İndirgenmiş Şeker Analizi:.....	44
3.3.4. Toplam Şeker Analizi:.....	45
3.3.5. Toplam Azot Analizi:.....	45
3.3.6. Ham Protein Analizi.....	45
3.3.7. Non- protein Azot Analizi:.....	46
3.3.8. Kül Analizi.....	46
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	47
4.1. ÇALIŞMADA SIVI SUBSTRAT OLARAK KULLANILAN ÇÜRÜK NARENCİYE SULARI.....	48
4.2. ÇALIŞMADA YARI KATI SUBSTRAT OLARAK KULLANILAN NARENCİYE POSALARI.....	56
4.2.1. Portakal Posası.....	56
4.2.2. Limon Posası.....	62
4.2.3. Greyfurt Posası:.....	65
4.3. MALİYET ANALİZİ.....	71
4.3.1. Narenciye Çürük Suları İçin Maliyet Analizi.....	71
4.3.2. Narenciye Posaları için Maliyet Analizi.....	73
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı canlıların kütlelerini ikiye katlamak için geçen süre.....	7
Çizelge 2.2. Bazı besinlerin protein içeriğinin mikrobiyal protein içeriği ile karşılaştırılması	9
Çizelge 2.3. Mikroorganizmaların nükleik asit içeriği.....	10
Çizelge 2.4. THP ürünlerinin besinsel değerlerinin Karşılaştırılması.....	14
Çizelge 2.5. Alg, Bakteri, Maya ve Filamentli Funguslardan Üretilen THP'nin çeşitli parametrelerinin karşılaştırılması.....	15
Çizelge 2.6. Dünyada farklı bölgelerde gıda olarak kullanılan algler.....	18
Çizelge 2.7. FAO standartları ile <i>A. niger</i> 'dan elde edilen THP'nin karşılaştırılması.....	21
Çizelge 2.8. Funguslardan THP üretimi.....	23
Çizelge 3.1. Narenciye Çürük Suyuna ilave edilen kimyasal katkı maddeleri ..	41
Çizelge 3.2. Narenciye Posalarına ilave edilen kimyasal katkı maddeleri	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil.4.1. Çeşitli konsantrasyonlarda portakal çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerindeki değişim	49
Şekil 4.2. Çeşitli konsantrasyonlarda limon çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerindeki değişim	50
Şekil 4.3. Çeşitli konsantrasyonlarda portakal çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde ağırlığında değişim	52
Şekil 4.4. Çeşitli konsantrasyonlarda limon çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde ağırlığında değişim.....	52
Şekil 4.5. Portakal ve limon çürük sularında inkübasyon boyunca zamana bağlı ham protein içeriğindeki değişim.....	53
Şekil.4.6. Portakal ve limon çürük sularında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak non-protein azotundaki değişim.....	54
Şekil 4.7. Portakal ve limon çürük sularında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kül değerlerindeki değişim.....	55
Şekil 4.8. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerlerindeki değişim.....	57
Şekil 4.9. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde içeriğindeki değişim.....	58
Şekil 4.10. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak protein içeriğindeki değişim.....	58
Şekil 4.11. Portakal posasında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak indirgenmiş şeker değerindeki değişim.....	60
Şekil 4.12. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak non-protein azotundaki değişimler.....	61
Şekil 4.13. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kül içeriğindeki değişim.....	61
Şekil. 4.14. Limon posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerlerindeki değişim.....	62

Şekil. 4.15. Limon posasında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde içeriğindeki değişim.....	63
Şekil.4.16. Limon posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak ham protein içeriğindeki değişim.....	63
Şekil. 4.17. Limon posalarında inkübasyon boyunca zaman bağlı olarak indirgenmiş şeker miktarındaki değişim.....	64
Şekil.4.18. Limon posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kül içeriğindeki değişim	65
Şekil.4.19. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerlerindeki değişim.....	66
Şekil.4.20. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde içeriğindeki değişim.....	66
Şekil.4.21. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak ham protein içeriğindeki değişim.....	67
Şekil.4.22. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak non-protein azotu değerindeki değişim.....	68
Şekil. 4.23. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak indirgenmiş şeker içeriğindeki değişim.....	69
Şekil. 4.24. Greyfurt posalarında zamana bağlı olarak kül değerindeki değişim.....	69

SİMGELER KISALTMALAR

BOİ Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı

KOİ Kimyasal Oksijen İhtiyacı

THP Tek Hücre Proteini

AAOC Association of Official Analytical Chemistry (Analitik Kimya Kurumu)

ATCC American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)

TCA Trikloroasetik asit



1. GİRİŞ

Dünyadaki hızlı nüfus artışı; arz ve taleplerin büyük çoğunluğunu karşılayan üçüncü dünya ülkelerinde, besin üretim talebini arttırmıştır. Bu da zaman içerisinde açlık çeken toplulukların sayılarının artmasına neden olmuştur. Yaşanan bu problem; proteince zengin, alternatif besin kaynaklarının araştırılmasına yönelik bir eğilimi doğurmuştur. Tek hücre protein (THP) üretimi, bu yolda atılan en büyük adımlardan biridir. THP; bakteri, fungus ve alglere dayanır. Bu protein, soya ve balık gibi çok pahalı bilinen kaynaklar yerine, ana diyeteye ilave edilecek bir katkı maddesi olarak kullanılabilir. Bunun yanında tarımsal ve endüstriyel atıkların; proteince zengin gıda ve yem kaynaklarına dönüştürülmesiyle, daha ucuz ürünler elde edilmesi sağlanmaktadır. Bu tür atıkların THP üretiminde kullanılmasıyla; atık, geri kazanılan bir ürün haline dönüşebilmektedir.

Bir gıda kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanılması çoğu insan tarafından kabul edilemeyecek gibi görünebilir. Ancak insanlar ve hayvanlar tarafından, gıda olarak mikroorganizmaların kullanılması fikri global gıda problemini çözmek için yeni bir buluş değildir. Bilerek ya da bilmeyerek, yüzyıllardan beri insanlar tarafından alkollü içecekler; peynir, yoğurt, soya salçası ve buna benzer birçok ürünün üretiminde mikroorganizmalar biyokütle olarak kullanılmıştır [1]. Bugüne kadar da dünyanın büyük bir kısmında gıda ve yem üretiminde mikroorganizmaların kullanılmasına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır

Çok eski zamanlarda Afrika'da Çad Gölü yakınında yaşayan topluluklar ve Meksika'da Texcoco Gölü yakınında yaşayan Aztekler tarafından, göl suyunda yaşayan bir alg türü olan *Spirulina* hasat edildikten sonra bunları kurutarak gıda ve yem maddesi olarak kullanılmıştır [2]. Algler arasında en çok kullanılan tür olan *Spirulina*, geçmişte olduğu gibi bugün de astronotlar tarafından uzay seyahatleri sırasında gıda maddesi olarak kullanılmaktadır. Buna benzer şekilde *Chlorella* ve *Scenedesmus*'un biyokütlesi, dünyanın bir çok yerinde, özellikle kabile şeklinde yaşayan topluluklar tarafından hayvan yemi olarak kullanılmaktadırlar [3].

Mateles ve Tannenbaum'un bildirdiklerine göre [3], mikrobiyal protein olarak da anılan THP, 1968 yılında Massachusetts Institute of Technology (MIT)'de yapılan bir toplantıda kullanılmaya başlanmıştır.

Son yıllarda mikroorganizmaların birçok türünden THP üretimi yapılabilmektedir. Bunlar alg, fungus ve bakterilerdir. THP üretimi için bakteri ve fungusların kullanılması, kolay elde edilebilir atık maddeler üzerinde üretildiği zaman daha ekonomik olmaktadır. Bu organizmaların THP üretiminde kullanılmasının nedeni hızlı üremeleri ve yüksek oranda protein içermeleridir.

Mayalar ve filamentli funguslar gibi, birçok fungal tür proteince zengin gıda maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok bilinen maya türleri *Candida*, *Hansenula*, *Pithecia*, *Torulopsis* ve *Saccharomyces*'dir. THP üretimde kullanılan başlıca filamentli funguslar *Aspergillus niger*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Chrysonilia sitophilia*, *Fusarium graneorum*, *Penicillium*'un bazı türleri ve beyaz çürükçül funguslardır. Funguslarda, bol miktarda B vitamini kompleksi vardır ve bunlar %9.7'lik düşük nükleik asit içeriğine sahiptir [4].

Cellulomonas ve *Alcaligenes* THP üretiminde en çok kullanılan bakteri türleridir. Ayrıca THP üretiminde diğer bakteri türleri ve metanotrofik türlerin kullanılması ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [3]. Bakteriyel THP, proteince zengindir. Ham protein içeriği, toplam kuru ağırlığının yaklaşık % 80'i seviyesindedir. Nükleik asit içeriğinin, özellikle RNA olarak (kuru halde) oldukça yüksek olup, % 15-16 gibi oldukça yüksek bir değerde olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel THP, temel aminoasitlerden olan metionin açısından zengin olup, % 2.2-3 arasında metionin içermektedir [2, 4]. Ancak Bakteriyel THP üretimi ekonomik açıdan uygun değildir. Çünkü bakterilerin protein miktarlarının yüksek olmasının yanında, hücrelerinin küçüklüğünden dolayı ortamdan ayrılmaları maliyeti arttırmaktadır [5].

Algler de THP üretiminde kullanılmakta olup, kullanılan başlıca türler *Alaria*, *Ascophylluem*, *Fucus*, *Laminaria*, *Caulerpa rosemosa*, *Durvillea antartica*, *Ulva*, *Laminaria*, *Nostoc*, *Pelwtia*, *Rhodymenia*, *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Synchococcus*, *Sargassum*, *Oedogonium*'dur [6, 7]. Alglerin gelişimi için gerekli olan ana substratlar karbondioksit ve güneş ışığıdır. Ayrıca algler; protein, yağ ve A,B,C,D ve E vitaminleri açısından zengindir. *Dulse* türü alglerde, portakaldakinin yarısı kadar C vitamini bulunmakta olup, *Fucoids* ve *Porphyra* da aynı şekilde C vitamini açısından zengindir. Anupama ve Ravindra [3] tarafından bildirildiğine göre, alglerden elde edilen THP'nin sığırlarda süt verimliliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Algler çok iyi besin kaynakları olmasına karşın, insanlar tarafından bunların kullanılmasında birçok sınırlandırmanın yapılması gerekmektedir. Bunlardan biri, algal hücre duvarının bulunmasıdır. İnsanlarda selüloz enzimi olmadığından algal hücre duvarının bir parçası olan selüloz parçalanamaz. Bu nedenle eğer bu ürün insan gıdası olarak kullanılacaksa, algal THP'nin ön işlemden geçirilerek, hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Büyük ve küçük baş hayvanların işkembelerinde yaşayan selüloz parçalayıcı bakteri ve protozoaların varlığından dolayı insanlarda olduğu gibi bir ön işlem yapılmaksızın algal THP gerek yem gerekse yem katkı maddesi olarak kullanılabilir. Diğer sınırlayıcı özellik ise, algal üretim dış ortamda yapıldığından üretim iklimsel koşullara bağlıdır.

Birçok kaynaktan elde edilen THP'nin kullanılabilirliğini; besin değeri ve içeriği ile ilgili parametreler belirler. Bu parametreler; nütrientler, vitaminler, azot, karbonhidratlar, yağlar, hücre duvarı, nükleik asitler, protein ve aminoasit profilidir. THP'lerinin hayvan yem katkı maddesi veya insan gıdası olarak kullanılabilmesi için bu parametrelerin belirlenmesine yönelik analizlerin mutlaka yapılması gerekmektedir. Burada gıda ve yem olarak belirli bir türün kullanılabilirliği ise, bu türün gelişme hızına, substrat kullanımına, kontaminasyonuna ve toksin içermemesine bağlıdır.

Mikrobiyal biyokütle THP üretiminde; katı, sıvı ve batık fermentasyon tipleri kullanılmaktadır. Fermentasyondan sonra ise biyokütle alınmakta ve yıkanıp, kurutulmakta ve hayvan yemine karıştırılmakta veya doğrudan doğruya hayvan yemi

olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu THP ürünlerine, protein ekstraksiyonu ve saflaştırılması gibi çeşitli işlemler de uygulanarak çeşitli amaçlar için de kullanılabilir [3].

THP üretiminde kullanılan tarımsal ve endüstriyel atıklar arasında zeytin karasuyu, keçiyoynuzu, bagaz, sorgum, sisal, hububat atıkları, incir atıkları, kassavayı da içine alan lignoselülotik atıklar, şekerleme sanayi atıkları, petrol atıkları, peynir altı suyu, metanol, sülfür, mandıra atıkları yer almaktadır. Lignoselülotik atıklar; hemiselüloz, selüloz ve ligninin değişik kompozisyonları şeklindedir. Lignoselülotik materyalin kaynağı olarak da; odun, ot, kağıt fabrikası atıkları, şeker kamışı, buğday sapı, buğday kepeği, yarfıstığı kabuğu, meyve suyu fabrikası atıkları ve diğer tarımsal atıklar örnek olarak verilebilir. Bu kaynaklardan meyve suyu fabrikası atıkları, tarımsal atık olarak önemli bir yere sahip olup, en fazla Akdeniz kıyı ülkelerinde rastlanmaktadır. Kurutulmuş narenciye atıkları (pulp) değerli bir hayvan yemi olarak, enerji değerleri yüksektir ve sığır yemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu atıklar aynı zamanda, etilen, piruvik asit, etanol ve sitrik asit gibi organik ürünlerin üretiminde veya kurutulmuş olarak pektin ekstraksiyonunda da kullanılmaktadır. [8]. Nishio ve Nagai [3], tarafından bildirildiğine göre seçilmiş bazı mikroorganizmaların narenciye kabuklarının; azot içeriği artırılmış bir ortamda yetiştirilmesi, bu atıkların değerlendirilmesinde alternatif bir yol olmuştur. Özellikle İtalya'nın güney kıyılarında portakal ve greyfurt kabukları tarımsal atık olarak aşırı miktarlarda çıkmaktadır. [9, 10].

Narenciye atıkları, THP üretimi için en ucuz ve en uygun hammaddelerden biridir [10]. Ülkemizde daha çok Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz bölgelerinde yetiştirilmekte olup, yılda narenciye üretimi 1996 yılında 24.537.400 ton iken 2000 yılında 26.333.000 tona yükselmiştir [11]. Üretilen meyvelerin çoğunluğu iç ve dış piyasada taze meyve olarak tüketilmektedir. Meyve suyu üretiminde iki tesisten alınan verilere göre yılda yaklaşık olarak sadece portakalda 6.223 ton meyve kullanılmaktadır. Meyve suyu üretimi sonucunda ise yılda yaklaşık olarak 4.045 ton atık posa üretilmektedir [11]. İtalya'da ise yılda 1 milyon ton narenciye atığı çıkmaktadır. Bunun yanı sıra dünyada da narenciye işleme, paketlenme

endüstrilerinden kaynaklanan atıkların depolanmaları çok büyük sorun olmaktadır. Narenciye atıkları ıslak halde iken, hayvan yemi olarak kullanılmaları maliyet açısından uygun olmadığı halde, kurutulularak hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Bu atıklar; yukarıda bahsedilen değerlendirme yöntemleriyle en çok % 50 oranında değerlendirilebilmekte, kalan ise, depolama, yakma gibi çevresel ve ekonomik açıdan uygun olmayan yöntemlerle ve en önemlisi yasal olmayan şekillerde çevreye verilmektedir [9, 10].

Atıkların çevreye verilmesi ile ekolojik denge önemli ölçüde bozulduğuna göre bu atıkların değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle bölgemizde oluşan narenciye atıklarının değerlendirilmesi ile hem çevre kirliliğine karşı verilen mücadelede bir adım atılmış, hem de artan nüfus yoğunluğu ile orantılı olarak büyüyen besin açığına karşı bir kaynak oluşturulmuş olacaktır.

Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmada ülkemizde de büyük bir potansiyele sahip bir endüstriyel tarım atığı olan narenciye atıklarının THP üretimi ile değerlendirilmesi çalışılmıştır. Bu amaçla ETAP Tarım Gıda fabrikasından temin edilen portakal posası ve üretim sonucunda ayrılan portakal çürükleri kullanılmıştır. Bunun yanı sıra limon ve greyluft çürüklerinden elde edilen posalar ve çürük sularında THP üretimi araştırılmıştır. Bu amaçla mikroorganizma olarak *Aspergillus niger* ve *Penicillium roquefortii* fungusları kullanılmıştır.

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.TEK HÜCRE PROTEİNİ (THP) NEDİR?

Proteince zengin gıdaların azlığı dünyada açlıkla mücadele eden milyonlarca insanın varlığı ve dünya nüfusundaki hızlı artış, insanlığı bilinen gıda kaynaklarının yanında alternatif protein kaynağı araştırmasına yönlendirmiştir. Özellikle birinci ve ikinci dünya savaşları ve hemen ardından 1970’li yıllarda görülen dünya enerji bunalımı ve bunlara bağlı olarak ortaya çıkan enerji tüketiminde tasarruf gereksinimi, hammadde fiyatlarındaki artış, yetersiz beslenme bütün geleneksel gıda kaynaklarının optimum kullanılmasını, yeni kaynakların bulunmasını, atıkların geri kazanımını zorunlu kıldığı sırada Tek Hücre Proteini (THP) üretimi başlamıştır [8].

Mikroorganizmaların kullanılmasının ilk yazılmış kayıtları M.Ö. 2600 yılında Babylania’da ekmek olarak görülmektedir. M.Ö. 12. yüzyılda hüküm süren Hammurabi zamanında ekmek pişirmek için özel bir yol geliştirilmiştir. Mayalanmış ekmeğin keşfi Mısırlılara dayanmaktadır [3].

Bugüne kadar da dünyanın büyük bir kısmında gıda ve yem üretiminde mikroorganizmaların kullanılmasına yönelik birçok araştırma bulunmaktadır [3].

THP terimi, farklı karbon kaynaklarında gelişen alg, fungus, bakteri gibi mikroorganizmaların cansız formlarıdır [12]. THP, “insan ve hayvanlar tarafından gıda maddesi olarak kullanılmak üzere endüstriyel ölçekte geliştirilen algler, bakteriler, mayalar ve filamentli funguslar gibi mikroorganizmaların kurutulmuş formlarıdır [4] şeklinde getirilen tanımın yanı sıra “insan ve hayvan gıdalarına ilave madde olarak katılan bir bakteri, filamentli fungus veya maya biyokütlesidir” [4] gibi tanımlar da yapılmıştır. Başka bir tanıma göre; THP, insan ve hayvan beslenmesinde protein gereksinimini kapatmak amacıyla endüstriyel ve tarımsal atıkları substrat olarak kullanarak elde edilen mikrobiyal protein veya biyokütledir [8]. Oxford’un bilimsel sözlüğünde geçen tanıma göre ise; THP, ticari olarak geliştirilen

fermentasyon proseslerinde insan ve hayvan gıdası olarak; bakteri, maya, mantar veya mikroalg gibi mikroorganizmaların biyokütle parçalarının olarak üretilmesidir [13]. Anupama ve Ravidra'ya [3] göre ise THP, tarımsal ve endüstriyel atıklar üzerinde üretilip yetiştirilmiş mikroorganizmaların hücre kütlelerinin kullanılmasıdır. Mikrobiyal biyokütle, üretimi yarı katı veya katı faz fermentasyon prosesleri kullanılarak üretilmektedir. Fermentasyondan sonra ise biyokütle alınmakta ve yıkama, hücrelerin ayrılması, kurutma ve hayvan yemi olarak kullanma işlemlerini içerir. Başka bir kaynağa göre ise, THP, insanların ya da hayvanların tüketimi için büyük miktarlarda geliştirilen mikroorganizmalardan ekstre edilerek ayrılmış proteinlerdir [14]. THP üretiminde bakterilerin geliştirilmesi için kullanılan reaktörler, 100.000 litre ve daha fazla kapasiteli büyük havalandırılmalı fermentörlerdir. Şu anda ticari amaçlı THP üretimi yapan ülkeler arasında Rusya, Fransa, Finlandiya ve İngiltere bulunmaktadır.

THP, diğer protein kaynakları ile karşılaştırıldığı zaman, mikroorganizmaların birim zamanda biyokütlesini iki katına çıkarmak için geçen sürenin diğer canlılara göre daha kısa olduğu görülür (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Bazı canlıların kütlelerini ikiye katlamak için geçen süre [5, 12]

ORGANİZMA	BİYOKÜTLESİNİ İKİYE KATLAMAK İÇİN GEÇEN SÜRE
Bakteri ve maya	20-120 dakika
Filamentli Funguslar ve Algler	2-6 saat
Ot ve Bazı Bitkiler	1-2 hafta
Piliçler	2-4 hafta
Domuzlar	4-6 hafta
Sığırlar	1-2 ay
İnsanlar	3-6 ay

Atıklar üzerinde geliştirilen mikroorganizmalardan elde edilen THP ürünleri günlük yaşantımızda tükettiğimiz geleneksel protein kaynaklarından daha fazla protein içeriğine sahiptir (Çizelge 2.2.). Bunun yanı sıra THP ürünlerinin daha küçük alanlarda elde edilebilmesi, açık havada yetiştirilen algler dışında iklim koşullarından bağımsız olması, kurulan sürekli fermentörlerde sürekli olarak üretilmesi, genetik olarak kontrol altına alınabilmesi ve aynı zamanda kirlilik önlemlerinin alınmasında rolü olması gibi bilinen protein kaynaklarına göre avantajları vardır. Bu ürünün en büyük dezavantajı ise içerdiği yüksek nükleik asit oranıdır. Bu ürün insan tüketiminde kullanıldığında yüksek nükleik asit içeriği, vücutta ürik asit birikimine sebebiyet vererek gut benzeri belirtiler görülmesine neden olur [14]. Yetişkin insan diyetinde günde 2 g'dan fazla mikrobiyal protein kaynağı olmaması gerektiğinden bu ürünlerde nükleik asit azaltma çalışmaları yapılmaktadır [15].

Bir proteinin kalitesini belirlemede en önemli unsur amino asit içeriğidir. Bazı amino asitlerin ise insan ve hayvan diyetlerinde bulunması zorunludur. Bunlar; temel aminoasitler olan lösin, isolösin, valin, metionin, triptofan, lisin, treonin ve fenilalanindir. THP ürünleri üzerinde yapılan analizler mikroorganizmaların gerekli aminoasitleri yeterli seviyede içerdikleri ancak metionin seviyesinin düşük olduğunu göstermiştir. Bu nedenle THP üretimi sırasında üretilen ürünler üzerinde aminoasit zenginleştirmesinin yapılabileceği önerilmiştir. Ancak aminoasitlerce zenginleştirme ve nükleik asit azaltma işlemlerinin yapılması ek maliyet getirir.

Çizelge 2.2. Bazı besinlerin protein içeriğinin mikrobiyal protein içeriği ile karşılaştırılması [5].

BESİNLER VE MİKROORGANİZMALAR	% PROTEİN
Buğday (orta)	12,2
Patates	2,0
Soya Fasulyesi ve Ürünleri	38
Portakal	0,9
Biftek (orta yağlı)	17,5
Yumurta (tavuk)	12,4
Balık Yağca Zengin	20,0
<i>Aspergillus niger</i> M1 miseli	35
Portakal Posasında Geliştirilen Funguslar	39-42
<i>Candida utilis</i>	48-52
Denizden İzole Edilmiş Mayalar	29-41
Saf n-parafinden Elde Edilen BP Mayası	60-63
Gaz Yağından Üretilen BP Mayası	65-67
<i>Chlorella spp.</i>	45-60
Bakteriler	47-87

2.1.1 THP Ürünlerinde Nükleik Asit Azaltılması

THP'nin en önemli sorunlarından biri de yüksek orandaki nükleik asit içerikleridir. Ancak bu sorun çeşitli yöntemlerle THP'nin nükleik asit içeriklerinin daha düşük düzeye indirilmesi çalışmasıyla çözümlenmeye çalışılmıştır. Mikroorganizmaların nükleik asit içerikleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Mikroorganizmaların nükleik asit içeriği [5]

MİKROORGANİZMA	% NÜKLEİK ASİT
Algler	% 3-8
Mayalar	% 6-12
Küfler	% 10-12
Bakteriler	% 8-16

Nükleik asit içeriği yüksek bir diyetin alınması nükleik asidin parçalanması sonucunda ürik asit çıkışına yol açar. Vücutta ürik asit, insanlarda üreaz enziminin olmamasından dolayı birikir. Farklı THP' lerdeki nükleik asitler eğer gıda olarak kullanılacaksa kabul edilebilir düzeye kadar indirilmelidir. Bakteriyal THP ürünleri kuru ağırlığın %16 gibi çok yüksek nükleik asit içeriğine sahiptir. İnsanların günde 2g' dan fazla nükleik alması, böbrek taşı oluşumuna ve gut hastalığına yol açar [3, 5].

