



***Galactomyces geotrichum* TS61  
İLE MELAS ORTAMINDA LİPİT ÜRETİMİ**

**Ramazan ALTUN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Mesut Taşkın**

**2019**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Galactomyces geotrichum* TS61 İLE MELAS ORTAMINDA  
LİPİT ÜRETİMİ

Ramazan ALTUN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Galactomyces geotrichum* TS61 İLE MELAS ORTAMINDA LİPİT ÜRETİMİ**

Prof. Dr. Mesut TAŞKIN danışmanlığında, Ramazan ALTUN tarafından hazırlanan bu çalışma, 12/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı - Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mehmet Nuri Aydoğdu İmza : [Signature]  
Üye : Prof. Dr. Mesut TAŞKIN İmza : [Signature]  
Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ İmza : [Signature]

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 25.07/2019 tarih ve 30./63 ..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

[Signature]  
**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN**  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ***Galactomyces geotrichum* TS61 İLE MELAS ORTAMINDA LİPİT ÜRETİMİ**

Ramazan ALTUN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Mevcut çalışma yüksek oranda lipit biriktirme yeteneğine sahip olan fungusların izolasyonuna ve en iyi lipit üreticisi izolatla melas ortamında lipit üretiminin optimize edilmesine odaklanmıştır. Melas ortamında toplam 75 fungus izole edilmiş, ancak bunların 7 tanesinin yüksek oranda lipit biriktirdiği tespit edilmiştir. Bu 7 izolat arasında en iyi lipit üreticisi izolatın TS61 olduğu belirlenmiş ve bu izolat 18S rRNA analizine göre *Galactomyces geotrichum* olarak teşhis edilmiştir. Bu izolatla lipit üretimi için en uygun kültür koşullarının %20 melas, 1.5 g/L amonyum sülfat, 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6 ve 8 günlük inkübasyon süresi olduğu bulunmuştur. Optimal kültür koşulları altında fungusun lipit konsantrasyonu 11.9 g/L, lipit içeriği ise %69.6 olarak tespit edilmiştir. Üretilen lipitin yağ asitlerinin çoğunluğunun çoklu doymamış yağ asitlerinden meydana geldiği belirlenmiştir. Lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan %23.67 yağ asidi Linoleik asit (C18:2) (Omega 6) ve bunun ardından da %22.14' lük içeriği ile Oleik asit (C18:1) (Omega 9) olarak belirlendi. Fungusun diğer yağ asitleri Eicosadienoik asit (C:20), Palmitoleik asit (C16:1), Stearik asit (C18:0), Palmitik asit (16:0), Pentadekanoik asit (C15:0) ve Miristik asit (C14:0) olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, bu fungusun lipitlerinin insan gıdası olarak kullanılabilme potansiyeli ortaya çıkarılmıştır.

**2019, 46 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Galactomyces geotrichum*, melas, lipit üretimi, optimizasyon

## ABSTRACT

Master Thesis

### LIPID PRODUCTION IN MOLASSES MEDIUM WITH

*Galactomyces geotrichum* TS61

Ramazan ALTUN

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Molecular Biology and Genetic  
Biotechnology Science

Supervisor: Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

The present study focuses on the isolation of molds with a high rate of lipid deposition and on optimizing lipid production in molasses medium with the best lipid producer isolate. A total of 75 molds and yeasts on molasses medium, but 7 of them were found to accumulate high levels of lipid. Among these 7 isolates, TS61 was the best lipid producing isolate and this isolate was identified as *Galactomyces geotrichum* according to 18S rRNA analysis. The best culture conditions for lipid production with this isolate were found to be 20% molasses, 1.5 g / L ammonium sulfate, 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6 and 8 days incubation time. The majority of the fatty acids of the lipid produced were determined to be polyunsaturated fatty acids. Linoleic acid (C18: 2) (Omega 6) (23.67%) had the highest amount (23.67%) in the lipid, followed by Oleic acid (C18: 1) (Omega 9) with 22.14% content. Other fatty acids of the mold include Eicosadienoic acid (C: 20), Palmitoleic acid (C16: 1), Stearic acid (C18: 0), Palmitic acid (16: 0), Pentadecanoic acid (C15: 0) and Myristic acid (C14: 0). As a result of this study, the potential of lipids of this mold to be used as human food was revealed.

**2019, 46 Pages**

**Keywords:** *Galactomyces geotrichum*, molasses, lipid production, optimization

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında yapıldı.

Öncelikle tez çalışmamda katkı ve fikirleriyle bana yol gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hem lisans hem de yüksek lisans eğitimimdeki emeklerinden ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Sayın Arş. Gör. Özkan BALTACI' ya, deneylerim sırasında göstermiş oldukları ilgi için Genetik Araştırma Laboratuvarında çalışan arkadaşlarım Sayın Abdulhadi FIRAT'a, Sayın Meryem DOYMUŞ'a, Sayın Tuğba ORAK'a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında olduğu gibi bu süreç boyunca da maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen başta babam Sayın Mezher ALTUN olmak üzere annem Sayın Zozan ALTUN ve kardeşlerime gönülden teşekkürlerimi sunarım.

**Ramazan ALTUN**

**Temmuz, 2019**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar .....	19
3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler .....	19
3.1.3. Çalışmada kullanılan toprak örnekleri .....	19
3.2. Yöntem .....	20
3.2.1. Melasın kimyasal içeriğinin belirlenmesi.....	20
3.2.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların izolasyonu.....	20
3.2.3. İzole edilen maya yada küflerin lipit üretme yeteneklerinin karşılaştırılması..	20
3.2.4. En iyi izolatla melas ortamında lipit üretiminin optimizasyonu .....	21
3.2.5. Lipit üretimi, hücre büyümesi ve şeker tüketiminin analizi .....	21
3.2.6. Üretilen lipitlerin yağ asidi profilinin belirlenmesi .....	22
3.2.7. En iyi izolatın moleküler olarak teşhisi .....	22
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>26</b>
4.1. Melasın Kimyasal İçeriği .....	26
4.2. Fungusların İzolasyonu ve Lipit Üretme Yeteneklerinin Karşılaştırılması.....	26
4.3. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61' ile Lipit Üretiminin Optimizasyonu .....	28
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>35</b>
KAYNAKLAR .....	41
ÖZGEÇMİŞ .....	47

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	Yüzde
dk	Dakika
bm	Biyomas Miktarı
EPDK	Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu
LP	Lipit Miktarı
ŞPM	Şeker Pancarı Melası
DEKTMK	Dünya Enerji Konseyi Türk Milli Komitesi
LV	Lipit Verimi
g	Gram
g/l	Gram/Litre
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
°C	Santigrat Derece
rpm	Revolutions Per Minute
sa	Saat
µg/l	Mikrogram/Litre

### Kısaltmalar

HCl	Hidroklorik Asit
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum Sülfat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum Sülfat
ZnSO <sub>4</sub>	Çinko Sülfat



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61 izolatının PDA besiyerindeki görüntüsü ....	27
Şekil 4.2. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61’de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi .....	28
Şekil 4.3. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61’de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine amonyum sülfat konsantrasyonunun etkisi .....	29
Şekil 4.4. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61’de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine $KH_2PO_4$ konsantrasyonunun etkisi .....	30
Şekil 4.5. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61’de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine pH’nın etkisi .....	31
Şekil 4.6. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61’de şeker tüketimi, lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi .....	33

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar .....	19
Çizelge 3.2. ITS gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan PCR bileşenlerini yoğunluk ve miktarları .....	23
Çizelge 3.3. ITS gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngüsü .....	23
Çizelge 4.1. Melasın kimyasal içeriği .....	26
Çizelge 4.2. Farklı fungal izolatların hücre büyüme ve lipit üretme yeteneklerinin karşılaştırılması .....	27
Çizelge 4.3. Melas konsantrasyonunun hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi... .....	28
Çizelge 4.4. Amonyum sülfat konsantrasyonunun hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi.....	30
Çizelge 4.5. $KH_2PO_4$ konsantrasyonunun hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi.....	31
Çizelge 4.6. Kültür pH'sının hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi.....	32
Çizelge 4.7. İnkübasyon süresinin hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi.....	33
Çizelge 4.8. <i>Galactomyces geotrichum</i> TS61' in lipitlerinin yağ asidi profili .....	34

## 1. GİRİŞ

Enerji dünya üzerinde yaşam ile ekonomik döngülerin devamlılığı ve insan türünün gereksinimlerinin karşılanması noktasında oldukça önemli bir konuma sahiptir. Dünya üzerinde insan popülasyonunun ve yaşamsal gereksinimlerinin git gide artması ile enerji tüketimi de son dönemlerde yoğun bir artış göstermektedir. Enerjiye olan ihtiyacın artması, hem kullanılan kötü enerji kaynakları dolayısıyla çevresel problemlere yol açmakta hem de daha temiz enerji kaynakları ile bu tüketimin dengelenmesini gerekli kılmaktadır. Bu durum ülkelere ait bir problem olmanın çok ötesinde, adeta küresel bir probleme dönüşmektedir (Yaşar, 2008).

Dünya da kullanılan enerjinin büyük çoğunluğu fosil yakıtlardan karşılanmaktadır. %85 gibi bir kullanım oranına sahip olan fosil yakıtlar; kömür, petrol, doğalgaz gibi enerji kaynaklarıdır. Bu yakıtlar kullanıldığında havadaki oksijen ile birleşerek CO<sub>2</sub> veya CO gazları ortaya çıkmakta, içerisinde eser miktarda bulunan kurşun, kükürt vb elementler de aynı şekilde bileşikler oluşturmak suretiyle insan sağlığını tehdit eder nitelikler arz etmektedir. Bu ürünlerin atmosferde birikmesi sonucu hem insan hayatı hem de diğer canlıların yaşamı üzerinde olumsuz koşullar oluşması kaçınılmaz olmaktadır (Ünalın, 2012). Atmosferde birikimi söz konusu olan bu gazların insanlarda solunum yolu hastalıklarından kansere kadar pek çok hastalığa davet çıkardığı görülmektedir (ATSDR 1995, Benbrahim-Tallaa *et al.* 2012).

Fosil yakıtlara ek olarak kullanım dahilinde olan bir diğer enerji kaynağı ise nükleer enerjidir. Bu enerji kaynağı, maliyet bakımından pahalılık arz etmesi ve olası bir kaza durumunda çevreye vereceği tahribatın geri dönüşümünün olmaması nedeniyle alternatif enerji kaynakları arayışını ortaya çıkarmaktadır (Pamir, 2003). Enerjiye duyulan ihtiyacın artması, kullanımı doğrultusunda ortaya çıkan olumsuz koşullar ve bu enerjilerin eldesi noktasında ülkelerin maddi anlamda dışa bağımlı hale gelmeleri; alternatif enerji kaynaklarını çok daha cazip bir konuma taşımaktadır.

Güneş enerjisi, rüzgar enerjisi, jeo-termal enerji gibi çevreye zarar vermeden enerjisi eldesi sağlayan alternatif enerji kaynakları arasında son dönemde en çok dikkati üzerine çeken enerji kaynağı biyodizeldir (Savin 2003, Helwani *et al.* 2009). Çevre üzerinde oluşturduğu olumsuzluklar son derece az olan, elde ediliş maliyeti fazla olmayan ve kolay bir şekilde üretimi sağlanabilen bu enerji kaynağı bilim dünyası tarafınca da sıklıkla önerilmektedir (Yaşar,2008; Akgün *et al.* 2009; Demirbas, 2009; Mata *et al.* 2010). Biyolojik atıklar kullanılarak enerji eldesi sağlayan bu yöntemde kullanılmış ürünlerin geri dönüşümünü sağlaması dolayısıyla yenilenebilir enerji de denilmektedir (Helwani *et al.* 2009).

Biyodizel, bitkisel, atık veya hayvansal kaynaklı yağların alkol ve uygun bir katalizörle reaksiyona girmesi neticesinde ortaya çıkan bir enerji ürünüdür. Bu enerji ürünü karbondioksit emisyonlarını azaltabilen, toksisitesi olmayan, kolay elde edilebilen, en önemlisi de yenilenebilir olan bir enerji kaynağıdır (Atadashi *et al.* 2010).

Biyolojik olarak kolay parçalanabilen bu yakıt kaynağı, yandığında petrol kaynaklı yakıtlar gibi zararlı gazların salınımına neden olmamakta ve atmosferde birikmesi gibi bir duruma sebebiyet vermemektedir. Açığa çıkardığı partiküler yapılar ise fosil yakıtlar ile kıyaslandığında son derece azdır. Yakıtın kalitesini belirleyen ısı değer, viskozite gibi parametreler bakımından da biyodizel yakıtlar, fosil yakıtların niteliklerine son derece yakın nitelikler sergilemektedir. Sahip olduğu nitelikler neticesinde içerisinde kullanıldığı motorların kullanım ömürlerini uzatması, motorun özgün niteliklerinde iyileşmeler meydana getirmesi ise biyodizeli daha dikkat çekici hale getirmektedir (Demirbas 2008; Tan *et al.* 2010; Mata *et al.* 2010). Biyodizel motorlarda kullanılırken saf halde veya diğer petrol kaynaklı yakıtlarla karıştırmak suretiyle kolaylıkla kullanılabilir (Çengelci *et al.* 2011).

Biyodizel üretimi sağlanırken bitkisel olarak kanola, soya, ayçiçeği gibi yağlardan faydalanılabileceği gibi hayvansal kaynaklı lipitler de üretimde yer alabilmektedir. Biyodizel üretimi için lipit kaynağı olarak Avrupa kanola yağını tercih ederken, Amerika ise soyadan elde edilen yağı kullanmaktadır. Bu lipitler temelde gliserol ve üç

yağ asidi içeren bir ester olan trigliseridlerden oluşmaktadır. Bu yağlardan yakıt eldesinde trigliseridlerin kullanıldığı transesterifikasyon metodu en sık kullanılan metot olarak görülmektedir. Bu olayda yağ bileşenleri katalizör yardımıyla kısa zincirli bir alkol ile birlikte tepkimeye girmekte ve sonuçta gliserol ve yağ asidi metil esterleri elde edilmektedir. Elde edilen ürünler içerisinde yer alan metil esterlerin ise, biyodizel niteliği taşımakta olduğu ifade edilmektedir (Chisti 2007; Beopoulos *et al.* 2011; Alptekin and Çanakçı 2011).

Biyodizelin yaygınlaştırılması, dünya genelinde kullanımının teşvik edilmesi son dönem koşulları göz önüne alındığında son derece önemli hale gelmiştir. Bu doğrultuda pek çok ülke (Avusturya, Almanya, Fransa, İtalya, Norveç, Polonya, Çek Cumhuriyeti gibi) biyodizelin vergiye tabi olmamasına dair yasal düzenlemelerde bulunmuştur (Çengelci *et al.* 2011).

Ticari olarak ilk kez Avusturya'da üretimi sağlanan biyodizelin 1988 yılındaki üretiminin ardından 1991 yılında da ilk ticari üretim tesisinin kurumu gerçekleştirilmiştir. Endüstriyel ölçekte üretimi ise 1992 yılından bu yana hem Avrupa Birliği ülkelerince hem de Amerika tarafınca gerçekleştirilmektedir. Dünyadaki biyodizel yakıtların üretim kapasitesi genel olarak 20 milyar litre olarak belirlenmiştir. Avrupa Birliği ülkelerinin bu üretim skalasının üzerine dahi çıkabildiği görülmüştür. En yüksek oranda üretim yapabilen ülkeler arasında Almanya, İspanya, İtalya ve Fransa'nın yer aldığı görülmektedir (DEKTMK 2011; Alptekin and Çanakçı 2011).

