

90604

ENDÜSTRİYEL ATIK MADDELERDEN
MİKROBİYAL YOLLA
 β -KAROTEN ÜRETİMİ

MUSTAFA KAHYAOĞLU
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
ŞUBAT 1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Mustafa KAHYAOĞLU'nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı Endüstriyel Atık Maddelerden mikrobiyal yolla β -Karoten Üretimi başlıklı tez.08.02.1999..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Merih KIVANÇ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Kıymet GÜVEN



Üye : Yrd.Doç.Dr. Semra İLHAN



Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17.02.1999..... tarih ve5/3..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Orhan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TOKİMANIYON MERKEZİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDÜSTRİYEL ATIK MADDELERDEN MİKROBİYAL YOLLA β -KAROTEN ÜRETİMİ

MUSTAFA KAHYAOĞLU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
1999, Sayfa 52

Biyoteknolojideki gelişmelere bağlı olarak son yıllarda endüstriyel fermentasyonla β -karoten üretimi konusunda çalışmalarda artmıştır. Araştırmamızda hem endüstriyel atık maddelerin çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi hemde besin ve ilaç endüstrisinde provitamin A olarak kullanılan β -karoten üretilmesi amaçlanmıştır. Endüstriyel atık maddelerden olan melas, şlempe ve peynir altı suyu doğal besiyortamı olarak kullanılarak mikrobiyolojik yolla β -karoten üretilmiştir.

Fermentasyon deneylerinde sentetik besiyeri olarak YPK buyyon, Malt ekstrakt buyyon, doğal ortam olarakta şeker sanayinin yan ürünü olan şeker pancarı melas'i ve şlempe, gıda sanayinin atık maddesi olan peynir altı suyu kullanılmıştır. Melas, şlempe ve peynir altı suyu kullanılmadan önce ön işlemlerden geçirilmiştir.

Fermentasyonda kullanılan mikroorganizmalar yapılarında β -karoten oluşturan ve özellikle biyoteknolojik araştırmalarda sıkça kullanılan *Phycomyces blakesleeanus* ve *Phycomyces nitens*, *Blakeslea trispora* suşları ile *Mucor mucedo* suşlarıdır. Yapılan çalışmalarda *Phycomyces blakesleeanus* ve *Phycomyces nitens* suşları 20°C'de Patates dekstroz agar'da ve *Blakeslea trispora*, *Mucor mucedo* suşları ise wort Agar'da geliştiği görülmüştür.

Denemeler sonunda β -karoten miktarı YPK buyyon'da 1,8-12,1 mg/lt, malt ekstrakt buyyon'da 7,9-27 mg/lt, melas'ta 6,1-43,3 mg/lt, şlempe'de 3-9,9 mg/lt, peynir altı suyunda 4,4-12,5 mg/lt arasında değişmiştir. En yüksek β -karoten miktarı ise genelde *B. trispora* suşundan elde edilmiştir.

Sonuç olarak, mikrobiyal yolla β -karoten üretimi, kullanılan mikroorganizmaya, fermentasyon ortamına, ilave edilen maddelere, aydınlatmanın uygulanıp uygulanmamasına göre büyük ölçüde değişmiştir. Melas, şlempe, peynir altı suyu gibi endüstriyel atık maddelerin β -karoten üretiminde kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Beta karoten, *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora*,

ABSTRACT**Master of Science Thesis** **β -CAROTENE PRODUCTION BY
MEANS OF FERMENTATION
FROM INDUSTRIAL WASTE****MUSTAFA KAHYAOĞLU
Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology: Major Biology****Supervisor: Prof. Merih KIVANÇ
1999, Page 52**

Nowadays, Studies of β -carotene production by means of fermentation was increased depending on development in biotechnology.

In our study the goal was to use waste substrate, before it damages the environment; and also to produce β -carotene which is used as provitamin A. in food and medicine industry.

Sugar beet molasses and whey, which were from industrial waste, used as natural in growth substrate and β -carotene was produced by microbiology way.

In our experiments YPK buyyon, Malt Ekstract were used as the synthetic substrate, sugar bett molasses and whey were used as the natural substrate. The later substrates were pretreated before using .

Microorganisms that were used for β -carotene production were *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakesleea trispora*, *Phycomyces nitens*, *Mucor mucedo*, our study showed that the optimum condition for these fungia at 20- 27⁰C on patoto dextrose agar and Wort agar Fermentation was done in 250 ml Flaks with 50 ml growth substrate an the Orbital Incubator SI 50 shaker incubatr, at 27⁰C.

It was seen that amount of β -carotene is 7,9-27 mg/lt in Malt extract broht, 1,8-12 mg/lt in YPK Buyyon, 6,1-43,3 mg/lt in Molas, 4,4-12,5 in Whey. The highest production yield was the one produced by *Blaksleea trispora*

As a result beside these waste substrate other waste substrate may give similar production. It will be a good subject to study on that for future research.

Keywords: Beta Carotene, *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakesleea trispora*,

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde, yol gösterici düşünce, değerli bilgileri ve yardımları ile bana her zaman için destek olan değerli hocam Prof.Dr. Merih KIVANÇ'a öncelikle teşekkürlerimi sunarım.

Deneyleşimin yürütülmesinde bilgilerine danıştığım hocalarım Yrd.Doç.Dr. Kıymet GÜVEN'e, Öğr.Gör. Nalan YILMAZ'a, Arş.Gör. Nuray KARAKAŞ'a, Uzm. Erdoğan ÇAKIR değerli yüksek lisans arkadaşlarım Filiz DEMİR, Yasemin ÇEKİÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Bütün çalışmalarımnda bana her zaman destek olan Ailem'e ve emeği geçen herkese teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karotenoidler.....	3
1.2. A. Vitamin'in Sağlık Açısından Önemi.....	4
1.3. Karotenoidler.....	5
1.4. β -karoten'in Biyosentezi.....	8
1.5. β -karoten Miktarı Artmasını Sağlayan Faktörler.....	9
1.6. β -karoten Oluşturan Mikroorganizmalar.....	13
2. MATERYAL VE METOD.....	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar.....	18
2.1.2. Fermentasyon Ortamı.....	18
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler.....	19
2.1.3.1. Patates Dekstroz Agar.....	19
2.1.3.2. Wort Agar.....	19
2.1.3.3. YPK Buyyon.....	20

2.1.3.4. Malt Ekstrakt Buyyon.....	20
2.1.3.5. Melas Ortamı.....	21
2.1.3.6. Şlempe Ortamı.....	21
2.1.3.7. Peynir altı suyu Ortamı.....	21
2.1.3.8. Kullanılan Çözgenler.....	22
2.1.3.9. Fermetasyon Ortamına Katılan Maddeler.....	22
2.2. Metod.....	23
2.2.1. Mikroorganizmaların Çoğaltılması.....	23
2.2.2. Suşların Farklı Besiyerinde.....	
Değişik Sıcaklıklardaki Büyümesi.....	23
2.2.3. İnokulum'un Hazırlanması.....	23
2.2.4. Fermentasyon.....	24
2.2.5. Fermentasyon Sonrası Misellerin Alınması.....	24
2.2.6. Misellerin Kuru ağırlıklarının Saptanması.....	24
2.2.7. Standart β -karoten Eğrisinin Çizilmesi.....	24
2.2.8. β -karoten Miktarının Standart Eğri	
Üzerinden Saptanması.....	25
3. BULGULAR.....	26
3.1. Farklı Besiyerlerinde Değişik Sıcaklıklarda Suşların Büyümesi.....	26
3.2. β -karoten'in Üretimi.....	28
3.2.1. Sentetik Besiyerlerinde β -karoten Üretimi.....	28
3.2.2. Melas Ortamında β -karoten Üretimi.....	29
3.2.3. Şlempe Ortamında β -karoten Üretimi.....	30
3.2.4. Peyniraltı suyu Ortamında β -karoten Üretimi.....	31
3.2.5. Ayçiçek ve Soya Yağı Katılarak Elde Edilen Fermentasyonlardaki β -karoten ve Kuru Ağırlık Miktarı	38

3.2.6. Işıklı Ortamlardaki Fermentasyonlarda Elde Edilen.....	
β -Karoten ve Kuru Ağırlık Miktarı	40
4. SONUÇLAR, YORUM VE ÖNERİLER.....	42
5. KAYNAKLAR.....	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	β -karoten'in vitamin A'ya dönüşümü.....	4
1.2.	β -karoten ve α -karoten'in kimyasal yapısı.....	6
1.3.	β -Karoten biyosentez yolu.....	10
1.4.	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> 'da zygospor oluşumu.....	14
1.5.	Prohormonlardan trisporik asit'in oluşumu.....	15
2.1.	Standart β -karoten grafiği.....	25
3.1.	<i>P.blakesleeanus</i> şuşunun 20 ⁰ C ve 27 ⁰ C Patates dekstroz agarda ve wort agardaki koloni çapları	27
3.2.	<i>B.trispora</i> şuşunun 20 ⁰ C ve 27 ⁰ C Patates dekstroz agarda ve wort agardaki koloni çapları	27
3.3.	<i>P.nitens</i> şuşunun 20 ⁰ C ve 27 ⁰ C Patates dekstroz agarda ve wort agardaki koloni çapları	27
3.4.	<i>M.muicedo</i> şuşunun 20 ⁰ C ve 27 ⁰ C Patates dekstroz agarda ve wort agardaki koloni çapları	28
3.5.	<i>P.blakesleeanus</i> şuşunun genel görüntüsü.....	28
3.5.	<i>B.trispora</i> şuşunun genel görüntüsü.....	29
3.5.	<i>P.nitens</i> şuşunun genel görüntüsü.....	29
3.5.	<i>M.muicedo</i> şuşunun genel görüntüsü.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	Çeşitli karotenoidleri üreten mikroorganizmalar ve gerekli koşullar.....	7
1.2.	β -karoten üretiminde β -ioninin verime etkisi.....	12
1.3.	Besi ortamına katılan bitkisel yağların β -karoten verimine etkisi.....	13
2.1.	Melas, şlempe ve peynir altı suyu'nun kimyasal analizleri	32
3.1.	YPK buyyon'da suşların 3 günlük fermentasyonu sonundaki verileri.....	33
3.2.	YPK buyyon'da suşların 5 günlük fermentasyonu sonundaki verileri.....	33
3.3.	YPK buyyon'da suşların 8 günlük fermentasyonu sonundaki verileri.....	33
3.4.	Malt ekstrakt buyyon'da suşların 3 günlük fermentasyon sonundaki verileri	34
3.5.	Malt ekstrakt buyyon'da suşların 5 günlük fermentasyon sonundaki verileri	34
3.6.	Malt ekstrakt buyyon'da suşların 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri	34
4.1.	Melas ortamın'da suşların 3 günlük fermentasyon sonundaki verileri.....	35
4.2.	Melas ortamın'da suşların 5 günlük fermentasyon sonundaki verileri.....	35
4.3.	Melas ortamın'da suşların 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri.....	35
5.1.	Şlempe ortamın'da suşların 3 günlük fermentasyonu sonundaki verileri.....	36
5.2.	Şlempe ortamın'da suşların 5 günlük fermentasyonu sonundaki verileri.....	36
5.3.	Şlempe ortamın'da suşların 8 günlük fermentasyonu sonundaki verileri.....	36
6.1.	Peynir altı suyun'da suşların 3 günlük fermentasyon sonundaki verileri.....	37
6.2.	Peynir altı suyun'da suşların 5 günlük fermentasyon sonundaki verileri.....	37
6.3.	Peynir altı suyun'da suşların 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri.....	37
7.1.	Fermentasyon ortamlarına ayçiçek yağı ve soya yağı katılarak	39
	gelişen suşların oluşturdukları β -karoten miktarları (mg/lt).....	39
7.2.	Fermentasyon ortamlarına ayçiçek yağı ve soya yağı katılarak.....	39
	gelişen suşların oluşturdukları kuru misel miktarı (gr).....	39
8.1.	Işıklı ortamda melas'ta, şilempe'de ve peynir atı suyunda	
	oluşturdukları β -karoten	40
8.2.	Işıklı ortamda melas'ta, şilempe'de ve peynir atı suyunda	
	oluşan kuru ağırlık miktarı.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- β : Beta
 α : Alfa
 γ : Gama
 μ : Mü
mg/lt : miligram/litre
DPA : Difenilamin



1. GİRİŞ

Son yıllarda gerek çevre kirliliğini ortadan kaldıracak gerekse de canlıların yaşamı için yararlı ürünlerin elde edilmesini sağlayan bir araştırma alanı gelişmiştir. Biyoteknoloji adı verilen bu araştırma alanı, mikroorganizmalar yolu ile atık maddelerin parçalanması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Biyoteknoloji; canlı hücreler (mikroorganizmalar, bitki-hayvan hücreleri ve dokuları), ve/veya hücrelerden elde edilen enzimler tarafından gerçekleştirilen biyolojik reaksiyonlarla ilgilenmektedir. Bu biyolojik reaksiyonlar kullanılarak mikroorganizmalardan maddelerin üretimi, yıkımı, atık suların biyolojik arıtımı, atıkların değerlendirilmesi, çevre'nin korunması, protein üretimi, insan ve hayvan sağlığını koruyucu bileşiklerin üretilmesi, bulaşıcı ve salgın hastalıklarla savaş biyoteknoloji'nin ana konularını oluşturmaktadır [1].

Atıkların çevreden uzaklaştırılması ve/veya onlardan yeni ürünlerin elde edilmesi insan ve hayvan sağlığı için olduğu kadar ekonomik açıdan da önem taşımaktadır. Bazı tarımsal ürünlerin, örneğin tahıl ürünlerinin % 60'ı, yağlı tohum ürünlerinin % 85'i, şeker üretiminin % 90'ı kullanılmayan madde olarak çevreye atılmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarla bu atık maddelerin büyük bir kısmı tekrar kazanılabilmektedir [2].

Vitamin B₁₂, antibiyotik, gibi sekonder metabolitler ve mikrobiyal transformasyonlarla elde edilen birçok ürün örneğin steroidler ve doğum kontrol haplarının aktif maddeleri yalnız biyoteknolojik yollarla elde edilmektedir [1].

İnsan ve hayvanların yaşamlarını sağlıklı bir biçimde sürdürebilmesi için aldıkları besinlerde az miktarlarda vitaminlere ihtiyaç duymaktadırlar. Bunlardan bir tanesi de A vitamini'dir [3].

Dünya pazarında vitaminler 5 milyar dolarlık bir pazara sahiptir. Dünyadaki insanların 13 milyon'dan fazlasında A vitamini eksikliğinin neden olduğu körlük olayının görüldüğü bildirilmiştir. A vitamininin öncül maddesi olan β -karoten'in üretimi de biyoteknoloji'nin uygulama alanları içinde yer almaktadır [4].

A vitamini; $C_{20}H_{30}O$, akserofitol veya retinol formunda, uzun zincirli bir alkolden oluşmaktadır. Aslında doğada, yağ asidi esterleri formunda bulunmaktadır [4].

İlk defa A vitamini McCollum ve Davis tarafından 1913-1914 yılları arasında, yumurta sarısından ve tereyağından izole edilmiştir. Daha sonra 1931 yılında Von Wackenroder tarafından havuç'dan kristal halde elde edilmiştir. 1946 yılında ise Karrer kimyasal yapısını açıklamıştır [4].

Siklohekzen türevi olan A vitamini sarı renkli ve kristal halinde bulunmaktadır. Organik çözücü ve yağlarda çözünmektedir. Isıya dayanıksızdır [5].

Et, karaciğer, balık eti, süt, tereyağ, yumurta gibi hayvansal besinlerde ve havuç, domates, elma, kayısı, şeftali gibi sarı, kırmızı renkli meyveler ve bazı yeşil yapraklı sebzelerde A vitamini bulunmaktadır. A vitamini bitkilerde karotenoidler, hayvansal besinlerde ise retinol esterleri halinde bulunmaktadır. Bitkisel besinlerin kaynatılması veya kızartılması ile A vitamini inaktive olmaktadır. Bitkisel yağlarda ve onların hidrojenlenmesi suretiyle elde edilen margarinlerde ise A vitamini bulunmamaktadır [6].