Nükleik asit içeriğinin azaltılmasıyla ilgili olarak şu yöntemler kullanılır:

- Fermentasyon sırasında nükleik asit sentezinin sınırlandırılması,
- Azaltılmış nükleik asit içeren protein izolatlarının veya konsantrelerinin üretimi,
- Çeşitli kimyasal maddelerinin faaliyeti ile bütün hücrelerden nükleik asitlerin hidrolizi ve ekstraksiyonu,
- Ekzojen ve endojen enzimlerin kullanılmasıyla.

Bu işlemlerde kullanılan mikroorganizmalar; *Paecilomyces varioti*, *Candida lipolytica*, *C. Utilis*, *C. tropicalis*, *Staphylococcus aureus'* dur.

Nükleik asitlerin yoğun bulunduğu ortamda mikrobiyal hücrelerin RNA formları hızlı bir şekilde çoğalır [2]. Maya hücrelerinin RNA içeriğinin C/N oranlarına ve kültür koşullarına bağlı olduğu bilinmektedir. Nükleik asit miktarı belli bir düzeye kadar çekilebilir. Bu amaçla 20 dakika 60-70°C'de kısa süreli sıcaklık yükseltilmesi ile endojen RNAaz'ın aktivasyonunun artırılması, nükleik asitlerin alkali hidrolizi, azot, karbon, fosfor ve çinko içeriğine göre veya kimyasal ekstraksiyonla kültür koşulların modifikasyonu ile nükleik asitler uzaklaştırılmaktadır [3].

Anupama ve Ravindra'nun [3] belirttiğine göre Taylor ve ark. gibi birçok araştırmacı hayvan yemi ve insan gıdası olarak THP ürünlerinin güvenliğini yaygın bir şekilde tartışmışlar ve nükleik asitlerin indirgenmesi için spesifik metotlar geliştirmişlerdir. Trevalyan'a göre [16] Baker's mayasının pH 1.4'de sodyum klorürle ekstraksiyonu, RNA içeriğinin azaltılmasında en etkili yöntemlerden biridir. Bunun en belirgin özelliği maya hücrelerinin çok az protein kaybına uğramasıdır. Nükleik asitlerin indirgeme çalışmaları *Brevibacterium*'daki endojen polinükleotit fosforilaz ve RNAaz, ile de sağlanabilir. Pankreatik RNAaz'ın iki çeşidi ve *Staphylococcus aureus*'un endonükleazı mısır koçanı üzerine immobilize edilerek, mayalardaki THP konsantrelerindeki nükleik asit yüzdelерinin indirgenmesinde kullanmış ve arıtmadan sonra % 6 protein kaybının yanında nükleik asit içeriği % 5-15'den % 0.5'e kadar indirilmiştir [17]. Ancak bu işlem sırasında kullanılan pankreatik RNAaz oldukça pahalıdır. Bunun yerine daha ucuz olan fosfodiesteraz enzimleri kullanılabilir [15]. Gaz yağında üretilen THP içindeki nükleik asit içeriğinin azaltılması ile ilgili metotlar Abou-Zeid ve ark. [18] tarafından rapor edilmiştir

Özyurt'un [19] bildirdiğine göre Revoy'ın yapmış olduğu çalışmada ise *C. lipolytica*, *C. tropicalis* tarafından parafin içeren besiyerinin fermentasyonu ile elde edilen proteinlerin nükleik asit yüzdesi hücre materyallerinin MeCHOH-H₂O ile ön işleminden sonra % 8'den % 2'ye düşürülmüştür. Tannenbaum ve ark. [20] mayalardaki (*C. Utilis* ve *C. intermedia*) nükleik asit konsantrasyonunu mayaların 60-70° C'de 2-20 saniye arasında ısı şoku ve daha sonra uygulanan mayanın inkübasyonu ile azaltmışlardır.

2.1.2 THP Ürünlerinin Aminoasitlerce Zenginleştirilmesi

THP'nin aminoasit analizleri, bir temel aminoasit olan metionince yetersiz olduğunu göstermiştir. Bir proteinin aminoasit içeriği bulunduğu besinin biyolojik değerini etkilemektedir. Mikroorganizmaların aminoasit içeriği üreme ortamı, havalandırma ve hücrelerin yapısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Okanishi ve Gregori [21] metionince zengin mutant mikroorganizmaların izolasyonları üzerinde çalışmışlardır. İzole ettikleri *Candida tropicalis* ATCC 1369 mutantlarının ana hücreye göre % 41 oranından daha fazla metionin içerdiği saptanmıştır. Özyurt'un [22] bildirdiğine göre Naroyanaswamy ve ark. petrolden üretilen mayaların protein verim oranlarının metionin katkısından sonra önemli bir şekilde 0,98'den 2,14'e yükseldiğini saptanmışlardır. Bu şekilde elde edilen ürünün metionin, biomin ve vitamin B₁₂ ile zenginleştirilmesi hayvanlarda % 22 oranında ağırlık artışı sağlamıştır. Bu şekilde zenginleşen maya yemdeki balık unun yerine kullanılabilir. Bu şekilde zenginleşen maya yemdeki balık unun yerine kullanılabilir.

THP ürünleri yetersiz oldukları aminoasitlerce takviye edilirse genellikle daha çok verim alınacağı şüphesizdir. Ancak bu işlemin THP üretim maliyetini etkileyeceği göz önünde tutulması gereken bir unsurdur.

2.1.3. Çeşitli Kaynaklardan Elde Edilen THP'nin Kullanılması İçin Sınırlandırmalar

Alglerin çok iyi besinsel kaynak olmasına rağmen insanlar tarafından kullanılması için birçok sınırlandırmanın olması gerekir. Bunların en önemlilerinden birisi de algal hücre duvarının bulunmasıdır. İnsanlarda selüloz enzimi bulunmamaktadır. Bu nedenle algal duvarının bir parçası olan selülozu parçalayamaz. Bu ürün insan gıdası olarak kullanılacaksa daha kolay sindirimin sağlanabilmesi için son üründen önce algal duvarın parçalanması gerekmektedir. Eğer THP hayvan yemi olarak kullanılacaksa geniş getiren hayvanlarda selülozu parçalayan simbiyotik bakteri, protozoalar onların içkembelerinde olduğundan alglerin hayvan yemi olarak kullanılması için önceden selülozun parçalanması gereksizdir. Algal üretim dış ortamda yapıldığından üretim iklimsel koşullara bağlıdır. Bu nedenle algal türlerin üretimi ve üretim koşulları önemlidir. Çok dikkat gerektiren metotlar ve örneklerin hazırlanması kontaminasyonun önlenmesi için önemlidir [3].

Özellikle *A. parasificus* ve *A. flavus* gibi fungus türlerinde mikotoksinlerin bulunması bu türlerin kullanılmasında en büyük engeldir. Hayvanlar gibi insanlarda da birçok allerjik reaksiyonların, hastalıkların ve karaciğer kanserinin olmasına neden olduğu bilinmektedir [3]. Bu nedenle mikotoksin içeren mikroorganizmalar THP üretimi için kullanılmamaktadır.

Bakteriyal THP'nin kullanılması yüksek maliyet gerektirmektedir. Bakterilerdeki protein miktarının yüksek olmasının yanında hücrelerin küçük olmaları nedeniyle ortamdaki ayrılmalara için harcama maliyeti diğer kaynaklara göre daha yüksektir. Bu nedenle bu hücrelerin santrifüj edilmesi halinde oluşan çamur flokülasyonla alınabilmektedir [3].

Algal türler düşük nükleik asit içeriğinden dolayı ticari amaçla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Eğer THP bilinen protein kaynaklarına göre tadı ve göze görünümü iyiye, yüksek besin değerine sahipse, toksik bir etkisi yoksa gıda olarak yaygın bir şekilde kullanılabilir.

2.2. THP ÜRETİMİNDE KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR

Mikroorganizmaların önemli bir potansiyeli karbonhidratları veya hidrokarbonları istenilen ürüne çevirebilmeleridir. Üretimler için gerek duyulan alan, klasik besin üretimi için gereksinim duyulan alandan daha azdır. THP üretiminde kullanılan mikroorganizmalar bakteriler, mayalar, algler ve filamentli funguslar olmak üzere dört grup altında incelenir.

Çizelge 2.4. THP ürünlerinin besinsel değerlerinin karşılaştırılması [3].

BİLEŞEN	KÜTLENİN % BİLEŞİMİ		
	ALG	FUNGUS	BAKTERİ
Ham protein	40-60	30-70	50-83
Toplam Azot	45-65	35-50	60-80
Lisin	4.6-7.0	6.5-7.8	4.3-5.8
Metionin	1.4-2.6	1.5-1.8	2.2-3.0
Yağ/lipit	5-10	5-13	8-10
Karbonhidrat	9	---	---
Pigment ve klorofil	6	---	---
Nükleik asit	4-6	9.70	15-16
Mineral tuzlar	7	6.6	8.6
Aminoasitler	----	54	65
Kül	3	----	----
Nem	6.0	4.5-6.0	2.8
Lif içeriği	3	----	----

Not: Verilerde çeşitli substrat tipleri, spesifik organizmalar ve çeşitli kültür koşulları kullanılmıştır.

----: tespit edilmemiştir.

THP üretimiyle elde edilen son üründe yüksek besin değerinin, alg, fungus ve bakteri arasında karşılaştırılması Çizelge 2.4.'de verilmiştir. Gıda ve yem olarak bir türün kabul edilebilirliği bu türün gelişme hızına, substrat kullanımına, kontaminasyonuna ve toksin içermemesine bağlıdır. Bunlar Çizelge 2.5'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. THP üretiminde kullanılacak mikroorganizmalarda aranan başlıca özellikler şu şekilde özetlemek mümkündür;

- Mikroorganizmaların bileşimi ve besin değeri
- Mikroorganizmaların kültür sıvısından kolay ayrılabilirliği
- Mikroorganizmanın toksik karakter taşıması

- Mutasyona uğrayarak genetik özelliklerini kaybedip stabil olmayan ve istenilmeyen bir forma dönüşme özelliğinin olmaması
- Enerji kaynağı olarak kullanılan karbon kaynağının tamamından yararlanabilmesi
- Kullanılan karbon kaynağı üzerinden yüksek verim elde etme
- Geniş sınırlar içinde substratlardan yararlanabilme

2.3.1. Bakteriler

Mikrobiyal protein üretimi için kullanılan birçok bakteriyel prosesler, laboratuvar ölçekte veya küçük pilot tesisler şeklinde geliştirilmiştir. Çizelge 2.5'den de anlaşıldığı gibi, bakteriler yüksek protein içeriğine sahip olması, çok hızlı gelişmesi ve geniş bir aralıkta substrat kullanma yeteneğine karşın, yüksek oranda nükleik asit içermeleri ve ortamdaki ayrılmalarda yaşanan zorluklar nedeniyle tercih edilmemektedir. Buna rağmen İngiltere'nin Billingham şehrindeki Imperial Chemical Industrial Pruteen işletmesi 1980 yılında ayda 6000 m³ metanolü *Methylophilus methylotrophus* bakteri türünü kullanarak ticari ölçekte işletmeye almışlardır. Bu işletme daha sonra Batı Avrupa Pazarlarında hayvansal yem olarak satışa sunmuştur [23].

Hoechst -Uhde hayvan yemi üretmek amacıyla metanol ile *Methylomonas clara* kullanarak bir proses geliştirmiştir. Bu proses 20 m³'lük fermentörlerde uygulanmıştır. Fakat ticari ölçekte uygulamaya geçilmemiş ve çalışmaya devam edilmemiştir [23].

Çizelge 2.5.: Alg, bakteri, maya ve filamentli funguslardan üretilen THP'nin çeşitli parametrelerin karşılaştırılması [3].

PARAMETRELER	ALGLER	BAKTERİ	MAYALAR	FLAMENTLİ FUNGUSLAR
Büyüme Hızı	Yavaş	Çok yüksek	Yüksek	Maya ve bakterilerden yavaş
Substrat	Işık, CO ₂ , İnorganik maddeler	Tarımsal atıklarla hidrokarbonları içine alan geniş bir aralık	CO ₂ dışındaki geniş bir aralık	Genellikle lignoselülotik atıklar
pH aralığı	11 ve üzeri	5-7	5-7	3-8
Üretim yerleri	Havuz ve Biyoreaktörler	Biyoreaktörler	Biyoreaktörler	Biyoreaktörler
Kontaminasyon Riski	Yüksek ve ciddi	Önem gerektirir	Düşük	Eğer pH 5'in altında ise en az
S-İçeren aminoasitler	Düşük	Yetersiz	Yetersiz	Düşük
Nükleik asit uzaklaştırma	-----	Gerekli	Gerekli	Gerekli
Toksin	-----	Gram negatif bakterilerde endotoksinler	-----	Bazı türlerde mikotoksinler

Son yıllarda balık yem fiyatlarındaki aşırı artış göz önüne alınarak, bakteriler atıklar üzerinde geliştirilerek bunların biyokütelleri yem olarak kullanılmıştır. Sucul ortamda yaşayan canlılar için besin olması amacıyla anaerobik fermentasyonun farklı türleri, fotosentetik bakteri olan *Rhodospseudomonas palustris* biyokütle üretiminde kullanılmıştır. Bu bakteri için optimum büyüme ve fermentasyon tipi belirlenmeye çalışılmıştır. Maksimum spesifik büyüme hızı $0,12 \text{ h}^{-1}$ ve biyokütle verimliliği 55 mg/L 'dir. Bakterinin ham protein içeriği % 72-74 arasında tespit edilmiş olup, oleik asit ve stearik açısından *Chlorella*'dan daha zengindir. Aminoasit profili FAO tarafından belirtilen standartlara uygundur. Kesikli ve sürekli fermentasyon için karşılaştırıldığında kesikli fermentasyonda biyokütle verimliliğinin diğerinin iki katından fazla olduğu görülmüştür [24].

2.3.1. Algler

Algler yıllardır tüm dünyada gıda olarak kullanılmıştır. En çok kullanılan makro algler kırmızı algler; *Porphyra* (nori, kim, laver), *Asparagophis taxiformis* (limu), *Gracilaria*, *Chondrus crispus* (Irish moss), *Palmaria palmata* (dulce) ve *Macrocystis* olup, yeşil algler arasından da *Caulerpa racemosa*, *KOlium* ve *Ulva* kullanılmaktadır. Bu algler özel olarak veya doğal ortamlarda yetişmiş algler hasat edilerek kullanılır. Hasat edilmiş algler ise ya taze olarak veya kurutulup paketlenmiş şekilde yenilmektedir. Çizelge 2.6'da dünyanın çeşitli yerlerinde gıda maddesi olarak kullanılan alg türleri kullanım şekillerine göre verilmektedir.

Cyanobacteria (mavi-yeşil algler) gıda kaynağı olarak veya gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ökaryotik ve prokaryotik türde 40,000 türden daha fazla alg türü olmasına karşın bunların çok az bir kısmı doğrudan gıda kaynağı olarak kullanılabilir. *Cyanobacteria* (mavi-yeşil algler) ve *Spirulina* (*S. Plantensis*, *S. maxima*) Çad'da yemeklerin % 10-60 içerisinde 9-13 g olacak şekilde kullanılmaktaydı. Bunun yanında Azteklerin ve Lake Texcoco ların *Spirulina*'yı tükettikleri bilinmektedir. Büyük ölçekli üretimler ABD ve Tayland'da olup, küçük ölçekli tesisler Çin, Hindistan ve Tayvan'da bulunmaktadır [26].

Spirulina açık alanda büyük ölçekte üretilebilecek en iyi alg türü olmasının yanında üretimi sınırlandıran çok önemli faktörler mevcuttur. Sıcaklık bunların içinde en önemli faktörlerden biridir. Bu alg türü için optimum sıcaklık aralığı 35-37 °C arasında değişmektedir. Bu nedenle kışın ve yaz sabahlarında optimum üretimi sağlamak için havuzların sıcaklık ayarlarının yapılması gerekmektedir [25].

Spirulina plantensis pH 9-11 gibi yüksek bazik koşullarda ve yüksek bikarbonat konsantrasyonunda en iyi şekilde gelişmektedir. Bu yüksek pH'larda diğer alg türleriyle rekabeti ise oldukça az olduğundan açık alanlarda gelişebilmektedir. Alglerin üretilmesinde kullanılan havuzların derinlikleri havuzların işlediği sezona ve alg yoğunluğuna bağlı olarak 30-50 cm arasında değişmektedir. Bu derinliğin belirlenmesinde havuzun büyüklüğü, akış hızı ve algal kültürlerin optimum ışık adsorpsiyonu önemlidir. Laboratuvar çalışmalarında optimum akış hızı 60 cm/s olarak gösterilmiş olsa da üretim sistemlerinde maksimum akış hızı 30 cm/s olabilmektedir [26].

Dunaliella salina; carotenoid beta-karotenin üretilmesi için kullanılabilir doğal bir kaynaktır. Ticari ölçekte daha çok Avustralya, ABD ve İsrail'de yetiştirilen bu alg türünün genellikle ya ekstre edilmiş durumda gıda ek maddesi olarak, ya doğal pigment olarak, ya da kurutulmuş algler tabletler halinde gıda olarak satışı yapılmaktadır. *Dunaliella salina*, yüksek tuzluluk konsantrasyonunda gelişmekte olup, optimum tuzluluk derişimi % 22 NaCl'dir. Bu durum avcı birçok türün gelişmesine engel olmaktadır.

Çizelge 2.6. Dünyada farklı bölgelerde gıda olarak kullanılan algler [3]

ALG TÜRÜ	YETİŞTİRİLDİĞİ BÖLGE	KULLANIMI
<i>Alaria</i>	Japonya	Kurutulup, tuzlanarak satılan ürün Saumen olarak isimlendirilmektedir.
<i>Ascophylluem, Fucus, Laminaria</i>	Japonya, ABD, Yeni Zelanda	Sığırlar, kümes hayvanları, domuzlar için yem olarak
<i>Caulerpa rosemosa</i>	Filipinler	Gıda
<i>Durvillea antartica, Ulva</i>	Çin	Gıda
<i>Laminaria</i>	Japonya	Kurutulup, tuzlanarak satılan ürün Kombu olarak isimlendirilmektedir.
<i>Laminaria, Ecklonia, Eisenia</i>	Büyük Britanya, Fransa, İskandinavya, Pasifik Okyanusu,	Parçalanarak, koyunlar ve piliçler için yem olarak
<i>Nostoc</i>	Brezilya	Kullanımı için kaynatılarak tüketilir.
<i>Pelwtia</i>	Norveç, Fransa, ABD, Danimarka, Yeni Zelanda	Sığırlar için yem olarak
<i>Porphyra tenera (Amanori), Laminaria, monostroma, undaria, sargassum</i>	İngiltere, Kore, Çin, Japonya	Gıda olarak
<i>Rhodymenia</i>	Fransa	Sığırlar için yem olarak
<i>Rhodymenia palmata, Gelidium, grateloupia, Fucus</i>	Pasifik Adaları	Parçalanarak yemlere eklenir
<i>Rhodymenia, Chorella yrenodosa, Spirulina, Synechococcus</i>	Pasifik Adaları,	Gıdaya belirli oranlarda eklenerek
<i>Sargassum</i>	Çin	Yem olarak
<i>Spirogyra, Oedogonium</i>	Hindistan	Kurutularak çorba yapımında
<i>Ulva</i>	Avrupa	Diyet olarak
<i>Ulva Lactuca</i>	İskoçya	Salata ve çorbalarda

Üretim amaçlı en çok kullanılan türlerden olan *Chlorella* özellikle Tayvan ve Japonya'da gıda katkı maddesi olarak yetiştirilmektedir. Bu alg türü, kesikli sistemde yaklaşık olarak 5-10 basamakta üretilmektedir. İlk önce kapalı ortamda küçük kültürler olarak üretimi yapılmakta ve daha sonra üretim için dış ortamdaki havuzlara alınmaktadır. *Chlorella*, yalnızca fototrofik olarak gelişmemekte bunun yanında mikсотrofik veya hetotrofik olarak da karanlık ortamlarda asetat ve glikozu karbon kaynağı olarak kullanarak da gelişmektedir. Glikoz gibi substratları karbon kaynağı olarak kullanarak suda bulunan ağır metalin, toksik kimyasalların ve patojenik mikroorganizmaların arıtılmasında algler kullanılmaktadır [23].

Nütrient ortamı olarak zeytin fabrikası atık suyu kullanılarak, etkili havalandırma yapılmak suretiyle *Chlorella pyrenoidosa* ve *Scenedesmus obliquus* mikroalglerin üretimi sağlanmıştır. Ortamın pH değeri 6.5 olup, sıcaklığın 30°C civarında olması sağlanmıştır. Ortama 0.5 ve 1 kg/m³ potasyum nitrat ilavesiyle alglerdeki protein içeriğinin % 60 zenginleştiği tespit edilmiştir [25].

2.3.2. Mayalar

Petrol üzerinde THP üretiminin yapılabileceği 1958 yılında bir İngiliz bilim adamı olan Alfred Champagnat tarafından BP(British Petrol)'ün Güney Fransa'daki Lavera araştırma laboratuvarlarında saptanmıştır. Bu araştırmacının rafine yağdaki parafin mumunun arıtılması amacıyla başlattığı çalışmalarda, mayaların bu fonksiyonu yerine getirip getiremeyeceğini görmek öngörülmüş ve mayaların parafini kullandıkları ve hızla çoğaldıkları saptanmıştır. Üretilen mayaların % 60-63 arasında ham protein içerdiği görülmüştür [5].

İngiltere ve birçok ülkede çok eski zamanlardan beri mayalar gıda olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda THP üretiminde kullanılan tipik prosesler şunları içermektedir; birincil mayaların (*Saccharomyces cerevisiae*) melas ortamında, *Fragillis* mayaların (*Kluyverromyces fragiliis*) peynir altı suyunda, *Torula* mayalarının (*Candida utilis*) kağıt atıklarında veya karbonhidratlarda üretilmesidir [23].

Deniz mayaları, yüksek düzeyde parçalama yeteneğine sahip organizmalardır. Bu nedenle ucuz hammaddelerin veya atıkların biyolojik dönüşümünde bu mayaların kullanımı atığa değer kazandırmaktadır. Maya biyokütlesindeki ham maddenin dönüşümü (THP) mayaların yüksek besinsel kaliteleri nedeniyle yararlıdır. Elde edilen ürün sucul ortamlarda hayvan yemi olarak kullanılabilmekte ve mikrobiyal proteinin aminoasit profili oldukça iyi olup, çiftlik hayvanlarının beslenmesinde toksik ve karsinojenik etki gözlenmemiştir[27]. Deniz ortamından izole edilerek elde edilen maya kültürleri, 80°C'lik fırında kurutulularak toz haline getirilen karides kabukları üzerine ekilmeden önce malt ekstratı agar üzerinde 18 saat üretimden sonra steril deniz suyu içeren ortamda yetiştirilmiştir. Kültür ortamında, pH 5'de 100 ml deniz suyunda 10 g toz karides kabuğu bulunmaktadır. Bu üretim sonucunda özellikle uzak doğu ülkelerinde balıkçılığın yoğun olduğu bölgelerde oluşan balık atıklarının çevreye verilmesine engel olunmuştur [28].

S. cerevisiae'den THP üretimi amacıyla Virgin üzümünün üretim sonucu çıkan atıklarının alternatif kullanımı tespit edilmiştir. Şekerce zengin solüsyon basit ekstraksiyon metoduyla üretilerek, geri beslemeli fermentasyonla düşük değerlikli etanole benzer üretim yerine yüksek besin değerine sahip biyokütle üretimi yapılmıştır. Mayanın kalitesinin ve verimliliğinin melastan üretilen mayaya benzer olduğu görülmüştür [29].

2.3.3. Filamentli funguslar:

Filamentli funguslar THP üretimde ortamdaki ayrılmalardan kolay olması ve lignoselülozik atıklar üzerinde kolayca üreyebildiklerinden THP üretiminde tercih nedeni olmaktadır. Bundan başka filamentli funguslar % 9.7'lik düşük nükleik asit içeriğine sahip olup Çizelge 2.7'da verildiği gibi, FAO standartlarına göre *A. niger*'in aminoasit bileşimi oldukça uygundur.