Biyodizelin Türkiye'ye girişi 2000'li yılların ilk dönemlerine denk gelmektedir. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı'nın projesi doğrultusunda yatırımcıların biyoenerji ile tanışması ve bu doğrultuda biyodizel tesislerinin kurulumu sağlanmıştır. 200'ün üzerinde biyodizel üretimi yapan tesis varlığına sahip Türkiye'de bu tesislerin çoğu yerli hammadde eksikliği dolayısıyla kapanmak durumunda kalmıştır. Bu tesislerin üretim kapasitesinin 1,5 milyon ton civarında olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde yerli tarım ürünleri kullanılarak biyodizel üretimi yapılabildiği gibi (DEKTMK 2011), atık

yağların geri dönüşümü amacıyla da biyodizel eldesinin sağlanabildiği çalışmaların da varlığından söz edilebilmektedir (Alptekin and Canakci 2010; Isler *et al.* 2011).

Mikroorganizmalar, günümüz dünyasında pek çok amaçla kullanılabilir. Bu amaçlar arasında rekombinant protein eldesi, antibiyotik, insülin üretimi, organik asitlerin, polisakkaritlerin üretimi, etil alkol eldesi gibi çeşitli maddelerin sentezi yer almaktadır (Bennett 1998; Adrio and Demain 2003; Gellissen 2005). Biyodizel yakıtların hammaddesi olarak kullanılan lipitlerin üretiminde de mikroorganizmaların rolünün büyüklüğü yadsınmaz bir gerçektir. Bu canlıların ürettiği lipitlere tek hücre yağı (Single cell oils) da denilmektedir (Fakaset *et al.* 2009).

Mikroorganizmalar içerdiği lipit skalası bakımından bitkilerin sahip olduğu lipitlere yakınlık arz etmektedir. Trigliseridler hem bitkilerde hem de hayvanlarda hücre içerisindeki baskın lipit portföyünü oluşturmaktadır. Bu yüzden bitki ve hayvanlardan elde edilen lipitler biyodizel üretimi için ideal hammadde olarak nitelendirilmekte ve kullanılmaktadır (Meng *et al.* 2009; Fakas *et al.* 2009; Hall *et al.* 2011; Beopoulos *et al.* 2011). Biyodizel hammaddesi olarak lipit eldesinde mikroorganizmaların kullanımı ise kültüre edilmelerinin kolay olması, ucuz substratlar kullanılarak gelişmelerinin sağlanabilmesi, kapladıkları yerin az olması ve kısa zamanda yüksek oranda verim sağlayabiliyor olmaları gibi pek çok avantaja sahiptir (Li *et al.* 2008; Amaretti *et al.* 2010).

Biyodizel hammaddesi olarak kullanılan lipitlerin üretimini sağlayacak mikroorganizmaların seçiminde, özellikle içeriğinde yüksek miktarda yağ depolayabilenlerden faydalanılmaktadır. Biyodizel üretiminde kullanılan mikrobiyal lipitleri yüksek miktarda üretebilen oleaginous mikro canlıları biyodizel üretimine giden yolda kaynak olarak kullanılan mikrobiyal lipitlerin üreticisi olarak tercih edilmektedir (Khot *et al.* 2012). Bakteriler, mantarlar, mikroalgler veya mayalar gibi mikro canlıların örneği olduğu oleaginous mikroorganizmalar kendi kuru ağırlıklarının %20'sinden fazlası lipitlerden oluşmaktadır. Diğer mikro canlılara kıyasla daha hızlı çoğalma niteliği taşıyan oleaginous bakterilerin (*Arthrobacter sp.* ve *Acinetobacter*

*calcoaceticus* gibi) yapılarında diğer canlı gruplarına kıyasla daha düşük oranda lipit ihtiva ettiği kaydedilmiştir (Meng *et al.* 2009; Amaretti *et al.* 2010). Aynı amaçla içeriğinde yüksek miktarda yağ biriktirebilen mikroalglerin de kullanımı söz konusudur. Bu doğrultuda fotosentetik oleaginous mikroalglerinin (*Botryococcus sp.*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella primolecta*, *Nitzschia sp.*, *Schizochytrium sp.*, *Nannochloris sp.* gibi) lipit üretiminde kullanımı söz konusu olduğunda ışık ve CO<sub>2</sub> girişinin sağlanabildiği sistemlerden faydalanılmaktadır (Chisti 2007). *Botryococcus* ve *Schizochytrium* gibi mikroalg cinsleri kuru biyokütlelerinin %70'inden fazla yağ depolayabilen mikroorganizma türleridir (Guschina vd., 2006). Diğer taraftan Mikroalglerin biyodizel üretimi amacıyla yapılan kapalı sistemlerinin çok pahalı olması, yüksek miktarda suya ihtiyaçları olması, üremelerinin mevsimsel koşullara dayalı olarak farklılık göstermesi, açık sistemlerinin de kontrol edilebilirliğinin zorluğu dolayısıyla bu canlıların kültürünün yapılması son derece zor olmaktadır (Chisti, 2007; Queiroz *et al.* 2011).

Birkaç bakteri türün uygun şartlar sağlandığında biyodizel üretimine yararlı triaçilgliseroller üretmektedir (Alvarez ve Steinbüchel, 2002). Bu oleaginous bakteri üyeleri genel olarak *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* *Streptomyces* ve *Gordonia* gibi triaçilgliserol üreten bakteri cinsleri arasında yer almaktadır. Bu bakteri türlerinin ürettiği yağ asidi içeriği stearik asit (C 18:0), palmitik asit (C 16:0) ve oleik asit (C 18:1)'tir (Kurosawa vd., 2010). Ayrıca bakterilerinin ürettiği bazı yağ asidi içeriğinin diğer mikrobiyal kaynaklardan elde edilen yağ asidi içeriğinden farklı olduğu için biyodizel üretim süreçlerinde fazla tercih edilmemektedir. Çünkü bakteriler daha çok doymamış yağ asitleri ve dallanmış zincirli yağ asitleri gibi çok özel yağları üretmektedirler (Li vd., 2008).

Oleaginous mayaların sentezledikleri lipitlerin sağladıkları enerji değerleri ve lipit kompozisyonlarının hayvansal ve bitkisel yağlarla benzer özellikler gösterdiği bulunmuştur. Mayalar bakterilerden daha yavaş üreyor olsalar da diğer mikroorganizmalara kıyasla iyi bir üreme hızına sahiptirler. Mayalar, çok kısa bir sürede lipitleri sentezleyebilir ve üremeleri mevsimlerin değişmelerinden etkilenmez (Li vd., 2006). Aynı zamanda içeriğinde lipit biriktirme kapasitesi bakımından diğer

mikroorganizmalara kıyasla mayalar çok daha iyi nitelikler sergilemektedir. Organik maddelerin karbon kaynağı olarak kullanılacağı biyodizel üretim çalışmalarında mayaların kullanımının çok daha verimli olduğu belirtilmektedir (Voltolina *et al.* 1999; Li *et al.* 2007; Queiroz *et al.* 2007; Vicente *et al.* 2009).

Biyodizel üretiminde kullanılan mikroorganizmaların büyük kısmı mayalardan oluşmaktadır. Oleaginous maya üyeleri genel olarak *Candida*, *Rhodospodidium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Lypomyces* ve *Yarrowia* cinsleri olarak ifade edilmektedir. Bu maya türlerinin büyük bir kısmı 37°C'nin üstü sıcaklık olan ortamlarda yaşayamazlar (Ratledege, 2005). Bakterilerde %20 olan yağ oranı bu cins mayalarda genel olarak %40 oranlarında seyretmektedir. Uygun koşulların (yüksek karbon, düşük azot varlığında) sağlanması durumunda bu oranın %70'in üzerine çıkabildiği belirtilmektedir. Bu canlılar temelde ortamdaki yüksek muhteviyatlı şekeri yağa dönüştürmektedir. Bu işleme lipogenis denilmektedir (Amaretti *et al.* 2010; Beopoulos *et al.* 2011). Biyoteknolojik çalışmalarda en çok tercih edilen mayalardan biri olan *Yarrowia lipolytica*, oleaginous maya türü olarak en iyi yağ sentezi yapabilen bir mikroorganizmadır (Beopoulos vd., 2009). Ayrıca bu bu maya türü model bir organizma olarak genetik çalışmaların geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Fickers vd., 2005).

Bu mikroorganizmaların hücrelerinde en fazla bulunan yağ asitlerinden bazıları; stearik asit (C 18:0), palmitoleik asit (C 16:1), linoleik asit (C 18:2), oleik asit (C 18:1) ve palmitik asittir (Cheirsilp vd., 2011). Mayalarda lipit üretimi için hazırlanan kültür ortamında ki karbon-azot oranı, organik tuzların ve iz elementlerin oranı bu mayaların ürettiği lipit miktarı üzerinde etkililerdir (Mainul vd., 1996).

Mayaların ihtiva ettiği lipit içeriğinin artırılması amacıyla dikkat edilmesi gereken bir diğer koşul ise sıcaklıktır (Rossi *et al.* 2009). Bu durumun en iyi örneği termofilik mayaların çok daha yüksek lipit içeriğine sahip olmasıdır (Shivaji *et al.* 2008; Rossi *et al.* 2009). Sıcaklığın yalnızca üretim kapasitesini değil, aynı zamanda üretilen lipitin profilini de etkilediği bilinmektedir. Termofilik mayaların ürettiği lipitlerin yüksek



oranda doymuş yağ içerdiği, psikrofilik mayalarınkinde ise doymamış yağ içeriğinin yüksek olduğu dikkat çekmektedir (Shivaji and Prasad, 2009; Rossi *et al.* 2009). Biyodizel üretimi için ihtiyaç duyulan mayalar, tatlı sularda, toprakta ve deniz gibi doğal alanlarda bulunabilirler (Ratledege, 2005). Mayalar, düşük sıcaklık altında, derin okyanus suları ve oksijen miktarının az olduğu ekstrem koşulların bulunduğu alanlarda yaşayabilirler.

Bazı fungusların özellikle filamentli fungusların biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. *Humicola lanuginosa*, kuru biyokütlesinin %75'i oranında yağ üretmiştir (Adachi vd., 2011). Yüksek oranda yağ üretebilen bir diğer fungus türü ise *Mucor circinelloides*'tir (Li vd., 2011). *Zygomcetes* sınıfından bir fungus olan *Mucor circinelloides*, biyodizel hammaddesi olarak triaçilgliserol sentezlediği ve üzerinde çokça çalışmaların yapıldığı bir türdür (Vicente vd., 2009). *Mucor circinelloides*, Ticari mikrobiyal lipit üretimi çalışmalarında ilk kullanılan bir fungus türüdür (Ratledege, 2004).

*Galactomyces geotrichum* dimorfik, oleaginous özelliğe sahip maya-küf geçişkenliği gösteren dimorfik bir fungus türüdür. Ayrıca bu mikroorganizma türü patojen olmayıp, çevre korunması içinde kullanılmaktadır. Çünkü; bazı yüksek düzeyde zararlı maddeleri parçalama yeteneğine sahiptir. Bu maddelerden biri DDT (1,1,1-triklor-2,2-bis (4-klorofenil) etan)' dir. Bu maddenin çevre üzerinde toksik etkileri vardır (Tian *et al.*, 2015). *Galactomyces geotrichum* uygulanabileceği alanlardan biri de tarımdır. *Galactomyces geotrichum* fosforun kaya fosfatlarından çözünmesini sağlar ve bitkilerin fosfat ihtiyaçlarını karşılamak üzere biyogübre olarak kullanılabilir (Yingben *et al.*, 2011).

Biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan *G. geotrichum* çoklu doymamış yağ asitlerini sentezleyebilen bir fungus türüdür. Bilim insanları, peynirden birden çok suş izole etmişlerdir (Majcher *et al.*, 2014). Ayrıca bu fungus türünün sentezlediği yağ asitlerin omega-6 ve omega-9 yağ asitleridir ve insan sağlığı açısından çok önemlidirler. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda besin maddelerinin kronik hastalıkların

önlenmesinde, tedavi edilmesinde ve sağlığımızın korunmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Coşkun, 2005). En önemli besin gruplarından biri yağlardır. İnsan besin maddesi olarak çok önemli bir role sahip olan yağlar, kan lipit üzerinde ki rolleri, yüksek enerji kaynağı olarak kullanılması ve omega-3 yağ asitleri içermeleri nedeniyle çok önemlidirler (Çakmakçı ve Kahyaoğlu, 2012). Ayrıca omega-3 serisinden çoklu doymamış yağ asitlerin insanlarda kanserin, damar sertliğinin ve koroner kalp hastalıklarının önlenmesinde büyük bir role sahiptirlerdir (Lopez-Ferrer ve ark. 1999).

İnsan vücudunda sentezlenmeyen omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin gıdalarla dışardan yeterli düzeyde alınması sonucunda kalp krizi riskinin azaldığı yönünde gözlemler yapılmıştır (Leaf ve Kang 1998, Ceylan ve ark. 1999). Omega-3 serisinden çoklu doymamış yağ asitleri insan sağlığı açısından çok önemlidir. Çoklu doymamış yağ asitleri gelişme çağındaki çocuklarda büyümenin uyarılması, erken dönemde beyin ve hücrelerinin gelişmesi, kalp hastalıklarının önlenmesi ve bazı deri hastalıklarının önlenmesin de büyük rol oynadıkları ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda omega-6 yağ asitlerinin prostaglandin E<sub>2</sub> 'nin düzeyin arttırdığı ve bu hormonun kemik gelişimini baskıladığı görülmüştür. Omega-3 prostaglandin E<sub>2</sub> hormonun salınımını baskılaması sonucunda kemik gelişimini olumlu yönde etkilediğini görmüşlerdir (Simopoulos 1991, Leskanich ve Noble 1997, Watkins ve ark. 1996, Horrocks ve Yeo 1999, Watkins ve ark. 2001). Omega-3 tüketimi çocuklarda zeka gelişimini, depresyondaki insanların ve kanserli hastalarının tedavisinde olumlu yönde etki etmiştir.

Sağlıklı beslenme açısından omega-3 ve omega-6 arasındaki oran da önemli bir yere sahiptir. Bu oranın 1:1 ile 4:1 olması önerilmektedir. İngiliz beslenme vakfının verilerine göre yetişkin bir insanın günde 1.25 gr omega-3 yağ asidi tüketmesi ile daha sağlıklı bir hayat sürdürmesine olanak sağlar. Çünkü omega-3 yağ asitleri kalp ve damar rahatsızlıklarını azaltmaktadır (Ayerza ve ark. 2002). Dengeli beslenen toplumlar diğer toplumlara göre daha az kalp ve damar rahatsızlıkları gibi hastalıklara yakalanırlar. Yağlar, insanlar için önemli bir enerji kaynağı olup, kadınlarda cinsiyet hormonlarının çalışmasında, hücre ve beyin zarlarının yapısında ve organların zedelenmelerinin

önlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Leaf ve Weber 1988, Barlow ve Pike 1991, Şenköylü 1999a).