Ülkemizde bazı margarinlere A ve D vitamini katılarak zenginleştirilmektedir. Bazı ülkelerde bu vitaminler sütte de katılmaktadır. A vitamini balık ve memeli gibi hayvanların ciğer yağlarından doğal olarak elde edilmektedir. Fakat günümüzde ilaç endüstrisinde tedavi amacı ile kullanılan A vitamin'in hemen hepsi sentetik yollardan elde edilmektedir [4].

1955 ve 1970 yılları arasında endüstriyel fermentasyonla karotenoid üretimi konusunda bir çok araştırmalar yapılmıştır. Karotenoidlerin bir çeşidi olan β -karoten bilindiği gibi A vitamininin provitaminidir. Margarin, yumurta ve peynir ürünlerine katılmaktadır. Kanatlı hayvanların yemlerine ve bazen de etin ve yumurta sarısının rengini iyileştirme de kullanılmaktadır. Bu nedenle besin endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. β -karoten'in mikrobiyolojik yolla elde edilmesi üzerindeki çalışmalar çeşitli ülkelerde halen devam etmektedir [4].

Çalışmamızda endüstriyel atık maddelerin ekonomik olarak değerlendirilmesi düşüncesiyle şeker sanayi'nin yan ürünü olan melas, şlempe ve süt sanayi'nin atık

maddelerinden olan peynir altı suyu kullanılarak fermentasyon yoluyla β -karoten üretilmesi amaçlanmıştır.

1.1. A Vitamin'inin Sağlık Açısından Önemi

A vitamini eksikliğinde genellikle gözde retinal ve rodopsin düzeyi düşerken, buna ilave olarak rodopsin'in rejenerasyonu da yavaşlamaktadır. Karanlıkta görmenin bozulması (gece körlüğü, niktalopi) A vitamini eksikliğinde ilk ortaya çıkan belirtilerdir. Epitel dokunun normal durumda kalmasında A vitamini'nin önemli katkısı bulunmaktadır [7]. A vitamini eksikliğine en duyarlı olan hücreler, göz yaşı bezleri ve kornea'nın epitel hücreleridir. Bu vitaminin eksikliğinde adı geçen hücreler kuruyarak keratitleşmektedir. Sonuçta kseroftalmi ve daha ileri dönemde kornea'nın yumuşaması (keratomalaşi) nedeniyle delinme görülmektedir. Kurumuş epitel hücreleri enfeksiyona elverişli durumda oldukları için keratit gelişmektedir. Bu sayılan durumlar genellikle körlükle sonuçlanmaktadır [8].

A vitamini eksikliği; mukozalarda enfeksiyon oluşmasına neden olmaktadır. Cildin epidermis tabakasında keratinizasyon artmakta ve ter bezleri atrofiye uğramaktadır. Cilt kurumakta ve kılların diplerinde papüller oluşmaktadır [6].

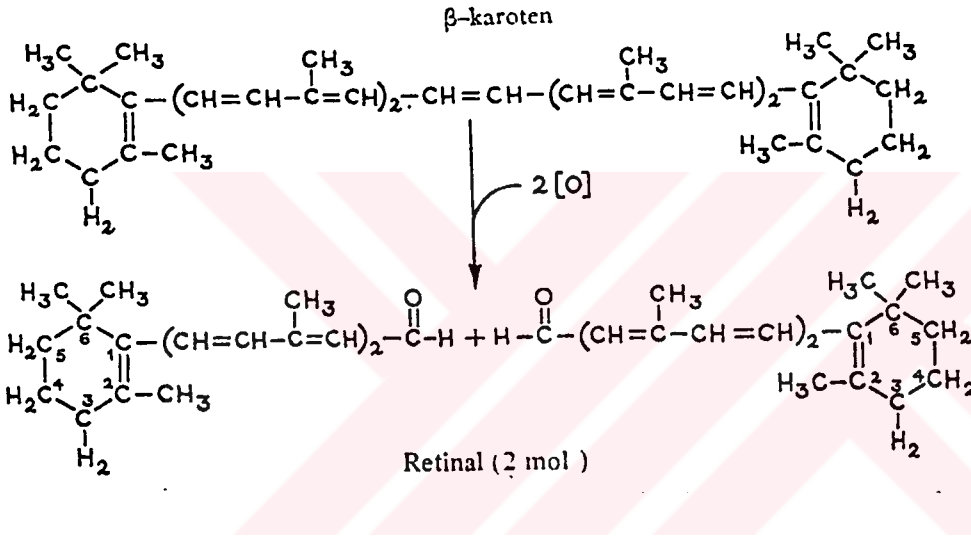
Bağ dokusunun temel maddesini oluşturan mukopolisakkarit metabolizmasının normal bir şekilde devam edebilmesi için A vitamini'nin gerekliliği deney hayvanlarında gösterilmiştir. Bu vitaminin eksikliğinde önce kemik ve sonra da yumuşak dokuların gelişimi durmaktadır [6].

Deney hayvanlarında bu vitaminin epitel hücrelerin yanında diğer hücrelerin de normal büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynadıkları bunun yanında kimyasal etkenlere, radyasyona veya virüslere bağlı olarak oluşturulan deneysel kanserleri önledikleri bildirilmiştir[6].

Hayvansal besinlerde bulunan retinol bağırsaklardan tamamiyle absorbe edilirken bitkisel besinler içinde bulunan karotenoidlerin yaklaşık 1/3'üne eşit bir miktarı absorbe edilmektedir. Besin içinde bulunan β -karoten'in kısmen absorbe

edilmesi ve vücutta kısmen retinole dönüşmesi nedeniyle vitamin olarak yararlanılmaktadır [7].

β -karoten barsak epitelinde A vitaminine dönüşmekte ve daha sonra karaciğerde öncelikle palmitat esteri olarak depolanmaktadır. Bu dönüşüm safhasında, bir β -karoten molekülü 15,15' bölgesinden, oksijenaz enzimi ile kesilerek, 2 retinal molekülüne ayrılmaktadır. Retinal'in retinole dönüşümü ise daha önce 1948'de Clover ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır (Şekil.1.1) [4].



Şekil.1.1. β -karoten'in vitamin A'ya dönüşümü (Tüzün, 1996)

Retinol ince bağırsak epitel hücrelerinde kolaylaştırılmış difüzyonla absorbe edilirken, bu olayda bir yağ asidi veya retinol bağlayan protein rol oynamaktadır. Karotenoidler ise basit difüzyonla absorbe edilmektedir. β -karoten ince bağırsak epitel hücrelerinde parçalanarak kısmen retinole dönüştürülmektedir. Yağlı besinlerin absorpsiyonunun bozulduğu hallerde A vitaminnin absorpsiyonu azalmaktadır. Karotenoidlerin yeteri derecede absorpsiyonu için diyetle yağ bulunması gerekmektedir. Yağca fakir diyetle beslenen kişilerde β -karoten absorpsiyonu azalmaktadır. Besinsel yağlar β -karoten absorpsiyonunu artırmaktadır [6].

Erişkinlerde ortalama günlük A vitamini rasyonu, uluslararası ünite ölçüsüyle 3350 ünedir. Dengeli bir diyet içinde alınan günlük A vitamin'in ağırlık üzerinden yaklaşık 1/3'ü retinol ve 2/3'ü β -karoten'den oluşmaktadır [6].

1.2. Karotenoidler

Bakteriler, funguslar, algler, bitkiler tarafından sentezlenen β -karoten, karotenoidlerin bir çeşidi olup çoğu canlı sistemlerde bulunmaktadır [9]. Karotenoidler doğada geniş yayılım alanı olan sarı, kırmızı ve turuncu renkli pigmentlerden oluşmaktadır [10]. Safran, kırmızı biber gibi bitki preparasyonlarında zengin karotenoid pigmentleri bulunmaktadır. Ticari olarak kullanılan saf karotenoidler genelde kimyasal yolla sentezlenmektedir. Astaksantin ve β -karoten özellikle endüstride önem taşımaktadır. Astaksantin; som balığı, istakoz ve bazı balık türlerinin renklerinin oluşmasından görev almaktadır [9].

Karotenoid pigmentlerinin kimyasal yapısına bakıldığında terpenoidler içinde yer almaktadır. Genellikle bitkilerde bulunmaktadır. Küçük moleküllü olanları, bitki yaprak, petal ve meyva kabuklarının seçkin kokularını oluşturmaktadır. Örneğin, mentol nane yapraklarında, geranyol gül petallerinde, sitronellol ise limon kabuğunda en çok bulunan ve onların bilinen kokularını oluşturan bileşiklerdir. Daha büyük moleküllü terpenlerden olan β -karoten, havuç ve yeşil yapraklarda bulunmaktadır [12].

Mass spektrometre, spektrofotometre ve HPLC gibi tekniklerle yeni karotenoid pigmentleri ve bunların kimyasal yapıları açıklanmıştır. Bugün 500'den daha fazla karotenoid molekülleri tanımlanmıştır [13].

Karotenoidler iki ana gruba ayrılmaktadır.

1) C-ihativa eden karotenoidler:

2) O-ihativa eden karotenoidler: Zeaksantin

C-ihativa eden karotenoidler üç gruba ayrılmaktadır;

1) Asiklik yapıli karotenoidler: Likopen

2) Monosiklik yapıli karotenoidler: λ -karoten, δ -karoten, γ -karoten

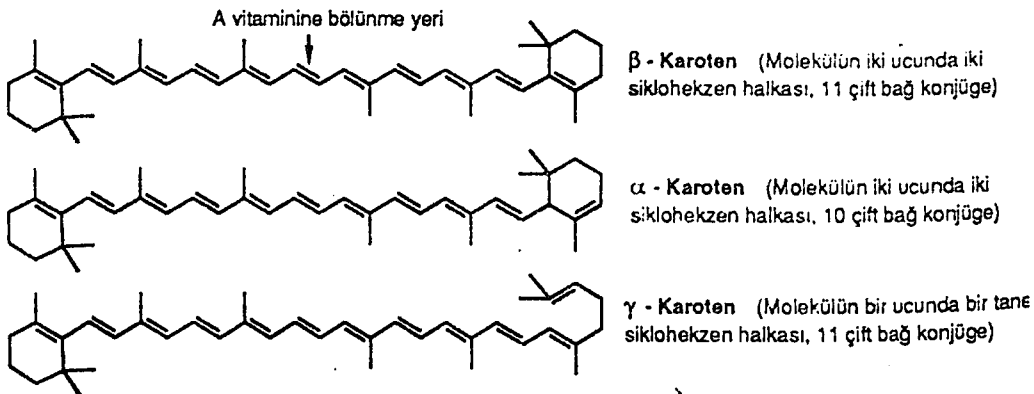
3) Bisiklik yapıli karotenoidler: α -karoten ve β -karoten

Karotenoidlerin temel asiklik yapıları; hidrojenasyon, dehidrojenasyon, siklizasyon ve oksidasyon reaksiyonlarına göre değişmektedir. 45 karbonlu, 50 karbonlu ve simetrik 30 karbonlu karotenoidlerde bu değişiklikler daha fazla oluşmaktadır [14].

40 karbon ve daha az sayıda karbon molekülüne sahip karotenoidlerin yapısı, daha uzun zincirli karotenoidlerin yapısından daha iyi bilinmektedir. 40 karbonlu önemli belli başlı karotenoid pigmentleri temelde asiklik veya siklik yapıdadır, bunlar da cis-trans konfügrasyon veya oksijenasyon (ksantofiller) şeklinde organize olmuşlardır. 200 kadar fungal türlerde karoten bulunduğu bildirilmiştir [13].

Genellikle karotenler havuç maddeleri olarak bilinmekte ve havuç'un portakal rengini oluşturmaktadır. β -karoten, α -karoten, γ -karoten olmak üzere üç türleri vardır. Şekil.1.2.'de gösterilmiştir. Bunlardan β -karoten hepsinin % 80 'nini oluşturmaktadır. β -karoten ve α -karoten moleküllerinin iki ucunda da altılı halka yapısı, γ -karoten'de ise sadece bir uçunda halka yapısı bulunmaktadır. Fotosentezin yardımcı pigmentlerindedir, fotosentez etkinliğini yeşil ışığa kadar genişletmektedir [11].

Karotenoidler yüksek bitkilerde fotosentez sırasında zararlı ışığa karşı fotokoruma aktivitesi de göstermektedir [14]. Özellikle β -karoten'in antioksidan özelliği de bulunmaktadır. Ayrıca toksik oksijen radikallerinden singlet oksijeni, inaktif O_2 'ne indirgemektedir [9]. Kanserle karşı koruma, immün cevabı artırma ve muhtemelen tümör gelişimini-inhibe özelliği de göstermektedir [16]. Bazı çalışmalarda bu gibi pigmentlerin taksonomik amaçlarla da kullanılabileceği bildirilmiştir [11].



Şekil.1.2. β -karoten, α -karoten ve γ -karoten'in kimyasal yapısı (Tüzün, 1996)

β -karoten molekülü genellikle büyük yapılı bir pigmenttir. Özellikle *Basidiomycetes* ve *Deutromycetes* grubu funguslarda bulunmaktadır. Çizelge 1.1'de çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan karotenoidler ve verimleri gösterilmektedir [13].

Çizelge.1.1. Çeşitli karotenoidleri üreten mikroorganizmalar ve gerekli koşullar (Ekmekeçi, 1987)

Karotenoidler	Üreten mikroorganizma	Ortamin İçeriği	Fermentasyon süresi (gün)	Verim (mgr/lt)
β -karoten	<i>Blakeslea trispora</i> karışık kültürleri	-	8	3000
Likopen	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> subsp. <i>rubescens</i>	Nişasta, soya unu (NH ₄) ₂ SO ₄ ,	6	500
	<i>Blakeslea trispora</i> karışık kültürleri	Pamuk tohumu unu, mısır unu, soya fasulyesi yağı, Triethylamin 48 saat sonra ilave edilir.	5	400
Zeaksanthin	<i>Flavobacterium</i> sp.	Glukoz, mısır ısıtma sıvısı, palmitatester, metionin, pyridoxin, Fe ⁺² tuzları	-	335
Çeşitli Karotenoidler	<i>Mycobacterium phlei</i>	Şeker pancarı melası, üre	7	300
	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Glukoz, maya ekstraktı	5	500
	Mayalar	Şeker, etanol veya parafin	-	5

Kimyasal yolla ve hipersaline mikroalglerden *Dunalinella salina* ve *Dunalinella bardawill*'in ekstraksiyonuyla her yıl 100 ton β -karoten üretilmektedir.

kullanılmaktadır. Farklı iki seksuel strainin karışık kültürüne β -ionin ve iproniazid gibi aktivatörler eklendiğinde β -karoten maksimum 3,2 gr/lt verim alındığı bildirilmiştir. *Blakeslea trispora* bütün yaşamını multinuklear olarak sürdürmektedir. Bu yüzden strainlerin geliştirilmesi çok zor olmaktadır [3].

Bugün genel eğilim kimyasal sentezleme yerine biyolojik sentezlenmenin desteklenmesi yönündedir. Endüstriyel proseslerle *Blakeslea trispora*'dan β -karoten üretimi için çeşitli besiortamları ve kültür şartları üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Mikrobiyolojik yolla β -karoten üretimi, kimyasal yolla β -karoten üretimine göre daha zor olması nedeniyle ekonomik rekabeti sınırlı olmaktadır [9].

1.3. β -Karoten'in Biyosentezi

β -karoten'in biyosentez yolu Porter ve Anderson (1962) tarafından ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra 1983'de de Goodwin tarafından doğrulanmıştır. [4].

Bütün karotenoidler diğer lipidler gibi Asetil-CoA'dan sentezlenmektedir. 2 Asetil-CoA molekülünün kondensasyonu ile asetoasetil-CoA meydana gelmektedir. Asetoasetil-CoA elektrofil ve nukleofil vererek β -metil- β -hidroksiglutaril-CoA oluşmaktadır. Bunun enzimatik indirgenmesiyle de mevalonik asit meydana gelmektedir [11].