Çizelge 2.7. FAO standartları ile *A. niger*'dan elde edilen THP'nin karşılaştırılması [3]

	AMİNO ASİT (%)							
	Valin	Lösin	İzolösin	Lisin	Metionin	Fenilalanin	Sistin	Tirosin
FAO Standardı	4.20	4.80	4.20	4.20	2.20	2.80	2.80	2.80
<i>A.niger</i>	4.36	6.80	3.75	4.50	0.35	5.70	Çok az	3.00

Lignoselülotik kalıntıların ve atıkların çevreye olan zararlarının azaltılması amacıyla hayvan yemi veya değerli ürünlerinin proteince zenginleştirilmesi üzerine birçok araştırma vardır [15, 30]. Çizelge 2.8.'de çeşitli filamentli funguslar üzerinde çeşitli atıkların kullanıldığı çalışmalardan örnekler verilmiştir. Bunlar içinden portakal kabuğu, proteince zengin hayvan yemi üretimi amacıyla substrat olarak kullanılmıştır. Burada bahsedilen portakal kabukları; meyve suyu ve meyve suyu konsantrelerinin yapımı sırasında ve endüstriyel yağların endüstriyel üretimi sonucunda atık olarak çıkmaktadır. Bu substrat çok az miktarda protein, değerli suda çözünen veya çözünmeyen karbonhidratlar ve çok az miktarda lif içermektedir. Bu substrat kullanılarak *T. viride* ve *Geotrichum candidum* filamentli fungusları, 60 saatlik yarı katı faz kültürde yetiştirilerek, % 65 sindirilebilirlik, % 23 lif ve % 20 ham protein içeren son ürün elde edilmiştir. Katı faz fermentasyonu ile daha yüksek besin değerine sahip ürünler (% 30 ham protein, % 80 sindirilebilirlik) elde edilmesine rağmen daha uzun süreli alıkonma süreleri maliyeti etkilemektedir [15].

Filamentli fungusların kullanıldığı ve endüstriyel ölçekte kurulmuş THP üretim proseslerinden biri de Pekilo prosesidir. Pekilo prosesinde, filamentli fungus *Paecilomyces variotii*'nin sürekli olarak çözünmüş karbonhidrat içeren bir ortamda kültürü yapılmaktadır. 1973'de Finlandiya'da Jamson koski kağıt fabrikasında ilk pekilo prosesi kurulmuştur. Hammadde olarak kağıt üretiminden çıkan atık olan sülfite likörünü kullanılmıştır. Şu anda sülfite likörünü tam kapasite kullanan endüstri mevcut değildir. Saatte 2.7-2.8 kg/m³ mikrobiyal büyüme hızına bağlı olarak 24 saatte 15-16.5 ton kuru madde üreten iki fermentör inşa edilmiştir. Pekilo prosesinde üretilen ürün kurutularak hayvan yemi olarak kullanılmakta olup, % 52-57 oranında

ham protein içermektedir. Pekilo prosesinde sülfür atığının yanı sıra Na, Ca, Mg gibi pişirme proseslerinden çıkan atık likörler de kullanılmaktadır. Odunda bulunan çözünmüş hemiselüloz nütrient kaynağı olarak kullanılabilir monosakkaritlere ayrılır. Diğer potansiyel substratlar, hidrolize edilmiş saman, mısır koçanı, mısır sapı ve turbayı içerir. Kağıt fabrikasından çıkan atıklar pekilo prosesinde değerlendirildiği zaman çıkış suyunun BOI₅ değeri % 83 indirgenir. Bu proses sayesinde kirliliğinin azaltılmasının yanında koku probleminin de önüne geçilir [15].

THP üretiminde filamentli fungusların kullanılmasına yönelik çalışmalar arasında birbirini tamamlayabilen ve farklı enzimatik sistemlere sahip karışık filamentli fungus kültürlerin kullanılması yer almaktadır. *Sporotrichum pulverulentum* ve *A. niger* filamentli fungusları narenciye atıkları üzerinde üretilmiştir. *S. Pulverulentum* lignoselüloz parçalama sistemleri oldukça verimlidir ancak *A. niger*'in lignoselülaz üretim kapasitesi düşüktür. Bu fermentasyonla selüloz parçacıkları *S. Pulverulentum* tarafından parçalanmakta ve üretilen şeker *A. niger* tarafından kullanılmaktadır. Bu şekilde iki filamentli fungusun ekilmesiyle elde edilen verim bir filamentli fungusun ekilmesiyle elde edilen verimden daha yüksektir [15].

İngiltere'de Rank Havis McDougall tarafından substrat olarak glikozun kullanıldığı sürekli fermentasyonda *F. graminearum* üretimiyle mikoprotein isimli ürün elde edilmiştir. Mineral tuzlar fermentöre eklenmeden önce steril edilmiş ve aseptik koşullarda çalışılmıştır. N kaynağı ve pH kontrolünü sağlamak amacıyla fermentör amonyak gazı ile beslenmiştir. Fermentörden ürünün ayrılması amacıyla vakum filtrasyon kullanılmıştır. Bu şekilde nükleik asit indirgenmesi de sağlanmıştır [23].

Çizelge 2.8. Funguslardan THP üretimi

Kullanılan Organizma	Substrat
<i>A. niger</i>	Mısır koçanı [3]
<i>A. niger Sporotrichum pulverulentum</i>	Pamuk sapı ve mısır [3]
<i>Candida kresui</i> & <i>Saccaromyces</i> spp.	Sorghum hidrolizati [30]
<i>C. tropicalis</i>	Sülfid atık likörü [3]
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Selülozik atılar [2]
<i>Chrysonilia sitophilia</i>	Lignin [3]
<i>Fabdrum graminearum</i>	Niştasta hidrolizati [2]
Marine yeast, <i>Saccaromyces cereviceae</i>	Deniz kabuğu atıkları [27]
Karışık maya kültürü	Süt endüstrisi atıkları [32]
<i>Paecilomyces variotii</i>	Sülfid likörü [2]
<i>P. cyclopium</i>	Peynir altı suyu [3]
<i>P. roqueforti</i> <i>P. camemberti</i>	Narenciye kabukları
<i>Pichia pastoris</i>	Metanol [3]
<i>S. cereviceae</i>	Melas [3]
<i>Phichia guilliermondii</i>	Kimchi atığı [33]
<i>C. utilis</i> ve <i>Paecilomyces variotii</i>	Kağıt atıkları [33]
<i>Trichoderma reesi</i> & <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Şeker pancarı pulpu [3]
<i>A. terreus</i>	Şeker kamısı bagazı [34]
Mayalar	Bitki orjinli sıvı atıklar [28]
Çeşitli funguslar	Zeytin karasuyu [5]
<i>A. niger</i> M1	Keçi boynuzu [35]
Microfunguslar	Hurma atığı [36]

THP üretiminde filamentli fungusların kullanılması ile atıkların KOİ ve BOİ değerlerinde önemli seviyelerde indirgenme sağlanmış ve çevreye zararsız hale getirilen atık suyun yanı sıra hayvan yemi olarak kullanılacak ürünler de elde

edilmiştir. Pretoria Üniversitesinde geliştirilen bir proste organik yükü oldukça yüksek olan bir atık suda aseptik koşullarda yüksek kalitede THP üretimi sağlanmıştır. Sistemde kullanılan atık su BOİ değeri oldukça yüksek ve çıkış sıcaklığı 45 °C civarında olan şeker fabrikası furfural çıkış suyudur. Mikroorganizma olarak *A. fumigatus* kullanılmıştır. Tipik olarak KOİ başına 0,56 g biyokütle üretilmiş ve bu yolla KOİ derişimi 8000 mg/L'den 150 mg/L'ye indirildiği görülmüştür. Elde edilen biyokütlenin aminoasit profilinin yenilenebilir diğer protein kaynaklarına yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan filamentli fungus patojen bir mikroorganizma olduğu için piyasaya sunulmadan önce deney hayvanları üzerinde çeşitli toksisite ve patojenite testlerinin yapılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra bu filamentli fungus sekonder metabolizmalarında insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyen mitotoksinleri üretmektedir. Ancak bu zararlı metabolitlerin üretilmesi için üç günlük inkübasyonun sağlanması gerekmektedir. Proste organizmaların maksimum büyüme hızına 12 saat içinde ulaştığı ve bu süre zarfında toksin üretmediği tespit edilmiştir [27].

Filamentli funguslardan THP üretimi sırasında sıvı, katı ve yarı katı fermentasyon tipleri de görülmektedir. Ancak katı faz fermentasyonu üretim süresi açısından bakıldığında diğerlerine göre çok uzun sürdüğü için kullanılan enerji bakımından diğerlerine göre daha pahalı görülmektedir. Ancak katı faz fermentasyonunda THP üretiminin yanı sıra, fermentasyon sırasında kullanılan fungusların ürettikleri enzimlerle narenciye sularının tatlarının iyileştirilmesi veya tekstil boyalarının renk gideriminin sağlanması gibi çalışmalar da bulunmaktadır. Katı faz sırasında üretilen biyokütle arta kalan substrattan ayrılmadığı için proteince zenginleştirilmiş ürün olarak kullanılmaktadır.

2.3 THP ÜRETİMİNDE KULLANILAN SUBSTRATLAR

THP üretiminde kaynak olarak kullanılan mikroorganizmaların üreme ve gelişmelerindeki en önemli faktör substrat adı verilen enerji ve karbon kaynağının varlığı ve kullanılabilirliğidir. Tarımsal ürünlerin hasadı ve işlenmesi sırasında açığa

çıkan çeşitli atıkların THP üretiminde substrat olarak kullanılması mikroorganizmalar için enerji ve karbon kaynağı niteliği taşımasına bağlıdır.

THP üretiminde bir karbon ve enerji kaynağını substrat olarak seçerken bazı kriterleri göz önünde tutmak gereklidir. Bu kriterler:

- Fiyat
- Elde edilebilirliği ve bolluğu
- Toksisitesi
- Karbonhidrat içeriği
- Mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliği

THP üretiminde kullanılan tarımsal ve gıda endüstrisi atıkları başlığı adı altında sıvı, katı ve yarı katı selülozik olmayan atıklar ve selülozik katı atıklar olmak üzere üç grup altında toplanabilmektedir.

Sıvı atıkların kolaylıkla mikrobiyal yıkıma uğramaları nedeniyle kısa süre içerisinde kullanılmaları gerekmektedir. Şeker pancarı ve kamış melası, zeytin karasuyu, peynir altı suyu, soya ve mısır ıslatma suları, nişastalı sıvı atıklar bu gruba girmektedir.

Selülozik olmayan katı ve yarı katı atıkların nem içerikleri oldukça yüksektir. Meyve suyu endüstrisi atıkları, üretim fazlası olan ve pazarlamaya uygun olmayan meyve ve sebzeler de bu gruba girmektedir. Meyve ve sebze endüstrisi atıkları belirli oranlarda selüloz bulundurmakla birlikte, yıkımı daha kolay olan nişasta, pektin, mono ve disakaritler ile vitaminleri de içermektedir. Narenciye meyveleri, meyve konsantreleri, konsantre ve reçel gibi ürünlerin işlendiğinde ağırlıklarının % 45-60 kadarı atık olarak ortaya çıkmaktadır.

Katı atıkların bileşiminin önemli bir kısmını dünyada bol bulunan selüloz oluşturmaktadır. Yeryüzünde yılda 10^{11} ton selülozun sentezlendiğini ve bunun dünyanın vejetasyonunun 1/3'ünü oluşturduğu bilinmektedir. Bu atıkların % 25-90 arasında nem içerikleri ile diğer substratlara göre depolanmaları kolay olmaktadır.

Hububat samanı ve kepekleri, orman ürünleri, kağıt endüstrisi atıkları, şeker kamışı ve şeker pancarı küspeleri zeytin küspeleri gibi atıklar bu grubu oluşturmaktadır.

Mikroorganizmaların karbon kaynağı olarak kullanıldığı substratlar için iki başlık altında toplanan farklı bir gruplandırmaya daha rastlanır. Bunlar;

- fosil karbon kaynakları,
- yenilenebilir karbon kaynakları

Fosil karbon kaynaklarından yararlanmak amacıyla yapılan araştırma ve çalışmalar, yenilenebilir karbon kaynaklarına oranla daha fazla yatırım gerektirmektedir. Çünkü;

- Hayvan ve insan gıdası üretiminde daha fazla karbon kaynağına ihtiyaç vardır.
- Atıkların kullanımı, çevre kirlenmesi kontrolünde önemli bir araçtır.

Fosil karbon kaynakları için sıvı ve gaz hidrokarbonlar, metanol ve etanol gibi organik çözücüler sıralanabilirken, yenilenebilir karbon kaynakları için ise CO₂, melas, peynir altı suyu, nişasta ve selüloz gibi polisakkaritler örnek olarak verilebilir.

2.3.1. THP Üretimde Kullanılan Bazı Substratlar

2.3.3.1. Alkenlerden THP üretimi

1950'lerin sonunda British Petrolün (BP) C12-C20 alkanlar içerisinde mikroorganizmaları üretmesi dünyanın büyük ilgisini çekmeye başlamıştır. Petrol, gaz yağının fraksiyonlarından oluşmakta olup, % 15'in üzerinde mum içerir. Bu mumlar petrol akışkan hale gelinceye kadar düşük sıcaklıkta çöktürülerek, blok tüplerle uzaklaştırılmaktadır [12].

BP, *Candida lipolytica* ve *C. Tropical* olmak üzere iki maya türü kullanmıştır. Fransa'da 16,000 ton/yıl ve İngiltere'de 4,000 ton/yıl üretim yapılmış ve üretilen ürüne TOPRINA adı verilmiştir. Her iki tesiste de azot kaynağı olarak NH₃ ve verimi arttırmak için Mg iyonları kullanılmıştır. Hiçbir karbon kaynağı eklemesi yapılmamıştır. TOPRINA ürünü, toksisite ve karsinojenik testlerden geçirilmiş ve hiçbir olumsuz etki görülmemiştir [12]. Sonuç olarak yüksek protein içerikli yem olarak, balık yemi içerisine ve süt üreticileri tarafından süt tozu içerisine katılarak satışa sunulmuştur.

2.3.1.2 Metandan THP üretimi

Metan ucuz, bol ve alkenlerin toksisite problemlerinden uzaktır. Bu gaz, Kuzey Denizinden ve anaerobik parçalanma sonucunda üretilmektedir. Metan, yüksek düzeyde karbonun indirgenmiş formunu içerir ve tüketilen gaz miktarına bağlı olarak yüksek miktarda hücrel metabolitlerle üretilir. Genel olarak *Methylomonas* ve *Methylococcus* karbon kaynağı olarak metanı kullanan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Ortama N kaynağı olarak nitrat ve amonyum tuzları eklenmesi gerekmektedir. Bu alanda İngiltere'de Shell tarafından birçok çalışma yürütülmüştür. Bu prosesler sabit karışık kültürler tarafından metanın oksidasyonunu içermektedir. İngiltere'de 1970 yılında 300 civarında pilot tesis kurulmuştur. Shell tarafından kurulan en büyük pilot tesiste ise yılda 100,000 ton üretim yapılmıştır [12]. Ancak soya fasulyesi ve mısır fiyatlarındaki aşırı düşüş, o zaman içerisinde varolan protein kaynaklarının bolluğu ve gelişmemiş ülkelerde bu türlü proseslerin kurulmasında yaşanacak problemler nedeniyle 1976 yılında üretim durdurulmuştur [12].

2.3.1.3. Metanolden THP Üretimi

Metanolden THP üretimi ile ilgili çalışmalar ICI'ya aittir. Fermentasyon, *Methylophilus methylotropha* bakterisiyle büyük bir havalandırılmalı fermentörde yapılmıştır. Bu organizma patojenite ve toksisite testlerinden geçirilmiştir. Azot kaynağı olarak amonyak kullanılmıştır. Elde edilen ürün PRUTEEN olarak

isimlendirilmiştir. Pruteen % 72 ham protein içermekte olup, yüksek oranda dengelenmiş protein kaynağı olarak pazarlanmaktadır. ICI, dünyada tek en büyük fermentörü ile yılda 60,000 ton üretim yapmıştır [12].

2.3.1.4. Etanolden THP üretimi

Etanol substrat olarak pahalı olmasına rağmen THP üretimi için kullanılmıştır. Amerika'da kurulan bir proseste gıda sınıfındaki bir maya (TORULA) kullanılmış ve ürün TORUTEİN adı altında satışa sunulmuştur. Maya yaklaşık olarak % 52 protein içermekte olup metionin seviyesi oldukça düşüktür [12].

2.3.1.5. Peynir altı suyundan THP üretimi

Peynir altı suyu, peynir yapımı sırasında çökeltme ve süt kazeinin uzaklaştırılması sonucunda oluşan atık sıvıdır. Bu son ürün kullanılan süt hacminin % 85-95' ini oluşturmakta olup, süt nütrientlerinin de % 55'ini içermektedir. Bu nütrientler arasında en önemli olanları; laktoz (% 4.5-5 w/v), çözülmüş proteinler (% 0.6-0.8 w/v), yağlar (% 0.4-0.5 w/v) ve mineral tuzlar (kuru ekstraktın % 8-10'u) dır [38].

Peynir piyasasına bağlı olarak her yıl peynir üretimine paralel 145×10^6 tondan daha fazla peynir altı suyu ve 6×10^6 ton laktoz üretilmektedir. 1 kg peynir üretimi başına 9 kg peynir altı suyu oluşmaktadır. Peynir altı suyunda süt bileşenlerinin düşük konsantrasyonlarda olması nedeniyle (Kuru madde içeriği % 6-7 arasında) bu son ürün bir atık sudur. 50 yıldan beri peynir yapımı sırasında oluşan peynir altı suyu artılmaya çalışılmış olup, yaklaşık olarak oluşan peynir altı suyunun yarısı artılmadan çevreye verilmektedir. Bu yüzden oluşan bu atık su yüksek organik madde içeriği (BOİ5 30 000-50 000 ppm ve KOİ 60 000-80 000 ppm) ve büyük hacimlerde olması nedeniyle önemli bir çevre kirliliğine neden olmaktadır. Yüksek miktarlarda KOİ ve BOİ içeren bu atık sular içerisinde bulunan laktoz göz önüne

alınacak olursa atık suyun % 75'i THP üretimi olarak, etanol veya metan gibi tekrar kullanılabilir ürünler dönüşürülebilmektedir [38].

Su kirliliğini önlemede acil olarak getirilen tedbirler arasında, peynir üreten fabrikalardan çıkan atık suların analiz değerlerinin alıcı ortama verilmeden önce yasal sınırlamaların altına çekilmesi gibi önlemler alınmıştır.

1940'lardan beri peynir altı suyundan ticari olarak mikrobiyal biyokütle üretilmektedir. Fransa'da, ABD'de, Almanya'da, Avusturya'da ticari ve pilot ölçekli işletmeler ve gelişmelerin olduğu bilinmektedir. Bilinen birçok proses arasında Yienna prosesi ve Bel prosesi bulunmaktadır. Gıda olarak kullanmak amacıyla peynir altı suyundan endüstriyel mikrobiyal biyokütle üretimi 1958 yılında Framageries Le Bel'de başladı. (Prosesin patenti 1955 yılında alınmıştır) İşletme, gıda değeri ve yem endüstrisinin alt ürünü oluşturan THP üretiminin klasik bir örneğini oluşturur. Peynir altı suyu sızıntısında üç maya türü (*Kluyveromyces lactis*, *K. Fragilis*, *Tromlopsis bovina*) geliştirilmiştir. Geliştirilen bu ürünün ticari adı Protibel olarak bilinmektedir. Kullanılan peynir altı suyuna bağlı olarak ortama bazen N ve P kaynağı ilavesi yapmak gerekebilir [38].

Biyoküte öncelikli olarak hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılmasının yanı sıra insan gıdası olarak da kullanılmaktadır . Framageries Le Bel firmasının yılda 2300 ton THP ürettiği bildirilmiştir ve ürün 10 yıldan daha fazla bir süre insan diyet besini olarak kullanılmıştır. Ham maddenin orijini insan tüketimi için THP'nin kabul edilebilirliğini desteklemektedir [39].

Clark [40] tarafından deneysel olarak yapılan bir çalışmada *Kluyveromyces marxianus* türü ile çalkalamalı kültür olarak peynir altı suyunda THP üretim potansiyeli çalışılmıştır. % 2'lik peynir altı suyu içeren ve 37 °C'de geliştirilen *K. marxianus* türünün pH 2,8'de gelişmesi sağlanmıştır. Elde edilen maksimum ürün miktarının kullanılan mayaya göre 0,38-0,46 g maya/g laktoz arasında değiştiği bulunmuştur.

Laktik mayaların peynir altı suyunda kültürünün yapılması ile biyokütle ile birlikte birçok metabolit oluşturulmaktadır. Karışık kültürler karbonun birçok kaynağını kullanabilir ve bu yüzden karışık maya kültürlerinin kullanılması biyokütle verimini arttırmak veya KOİ değerini düşürmek için tercih edilmektedir. Karışık kültürleri arasında yapılan denemelerde en yüksek biyokütle veriminin *Torulopsis cremaris* ve *Candida utilis* ile sağlandığı gösterilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada ise 0.75 g biyokütle/g laktozla biyokütle üretimi ve % 95.8'lik KOİ uzaklaştırma verimi elde edilmiştir [33].

2.3.1.6. Lignoselülotik atıklardan THP üretimi

Lignoselülotik atıklar, tarımsal ve yenilenebilir atıklar olup, THP üretimi için en önemli substratlar olarak bilinmektedir.

Odun ve otsu yapı bir arada düşünüldüğü zaman bitkinin kuru ağırlığında selüloz, hemiselüloz ve ligninin oranları sırasıyla % 45, 20, 20 olarak tahmin edilmektedir. Genel olarak lignoselülotik materyalin mevsimsel olarak üretilen miktarı değiştiği için sürekli olarak kullanılması oldukça zordur. Bünyesindeki su içeriğinin yüksek olması taşınmasını ve kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Lignin ve hemiselüloz hayvanlar ve insanlar tarafından kullanılamadığından, hasat sonrasında kalan kalıntılar çok büyük çevresel kirliliğe neden olmaktadır. Bu nedenle, bu polimerik bileşiklerin gıda olarak kullanılabilmesi ve özellikle ligninin kullanılmasını sağlayacak etkili bir metot geliştirilmesi gerekmektedir. THP üretimi ise, bu polimerik bileşiklerin monomerik şekerlere dönüştürülmesi ve besinsel değeri daha yüksek gıdaların üretilmesi açısından çok önemli bir yöntemdir. Lignoselülotik atıkların THP üretiminde kullanılabilmesi için ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla asidik ve bazik yöntemler, x ışınları veya basıncın kullandığı birçok ön işlemler bulunmaktadır. THP üretiminde kullanılan bazı lignoselülotik atıklar aşağıda verilmiştir:

Kassava küspesi: Kassava küspesi genellikle etanol, THP, mantar, enzim, organik asitler, çeşitli aminoasitler gibi ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Tarımsal

kalıntılar üzerinde bu türlü uygulamalar bu atıkların çevreye zarar vermeksizin deşarjlarını sağlamaktadır.

Kassava bitkisinin işlendiği işletmelerde, katı ve sıvı olmak üzere iki tip kassava atığı üretilmektedir:

Katı atıklar, küspe ve kabukları içermekte olup bu atıklar yaklaşık olarak % 85 oranında nem içeriğine sahiptir. Sıvı atıklar ise % 1'lik katı içeriğiyle (yaklaşık 2655 m³'lük) atık su şeklindedir. Oluşan katı atıklar herhangi bir arıtmadan geçirilmeksizin çöp deponi alanlarına gönderilmektedir. Bu deşarj da çevrede çok ciddi problemlere yol açmaktadır [42].

Kassava Küspesi, kuru ağırlık temelinde yaklaşık olarak % 50 nişasta içeren lifli bir kalıntıdır. Ancak çok az protein içermesinden dolayı hayvan yemi olarak çekici görünmemektedir. Ancak mikrobiyal kültürlerin biyolojik dönüşüm proseslerinde kullanılmasında oldukça elverişli bir hammadde olarak düşünülebilir. Çünkü şeker kamışı küspesi ile karşılaştırıldığında herhangi bir ön işleme gereksinim duyulmaması ve mikroorganizmalar tarafından kolayca kullanılabilmesi gibi avantajları vardır.

Bazı maya ve filamentli funguslar kassava küspesi üzerinde kültürasyonları için kullanılmaktadır. Ancak filamentli funguslar daha çok kullanım alanına sahiptir [42]. Kassava küspesi, yüksek nişasta içerikleri nedeniyle yenilenebilir fungal kültürler kullanılarak gıda ve yem içinde bu atığın biyolojik dönüşümü sağlanmaktadır [42].

Şeker kamışı küspesi: En büyük selülozik endüstriyel tarım son ürünlerinden birisi şeker kamışı küspesidir. Bu küspe şeker kamışının ezilip suyunun çıkarılmasından sonra kamış saplarının üzerindeki lifli kalıntıdır. Bu atık, lignoselülotik bir kalıntı olup, şeker fabrikasında genellikle yakıt olarak kullanılmaktadır [44].