Dünyada artan insan popülasyonu ve sanayileşme süreci dolayısıyla tüketim fazlalığından doğan atık maddelerin de hızlı bir artış eğiliminde olduğu görülmektedir. Atık maddelerin hızlı artışı çevresel sorunların ortaya çıkmasında pay sahibi olmakla birlikte, aynı zamanda ekonomiye de oldukça zarar vermektedir. Bu atık maddelerin geri dönüşüm ile çevreye faydalı olacak şekilde yeniden kazandırılmaları pek çok açıdan büyük öneme sahip olmaktadır. Son dönemde yapılan bilimsel çalışmalar da biyodizel kaynağı olarak kullanılabilen mikrobiyal lipitlerin bu atık maddelerin substrat olarak kullanılarak üretilebileceğini göstermektedir (Huang *et al.* 2009; Karatay and Dönmez, 2010; Hall *et al.* 2011; Huang *et al.* 2012). Bu nedenle atıkların değerlendirilebilmeleri ve geri dönüşümleri çevresel ve ekonomik açıdan son derece önemli olacaktır. Bu doğrultuda, araştırmacılar son zamanlarda melas gibi organik atıkların mikrobiyal çalışmalarda büyüme substratı olarak kullanılmasıyla sadece ekonomik kazanç sağlanmayacağını aynı zamanda çevre kirliliği probleminin azaltılmasına da katkı yapabileceğini ileri sürmektedirler.

Melas; şeker endüstrisinde şeker pancarı ve şeker kamışından şeker üretimi sonucu ortaya çıkan atık bir üründür. Şeker pancarı melasının (ŞPM) içeriği esas olarak %23-26 su, %47-48 şeker, %9-14 mineral maddeler (Mg, Mn, Al, Fe ve Zn) ve %8-12 de azotlu bileşiklerden (aminoasit, protein vb.) oluşmaktadır. Ayrıca yapısında vitaminleride içermektedir. Zengin besinsel içeriğinden dolayıda mikrobiyal çalışmalarda iyi bir büyüme substratı olarak kabul edilmektedir (Kalogiannis *et al.*, 2003; Survase *et al.*, 2007; Yilmaztekin *et al.*, 2008). ŞPM günümüzde mikroorganizmalar vasıtasıyla etil alkol, polisakkarit, karotenoid, enzim, laktik asit, sitrik asit, tek hücre proteini gibi değerli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Ergun and Mutlu, 2000; Kalogiannis *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008; Razmovski and Vucurovic, 2011; Taskin *et al.*, 2012). Benzer şekilde, ŞPM oleaginous mayalardan yağ bakımından zengin biyomasların üretilmesinde de kullanılabilir. Özellikle melasın yüksek karbon ve düşük azot içeriği göz önüne alındığında bu varsayım daha da güçlenmektedir. Çünkü daha öncede

bahsedildiği gibi yüksek karbon ve düşük azot oranlı kültür ortamları oleaginous mayalarda yağ içeriğini artırmaktadır (Amaretti *et al.*, 2010; Beopoulos *et al.*, 2011).

Ülkemizde Erzurum, Konya, Amasya, Ankara, Kars gibi birçok Őehirde bir çok Şeker fabrikası bulunmaktadır. Bu fabrikaların çoğunda Şeker retimi için hammadde olarak Şeker pancarı kullanılmaktadır. Ülkemizdeki Şeker fabrikalarında yan ürün olarak melas üretilmektedir. Melas lkemizde doğrudan hayvan yemi olarak değerlendirilebildiği gibi etil alkol, sirke, hamur mayası ve yemlik maya, üretiminde de kullanılabilir. (TürkŐeker, 2011). Bahsedilen kullanım alanları dıŐında, melas ülkemizde pek fazla uygulama alanı bulmamaktadır. Dolayısıyla mikrobiyal lipit üretiminde melasın mikroorganizmalar için substrat olarak kullanılması melasın ekonomimize kazandırılması açısından önem arz edecektir.

Bu yüzden mevcut çalışmada, topraktan izole edilen maya yada küfler ile melas içeren kültür ortamında mikrobiyal lipit üretiminin gerçekleştirilmesi, üretilen lipitlerin yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi ve bu sayede lipit veya insan gıdası olarak kullanılabilme potansiyelinin ortaya konulması amaçlanmaktadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde mikroorganizmaların insan gıdası veya biyodizel hammaddesi olarak kullanılabilme potansiyeline sahip lipitleri ürettiği belirtilmektedir. Mikrobiyal lipitlerin üretiminde ise ucuz organik atıklar sıklıkla substrat olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan, yapılan çalışmalarda kültür koşullarının (oksijen konsantrasyonu, sıcaklık, pH, inkübasyon süresi vb) ve besinsel faktörlerinde (karbon ve azot kaynakları) lipit üretimini artırdığı belirtilmektedir. Mikrobiyal lipit üretimiyle alakalı olarak yapılan çalışmaların bazıları aşağıda verilmiştir.

Li *et al.* (2007) kullandıkları *Rhodospiridium toruloides* Y4 mayasının üreteceği lipit ve biyomas oranını artırabilmek için 100 ile 400 g/L arasında değişen oranlarda glukoz kullanımı ile kesikli-beslemeli bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Kesikli çoğaltım kaynaklı uygulamalarında 150 g/L glukoz içeren besiyerinde en yüksek verimli lipit üretimi ve biyomas oranlarına ulaştıkları kaydedilmiştir. Ancak bu noktadan sonra artırılan glukoz oranlarının mayaların üreteceği lipit ve biyomas miktarları üzerinde olumsuz bir etkiye neden olduğu kaydedilmiştir. Kesikli-beslemeli olarak yapılan bir diğer kültür uygulamasında ise inkübasyon süresi 25 gün sürmüş, kuru biyomas değeri 151 g/L olarak hesaplanırken, lipit derişimi %48 olarak bildirilmiştir. Bu uygulamanın 134. saatinin bitişiyle birlikte 16 ve 18 karbon atomu uzunluğunda yağ asitlerinin sentezlendiği belirlenmiştir. Bu yağ asitleri ise, miristik (C 14:0), palmitik (C 16:0), palmitoleik (C 16:1) ve linolenik (C 18:2) asit olarak kaydedilmiştir (Li *et al.* 2007).

Nişasta atık suyuyla yapılan bir çalışmada *Rhodotorula glutinis* mayasının kullanımı sağlanmıştır. Bu maya türü 30-37°C sıcaklığa sahip ortamda kültüre edilerek hücre artış oranı ile lipit üretimi seviyeleri değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada 5 litrelik fermentasyon tanklarında mayaların 60 saat süreyle kültüre edilmelerinin ardından 60 g/L oranında biyokütle eldesi, %30 oranında da lipit birikimi sağlanmıştır. Kullanılan maya türünün optimum gelişim sıcaklığının 30°C olduğunun belirlendiği bu çalışmada 300 litrelik pilot fermentasyon tanklarında ise steril koşullar ile pH optimizasyonu sağlanmaksızın, %35 oranında lipit birikimi elde edilirken, biyomasın 40 g/L olduğu

tespit edilmiştir. Transesterifikasyon yapımının ardından ise %90 oleik asit, %10 oranında ise palmitik asit eldesi sağlanmış, bu yapıların biyodizel üretiminde kullanılabilir olduğu ifade edilmiştir (Xue *et al.* 2010).

Woodbine (1995) yaptığı çalışmada oleaginous mikroorganizmalarının yağ içeriklerinin değişiminde yalnızca yüksek karbon, sınırlı azot oranlarının etkili olmadığını ortaya koymuştur. Azot haricinde fosfat, magnezyum, demir, sülfat gibi inorganik maddelerin veya vitaminlerin de kültür içerisindeki oranlarının mikroorganizmaların yağ biriktirme oranlarında etkili olduğu kaydedilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada bilim insanları *Galactomyces geotrichum*'u atık su arıtma sistemlerinde gözlemlenmiş ve çamurlu sudan izole etmişlerdir. Bu çalışmada suyun bozulma sürecini çeşitli kültür koşulları altında incelemek ve organik bileşiklerinin mantarların büyüme oranları üzerinde ki etkisini tespit etmek amaçlanmıştır (Matos *et al.*, 2012).

*Rhodotorula glutinis* mayasının kullanıldığı bir başka çalışmada lipit birikiminde kullanılan karbon kaynaklarının ne derecede etki ettiğinin anlaşılması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında glukozun yanı sıra mısır sapı ile pirinç samanı da karbon kaynağı olarak araştırılmıştır. 100 g/L glukoz içeren besiyerinde mayaların %49.25 oranında lipit birikimi sağlayabildiği belirlenmiştir. Aynı koşullarda glukoz yerine mısır sapı kullanılarak yapılan uygulamada ise lipit oranının %11.78'de kaldığı tespit edilirken, pirinç samanında bu oranın %5.74 olduğu kaydedilmiştir (Dai *et al.* 2007).

Lin *et al.* (2011) iki basamaklı bir fermentasyon deneyi gerçekleştirmişlerdir. İlk basamakta mayalar besin açısından zengin bir inkübasyon ortamında üretilirken, ikinci basamakta ise steril ve non-steril glukoz içeriğine sahip 7 litrelik hacme sahip olan fermentasyon kaplarında inkübe edilmişlerdir. Çalışmada elde edilen biyomas 104.6 g/L olurken, lipit birikim oranının %64.9 olduğu saptanmış, lipit verimi ise 67.9 g/L olarak tespit edilmiştir. Non-steril glukoz içeriğinin uygulamada elde edilen lipit oranında düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Lipitlerin karakterizasyonu sonucunda lipitlerin yağ

asidi profillerinin ise miristik (C 14:0), palmitik (C 16:0), palmitoleik (C 16:1), stearik (C 18:0), oleik (C 18:1), ve linoleik asit (C 18:2) şeklinde olduğu tespit edilmiştir (Lin *et al.*, 2011).

Yapılan bir çalışma da *Galactomyces geotrichum* fungusu kullanılmıştır. Bu fungus türünün çoklu doymamış yağ asitlerin üretme yeteneğine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (Grygier *et al.*). Bilim insanları peynirden 39 suş izole etmişlerdir. Bu suşlar Bajpai medium (%2 glukoz, %1 maya özütü) ortamın da 5 gün boyunca bekletilmiştir. Bu kültür ortamında çeşitli yağ asitlerinin sentezlendiği yönünde gerçekleşmiştir ve bu yağ asitleri;  $\alpha$ -linoleik asit, eikosapentenoik asit, dokosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asittir. Bu yağ asitleri omega 3 yağ asitleridir ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisin de önemlidir (Adarme-Vega *et al.* 2012).

*Rhodotorula minuta* IIP-33 maya türünün kullanıldığı bir çalışmada, farklı karbon/azot oranları ile farklı karbon kaynaklarının kullanımının değerlendirmesi yapılmıştır. Bu çalışmada karbon/azot oranı 30 olan, karbon kaynağı olarak glukoz kullanılan uygulamada %48'lik lipit birikimi sağlanmış ve bu oran en verimli sonuç olarak kaydedilmiştir. Elde edilen lipitin kalitesi ve içeriğinin de sıcaklık ile değişim arz ettiğinin belirlendiği çalışmada, 30-32°C sıcaklık altında 16-18 karbon zinciri uzunluğundaki yağ asitlerini içeren lipitlerce zengin içeriğin elde edildiği belirlenirken, 38°C'de ise 7 ile 9 karbon zinciri uzunluğunda kısa yağ asitlerinin eldesinin gerçekleştiği rapor edilmiştir. Bunun nedeni olarak ise sıcaklığa duyarlı olan ve zincirin uzunluğunun belirlenmesinde etkin role sahip olan açıl taşıyıcı proteinler gösterilmiştir (Saxena *et al.* 1998).

Melas, şeker fabrikalarında üretim esnasında yan ürün olarak ortaya çıkan %48'lik kısmı şekerden oluşan, şeker haricinde içeriğinde inorganik maddeler ile nitrojen de barındıran bir karbonhidrat üyesidir (Aksu ve Eren, 2005). Melas kullanımı ile yapılan bir çalışmada %8 oranında melas içeren ortamda 4 günlük kültürün ardından lipit verimleri ile yağ asidi metil esterleri oranlarına bakılmıştır. Bu değerler sırasıyla

*Candida lypotica* türü için %59.9 ile %84.9 olmuş, *Candida tropicalis* türü için %46.8 ile %93.2 olarak kaydedilmiş ve son olarak *Rhodotorula mucilaginosa* türü içinse %69.5 ile %92.3 olarak belirlenmiştir. Elde edilen lipit içeriklerinin ise çoğunlukla palmitik asit (C 16:0) ile stearik asit (C 18:0) yapılarından oluştuğu kaydedilmiştir (Karatay ve Dönmez, 2010).

Yapılan bir çalışmada *Rhodotorula glutinis* (syn. *Rhodotorula gracilis*) NRRL Y-1091 mayası kullanılmıştır. Bu mayanın karbon ve azot kaynaklarının sınırlanması durumunda depolayabileceği lipit kapasitesindeki farklılıklar incelenmiştir. Bu amaçla kesikli ve sürekli kültürler kullanılmıştır. Sürekli kültür uygulamasında, azot sınırlaması gerçekleştirildiğinde en düşük dilüsyon numunesinde en yüksek lipit eldesinin sağlandığı kaydedilmiştir. 100 gr glukoz kullanılan uygulamada 16.4 gr lipit eldesi sağlandığı belirlenmiştir. Deney süresince dilüsyon oranında yapılan artışların lipit içeriği, veriminin azalmasına neden olduğu, biyokütlenin de bu sebeple azaldığı tespit edilmiştir. Karbonun sınırlandığı sürekli kültür uygulamalarında ise dilüsyon oranı arttıkça biyokütlenin azaldığı, ancak lipit oranının değişmediği not edilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda dilüsyon oranının elde edilecek yağ asidi içeriğini etkilediği ortaya koyulmuştur. Artan dilüsyon oranıyla birlikte doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin oranında azalma eğilimi sergilediği tespit edilirken, polidoymuş yağ asitlerinde ise artış gözlenmiştir (Yoon and Rhee, 1983).

Beş farklı karbon kaynağının lipit üretiminde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *Candida curvata* türü mayalar kullanılmıştır. Kesikli ve sürekli olarak kültür uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Kesikli kültürde en yüksek lipit eldesini sağlayan uygulamanın (biyokütle %49) karbon kaynağı olarak ksilozun kullanıldığı uygulamalar olduğu kaydedilmiştir. Sürekli kültür uygulamalarında ise en yüksek oranda lipit eldesini sağlayan karbon kaynağının laktoz olduğu belirlenmiştir. Yağ asidi profilini etkileyen temel parametrenin karbon kaynağının sınırlı kullanımı olduğunu ifade eden çalışmada, ksiloz ile elde edilen lipit içeriğinde çoğunlukla stearik asit yağ asidine rastlandığı belirtilmiştir. Etanolün karbon kaynağı olması durumunda ise oleik asit



oranında artış, palmitik asit içeriğinde ise azalma ile karşılaşmıştır (Evans and Ratledge, 1983).

*Lipomyces starkeyi* maya türü ile yapılan bir çalışmada, glukoz ve ksiloz içeren besi ortamında lipit eldesi oranları incelenmiştir. En yüksek lipit eldesini sağlayabilmek için kültür koşullarının optimizasyonu da yapılmıştır. Besi ortamında yer alan dokuz parametrenin değişikliği ile istatistiki analiz gerçekleştirilmiş, en çok lipit üretimini etkileyen değişkenlerin şeker karışımı, maya ilavesi ve FeSO<sub>4</sub> maddesi olduğu belirlenmiştir. En yüksek lipit eldesinin %61 oranıyla 73 g/l şeker (48.9 g/L glikoz, 24.4 g/L ksiloz), 7.9 g/L maya ekstratı ve 4.0 mg/L FeSO<sub>4</sub> besi ortamında elde edildiği kaydedilmiştir (Zhao *et al.* 2008).

Oleaginous niteliğinde olan iki mantar türü ile yapılan bir çalışmada, karbon kaynağının farklılığının üretilen lipit oranı ile elde edilen lipitlerin içeriğindeki yağ asitleri profilleri üzerine etkisi incelenmiştir. Hem *Mortierella isabellina* ATHUM 2935 türünde hem de *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 türüne ait kültürlerde maksimum lipit oranı ksiloz içeren besi ortamlarında elde edilmiştir. En düşük lipit oranının ise gliserol içeren besi ortamlarında bulunduğu belirlenmiştir (Fakas *et al.* 2009).

Melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada *Cryptococcus curvatus* mayasının lipit üretimi incelenmiştir. Optimum değerlerin belirlendiği çalışmada 120 g/L melas ile 0.13 g/L azot kaynağı içeriğinde en iyi üretimin gerçekleştiği kaydedilmiştir. Kültür şartları kapsamındaki en iyi sıcaklık değerinin 28°C olduğu belirlenirken, 5.5 pH değerinde ve 200 rpm çalkalama hızı ile en efektif gelişim sağlandığı not edilmiştir. Elde edilen lipitlerin içeriği araştırıldığında yüksek oranda linoleik asit, oleik asit ve palmitik asitin yer aldığı tespit edilmiştir. Araştırmalar sonucunda bu maya türü ile maliyeti düşük besi ortamları kullanılarak lipit eldesi sağlanabileceği ifade edilmiştir (El-Fadaly *et al.* 2009).

Üç farklı maya türü ile yapılan çalışmada melas içeren besi ortamlardaki gelişim ve lipit üretim oranları değerlendirilmiştir. Bu kapsamda melas, pH ve amonyum sülfat

parametreleri değiştirilerek farklı oranlar test edilmiştir. En yüksek lipit eldesinin sağlandığı uygulamanın %8 melas içeren, pH değeri 5.0 olan ve amonyum sülfat derişimi 1 g/L olan uygulama olduğu kaydedilirken, *Candida lipolytica* mayasının %59.9, *Candida tropicalis* mayasının %46.8 ve *Rhodotorula mucilaginosa* mayasının ise %69.5 lipit kuru ağırlığı üretimi sağladığı tespit edilmiştir (Karatay ve Dönmez, 2010).

*Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 maya türü ile yapılan bir çalışmada sıcaklık ve glukoz oranlarının değişimi ile yağ asidi profillerinin ne oranda etkilendiği araştırılmıştır. Maya türü bir psikrofil olması dolayısıyla -3 ile +20 °C sıcaklıkları arasında gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Glukoz oranı besi ortamında 120 g/L olduğunda elde edilen lipit miktarı 19 g/L olurken, biyokütle açısından elde edilen değerin %68 olduğu belirlenmiştir. Glukoz oranının artmasının lipogenezin artmasına neden olduğu belirlenmiştir (Amaretti *et al.* 2010).

Nişasta açısından zengin atık suyunun substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada *Rhodotorula glutinis* maya türünün lipit üretimi incelenmiştir. 30-37 °C sıcaklık değeri aralığında optimum gelişim sergileyen mayanın 60 saatlik kültür (5 L fermentörde) akabinde 60 g/L biyokütle elde ettiği, lipit oranının ise %30 olarak tespit edildiği ifade edilmiştir. 300 L kapasitesindeki fermentörde gerçekleştirilen kültürde ise 40 g/L biyokütle eldesi, %35 oranında lipit eldesi gerçekleştiği kaydedilmiştir. Transesterifikasyon çalışmaları ile elde edilen lipitlerin biyodizel üretimi için uygun nitelik sergilediği ifade edilmiştir (Xue *et al.* 2010).

Fungusların (*Mortierella isabellina*) lipit üretmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, pirinç kabuğundan elde edilen hidrolizatlardan faydalanılmıştır. En yüksek karbon/azot oranının (57) oluşturulduğu uygulamalarda en yüksek lipit (%64.3) eldesinin sağlandığı tespit edilmiştir. Elde edilen lipitin yağ asiti profili incelendiğinde, içeriğinde çoğunlukla oleik asit, palmitik asit ve linoleik asitin yer aldığı ifade edilmiştir (Economou *et al.* 2011).

Ko-kültürü yapılan bir mikroalg ile bir mayanın melas substratını kullanarak lipit üretimlerini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, tek kültürlerde mayanın mikroalge kıyasla daha yüksek oranda biyokütle ile lipit üretimi sergilediği gösterilmiştir. Mayanın biyokütlesi 6.4 g/L, ürettiği lipit verimi ise 0.466 g/L olarak bulunurken, mikroalgin biyokütlesinin 2.53 g/L, lipit veriminin ise 0.132 g/L olduğu tespit edilmiştir. Ko-kültür sonuçlarına göre iki mikroorganizmanın birlikte biyokütlesinin 7.33 g/L olduğu, lipit veriminin de 0.808 g/L olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın ifade edildiği metinde, ko-kültür için melasın efektif bir substrat olduğu dile getirilmiştir (Leesing *et al.* 2012).

Pirinç kabukları hidrolizatının substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada, pirinç kabuklarının hidrolizinin farklı materyallerle gerçekleşmesi sağlanmıştır. Şeker içeriğinin yükseltilmesi için yapılan bu değişimlerden en başarılı olanının %3 oranında sülfirik asit, 90 °C sıcaklık değeri ve 6 saat inkübasyon süresi olduğu kaydedilmiştir. Hidrolizat içerisindeki en yoğun şekerin glukoz (43.2 g/L) olduğu, bunu ksiloz (4.93 g/L) ve arabinozun (2.09 g/L) takipte olduğu ifade edilmiştir (Tsigie *et al.* 2012).

Peynir altı suyu ve melasın substrat olarak kullanıldığı ve bakterilerilerin gelişiminin sağlandığı çalışmada biyosurfaktant eldesi sağlanmıştır. En yüksek biyosurfaktant eldesinin melasın %5-7 oranında bulunduğu ortamlardan elde edildiği kaydedilmiştir. Elde edilen ürünün ise 80°C'de 9 günlük inkübasyon sonucunda pH aralığı ve tuz konsantrasyon aralığı oldukça geniş bir skalada aktif olarak bulunabildiği kaydedilmiştir (Joshi *et al.* 2008).

Transesterifikasyon yapılan bir çalışma üç farklı maya türünden (*Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides* ve *Mortierella isabellina*) elde edilen lipitlerin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Transesterifikasyon işleminde katalizör olarak asidik ve bazik katalizörlerden faydalanılmıştır. Reaksiyon sürecinde metanol oranı, reaksiyon sıcaklığı, kataliz derişimi ve zaman gibi parametrelerin etkileri değerlendirilmiştir. Buna ek olarak katalizörlerin asidik veya baziklik durumunun da işlem sürecine etkisi de incelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında bazik katalizörlerin diğerlerine kıyasla çok

daha kısa zaman aralığında, daha düşük sıcaklık değerlerinde işlem gerçekleştirebildiği kaydedilmiştir. Metanoliz sonuçları doğrultusunda tüm türlerin metil esteri olarak palmitik ve oleik asit varlığı gözlenmiştir (Liu and Zhao, 2007).

Peynir altı suyunun substrat olarak kullanıldığı ve üç farklı fungus türünde lipit üretiminin oranlarının incelendiği çalışmada, *Mortierella isabellina*, *Thamnidium elegans* ve *Mucor sp.* Fungus türlerinin gelişimi sağlanmıştır. Kullanılan peynir altı suyu analiz edildiğinde, içerisinde %92-95 oranında suyun yer aldığı, %4-5 oranında laktoz yoğunluğundan söz edilebildiği ifade edilmektedir. Ancak çalışmaların ilk bölümünde laktoz ve protein açısından zengin bir peynir altı suyundan faydalanılmıştır. *Mortierella isabellina* türünün önce laktozu tükettiği, ardından proteinin tüketimine geçtiği kaydedilmiştir. Diğer iki türün ise öncelikle proteini tüketip akabinde laktozun tüketimine geçtiği belirlenmiştir. İlk önce laktozu tüketen fungus türünün gelişimi esnasında daha yoğun laktoz ilavesi gerçekleştirildiğinde lipit içeriğinde artış gözlemlendiği ifade edilmektedir. Diğer iki fungus türü içinse amonyum sülfat oranı artırılan besi ortamının lipit oranında artış sağladığı kaydedilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmanın ikinci basamağında laktozu önce tüketen *Mortierella isabellina* türünün gelişim gösterdiği besi ortamına 25 g/L laktoz ilavesi, diğer iki türün kültür ortamı içerisine ise 6 g/L amonyum sülfat ilavesi gerçekleştirilmiştir. pH değeri 6, çalkalama hızı 180 rpm, sıcaklığın 28°C olduğu koşullarda fungusların 420 saat inkübe edilmesi sağlanmıştır. Bu sürecin sonunda *Mortierella isabellina* türünün 42.3 g/L biyomas eldesi sağladığı, %25.3'lük bir oranla lipit elde edildiği belirlenmiştir. *Thamnidium elegans* türünün biyomas değerinin 29.5 g/L olduğu, %1'lik lipit oranı sağladığı kaydedilmiştir. *Mucor sp.* ise 28.5 g/L biyomas, %0.7 lipit oranı ile kayıtlarda yerini almıştır. Kültüre edilen tüm fungus türlerinin ürettiği lipitlerin içeriği analiz edildiğinde ise, sıklıkla palmitik asit, oleik asit, linoleik asit, palmitoleik asit ve stearik asit yağ asitleri ile karşılaşıldığı rapor edilmiştir (Vamvakaki *et al.* 2010).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

**Çizelge 3.1.** Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar

NO	ALET ve CİHAZ	MARKA
1	Otoklav	HMC HIRAYAMA
2	Hassas Terazı	DenverInstrument, SHIMADZU ATX224
3	pH Metre	Mettler Toledo
4	Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
5	Falkon	Ependorf
6	Vortex	Wisd WiseMix VM-10
7	Ependorf Tüpler	Ependorf
8	Mikropipet Takımı	Ependorf
9	Etüv - İnkübatör	
10	Destile Su Cihazı	Mp MINI Pure
11	Mikroskop	Boeco
12	Mikrodalga Fırın	Beko MD 1500
13	Petri	Ependorf
14	Buzdolabı	Vestel
15	Santrifüj	Hettich
16	Raklar	Ependorf
17	Derin Dondurucu	New Brunswick Premium U140

##### 3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

Kloroform, Metanol, Sukroz, Agar, PDA, Amonyum Sülfat, Magnezyum Sülfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ve. Melas (Erzurum Şeker Fabrikası'ndan temin edilmiştir).

##### 3.1.3. Çalışmada kullanılan toprak örnekleri

Çalışmada Erzurum ilindeki ayçiçeği, şeker pancarı ve patates ekiminin gerçekleştirildiği tarla topraklarının yanısıra bahçe, saksı ve orman altı toprakları lipit üreten fungusların (maya yada küf) izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Melasın kimyasal içeriğinin belirlenmesi

Başlangıçtaki ham melas ve besiyerindeki şeker miktarı fenol-sülfirik asit metodu (Dubois *et al.*, 1956) ile belirlenmiştir. Melasın pH' sı Ohaus Starter 3100 marka pH metre ile ölçülmüştür. Toplam azot içeriği micro-kjeldal cihazıyla belirlenmiş ve elde edilen azot içeriği 6,25 faktörüyle çarpılarak toplam protein içeriği hesaplanmıştır.

### 3.2.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların izolasyonu

Toprak örneklerinin steril-fizyolojik su ile dilisyonları hazırlanmış ve dilisyon örneklerinin  $10^{-3}$  lük olanından 0.1 mL alınarak melas ile hazırlanan steril izolasyon besiyeri üzerine yayılmıştır. İzolasyon besiyerinin içeriği saf su içerisine %5 melas (50 mL/L), 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 gr/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (amonyum sülfat), 0.25 g/L  $\text{MgSO}_4$  ve 20 g/L agar ilavesi yapılarak hazırlanmıştır (pH 6). Ekim yapılan petriyerler, 30 °C'de 3 – 10gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu zaman dilimi içerisinde petriyerlerde gelişen koloniler mikroskop altında incelenerek maya yada küf olduğu düşünülen mikroorganizmalar PDA (Potato Dextrose Agar) ortamında alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır.

### 3.2.3. İzole edilen maya yada küflerin lipit üretme yeteneklerinin karşılaştırılması

İzole edilen mayalar yada küfler 30 °C'de PDA içeren besiyerleri üzerinde aktifleştirilmiştir. Aktifleştirme işleminin ardından küf olduğu düşünülen mikroorganizmaların sporlarından yada misellerinden, maya olduğu düşünülen mikroorganizmaların ise hücre biyomasından bir öze dolusu alınıp melas ile hazırlanan sıvı besiyerinin (mikroorganizmaların taranması ve lipit üretim deneylerinde kullanılan) 100 ml' sini içeren 250 ml' lik erlenlere aşılanmıştır. Bu besiyerinin içeriği saf su içerisine %5 melas (50 mL/L), 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 gr/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (amonyum sülfat) ve 0.25 g/L  $\text{MgSO}_4$  ilavesi yapılarak hazırlanmıştır. Aşılama işleminin ardından besiyerleri 30 °C'de 6 gün süreyle 150 rpm' de inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda

kültürler santrifüj edilmiş ve kültürlerdeki hücre biyoması, lipit miktarı ve lipit içeriği analiz edilmiştir. En yüksek lipit miktarına sahip olan izolat seçilmiş, bu izolatın 18S rRNA sekans analizine göre moleküler teşhisi gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4. En iyi izolatla melas ortamında lipit üretiminin optimizasyonu**

Çalışmada en iyi izolatla lipit üretimi için kültür şartlarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. En iyi izolat sıvı kültürde maya morfolojisinde büyüdüğü için optimizasyon çalışmaları süresince bu izolatın ön kültürü patates dektroz besiyerinde hazırlanarak eşit inokulasyonun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Ön kültürün hazırlanması sırasında PDA üzerinde gelişen mikroorganizmanın çivik kıvamındaki misel yapısından steril patates dektroz broth besiyerinin 100 ml'sini içeren 250 ml' lik erlen içerisine bir öze dolusu hücre aşılansmış ve erlenler 30 °C ve 150 rpm'de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda hücre yoğunluğu 600 nm' de 1.5 absorbansa ayarlanmış ve bu absorbansa sahip ön kültürün 1 ml'si lipit üretim besiyerinin (melas besiyeri) aşılansması için kullanılmıştır. Aşılansan besiyerleride 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Optimizasyon deneyleri süresince farklı melas konsantrasyonları, amonyum sülfat ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> konsantrasyonları, kültür pH' ları ve inkübasyon süreleri test edilmiştir.

#### **3.2.5. Lipit üretimi, hücre büyümesi ve şeker tüketiminin analizi**

Belirlenen inkübasyon süresinin sonunda kültürler 5000 rpm' de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen ıslak hücreler sabit ağırlığa gelinceye kadar 80 °C'de kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra elde edilen ağırlık hücre biyoması (g/L) olarak ifade edilmiştir. Besiyerindeki şeker tüketimide fenol-sülfirik asit metodu (Dubois *et al.*, 1956) ile belirlenmiştir.

Lipit miktarının ve içeriğinin belirlenmesi içinse kuru hücrelerden lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun içinde, kuru hücreler üzerine 5 ml'lik kloroform-metanol eklendi (2V\1V). Her bir tüp 5 dk boyunca vortekslendi ve 5.000 rpm'de 5 dk santrifüj

edildi. Daha sonra süpernatant dökülüp üzerlerine tekrar 5 ml'lik kloroform – metanol eklendi ve böylece bu işlem 5 kez tekrarlandı. Elde edilen sıvı kısımlar uzaklaştırıldı. Bu yapılan işlem sonunda geriye kalan katı kısım (hücre) sabit ağırlığa gelinceye kadar tekrar 80 °C' de kurutuldu. Kuru hücrelerin başlangıçtaki ağırlığından final ağırlığı çıkarılarak toplam yağ konsantrasyonu (g/L) hesaplandı. Lipit içeriği (%) ise aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Lipit içeriği (%)=[Lipit konsantrasyonu (g/L) /Hücre biyoması (g/L)] x 100.