Benzer karotenoidler mevalonik asit'in baş ve kuyruklarındaki iki izopren izomerlerinin yoğunlaşmasıyla sentezlenmektedir. Mevalonik asit kinaz enzimleriyle fosfatlanıp eliminasyonu sonunda izopentenilpirofosfat ve bunun izomerinden dimetilallilpirofosfat meydana gelmektedir. İzopentenilpirofosfat dimetilallilpirofosfat'a pirofosfat ayrılarak bağlanmakta ve geranilpirofosfat meydana gelmektedir. Aynı şekilde geranilpirofosfattan, farnezilpirofosfat ve geranilgeranilpirofosfat oluşmaktadır. İki molekül karbon 20 karotenoid'i geranilgeranilpirofosfat'ın kuyruk kuyruğa bağlanmalarıyla prefitonpirofosfata, prefitonpirofosfat da fiton'a dönüşmektedir [13].

Porter Lincoln'e göre fiton birbirini izleyen dört dehidrogenasyon basamaklarıyla likopen'i vermektedir. Fiton fungide genellikle 15-cis konfigrasyonunda bulunmaktadır. Fitofluen muhtemelen izomerizasyon reaksiyonlarının trans

konfigrasyonundan meydana gelmekte ve trans karotenoidlerden 7,8,11,12-tetrahidrolükopen'i ve ζ -karoten'i oluşmaktadır [13].

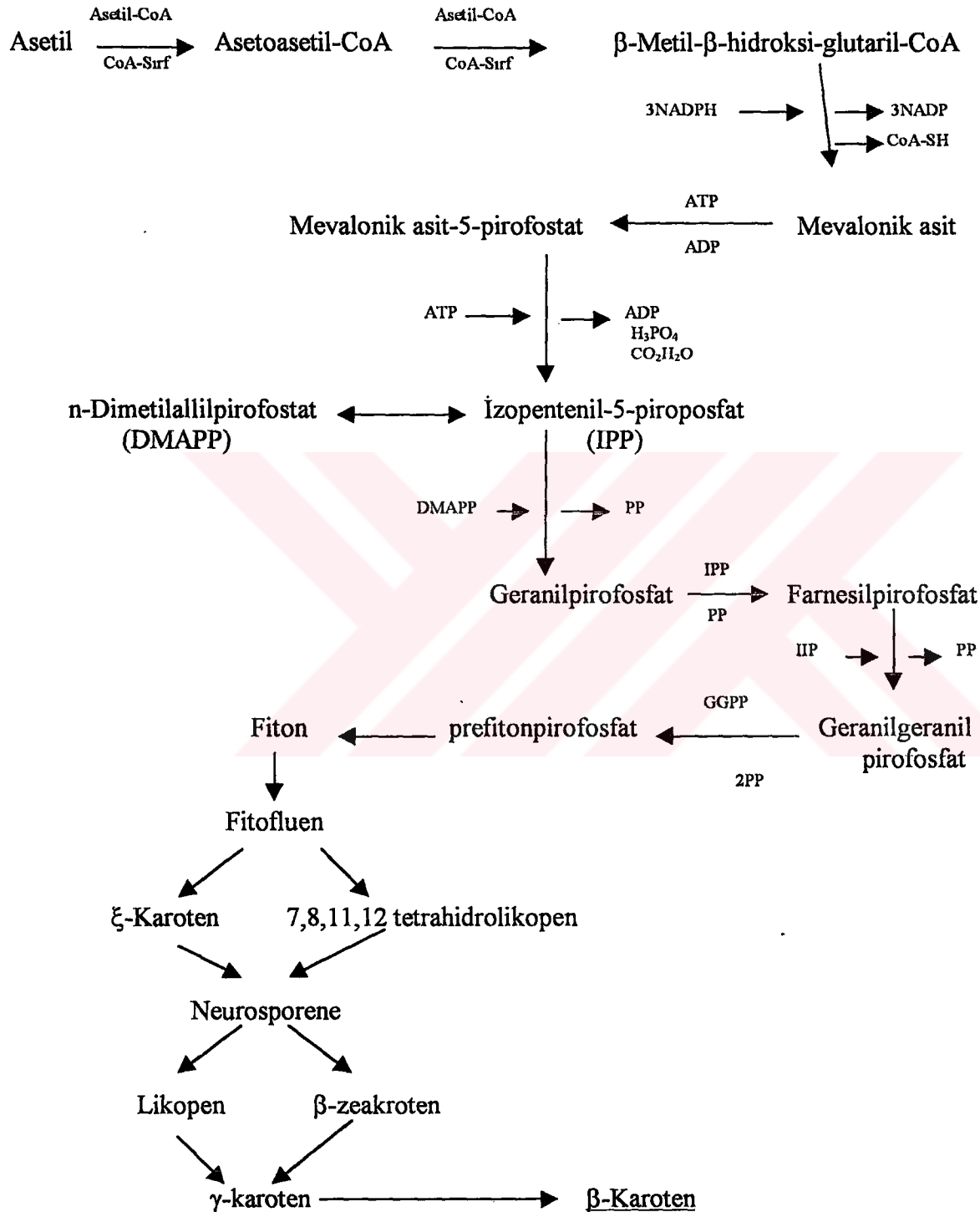
Siklizasyon reaksiyonlarıyla β -zincirlerinden doymamış asiklik karotenoidler oluşmaktadır. Neurosporene molekülünden asiklik likopen ve siklik β -zeakaroten oluşmaktadır. Bu yolların her ikisinde çoğu fungusda çalışmaktadır. Daha sonra da γ -karoten'den β -karoten oluşmaktadır (Şekil.1.4.) [13].

Bu reaksiyonda yer alan dehidrojenasyon ve siklizasyon enzimleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Fakat bazı funguslardan elde edilen serbest hücre ekstraktlarından biyosentez sırasında belli reaksiyonlarda görev alan enzimler açıklanmıştır [13].

1.4. β -Karoten Miktarını Artırmasını Sağlayan Faktörler

Son yıllarda biyoteknoloji'de yapılan araştırmalarla bazı kimyasal bileşiklerin karotenoid üretimini artırıcı etkiye sahip olduğu ve son ürünün yapısına katılmadığı ortaya çıkmıştır [13]. Karotenoid oluşturan funguslarda β -ionin'nin karotenoid oluşumuna pozitif etki yaptığı [13] ve biyosentez sırasında gerekli enzimleri aktive ettiği bildirilmiştir [4]. Yine, Ciegler (1965) *Blakeslea trispora*'da karotenoid biyosentezine β -ionin'nin etkisini göstermiştir. Lee ve arkadaşları benzer etkiyi *Phycomyces blakesleeanus*'da göstermiştir [17].

Yapısal olarak β -ionin molekülü β -karoten'e benzer, fakat β -ionin molekülü ürüne bağlanmaz. Enzim aktivitesini düzenleyerek 5-fosfomevalonat'ı dimetilalilpirofosfat'a dönüştürmektedir. β -ionin ve trisporik asitin, β -karoten biyosentezinde genlerin hassas bölgelerinde birbirleriyle rekabet ettiği bildirilmiştir. *Blakeslea trispora*'da β -ioninle birlikte dimetilformid, suksimid veya isonikotilhidrazin gibi bazı kimyasal bileşiklerinde β -karoten üretimini 2-3 kat arttırdığı bildirilmiştir (çizelge 1.2.) [13].



Şekil.1.3. β -Karoten biyosentez yolu (Margalith, 1992)

β -ionin'e eş değerde 2,6,6-trimetil-1-asetil-sikloheksan bileşiği'de aktivatör olarak kullanılmaktadır. Bunlara ilave olarak uygun etkiye sahip suksinamid, izoniazid ve iproniazid de benzer etki göstermektedir [4].

Ninet ve arkadaşları 1969'da yaptıkları araştırmalarda izonikotilhidrazin'in çeşitli türevlerinin karotenoid fraksiyonundaki bileşimi ve ürün üzerine etkisini göstermişler ve funguslarda karotenoid oluşumunu artırıcı çalışmalarla ilgili yayınlar yapmışlardır [17].

Çizelge.1.2. β -karoten üretiminde β -ionin'in verime etkisi (Pekin, 1983)

Fermentasyon Ortamına Katılan β -ioninin ($\mu\text{gr}/100 \text{ ml}$)	Oluşan β -Karoten ($\mu\text{gr}/100 \text{ ml}$)
0	10000
9,4	10050
94	11025
940	19750
9400	29400
94000	36820

Bazı bileşikler karoten biyosentezi'nin çeşitli basamaklarında yer alan siklizasyon ve dehidrogenasyon reaksiyonlarına spesifik inhibitör etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin difenilamin (DPA), dehidrogenasyon basamağını inhibe edip ortamda doymuş fiton'un birikmesini sağladığı saptanmıştır. Bu durum ise β -karoten (son ürün) sentezinde rol oynadığını ve karotenoidlerin total miktarının artmasına neden olduğu bildirilmiştir [17].

Fermentasyon ortamında yüksek konsantrasyonda bulunan karbonhidrat, lipid ve proteinler yüksek viskoziteye sahip olduğu zaman β -karoten miktarının arttığı bulunmuştur [4].

Distilasyon atığı yüksek fosfor içermesi nedeniyle avantajlı olacağı Dholakio ve Modi (1984) 'nin çalışmalarıyla gösterilmiştir. Karotenoidlerin oluşumu için fosfor'un önemli olduğu vurgulanmıştır [4].

Fermentasyon ortamına karosen'nin katılmasıyla β -karoten oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Karosen funguslardaki özel lipit metabolizmasının ilerlemesini ve lipit substratlarının eriyebilirliğini kolaylaştırmaktadır. β -karoten çok çabuk oksitlenen bir bileşik olduğu için, oluşan β -karoten'in oksidasyonunun önlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle ortama Ethoksikuin (2,2,4-trimetil-6-ethoksil-1, 2-dihidrokuinolin) veya santokuin gibi antioksidanların ilave edilmesi β -karoten verimini artırdığı belirtilmiştir. [4].

Fermentasyon ortamına iyonik olmayan deterjanların, bitkisel yağların ve yağ asitlerinin katılması β -karoten verimini artırdığı bildirilmiştir [18]. Ciegler ve arkadaşları α -ionin ve δ -metilionin ile bunların karışımlarının da verimi artırdığını gözlemişlerdir. Bitkisel yağlar, antioksidanlar (2,6-dietersiyer butil-4-metilfenol gibi), terpenoidler, izonikotinolhidrazin ve karosen gibi bazı hidrokarbonların da verimi artıran maddeler arasında olduğu bildirilmiştir [18].

Çizelge.1.3. Besi ortamına katılan bitkisel yağların β -karoten verimine etkisi (Pekin, 1983)

Katılan bitkisel yağ	Oluşan β -Karoten ($\mu\text{gr}/100 \text{ ml}$)
Kontrol	155
Soya Yağı	31350
Pamuk Yağı	33800

Karotenoidlerin oluşumunda ışığın β -karoten üretimini artırıcı etki yaptığı ve ışıklı ortamda büyüyen *P.blakesleeanus* fungusunun misellerinin karanlık ortamdakinden daha sarı renkli olduğu görülmüştür. Işıklı ortamda miselledeki β -karoten miktarının arttığı bulunmuştur. Işık; karışık kültür, trisporik asit, besin içeriği gibi faktörlere göre karotenoid oluşumunda daha etkili olduğu saptanmıştır [13]. 13 tane fungal türde ışığın uyarıcı etkisi tanımlanmıştır. Işık karotenoid sentezinde operonu

etkilememektedir. Fakat bazen ışıklı ortamlardaki kültürlerde karotenoid birikiminin azaldığı gözlenmiştir. Karotenoidlerin ışık tarafından yıkımı daha aydınlatılamamıştır [13].

Günümüzde yeni bileşiklerin karotenoid fermentasyonunu artırıcı ve ürünü yönlendirmedeki etkileri araştırılmaktadır. Bunun yanında aromatik bileşikleri büyüme ortamına eklenerek β -karoten oluşumu üzerine etkileri de incelenmektedir [17].

Bu konuyla ilgili mevcut literatürlerde bilgiler yeterli değildir. *P.blakesleeanus* suşunda karotenoid oluşumuyla ilgili genetik araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda karotenoid sentezinin genetik kontrol mekanizması açığa çıkarılmaya çalışılmaktadır.

1.5. β -karoten Oluşturan Mikroorganizmalar

Yapısında β -karoten oluşturan bir çok alg, ipliksi fungus ve maya bulunmaktadır. Karotenoidlerin çoğu bitki ve hayvanların yapılarında bulunsa da sadece mikroorganizma ve bitkilerin sahip olduğu enzimlerle sentezlenmektedir. Karotenoid oluşturan fungusların büyümesi ve gelişmesi üzerinde bir çok araştırma yapılmıştır [16].

Bunlar üzerinde en çok çalışılan *P.blakesleeanus* (*Mucoraceae*) ve *Blakeslea trispora* (*Choanopheraceae*) funguslarıdır. Bunların çeşitli substratlarda β -karoten oluşturduğu gösterilmiştir [13].

Diğer fungal türlerden *Mucor mucedo*, *Ustilago violaceae*, *Neurospora crassa* *Fusarium aquaeductum*, *Penicillum sclerotium* özellikle *Mucorales* ordosundan *Choanopheraceae* familyasındaki *Choanophora cucurbitarum*'da ve mayalardan *Rhodotorula*'da karotenoid oluşumu görülmektedir. Fakat bunlar düşük verimleri nedeniyle endüstriyel kullanım için uygun değildir. Bununla beraber son yıllarda genetik manipülasyon tekniği ile yüksek verim gösteren *P.blakesleeanus*'un strainleri üretilmiştir. (25 mgr. β -karoten/gr. kuru hücre) [4].

1955 yıllarında dikkatler *P.blakesleeanus*'a benzer bir mikroorganizma olan *Blakeslea trispora* üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu fungusun iki seksüel formu (+) ve (-)

strainler eşit miktarlarda aynı kültür içinde geliştirilmiş ve β -karoten üretiminde göze çarpar bir artışın olduğunu görülmüştür [4].

Açık sarı renkli β -karoten üreten *P.blakesleeanus*; *Mucorales* ordosunda *zycomycetes* sınıfında heterotallik bir fungustur [19]. Yine *Blakesleeanus trispora*'da heterotallik karotenojenik bir fungusdur [20].

Phycomyces türlerinde sporangioforlar karakteristiktir ve kolayca tanımlanmaktadır. Sporangioforlar uzun, dik, metalik parlak renkte ve oksitlenmiş çelik teli gibi görünmektedir. *P.nitens*'in sporangioforları 20 cm'den daha uzundur, yaşlı misellerde sporangia siyah renkli görünmekte ve çapı 500 μ m'dur. Sporları ortalama 25x11 μ m ve elipsoidir. Toprakta, gübre yığınlarında ve yağ varillerinde gelişmektedir. *P.blakesleeanus*, *P.nitens*'den farklı olarak sporangia daha büyüktür. Sporangia çapı 1000 μ m'dan uzundur. Sporları daha küçük 12x8 μ m'dir. Wort agarda ve bitki özütünden yapılmış bazı besiyerlerinde iyi gelişmektedir. Sentetik besiyerlerinde gelişmemekte ve gelişmesi için tiamine ihtiyaç duymaktadır. Sporangioforları fototropiktir [21].

Phycomyces sp. sporları uygun çevre koşullarında çimlenmekte ve hifler birleşerek miselleri oluşturmaktadır. Eğer yaşam döngüsünde biyokimyasal ve morfolojik olarak kompleks karşıt hifler bir araya gelip birleşirse bu bölgede zigosporlar oluşturmaktadır (Şekil 1.4). Uzun dormansi döneminden sonra zigosporlar çimlenmekte, spor yeniden sporangium formuna geçmekte ve vejetatif döngü yeniden tekrarlanmaktadır [13].