Son yıllarda şeker kamışı küspesini de içine alan endüstriyel tarım kalıntılarının daha verimli bir şekilde kullanılmasına yönelik artışlar söz konusudur. Şeker kamışı küspesini ham madde olarak kullanan çeşitli prosesler bildirilmiştir. Bunlar elektrik üretimi, kağıt ve pulp ve fermentasyon ürünlerinin üretilmesidir. Küspesini de içine alan çeşitli ürünlerle alkol, alkoloidler, mantar, proteince zenginleştirilmiş hayvan yemi (THP) ve enzimler gibi kimyasallar ve metabolitler üretilmektedir.

Küspenin en önemli uygulamalarından biri proteince zenginleştirilmiş geviş getiren hayvanların yemlerinin ve enzimlerinin üretilmesidir. Küspe gibi yeniden kullanılabilir kaynakların öneminin yeni fark edilmesi bu yönde çeşitli proseslerin uygulanmasına yol açmıştır [43].

Bakteri, maya ve filamentli fungusları içeren mikroorganizmaların büyük bir kısmı yıllardır küspe üzerinde yetiştirilmiştir. Ancak özellikle *Basidomycetes* türü filamentli funguslar protein zenginleştirme ve enzim üretimi amacıyla tercih edilen ve en çok kullanılan türler arasındadır [43].

Her tarımsal atıkta olduğu gibi küspeye de daha çok parçalanabilirlik ve mikrobiyal tutunma sağlamak amacıyla ön işlemler uygulanmaktadır. Substrat partiküllerinin iç yüzey alanlarının daha küçük parçalara ayrılmasıyla uygulanan ön işlemin sonuçları partiküllerin çözünürlüğü ve/veya hemiselülozun, ligninin parçalanması ile başarılmıştır. Ön işlem uygulanan atıklarda mikrobiyal büyümede belirgin bir şekilde artış olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [44]. Yapılan çalışmalar uygulanan fizikokimyasal işlemlerin lignoselülotik kalıntılarının parçalanabilirliğini arttırdığını göstermiştir. Etkili bir ön işlem lignoselülotik materyallerdeki karbonhidrat erişebilirliğini zenginleştirmek için fiziksel ve kimyasal faktörlerle değişmektedir [43].

Küspe üzerinde mikroorganizmaların geliştirilmesini içeren prosesler iki grupta sınıflandırılabilir:

- 1- Sıvı faz fermentasyon temelinde olan prosesler (Bu proses içerisinde genelde yarı katı fermentasyon da yer almaktadır)
- 2- Katı faz fermentasyon temelinde olan prosesler

Sıvı faz fermentasyonu uygulama açısından iki kategoriye ayrılır; tüm küspe substrat olarak kullanılır, diğesinde ise küspe hidroliz işleminden geçirilir ve elde edilen hidroliz ürününü substrat olarak kullanılır. Katı faz fermentasyonu; biri küспенin doğrudan doğruya karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı, diğeri ise mikroorganizmalara destek olarak kullanıldığı iki alt gruba ayrılır. Küспенin sıvı faz fermentasyonu kullanılarak, % 35.5 ham protein ve % 69.8 parçalanabilirliği olan proteince zengin biyokütle üretimi sağlanmıştır [44].

Maya ve filamentli fungusların kullanıldığı katı faz fermentasyon prosesleriyle küspe proteince zenginleştirilmiş hayvan yemi üretiminde geniş aralıklarla kullanılmaktadır. Nigam [45] tarafından yapılan bir çalışmada *basidiomycetes* türü funguslar kullanarak hayvan yemi üretimi için küспенin katı faz fermentasyonu çalışılmıştır.

Vazquez ve ark. [43] yaptıkları çalışmada, *Cellulomanas flavigena* ve *Xanthomonas spp.* (türler CDBB-B-532 ve ATCC-31920) karışık kültürü kullanarak, küspeye NaOH ve Ca(OH)₂, NH₄OH ve H₂O₂ uygulanmasının THP üretimine etkisine bakmışlardır. Bu çalışmada Ca(OH)₂ ve NaOH uygulanan küspelerde mikrobiyal büyümenin belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Hücrelerin uygulanan ön işleme göre büyüme hızları karşılaştırıldığında en hızlı büyüme, biyolojik parçalanma ve lignin içeriğinin azaltılması 4 saatlik NaOH ön işlemlili kültürlerde görülmüştür.

El-Nawwi ve El-Kader [46] tarafından yapılan çalışmada ise çeşitli kültür koşulları altında alkali artımlı küspe üzerinde *Aspergillus terreus* ile protein üretimi çalışılmıştır. % 1.5 (w/v) küspe substrat oranı içeren, pH 4.5'de, 35° C'de, % 4'lük ekimin yapıldığı, 7 günlük çalkalamalı ortamda, optimum biyokütledeki protein içeriğinin % 21-28 (w/w), protein geri kazanımı 100 g küspede 11-14.5 g olduğu

bulunmuştur. Bu çalışmada, aynı zamanda statik koşullar (% 7 ham protein içeriği) ve çalkalamalı koşullar (% 21 ham protein içeriği) arasında biyokütle üretimi açısından büyük fark olduğu tespit edilmiştir.

Narenciye atıkları: Narenciye posaları ve atıkları, ülkemizde ve dünyada mevsime bağlı olarak elde edilen bir gıda endüstrisi yan ürünüdür. Bu posa; meyve suyu, konsantre veya esans gibi ürünlerin üretildiği endüstrilerin yan ürünüdür [47].

Ülkemizde ve özellikle Akdeniz bölgesinde narenciye dikim alanları ve üretimin son yıllarda hızla arttığı ve tarımsal ekonomideki yerinin küçümsemeyecek boyutlara ulaştığı tespit edilmiştir [51]. Ülkemizde gıda endüstrisinde işlenerek değerlendirilen narenciye çeşitleri; portakal, greyfurt, mandalina ve limondur. İçel ili toplam narenciye üretiminin % 56,28'ini limon üretiminin % 71,65'ine ve portakal üretiminin % 15,14'ine sahiptir [51]. Narenciyenin meyve suyu olarak işlenmesinden sonra yaklaşık olarak % 40-65 oranında posa elde edildiği düşünülürse özellikle bu posaların ülkemizde önemli bir potansiyel oluşturduğu görülür.

Protein içeriği düşük, karbonhidrat içeriği yüksek olması nedeniyle geniş getiren hayvan yemi olarak uygun bir maddedir [52, 53]. Ancak % 80-92 oranında çok yüksek su içermesinden dolayı dönüşüm sırasında birçok probleme neden olur. Kurutma maliyetinin oldukça yüksek olması ve depolamanın sorunlara yol açması nedeniyle bu materyal çok sınırlı bir şekilde kullanılmakta ve genellikle atık olarak göz önünde tutulmaktadır [47]. Düşük düzeyde kuru madde ve yüksek düzeyde maya popülasyonları içermeleri nedeniyle depolama sırasında birkaç gün gibi kısa bir süre içinde hızla bozulabilmekte ve besin değeri bir hafta içerisinde yaklaşık olarak % 50 oranında azalabilmektedir. Bu nedenle üretilen posaların hayvan yemi olarak kullanılacaksa sürekli olarak kalite kontrolünün yapılması gereklidir. Ülkemizde özellikle narenciye işleyen gıda işletmelerine yakın olan bölgelerde bu posalar çoğunlukla silolarda depolanarak değerlendirilmektedir [54].

Meyve suyu üretim sonucunda çıkan posalar kabuk, pulp ve meyvenin çekirdeklerini içermekte olup, kimyasal yapısı narenciye çeşidine, yetiştirme koşullarına, iklime ve meyvenin hasat zamanına göre değişiklik göstermektedir [55, 56].

Ülkemizde narenciye üretimi sahil şeridi boyunca yapılmakta olup üretimin önem kazandığı bölgeler sırasıyla Akdeniz, Ege, Karadeniz ve Marmara bölgeleridir.

Ülkemizin yanı sıra Akdeniz ülkelerinde de yoğun bir şekilde narenciye üretimi yapılmaktadır. Taze tüketiminin yanı sıra meyve suyu üretimi de yaygındır. İtalya'da yılda 1 milyon ton üretilen narenciye posasının deşarj edilmesinden ve değerlendirilmesinden kaynaklı maliyetler doğrudan doğruya üretime yansımaktadır. Bu da meyve suyu fiyatlarında yükselmeye neden olmaktadır. Bu nedenle meyve suyu üretimi sonucunda oluşan posalar ise önüne geçilemez bir çevre sorunu haline gelmiştir. Posanın maliyeti besin değeri ile karşılaştırılacak olursa oldukça düşüktür. Bu son ürün yüksek miktarlarda pektin ve çözünebilir karbonhidrat içermektedir. Narenciye posalarının aynı zamanda selüloz içeriği yüksek, azot içeriği ise düşüktür. Bu yüzden kurutulmuş narenciye posaları geniş getiren hayvanların diyetinde kullanılmıştır. Ancak narenciye posalarının kurutulmasıyla elde edilen yemlerin kullanılması kurutma işleminin çok pahalı olması nedeniyle oldukça seyrek [56]. Fabrikadan atık olarak çıkan posalar, hayvan yemi olarak kullanılacağı zaman hızlı bir şekilde hedef hayvanları tarafından tüketilmesi gerekmektedir. Çıkan posaların asiditesi çok yüksek olduğu için römorklarda metallerin korozyona uğraması kaçınılmazdır. Bu nedenle yüksek nem içeren bu atık maddenin taşınabileceği limit bir uzaklık vardır [58].

THP üretimi için portakal kabuğunun kullanılması üzerine yapılan ilk araştırma sonuçları hayvan yemi olarak kullanılabilceğini göstermiştir [47].

Narenciye atıklarının THP üretimi ile değerlendirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar genellikle bakteri, mayalar ve filamentli funguslardır [48, 49, 50]. Bunların arasında mayalar ve bakterilerin ortamdaki

ayrılması filamentli funguslara göre daha fazla maliyet gerektirmektedir. Bunun yerine daha geniş kullanım aralığına sahip, filtrasyonla daha kolay geri kazanılabilen, bakteri ve mayadan daha lezzetli türler olan funguslar kullanılmaktadır [47].

Çalışmada kullanılan narenciye posaları meyve suyu üretimi sonucunda katı atık olarak çıkan ETAP Tarım Gıda Fabrikasından temin edilmiştir. Çürük suyunun elde edilmesi için kullanılan narenciye çürükleri, yine ETAP Tarım Gıda Fabrikasından meyve suyu üretimi sırasında ayrılan ve çöp deponi alanına gönderilen çürüklerden ve evlerden çıkan çürümüş meyvelerden elde edilmiştir.

2.4. THP ÜRETİMİNİN ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİNDEKİ YERİ

2.4.1. Çevre Mühendisliği Açısından Önemi

Hızla gelişen endüstrileşme, üretim sonucunda çıkan atıklar nedeniyle çevre kirliliğinin hızla artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle çevreye verilen bu atıklar, kaynakları hızla kirletmektedir. İnsan kültür düzeyinin yükselmesi daha kaliteli ürünlerin üretilmesini zorunlu hale getirmektedir. Bunun sonucunda kullanılan yöntemlere göre çevreye verilen atıkların nitel ve niceliğini de değiştirmektedir. Doğanın ekolojik dengesi bu kirliliği bir sınıra kadar tolere edebilmektedir. Ancak kirlilik için kesin önlemlerin alınmaması ve kirlenmenin hızla artması sonucu ekolojik denge geri dönüşü olanaksız bir şekilde bozulmaktadır [59].

Endüstriyel kaynaklardan çıkan atıklar; katı, sıvı ve gaz formda olup, üretilen prosese göre çeşitlilik göstermektedir. Bunun yanı sıra tarımsal alanlardan hasat sonucu arta kalan atıklar, yakılarak veya deponi alanlarına gönderilerek bertaraf edilmektedir. Bu şekilde hem katı atık problemine hem de hava kirliliğine neden olmaktadır.

Bazı gıda endüstrilerinden çıkan atıklar BOİ ve KOİ değerleri çok yüksek ve alıcı ortamda çok büyük etkiye sahip atıklardır. Buna en güzel örneklerden biri de peynir üretimi sonucunda son ürün olarak çıkan peynir altı suyu olup yılda 145×10^6

ton üretilmektedir. 1 kg peynir üretimi sırasında 9 kg peynir altı suyu üretilmektedir. Oluşan sıvının düşük konsantrasyonda katı madde (% 6-7 kuru madde) içermesi nedeniyle genellikle atık olarak düşünülmektedir. Günde 100 ton sütü işleyen süt ürünleri tesislerinden çıkan çıkış suları benzer kalitede organik yük içerir. Tüm bunlara rağmen 50 yılı aşkın süreden beri dünyanın yaklaşık yarısında peynir üretilen tesislerden çıkan atık sular arıtılmaksızın deşarj edilmektedir. Bu yüzden büyük miktarlarda üretilen ve yüksek derecede organik yük içeren bu atık çevrede çok büyük problemlere neden olmaktadır. Peynir altı suyu; 30,000-50,000 ppm BOİ₅ ve 60,000-80,000 ppm KOİ içeriğine sahiptir. Bu atıktan 10,000 ppm KOİ azaltılması ile içeriğindeki protein geri kazanılmaktadır. Peynir altı suyu laktozunun THP üretimi, etanol ve metan üretimiyle biyolojik dönüşümü yapıldığında % 75'den daha fazla BOİ indirgenmesi sağlanmaktadır. Elde edilen ürün de ekonomik pazara sunulmaktadır [38]. Bu alanda ticari alanda pilot ve ticari ölçekli bir çok tesis bulunmaktadır.

Yine aynı şekilde arıtılmadan çevreye verildiğinde ekolojik dengeyi etkileyen bir diğer atık da, zeytin yağı üretimi sonucunda çıkan zeytin karasuyudur. Bu atığın organik yükü oldukça fazladır. Bu atığın arıtılması yönünde birçok çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında THP üretimi de hem atığın organik yükünün giderilmesi hem de hayvan yemi katkı maddesi olarak yeni ürün elde edilmesi açısından çok önem taşır.

Melas, şeker fabrikalarında üretim sonucunda çıkan bir yan üründür. Bu yan ürün, genelde etanol üretimi ile değerlendirilebilmektedir. Ancak bu ürünün çok yüksek oranda organik yük içermesi nedeniyle etanol üretiminden kaynaklı damıtma atığı yüksek kül, düşük pH, yüksek oranda mineral tuzlar ve 45-65 g/L'lik BOİ değerine sahiptir [62]. 10-14 L melastan yaklaşık olarak 1L etanol üretilmektedir. Bu üretim sonucunda çıkan atık su da yüksek BOİ değerine sahiptir. Shojaosadati ve ark. [62] yapmış oldukları çalışmada etanol üretiminden sonra çıkan atık suda *Hansenula* filamentli fungusu geliştirilmiş ve içerisine azot ve fosfor kaynağı eklemeksizin biyokütle miktarı 5.7 g/m³ iken KOİ gideriminin % 35,7, azot ve fosfor kaynağı eklendikten sonra biyokütle miktarınının 8.5 g/m³'e ve KOİ gideriminin %

39.6'a yükseldiği tespit edilmiştir. Bu şekilde melasın etanol üretiminden sonra çıkan yine organik yükü fazla atık su, THP üretimiyle değerlendirilerek çevreye zararsız hale getirilmektedir.

Katı atık olarak ise tarımsal alanlarda arta kalan kalıntılar katı veya yarı katı faz fermentasyon kullanılarak, proteince zenginleştirilmiş hayvan yemi (THP) üretimi yapılmaktadır. Aynı zamanda bu atıklardan THP üretiminin yanı sıra enzim üretimi yapılarak üretilen enzimler tekstil atık sularının renk giderim çalışmalarında, kozmetik endüstrisinde ve tıp gibi birçok alanda kullanılabilir [62].

Aynı şekilde bu çalışmada da kullanılan narenciye çürük suları ve narenciye posaları çevre açısından çok önemli atıklar arasındadır. Çünkü fabrikada üretim sırasında ayrılan çürükler ve üretim sonucunda gerek ihraç gerekse iç piyasada kullanılmak üzere paketleme ünitelerinden ayrılan çürük narenciyeler doğrudan doğruya çöp deponi alanlarına gönderilmektedir. Çürüklerden kaynaklanan sular ise yüksek derecede organik yüke sahiptir. Meyve suyu üretimi sonucunda çıkan posalar ise % 80-85 oranında nem içermekte olup, asidik özelliklere sahiptir. Bu yüzden kısa süre içerisinde hayvan üreticilerine verilmekte veya çöp deponi alanlarına gönderilmektedir. Bitkiler için gübre olarak kullanıldığı da görülmüştür. Ülkemizde yılda meyve suyu üretiminde 6.223 ton narenciye üretildiği ve meyve suyu üretimi sırasında bunların yaklaşık olarak % 40-65 oranında posa elde edildiği düşünülecek olursa bu posaların önemli bir potansiyel oluşturduğu görülür.

Dünyada ve ülkemizde endüstriyel ve tarımsal alanlarda bu şekilde organik yükü yüksek ve THP üretimi, etanol ve biyogaz üretimi gibi değerlendirme potansiyeli olan atıklar gün geçtikçe artmaktadır. Bu atıkların doğaya doğrudan doğruya verilmesi ise ekolojik dengenin bozulması için hazır bir bomba niteliği taşımaktadır. Bu yüzden bu atıkların bu gibi yöntemlerle değerlendirilmesi hem atığa değer kazandırmakta hem de hayvanlar ve insanlar için ek gıda maddesi olması nedeniyle ekonomik bir değere sahip olmaktadır. Başlangıçta belki önemli yatırım gerektirmesi açısından oldukça pahalı görünse de, gelecekte gıda ihtiyacının karşılanmasındaki yeri düşünüldüğünde büyük önem taşımaktadır. Bugün hayvan

yemi fiyatlarındaki aşırı yükselme atıklar üzerinde THP üretimini daha çekici hale getirmektedir [65].

2.4.2. Ekonomik Değeri

Bilindiği gibi yem hammaddesi üretiminin yetersizliği ve fiyatların yüksek olması, yem sektöründe güçlükler meydana getirmektedir. Maliyeti düşürerek yem hammaddesi sıkıntısını azaltmak amacıyla denenen yollardan biri ithalatı geliştirmektir. İstatistiklere göre ithal edilen ham maddelerin yem üretimindeki payı 1989 yılında % 22.9, 1993 yılında % 32 olmuştur [64]. Bu artışa sebep olan ham maddeler daha ziyade sorgum, tapioka, mısır gibi enerji kaynakları ile balık unu, soya küspesi gibi protein kaynakları iken, 1993-1994 yıllarında bunlara tek hücre proteinleri de eklenmiştir [54]. Tek hücre proteinleri, özellikle yüksek düzeyde ve kalitede protein içermesi itibariyle soya küspesi ve balık ununa alternatif bir yem hammaddesi gibi görünmektedir. Yıllardan beri çeşitli ülkelerde tesis edilen pek çok fabrikada alg, maya ve bakterilerden çeşitli tekniklerle üretilen tek hücre proteinleri dünya piyasasına sunulmakta ve genellikle ekonomik olması itibariyle gelişmekte olan veya gelişmemiş ülkelerde bu ürünün kullanılması sağlanmaktadır. 1970'li yıllarda İngiltere, İtalya, Fransa ve A.B.D'de kurulan fabrikalarda, hidrokarbon besiyerinde üretilen tek hücre proteinlerinden petrol mayası; içlerinde ülkemizin de bulunduğu pek çok ülkeye satılmak istenmiş; fakat yapılan testlerden sonra ham besin maddesi yapısı itibariyle balık ununa eşdeğer olduğu saptanan ürünün, farelerle yapılan biyolojik araştırmalar sonunda, önemli olmayan bazı anormallikler tespit edilmiştir. Aynı ürünle yapılan ikinci bir besleme denemesinde balık ununa eşdeğer sonuçlar elde edilmiştir [63].

3. MATERYAL ve METOD

3.1.ÇALIŞMADA KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR VE KÜLTÜRLERİN DEVAMLILIĞI

Çalışmada kullanılan filamentli funguslar *A. niger* ve *P. roquefortii* Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarından sağlanmıştır. Stok kültürlerin devamlılığı için 30 °C’de 5 gün inkübatörde (Mammert Marka Be-400 Model) inkübe edildikten sonra çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C’de saklanmıştır.

3.2.ÇALIŞMADA KULLANILAN NARENCİYE ATIKLARININ HAZIRLANIŞI

Çalışmada ETAP Tarım Gıda meyve suyu fabrikasından temin edilen portakal, limon ve greyfurt çürük suyu (narenciye çürük suyu) ile portakal ve limon posaları (narenciye posası) kullanılmıştır.

3.2.1. Narenciye Çürük Sularının Elde Edilişi

ETAP Meyve Suyu Fabrikasında atık olarak çöp deponi alanına gönderilen çürük meyveler alınmıştır. Alınan bu örnekler laboratuvarında BEKO marka meyve suyu sıkma makinasında çürük suları elde edilmiştir. Elde edilen çürük suları besiyeri olarak kullanıncaya kadar buzdolabında –21 °C’de saklanmıştır.

Çürük suları besiyeri olarak kullanılmadan önce herhangi bir ön işleminden geçirilmeden, % 25, % 50 ve % 75 konsantrasyonlarda besiyerine eklenmiş ve seyreltme musluk suyu ile yapılmıştır.

3.2.2. Narenciye Posalarının Elde Edilişi

ETAP Meyve Suyu Farikasında, narenciye meyve suyunun elde edilmesinden sonra son ürün olarak atılan ve çiftçiler tarafından hayvan yemi olarak kullanılan atıklar besiyeri olarak kullanmak amacıyla alınmıştır. Fabrikadan temin edilen

atıklar besiyeri olarak kullanıncaya kadar buzdolabında $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Besiyeri amacıyla kullanmadan önce ön işlemden geçirilmiştir.

3.2.3. Narenciye Posalarına Uygulanan Ön İşlem

ETAP meyve suyu fabrikasından temin edilen narenciye posaları (yaklaşık % 82 nem içerikli) Lo Curto ve ark [69], Ziino ve ark [9] tarafından kullanılan önışlemden olduğu gibi 7.6 g kuru madde/ 100mL musluk suyu olacak şekilde musluk suyu ile karıştırıldı. $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 120 dakika 2 mL asit/ 100 g kuru madde olacak şekilde % 98'lik H_2SO_4 ile ön işlemden geçirilerek vakumla filtreden geçirildi. Geriye kalan kalıntı 400 mL/ 100g kuru madde olacak şekilde sıcak suyla yıkandı ve yeniden vakum altında filtre edildi. Oluşan ürünün kuru madde içeriğini bulmak için $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat etüvde (Elektromag M6040 marka) kurutmaya bırakıldı. Ön işlemden geçirilmiş posalar 60 g kuru madde/L olacak şekilde musluk suyu ile sulandırılarak içerisine azot ve fosfor kaynakları eklenmiştir.

3.2.4. Besiyeri İçeriği

3.2.4.1. Narenciye çürük suyu için

Besiyeri içeriği aşağıdaki çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1: Narenciye Çürük Suyuna ilave edilen kimyasal katkı maddeleri [5]

KULLANILAN MADDENİN ADI	% KÜTLECE
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
NaH_2PO_4	0.2

3.2.4.2.Narenciye posaları için:

Besiyeri içeriği aşağıda Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Narenciye Posalarına ilave edilen kimyasal katkı maddeleri [9]

KULLANILAN MADDENİN ADI	g/ 100g KURU MADDE
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12,4
NaH_2PO_4	1,86

3.2.5. Besiyerlerinin Sterilizasyonu

Narenciye çürük sularına stok bazal ortam ilavesiyle oluşan sıvı besiyeri (120 °C ve 1.2 atm. basınç) 15 dakika [62] ve narenciye posaları ön işlemden çıktıktan sonra içerisine stok bazal ortam ilavesi ile oluşan yarı katı besiyeri 30 dakika (120 °C ve 1.2 atm. basınç) otoklavda steril edilmiştir [30].

3.2.6. Besiyerinin pH’sı

Ortamın pH’sını sabit tutmak için herhangi bir tampon kullanılmamıştır. Otoklava girmeden, ekimden önce ve her inkübasyondan sonra pH ölçümleri (Nel-Electronic pH 890) yapılmıştır. Buna bağlı olarak pH değişimleri tespit edilmiştir.

3.2.7. Besiyerine Fungus Ekimi

Çalışmalarda kullanılan fungus türleri, 3 mm kalınlığındaki katı agarlı besiyeri içeren petri kaplarında tüm yüzeyi örtecek şekilde üretilmiş stok kültürlerden, her biri 1cm² yüzey alanında olacak şekilde 1 parça kesilerek UV ışımalarının sağlandığı pasaj kabini içerisinde hazırlanan steril koşulda besiyerine ilave edildi.

3.2.8. Ortam Sıcaklığı

A. niger ve *P. roquefortii* ile yapılan çalışmada fermentör içerisinde filamentli fungusların üretim sıcaklığı olan 30 °C'lik koşullar kullanıldı. Bu sıcaklık ayarı fermentör içerisinde bulunan termostat sayesinde sağlandı [53].