### 3.2.6. Üretilen lipitlerin yağ asidi profilinin belirlenmesi

Yağ asidi bileşiminin tespiti için, kurutulmuş lipidler 500 µl BF3-metanol (FLUKA, 15716) içerisinde eritilmiş ve kapalı bir şişede, 20 dakika boyunca 95 ° C'lik bir ısıtıcıda inkübe edildi. Suda hazırlanmış 300 µl doymuş NaCl ilave edildikten sonra yağ asidi metil esterleri 300 µl n-heksan ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra, yağ asitlerinin analizi, bir HP-88 kolonu (60 m x 0.25 mm x 0.20 µm) ile donatılmış bir Agilent Technologies 7890A-5975C GC-MS sistemi kullanılarak GC-MS ile yapılmıştır. Standart olarak yağ asidi metil esterleri (FAME'ler) karışımı C8-C24 (SUPELCO, ABD) kullanılmıştır. Yağ asidi pikleri, bilinen standartlar ile karşılaştırılarak tanımlanmış ve miktarları hesaplanmıştır.

### 3.2.7. En iyi izolatın moleküler olarak teşhisi

En yüksek lipid üreticisi olan TS61 kodlu izolatın moleküler tanısının yapılması amacıyla, ilk olarak, mikroorganizma PDB besiyerinde 30°C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra saflığı kontrol edildikten sonra Promega wizard<sup>R</sup> genomic DNA purification kit (A20) protokolüne uygun olarak genomik DNA'sı izole edildi.

Hedef bölge olarak fungus sistematigi açısından önemli olan ve evrimsel açıdan korunmuş bölge olma özelliğini taşıyan ITS bölgesi, evrensel primerler (ITS1 ve ITS4) kullanılarak *in vitro* koşullar altında çoğaltıldı. PCR bileşenleri ve PCR programı çizelge 3.2 ve çizelge 3.3'de verilmiştir.



**Çizelge 3.2.** ITS gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla kullanılan PCR bileşenlerini yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Konsatrasyon	Miktar (µl)
PCR Buffer (sigma)	10X	3
dNTP	25 mM	0,6
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,8
ITS1	5 pmol	3
ITS4	5 pmol	3
DMSO	%99	1,2
DDH <sub>2</sub> O	-	14,1
Kalıp DNA	100 ng	3

**Çizelge 3.3.** ITS gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngüsü

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	52	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

0,9 gr agaroz üzerine 90 ml 1XTAE (%1'lik agaroz jel) solüsyonu ilave edilerek, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Agaroz çözüldükten sonra kısa bir süre soğumaya bırakılıp, jele 0,8 µg/ml olacak miktarda etidyum bromür eklendi ve içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. Daha sonra 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlandı ve donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Ardından içerisinde 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl ve diğer çukurlara ise her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü ile karıştırılarak yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 1 saat yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

TS61 kodlu izolata ait ITS gen bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra dizi analizinin yapılması amacıyla pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA) vektörüne klonlandı. Klonlama basamakları aşağıda verilmiştir.

Ligasyon işlemi için;

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl vektör
- 1 µl T<sub>4</sub> DNA ligaz

0,2 ml lik tüplerde bir araya getirilen karışım 1 gece 16 derecede 13-15 saat bekletildikten sonra kullanılıncaya kadar +4 °C muhafaza edildi.

Transformasyon işlemi için;

- Her bir ependorf tüpüne pGEM®-T Easy Vector Systems ile birlikte gelen kompetent hücreden 50 µl konuldu.
- Üzerine 2,5 µl ligasyon ürünü (ITS gen bölgesi) eklendi ve 20 dk süre ile buzda bekletildi.
- 2 dk süre ile 42,5°C'de ısı şokuna uğratıldı.
- Üzerlerine 900 µl LB besiyeri konulup yaklaşık 2 saat süre ile 37°C'de bekletildi.
- Daha sonra buzdolabında muhafaza edilen ve kullanılmadan önce oda ısısına gelmesi sağlanan amfisilinli katı besi yerine, 40 µl X-Gal ve 40 µl IPTG yayıldı.
- Yüzey yeterince kuruduktan sonra, ligasyon ürünü + Kompetent hücre karışımından 150 µl alınarak petrinin ortasına konuldu ve drigalski ile iyice yayılımı sağlandı. Daha sonra petrilere, 37°C'de yaklaşık 12-14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda petriyeler, inkübatörden çıkarılarak +4°C’de bir gece bekletildi ve petriyelerde mavi ve beyaz koloni oluşumu gözlemlendi. Beyaz kolonilerin ITS gen bölgelerini içerip içermediğinin kontrolü kolon PCR ile yapıldı. Bu amaçla;

- 16,1 µl dH<sub>2</sub>O, 3 µl tampon (MgCl<sub>2</sub>’li), 0,6 µl dNTP mix, 1,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µl 50 µM T7 (5’-AATACGACTCACTATAG-3’) primer, 2 µl 50 µM SP6 (5’-ATTTAGGTGACACTATAG-3’) primer, 0,3 µl *Taq* DNA pol, 1,2 µl DMSO ve numaralandırılmış koloni eklendi.
- Denatürasyon (94°C 2 dk), amplikasyon (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 dk) 35 döngü, sonlanma (72°C 10 dk).
- EtBr ilaveli %1’lik agaroz jele, markır ve içerisinde istenen geni içeren (pozitif)- içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü.
- İstlenen geni taşıyan koloniler, PCR görüntülerine göre seçilip, plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth’a ekildi.

Plazmit izolasyonu için Promega markasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanıldı. Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması için;

1. 998 µl saf su + 2 µl plazmit konularak OD<sub>260</sub> da ölçüldü.
2.  $A_{260} \times 50$  (sabit)  $\times 500$  (dilüsyon oranı) formülü ile plazmitin konsantrasyonu 100 – 200 ng olacak şekilde ayarlandı.
3. 30–50 µl uygun konsantrasyona sahip seçilerek plazmitler sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi için firmanın sayfasından indirilen sekans sonuçları BioEdit ile analiz edildi ve fasta formatına çevirildi. Öncelikle primerler bulundu ve primerlerden önde kalan kısımlar vektöre ait DNA sekansını içeren bu bölgeler çıkarıldı. Ardından diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi. Anlamlı hale getirilen sekans verilerinin blast çalışması [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar baz alınarak, bilgileri gen bankasına girildi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Melasın Kimyasal İçeriği

Seyreltme işlemine tabi tutulmamış %100' lük melasın pH'sı 8.2, toplam şeker içeriği 47.2 gr/lt, toplam azot içeriği ise %1.7 ve toplam protein içeriği %10.6 gr/lt olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Melasın kimyasal içeriği

Parametre	Miktar/Seviye
pH	8.2
Toplam şeker	%47 (470 g/L)
Toplam azot	%1.7
Protein	%10.6 (106 g/L)

Melasın pH, toplam azot, toplam şeker ve kül içeriği üç tekerrür olarak analiz edilmiştir.

### 4.2. Fungusların İzolasyonu ve Lipit Üretme Yeteneklerinin Karşılaştırılması

Materyal metot kısmında belirtildiği gibi farklı toprak örneklerinin dilüsyonları hazırlanmış ve  $10^{-3}$  lük dilüsyon örneğinin 0.2 ml' si melas ile hazırlanan agar besiyeri üzerine yayılmış ve petriler 25 C' de 3-10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süresi içerisinde petriler üzerinde gelişen koloniler patates dekstroz agar (PDA) besiyeri üzerinde alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır. Bu adımlar izlenerek farklı toprak örneklerinden 75 tane fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlar daha sonra melas ile hazırlanan besiyerine aşılınmış ve lipid üretme yetenekleri test edilmiştir. 50 mL/L melas içeren besiyerinde (%5'lik melas besiyeri) 75 izolatın sadece 7 tanesinin %20 nin üzerinde lipid içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden, çizelge 4.2' de sadece 7 izolata ait değerler verilmiştir. Bu izolatlar arasında en yüksek lipid içeriğine (%33.3) TS19 sahip olsa da en düşük toplam lipid miktarı (1.9 g/L) yine bu izolat için ölçülmüştür. Toplam lipid üretkenliği açısından ise en iyi izolat TS61 bulunmuştur. %5' lik düşük melas konsantrasyonunda bile bu izolatla üretilen toplam lipid miktarı 3.2 g/L,

lipit içeriği ise %32.9 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alınarak takip eden çalışmalar şeker pancarı tarlasından izoel edilen TS61 izolatu ile yürütülmüş ve bu izolat 18S rRNA sekans analizine göre *Galactomyces geotrichum* olarak teşhis edilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Farklı fungal izolatların hücre büyüme ve lipit üretme yeteneklerinin karşılaştırılması

İzolat Kodu/ izolasyon kaynağı	Hücre konsantrasyonu (g/L)	Lipit konsantrasyonu (g/L)	Lipit içeriği (%)
TS13 (Ay ieği Tarlası)	10.6±0.9b	3.0±0.22a	28.2
TS19 (şeker Pancarı Tar)	5,7±0.6d	1.9±0.15c	33.3
TS25 (Orman Toprağı)	11.5±0.87b	2.8±0.17ab	24.2
TS44 (Bahçe Toprağı)	11.6±1.0b	2.5±0.17bc	21.5
TS61 (şeker Pancarı Tar)	9.7±0.7bc	3.2±0.20a	32.9
TS64 (Patates Tarlası)	8.3±0.5c	2.5±0.20bc	30.1
TS70 (Saksı Toprağı)	12.9±1.1ab	2.8±0.17ab	21.7

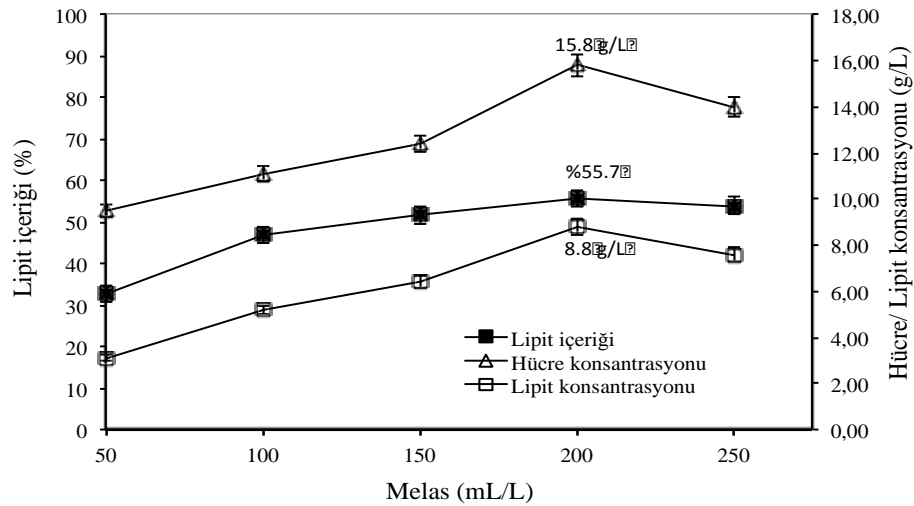
Tarama koşulları: Sıcaklık 30 C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 6 gün ve pH 6.0. Besiyeri kompozisyonu: %5 melas (50 mL/L), 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 gr/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (amonyum sülfat) ve 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>



**şekil 4.1.** *Galactomyces geotrichum* TS61 izolatının PDA besiyerindeki görüntüsü

### 4.3. *Galactomyces geotrichum* TS61 ile Lipit Üretiminin Optimizasyonu

Çizelge 4.3' den de görülebileceği gibi besinsel faktörler (azot kaynağı ve mineral tuzlar) ve diğer kültür parametreleri (pH, sıcaklık, çalkalama hızı, ve inkübasyon süresi) sabit tutulduğunda, maksimum hücre (15.8 g/L) ve lipit konsantrasyonunun (8.8 g/L) yanısıra maksimum lipit içeriğine (%55.7) 200 ml/L melas konsantrasyonunda (%20'lik melas besiyeri) ulaşılmıştır. Bu yüzden çalışmanın takip eden aşamaları bu miktarda melas içeren besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Test edilen melas konsantrasyonlarının tamamın lipid konsantrasyonu, lipit içeriği ve hücre konsantrasyonunu istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilemiştir.



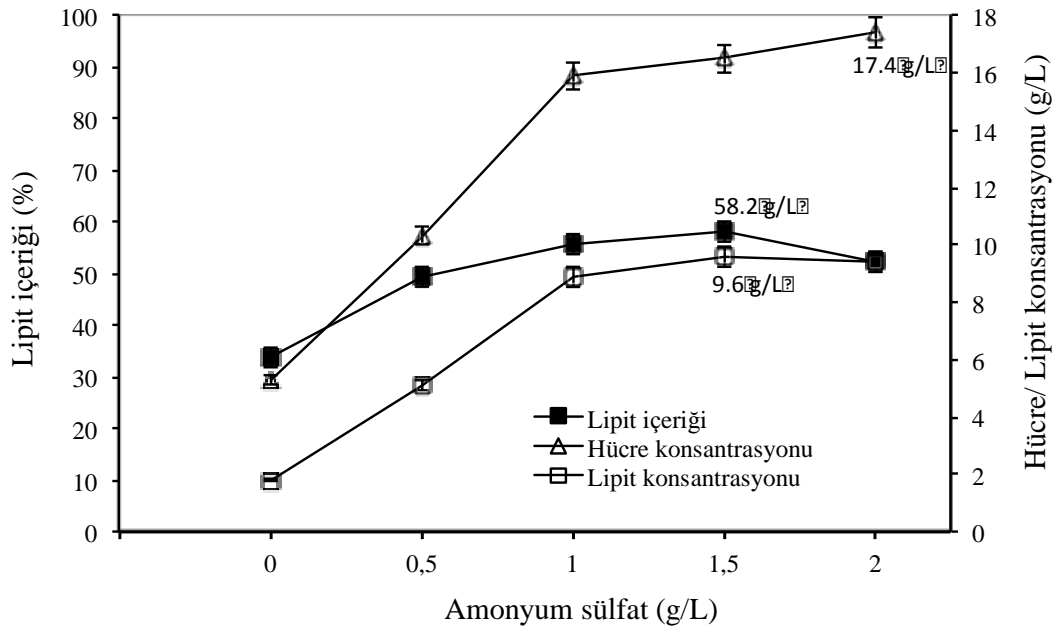
**Şekil 4.2.** *Galactomyces geotrichum* TS61’de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine melas konsantrasyonunun etkisi

**Çizelge 4.3.** Melas konsantrasyonunun hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi

Melas miktarı(mL/L)	Hücre konsantrasyonu(g/L)	Lipit konsantrasyonu(g/L)	Lipit içeriği (%)
50	9.5±0.7d	3.1±0.22c	%32,6
100	11.1±1.1c	5.2±0.41b	%46.8
150	12.4±0.9bc	6.4±0.33ab	%51.6
200	15.8±1.2a	8.8±0.52a	%55.7
250	14.0±1.3b	7.6±0.56ab	%54
300	13.9±1.1b	6.9±0.34ab	%49.6

Tarama koşulları: Sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 6 gün ve pH 6.0. Besiyeri kompozisyonu: 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 gr/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (amonyum sülfat) ve 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi deneyler 200 m/L melas içeren besiyerinde gerçekleştirildiğinde amonyum sülfat içermeyen melas besiyerinde (0 g/l amonyum sülfat) çok düşük hücre ve lipit konsantrasyonları elde edilmiştir. İlave azot kaynağınının (amaonyum sülfat) artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre konsantrasyonunun sürekli bir artış gösterdiği ve maksimum hücre konsantrasyonuna (16.5 g/L) 2 g/L amonyum sülfat içeren besiyerinde ulaşıldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, melas besiyerine eklenen amonyum sülfatın lipit konsantrasyonu ve lipit içeriğininide artırdığı görülmüştür. Bununla birlikte, hücre konsantrasyonunun aksine lipit konsantrasyonu ve lipit içeriğinde 1.5 g/L' nin üzerindeki amonyum sülfat konsantrasyonunda azalma tespit edilmiştir. Diğer bir ifadeyle, hücre büyümesi için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonu 2 g/L, lipit birikimi içinse 1.5 g/L olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfatın bu optimal konsantrasyonunda, lipit konsantrasyonu ve lipit içeriği sırasıyla 9.6 g/L ve %58.2 olarak tespit edilmiştir.