Karşıt hifler birleşmeden önce prohormon denilen maddeleri üretmektedir. (+)prohormon ve (-)prohormon'un her biri diğerine doğru büyümeyi stimüle etmekte ve hifler eriyerek zigosporları oluşturmaktadır. Bu prohormonların zigosporların büyümesinde ve yönlendirilmesinde kemotropik bir etkisi vardır. Her bir hifin birleşmesi, zigospor gelişimi ve morfogenetik olayların hormonların kontrolünün altında gerçekleştiği belirtilmektedir (şekil 1.5.) [13].

(+) Miselin ürettiği, (+) prohormon ve (-) miselin ürettiği (-) prohormon kimyasal olarak çok benzerdir, her biri uygun moleküllerin biyokimyasal olarak birleşmesi sonucu, son hormon olan trisporik asiti oluşturmaktadır [13].

Trisporik asit'in yapısına bakıldığında karotenoidlere benzer olduğu ve deneylerle trisporik asitten β -karoten üretildiği gösterilmiştir. Bu funguslar seksüel üremeleri sırasında trisporik asite ihtiyaç duyarlar ve daha sonra trisporik asit retinol yoluyla β -karoten'e transforme olmaktadır. Karotenoid oluşturmeyen mutant *P.blakesleeanus* funguslarında trisporik asit üretimi düşmektedir. Renksiz albino mutantlarında ise seksüel üreme azalmaktadır. (+) ve (-) strainlerin karışık kültürlerinde β -karoten konsantrasyonu tekli kültürlerden çok daha yüksektir. Karışık olmayan kültürlerle trisporik asit'in eklenmesiyle de benzer sonuçlar alınmıştır. β -karoten'in biyosentezinde trisporik asit oluşumu stimülandır ve onun prekürsürüdür [13].



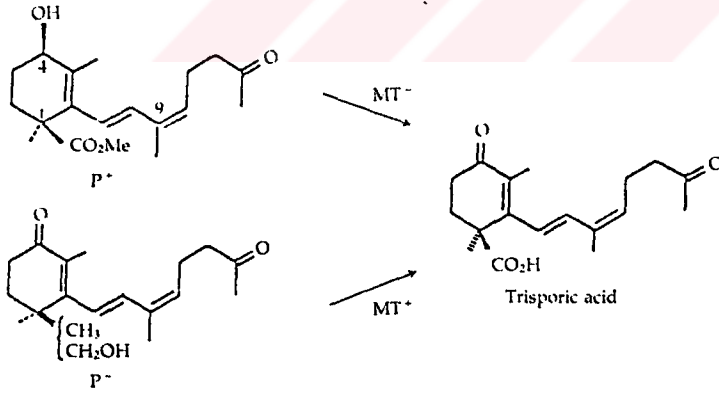
Şekil.1.4. *Phycomyces blakesleeanus*'da zygospore oluşumu (Margalith, 1992)

Karotenoidlerin Mucorales'in seksüel sporlarının oluşmasında önemli rolü bulunmaktadır. Ayrıca diğer funguslarda ve *P.blakesleeanus*'ta fototropik cevabın oluşmasında karotenoidlerin rolünün olduğu bildirilmiştir [13].

Mucoral *P.blakesleeanus*'un misellerinde belli şartlar altında %41 oranında yağ bulunmaktadır (Kuru ağırlığı'nın). *P.blakesleeanus*'un hafif alkali ve nötr besiyerinde şekerleri lipide dönüştürme oranı çok yüksektir. Laboratuvarda asidik ortamlarda (pH:

4,5) yağ konsantrasyonu azalmaktadır. Yağ üretimi için optimum sıcaklık 25⁰C'dir. Uygun şartlarda glukoz'un % 12'sinden daha fazlası lipid üretiminde kullanılmaktadır. Glukozdaki karbon atomlarının % 20'si yağlara bağlanmaktadır [9].

Yağ içeriğinin % 80'nini yağ asitleri oluşturmaktadır. Serbest veya diğer bileşiklerle birlikte bulunmaktadır. Yağ asidi bileşimi; bağlı yağ asitlerinin serbest yağ asitlerine oranına, yaşa ve dış koşullara bağlı olarak değişmektedir. *Phycomyces*'te oleik asit, palmitik asit, Linoleik asit ve stearik asit bol miktarda bulunmaktadır. Farklı sınıflardaki lipid ve çeşitli yağ asitlerinin misel ve sporangioforlarda görevleri benzerdir. γ -linoleik asit *Phycomyces*'in yağ asitlerinden biridir. γ -linoleik asit *Phycomyces*'in sporlarında bol miktarda bulunmaktadır. *Phycomyces*'deki uzun yağ asitleri özellikle eski kültürlerde bulunmakta ve sporangioforların vaks kütikulasını oluşturmaktadır. Ergosterol, episterol ve kolesterolde belli miktarda bulunmaktadır. Skualen, lanosterol ve episterol ergosterol'den sentezlenmektedir. Trigliseridler besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Besin yetersizliğinde misellerdeki konsantrasyonu hızla azalmaktadır [9].



Şekil.1.5. Prohormonlardan trisporik asit'in oluşumu (Margalith, 1992)

Alglerden de bazı karotenoidler izole edilmiştir. Alglerdeki karotenoidlerin çok azı hariç genelde karbon 40 tipindedir. Yüksek bitkilerde bulunan karotenoidler ve ksantofillerin (β -karoten, lutein, epoksi karotenoidler) çoğu yeşil alglerde de bulunmaktadır. Son yıllarda yeşil alglerdeki karotenoid pigmentlerinin biyosentez

reaksiyonları ve pigmentlerin oluşum yerleri araştırılmaktadır. Biyosentezin ileri ki basamaklarında yer alan enzimler (dehidrogenaz, cis-trans izomeraz ve siklaz) muhtemelen sitoplazmik membranda lokalize olmuşlardır [13].

Genellikle karotenoidler kloroplast pigmentleri arasında bulunmaktadır. Ekstraplastik karotenoidler nitrojen eksikliği gibi uygun olmayan koşullardaki bazı alg kültürlerinde, β -karoten, keto kökenli ekhinon veya ksantofil gibi karotenoidlerin çok miktarda biriktiği ve alglerin kırmızı ve turuncu renkli görünmesine neden olduğu bildirilmiştir. Halotolerant *Dunaliella bardawill* yüksek ışııkta ve yüksek tuz konsantrasyonunda veya sınırlı nitrojen altındaki büyümesinde (kuru ağırlığının % 10'un üstünde) çok miktarda β -karoten biriktirdiği bildirilmiştir [13].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

- <i>Pycomyces blakesleeanus</i>	NRRL 1465
- <i>Pycomyces nitens</i>	NRRL 2445
- <i>Blakeslea trispora</i>	NRRL 2456
- <i>Mucor mucedo</i>	NRRL 3654

United States of Agriculture Agricultural Research Service Area National Center For Midwest Agriculture Utilization Researchv 1815 North University Street Peoria İllinois 61604 USA'dan temin edilmiştir. Mikroorganizma kültürleri kullanılıncaya kadar + 4°C'de saklanmıştır.

2.1.2. Fermentasyon Ortamı

Bu çalışmada fermentasyon ortamı olarak ön işlemlerden geçirilmiş melas, şlempe ve peynir altı suyu kullanılmıştır. Ayrıca fermentasyon ortamlarına % 2 oranında ayçiçek yağı ve soya yağı ilave edilmiştir. Bunun yanında suşlar bir gün karanlık, dört gün ışıklı ortamda fermentasyona bırakılarak oluşan β-karoten miktarları araştırılmıştır [22].

Kullanılan melas ve şlempe şeker sanayinin bir yan ürünü olup Eskişehir şeker fabrikasından, peyniraltı suyu süt sanayinin bir atığı olup Eskişehir'deki çeşitli mandıralardan, ayçiçek yağı Eskişehir Ravin Fabrikasından, soya yağı rafinerize olarak marketten alınmıştır. Işık kaynağı olarak 200W'lık ampul kullanılmıştır.

Melas ve şlempe içerdiği bazı koloidal bileşik ve ağır metalleri (Cu, Fe, Pb, vb) uzaklaştırmak amacıyla bir ön işlemde geçirilmiştir [4].

Bunun için; 170 gr melas 300 ml distile su içinde karıştırılarak çözüldürüldükten sonra üzerine 50 ml distile suda çözünen 0,30 gr potasyum trisiyanat çözeltisi konmuştur. Tüm çözelti distile suyla 500 ml'ye tamamlanmış ve 5 gr diotome toprağı ilave edilerek iyice karıştırmıştır. Bir gece + 4⁰C'de bekletilen melas çözeltisi, bu süre sonunda 0,2'lik selüloz nitrat filtre kağıdından vakum yardımıyla süzölmüştür. Böylece istenmeyen bazı bileşiklerden arındırılmış ve berraklaşmış bir melas çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen bu melas çözeltisinin toplam şeker içeriğı yaklaşık % 51 civarında olduğundan, Melas fermentasyon ortamı olarak hazırlanırken distile su ile %5'e seyreltilmiştir. Aynı işlemler şlempe içinde yapılmıştır [4].

Peynir altı suyu, içerdiği proteinlerden arındırılmak amacı ile bir ön işlemde geçirilmiştir. Bunun için; peynir altı suyu 1,1 atmosfer basınç altında 121⁰C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmış ve daha sonra 5 gr diotome toprağı ilave edilip iyice çalkalanmıştır. Bir gece + 4⁰C'de bekletildikten sonra ertesi gün 0,2'lik selüloz nitrat filtre kağıdından vakum altında süzölerek berraklaşmış bir peynir altı suyu çözeltisi elde edilmiştir [4].

Fermentasyon ortamına % 2 oranında katılan ayçiçek yağı ve soya yağı her hangi bir ön işlemde geçirilmemiştir.

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

2.1.3.1. Patates Dekstroz Agar (Merck)

Patates infüsyonu	4 gr/lt
D(+) glukoz	20 gr/lt
Agar-agar	15 gr/lt

Patates Dekstroz Agar litrede 39 gr/lt olacak şekilde distile suda eritilerek otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.3.2. Wort Agar (Oxoid)

Malt Ekstract	15 gr/lt
Pepton	0,78 gr/lt
Maltoz	12,75 gr/lt
Dektrin	2,75 gr/lt
Gliserol	2,35 gr/lt
KH ₂ PO ₄	1 gr/lt
NH ₄ Cl	1 gr/lt
Agar	15 gr/lt

Wort agar litrede 50 gr/lt olacak şekilde distile suda eritilerek otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.3.3. YPK Broht

Bakto-pepton	5 gr/lt
Yeast extract	2 gr/lt
Glukoz	20 gr/lt
KH ₂ PO ₄	5 gr/lt
Tiamin HCL	1 mg/lt

YPK Broht distile suda eritilerek, pH 1N NaOH ile 5,5 'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 ⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Besiyeri otoklavlandıktan sonra glukoz 0,2'lik disposable filtre ile steril edilip besiyerine eklenip, karıştırıldıktan sonra kullanılmıştır [16].

2.1.3.4. Malt Ekstrakt Broht (Fluka)

Malt ekstrakt	17 gr/lt
Mikolojik pepton	3 gr/lt

Malt ekstrakt broht litrede 20 gr/lt olacak şekilde distile suda eritilerek, pH 1N NaOH ile 5,5'e ayarlanmıştır. Daha sonra otoklavda 121°C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.3.5. Melas Ortamı

% 5 oranında seyreltilmiş melas ortamına katılan;

NH ₄ NO ₃	1,5 gr/lt
KH ₂ PO ₄	1 gr/lt
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 gr/lt
Tiamin HCl	1 mg/lt

maddeleri distile suda çözülerek pH 1N NaOH ile 5,5'e ayarlandıktan sonra, otoklavda 121°C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır [4].

2.1.3.6. Şlempe Ortamı

% 5 oranında şlempe ortamına katılan;

NH ₄ NO ₃	1,5 gr/lt
KH ₂ PO ₄	1 gr/lt
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 gr/lt
Tiamin HCl	1 mg/lt

maddeler distile suda çözülerek pH 1N NaOH ile 5,5'e ayarlandıktan sonra, otoklavda 121°C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır [4].

2.1.3.7. Peynir altı suyu Ortamı

Ön işlemlerden geçirilmiş peynir altı suyuna katılan;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,5 gr/lt
KH_2PO_4	1 gr/lt

maddeleri distile suda eritilerek 1N NaOH ile pH 5,5 'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edildikten sonra kullanılmıştır [4].

2.1.3.8. Kullanılan Çözgenler

Fermentasyon sonrası ortamdan alınan misellerin ekstraksiyonu için % 99,8 'lik Metanol ve % 99'luk n-Hekzan kullanılmıştır.

2.1.3.9. Fermentasyon Ortamına Katılan Maddeler

Uygun şekilde hazırlanan fermentasyon ortamlarına % 2 oranında Ayçiçek yağı ve soya yağı katılmıştır.

2.2. METOD

2.2.1. Mikroorganizmaların oğaltılması

Fermentasyon denemelerinde, *P.blakesleeanus*, *B.trispora*, *P.nitens*, *M.mucedo* liyofilize kùltürleri kullanılmıştır. Liyofilize kùltürleri canlandırmak için önce liyofilize tüpleri steril kabin içinde alkollü pamukla temizlendikten sonra steril pens yardımıyla tüplerin ağızları açılmış ve nutrient broht tüplerine aktarılmıştır. 2-3 gün 27°C'de inkübasyondan sonra aktif hale gelen mikroorganizmaların her birinden 2 şer tane olmak üzere içinde 15-20 ml Patates dekstroz agar bulunan petrilere ekilerek etüv'de 27°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gelişen funguslardan birer tanesi ileride kùltürleri yenilemek için + 4 °C'de saklanmıştır. Fermentasyonda denemelerinde bir haftalık mikroorganizmalar kullanılmıştır.

2.2.2. Suşların Farklı Besiyerlerinde Değişik Sıcaklıklardaki Büyümesi

P.blakesleeanus, *B.trispora*, *P.nitens* ve *M.mucedo* suşları, patates dekstroz agar ve wort agar'da her birinden çift petri olmak üzere transfer iğnesi ile tek nokta ekimi yapılmıştır. 20°C, 27°C, ve 37°C'de 5 gün boyunca inkübe edilerek her gün suşların koloni çapları ölçülmüştür.

2.2.3. İnokulum'un Hazırlanması

Patates dekstroz agar'da gelişen suşlar (*P.blakesleeanus*, *B.trispora*, *P.nitens*, *M.mucedo*)'dan steril kokpor (mantar delici) yardımı ile alınan 9 mm çapındaki iki adet agar disk 250 ml'lik erlenlerde bulunan 50 ml'lik fermentasyon ortamlarına ayrı ayrı inoküle edilmiştir [4].

2.2.4. Fermentasyon

Fermentasyon için Orbital İncubator SI 50 çalkalamalı etüv kullanılmıştır. Fermentasyon ortamı olarak YPK buyyon, malt ekstrakt broht, ön işlemlerden geçirilmiş melas, şlempe ve peynir altı suyu uygun şekilde hazırlandıktan sonra 1N NaOH ile pH'sı 5,5'e ayarlanmış ve otoklavda 121⁰C'de 1,1 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile steril edilmiştir. 250 ml erlenler içine 50ml olarak hazırlanan fermentasyon ortamları çalkalamalı etüvde 27⁰C'de 150 (r.p.m) 3, 5 ve 8 gün fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon çift paralel olarak aynı koşullar altında bütün besiyerleri için ayrı ayrı tekrarlanmıştır [4].

2.2.5. Fermentasyon Sonrası Misellerin Alınması

Suşların 3, 5 ve 8 günlük fermentasyonları sonunda oluşturdukları miseller fermentasyon ortamından kurutma kağıdı yardımıyla filtre edilerek ayrılmıştır. Ayrılan miseller bire bir oranında Hekzan-metanol (1:1) karışımı bulunan erlenlere konulmuş ve çalkalamalı etüvde 55⁰C'de 2 saat çalkalanmıştır. Miseller kurutma kağıdı yardımıyla filtre edilerek ortamdaki ayrılmıştır. Geriye kalan organik çözücü 446 nm, 455 nm, 483nm 'deki absorbanları spektrofotometre (UV-2101 PC UV-VİS Scannig Shimadzu) de ölçülmüştür [17].