3.2.9. İnkübasyon Süresi

Narenciye posalarının ve çürük sularının herhangi bir tampon veya pH ayarı yapılmaksızın pH'ları 3 - 4 arasında değişmektedir. Bu nedenle fermentasyon, *A. niger* ve *P. roquefortii* kültürleri 30 °C'de çürük narenciye suları 36 saat (5, 53], narenciye posaları 48 saat süre ile 200 rpm'lik çalkalamalı inkübatörde serum şişeleri içinde yürütülmüştür. (Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan çalkalamalı inkübatör) [47] .

İnkübasyon, 300 ml'lik serum şişeleri içine 50 ml besiyeri eklenerek yapılmıştır. 12 saat aralıklarla alınan her örnekteki pH değişikliği ve biyokütledeki değişimlere bakılmıştır.

3.2.10. Biyokütlenin Ortamdan Ayrılması

İnkübasyon sonrası filamentli fungusları ortamdan ayırmak amacıyla siyah bantlı S&S filtre kağıtları kullanılmıştır. Biyokütle olarak toplanan örnekler, 60 °C'deki etüvde narenciye çürük suyu için 16 saat [5] ve narenciye posası için de 24 saat [47] olmak üzere kurutmaya bırakılmıştır.

3.3. İNKÜBASYONDAN ÖNCE VE SONRA YAPILAN ANALİZLER:

ETAP meyve suyu fabrikasından temin edilen besiyeri olarak kullanılacak olan narenciye atıkları üzerinde pH, kuru madde içeriği, kül içeriği, toplam şeker (narenciye çürük suyu için Lane-Eynon metodu, narenciye posaları için Fenol-

Sülfürik asit ayracı ile indirgenmiş şeker olarak), ham protein, non-protein azotu, toplam azot, çözünebilir katı madde olmak üzere ön analizler yapılmıştır.

İnkübasyon sonucunda kurutulan örneklerde indirgenmiş şeker, toplam azot, ham protein, protein olmayan azot ve kül tayinleri yapılmıştır.

Yapılan analizler ve kullanılan yöntemler aşağıda verilmiştir:

3.3.1. pH Ölçümü

İnkübasyondan önce ve sonra filtre kağıdından süzülen süzüntü sularında Nel-Electronic pH 890 markası pH metre ile pH değerlerine bakılmıştır [5].

3.3.2. Çözünebilir Katı Madde Derişimi

Narenciye çürük sularında doğrudan doğruya narenciye posalarında ise 5,0 g örnek 25 mL saf su içerisinde 30 dakika magnetik karıştırıcıda bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülen süzüntü suyunda el refraktometresi ile çözünebilir katı madde miktarına bakılmıştır.

3.3.3. İndirgenmiş Şeker Analizi

İndirgenmiş şeker analizi sadece narenciye posalarında bakılmıştır. Posalar üzerinde yapılan indirgenmiş şeker tayini için örnekler önce Rosenberg [66]'ın yönteminden yararlanılarak asitle parçalanmıştır. Bunun için yine aynı yöntemden modifiye edilerek 0,2 g örnek içerisine % 72'lik H_2SO_4 çözeltisinden 5 mL eklenerek her yarım saatte bir karıştırılmak suretiyle 3 saat bekletilmiş ve süre sonunda 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti oda sıcaklığında 12 saat bekletildikten sonra S&S siyah bant filtre kağıdından süzülmüş ve elde edilen süzüntü suyundan 1mL alınarak 50 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltide fenol sülfürik asit yöntemiyle indirgenmiş şekere bakılmıştır [66].

Fenol sülfürik asit metodu [67] ile 1mL örnek alınıp üzerine % 5'lik fenol çözeltisinden yavaş yavaş eklenmiş daha sonra hızlı bir şekilde derişik % 98'lik H₂SO₄ çözeltisinden eklenmiştir. Oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra 488 nm'de spektrofotometrede okunmuştur.

3.3.4. Toplam Şeker Analizi

Narenciye çürük sularında ön analizde toplam şeker miktarı Lane-Eynon metoduyla tayin edilmiştir.

3.3.5. Toplam Azot Analizi

Vaccarino ve ark. [47], Ziino ve ark [9] ve Scerra ve ark.[57] narenciye atıkları ile yaptıkları çalışmalar sonucunda elde ettikleri biyokütlenin toplam azot değerini bulmak amacıyla AAOC standart metodunda [61] hayvan yemi için kullanılan yöntem kullanılmıştır. Biz de yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz THP'nin toplam azot değerini AAOC standardında belirtildiği gibi ve bu referanslara bağlı olarak Kjeldahl azotu olarak bulunmuştur. Narenciye çürük suları ve narenciye posalarında inkübasyondan önce ve sonra toplam azot değerine Kjeldahl cihazı ile (Velp Scientifica DK 20 Heating Digerter) bakılmıştır. Bu amaçla 1 g örnek tartılmış ve örneğe 7 mL H₂O₂ ve 15 mL derişik H₂SO₄ çözeltisi ve 2'şer adet Kjeldahl tablet eklenmiştir. 420 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında bekletilmiş ve distilasyon ünitesine (Velp Scientifica UDK 140 Distillation Unit) alınmıştır. Distilasyon ünitesinde 25 mL % 4'lük borik asit çözeltisi, 50 mL NaOH ve 10 mL distile su kullanılmıştır. Elde edilen örnek 0,2 N HCl ile titre edilerek sonuç toplam azot olarak verilmiştir.

3.3.6. Ham Protein Analizi

Genellikle protein içeren karışımlarının %16 azot içerdiği tahmin edilir. Bu yüzden bir örneğin protein içeriği 6.25 (=100/16) faktörüyle, hesaplanan azot içeriğinin çarpılmasıyla bulunur. Bu katsayı gıda örneğinin türüne göre değişmekle

birlikte çoğu gıda ve mikrobiyal ürün için 6.25 katsayısı kullanılmaktadır [52]. Bu nedenle toplam azot olarak bulunan sonuç 6.25 katsayısı ile çarpılarak elde edilen sonuç ham protein azotu olarak verilmiştir [9, 47, 57].

3.3.7. Non- protein Azot Analizi

AAOC'nin hayvan yemi için standart metodundan [61] modifiye edilerek narenciye posası ve elde edilen biyokütlerde non-protein azotuna inkübasyondan önce ve sonra bakılmıştır. Bunun için 1 g örnek tartılmış ve 10 mL 40 °C'lik saf su ile 30 dakika manyetik karıştırıcıda bekletilmiş ve sonra üzerine 40 mL % 15'lik Trikloroasetik (TCA) asit çözeltisi eklenerek manyetik karıştırıcıda 15 dakika bekletilmiştir. TCA'lı karışım S&S siyah bant filtre kağıdından süzöldükten sonra süzöntüden 10 mL örnek alınarak kjeldahl ile toplam azota bakılmıştır.

3.3.8. Kül Analizi

AOAC standartlarına göre kül tayini yapılmıştır. Bunun için 1 g tartılan örnek 600 °C'de 2 saat süresince yakılmış ve geriye kalan kalıntı kül değeri olarak verilmiştir [61].

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

A. niger ve *P. roquefortii* filamentli funguslarının kullanıldığı bu çalışmada, sıvı ve batık fermentasyon tekniği kullanılarak, narenciye atıklarının THP üretimiyle değerlendirilmesi araştırılmıştır. Besiyeri olarak kullanılan narenciye atıkları; narenciye posaları (portakal limon ve greyfurt) ve narenciye çürük sularıdır (portakal, limon).

Besiyeri olarak kullanılan portakal posaları, ETAP Tarım Gıda A.Ş. fabrikasından katı atık olarak çıkan ve hayvan üreticileri tarafından kullanılan düşük protein, yüksek karbonhidrat içerikli atıklardır. Batık fermentasyonunda kullanılan diğer bir substrat olan limon ve greyfurt posaları ise, çürümüş halde çıkan ve organik atık olarak çöp deponi alanlarına gönderilen çürük meyvelerden preslenip ayrılarak elde edilmiştir.

Sıvı faz fermentasyonun besiyeri içeriğini oluşturan narenciye çürük sularından portakal çürük suyu, ETAP Tarım Gıda meyve suyu fabrikasında meyve suyu üretimi için gelen meyvelerin üretime hazırlanması sırasında çıkan çürük, işe yaramayan ve çöp deponi alanına gönderilen portakal atıklarından elde edilmiştir. Greyfurt ve limon çürük suları ise doğrudan doğruya çürük suların meyvenin posasından ayrılmasıyla elde edilmiştir. Elde edilen çürük sularının karbonhidrat içeriği olarak oldukça yüksek olup doğal yapıları itibariyle de pH'ları kullandığımız fungusların optimum üreme pH'larına çok yakındır.

Narenciye atıkları, ülkemizde ve Akdeniz ülkelerine yoğun olarak çıkan bir atıktır. Özellikle Akdeniz ülkelerinde çevresel soruna yol açan ve değerlendirme çalışmaları devam eden bir atıktır. Çalışmamızda, narenciye atıklarının THP üretimiyle değerlendirilmesi araştırılmıştır.

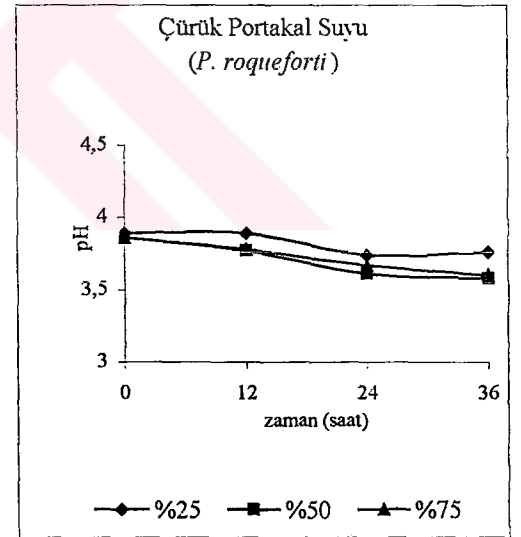
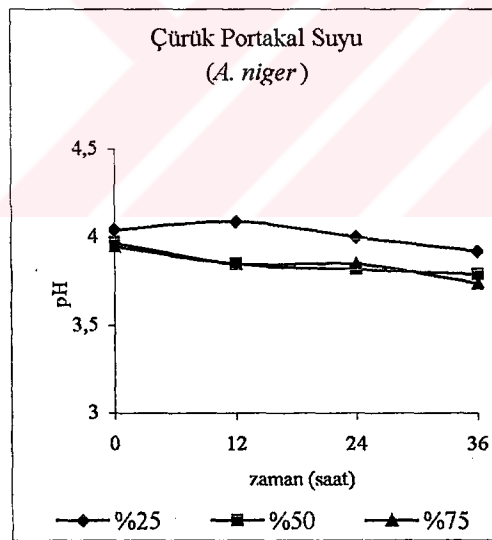
4.1. ÇALIŞMADA SIVI SUBSTRAT OLARAK KULLANILAN ÇÜRÜK NARENCİYE SULARI

Sıvı faz fermentasyonunda kullanılan substratlar yapılan toplam şeker ve indirgenmiş şeker analizlerle de ortaya çıkan, yüksek karbonhidrat içeriğine sahip ve organik yükü yüksek, çürük narenciye meyvelerinden elde edilen atık sulardır. THP üretiminde kullanılan substratların mikroorganizmalar tarafından kullanılabilme özelliğine sahip olması gerekmektedir. Bu amaçla çürük narenciye sularında biyokütle üretimi için sıvı faz fermentasyonunda *A. niger* ve *P. roquefortii* filamentli fungusları kullanılmıştır. Bu filamentli fungusların primer metabolizmada gelişebilmesi için optimum üreme gösterdikleri sıcaklık olan 30 °C seçilmiş ve sabit sıcaklıkta besiyeri içerisine pH değerini sabit tutmak için tampon eklemesi yapılmamıştır. 200 devir/dakikalık çalkalamalı fermentörde toplam 36 saatlik inkübasyon süresince her 12 saatte bir örnekler alınarak optimum üreme süresi tespit edilerek, pH ve kuru madde miktarı, ham protein, kül ve non-protein azot değerindeki değişimlere bakılarak optimum THP üretimi tespit edilmeye çalışılmıştır.

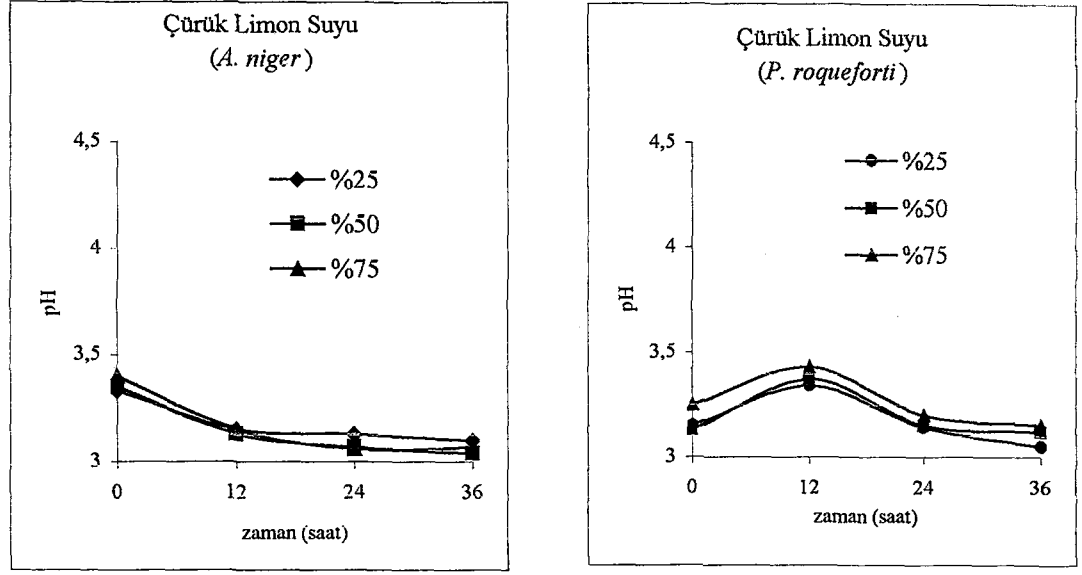
Sıvı faz fermentasyonunda kullanılan çürük narenciye sularına % 25, 50, 75'lik oranlarda sulandırma uygulanmış ve zaman içerisinde biyokütlerde meydana gelen değişimler tespit edilmiştir.

Sıvı faz fermentasyonunda Özyurt [5] tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus niger*, *A. oryzae* ve *Penicillium chrysogenum* filamentli funguslarını içeren çeşitli filamentli fungus ve mayalar % 25, 50, 75 ve 100'lük sulandırma oranlarında kullanmıştır. Elde edilen sonuçlarda % 50'lik sulandırma oranında optimum büyüme görüldüğü, 48 saatlik inkübasyonda maksimum protein içeriğinin olduğu tespit edilmiştir. Portakal ve limon çürük sularından üretilen biyokütlerin pH ve kuru madde içeriğindeki değişimlere bağlı olarak elde edilen grafiklerden de anlaşıldığı gibi %50'lik sulandırma oranının limon çürük suyunda %75'lik sulandırma oranının ise portakal çürük suyunda optimum olduğu tespit edilmiştir. Özyurt [68] tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise karışık kültürde *Aspergillus*

oryzae ve *Candida utilis* filamentli fungus ve mayası; substrat olarak ise % 50 oranında sulandırılmış zeytin karasuyu kullanılmıştır. Sulandırma oranının çok az olması veya olmaması yapılan çalışmayı reaktör açısından veya ekonomisi açısından düşünüldüğünde daha kısa süre içerisinde daha büyük miktarlarda atıksu işletilmiş olacaktır. Ancak üretim sırasında substratın konsantrasyonunda THP içeriğini değiştireceğini göz ardı etmemek gerekir. Çalışmada pH ayarlamak için herhangi bir kimyasal kullanılmamıştır. pH ayarlaması için kimyasal kullanılmaması nedeni, yapılan fermentasyon erlenlerde yürüdüğü için ve pH ayarlamaları genellikle reaktör aşamasında göz önüne alınmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre Şekil 4.1'den ve Şekil 4.2'den de anlaşıldığı gibi pH değerlerinde düşme gözlenmiştir. Shojaosadati ve ark. [62] sıvı faz fermentasyonda melas üzerinde yaptıkları çalışmada inkübasyon 200 devir/dakikalık çalkalamalı ortamda 30 °C'de, 48 saat sürdürülmüştür. Kullandığımız substratın sıvı olması nedeniyle Shojaosadati ve ark [62] tarafından yapılan çalışma göz önüne alınarak, inkübasyon 30 °C'de, 200 devir/dakika ve 36 saatte sürdürülmüştür.



Şekil.4.1. Çeşitli konsantrasyonlarda portakal çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerindeki değişim



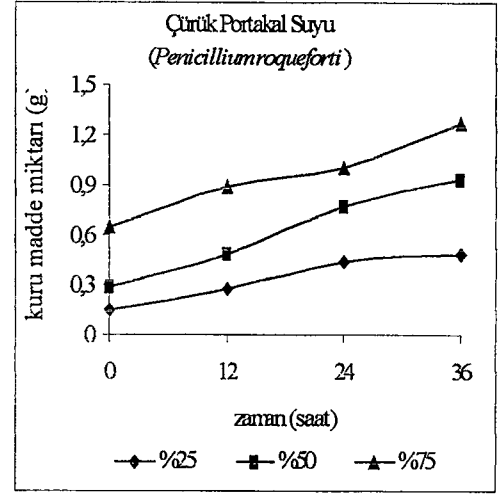
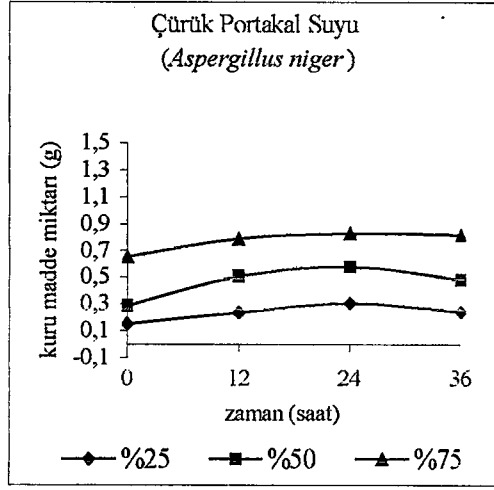
Şekil 4.2. Çeşitli konsantrasyonlarda limon çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerindeki değişim

Shojasdati ve ark. [62] tarafından yapılan çalışmada melastan etanol üretimi sonucunda çıkan organik yükü yüksek sıvı atıklardan THP üretimi ve çıkış suyunda KOİ giderimi üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmada sürekli kültürde *Hansenula spp.* fungusu kullanılmış ve herhangi bir kimyasal ekleme yapılmaksızın 5,7 g/L'lik biyokütle % 31'lik KOİ giderimi tespit edilmiştir. Azot ve fosfor kaynağı eklemesiyle biyokütle miktarının 8,5 g/L'ye ve KOİ gideriminin % 35,7'ye çıktığı gözlenmiştir. THP'nin ham protein içeriğinin ise azot ve fosfor kaynağı eklenmediğinde % 39,5 iken azot ve fosfor kaynağı eklendiğinde % 50,6'ya yükseldiği görülmüştür. Ortama eklenen azot ve fosfor kaynaklarının protein içeriğini değiştirdiği gözlenmiştir. Bunun için yaptığımız çalışmada, sıvı faz fermentasyonu üzerine yapılan birçok çalışmada kullanılan azot ve fosfor kaynaklarının miktarları kullanılmıştır. Bu amaçla kütlece % 0,5 $(NH_4)_2SO_4$ olmak üzere azot, kütlece % 0,2 NaH_2PO_4 olmak üzere fosfor kaynağı eklemesi yapılmıştır.

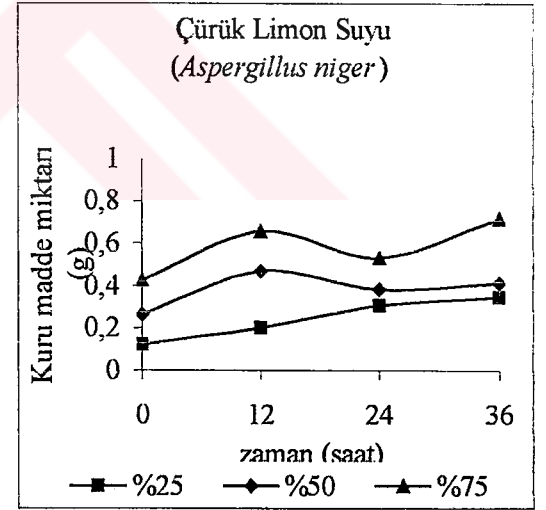
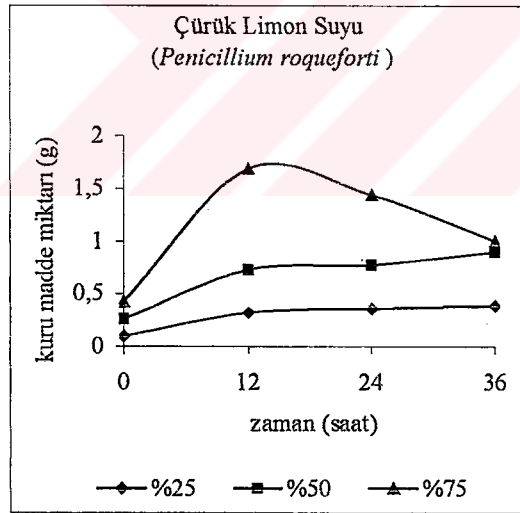
Narenciye çürük sularında inkübasyon boyunca pH'larında belirgin bir değişim olduğu Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'den de görülmektedir. Ortamda biyokütle

artışına bağlı olarak pH değerinin; portakal çürük suyunda *A.niger*'da 4,04'den 3,74'e, *P. roquefortii*'nin 3,89'dan 3,58'e düştüğü limon çürük suyunda *A. niger* kullanıldığında 3.35'dan 3.04'e düştüğü görülmüştür. Elde edilen sonuçlardan da anlaşılacağı gibi ortamda fungusun üremesine bağlı olarak pH değerinde değişme meydana gelmektedir. pH değerindeki bu değişme üreme sırasında ortamı hem tamponlamak amacıyla hem de substratı kullanmak amacıyla fungus tarafından salgılanan enzimlerden kaynaklanabilir. Çürük limon suyunda pH değerindeki değişime bakıldığında ilk 12 saatte belirgin bir artış olduğu ve pH değerini 3,4'e çıkardıktan sonra pH değerini 3 civarına çektiği görülmektedir. Aynı şekilde fungus geliştiği ortamın pH değerini değiştirerek gelişebileceği koşulları sağlamıştır. *A. niger*'ın pH 3 değerinde sitrik asit üretimi yaptığı da göz önüne alınabilir. Özyurt [5] tarafından zeytin karasuyunda *A.niger* ile yapılan inkübasyonda başlangıç pH değerinin 4.7'den 2.9'a düştüğü tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan filamentli funguslar, asidik ortamda daha verimli bir şekilde geliştiği ve kullanılan substratın pH değerinin bu filamentli fungusların gelişmesi için uygun olması nedeniyle herhangi bir tampon kullanılmamıştır.

Yaptığımız çalışmada her 12 saatte bir alınan örneklerde pH, kuru madde miktarı, ham protein, kül ve non-protein azotu analizleri yapılarak optimum THP üretim zamanı belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre narenciye çürük sularında kuru madde miktarının sulandırma oranına bağlı olarak düzenli bir şekilde arttığı (Şekil 4.3, Şekil 4.4) ve *A.niger* için portakal çürük suyunda optimum inkübasyon süresinin 24 saat olduğu, *P. roquefortii* için de kuru madde ve protein içeriğine bağlı olarak 36 saat olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlardan da anlaşılacağı gibi substratın daha yoğun olduğu koşullarda üremenin daha fazla olduğu ve ortamdaki derişime bağlı olarak kuru madde içeriğinin de değiştiği görülmüştür.