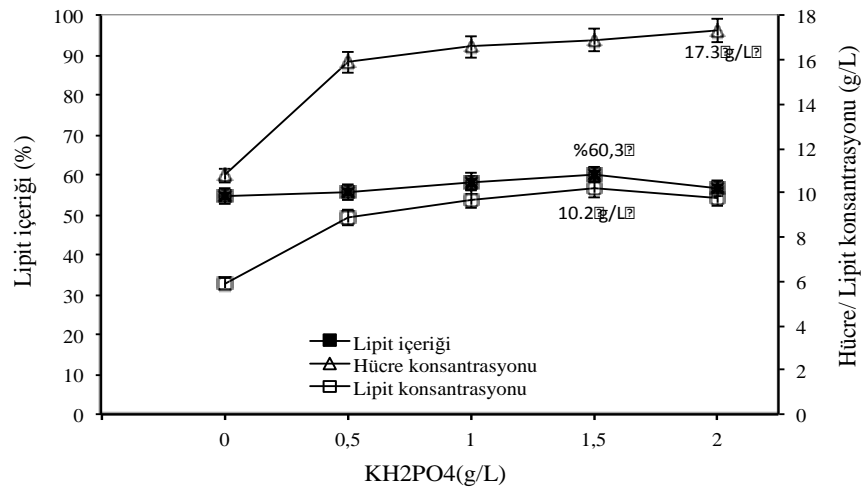
**Şekil 4.3.** *Galactomyces geotrichum* TS61'de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine amonyum sülfat konsantrasyonunun etkisi

**Çizelge 4.4.** Amonyum sülfat konsantrasyonunun hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi

Amonyum sülfat(g/L)	Hücre konsantrasyonu(g/L)	Lipit konsantrasyonu(g/L)	Lipit içeriği (%)
0	5.3±0.6c	1,8±0.17d	%33,9
0.5	10.3±1.2b	5,1±0.32c	%49.5
1	15.9±1.1a	8.9±0.44ab	% 55.8
1.5	16.5±1.4a	9.6±0.42a	% 58.2
2	17.4±1.5a	9.4±0.33ab	%52.2

Tarama koşulları: Sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 6 gün ve pH 6.0. Besiyeri kompozisyonu: %20 melas (200 mL/L)1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ve 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>

Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi amonyum sülfat ilavesinde olduğu gibi test edilen KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> konsantrasyonlarının hepsi hücre büyümesinde sürekli bir artışa neden olmuştur. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ilavesi hücrede lipit sentezini de olumlu olarak etkilemiş ve buna bağlı olarak da 1.5 g/L’ ye kadar olan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> konsantrasyonlarında lipit konsantrasyonu için sürekli bir artış kaydedilmiştir. Ancak, lipit konsantrasyonunun yanı sıra hücre konsantrasyonunda da önemli artışlar meydana geldiği için lipit içeriği çok fazla bir artış göstermemiştir. Diğer taraftan, hücre büyümesinin aksine lipit konsantrasyonunun ve lipit içeriğinin 1.5 g/L’ nin üzerindeki KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> konsantrasyonlarında azaldığı belirlenmiştir. Lipit sentezi için optimal olarak belirlenen 1.5 g/L’ lik KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> konsantrasyonunda, lipit konsantrasyonu 10.2 g/L, lipit içeriği ise %60.3 olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.4.** *Galactomyces geotrichum* TS61’de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> konsantrasyonunun etkisi

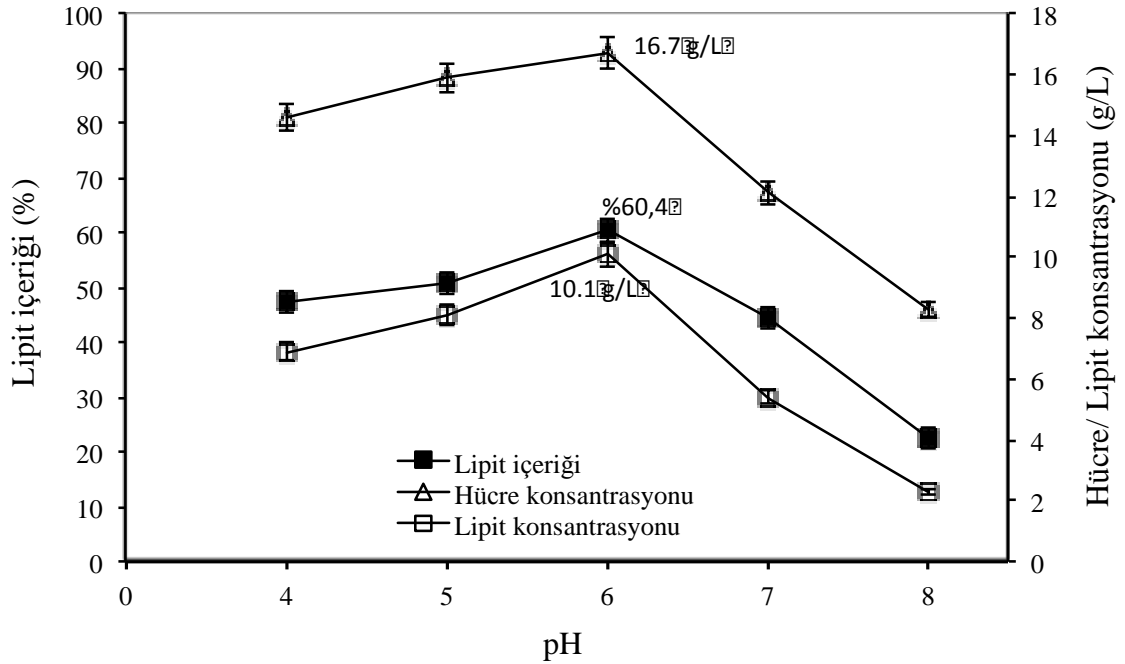


**Çizelge 4.5.**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonunun hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi

$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{g/L})$	Hücre konsantrasyonu(g/L)	Lipit konsantrasyonu (g/L)	Lipit içeriği (%)
0	10.8±0.7c	5.9±0.29c	%54.6
0.5	15.9±1.0b	8.9±0.27b	%55.8
1	16.6±1.2ab	9.7±0.33ab	%58.4
1.5	16.9±1.2ab	10.2±0.45a	%60.3
2	17.3±1.4a	9.8±0.42ab	%56.6

Tarama koşulları: Sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 6 gün ve pH 6.0. Besiyeri kompozisyonu: %20 melas (200 mL/L), 1.5 gr/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (amonyum sülfat) ve 0.25 g/L  $\text{MgSO}_4$

Çizelge 4.6' den görülebileceği gibi test edilen pH ların hücre büyümesi ve lipit sentezi çok fazla etkilemiştir. Özellikle, pH 7' de hücre büyümesi ve lipit sentezinde çok fazla azalma tespit edilmiştir. Hem hücre büyümesi hemde lipit sentezi için en uygun pH 6.0 olarak belirlenmiştir. Optimal olarak belirlenen bu pH' da hücre konsantrasyonu 16.7 g/L, lipit konsantrasyonu ve içeriği ise sırasıyla 10.1 g/L ve %60.4 olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.5.** *Galactomyces geotrichum* TS61' de lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine pH'nın etkisi

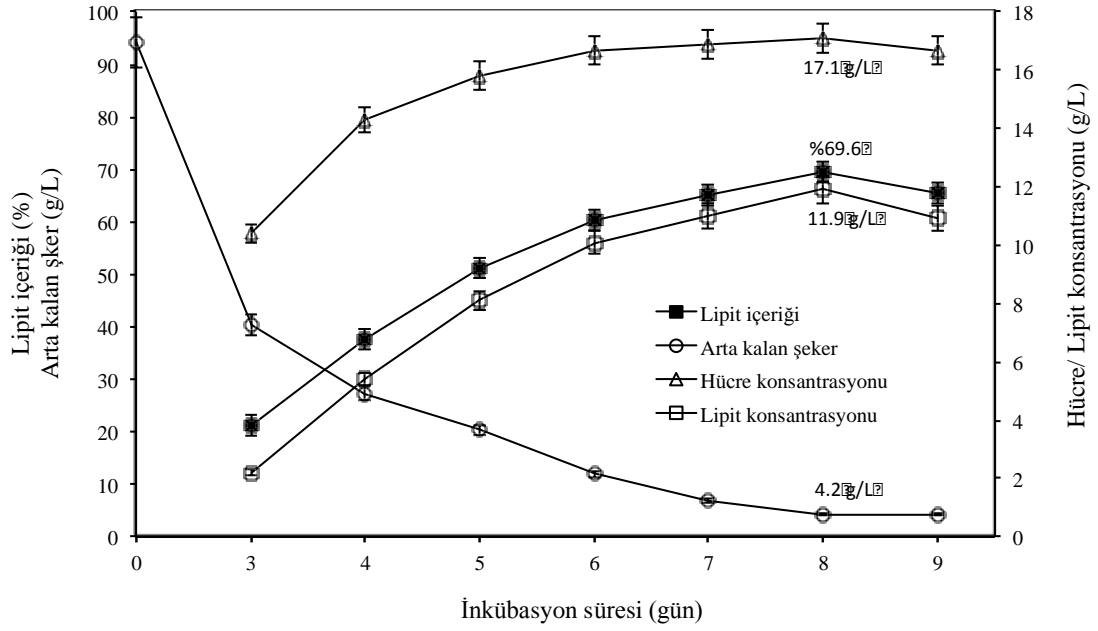
**Çizelge 4.6.** Kültür pH'sının hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi

Başlangıç pH	Hücre konsantrasyonu(g/L)	Lipit konsantrasyonu (g/L)	Lipit içeriği (%)
4	14.6±1.2cd	6,9±0.35c	%47.3
5	15.9±1.4bc	8.1±0.33b	%50.9
6	16.7±1.2a	10.1±0.54a	%60.4
7	12.1±1.3d	5.4±0.27d	%44.6
8	8.3±0.6e	2.3±0.22e	%27.7

Tarama koşulları: Sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 150 rpm ve inkübasyon süresi 6 gün. Besiyeri kompozisyonu: %20 melas (200 mL/L), 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 gr/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (amonyum sülfat) ve 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>

Çizelge 4.7' den görülebileceği gibi deneyler optimal şartlarda gerçekleştirildiğinde en fazla hücre büyümesi inkübasyonun ilk 3 gününde meydana gelmiş ve 6. güne kadar hücre büyümesinde kayda değer artışlar tespit edilmiştir. 6- 8. günler arasında ise hücre büyümesinde dikkate alınmayacak derecede artışlar belirlenmiştir. Örneğin, 6, 7 ve 8. günlerdeki hücre konsantrasyonları sırasıyla 16.7, 16.9 ve 17.1 g/L olarak ölçülmüştür. 8. günden sonra ise hücre konsantrasyonunda azalma tespit edilmiştir.

Lipit sentezi ise ilk 3 günde çok düşük seviyelerde kalmıştır. Şöyleki, 3. günün sonunda lipit konsantrasyonu 2.2 g/L, lipit içeriği ise sadece %21.1 olarak ölçülmüştür. Üçüncü günden sonra ise lipit sentezinde hızlı bir artış meydana gelmiş ve bu artış kademeli olarak artarak 8. güne kadar devam etmiştir. 6. günden sonra hücre büyümesi çok yavaşlarsa da lipit sentezindeki artış 8. günün sonuna kadar devam etmiştir. 8. günden sonra ise sadece hücre konsantrasyonunda değil aynı zamanda lipit konsantrasyonu ve lipit içeriğinde de azalmalar gözlemlenmiştir. 8. günün sonunda elde edilen maksimum lipit konsantrasyonu 11.9 g/L, lipit içeriği %69.6 hücre konsantrasyonu ise 17.1 g/L olarak belirlenmiştir. 200 mL/L melas içeren besiyerindeki toplam şekerin başlangıç miktarı 94 g/L olarak ölçülmüştür. Şeker içeriğindeki en fazla azalma inkübasyonun ilk 3 gününde tespit edilmiştir. Hücre büyümesinin ve lipit sentezinin bittiği 8. günün sonunda şeker içeriği 4.2 g/L olarak ölçülmüştür. 8. günden sonra ise şeker içeriğinde herhangi bir azalma tespit edilmemiştir.



**Şekil 4.6.** *Galactomyces geotrichum* TS61’de şeker tüketimi, lipit sentezi ve hücre büyümesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

**Çizelge 4.7.** İnkübasyon süresinin hücre büyümesi ve lipit sentezi üzerine etkisi

İnkübasyon süresi (gün)	Şeker içeriği(g/L)	Hücre konsantrasyonu(g/L)	Lipit konsantrasyonu(g/L)	Lipit içeriği (%)
3	40.2±3.2a	10.4±0.6c	2,2±0.15e	21.1
4	27.3±2.8b	14.3±0.8b	5,4±0.27d	37.7
5	20.4±1.4c	15.8±1.0ab	8,1±0.33c	51.3
6	11.9±1.1d	16.7±1.0a	10.1±0.38b	60.4
7	6.8±0.5e	16.9±1.2a	11.0±0.44ab	65.1
8	4.2±0.3f	17.1±1.1a	11.9±0.47a	69.6
9	4.2±0.3f	16.7±1.1a	10.9±0.56ab	65.3

Tarama koşulları: Sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 150 rpm ve pH 6.0. Besiyeri kompozisyonu: %20 melas (200 mL/L), 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 gr/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (amonyum sülfat) ve 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub>

#### 4.4. Üretilen Lipitlerin Yağ Asidi Profilinin Belirlenmesi

Çalışmanın en son aşamasında, optimal şartlarda üretilen lipitler metanol-kloroform karışımı ile hücre biyomasından ekstrakte edilmiş ve daha sonra bu lipitlerin GC ile yağ asidi kompozisyonu analiz edilmiştir. Üretilen lipitlerin %27,09' nin doymuş yağ asitlerinden % 72.85' sının ise doymamış yağ asitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Toplam lipitler içerisinde tekli-doymamış (mono-unsaturated) yağ asitlerinin oranı %30,36, çoklu doymamış (poly-unsaturated, PUFAs) yağ asitlerinin oranı ise %42.49 olarak tespit edilmiştir. Lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan yağ asidinin çoklu bir doymamış yağ asidi olan Linoleik asit (C18:2) (Omega 6) (%23.67), bunun ardından da tekli bir doymamış yağ asidi olan oleik asit (C18:1) (Omega 9) (%22.14) olduğu belirlenmiştir. Lipit içerisinde en fazla bulunan 3. yağ asidinin ise Eicosadienoik asit (C:20) (Omega 6) (%18.82) olduğu tespit edilmiştir. Lipitlerin içerisindeki diğer yağ asitlerinin ise Palmitoleik asit (C16:1), Stearik asit (C18:0), Palmitik asit (16:0), Pentadekanoik asit(C15:0) ve Miristik asit (C14:0) olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 4.8.** *Galactomyces geotrichum* TS61' in lipitlerinin yağ asidi profili

Yağ asitleri	Yağ asidi türü	Miktarı (%)
Myristik asit (C14:0)	Doymuş	5.06
Pentadekanoik asit(C15:0)	Doymuş	6.32
Palmitik asit (16:0)	Doymuş	6.59
Stearik asit (C18:0)	Doymuş	9.12
Palmitoleik asit (C16:1)	Tekli-doymamış	8.22
Oleik asit (C18:1) (Omega 9)	Tekli-doymamış	22.14
Linoleik asit (C18:2) (Omega 6)	Çoklu doymamış	23.67
Eicosadienoik asit (C:20) (Omega 6)	Çoklu doymamış	18.82

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikroorganizmalar çeşitli enzimlerin, pigmentlerin, organik asitlerin, biyopolimerin, rekombinant proteinlerin, antimikrobiyal peptitlerin ve antibiyotiklerin yanı sıra lipitlerin üretiminde de sıklıkla kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen üretim çalışmalarında ise ucuz substrat seçimi önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Bu doğrultuda, mikroorganizmaların geliştirilmiş olduğu besiyerlerine; peynir altı suyu, gliserol, melas, narenciye ve pirinç kabukları, meyve çekirdekleri ve kabukları, atık kızartma yağları, tavuk tüyleri, mısır maserasyon sıvısı ve patates kabukları gibi ucuz organik atıklar veya yan ürünler karbon ve/veya azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Lee *et al.*, 2011; Gouda *et al.*, 2001, Papanikolaou and Aggelis, 2002; Huang *et al.*, 2009; Taskin and Erdal 2011; Arslan *et al.*, 2016; Unver *et al.*, 2018; Orak *et al.*, 2018; Yazici *et al.*, 2018).