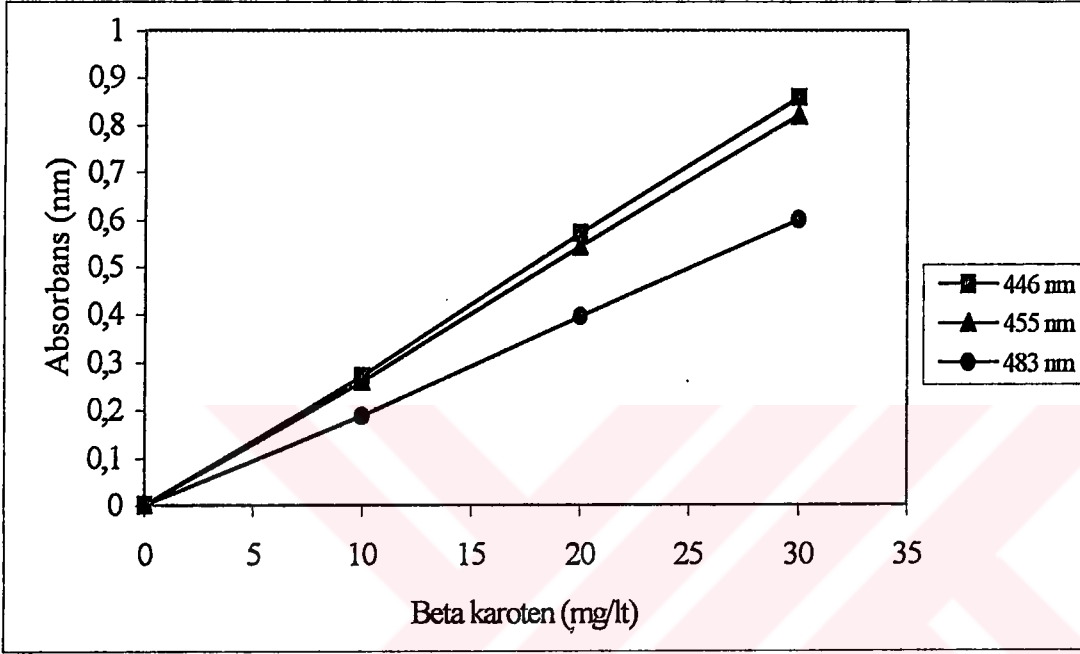
2.2.6. Misellerin Kuru Ağırlık Miktarının Saptanması

Miseller hekzan-metanol (1:1) karışımından huni yardımıyla kurutma kağıdından filtre edilerek ortamdaki ayrılmıştır. misellerin kuru ağırlıklarını bulmak için 70⁰C'de 3 gün bekletilmiş ve misellerin kuru ağırlık miktarları saptanmıştır [4].

2.2.7. Standart β -karoten Eğrisinin Çizilmesi

β -karoten (β -karoten C₄₀H₅₆, Merck) belli bir hacimde metanol 10 ppm 20 ppm 30 ppm olarak çözeltileri hazırlanmıştır. Bu hazırlanan çözeltiler, UV-2101 PC UV-VİS

Scannig (Shimadzu) Spektrometre'de 446 nm, 455 nm, 483 nm dalga boylarında absorbansları okunmuştur. Üç dalga boyu için okunan absorbans değerlerine göre standart β -karoten eğrisi çizilmiştir (Şekil.5.1).



Şekil 2.1. Standart β -karoten Eğrisi

2.2.8. β -Karoten Miktarının Standart Eğri Üzerinden Saptanması

Fermentasyon sonunda elde edilen ürünün (β -karoten) spektrofotometre de 446 nm, 455 nm, 483 nm dalga boylarında okunan absorbansların değerleri, daha önce çizilen şekil.2.1'de gösterilen standart eğriye uygulanarak miktar tayini mikrogram cinsinden aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

Standart β -karoten grafiğinden okunan ppm değeri X çözgen hacmi (ml) = μ gr (mikrogram)/litre. Böylece mikrobiyolojik yolla elde edilen β -karoten miktarı saptanmıştır [4].

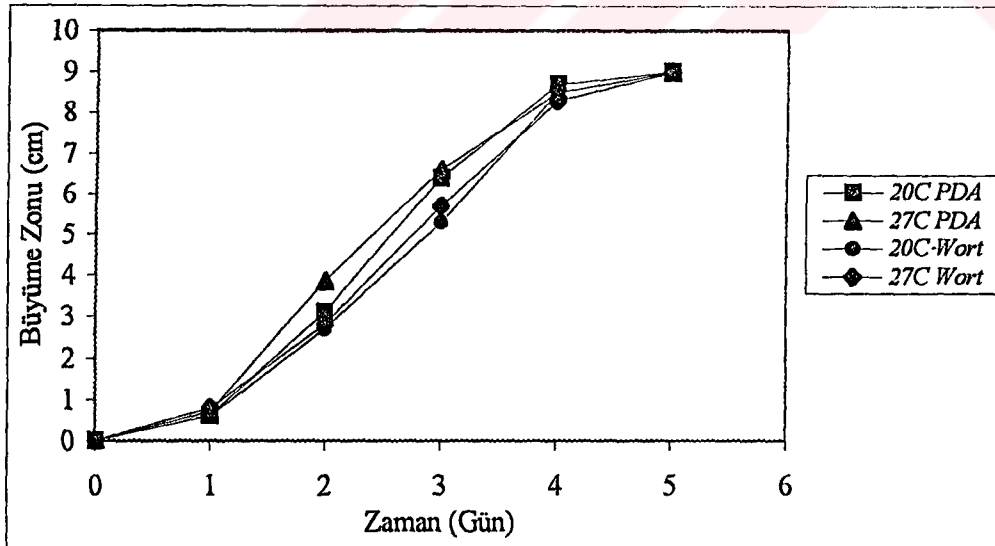
3. BULGULAR

3.1. Farklı Besiyerlerinde Değişik Sıcaklıklarda Suşların Büyümesi

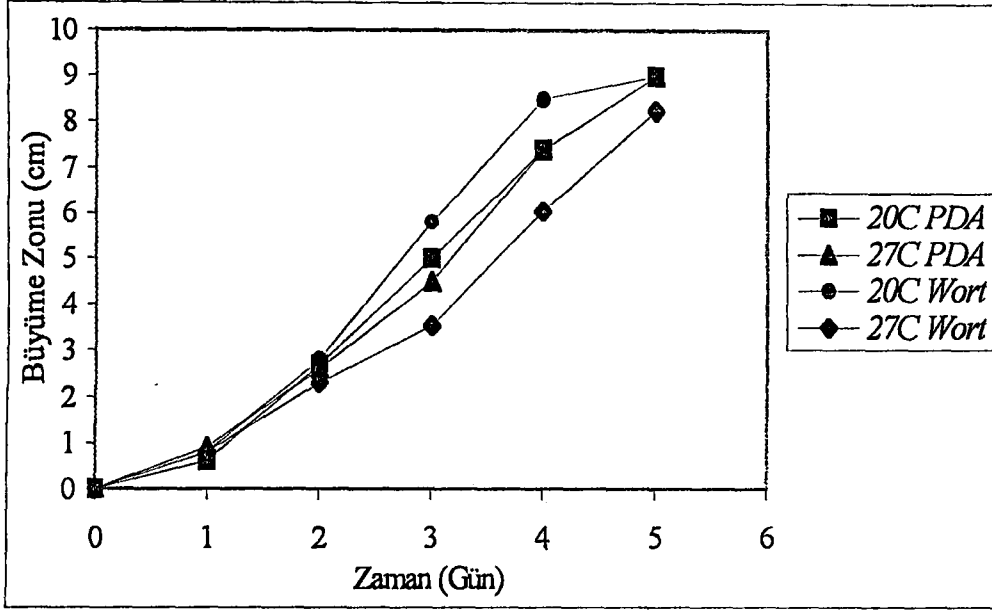
Patates dekstroz agar ve wort agar'da *P.blakesleeanus*, *B.trispora*, *P.nitens*, *M.mucedo*'nun 20°C, 27°C ve 37°C'de beş günlük inkübasyon süresi boyunca oluşturdukları koloni çapları ölçülerek şekil.3.1-3.8'de verilmiştir. Buna göre en iyi gelişmeyi *P.blakesleeanus* ve *M.mucedo* suşları 20°C'de Patates dekstroz agar'da, *B.trispora* ve *P.nitens* suşları 20°C'de wort agarda göstermişlerdir.

Dördüncü günde patates dekstroz agar'da oluşan koloni çapları 20°C'de *P.blakesleeanus*'ta 8,5 cm, *B.trispora*'da 7,4 cm, *P.nitens*'te 8,3 cm, *M.mucedo*'da 8 cm., 27°C'de ise *P.blakesleeanus*'ta 8,3 cm, *B.trispora*'da 7,4 cm, *P.nitens*'te 6,1 cm ve *M.mucedo*'da 7,4 cm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5.-3:8).

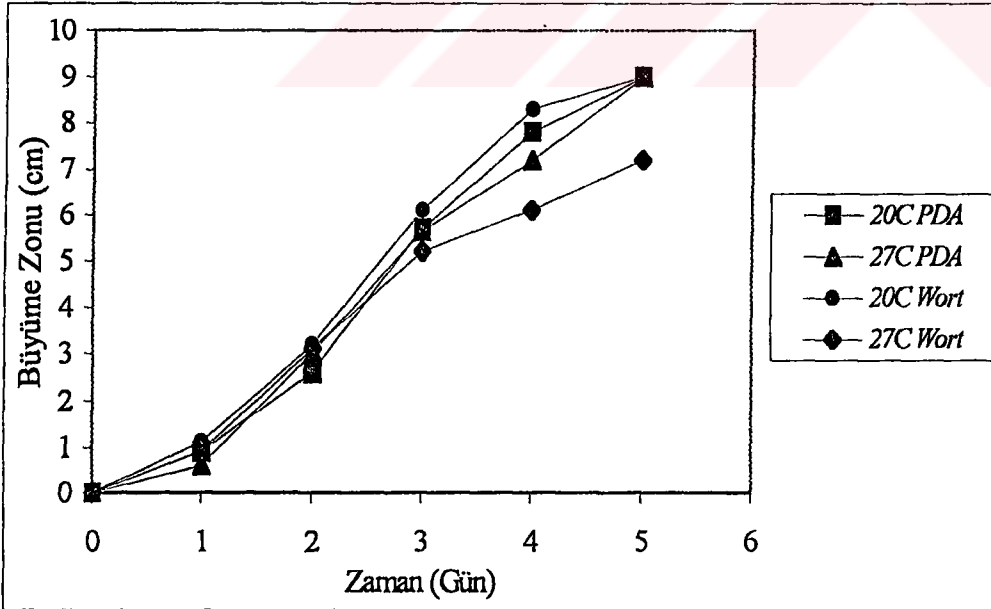
Wort agar'daki koloni çapları ise 20°C'de *P.blakesleeanus*'ta 8,7 cm, *B.trispora*'da 8,5 cm, *P.nitens*'te 7,8 cm, *M.mucedo*'da 6,5 cm. 27°C'de ise *P.blakesleeanus*'ta 8,5 cm, *B.trispora*'da 6 cm, *P.nitens*'ta 7,2 cm, *M.mucedo*'da 6,2 cm olarak belirlenmiştir. Patates dekstroz agar ve wort agarda 37°C'de test mikroorganizmalarının hiç biri gelişmemiştir.



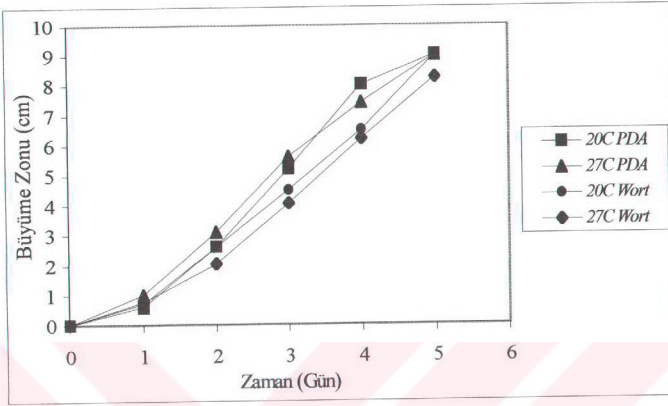
Şekil.3.1. *P.blakesleeanus* şuşunun 20°C ve 27°C Patates dekstroz agarda ve wort agardaki koloni çapları



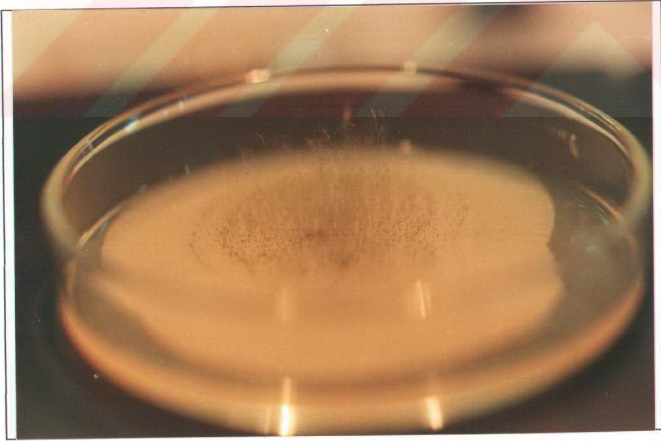
Şekil.3.2. *B. tripora* şuşunun 20⁰C ve 27⁰C'de Patates dekstrozo agarda ve wort agardaki koloni çapları



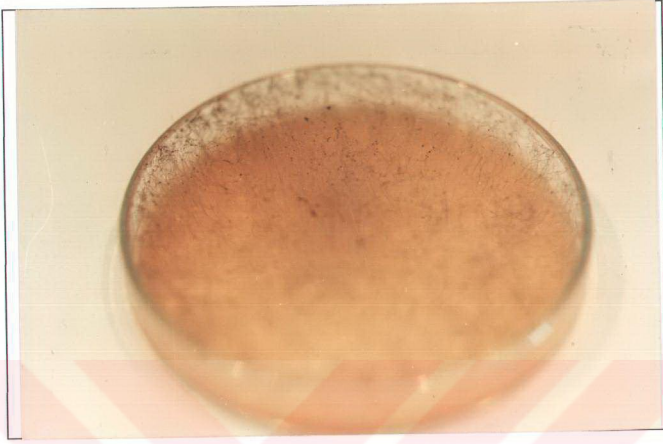
Şekil.3.3. *P. nitens* şuşunun 20⁰C ve 27⁰C Patates dekstrozo agarda ve wort agardaki koloni çapları



Şekil.3.4. *M.ucedo* şuşunun 20°C ve 27°C'de Patates dekstroz agar ve wort agardaki koloni çapları



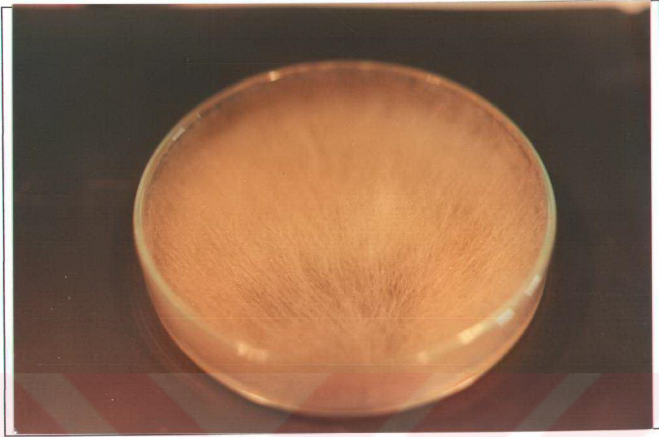
Şekil.3.5. *Phycomyces blakesleeanus* şuşunun genel görüntüsü



Şekil.3.6. *Blakeslea trispora* suşunun genel görüntüsü



Şekil.3.7. *Phycomyces nitens* suşunun genel görüntüsü



Şekil.3.7. *Mucor mucedo* suşunun genel görüntüsü

3.2. Fermentasyonla β -karoten Üretimi

3.2.1. Sentetik Besiyerlerinde β -karoten Üretimi

Fermentasyon ortamı olarak YPK buyyon ve malt ekstrakt buyyon kullanılarak yapılan denemelerde *P.blakesleeanus*, *B.trispora*, *P.nitens* ve *M.mucedo* suşları ile elde edilen β -karoten ve misellerin kuru ağırlık miktarları çizelge 3.1-3.6'da verilmiştir.