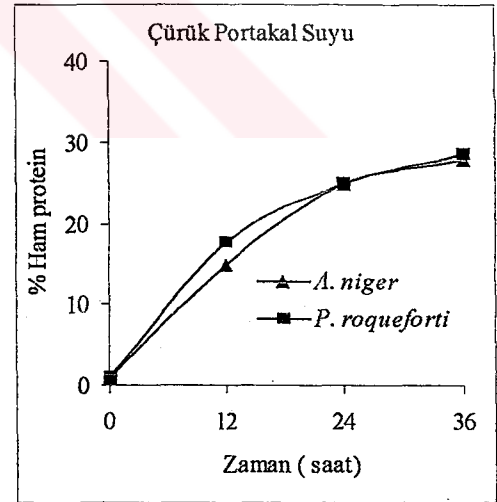
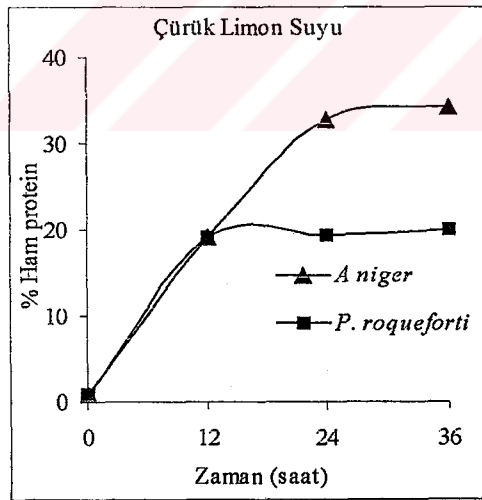
Şekil 4.3. Çeşitli konsantrasyonlarda portakal çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde ağırlığında değişim



Şekil 4.4. Çeşitli konsantrasyonlarda limon çürük sularının inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde ağırlığında değişim

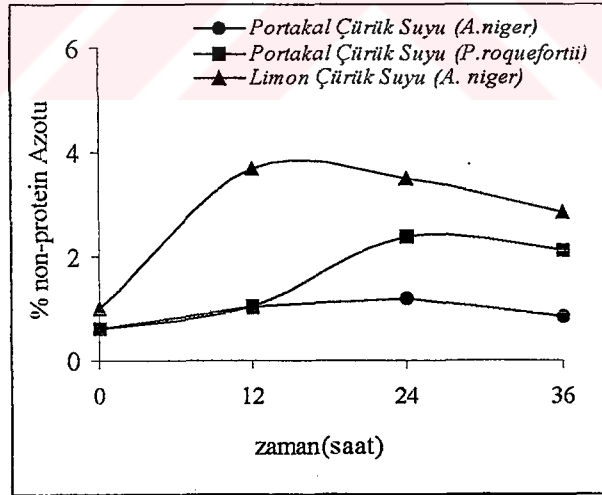
Narenciye çürük sularında geliştirilen filamentli fungusların protein içerikleri şekil 4.5'de verilmekte olup, protein içerikleri karşılaştırıldığında; portakal çürük

sularında 36 saatlik inkübasyon sonrasında *A. niger*'da % 27.8'lik protein içeriği, *P. roquefortii*'da % 28.7'lik protein içeriği saptanmıştır. Limon çürük suyunda da ise 36 saatlik inkübasyon sonrasında *A. niger*'da % 34,22'lik protein içeriği, *P. roquefortii*'da % 19,9'luk protein içeriği saptanmıştır. Çürük suları içerisinde geliştirilen fungusların ham protein içerikleri substrata bağlı olarak değişecektir. Özyurt'un [5] laboratuvarında aynı koşullar altında zeytin karasuyunda yaptığı çalışmada ise, *A. niger*'ın inkübasyonundan elde edilen biyokütlenin % 26, *A. oryzae* filamentli fungusundan elde edilen biyokütlenin % 27'lik, *P.chrysogenum*'un % 31'lik protein içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi THP üretiminde kullanılan substratın, protein içeriğinde büyük rol oynadığı ve inkübasyonda kullanılan mikroorganizmaların farklı oluşunun ham protein içeriğini etkilediği açık bir şekilde görülmektedir. Ham protein içeriğindeki değişimler göz önüne alınarak inkübasyon süresi belirlenecek olursa kuru madde ve pH içeriğine bağlı olarak tespit edilen inkübasyon süresiyle aynı olduğu görülmektedir.

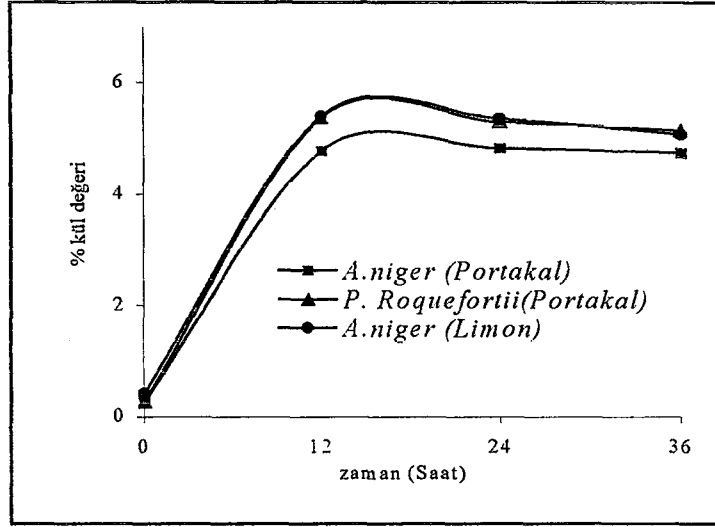


Şekil 4.5. Portakal ve limon çürük sularında inkübasyon boyunca zamana bağlı ham protein içeriğindeki değişimi

Sıvı fazda üretilen biyokütlelerde non-protein azotu değerleri; portakal çürük suyunda *A. niger*'da % 0,6'dan % 0,85'e, *P. roquefortii*'nin % 0,7'den % 2,01'e yükseldiği, limon çürük suyunda ise % 1,0'dan % 2,83'e yükseldiği görülmüştür. Non-protein azotu protein yapısına bağlı olmayan azot değeridir. Bu sonuçlarla protein içeriğine ne kadar azotun bağlandığı ve fungusun üremesinin verimini tespit edebiliriz. Bu yüzden inkübasyon süresine ve fungusun gelişimine bağlı olarak zaman içerisinde non protein azotunda azalma beklenen sonuçtur. Şekil 4.6.'den de anlaşıldığı gibi 12 saatten sonra non-protein azotu değerlerinde düşme gözlenmiştir. Bunun nedeni kör değerlerinin non-protein azotu analizi sırasında örnek içerisinde filamentli fungusun olmamasından ve filtre üzerindeki kalıntıda non-protein azot değerine bakılmasından kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra inkübasyondan önce ortama azot ve fosfor kaynağının eklendiğini de göz ardı etmemek gerekir. 12 saatlik inkübasyondan sonra meydana gelen düşme ise filamentli fungusların gelişerek ortamdaki azotu organik azota ve buna bağlı olarak ham proteine dönüştürdüğünü göstermektedir.



Şekil.4.6. Portakal ve limon çürük sularında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak non-protein azotundaki değişim



Şekil 4.7. Portakal ve limon çürük sularında inübasyon boyunca zamana bağlı olarak kül değerlerindeki değişim

Şekil 4.7'den görüldüğü gibi çürük sularından 12 saat aralıklarla alınan örneklerde kül miktarında belirgin bir değişme gözlenmemiştir. Kül değerinde meydana gelen ilk 12 saat içerisinde meydana gelen artış ortama eklenen filamentli funguslardan kaynaklanmaktadır. İnkübasyon sonucunda kül değeri ortamdaki inorganikleri içerdiği için değişiklik olmaması beklenmektedir.

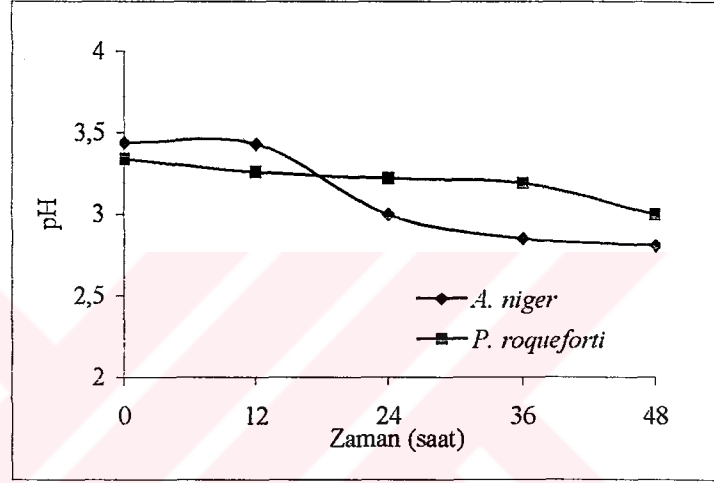
4.2. ÇALIŞMADA YARI KATI SUBSTRAT OLARAK KULLANILAN NARENCİYE POSALARI

Çalışma sırasında ETAP Tarım Gıda A.Ş. fabrikasından temin edilen portakal posaları ve narenciye presinden sıkılan çürük sularından elde edilen diğer posalar inkübasyondan önce bir ön işlemden geçirilmiştir. Daha sonra ortam azot ve fosfor kaynağınca zenginleştirilmiş ve filamentli fungusların transferi parça ekimi ile olmuştur. Ortama filamentli fungusların gelişimi için gerekli olan mikronütrient eklemesi yapılmamıştır. Ziino ve ark [9] tarafından yapılan çalışmada da batık fermentasyonda portakal posalarının inkübasyonu sırasında da mikronütrient eklemesi yapılmamıştır. Toplam 48 saat süren inkübasyon boyunca 12 saatte bir örnekler alınarak, S&S siyah bant filtre kağıdından geçirildikten sonra süzüntü suyunda meydana gelen pH değişimlerine ve filtre kağıdında kalan kalıntıda ise ham protein, toplam azot, non-protein azotu, indirgenmiş şeker, kül, kuru maddede meydana gelen değişimlere bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

4.2.1. Portakal Posası:

Şekil 4.8'den de görüldüğü gibi 12 saat aralıklarla alınan örneklerin pH değerlerinde belirgin bir azalma görülmüştür. *A. niger*'in 48 saatlik inkübasyon sonunda pH değerinin 3,44'den 3,04'e düştüğü ve *P.roquefortii*'nin ise 3,34'den 3,19'a indiği görülmüştür. pH değerindeki değişme çürük sularında olduğu gibi fungusun ortamdaki substratı kullanarak gerek selüloz parçalaması sonucunda oluşan bileşiklerden gerekse üretim sırasında ürettiği enzimlerden kaynaklanmaktadır. Lo Curto ve ark. [69] portakal posası ile *Geotrichum candidum* filamentli fungusu ile yaptıkları fermentasyonda, 16 L'lik çalkamalı otomatik fermentör kullanılmış ve çalışmada ortamın pH'sını sabit tutmak için N₂ gazı kullanılmıştır. Ziino ve ark [9], yaptıkları çalışmada bilgisayar kontrollü sürekli fermentörde pH ayarı sağlamak için N₂ gazı kullanılmıştır. Vaccorino ve ark. [47]'nin yaptıkları çalışmada ise 16L'lik 250-350 rpm devir hızına sahip fermentörde 20 g/L'lik kuru madde içeriğine sahip substrat kullanılmıştır. Ortamın pH'sı 5,5'e ayarlanmış ve fermentasyon boyunca pH kontrolü yapılmamıştır. N ve P kaynağı olarak üre ve fosforik asit kullanılmıştır.

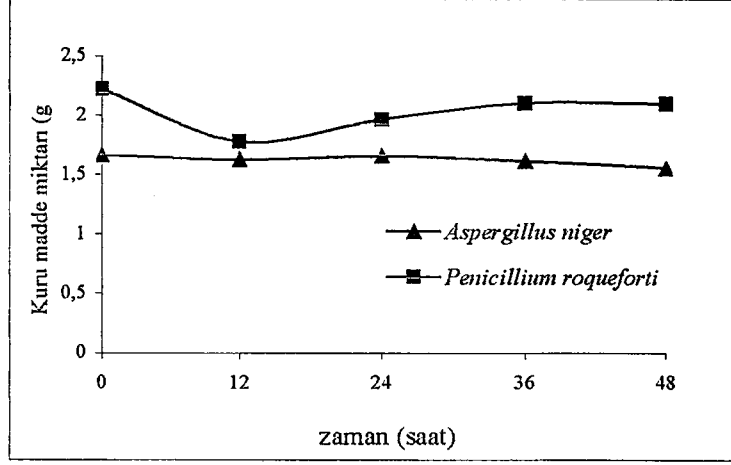
Fungusun geliştirildiği besiyerinde pH ayarının yapılmasındaki neden fungus için optimum üreme koşullarının sağlanması içindir. Aynı şekilde tampon kullanılması da üremenin sabit pH koşullarında olmasını sağlamak için yapılmaktadır. Yaptığımız çalışmada pH ayarı için herhangi bir ayarlama yapılmamıştır. Çünkü ortamın pH değeri kullanılan fungusların üremesi için uygun değere sahiptir. Tampon kullanılması ise daha çok büyük ölçekli sistemlerde yapılmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre pH değerinin zamana bağlı olarak düştüğü şekil 4.8'den de anlaşılmaktadır.



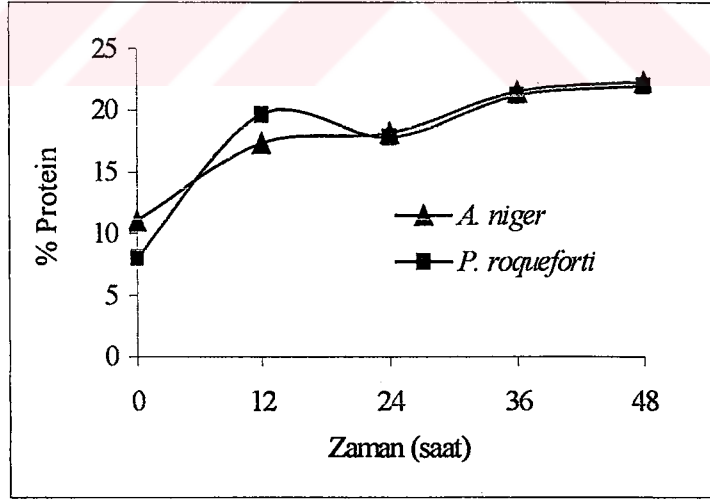
Şekil 4.8. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerlerindeki değişim.

Yarı katı fermentasyonda üretilen biyokütlenin zaman içerisinde kuru madde içeriğinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Buna karşın posanın filtre kağıdı ile ayrılmasından sonra arta kalan süzüntü suyunda yapılan çözünebilir madde içeriğinin arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlarda % 2-3 civarında olan çözünebilir katı madde içeriği % 6-7 civarına yükselmiştir. Bunun nedeni filamentli fungusların karbonhidratça zengin substratı kullanarak biyokütlesini arttırdığı ve substratın kütlelerinde azalmaya neden olmasından ve suda çözünür formda partiküllerin oluşmasına yardımcı olmasından kaynaklanmaktadır. Daha önce portakal posaları üzerinde yapılan çalışmalarda zamana bağlı olarak posanın kuru madde içeriğinde

azalma ve süzöntü suyunda çözünebilir katı madde içeriğinde belirgin bir artış olduğunu tespit edilmiş ve sonuçlar kuru madde içeriğindeki % azalış olarak verilmiştir [9, 47, 69]



Şekil 4.9. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde içeriğindeki değişim

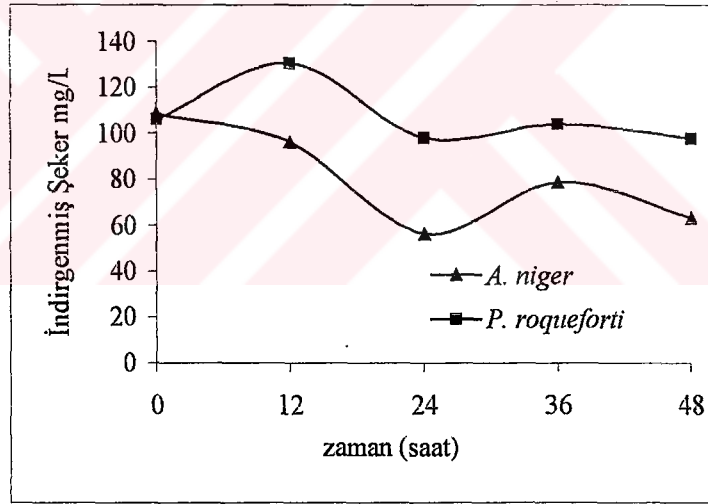


Şekil 4.10. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak protein içeriğindeki değişim

Elde edilen biyokütledeki ham protein miktarını bulmak için Kjeldahl toplam azot değeri bulunmuş ve bulunan sonucun 6.25 katsayı ile çarpılması ile elde edilen değer toplam ham protein değeri olarak verilmiştir. Portakal posalarında bulunan toplam azot değerine bağlı olarak 48 saatlik inkübasyon sonunda yaklaşık olarak % 10'luk ham protein içeriğinin *A.niger*'de % 22,33'e, *P.roquefortii*'de % 21,26'a yükseldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Vaccarino ve ark. [47] batık fermentasyonda portakal kabukları ile *Geotrichum candidum* ile yapılan çalışmada % 20,5'lik zenginleştirme sağlanabilmiştir. Lo Curto ve ark. [69] aynı filamentli fungus ve substrat ile otomatik bir fermentörde, ortamda tampon kullanarak yaptıkları çalışmada ise posalarda sulandırma oranına bağlı olarak % 39-44 arasında değişen miktarlarda ham protein içeriği saptanmıştır. Ziino ve ark. [9] aynı ortamda yine tampon kullanarak gerçekleştirdikleri inkübasyonda sulandırma oranlarına bağlı olarak lipit içeriğine bakılmış ve elde edilen biyokütlenin % 4 lipit içerdiği görülmüştür. Başlangıç değeri ile karşılaştırılacak olursa *A. niger* ile yapılan inkübasyon sonucunda % 201,72'lik, *P. roquefortii* ile inkübasyon sonucunda % 263,44'lük zenginleştirme olduğu Şekil 4.9'dan da anlaşılmaktadır. Scerra ve ark. [57]'nin katı faz fermentasyonda *A.niger* ile yaptıkları çalışmada 15 günlük inkübasyon sonucunda portakal posasında % 92,86'lık zenginleştirme sağlayabilmişlerdir. Yapılan bu çalışmalarını da referans olarak alacak olursak, diğer çalışmalar ve yaptığımız çalışmalar arasında görülen bu farklar kullanılan substratın aynı olmasına karşın kullanılan filamentli fungusun farklı olması ve besiyeri ortamında tampon kullanılmamasından kaynaklanmaktadır.

İndirgenmiş şeker ve non-protein azotu değerlerine bakıldığında her iki filamentli fungusda da belirgin bir şekilde indirgenmiş şeker değerinde düşme gözlenmektedir. İndirgenmiş şeker içeriği ortamda bulunan monosakaritlerin feneol ile oluşturduğu mavi kompleks yapının spektrofotometrede ölçülmesiyle bulunmuştur. Besiyerinde fungusun üremesi durumunda karbon kaynağı olarak mono ve disakaritleri kullanacak ve bu şekilde indirgenmiş şeker içeriğinde bir azalma olması beklenecektir. Portakal posalarında 108,8 ile 106,15 mg/L'lik indirgenmiş şeker içeriği *A.niger* ile 63 mg/L'ye, *P. roquefortii* ile ise 103,95 mg/L'ye kadar düşmüştür (Şekil 4.11). Protein artışına bağlı olarak meydana gelen

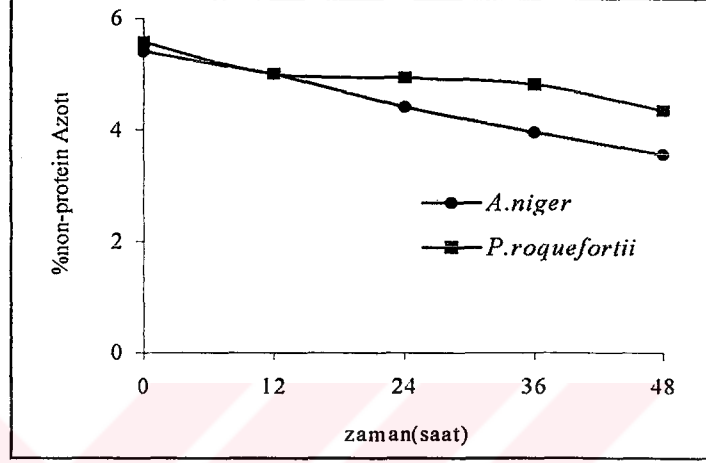
bu düşüş posa içerisinde bulunan mono ve disakaritlerle selüloz fraksiyonlarının filamentli funguslar tarafından kullanıldığını göstermektedir. Bu şekilde fungus üremesini devam ettirerek ham protein içeriğinde artışa yol açabilmektedir. Aynı şekilde Shojaosadati ve ark [70] narenciye, buğday samanı ve şeker pancarı küspesine ayrı olarak *Neurospora sitophila* üzerinde katı faz fermentasyonda yapmış oldukları çalışmada selüloz içeriğinin, protein içeriğindeki artışa bağlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Çalışmada hem substrat hem de kullanılan fungus farklı olmasına rağmen bu çalışmada da indirgenmiş şeker içeriğindeki azalış bu açıklamayı yapmamızı sağlayabilir. Scerra ve ark. [10]'nın narenciyenin bir türü olan bergamot meyvesinin kabukları üzerinde *P. roquefortii* ve *P. camemberti* filamentli fungusları ile batık fermentasyonda yapmış oldukları çalışmada protein içeriğindeki artışa bağlı olarak karbonhidrat içeriğinde kayıp meydana geldiğini görmüşlerdir.



Şekil 4.11. Portakal posasında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak indirgenmiş şeker değerindeki değişim

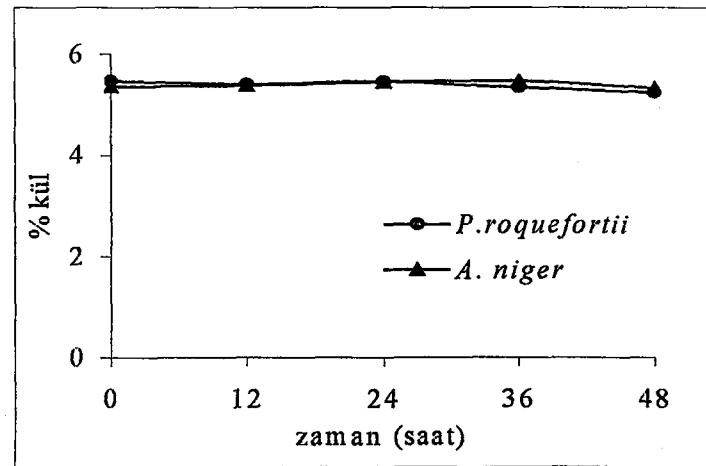
Portakal posalarında üretilen biyokütlede non-protein azot değerinin ise 48 saatlik inkübasyon sonucunda zamana bağlı olarak azalma gösterdiği şekil.4.12.'de görülmektedir. % 5,40 ile 5,57 aralığındaki non-protein azot değerinin *A. niger* ile % 3,55'a ve *P. roquefortii* ile % 4,34'e düştüğü bulunmuştur. Scerra ve ark. [10,

57], Ziino ve ark. [9] yaptıkları çalışmalarda zamana bağlı olarak non-protein azotunda düşme saptamışlardır. Yapılan çalışmalarda non-protein azotunda bulunan yüksek değer, kullanılan narenciyenin türünden ve yetiştirildiği ortama göre değişiklik göstermesinden kaynaklanmaktadır. Ancak burada besiyerinin azotça zenginleştirildiğinin de göz ardı edilmemesi gerekmektedir.