Yapılan çalışmalarda, mikrobiyal lipitlerin insan vücudunda doğal olarak sentezlenemeyen ve birçok hastalığa karşı koruyucu etkisi olduğu bilinen omega-3 ve omega-6 gibi çoklu doymamış yağ asitlerini içerdiği bildirilmektedir. Diğer bir ifadeyle, çoklu doymamış yağ asitlerine sahip olan lipitlerin daha çok insan gıdası veya ilaç olma potansiyelinden bahsedilmektedir (Ochsenreither *et al.*, 2016). Çoklu yağ asitleri, üretilen biyodizelin vizkositesini azalttığından dolayıda, çoklu doymamış yağ asitlerini içermeyen veya bu yağ asitlerini düşük oranda içeren mikrobiyal lipidlerin ise bitkisel yağlara alternatif olarak biyodizel üretiminde ham madde olarak kullanılabilceği belirtilmektedir (Gui *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009; Katre *et al.*, 2012; Taskin *et al.*, 2015).

Diğer taraftan, lipit üretme kapasitesi bakımından da her mikroorganizma uygun olmamaktadır. Bu doğrultuda da, araştırmacılar çoğunlukla yüksek oranda lipit biriktiren (lipit içeriği %20' nin üzerinde) yani oleaginous olarak bilinen mikroorganizmalara yönelmektedirler. Hatta uygun kültür koşulları altında bazı mikroorganizmaların lipit içeriği %70'lere çıkmaktadır (Amaretti *et al.* 2010; Beopoulos *et al.* 2011; Katre *et al.* 2012). Bu yüzden, mikrobiyal lipitlerin üretiminde amaca

yönelik uygun yağ asidi profiline sahip olan ve yüksek miktarda lipit üretebilen mikroorganizma seçimi çok önem arz etmektedir.

Mikrobiyal lipitlerin üretiminde uygun substrat seçimide çok önemli bir adım olarak kabul edilmektedir. Uygun substrat seçiminde ise, araştırmacılar düşük maliyetli olmasının yanısıra yapısında yüksek şeker fakat düşük oranda azot içeren melas, gliserol, pirinç kabukları gibi ucuz organik materyallere yönelmektedirler (Meng *et al.*, 2009; Vamvakaki *et al.*, 2010; Karatay and Dönmez, 2011; Economou *et al.*, 2011; Mast *et al.*, 2014). Çünkü, yüksek karbon:azot oranının oleaginous mikroorganizmlarda lipit birikimini artırdığı belirtilmektedir (Amaratti *et al.*, 2010). Örneğin, yüksek azot içeriğinden dolayı bazı meyve sularının, kanalizasyon atık suyunun ve monosodium glutamat içeren atık suların iyi bir lipit üretim substratı olmadığı açıklanmaktadır (Wu *et al.*, 2012). Yada, yüksek azot içeriği probleminin üstesinden gelebilmek için peynir altı suyu gibi protein (azot) bakımından zengin materyallere protein giderme işlemleri uygulayarak azot içeriğinin azaltılmasına çalışılmaktadır (Taskin *et al.*, 2015). Melas ise yüksek karbon ve düşük azot içeriğine sahip olmasının yanında maliyetinde düşük olması sebebiyle mikrobiyal lipit üretimi için iyi bir substrat olarak kabul edilmektedir (Taskin *et al.*, 2016).

Doğadaki bir çok mikroorganizmanın sukroz şekerini karbon kaynağı olarak kullanmadığı bilinmektedir. Melasında şeker içeriğinin çoğunluğunu sukroz oluşturmaktadır. Bu yüzden de, melas ile hazırlanan besiyerlerinde sukroz pozitif olan bir mikroorganizma ile çalışılması gerekmektedir. Bu noktalar göz önüne alınarak, mevcut çalışmada melas sukrozunu etkili bir şekilde kullanabilen ve yüksek oranda lipit biriktiren fungusların izolasyonuna çalışılmıştır. Melas sukrozunu etkili kullanabilen mikroorganizmaların izole edilebilmesi içinde izolasyon çalışmaları doğrudan melas (tek karbon kaynağı), bazı mineral tuzlar ve agar ile hazırlanan besiyerinde gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmaları sonucunda farklı toprak örneklerinden 75 fungus izole edilmiştir. %5'lik düşük melas (düşük şeker içeriği) ile hazırlan sıvı besiyerinde gerçekleştirilen tarama deneyleri sonucunda bu izolatlardan sadece 7'sinin %20' nin üzerinde lipit biriktirdiği diğer bir ifadeyle oleaginous özellik gösterdiği tespit

edilmiştir. 7 izolat arasında TS19' un en fazla lipit içeriğine sahip olduğu belirlense de en düşük lipit üretkenliği (lipit konsantrasyonu 1.9 g/L) bu izolat için kaydedilmiştir. Ay çiçeği tarlasından izole edilen TS61 kodlu izolatin ise en yüksek lipit üretkenliğine (lipit konsantrasyonu 3.2 g/L) sahip olduğu belirlenmiştir. TS61 izolatinın lipit içeriğinde (%32.9) son derece yüksek bulunmuş ve bu yüzden de takip eden deneyler bu izolatla gerçekleştirilmiştir. Bu izolat *Galactomyces geotrichum* olarak teşhis edilmiştir. *G. geotrichum* strainlerinin literatürde süt ve peynir gibi gıdalarda, alkollü içeceklerde ve toprakta bulunduğu, maya-küf morfoloji geçişli dimorfik özellik taşıdığı ve patojen olmadığı rapor edilmektedir (Grygier *et al.*, 2017). Starter olarak kullanıldığında peynire aroma kazandırdığı ve peynirde oluşan acımsı tadın giderilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (Chebeňová-Turcovská *et al.*, 2011; Gamero *et al.*, 2016; Sadecka *et al.*, 2016). Sahip olduğu laccase, azo reductase ve tyrosinase gibi enzimler sayesinde azo boyaları parçaladığı ve bu yüzden biyoremediyasyon çalışmalarında kullanılabilmesi de açıklanmaktadır (Govindwar *et al.*, 2014). Yine literatürde, bu organizmanın toksik özellik taşıyan DDT' yi parçaladığı belirtilmektedir (Purnomo *et al.*, 2010). Yapılan tek bir çalışmada da, bu organizmanın mikrobiyal lipit üretiminde kullanılabilmesi belirtilmiştir (Marjakangasa *et al.*, 2015). Bu yüzden, *G. geotrichum* dimorfik organizmasının lipit üretme yeteneğinin araştırılmasına yönelik daha çok araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir. Mevcut çalışmada da, izole edilen 75 maya, küf ve yada dimorfik organizma arasında en yüksek lipit üretkenliğinin *G. geotrichum* izolatı ile başarılması bu türün gerçekte lipit üretiminde detaylı bir şekilde test edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Literatürde mikrobiyal lipitler üretimini besinsel faktörlerin (karbon, azot, fosfor vb konsantrasyonları) yanısıra pH, sıcaklık, inkübasyon süresi gibi parametrelerin etkilediği de belirtilmektedir (Ma *et al.*, 2009; Sitepu *et al.*, 2013;..). Bu yüzden, mevcut çalışmada *G. geotrichum* TS61 ile lipit üretimi için bu parametrelerin bazılarında optimize edilmiştir. Amonyum sülfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve diğer mineral tuzların konsantrasyonları sabit tutulduğunda, maksimum hücre büyümesinin, lipit üretiminin (lipit konsantrasyonu) ve lipit içeriğinin 200 ml/L melas konsantrasyonuna başarıldığı görülmüştür. Daha yüksek melas konsantrasyonlarında (250 ve 300 ml/L) ise hem hücre büyümesinin hemde lipit

sentezinin azaldığı görülmüştür. Bu azalma, melas bazı toksik maddelerin olası varlığına bağlanabilir. Bununla birlikte, 250 ve 300 ml/L' deki melas konsantrasyonlarında bile en düşük melas konsantrasyonuna oranla (50 ml/L) daha iyi hücre büyümesi ve lipit sentezi gözlenmiştir. *G. geotrichum*' un toksik maddelerin biyoremediyasyonunda kullanılabildiği bilgisi (Purnomo *et al.*, 2010; Govindwar *et al.*, 2014) göz önüne alındığında bu küfün yüksek melas konsantrasyonlarını tolere etmesi çok şaşırtıcı olmamalıdır.

Azot ilavesi (amonyum sülfat) yapılmamış besiyerinde *G. geotrichum* organizmasının lipit içeriği yüksek bulunsada hücre biyomas konsantrasyonunun çok düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, melas içerisinde bu fungus tarafından azot kaynağı olarak kullanılabilecek olan maddelerin sınırlı olmasıyla açıklanmıştır. Çünkü mevcut çalışmada da melasın toplam azot içeriği (%1.7) son derece düşük bulunmuştur. Literatürde de zaten, melasın azot içeriğinin hem düşük hem de azotlu bileşiklerin çoğunun mikrobiyal büyüme veya aktiviteler için uygun olmadığı açıklanmaktadır. Amonyum sülfat ilavesi yapılan bütün besiyerlerinde test edilen bütün konsantrasyonlarda hücre büyümesinde bir artış tespit edilmiştir. Hücre büyümesinin aksine ise 1.5 g/L' nin üzerindeki konsantrasyonda hem lipit konsantrasyonu hem de lipit içeriğinde bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum, daha önceki çalışmalarda da belirttiği gibi (Katre *et al.* 2012; Taskin *et al.*, 2016) besiyerinin karbon:azot oranına bağlanmıştır. Bu sonuçlarda, *G. geotrichum* ile lipit üretimi için en uygun karbon:azot oranının 200 ml melas ve 1.5 g amonyum sülfat içeren besiyerinde sağlandığını göstermektedir.

Amonyum sülfat örneğinde olduğu gibi besiyerine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ilave edildiğinde de test edilen bütün  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonlarında hücre büyümesinde bir artış tespit edilmiştir. Hücre büyümesinin aksine, lipit konsantrasyonunun ve lipit içeriğinin ise 1.5 g/L üzerindeki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonlarında azaldığı görülmüştür. Diğer bir ifadeyle,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ilavesi lipit üretimini artırsada aşırı yüksek konsantrasyonlarının lipit üretiminde azalmaya neden olmuştur. Lipit üretimindeki azalma  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  kaynaklı yüksek fosfor içeriğine bağlanabilir. Çünkü literatürde sadece, yüksek azot içeriğinin



değil aynı zamanda yüksek fosfor içeriğinin de lipit sentezini engellediği belirtilmektedir (Gill *et al.* 1977; Li *et al.* 2006; Wu *et al.* 2010; Taskin 2015).

Mevcut çalışmada, melas, amonyum sülfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  konsantrasyonlarının ardından kültür pH'sının lipit üretimi ve hücre büyümesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma bulgularında da belirtildiği gibi hücre konsantrasyonunun yanısıra en yüksek lipit konsantrasyonu ve lipit içeriği pH 6.0' da başarılmıştır. Test edilen bütün pH' ların hücre büyümesini ve lipit üretimini çok fazla etkilediği görülmüştür. Örneğin, pH 6' nın üzerindeki değerlerde hücre ve lipit konsantrasyonlarında çok keskin azalmalar görülmüştür. Bu bulgularda kültür pH'sının mikrobiyal lipitlerin sentezini çok fazla etkilediğini gösteren önceki çalışmalarla paralellik taşımaktadır (Zhu *et al.* 2008; Taskin *et al.*, 2015).

Hücre büyümesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi araştırıldığında hücre konsantrasyonunun ilk 3 gün içerisinde çok fazla arttığı ancak 4-6 günler yavaşladığı görülmüştür. Hatta, 6-8 günler arasında hücre konsantrasyonunda sadece 0.2 g' lık bir artış tespit edilmiştir. Bu sonuçlar küfün hücre büyümesinin yaklaşık olarak 6.günden sonra durağan faza geçtiğini göstermektedir. 8. günden sonra ise hücre konsantrasyonunda düşüş gözlemlenmiştir. Hücre konsantrasyonunda bu düşüş besin tükenmesine bağlı olarak (özellikle azot kaynağı) fungal lizis geçirmesine bağlanmıştır. Lipit sentezi ise ilk üç günde çok düşük seviyelerde kalmış, 3. günden sonra ise yüksek artışlar göstermiştir. Diğer taraftan, hücre büyümesi 6. günden itibaren durma noktasına gelmesine rağmen lipit sentezi 6. günden sonrada yüksek artış göstermiştir. Durağan lipit sentezinin devam etmesi kültürde azotun bittiğinin ama karbon kaynağının kaldığını ve buna bağlı olarakta azot sınırlılığında hücrelerin lipogenezise yöneldiğini göstermektedir. Bu sonuçlar hücre büyümesinin aksine lipitlerin veya yağ asitlerinin sentezinin durağan fazda da devam ettiğini gösteren önceki çalışmalardaki sonuçlara paralellik taşımaktadır (El-Fadaly *et al.* 2009; Amaretti *et al.* 2010; Gohel *et al.* 2013; Takin *et al.*, 2015). Optimize edilmiş kültür şartları altında 8. günün sonunda elde edilen maksimum lipit konsantrasyonu 11.9 g/L, lipit içeriği ise %69.6 olarak

belirlenmiştir. Bu küf için elde edilen lipit içeriği önceki çalışmalarda belirtilen diğer maya veya küflerin lipit içeriklerinin çoğundan daha yüksek bulunmuştur.