YPK buyyon'da üç günlük fermentasyon süresinde en yüksek β -karoten 4,8mg/lt ile *P.nitens*'de elde edilirken, en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,15 gr'la *P.nitens* ve *B.trispora*'da elde edilmiştir. En düşük kuru ağırlık ise 0,06 gr'la *M.mucedo*'da oluşmuştur. Beş günlük fermentasyon denemelerinde ise suşlarda hem kuru ağırlık miktarı hem de β -karoten miktarlarında artış olmuştur. Beşinci günde en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,21 gr'la *B.trispora*'da elde edilirken en yüksek β -karoten miktarı 12,1mg/lt ile *P.nitens* suşu kullanılan fermentasyondan elde edilmiştir. En düşük β -

karoten ve kuru ağırlık miktarı *M.mucedo*'da olmuştur. Sekiz günlük fermentasyonda ise β -karoten ve kuru madde miktarlarında bir düşüş görülmüştür. Sekizinci günde en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,11 gr'lae *P.nitens*'de elde edilirken en yüksek β -karoten miktarı 5,3 mg/lt ile *B.trispora*'da elde edilmiştir. En düşük β -karoten ve kuru ağırlık miktarı ise *P.blakesleeanus*'da oluşmuştur.

Fermentasyon ortamı olarak malt ekstrakt buyyon kullanıldığında üç günlük fermentasyonda en yüksek β -karoten miktarı 10,3 mg/lt ve kuru ağırlık miktarı 0,28 gr ile *P.blakesleeanus*'tan elde edilmiştir. Beş günlük fermentasyonda ise en yüksek β -karoten miktarı 27,9 mg/lt ve en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,40 gr'la *P.blakesleeanus*'tan elde edilmiştir. Sekiz günlük fermentasyonda ise en yüksek β -karoten miktarı 20,6 mg/lt ile *B.trispora*'da elde edilirken en yüksek kuru ağırlık miktarı ise 0,34 gr ile *P.blakesleeanus*'tan elde edilmiştir.

Malt ekstrakt buyyon kullanılarak yapılan denemelerde üç günlük fermentasyonda en düşük β -karoten miktarı ve kuru ağırlık miktarı *M.mucedo*'da görülürken beş günlük fermentasyonda en düşük β -karoten ve kuru madde miktarı *P.nitens*'de oluşmuştur. Sekiz günlük fermentasyonda ise β -karoten ve kuru ağırlık miktarlarında bir azalma görülürken, en düşük β -karoten kuru madde miktarı *M.mucedo* suşunda elde edilmiştir.

Malt ekstrakt buyyon'da elde edilen β -karoten ve kuru ağırlık miktarı YPK buyyon'a göre daha yüksek olmuştur. Malt ekstrakt buyyon'da en uygun fermentasyon süresi 5 gün olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Melas Ortamında β -karoten Üretimi

Melas şeker fabrikasının yan ürünü olup koyu kahve renkli bir bileşiktir. Türkiye'deki yıllık üretimi 380.000 tonu bulunmaktadır. Şeker sanayinin çalışmaları gözden geçirildiğinde bu miktarın ileri ki yıllarda daha da artacağı ortaya çıkmaktadır. Melas bileşim zenginliği yönünden, yurdumuzda bazı endüstriyel kollarında kullanım alanı bulmaktadır. Melas içerisinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan çeşitli bileşikler, koyu renkli azot içeren polimerik bileşikler,

inorganik iyonlar, malik, sitrik, laktik, formik, asetik, ve propiyonik asitler gibi organik asitler bulundurmaktadır [5]. Deneyleerde kullanılan melas'ın bazı kimyasal özellikleri çizelge.2.1'de verilmiştir.

Melas ortamında *P.blakesleamus*, *P.nitens*, *B.trispora* ve *M.mucedo* suşlarının oluşturdukları β -karoten ve kuru ağırlık miktarı çizelge 4.1-4.3'de verilmiştir.

Melas kullanılarak yapılan denemelerde üç günlük fermentasyonda en yüksek β -karoten miktarı 11,7 mg/lt ve en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,24 gr'la *B.trispora*'da elde edilmiştir. Beş günlük fermentasyonda ise en yüksek β -karoten miktarı 43,3 mg/lt ile *B.trispora*'da elde edilirken yine kuru ağırlık miktarı 0,25 gr'la *B.trispora*'da elde edilmiştir. Sekiz günlük fermentasyonda ise en yüksek β -karoten miktarı 28 mg/lt ile *B.trispora*'da elde edilmiştir. Sekiz günlük fermentasyonda elde edilen β -karoten miktarı ve kuru ağırlık miktarında bir azalma görülmüştür.

Melas ortamında üç ve beş günlük fermentasyonlarda en düşük β -karoten miktarı *M.mucedo*'da elde edilirken en düşük kuru ağırlık miktarı *P.blakesleamus*'ta oluşmuştur. Sekiz günlük fermentasyonda ise en düşük β -karoten miktarı *P.nitens*'te, en düşük kuru ağırlık miktarı 0,19 gr'la *B.trispora* ve *P.blakesleamus*'ta elde edilmiştir.

Melas için en uygun fermentasyon süresi *P.blakesleamus*, *P.nitens* ve *B.trispora* suşlarında 5 gün, *M.mucedo* suşları için ise 8 gün olarak belirlenmiştir.

3.2.3. Şlempe Ortamında β -Karoten Üretimi

Şlempe şeker fabrikasının yan ürünü olan melas'tan fermentasyon yoluyla alkol üreten fabrikalarda ortaya çıkan kötü kokulu, koyukahverengli sıvı bir atıktır. Üretilen bir litre alkol için yaklaşık oniki litre şlempe oluşurmaktadır. Eskişehir şeker fabrikasında ortaya çıkan şlempe yaklaşık 600-800 ton/gün'ü bulmaktadır. Şlempe toplam azot ve fosfor bakımından oldukça fakir, potasyum bakımından ise oldukça zengin bir bileşikten oluşmaktadır. Yoğun organik kirlilik yükü nedeniyle şlempe'nin doğrudan doğruya araziye veya alıcı su ortamına verilmesi sakıncalar doğurmaktadır. Şlempe'den endüstride genellikle , potasyum kaynağı, hayvan yemi ve sıvı gübre olarak

kullanılmaktadır. Deneyleerde kullanılan şlempe'nin bazı kimyasal özellikleri çizelge.2.1'de verilmiştir.

Fermentasyon ortamı olarak şlempe kullanılarak yapılan denemelerde *P.blakesleanus*, *P.nitens*, *B.trispora* ve *M.mucedo* suşlarının oluşturdukları β -karoten ve kuru ağırlık miktarı çizelge 5.1-5.3'de verilmiştir.

Fermentasyon ortamı olarak şlempe kullanıldığında üç günlük fermentasyonda en yüksek β -karoten miktarı 4,2 mg/lt ile *P.nitens*'de ve en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,12 gr'la *B.trispora*'da elde edilmiştir. Beş günlük fermentasyonlar da ise en yüksek β -karoten miktarı 11,2 mg/lt *B.trispora*'da elde edilirken en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,21 gr ile *M.mucedo*'da elde edilmiştir. Sekiz günlük fermentasyonda ise en yüksek β -karoten miktarı 4,7 mg/lt ile *B.trispora*'da en yüksek kuru ağırlık miktarı 0,18 gr'la *M.mucedo*'da olmuştur.

Şlempe ortamında üç günlük fermentasyonda en düşük β -karoten miktarı *M.mucedo* elde edilirken beş günlük fermentasyonda ise en düşük β -karoten miktarı *P.nitens*'te olmuştur. Üç ve beş günlük fermentasyonlarda ise en düşük kuru ağırlık miktarı *P.blakesleanus* elde edilirken sekiz günlük fermentasyon denemelerinde ise en düşük β -karoten miktarı *P.blakesleanus*'ta ve en düşük kuru ağırlık miktarında ise *B.trispora*'da elde edilmiştir. Şlempe kullanılarak yapılan fermentasyon deneylerinde en uygun fermentasyon süresi beş gün olmuştur.

3.2.4. Peynir altı suyu Ortamında β -karoten Üretimi

Peynir altı suyu süt sanayinin bir atık maddesi olup, peynir imalatı sırasında süttün peynir mayası yardımıyla kazein'in çöktürülmesinden sonra arta kalan yeşilimsi sarı renkte bir sıvıdır. Bileşim yönünden çok zengin olan bu madde, yurdumuzda her yıl yaklaşık 800.000 ton civarında oluşmakta ve hemen hemen hiç değerlendirilmemektedir [4]. Araştırmamızda kullanılan peynir altı suyunun bazı kimyasal özellikleri çizelge 2.1'de verilmiştir. Peynir altı suyu kullanılarak yapılan fermentasyonlarda *P.blakesleanus*, *P.nitens*, *B.trispora* ve *M.mucedo* suşlarının β -karoten ve kuru ağırlık miktarları çizelge.6.1- 6.3'de verilmiştir.

Peynir altı suyun'da üç günlük fermentasyon sonunda en yüksek β -karoten miktarı 5,8 mg/lt ile *P.blakesleeanus*'ta elde edilirken, yine en yüksek kuru ağırlık miktarıda 0,29 gr'la *P.blakesleeanus*'ta oluşmuştur. Beş günlük fermentasyonda ise en yüksek β -karoten miktarı 12,5 mg/lt ile *B.trispora*'da elde edilmiştir. En yüksek kuru ağırlık miktarı 0,35 gr'la *P.blakesleeanus*'ta oluşmuştur. Sekiz günlük fermentasyonda ise en yüksek β -karoten miktarı 5,6 mg/lt ile *P.nitens*'te en yüksek kuru ağırlık miktarı ise *P.blakesleeanus*'ta oluşmuştur.

Fermentasyon ortamı olarak peynir altı suyu kullanıldığında üç, beş ve sekiz günlük fermentasyonlarda en düşük β -karoten miktarı *M.mucedo* suşunda oluşmuştur. En düşük kuru ağırlık miktarı üç ve beş günlük fermentasyonlarda *P.nitens*'te sekizinci günde ise en düşük kuru ağırlık miktarı *M.mucedo*'da oluşmuştur.

YPK buyyon, malt ekstrakt buyyon, melas, şlempe ve peynir altı suyuyla yapılan fermentasyon sonunda *P.blakesleeanus*, *P.nitens* ve *B.trispora* suşlarında en yüksek β -karoten miktarı beş günlük fermentasyonlarda melas'ta elde edilmiştir. *M.mucedo*'da ise en yüksek β -karoten miktarı sekizinci günde melas'ta oluşmuştur. *P.blakesleeanus*, *B.trispora*, *M.mucedo* için en yüksek kuru ağırlık miktarı malt ekstrakt buyyon'da oluşmuştur. *P.nitens*'te ise en yüksek kuru ağırlık miktarı melas 'tan elde edilmiştir.

Çizelge 2.1. Melas, şlempe ve peynir altı suyu'nun kimyasal yapısı

Analizler	Melas	Peynir altı suyu	Şlempe
Kuru ağırlık	% 86	% 5	% 65,3
Şeker	% 51,9	% 1,2	% 3,4
Protein	% 11,2	% 2,7	% 27,1
Yağ	-	% 0,1	% 0,5'den az
Kül	% 4	% 2	% 5

Çizelge.3.1. YPK broht'ta suşların 3 günlük fermentasyonu sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,12	0,056	0,053	0,038	2,8
<i>P.nitens</i>	0,15	0,115	0,110	0,080	4,8
<i>B.trispora</i>	0,15	0,024	0,023	0,016	1,8
<i>M.muicedo</i>	0,06	0,069	0,066	0,048	3,3

Çizelge.3.2. YPK broht'ta suşların 5 günlük fermentasyonu sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,14	0,209	0,201	0,145	7,9
<i>P.nitens</i>	0,16	0,334	0,321	0,232	12,1
<i>B.trispora</i>	0,21	0,126	0,121	0,087	5,2
<i>M.muicedo</i>	0,11	0,056	0,053	0,038	2,8

Çizelge.3.3. YPK broht'ta suşların 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,08	0,077	0,074	0,053	3,5
<i>P.nitens</i>	0,11	0,077	0,074	0,053	3,5
<i>B.trispora</i>	0,10	0,131	0,126	0,091	5,3
<i>M.muicedo</i>	0,09	0,099	0,095	0,068	4,3

Çizelge.3.4. Malt ekstrakt broht'ta suşların 3 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeamus</i>	0,28	0,279	0,268	0,194	10,3
<i>P.nitens</i>	0,17	0,235	0,226	0,163	8,8
<i>B.trispora</i>	0,22	0,209	0,201	0,145	7,9
<i>M.mucoedo</i>	0,16	0,232	0,223	0,161	8,7

Çizelge.3.5. Malt ekstrakt broht'ta suşların 5 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeamus</i>	0,40	0,799	0,578	0,557	27,9
<i>P.nitens</i>	0,15	0,330	0,317	0,230	12
<i>B.trispora</i>	0,30	0,730	0,702	0,497	25
<i>M.mucoedo</i>	0,39	0,390	0,375	0,271	14

Çizelge.3.6. Malt ekstrakt broht'ta suşların 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeamus</i>	0,34	0,370	0,356	0,258	13
<i>P.nitens</i>	0,30	0,439	0,422	0,305	15,6
<i>B.trispora</i>	0,32	0,588	0,567	0,410	20,6
<i>M.mucoedo</i>	0,32	0,298	0,287	0,208	10,5

Çizelge.4.1. Melas ortamın'da suşların 3 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,12	0,310	0,293	0,219	11,3
<i>P.nitens</i>	0,20	0,303	0,291	0,211	11,1
<i>B.trispora</i>	0,24	0,321	0,309	0,224	11,7
<i>M.muucedo</i>	0,13	0,155	0,149	0,108	6,1

Çizelge.4.2. Melas ortamın'da suşların 5 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,20	0,652	0,627	0,454	22,8
<i>P.nitens</i>	0,23	0,621	0,598	0,433	21,7
<i>B.trispora</i>	0,25	1,243	1,196	0,866	43,3
<i>M.muucedo</i>	0,24	0,373	0,356	0,234	13,4

Çizelge.4.3. Melas ortamın'da suşların 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,19	0,429	0,413	0,269	15,3
<i>P.nitens</i>	0,20	0,337	0,324	0,234	12,2
<i>B.trispora</i>	0,19	0,834	0,803	0,580	28
<i>M.muucedo</i>	0,20	0,471	0,453	0,327	16,7

Çizelge.5.1. Şlempe ortamın'da suşların 3 günlük fermentasyonu sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/l)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,05	0,070	0,067	0,048	3,3
<i>P.nitens</i>	0,05	0,096	0,092	0,066	4,2
<i>B.trispora</i>	0,12	0,099	0,095	0,068	3,9
<i>M.muicedo</i>	0,05	0,068	0,065	0,047	3,2

Çizelge.5.2. Şlempe ortamında suşların 5 günlük fermentasyonu sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/l)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,05	0,268	0,258	0,186	9,9
<i>P.nitens</i>	0,19	0,095	0,093	0,066	4,1
<i>B.trispora</i>	0,07	0,306	0,293	0,213	11,2
<i>M.muicedo</i>	0,21	0,114	0,113	0,079	4,8

Çizelge.5.3. Şlempe ortamın'da 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/l)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,16	0,060	0,055	0,041	3,0
<i>P.nitens</i>	0,16	0,094	0,090	0,065	4,1
<i>B.trispora</i>	0,15	0,111	0,106	0,077	4,7
<i>M.muicedo</i>	0,18	0,075	0,072	0,052	3,5

Çizelge.6.1. Peynir altı suyun'da suşların 3 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,29	0,145	0,139	0,100	5,8
<i>P.nitens</i>	0,10	0,114	0,109	0,079	4,8
<i>B.trispora</i>	0,16	0,137	0,131	0,095	5,5
<i>M.muicedo</i>	0,23	0,110	0,105	0,076	4,6

Çizelge.6.2. Peynir altı suyun'da suşların 5 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,35	0,328	0,315	0,228	11,9
<i>P.nitens</i>	0,15	0,303	0,291	0,210	11,1
<i>B.trispora</i>	0,23	0,345	0,332	0,240	12,5
<i>M.muicedo</i>	0,31	0,284	0,273	0,197	10,4

Çizelge.6.3. Peynir altı suyun'da suşların 8 günlük fermentasyon sonundaki verileri

Mikroorganizmalar	Kuru ağırlık (gr)	Absorbans değerleri (nm)			β-karoten miktarı (mg/lt)
		446	455	483	
<i>P.blakesleeanus</i>	0,31	0,116	0,111	0,080	4,8
<i>P.nitens</i>	0,24	0,140	0,134	0,094	5,6
<i>B.trispora</i>	0,25	0,118	0,113	0,082	4,9
<i>M.muicedo</i>	0,20	0,102	0,098	0,071	4,4

3.2.5. Ayçiçek ve Soya Yağı Katılarak Elde Edilen Fermentasyonlardaki β -karoten ve Kuru Ağırlık Miktarı

Fermentasyon ortamı olarak kullanılan melas, şlempe ve peynir altı suyuna ayçiçek ve soya yağı katıldığında *P.blakesleeanus*, *P.nitens*, *B.trispora* ve *M.mucedo* suşlarının oluşturdukları β -karoten ve misellerinin kuru ağırlık miktarları çizelge 7.1-7.2'de gösterilmiştir.