Şekil 4.12. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak non-protein azotundaki değişimler

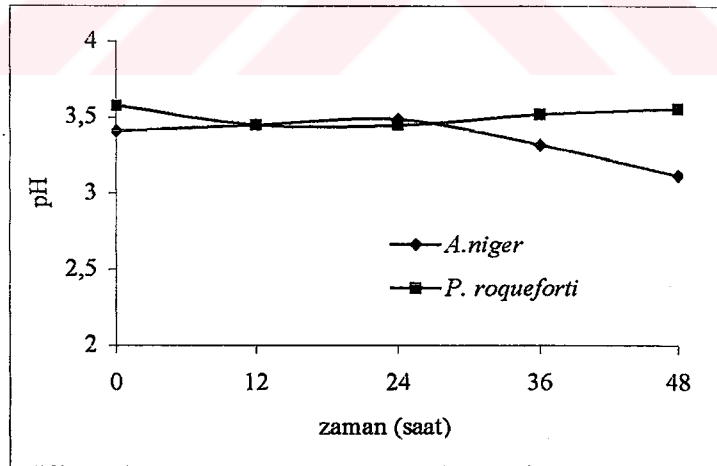
Portakal posalarında kül içeriği ortamda bulunan inorganikleri temsil ettiği için, 48 saatlik inkübasyon boyunca belirgin bir değişim göstermediği görülmektedir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Portakal posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kül içeriğindeki değişimler

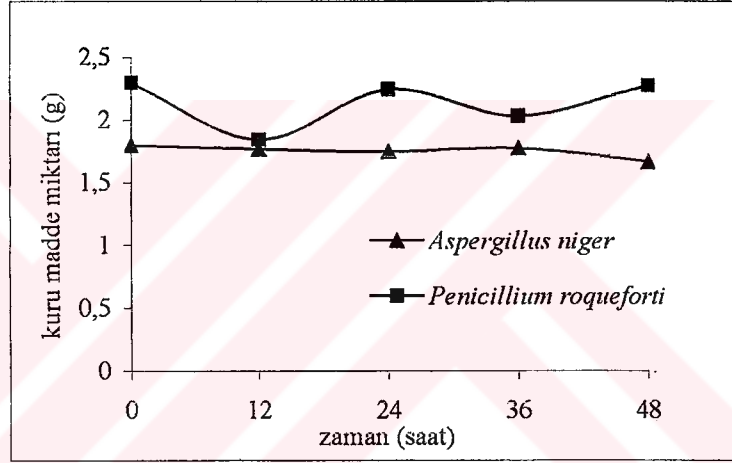
4.2.2. Limon Posası:

Yapılan literatür taramasında limon posasının kullanıldığı tek bir çalışmaya rastlanmıştır ve açıklamalar sırasında bu çalışma referans alınmıştır. Genellikle yapılan THP üretimi çalışmalarında THP üretiminin yanı sıra enzim üretimine de bakılmaktadır. Yaptığımız çalışmada ise batık fermentasyonda inkübasyon boyunca pH'da zamana bağlı olarak şekil 4.14.'den de anlaşıldığı gibi düşüş gözlenmiştir. De Gregorio ve ark. [71] tarafından limon posasında batık fermentasyonda yaptıkları THP ve ham pektinaz üretimi sonucunda besiyerinde pH'nin zamana bağlı olarak düştüğü bildirilmiştir. Düşük pH değeri kullanılan mikroorganizmanın (*A. niger* ve *Trichoderma viride*) optimum gelişim şartlarını sağlamak amacıyla sodyum karbonat ile yükseltilmiştir. İnkübasyondan önce ortama mikronütrient eklemesi yapıldığı bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki filamentli fungusun zamanla kuru madde içeriğinde azalış ve ham protein içeriğinde artış tespit edilmiştir.

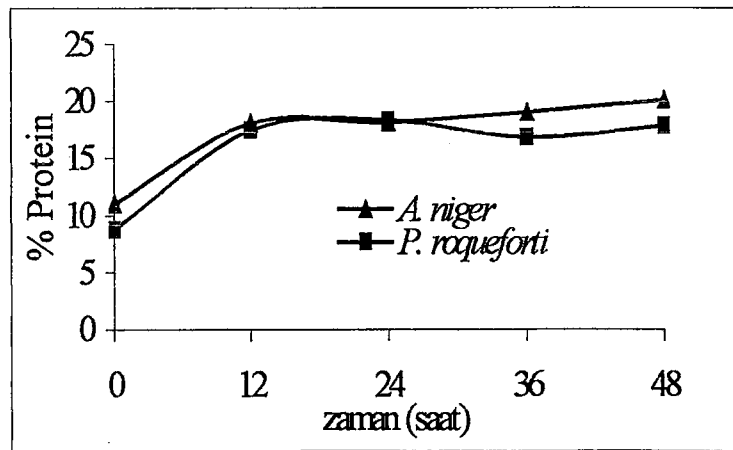


Şekil. 4.14. Limon posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerlerindeki değişim

Limon posasının kullanıldığıımız bu çalışmada ise benzer eğilim gözlenmiş inkübasyon boyunca biyoküttele ve pH değerinde azalma ve protein içeriğinde artış görülmüştür (Şekil 4.15, Şekil 4.16). Özellikle 24. saatten sonra *A.niger*'da pH değerinin 3'e kadar düştüğü gözlenmiştir. Bu şekildeki bir azalış fungusun karbon kaynağını kullanması ve sitrik asit üretimine geçmesinden olabilir. *A.niger* ile yapılan inkübasyonda protein içeriği % 20,07 olurken kuru madde içeriğinde % 8'lik azalma; *P. roquefortii*'de ise % 17,87'lik protein içeriği ve kuru madde içeriğinde % 5,76'lık azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu şekilde meydana gelen değişim fungusun portakalda olduğu gibi ortamda bulunan selülozu kullanmasından kaynaklanabilir.

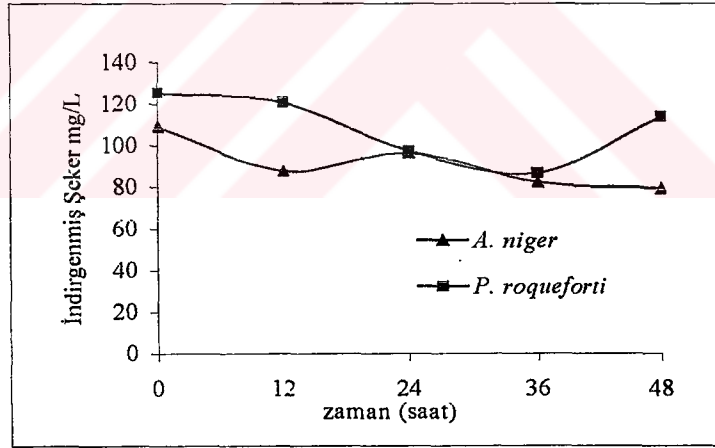


Şekil. 4.15. Limon posasında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde içeriğindeki değişim



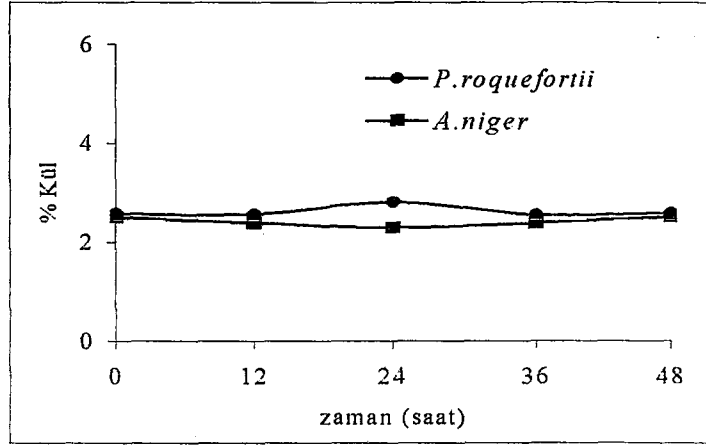
Şekil.4.16. Limon posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak ham protein içeriğindeki değişim

Limon posalarında filamentli funguslarla yapılan 48 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen biyokütlede indirgenmiş şeker değerine bakılmıştır (Şekil 4. 17]. Elde edilen sonuçlara göre *A.niger*'in olduğu besiyerinde ortalama 109,15 mg/L'lik indirgenmiş şeker değeri 79,45 mg/L'ye; *P. roquefortii*'nin olduğu besiyerinde ise ortalama 125,5 mg/L'lik indirgenmiş şeker değeri 113,9 mg/L'ye düşmüştür. Bu değer posada bulunan selüloz ve karbonhidrat fraksiyonlarının değeri olarak da düşünülebilir. Limon posasındaki indirgenmiş şeker değerindeki azalışın portakal posasına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Non protein azotu bakımından da portakal posalarında yapılan inkübasyona benzer şekilde azalış olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *A.niger* ile % 4,33'den % 2,83'e düşmüştür.



Şekil. 4.17. Limon posalarında inkübasyon boyunca zaman bağlı olarak indirgenmiş şeker miktarındaki değişim

Limon posalarının kullanıldığı bu çalışmada besiyeri içeriğindeki kül içeriğinin inkübasyon zamanına bağlı olarak değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.18].



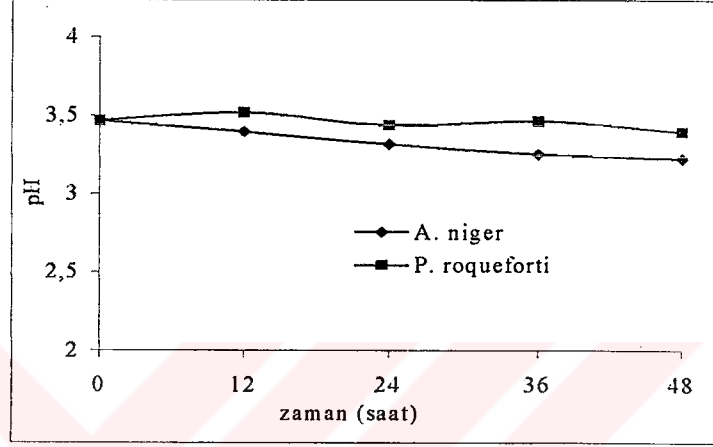
Şekil. 4.18. Limon posalarında inkübasyon boyunca zaman bağılı olarak kül içeriğindeki değişim

4.2.3. Greyfurt Posası:

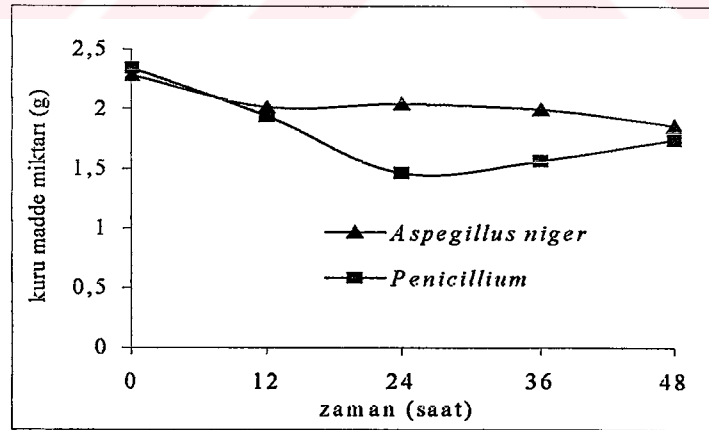
Greyfurt posaları ile ilgili yapılan araştırmalar gözden geçirildiğinde genellikle kurutularak hayvan yemi olarak kullanıldığı veya enzim çalışmalarının yapıldığı görülmektedir [72, 73]. THP üretimi veya zenginleştirme çalışmalarına rastlanmamıştır.

Yaptığımız çalışmada ise THP üretimi amacıyla greyfurt posaları kullanılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Greyfurt posalarında yapılan inkübasyonda aynı şekilde analizler yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre; inkübasyon sırasında pH değerinde, kuru madde, indirgenmiş şeker içeriğinde belirgin bir azalış, protein içeriğinde ise artış tespit edilmiştir. pH değeri; *A. niger* ile 3,5'den 3,23'e, *P. roquefortii* ile 3,5'den 3,3'e düşmüştür (Şekil 4.19). Kuru madde içeriğinde de *A. niger* ile % 22,6'lık, *P. roquefortii* ile % 34,37'lik kuru madde düşme bulunmuştur (Şekil 4.20). Kuru madde içeriğini gösteren grafikte de görüldüğü gibi 24. saatte kuru madde içeriğinde %45'lik bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş ortamda bulunan karbon kaynağının fungus tarafından kullanarak CO₂ ve

H₂O'ya kadar yıktığı ve kendi bünyesini arttırmadığını göstermektedir. Bu nedenle biyokütlede bir azalış varmış gibi görülmektedir. 36. saatten sonra meydana gelen artış ise fungusun artık ortamdaki karbon kaynağını kullanarak artışa neden olmuştur. Ham protein içeriğindeki değişime de bakıldığında 12. saat ile 24. saat arasında bir sabitlik ondan sonra bir artış olması bunu kanıtlamaktadır.

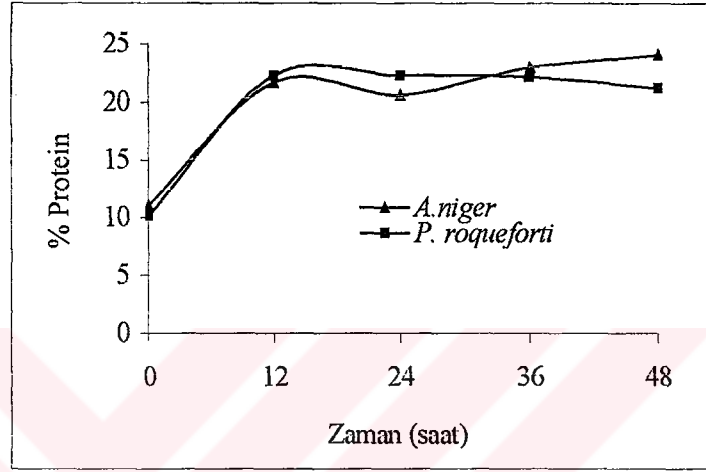


Şekil.4.19. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak pH değerlerindeki değişim



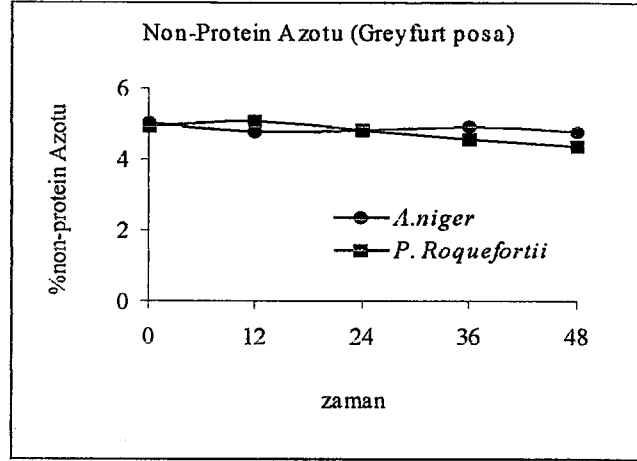
Şekil.4.20. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kuru madde içeriğindeki değişim

Ham protein içeriği açısından 48 saatlik inkübasyondan sonra *A. niger* ile % 24,06'lık; *P. roquefortii* % 21,19'lik protein içeriği bulunmuştur (Şekil 4.21.). Başlangıçtaki ham protein içeriği ile karşılaştırılacak olursa % 117,3 ile % 110 arasında proteince zenginleştirme sağlanmıştır. Greyfurt posası ile THP çalışmasında elde edilen protein içeriği portakal ve limon posasından elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.



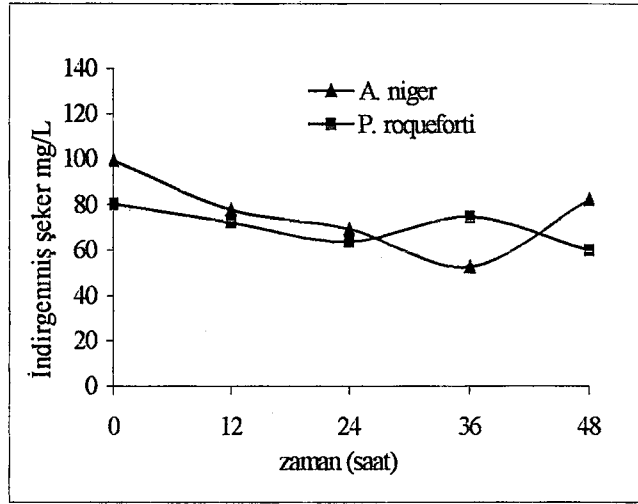
Şekil.4.21. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak ham protein içeriğindeki değişim

Non-protein azotu değerlerine bakıldığında *A.niger* ile yapılan inkübasyon boyunca başlangıçtaki % 5,00'lük non-protein içeriği % 4,74'e, *P.roquefortii* ile yapılan inkübasyon boyunca ise % 4,35'e düşmüştür. Buradan da anlaşılacağı gibi filamentli funguslar posadaki selüloz içeriğini parçalayarak non-protein azot içeriğini düşürmüştür (Şekil 4.22).



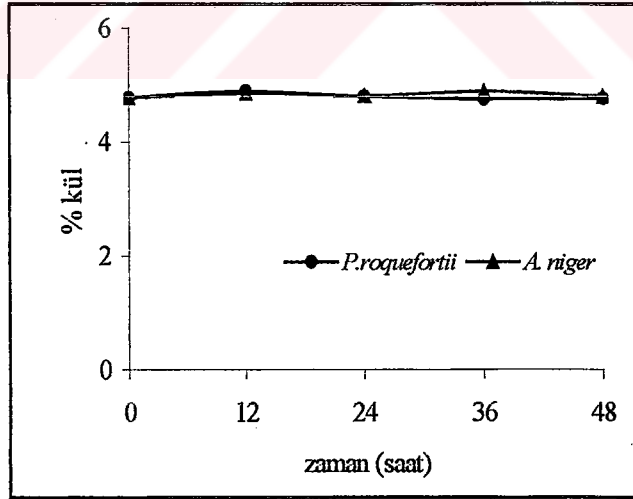
Şekil.4.22. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak non-protein azotu değerlerindeki değişim

İndirgenmiş şeker içeriği olarak bakıldığında *A.niger* ile 99,3 mg/L'den 82,1 mg/L'ye ve 36 saatlik inkübasyonda 52,45 mg/L indirgenmiş şeker içeriğinin; *P. roquefortii* ile 80,1 mg/L'den 59,85 mg/L'ye düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Greyfurt posalarının kullanıldığı bu çalışmada ortamda indirgenmiş şeker içeriğindeki değişmeye bakıldığında (Şekil 4.23), limon posası ve portakal posasına göre en fazla azalışı gösterdiği görülür. Bu sonuçlara göre bu fungusların greyfurt posasını diğer posalara göre daha kolay parçalayarak karbon kaynağı olarak kullanabildiğini göstermektedir.



Şekil.4.23. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak indirgenmiş şeker içeriğindeki değişim

Greyfurt posalarında limon ve portakal posalarında olduğu gibi, 48 saatlik inkübasyon boyunca kül değerinde değişme olmadığı Şekil 4.24'den de görülmektedir.



Şekil 4.24. Greyfurt posalarında inkübasyon boyunca zamana bağlı olarak kül içeriğindeki değişim

Elde edilen veriler ışığı altında doğrudan doğruya kurutularak hayvan yemi olarak greyfurt posalarının kullanılması yerine proteince zenginleştirilmiş greyfurt posalarının hayvan yemi olarak kullanılması [72] daha dikkate değer bulunmuştur. Çünkü greyfurt posalarının kurutma maliyetleri oldukça yüksektir. Şu anda uygulama aşamasında greyfurt posaları ya doğrudan doğruya çöp deponi alanlarına gönderilmekte ya da kurutarak veya kurutmadan hayvan yemi olarak kullanılmaktadır [72]. Daha önce proteince zenginleştirme ve THP üretim çalışmalarında, substrat olarak greyfurt posalarının kullanıldığı çalışmalara rastlanmamıştır.



4.3. MALİYET ANALİZİ

4.3.1. Narenciye Çürük Suyu İçin Maliyet Analizi

Türkiye’de yılda 26.333.000 ton narenciye üretimi yapılmaktadır. Hasat edilen ürünlerin büyük bir kısmı iç ve dış piyasada taze olarak tüketilmektedir. Bu sırada çıkan çürük meyvelerin yaklaşık olarak % 40 çürük suyu içerir. Çürük sularının değerlendirilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada 100 L kapasiteli bir fermentörün maliyet analizi çıkarılacak olursa,

- Suyun birim fiyatı 1,000,000 TL/tondur
- Elektrik’in birim fiyatı 118,000 kw/saattir.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ birim fiyatı 12 Euro/kg.
- NaH_2PO_4 birim fiyatı 23 Euro/kg.

Narenciye çürük suyu (L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ TL/ L atık	NaH_2PO_4 TL/ L atık	Elektrik Maliyeti	Su Maliyeti	Toplam harcama TL
100	9,600,000	7,360,000	2,360,000	25,000	19,345,000

Kabuller :

- Narenciye çürük suları %75 derişimde olacak şekilde musluk suyu ile sulandırılarak inkübe edilmiştir.
- İnkübatörün gereksinim duyduğu enerji bu çalışmada kullanılan çalkalamalı inkibatör baz alınarak hesaplanmıştır. Enerji sarfiyatı inkübatörün veya fermentörün kapasitesine bağlı olarak değişir.
- Maliyet hesabında çalışmada kullanılan kimyasal maddeler esas alınmıştır. Endüstriyel ölçekli çalışmalarda merck olmayan ve daha ucuz olan yerli malzeme kullanılabilir. Ziino ve ark. Tarafından yapılan THP çalışmasında fosforik asit ve üre kullanılmış ve ham protein içeriğinin

diğer azot kaynaklarının kullanıldığı çalışmalara yakın olduğu tespit edilmiştir [9].

- İnkübatörde 100 L besiyerinin kullanıldığı kabul edilmiştir.

Hesaplama:

Kimyasal maliyeti:

$$(NH_4)_2SO_4 \text{ TL} / 100 \text{ L çürük suyu} = \frac{12 \text{ Euro}}{1 \text{ kg } (NH_4)_2SO_4} \times \frac{1,600,000 \text{ TL}}{1 \text{ Euro}} \times$$

$$\frac{0,5 \text{ kg } (NH_4)_2SO_4}{100 \text{ L çürük suyu}} \times 100 \text{ L çürük suyu} = 9,600,000 \text{ TL}$$

$$NaH_2PO_4 \text{ TL} / 100 \text{ L çürük suyu} = \frac{23 \text{ Euro}}{1 \text{ kg } NaH_2PO_4} \times \frac{1,600,000 \text{ TL}}{1 \text{ Euro}} \times$$

$$\frac{0,2 \text{ kg } NaH_2PO_4}{100 \text{ L çürük suyu}} \times 100 \text{ L çürük suyu} = 7,360,000 \text{ TL}$$

Elektrik Sarfıyatı: Biyoteknoloji laboratuvarında bulunan çalkalamalı inkübatörün sürekli çalışması halinde 100w/saat, ısıtma ve soğutma sisteminin çalkama ile birlikte çalışması halinde 300 w/saat'lik enerji sarfıyatı olmaktadır. İnkübasyon süresi 36 saat olarak belirlendiğine göre elektrik maliyeti ise;

$$\text{Elektrik Maliyeti} = \frac{118,000 \text{ TL}}{1 \text{ kwsaat}} \times 36 \text{ saat} \times 300 \text{ w} \times \frac{1 \text{ kw}}{1,000 \text{ watt}} = 1,274,400 \text{ TL}$$

Kurutma 16 saat olmak üzere Nüve 500 marka etüvde yapılmıştır. Etüvün elektrik sarfıyatı 500 w/saattir. Buna göre etüvden gelecek elektrik maliyeti,

$$\text{Elektrik Maliyeti} = \frac{118,000 \text{ TL}}{1 \text{ kwsaat}} \times 16 \text{ saat} \times 500 \text{ w} \times \frac{1 \text{ kw}}{1,000 \text{ watt}} = 944,000 \text{ TL}$$

$$\text{Toplam Elektrik Maliyeti} = 1,416,000 + 944,000 = 2,360,000 \text{ TL}$$

$$\text{Su Maliyeti} = \frac{1,000,000 \text{ TL}}{1 \text{ tonsu}} \times \frac{1 \text{ ton su}}{1,000 \text{ L su}} \times \frac{25 \text{ L musluk suyu}}{75 \text{ L çürük suyu}} \times 75 \text{ çürük suyu}$$

$$= 25,000 \text{ TL}$$

EURO = 1,600,000 TL olarak alınmıştır.

4.3.2. Narenciye Posası İçin Maliyet Analizi

ETAP Tarım Gıda fabrikasında meyve suyu talebine bağlı olarak yılda 5,000 ile 9,000 ton arasında narenciye meyve suyu üretiminde kullanılmaktadır. Meyve suyu üretimi sırasında narenciyelerin % 45-60'lık kısmı posa olarak çıkmaktadır [9]. ETAP Tarım Gıda fabrikasında bu oran % 60'dır. Buna göre ETAP Tarım Gıda' meyve suyu üretimi sırasında 3,000 ile 5,400 ton arasında atık posa çıkmaktadır.

- Suyun birim fiyatı 1,000,000 TL/tondur
- Elektriğin birim fiyatı 118,000 kw/saattir.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ birim fiyatı 12 Euro/kg.
- NaH_2PO_4 birim fiyatı 23 Euro/kg.

Narenciye posası (kg)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ TL/kg atık	NaH_2PO_4 TL/ kg atık	Elektrik Maliyeti	Su Maliyeti	Toplam harcama TL
100	47,616,000	13,690,000	2,690,400	313,000	64,309,400

Kabuller :

- Narenciye posaları 1L'de 60g kuru madde olacak şekilde sulandırılarak inkübe edilmiştir.
- İnkübatörün gereksinim duyduğu enerji bu çalışmada kullanılan çalkalamalı inkübatör baz alınarak hesaplanmıştır. Enerji sarfiyatı inkübatörün veya fermentörün kapasitesine bağlı olarak değişir.
- Maliyet hesabında çalışmada kullanılan kimyasal maddeler esas alınmıştır. Endüstriyel ölçekli çalışmalarda mercek olmayan ve daha ucuz

olan yerli malzeme kullanılabilir. Ziino ve ark. tarafından yapılan THP çalışmasında fosforik asit ve üre kullanılmış ve ham protein içeriğinin diğer azot kaynaklarının kullanıldığı çalışmalara yakın olduğu tespit edilmiştir [9].