Deneyle sonucunda, *G. geotrichum* küfünden elde edilen lipitlerin yapısında çoklu-doymamış yağ asitlerinin yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu doymamış yağ asitleri omega 3, 6 ve 9 tip yağ asitleri grubunda yer almaktadır. Literatürde de çoklu doymamış yağ asitlerinin esas olarak insan gıdası ve ilaç olma potansiyelinden bahsedilirken, biyodizel üretimi için uygun olmadıkları rapor edilmektedir (Karatay and Dönmez, 2010; Katre *et al.*, 2012; Taskin *et al.*, 2015).

#### **Çalışma sonucunda elde edilen bulgular göstermektedir ki;**

1. Mayaların yanısıra küflerde yüksek lipit içeriğine sahip olabilmektedir. Bu bağlamda, patojen özellik taşımayan *Galactomyces geotrichum* küfö iyi bir lipid kaynağı olarak kullanılabilir.
2. Bu küfle lipid üretiminde melas substrat olarak kullanılabilir ve bu küf melasın toksik bileşenlerini tolere edebilir.
3. Melas ortamında bu küfle lipid üretiminde amonyum sülfat ve  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ilavesi lipid üretimini teşvik etsede aşırı yüksek konsantrasyonları lipid sentezini sınırlayabilir. Diğer bir ifadeyle, karbon, azot ve fosfor oranları bu küfte lipogenezi yeteneğini etkileyebilir.
4. Uzatılmış inkubasyon süreleri bu küfte lipogenezi artırabilir.
5. Çoklu doymamış yağ asidi içeriğinden dolayı bu küfün lipitleri insan gıdası olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

- Adrio, J.L. and Demain, A.L., 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6, 191-199.
- Ai, Y., 2013. Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, 92: 120-127.
- Akgün G., Bayındır H., Aydın H., Düz Z., 2009. Hayvansal yağlardan biodizel üretimi ve teknik değerlerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma, V. Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, Diyarbakır-Türkiye,. pp: 131-136.
- Aksu, Z., Eren, A.T., 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process. Biochem.* 40, 2985–2991.
- Alptekin E., Canakci M., 2010. Optimization of Pretreatment Reaction for Methyl Ester Production from Chicken Fat, *Fuel*, 89, 4035-4039.
- Alptekin E., Çanakçı M., 2011. Hayvansal kökenli yağlardan biyodizel üretimi, VI. Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, Kayseri-Türkiye.
- Alvarez RM., Rodriguez B., Romano JM., Diaz AO., Gomez E., Miro D., Navarro L., Saura G., Garcia JL., 1992. Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 214–215.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., Lucia, M.D., Leonardi, A. and Rossi, M., 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, *Microbial Cell Factory*, 9(73), 1-6.
- Arslan, N. P., Aydoğan, M. N., & Taskin, M., 2016. Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose—positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. *Journal of biotechnology*, 231, 32-39.
- Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Abdul Aziz, A., 2010. High Quality Biodiesel and Its Diesel Engine Application: A Review. *Renew Sustain Energy Rev* 14 (7): 1999–2008.
- ATSDR., 1995 Toxicological profile for Gasoline. U.S. department of health and human services, Public Health Service.
- Benbrahim-Tallaa L, Baan RA, Grosse Y, *et al.*, 2012. Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. *Lancet Oncol*;13:663-4.
- Bennet, J.W., 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology* 66, 101–107.
- Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribe Larrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM., 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res*; 48:375–87.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.M. and Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 90, 1193-1206.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.M. and Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 90, 1193-1206.

- Brouns, F., 2002. Resistant Starch and “the butyrate revolution”. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 251-261.
- Çengelci, E., Bayrakçeken, H. and Aksoy, F., 2011. Animal and Vegetable Oils Obtained Comparison of biodiesel with diesel fuel, *Electronic Journal of VehicleTechnologies*, 3(1), 41-53.
- Chebeňová-Turcovská, V., Ženišová, K., Kuchta, T., Pangallo, D., Brežná, B., 2011. Culture-independent detection of microorganisms in traditional *Slovakian bryndza* cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 150, 73–78.
- Chisti Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., Zhang, M., 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr. J. Biotechnol.* 6:18, 2130-2134.
- DEKTMK., 2011. Dünya Enerji Konseyi Türk Milli Komitesi, Enerji Raporu, DEK-TMK YAYIN NO: 0019, Çankaya-Ankara, pp: 1-233.
- Demirbas A., 2008. New liquid biofuels from vegetable oils via catalytic pyrolysis, *Energy Educ Sci Technol.*, 21, 1-59.
- Demirbas A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energ Convers Manage.*, 50, 14-34.
- Dubois M, Giles UA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F., 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*;28:350–356.
- Economou, Ch.N, Aggelis, G., Pavlou, S., Vayenas, D.V., 2011. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 102, 9737–9742.
- El-Fadaly, H.A., El-Naggar, N.E. and Marwan, E.M., 2009. Single cell oil production by an Oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. *Research Journal of Microbiolohy*, 4, 301-313.
- Eliasson, A., 2004. Starch in Food. *Starch in Food: Structure, Function and Applications*, Edited by.
- Ergun M., Mutlu S., 2000. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour Technol.*, 73, 251-255.
- Evans, C.T. and Ratledge, C., 1983. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids*, 18, 623-629, 1983.
- Fakasa, S., Papanikolaou, S., Batsosa, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchosa, A. and Aggelis, G., 2009. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Biorenewables* 33573–580.
- Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., Hazelwood, L., 2016. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol.*, 60, 147–159.
- Gellissen, G., 2005. *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Gill, C.O., Hall, M.J. and Ratledge, C., 1977. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 231–239.

- Gohel, H.R., Ghosh, S.K., Braganza, V.J., 2013. Yeast as a Viable and Prolonged Feedstock for Biodiesel Production. *International Journal of Renewable Energy Research*, 3, 126-131.
- Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H., 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological research*, 156(3), 201-207.
- Govindwar, S. P., Kurade, M. B., Tamboli, D. P., Kabra, A. N., Kim, P. J., Waghmode, T. R. (2014). Decolorization and degradation of xenobiotic azo dye Reactive Yellow-84A and textile effluent by *Galactomyces geotrichum*. *Chemosphere*, 109, 234–238.
- Grygier, A., Myszka, K., & Rudzińska, M., 2017. *Galactomyces geotrichum*-moulds from dairy products with high biotechnological potential. *Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria*, 16(1), 5-16.
- Grygier, A., Myszka, K., Szewiel, A., Stuper-Szablewska, K., Pawlicka-Kaczorowska, J., Chwatko, G., & Rudzińska, M., 2019. Production of Bioactive Compounds by Food Associated *Galactomyces geotrichum* 38, as Determined by Proteome Analysis. *Nutrients*, 11(2), 471.
- Gui MM, Lee KT and Bhatia S., 2008. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy* 33:1646–16 53.
- Güzel, D. ve Sayar, S., 2010. Digestion profiles and some physicochemical properties of native and modified borlotti bean, chickpea and white kidney bean starches. *Food Research International*, 43: 2132-2137.
- Hall, J., Hetrick, M., French, T., Hernandez, R., Donaldson, J., Mondala, A. and Holmes, W., 2011. Oil production by a consortium of oleaginous microorganisms grown on primary effluent wastewater, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86, 54-60.
- Helwani Z., Othman, M.R., Aziz, N., Fernando, W.J.N., Kim, J., 2009. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: a review, *Fuel Proc. Technol.* 90, 1502e1514.
- Huang, C., Chen, X.F., Xiong, L., Chen, X.D., Ma, L.L., 2012. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. *Bioresource Technology* 110,711–714
- Huang, C., Zong, M.H., Wu, H., Liu, Q.P., 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*, 100 (19), 4535–4538.
- Işler, A., Sundu, S., Tüter, M., Karaosmanoğlu, F., 2010. Transesterification reaction of the fat originated from solid waste of the leather industry,. *Waste Management*, 30(12), 2631-2635.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A.J., 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99, 195-199.
- Kalogiannis S., Iakovidou G., Liakopoulou-Kyriakides M., Kyriakidis DA., Skaracis GN., 2003. Melasta yetißen *Xanthomonas campestris* tarafından ksantan sakızı üretiminin optimizasyonu, *Process Biochem.*, 39, 249-256.
- Karatay, S.E., Dönmez, G., 2011. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresour. Technol.* 101, 7988–7990.

- Katre G, Joshi C, Khot M, Zinjarde S and Ravikumar A., 2012. Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express* 2:36.
- Kaur, M., 2010. Microstructure, physicochemical properties and *in vitro* digestibility of starches from different Indian lentil (*Lentil culinaris*) cultivars. *Carbohydrate Polymers*, 79: 349-355.
- Khot, M., Kamat, S., Zinjarde, S., Pant, A., Chopade, B., Ravikumas, A., 2012. Single cell oils of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microb. Cell Fact.* 11:71, 2-13.
- Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y., Chang, H. N., & Chang, Y. K., 2000. Fermentative production of succinic acid from glucose and corn steep liquor by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 5(5), 379-381.
- Leesing, R., Baojungharn, R. and Papone, T., 2012. Microbial Oil Production by Mixed Culture of Microalgae *Chlorella* sp. KKU-S2 and Yeast *Torulaspora maleeae* Y30. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 64, 1055-1058.
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 312-317
- Li, Y.H., Liu, B., Zhao, Z.B. and Bai, F.W., 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chin. J. Biotechnol.* 22, 650-656.
- Lin, J., Shen, H., Tan, H., Zhang, X., Wu, S., Hu, C., Zhao, Z.K., 2011. Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *J. Biotechnol.* 152:4, 184-188.
- Liu YP., Zheng P., Sun ZH., Ni Y., Dong JJ., Zhu LL., 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*, *Bioresour Technol.*, 99, 1736-1742.
- Liu, B., Zhao, Z., 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 775-780.
- Ma, L., Xing, D., Wang, H., Wang, X., & Xue, D. (2009). Effect of culture conditions on cell growth and lipid accumulation of oleaginous microorganism. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*, 25(1), 55-59.
- Marjakangasa, J. M., Lakaniemia, A. M., Koskinenb, P. E.P., Changc, J. S., Puhakkaa, J. A., 2015. Lipid production by eukaryotic microorganisms isolated from palm oil mill effluent. *Biochem. Eng. J.*, 99, 48-54.
- Mast, B., Zohrens, N., Schmidl, F., Hernandez, R., French, W.T., Merkt, N., Claupein, W., Graeff-Honninger, S., 2014. Lipid Production for Microbial Biodiesel by the Oleagenious Yeast *Rhodotorula glutinis* Using Hydrolysates of Wheat Straw and Miscanthus as Carbon Sources. *Waste Biomass Valor* 5, 955-962.
- Mata TM., Martins AA., Caetano NS., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew Sust Energ Rev.*, 14, 217-232.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energ.* 34, 1-5.
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syldatk, C., 2016. Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, 7, 1539.

- Oomah, B. D. ve diğ., 2011. Chemistry of Pulses. Pulse Foods: Processing, Quality and Nutraceutical Applications, Edited by B. K. Tiwari, A. Gowen and B. McKenna, pp 16-20. Elsevier Inc.
- Pamir, A.N., 2003. Dünyada ve Türkiye'de Enerji, Türkiye'nin Enerji Kaynakları ve Politikaları. *Metallurji Dergisi*.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G., 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource technology*, 82(1), 43-49.
- Purnomo, A. S., Koyama, F., Mori, T., Kondo, R., 2010. DDT degradation potential of cattle manure compost. *Chemosphere*, 80, 619–624.
- Queiroz, M.I., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q., Bastos, R.G., Goldbeck, R., 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*, 98, 2163-2169.
- Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L and Perez Á., 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol* 100:261–268.
- Razmovski R., Vucurovic V., 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix, *Enzyme Microb Technol.*, 48, 378-385.
- Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, Ponzoni C, Pagnoni UM and Matteuzzi D., 2009. Growth, lipidaccumulation, and fattyacid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecology* 69 363–372.
- Sadecka J., Sakova, N., Pangallo, D., Korenova, J., Kolek, E., Puskarova, A., Kuchta, T., 2016. Microbial diversity and volatile odour-active compounds of barrelled ewes' cheese as an intermediate product that determines the quality of winter bryndza cheese. *LWT-Food Sci*.
- Savin, J., 2003. *Enerji İçin Yeni Bir Gelecek Yaratmak. Dünyanın Durumu*. Çev. Sehnaz Tahir Gürçaglar, TEMA Vakfı Yayınları, İstanbul.
- Saxena, V., Sharma, C.D., Bhagat, S.D., Saini, V.S., Adhikari, D.K., 1998. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Indian Institute of Petroleum*. 75:4, 501-505.
- Shivaji, S., Bhadra B., Rao RS. and Pradhan S., 2008. *Rhodotorula himalayensis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from Roopkund Lake of the Himalayan mountain ranges, India. *Extremophiles*, 12, 375-381.
- Sitepu, I. R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., German, J. B., Gillies, L. A.,... & Boundy-Mills, K. L., 2013. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource technology*, 144, 360-369.
- Tan T., Lu J., Nie K., Deng L., Wang F., 2010 Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*., 28, 628-634.
- Taskin M., Esim N., Ortucu S., 2012. Efficient production of L-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61, *Food Bioprod Process.*, 90(4), 773-779.

- Taskin, M., & Erdal, S., 2011. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* MT- 5 in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1440-1445.
- Taskin, M., 2013. "Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 165-172.
- Taskin, M., Saghafian, A., Aydogan, M. N., & Arslan, N. P., 2015. Microbial lipid production by cold- adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non- sterile whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), 595-605.
- Tsigie, Y.A., Wang, C.Y., Kasim, N.S., Diem, Q.D., Huynh, L.H., Ho, Q.P., Truong, C.T. and Ju, Y.H., 2012. Oil Production from *Yarrowia lipolytica* Po1g Using Rice Bran Hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-10.
- Ünalın, S., 2012. <https://akmyo.kocaeli.edu.tr/altenerkaydersnot.pdf>
- Vamvakaki, A.N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M., Papanikolaou, S., 2010. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by *Zygomycetes*. *Eng. Life Sci.* 10:4, 348–360.
- Vicentea G., Bautistaa LF., Rodrígueza R., Gutiérreza FJ., Sádabaa I., Ruiz-Vázquezb RM., Torres-Martínez S., Garreb V., 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem Eng J.*, 48, 22-27.
- Voltolina D., Cordero B., Nieves M., Soto LP., 1999. Growth of *Scenedesmus sp.* in artificial wastewater. *Bioresour Technol.*, 68, 265-268.
- Woodbine, M., 1995. Microbial fat: microorganisms as potential producers. *Prog. Indust. Microbiol.* 1, 145-179.
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X. and Zhao, ZK., 2010. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology* 101, 6124–6129.
- MengX., YangJ., XuX., ZhangL., Nie, Q., Xian, M., 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renew. Energy* 34, 1e5.
- Xue, F., Gao, B., Zhu, Y., Zhang, X., Feng, W. and Tan, T., 2010. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresource Technology* 101 6092–6095.
- Yasar, B., 2008. Türkiye’de Biyodizel Üretim Maliyeti ve Yasanan Sorunlar. VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, UTES’2008, İstanbul.
- Yilmaztekin M., Erten H., Cabaroğlu T., 2008. Production of Isoamyl Acetate from Sugar Beet Molasses by *Williopsis saturnus*. *Saturnus, J. Inst. Brew.*, 114(1), 34-38.
- Yoon, S.H. and Rhee, J.S., 1983. Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of the American Oil Chemists’ society.* 60, 1281-1286.
- Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B. and Zhao, Z.K., 2008. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 405–412.
- Zhu LY, Zong MH, Wu H., 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon* fermentans and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99, 7881-788.



## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladıktan sonra 2009 yılında Cumhuriyet Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. 2015-2016 eğitim öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimine halen devam etmektedir.