Ayçiçek yağı katılarak yapılan fermentasyonlarda en yüksek β -karoten miktarı melas ortamında 22,6 mg/lt ve peynir altı suyunda ise 9,6 mg/lt ile *B.trispora*'da oluşurken şlempe ortamında ise 11 mg/lt ile *P.blakesleeanus*'ta elde edilmiştir (çizelge 7.1.). En yüksek kuru ağırlık miktarı ise melas'ta 0,71 gr ve peynir altı suyunda ise 0,69gr'la *B.trispora*'da şlempe'de ise 1,01 gr/lt ile *P.bakesleeanus*'ta elde edilmiştir (çizelge 7.2.)

Soya yağı katılarak yapılan denemelerde ise en yüksek β -karoten miktarı melas ortamında 24,1 mg/lt ile *P.blakesleeanus*'ta şlempe ortamında 16,3 mg/lt ve peynir altı suyunda ise 18,8 mg/lt ile *B.trispora*'dan oluşmuştur. (çizelge 7.1). En yüksek kuru ağırlık miktarı ise melas'ta 0,75 gr, şlempe'de 1,01gr ve peynir altı suyunda ise 0,95 gr ile *P.blakesleeanus*'ta elde edilmiştir (çizelge 7.2.).

Çizelge.7.1. Fermentasyon ortamlarına ayçiçek yağı ve soya yağı katılarak gelişen suşların oluşturdukları β -karoten miktarları (mg/lt)

Kullanılan Ortamlar	<i>P.blakesleeanus</i>	<i>B.trispora</i>	<i>P.nitens</i>	<i>M.mucedo</i>	
Ayçiçek Yağın'da	Melas	18,7	22,6	17,3	8,3
	Şlempe	11,0	6,25	5,5	7,5
	Peynir altı suyu	8,4	9,6	8,2	4,8
Soya Yağın'da	Melas	24,1	20,8	16	13,8
	Şlempe	13,2	16,3	8,1	4,0
	Peynir altı suyu	7,8	18,8	6,6	4,4

Çizelge.7.2. Fermentasyon ortamlarına ayçiçek yağı ve soya yağı ilave edilerek gelişen suşların oluşturdukları kuru misel miktarı (gr)

Kullanılan Ortamlar	<i>P.blakesleeanus</i>	<i>B.trispora</i>	<i>P.nitens</i>	<i>M.mucedo</i>	
Ayçiçek	Melas	0,73	0,76	0,71	0,47
	Şlempe	1,01	0,63	0,55	0,68
Yağında	Peynir altı suyu	0,56	0,61	0,58	0,39
Soya	Melas	0,65	0,57	0,53	0,48
	Şlempe	0,41	0,46	0,39	0,27
Yağında	Peynir altı suyu	0,95	0,48	0,40	0,35

3.2.6. Işıklı Ortamlardaki Fermentasyonlarda Elde Edilen β -Karoten ve Kuru Ağırlık Miktarı

Işıklı ortamda melas, şlempe ve peynir altı suyu'da gelişen *P.blakesleeanus*, *P.nitens*, *B.trispora* ve *M.mucedo* suşlarının oluşturdukları β -karoten ve kuru ağırlık miktarlarına çizelge 8.1-8.2'de verilmiştir.

Fermentasyon ortamı olarak kullanılan melas'ta en yüksek β -karoten miktarı 41,7 mg/lt ile *B.trispora*'da yine şlempe'de 23,4 mg/lt *B.trispora*'da ve peynir altı suyunda ise en yüksek β -karoten miktarı ise 23 mg/lt ile *P.blakesleeanus*'ta elde edilmiştir (çizelge 8.1).

En yüksek kuru ağırlık miktarı ise melas ortamında 0,25 gr/lt ile *P.blakesleeanus*'ta peynir altı suyun'da 0,75 gr ile *P.nitens* suşunda ve şlempe ortamında ise 0,09 gr/lt ile *P.blakesleeanus* suşunda elde edilmiştir (çizelge 8.2.)

Bir gün karanlık, dört gün ışıklılandırılarak yapılan fermentasyon denemeleri sonunda *P.blakesleeanus* suşu en yüksek β -karoten miktarını 27,3 mg/lt melas ortamında, *B.trispora* suşu 41,7 mg/lt ile melas ortamında ve *P.nitens* suşu ise 30,7 mg/lt ile yine

melas ortamında oluşturmuştur. *M.mucedo* suşu ise en yüksek β -karoten miktarını 7,09 mg/lt ile peynir altı suyu ortamında oluşturmuştur.

Çizelge 8.1. Işıklı ortamda melas, şlempe ve peynir atı suyunda oluşturdukları β -karoten miktarları (mg/lt)

Fermentasyon Ortamı	Melas Ortamı	Şlempe Ortamı	Peynir altı suyu Ortamı
<i>P.blakesleeanus</i>	27,3	7,4	23,0
<i>B.trispora</i>	41,7	23,4	16,5
<i>P.nitens</i>	30,7	18,3	19,5
<i>M.mucedo</i>	1,6	2,5	7,09

Işıklı ortamda melasta elde edilen β -karoten miktarı, ışıklandırılmadan elde edilen β -karoten miktarına göre *B.trispora* suşunda hemen hemen aynı miktarda elde edilirken *P.blakesleeanus*, *P.nitens*'te artış, *M.mucedo*'da azalma olmuştur. Şlempe'de ise yine *P.blakesleeanus* biraz, *M.mucedo*'da yarı yarıya azalma olurken *B.trispora*'da iki katlık, *P.nitens*'te dört katlık bir artış görülmüştür. Peynir altı suyunda ise β -karoten miktarı *P.blakesleeanus*, *B.trispora*, *P.nitens*'te artış *M.mucedo*'da ise azalma görülmüştür.

Çizelge 8.2. Işıklı ortamda melas, şlempe ve peynir atı suyunda oluşan kuru ağırlık miktarı (gr/lt)

Fermentasyon Ortamı	Melas Ortamı	Şlempe Ortamı	Peynir altı suyu Ortamı
<i>P.blakesleeanus</i>	0,25	0,09	0,74
<i>B.trispora</i>	0,24	0,06	0,52
<i>P.nitens</i>	0,18	0,07	0,75
<i>M.mucedo</i>	0,17	0,08	0,66

4.SONUÇLAR, YORUM VE ÖNERİLER

Biyoteknolojideki gelişmelere bağlı olarak son yıllarda fermentasyonla β -karoten üretimi konusunda çalışmalar artmıştır. Ülkemizde ise β -karoten üretimi üzerine çok az araştırma yapılmıştır [4].

Araştırmamızda hem endüstriyel atık maddelerin çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi hem de besin ilaç endüstrisinde provitamin a olarak kullanılan β -karoten'in üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için şeker fabrikasının yan ürünü olan melas, şlempe ve süt sanayinin atık maddesi olan peynir altı suyu doğal besiyortamı olarak kullanılmıştır. Sentek besiyortamı olarakta malt ekstrakt broht ve YPK broht'tan fermentasyon yoluyla β -karoten üretilmeye çalışılmıştır.

Yaptığımız çalışmada patates dekstroz agar ve wort agar'da *P.blakesleeanus*, *P.nitens*, *B.trispora*, ve *M.mucedo* suşlarının büyüme miktarları ölçülmüştür. Buna göre *P.blakesleeanus*, ve *P.nitens* suşları 20⁰C'de patates dekstroz agar'da *B.trispora* ve *M.mucedo* suşları ise 20⁰C'de wort agar'da en iyi büyümeyi gösterdiği görülmüştür. Ancak, çalışmamızda kullandığımız çalkalamalı etüv soğutmalı olmadığından fermentasyon işlemleri çok büyük fark olmadığı için 27⁰C'de yürütülmüştür.

Gerek YPK broht ve malt ekstrakt broht gibi sentetik besiyerlerinde ve gerekse melas, şlempe ve peynir altı suyu gibi doğal besiyerlerinde maksimum β -karoten miktarı beşinci günde elde edilmiştir. Sekizinci günde ise β -karoten miktarında bir azalma olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin ise β -karoten'nin oksidasyona uğraması olabilir [4]. Araştırmacılar, ortama antioksidan maddelerin ilavesinin β -karoten veriminin artırdığını bildirmiştir [4].

Sentetik besiyeri olarak kullanılan YPK broht ile yapılan fermentasyon denemelerinde β -karoten miktarı 1,8-12,1 mg/lit arasında değişmiştir. En yüksek β -karoten besinci günde *P.nitens* üç günlük fermentasyonlarda elde edilen β -karoten'e göre *P.blakesleeanus* ve *B.trispora*'da üç kat, *P.nitens*'te iki buçuk kat ve *M.mucedo*'da ise hemen hemen aynı kaldığı görülmüştür.

Malt ekstrakt broht'ta yapılan denemeler sonunda β -karoten miktarı 7,9-27,9mg/lt arasında değişmiştir. En yüksek β -karoten *P.blakesleeamus*'ta elde edilmiştir. Malt ekstrakt broht'ta ise beş günlük fermentasyonlarda elde edilen β -karoten miktarı üç günlük fermentasyonda elde edilen β -karoten miktarına göre yaklaşık olarak *B.trispora* 'da üç kat, *P.blakesleenaus*'ta iki katlık bir artış diğer suşlarda ise çok az bir fark görülmüştür. Malt ekstrakt broht'ta elde edilen β -karoten miktarı YPK broht'ta oranla daha fazla oluştugu görülmüştür.

Melas kullanılarak yapılan fermentasyon denemelerin ise β -karoten miktarı 6,1-43,3 mg/lt arasında değişmiştir. En yüksek β -karoten beşinci günde *B.trispora* suşunda elde edilmiştir. Beş günlük melasın fermentasyonundan elde edilen β -karoten miktarına göre *P.blakesleeamus*, *P.nitens* ve *M.mucedo* iki kat, *B.trispora*'da üç kat artığı görülmüştür.

Şlempe ile yapılan fermentasyon denemelerinde ise β -karoten miktarı 3 ile 11,2 mg/lt arasında değişmiştir. En yüksek β -karoten miktarı *B.trispora* suşunda elde edilmiştir. Beş günlük şlempe ortamında elde edilen β -karoten miktarı üç günlük fermentasyonda hemen hemen aynı olduğu görülmüştür.

Peynir altı suyu ile yapılan fermentasyon denemelerinde ise β -karoten miktarı 4,4,-12,5 mg/lt arasında değişmiştir. En yüksek sonuç beşinci günde *B.trispora* suşundan elde edilmiştir. Peynir altı suyunda *P.blakesleeamus*, *B.trispora*, *P.nitens* ve *M.mucedo* suşlarında beş günlük fermentasyonla elde edilen β -karoten miktarından iki kat fazla olduğu görülmüştür.

Melas, şlempe ve peynir altı suyu gibi doğal besiortamları içinde en iyi fermentasyon ortamının melas olduğu saptanmıştır. Melas kullanılarak yapılan çalışmalarda *B.trispora*'da (43,3 mg/lt) maksimum ürün elde edilmiştir. Melas'ta en düşük β -karoten ise *M.mucedo*'da (13,4 mg/lt) suşunda olmuştur. Sentetik besiortamı olan YPK broht'ta ise en düşük β -karoten miktarı elde edilmiştir. Süt sanayinin atık ürünü olan peynir altı suyunda ise en yüksek β -karoten verimi *B.trispora* suşunda elde

edilmiştir. Şlempe ortamında β -karoten veriminin melas ve peynir altı suyuna göre daha az miktarda olduğu görülmüştür.

Ekmekçi [4] tarafından, benzer olarak mikrobiyal yolla β -karoten üretimi üzerine yapılan bir çalışmada; fermentasyon ortamı olarak malt ekstrakt broht kullanıldığında β -karoten miktarının 3,6-8 $\mu\text{gr}/\text{lt}$ arasında değiştiğini, peynir altı suyu kullanıldığında ise β -karoten miktarının 136,4-165,5 $\mu\text{gr}/\text{lt}$ arasında değiştiğini saptamıştır. Araştırmacı, peynir altı suyunun malt ekstrakt broht'ta göre yaklaşık 40 kat verim artışına neden olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda ise verim artışları bu kadar yüksek olmamıştır. Bunun nedeni kullanılan doğal besiortamlarının bileşimlerinin farklı olması olabileceği gibi kullanılan mikroorganizmaların farklı olmasından da olabilir. Araştırmacılar β -karoten biyosentezine büyüme ortamının bileşiminin büyük ölçüde etkili olduğunu bildirmişlerdir [8].

Phycomyces'lerin *Choanephoracea* familyası ve bu familyanın *P.blakesleeanus*, *B.trispora* suşlarında β -karoten üretimi üzerine bir çok araştırma yapılmıştır [16,17]. Bununla birlikte *M.mucedo* ve *P.nitens* suşlarında β -karoten bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmamızda bu suşlar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar kullanılan mikroorganizmalara göre β -karoten veriminin değiştiğini göstermektedir [16,17].

Ayrıca araştırmacılar fungusların (+) ve (-) suşları ile yapılan fermentasyon denemelerinde β -karoten miktarının değiştiğini bildirmişlerdir [4].

Kim Won-Seon vd [19] *B.trispora*(+) ATCC 14271 straininde 4 mg/lt ve *B.trispora*(-) ATCC 14272 straininde 52 mg/lt β -karoten oluştuğunu fakat *B.trispora*'nın karışık kültürlerinde ise 150 mg/lt β -karoten elde edildiğini saptamışlardır.

Margalith [23] *P.blakesleeanus*(-) NRRL 1555 ile yapmış olduğu çalışmada 72 saat sonra β -karoten miktarını 560 mg/gr olarak elde ettiğini bildirmiştir.

Feofilova vd [24] tarafından yapılan bir çalışmada 72 saat sonra *B.trispora* (+) 701 straininde 61,8 $\mu\text{g}/\text{gr}$ ve *B.trispora* (-) 987 strainide 276,5 $\mu\text{g}/\text{gr}$ β -karoten elde ettiğini 18 saatlik kültürlerde ise β -karoten oluşmadığını bildirmiştir.