- İnkübatörde 100 kg besiyerinin kullanıldığı kabul edilmiştir.

Hesaplama:

Kimyasal maliyeti:

$$\begin{aligned} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ TL / kg atık} &= \frac{12 \text{ Euro}}{1 \text{ kg } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} \times \frac{1,600,000 \text{ TL}}{1 \text{ Euro}} \times \frac{12,4 \text{ kg } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}{100 \text{ kg kuru posa}} \\ &\times \frac{20 \text{ kg kuru posa}}{100 \text{ kg posa}} \times 100 \text{ kg posa} = 47,616,000 \text{ TL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ TL/ kg posa} &= \frac{23 \text{ Euro}}{1 \text{ kg } \text{NaH}_2\text{PO}_4} \times \frac{1,86 \text{ kg } \text{NaH}_2\text{PO}_4}{100 \text{ kg kuru posa}} \times \frac{20 \text{ kg kuru posa}}{100 \text{ kg posa}} \\ &\times 100 \text{ kg posa} = 13,690,000 \text{ TL} \end{aligned}$$

Elektrik Sarfıyatı: Biyoteknoloji laboratuvarında bulunan çalkalamalı inkübatörün sürekli çalışması halinde 100w/saat, ısıtma ve soğutma sisteminin çalkama ile birlikte çalışması halinde 300 w/saat'lik enerji sarfıyatı olmaktadır. İnkübasyon süresi 36 saat olarak belirlendiğine göre elektrik maliyeti ise;

$$\text{Elektrik Maliyeti} = \frac{118,000 \text{ TL}}{1 \text{ kwsaat}} \times 36 \text{ saat} \times 300 \text{ w} \times \frac{1 \text{ kw}}{1,000 \text{ watt}} = 1,274,400 \text{ TL}$$

Kurutma 24 saat olmak üzere Nüve 500 marka etüvde yapılmıştır. Etüvün elektrik sarfıyatı 500 w/saattir. Buna göre etüvden gelecek elektrik maliyeti,

$$\text{Elektrik Maliyeti} = \frac{118,000 \text{ TL}}{1 \text{ kwsaat}} \times 24 \text{ saat} \times 500 \text{ w} \times \frac{1 \text{ kw}}{1,000 \text{ watt}} = 1,416,000 \text{ TL}$$

Toplam Elektrik Maliyeti = 1,416,000 + 1,274,400 = 2,690,400 TL

$$\text{Su Maliyeti} = \frac{1,000,000 \text{ TL}}{1 \text{ ton su}} \times \frac{1 \text{ ton su}}{1,000 \text{ L su}} \times \frac{313 \text{ L su}}{100 \text{ kg posa}} \times 100 \text{ kg posa} = 313,000 \text{ TL}$$

EURO = 1,600,000 TL olarak alınmıştır.

Bu hesaplamalar ışığında 100 kg narenciye posası başına, %5'lik kütle azalışı olduğu düşünülecek olursa 19 kg THP üretilmekte ve üretilen 1 kg THP'nin birim fiyatı günümüz şartlarında yaklaşık olarak 3,385,000 TL olacaktır.

Yapılan hesaplamalar ışığında 50mL çürük suyundan yaklaşık olarak 0,3 g THP elde edildiğine göre 100 L'den 600 g THP elde edilecektir. Bu yüzden 1 kg THP'nin birim fiyatı günümüz şartlarında yaklaşık olarak 32,241,000 TL olacaktır. Çalışmada kullanılan kimyasalların merck olmasından dolayı maliyet yüksek görünmektedir.

Yapılan maliyet hesabında laboratuvar koşullarında yapılan çalışma göz önüne alınmıştır. Yaptığımız çalışma bundan sonra yapılacak pilot ve endüstriyel ölçekli çalışmalara yol gösterecektir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda laboratuvar ve pilot ölçekli reaktör çalışmaları olmalıdır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Türkiye’de ve özellikle Akdeniz ülkelerinde yoğun ve artan bir şekilde narenciye üretimi devam etmektedir. Meyve suyu üretimi ve taze meyve tüketimi sonucunda ortaya çıkan narenciye atıklarından THP üretimi için gerekli koşulların sağlandığı ve protein içeriğinin arttırıldığı saptanmıştır.

Narenciye atıkları, endüstriyel tarım atıkları arasında yer almaktadır. Bu atıkların enzim üretimi ve çeşitli ürünlerin yanı sıra THP üretiminde kullanılması, özellikle hayvanlarda et ve süt verimlerini arttırdığının tespit edilmesinden sonra daha çok dikkat çekmeye başlamıştır [75].

Narenciye atıkları gerek meyve suyu üretimi sonucunda posa olarak, gerekse tüketim amacıyla iç ve dış piyasaya verilen narenciyelerden ayrılan çürükler olarak çıkmaktadır. Bu atıklar ya hayvan üreticileri tarafından alınarak hayvan yemi olarak kullanılmakta ya da çöp deponi alanlarına organik atık olarak atılmaktadır. Karbonhidrat içeriği yüksek, protein içeriği düşük bu atıkların protein içeriği zenginleştirilerek hayvan yemi olarak kullanılması ise daha önce yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Yaptığımız çalışmada çürük narenciye sularının melas veya zeytin karasuyu gibi THP üretim çalışmalarında kullanılabileceği saptanmıştır. Aynı şekilde portakal posalarında daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak tampon kullanılmaksızın protein içeriği yükseltilmiştir. Limon posaları üzerine daha önce yapılan çalışmalarda inkübasyon sırasında tampon kullanılmamış ancak inkübasyondan önce pH ayarlaması yapılmıştır. Limon posaları üzerinde bizim yaptığımız çalışmada ise ne inkübasyondan önce ne de inkübasyon sırasında pH ayarlaması yapılmamıştır. pH ayarlaması yapılmaksızın geliştirilen filamentli funguslarda protein içeriğine yakın olduğu saptanmıştır [9, 69]. Greyfurt posaları üzerinde yapılan THP çalışmalarında ham protein içeriğinin, limon ve portakal posalarından elde edilen sonuçlara yakın olduğu tespit edilmesine karşın, literatürde bu atıkla ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

Narenciye posaları ile yaptığımız bu çalışma reaktör aşaması ve pilot ölçekli yapılacak çalışmalar için bir ön çalışma niteliği taşımaktadır. Narenciye posaları günümüzde iki şekilde değerlendirilmektedir. Her iki şekilde birbirine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Narenciye atıklarının kurutulmuş hayvan yemi olarak kullanılması bu ürünün daha uzun süre kullanımını sağlamakta ve asidik içeriği dengelenmektedir. Uygulanan diğer yöntemde ise posalar kurutulmadan hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Bunun dezavantajları ise asidik içeriği nedeniyle mayaların üremesi için uygun koşul arz etmesi ve atığın taşındığı konteynerlerde korozyona yol açmasından dolayı kısa süre içerisinde tüketilmesi gerekmektedir. Bu posaların değerlendirilmesi için kullanılan yöntemlerin ek maliyeti doğrudan doğruya meyve suyu fiyatlarına yansımaktadır. Buna karşın THP üretimiyle değerlendirilen bu ürünler hayvan et ve süt verimini arttırdığını [75] ve de yeni bir ürün olarak elde edilmesi düşünüldüğünde meyve suyu üreticileri tarafından cazip görünebilir.

Narenciye atıklarının yanı sıra Türkiye’de tarımsal atık olarak çıkan birçok atık mevcuttur. Bu atıkların özelliklerine göre THP üretim çalışmalarında kullanılabileceği kanısındayız. Narenciye atıklarını da içine alan tarımsal atıkların THP üretiminin yanı sıra enzim çalışmalarında da kullanılabileceği bilinmektedir.

Elde ettiğimiz biyokütlenin hayvan yemi olarak kullanılabilmesi için aminoasit profilinin, toksikolojik ve karsinojenik testlerinin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Tuse, D., "Single cell protein: current status and future prospects", *Critical Review Food Science*, **19(4)**:273-325, (1984).
- [2] Singh, BD., "Biotechnology", Kalyani Publisher, New Delhi, s. 468-510, (1998)
- [3] Anupama and Ravindra, P., "Value-added Food: Single Cell Protein", *Biotechnology Advances*, **18**:459-479, (2000).
- [4] Frazier WC. and Westhoff DC, "Food Microbiology", Tata McGraw Hill Publishing Company Limited, New Delhi, s. 398-415.(1990)
- [5] Özyurt M. "Conversion of Black Water "Olive Waste" to Microbial Protein", Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, İstanbul, ÇNAEM-R-144, (1975)
- [6] Tanaka, M. and Matsuno, R., "Conversion of Lignocellulosic to Single-Cell Protein (SCP): Recent Development and Problems", *Enzyme Microbiology and Technology*, **7**:197-206, (1985).
- [7] Gupte, A. and Madamwar, D., "Solid State Fermentation, of Lignocellulosic Waste for Cellulase and β -glucosidase Production by Cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*", *Biotechnology Programme*, **13**:166-169, (1997).
- [8] Bu'lock, J. and Kristiansen, B., "Basic Biotechnology", Academic Press, London, England, s.285-315, (1987).
- [9] Ziino, M., Lo Curto, R., Salvo, F., Signorino, D., Chiofalo, B. and Giuffrida, D., "Lipid Composition of *Geotrichum candidum* Single Cell Protein Grown in Continuous Submerged Culture", *Bioresource technology*, **67**:7-11, (1999).

[10] Scerra, V., Caridi, A., Foti, F. and Sinatra, M.C., "Influence of Dairy *Penicillium* spp on Nutrient Content of Citrus Fruit Peel", *Animal Feed Science and Technology*, **78**:169-176, (1999).

[11] DEİ Enstitüsü Raporu, "Yıllık Narenciye Üretimi ve Meyve Suyu Üretiminde Kullanılan Narenciye Miktarı", (2002).

[12] Israelidis, C.,J., (Haziran 2000), Nutrition, Erişim: <http://business.hol.gr/bio/HTML/PUBS/VOL1/isreali.htm>, (20 Mayıs 2002).

[13] Dictionary of Science, (2002) "Single Cell Protein" Oxford University Press, Market House Books, Ltd, 1999 London, <http://w2.xrefer.com/entry/492495> (20 Mayıs 2002)

[14] Keil., H., (8 Şubat 1999), "Single Cell Protein", Erişim: <http://www.brunel.ac.uk/depts/bl/project/microbiol/envmic/methbac/singlece.htm> (20 Mayıs 2002)

[15] Wainwright, M., "An Introduction to Fungal Biotechnology", 2. Baskı, Wiley Biotechnology Series, England, s. 126-136, (1992).

[16] Trevelyan, W.E., "Chemical Methods for the Reduction of the Purine Content of the Baker's Yeast, a form of Single Cell Protein", *Journal Science Food Agriculture*, **27(3)**:225-230, (1976).

[17] Martinez, M.,C., Sanchez-Montero J.M., Sinisterra, J.V. and Ballesteros, A., "New Insolubilized Derivatives of Ribonuclease and Endonuclease for Elimination of Nucleic Acids in Single Cell Protein Concentrates" *Biotechnology of Applied Biochemistry*, **12(6)**:643-652, (1990).

[18] Abou-Zeid, A.A.,Khan, J. A. and Abulnaja, K.O., "On Methods for Reduction of Nucleic Acids Content in a Single-Cell Protein from Gas-Oil", *Bioresource Technology*, **52**:21-24, (1995).

- [19] Özyurt, M., “Mikrobiyal Proteinlerin Yüksek Düzeydeki Nükleik Asitlerini Azaltma Yöntemleri”, Gıda Sanayii Dergisi, 5:51-53, (1980).
- [20] Tanenbaum, S., R., “Reducing the Nucleic Acid Content in Yeast”, Brit. Appl.,53:263, (1973).
- [21] Okanishi, M. and Gregory, K., F., “Isolation of Mutants of *Candida tropicalis* with Increased Methionine Content”, Can. J. Microbiology, 16:1139, (1970).
- [22] Özyurt, M., “Tek Hücre Proteinlerinin Amino Asitlerle Zenginleştirilmesi”, Kükem Dergisi, 1:102-104, (1980).
- [23] Litchfield, J.H., “Food Supplements from Microbial Protein”, Goldberg, I., Williams, R. (ed), Biotechnology and Food Ingredients, Newyork, USA, s.65-108, (1991).
- [24] Rhishipal,R. and Philip, R., “Selection of Marine Yeast for the Generation of Single Cell Protein from Prawn-shell Waste”, Bioresource Technology, 65:255-256, (1998).
- [25] Sanchez Villasclaras, S., Martinez Sancho, E., Espejo Caballero, M. T., and Delgado Perez, A., “Production of Microalgae from Olive Mill Wastewater”, International Biodeterioration and Biodegradation, s. 245-247, (1996).
- [26] Brian J.B., “Microbiology of fermented foods”, 2. Cilt, 2. Baskı, Blackie Academic&Professional London, England, s. 585-593, (1998).
- [27] Van der Westhuizen, T.H. and Pretorius, W.A., “Production of Valuable Products from Organic Waste Streams”, Water Science Technology, 33(8)31-38, (1996).

- [28] Chanda, S. and Chakrabarti, S., "Plant Origin Liquid Waste: A Resource for Single-Cell Protein Production by Yeast", *Bioresource Technology*, **57**:51-54, (1996).
- [29] Lo Curto, R.B. and Tripodo, M.M., "Yeast Production from Virgin Grape Marc" *Bioresource Technology*, **78**:5-9, (2001).
- [30] Banerjee, U., C., Chisti, Y. and Moo-Young, M., "Effects of Substrate Particle size and Alkaline Pretreatment on Protein Enrichment by *Neurospora sitophila*", *Resources, Conservation and Recycling*, **13**:139-146, (1995).
- [31] Konlani, S., Delgenes, J., P., Moletta, R., Traore, A. and Doh, A., "Optimization of Cell Yield of *Candida Krusei* SO1 and *Saccharomyces sp.* LK3G Cultured in Sorghum Hydrolysate", *Bioresource Technology*, **57**:275-281, (1996)
- [32] Cristiani-Urbina, E., Netzahuatl-Munoz, A.R., Manriquez-Rojas, F., J., Juarez-Ramirez, C., Ruiz-Ordaz, N. and Galindez-Mayer, J., "Batch and Fed-Batch Cultures for the Treatment of Whey with Mixed Yeast Cultures", *Process Biochemistry*, **35**:649-657, (2000).
- [33] Ho Choi, M. and Park, Y., H., "Growth of *Pichia guilliermondii* A9, an Osmotolerant Yeast, in Waste Brine Generated from Kimchi Production", *Bioresource Technology*, **70**:231-236, (1999).
- [34] Vanquez, R.R. and Cervantes, D.D., "Effect of Chemical Solutions Sprayed on Sugarcane Bagasse Pith to Produce Single-Cell Protein: Physical and Chemical Analyses of Pith", *Bioresource Technology*, **47**:159-164, (1994).
- [35] Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Garcia, H. and Forster, C.F., "Acid Hydrolysis of Shrimp-Shell Wastes and the Production of Single-Cell Protein from the Hydrolysate", *Bioresource Technology*, **57**:55-60, (1996).

- [36] Tate&Lyle Ltd. Gr. Res. and Dev., "Pilot Plant for the Study of Microbial Utilisation of Molasses", Philip Lyle Memorial Research Laboratory, The University Whiteteknights, (1973).
- [37] Tate&Lyle Ltd. Gr. Res. and Dev., "Proposal for te Microbial Utilisation of Dates for Animal Feed", Philip Lyle Memorial Research Laboratory, The University Whiteteknights, 73:4, (1973).
- [38] Siso, G.M.I., "The Biotechnological Utilization of Cheese Whey:A Review", Bioresource Technology 57:1-11, (1996).
- [39] Kitamota, H., K. and Nakahama, T., "Isolation of an I-Methionine Enriched Mutant of *Khyveromyces Lactis* Grown On Whey Permeate", Process of Biochemistry, 29:127-131, (1994).
- [40] Clark, "Yeast Single-Cell Protein Production from Casein Whey Permeate", Pak-Lum Yu (ed), Fermentation Technologies: Industrial Application, Proceeding of The International Biotechnology Conference Held at Massey University, Palmersion, New Zeland, s.271-275, (1990)
- [41] Scerra, V., Caparra, P., Foti, F., Lanza, M. and Priolo, A., "Citrus Pulp and Wheat Straw Silage as an Ingredient in Lamb Diets: Effects on Growth and Carcass and Meat Quality", Small Ruminant Research, 40:51-56, (2001).
- [42] Pandey, A, Soccol, CR, Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, P.S. and Mohan, R., "Biotechnological Potential of Agro-Industrial residues.II: Cassava Bagasse", Bioresource Technology, 74:81-87, (2000).
- [43] Vazquez R., R. and Cervantes, D., D., "Effect of Chemical Solutions Sprayed on Sugarcane Baggasse Pith to Produca Single Cell Protein: Physical and Chemica Analyses of Pith", Bioresource Technology, 47:159-164, (1994).

- [44] Pandey, A, Soccol, CR, Nigam, P. and Soccol, V.T., "Biotechnological Potential of Agro-Industrial residues.I: Sugarcane Bagasse", *Bioresource Technology*, 74:69-80, (2000).
- [45] Nigam, P., "Investigation of Some Factors Important for Solid State Fermentation of Sugar Cane Bagasse for Animal Feed Production", *Enzym and Microbiological Technology*, 12:808-811, (1990).
- [46] El-Nawwi S.A. and El- Kader A.A., "Production of Single Cell Protein and Cellulase from Sugarcane Bagasse: Effect of Culture Factors", *Biomass and Bioenergy* 11(4)361-364, (1996).
- [47] Vaccarino, R., Lo Curto, R., Tripodo, M.M., Patane, R., Lagana G. and Schachter, S., "SCP from Orange Peel by Fermentation with Fungi-Submerged and Surface Fermentation", *Biological Wastes*, 29: 279-287, (1989).
- [48] Karapınar, M., "Chemical Composition of Yeast Biomass Grown on Orange Waste", *Kökem Dergisi*, 7(2):20-23, (1984).
- [49] Karapınar, M. ve Okuyan, M., "Portakal Artıklarından Fungal protein Eldesi", *E. Ü. Mühendislik fakültesi Dergisi, Seri B*, 1(1):27-38, (1983).
- [50] Karapınar, M., "Narenciye Artıklarının Maya proteini Üretiminde Substrat Olarak Kullanımı", *Gıda Dergisi*, 9:193-196, (1984).
- [51] Çakır, İ., "Potasyum Gübrelemesinin Kütüphan Limonu ve Valencia Portakalı Yapraklarında Besin elementlerinin Mevsimsel Değişmesi, Meyve Verim ve Kaliteye etkisinin Saptanması", *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana*, 300s, (1998).

[52] Pomeranz, Y. and Meloan, C. E., "Food Analysis Theory and Practice", Third Edition, Chapman & Hall ITP An International Thompson Publishing Company, New York, NY 10119, s. 736-737, (1994).

[53] Özyurt, M., "The Amino Acid Composition of Microorganisms Grown on Olive Waste", Çekmece Nuclear Research and Training Center, P.K. 1, Hava Alanı, İstanbul, Turkey, (1977).

[54] Filya, İ., Karabulut, A., Değirmenciöğlü, T., Canbolat, Ö. ve Kalkan, H., "Turunçgil Posalarının Muhafaza ve Yem Değeri Özelliklerinin Geliştirilmesi", Vet Anim Sci 25:939-945, (2001).

[55] Karapınar, M. ve Okuyan, M., "The Utilisation of Citrus Waste as Substrate for Microbial Protein, Production by the Fungus *Sporotrichum pulverulentum*", J. Chem. Tech, Biotechnol, 32:1055-1058, (1982)

[56] Karapınar, M. ve Okuyan, M., "Composition of Fungal Biomass Grown on Citrus Waste", Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm, 7:134-136, (1982).

[57] Scerra, V., Caridi, A., Foti, F., Sinatra, M.C. and Caparra, P., "Changes in Chemical composition During the Colonisation of Citrus Pulp by a Dairy *Penicillium roqueforti* Strain" Bioresource Technology, 72:197-198, (2000).

[58] Kimball, D.A., "Citrus processing (a complete guide)" Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland USA, s. 388-432, (1999).

[59] Mazmancı M.A. "Bir Tiyazin Boya Olan Metilen Mavisinin Beyaz Çürükçül Fungus *Coriolus Versicolor* Tarafından Yıkımı", Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İçel, 84s, (1997).

- [60] Test Procedures Committee of Market Administrators, Protein Determination, (Haziran 1991), Erişim:<http://www.fmmaseattle.com/Lab/methods/protein.htm>, (29 Mayıs 1991).
- [61] Helrich, K., “Official Methods of Analysis of the AOAC”, 15th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Inc.,USA, s. 70-72, (1990).
- [62] Shojaosadati S. A.,Khalilzadeh, R., Jalilzadeh, A. and Sanaei, H.R., “Bioconversion of Molasses stillage to Protein as an Economic Treatment of This Effluent”, Resources, Conservation and Recycling, 27:125-138, (1999).
- [63] Deveci, T., “Beyaz Çürükçül Funguslar Kullanarak Elde Edilen Lakkaz, Peroksidaz ve Katalaz’ın Remazol Brilliant Blue R’nin Renk Giderimine Etkisinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, İçel, 111s, (2001).
- [64] Çalışkaner, S, Ceylan., N., Konca Y., Demirel, R., Çördük M. ve Milli, Ü., “Etil Alkol Vasatında Üretilen Tek Hücre Proteini (Eprin) Üzerinde Biyolojik Bir Araştırma”,Tr. J. of Agriculture and Forestry, 22:299-304, (1998)
- [65] Çalışkaner, S., Konca, Y., Ceylan, N., Çördük, M., Demirel R., Ceyhan, K., Mamak, M. ve Saydam, R., “Sıvı Parafın Vasatında Geliştirilmiş Tek Hücre Proteini (Paprin) Üzerinde Biyolojik Bir Araştırma”, Tr. J. of Agriculture and Forestry, 23:125-131, (1999)
- [66] Rosenberg, S.L., “Physiological Studies of Lignocellulose Degradation by the Thermotolerant Mold *Chrysosporium pruinatum*”, Development Industrial Microbiology, 20(12):133-142, (1980).
- [67] Southgate, D.,A.,T., “Determination of Food Carbohydrates”, 1. Baskı, Applied Science Publishers Ltd, England, s. 108,(1976).

- [68] Özyurt, M., “Endüstriyel Mikroorganizmaların Zeytin Suyunda Karışık Kültür Kùltivasyonu”, Gıda Sanayii Dergisi, **6(3)**:38-43, (1992).
- [69] Lo Curto, R., Tripodo, M.M., Leuzzi, U., Giuffrè, D. and Vaccorino, C., “Flavoids Recovery and SCP Production from Orange Peel”, Bioresource Technology, **42**:83-87, (1992).
- [70] Shojaosadati S. A., Faraidouni, R., Madadi-Nouei, A. and Mohamadpour, I., “Protein Enrichment of Lignocellulosic Substrates by Solid State Fermentation Using *Neurospora sitophila*”, Resources, Conservation and Recycling, **27**:73-87, (1999).
- [71] De Gregorio, A., Mandalari, G., Arena, N., Nucita, F., Tripodo, M.M. and Lo Curto, R., “SCP and Crude Pectinase Production by Slurry-State Fermentation of Lemon Pulps”, Bioresource Technology **83**:89-94, (2002)
- [72] Ammerman, C.B. and Henry, P.R., “Citrus and Vegetable Products for Ruminant Animal”, Feeding and Nutrition, University of Florida, October, 1993, Erişim: <http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/Feeding>. (29 Mayıs 2002).
- [73] Reyes, G.; Martinez, R.; Rodriguez, L.M.; Bello, R.A., and Cruz-Pascual, M., “Effect of the addition of tropical fruit wastes on the rate of production of microbial silage from fish”, Instituto de Ciencia y Tecnologia de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Venezuela, **28**: 219, s. 99-108, (1991) Erişim: <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/afris/Data/19.htm> (29 Mayıs 2002)
- [74] Karapınar, M. ve Oker, H., “A Study on the Culture Conditions of Single Cell Protein Production from Dried Fig”, Tu. J. Agri. Forest., **13(2)**:300-305, (1989).
- [75] Chiou, P., W., S., Chiu, S., W. and Chen, C., R., “Value of *Aspergillus niger* Fermentation Product as a Dietary Ingredient for Broiler Chickens”, Animal Feed Science and Technology, **91**:171-182, (2001)

ÖZGEÇMİŞ

1978 Mersin doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 1998 yılında Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünden mezun oldum. 1999 yılında Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünde Yüksek Lisans eğitimime başladım.