Yaptığımız çalışmada kuru misel ağırlığı YPK buyyonda 0,08-2,1 gr arasında değişmiş ve en yüksek misel ağırlığı *B.trispora* suşunda elde edilmiştir. Malt ekstrakt buyyonda ise kuru misel ağırlığı 0,15-0,40 gr arasında değişmiş ve en yüksek

P.blakesleeanus'ta oluşmuştur. Melas'ta ise kuru misel ağırlığı 0,12-0,25 gr arasında değişmiş en yüksek kuru misel ağırlığı *B.trispora* suşunda elde edilmiştir. Şlempe ortamında kuru misel ağırlığı 0,05-0,21 gr arasında değişmiş ve en yüksek misel ağırlığı *M.muicedo*'da elde edilmiştir. Peynir altı suyunda kuru misel ağırlığı 0,1-0,35 gr arasında değişmiş ve en yüksek misel ağırlığı *P.blakesleeanus*.suşunda elde edilmiştir.

Genelde en düşük kuru misel ağırlığının şlempe hariç diğer besi ortamlarında *M.muicedo* suşunda olduğu görülmüştür.

β -karoten oluşumu ile kuru misel ağırlığı arasında bir ilişkinin olduğu, beşinci günde kuru misel ağırlığının artışına paralel olarak β -karoten miktarında da bir artışın olduğu ve sekinci günde kuru misel ağırlığının azalışına bağlı olarak β -karoten miktarında da bir azalma olduğu görülmüştür. Benzer olarak yapılan bir çalışmada Ekmekçi [4]; malt ekstrakt broht'ta en az kuru misel ağırlığı 4,6 gr/1,5 litre olduğunda β -karoten veriminin 3,6 μ gr/1,5 litre olduğunu, 5,15 gr/1,5 litre2de ise β -karoten verimin 8 μ gr/1,5 litre olduğunu, peynir altı suyunda ise kuru misel ağırlığının 3,7 gr/lt olduğunda β -karoten veriminin 136,4 μ gr/lt olduğunu, kuru ağırlık 4,9 gr/litre olduğunda ise verimin 165,6 μ gr/litre olduğunu bildirmiştir. Yine Shlomai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *P.blakesleeanus*'un kuru madde miktarının artmasına bağlı olarak β -karoten miktarının arttığını bildirmişlerdir [22].

Çalışmamızda melas, şlempe, peynir altı suyundan β -karoten verimini artırmak için besiortamına ayçiçek yağı ve soya yağı ilavesinde ayçiçek yağı katılan besiortamlarında β -karoten miktarı 4,8 ile 22,6 mg/lt arasında değişmiştir. En yüksek β -karoten verimi *B.trispora*'da olduğu grülmüştür. Soya yağı katılan besiortamlarında ise β -karoten miktarı 4,0-24,1 mg/lt arasında değişmiştir. En yüksek verim ise *B.trispora* suşunda elde edilmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda soya yağının fermentasyon ortamına ilavesinin β -karoten verimini artırdığı bildirilmiştir [4].

Işıklandırma yapılan fermentasyon denemelerimizde ise β -karoten miktarı melas ortamında 1,6 -41,7 mg/lt arasında, şlempe ortamında 2,5-23,4 mg/lt arasında ve peynir altı suyu ortamında ise 7,09-23 mg/lt arasında değişmiştir. Işıklandırma yapılan fermentasyon denemelerinde β -karoten miktarı *P.blakesleeanus* suşu ile melas'ta ve peynir altı suyunda artmış, şlempe'de ise azalmıştır. *B.trispora* suşu ile yapılan

fermentasyonda ise β -karoten miktarı melasta aynı kalmış şlempe ve peynir altı suyunda artmıştır. *P.nitens* suşunun kullanıldığı fermentasyonlarda β -karoten miktarı her üç ortamda da artış göstermiştir. *M.mucedo* suşunda ise β -karoten miktarı her üç ortamda da azalma göstermiştir.

Işıklandırma *P.blakesleeanus*, *P.nitens*, *B.trispora*'da β -karoten miktarında önemli bir artışa neden olmuştur. Benzer olarak yapılan çalışmalarda da araştırmacılar ışığın karotenoidlerin biyosentezini düzenlediğini bildirmişlerdir [12].

Bejerano vd., [22] tarafından yapılan bir çalışmada *P.blakesleeanus* suşunda karanlıkta dört günlük inkübasyon sonunda 60 $\mu\text{gr/gr}$ β -karoten elde edildiğini bildirmiştir. Yine *P.blakesleeanus* suşunda ışıklı ortamda dört günlük inkübasyon sonunda ise β -karoten miktarının 712 $\mu\text{gr/gr}$ 'a çıktığı bildirilmiştir. Yalnız kültürlerin sürekli aydınlatılmasında karotenoid oluşumunun devamlı artmadığı gözlenmiştir. İki gün karanlık iki gün aydınlıkta β -karoten miktarı 690 $\mu\text{gr/gr}$, bir gün karanlık üç gün aydınlıkta 757 $\mu\text{gr/gr}$ olduğu bildirilmiştir.

Çeşitli faktörler dikkate alındığında en yüksek β -karoten miktarı *B.trispora*'da elde edilmiştir. Bunu *P.nitens* suşu takip etmiştir.

P.blakesleeanus ile elde edilen β -karoten miktarı melasa soya yağı ilavesi verimi artırırken ayçiçek yağında aynı verim artışı olmamıştır. Şlempe içeren ortama ise gerek ayçiçek yağının ilavesi ve gerekse soya yağının ilavesi verim artışına neden olmuştur. Işık uygulanması hem melasta hem de peynir altı suyunda β -karoten miktarında artışa neden olmuştur.

P.nitens için de melas iyi bir fermentasyon ortamı olmuştur. Her üç doğal besi ortamında da ışıklandırma β -karoten miktarında artışa neden olmuştur . Ayçiçek yağı veya soya yağı ilavesi β -karoten veriminde melas ve peynir altı suyu ortamlarında bir artışa neden olmazken, şlempe ortamında bir artış görülmüştür.

B.trispora'nın kullanıldığı fermentasyonlarda en yüksek β -karoten veriminin yine melasta elde edilmiştir. Şlempe ve peynir altı suyunun kullanıldığı ortamlarda β -karoten miktarı ışıklandırma ile artmıştır. Soya-yağı içeren peynir altı suyunda *B.trispora*'da artış olurken, ayçiçek yağı ve soya yağı katılan diğer fermentasyon ortamlarında β -karoten verimini düşürmüştür.

M.mucedo ile yapılan fermentasyonlarda β -karoten verimi diğer funguslara göre çok düşük olmuştur. *M.mucedo* suşunda ise melas ve peynir altı suyuna ayçiçek yağının katılması β -karoten miktarında bir artışa neden olmamıştır. Ancak şlempe'ye ayçiçek yağı katılarak kullanılan fermentasyon ortamında *M.mucedo* suşunda (4,8 mg/l'ten 7,5 mg/l'te) verim artışı olmuştur. Işıklandırma *M.mucedo* suşunda β -karoten miktarında bir azalmaya neden olmuştur.

Sonuç olarak; mikrobiyal yolla β -karoten üretimi, kullanılan mikroorganizmaya, fermentasyon ortamına, ilave edilen maddelere, aydınlatmanın uygulanıp uygulanmamasına göre büyük ölçüde değişmektedir. Melas, şlempe ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atık maddelerin β -karoten üretiminde kullanılabileceği görülmüştür. Bunlardan özellikle melasın kullanıldığı fermentasyonlarda diğer doğal ortamlara ve sentetik besiyerlerine göre daha yüksek miktarda β -karoten elde edilmiştir. *B.trispora*'nın kullanıldığı fermentasyonlarda ise melasın en uygun fermentasyon ortamı olduğu görülmüştür.

Melas, şlempe ve peynir altı suyundan endüstriyel çapta β -karoten üretimi için ilave çalışmalara gereksinim vardır. β -karoten verimini etkileyen faktörler araştırılarak en uygun fermentasyon koşulları saptanmalıdır.

Çeşitli araştırmacılar tarafından besiyeri bileşimi, ortamın pH'sı, sıcaklık, havalandırma, ortama ilave edilen retinol, dimetil fitolal gibi kimyasal bileşiklerin β -karoten verimini etkilediği, fermentasyon sırasında vizkozite kontrolünün ve uygun bir karıştırmanın yapılması gerektiğini ve karotenoid oluşumu için fosfatın önemli olduğu vurgulanmıştır [4,8,12].

Çalışmalarımız çalkalamalı inkübatörde yürütüldüğü için pH kontrolü yapılamamıştır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki β -karoten biyosentezi sırasında ortamın pH'sında bir düşme meydana gelmektedir. pH'nın değişmesiyle β -karoten üretiminde sapsmaların olabileceği bildirilmiştir [22].

Kullanılan fermentasyon ortamlarına göre β -karoten miktarı önemli ölçüde değişmiştir. Doğal besiyerlerinden melas en iyi besiyeri ortamı olarak görülmektedir. Gerek şlempe gerekse peynir altı suyunun kullanılabilmesi için β -karoten verimini artırıcı ilave çalışmalara gereksinim vardır [22,24].

Ayrıca çeşitli kimyasal bileşikler denenerek verimin artırılması için çalışmalar yapılmalıdır. Margalith [23]; *Aspergillus* sp metabolitlerinin β -karoten verimine etkili olduğunu bildirmiştir. Seon-Won [19] tarafından yapılan çalışmada iyonik olmayan span 20 gibi sürfektanın β -karoten verimini 10 kat arttırdığını bildirilmiştir.

Ortama ilave ettiğimiz ayçiçek ve soya yağı β -karoten verimini beklediğimiz ölçüde arttırmamıştır. Bu nedenle karosen, β -ionin gibi diğer kimyasalların denenmesi faydalı olabilir. Ayrıca iyonik olmayan deterjanlar, pamuk tohumu, pamuk yağı gibi bitkisel yağlar da denenebilir.

Buna ilave olarak β -karoten oksidasyonunu önlemek için Ethoksikuin, Santokuin gibi antioksidanlar ilave edilerek deneyler yapılmalıdır. β -karoten biyosentezi lipit metabolizmasıyla yakından ilişkilidir. Bu nedenle fungusların lipit metabolizmasını geliştirmek için çalışmalar yapılmalıdır.

Ayrıca seksüel interaksiyon β -karoten verimini arttırmaktadır. Heteroseksüel funguslarda (+) ve (-) suşlar bir arada kullanılarak deneyler yapılmalıdır. *B.trispora*'da da benzer çalışmalar yapılmıştır. Bu fungusun iki seksüel formu belli oranlarda karıştırılarak, aynı kültür içinde geliştirilerek β -karoten üretiminde artış olduğu bildirilmiştir. Ortamda (+) ve (-) formların bir arada bulunması trisporik asit gibi bazı hormonal maddelerin sentezine neden olmaktadır. Trisporik asit ise β -karoten oluşumunu teşvik etmektedir [12,19].

Süper ürün veren mutant suşlar elde edilerek çalışmalar tekrarlanmalıdır. *P.blakesleeanus*'un genetik manipulasyon teknikleri ile yüksek miktarda β -karoten üreten suşlar elde edilmiştir. Bu suşlar interseksüel heterokaryonların MNNG (N-metil-N-Nitro-N-Nitrosoguaridin) ile muamelesiyle elde edilmiştir [4].

Melas, şlempe, peynir altı suyu gibi endüstriyel atık maddeler fermentasyon ortamı olarak β -karoten üretiminde kullanılabilceği görülmüştür. Ancak endüstriyel boyutta üretimin yapılabilmesi için optimum koşulların ve mikroorganizmaların belirlenmesi gerekmektedir. Bunun yanında diğer endüstriyel atık maddeler de denenmelidir. β -karoten'in endüstriyel boyutta üretimine geçilmeden önce fermentör deneyleri yapılarak en ekonomik sonuçlar elde edilmelidir.

KAYNAKLAR

- TELENFONCU, A., *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Bornova-İzmir, 1995.
- ENVER, T. Ç., *Endüstriyel mikrobiyoloji*, İstanbul Üniversitesi Tıp Fak, İstanbul, 1983.
- TİMM A., *Fungal Biotechnology*, Chapman and Hall, London, 1997.
- EKMEKÇİ, S., *Mikrobiyal Yöntemler İle Beta Karoten Üretimi ve Verimliliğin Artırılması*, Bornova-İzmir, 1987.
- TEKMA, Ş., ÖNER, N., *Genel Biyokimya*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 1991.
- YENSOR, M., *İnsan Biyokimyası*, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, 1988.
- HAROLD, A. H., *Fizyolojik Kimya'ya Bakış*, Ege Üniversitesi, Bornova-İzmir, 1976.
- CERDA-OLMEDO, E. and AVALOS, J., *Oleaginous Fungi: Carotene-Rich Oil From Phycomyces*, Prog. Lipid, Vol.33, No:1/2, pp 185-192, 1994.
- MIURA, Y., KONDO, K., SAITO, T., SHIMADA, H., FRASER, P, and MISAWA, N., *Production of the Carotenoids Lycopene, β -carotene, and Astaxanthin in the Food Yeast *Candida utilis**, Applied and Environmental Microbiology, Vol.64, No.4, pp. 1226-1229, 1998.
- TÜZÜN, C., *Organik Kimya*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 1996
- BİNGÖL, G., *Biyokimya*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, 1978.

2. MARGALITH, P.Z., *The Carotenoid Pigments*, Pigment Microbiology, 1992.
3. DAVIES, B.H., *Karotenoidler*, Ege üniversitesi, İzmir 1973.
4. MISAWA, N., YAMANO, S., and IKENAGA, H., *Production of β -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by Indtroduction of the Biosynthesis Genes from *Erwinia uredovora**, Applied and Enviromental Microbiology, Vol.57, No.6, pp. 1847-1849, 1991.
15. GIRARD, P., FALCONNIER, B., BRICOUT, J., VLADESCU, B., *β -Carotene Producing mutants of *Phaffia rhodozyma**, Applied Microbiol Biotechnology, Vol.41, pp.183-191, 1994.
16. SHLOMAI, P., BEN-AMOTZ, A., MARGALITH, P., *The Effect of Veratrole on Carotenoid Biosynthesis by *Phycomyces blakesleeanus**, Journal of Applied Bacteriology, Vol. 70, 166-168, (1991).
17. PEKİN, B., *Biyokimya Mühendisliği*, Ege Üniversitesi, Bornova-İzmir, 1983.
18. BINA, J.M., LUIS, M.S., BEJARANO, E.R., CERDA-OLMEDO, E., *New mutatnts of *Phycomyces blakesleeanus* for β -carotene Productio*, Applied and Enviromental microbiology, Vol 63, No:9, pp.3657-3661, (1997).
19. SEON-WON, K., WEON-TAEK, S., PARK, Y.H., *Enhanced Synthesis of Trisporic acid and β -Carotene Production in *Blakesleeanus trispora* by addition of a Non-Ionic Surfactant, Span 20*, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.84, No:4, pp. 330-332, 1997.
20. EGGINS, H.O.W., ALLSOPP, D., ONIONS, A.H.S., *Smith's Introduction to Industrial Mycology*, Britis Library Cataloguing in Publication Data, London, 1981.

21. BEJERANO, R.E., AVALOS, J., LIPSON, D.E., CEDA-OLMEDO, E., *Photoinduced accumulation of carotene in Phycomyces*, *Planta*, Vol.183, pp.1-9. 1990.
22. SHLOMAI, P., BEN-AMOTZ, A., MARGALITH, P., *Production of Carotene Stereoisomers by Phycomyces blakesleeanus*, *Applied Microbiology Biotechnology* Vol: 34, pp 458-462, 1991
23. MARGALITH, P., *Enhancement of Carotenoid Synthesis by Fungal Metabolites*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 38, pp. 664-666, 1993.
24. FEOLILOVA, E.P., TERESHINA, V.M., MEMORSKAYA, A.S., *Heterothallism in Mucorous Fungi: Physiological and Biochemical Characterization of the (+) and (-) strains of Blakeslea trispora*, *Microbiology*, Vol.66, No:6, pp 701-705, 1997.