İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİYLE KÜFLERDEN LİPİT ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Müh. Handegül AYTUNA

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

OCAK 2004

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİYLE KÜFLERDEN LİPİT ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Müh. Handegül AYTUNA
506011271

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22 Aralık 2003
Tezin Savunulduğu Tarih : 14 Ocak 2004

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Necla ARAN
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Artemis KARAALİ
Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN

OCAK 2004

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın ortaya çıkmasından tamamlanmasına kadar geçen her aşamada değerli fikirleri ve sonsuz yardımlarıyla beni destekleyen Sayın Hocam Prof. Dr. Necla Aran'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana verdikleri destek ve yardımlarından ötürü saygıdeğer Yrd. Doç. Dr. Beraat Özçelik'e, çok sevgili Neşe Şahin, Esra Çapanoğlu, Dilara Nilüfer ve diğer tüm Bölüm arkadaşlarıma, ayrıca Nabi Uygun, Levent Dinçer ve Nalan Demir'e çok teşekkür ederim. En zor anlarımda hep yanımda olan sevgili dostum Gökhan Bingöl ve ağabeyim Mehmet Keskin'e her zaman minnettar kalacağım.

Çalışmamız için gerekli küf kültürlerinin temin edildiği TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimleri ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü, greyfurt ve malt posalarının sağlandığı Penkon Penguen Konsantre San. A.Ş. ve Anadolu Efes Biracılık ve Malt Sanayi A.Ş. yetkililerine teşekkür ederim. Kromatogram piklerinin tanımlanması amacıyla "borage" yağının kullanımına olanak verildiği için Prof. Dr. Güldem Üstün ve Prof. Dr. Ayşe Aksoy'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamı, çalışmalarım sırasında benden hiç bir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli anneciğim ve babacığıma ithaf ediyorum.

Ocak, 2004 Handegül AYTUNA

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR **v**
TABLO LİSTESİ **vı**
ŞEKİL LİSTESİ **vıı**
ÖZET **vııı**
SUMMARY **x**

1. GİRİŞ **1**

2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1. Yağ Asitleri ve Sağlık Üzerine Etkileri 3
2.2. Mikrobiyal Lipitler 5
2.2.1. Bakteriler 6
2.2.2. Küfler ve Mayalar 7
2.2.3. Algler ve Fitoplanktonlar 11
2.3. Mikrobiyal Yağ Sentez Mekanizması 12
2.4. Mikroorganizmalardan Elde Edilen Lipidin Miktar ve Bileşimini Etkileyen Faktörler 13
2.4.1. Uygun Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi 16
2.5. Mikroorganizmalardan Lipit Üretim Yöntemleri 18
2.5.1. Daldırma Yöntemi 18
2.5.2. Katı Faz Fermantasyon Yöntemi 18
2.6. Turunçgil Posası ve Malt Küspesinin Fermantasyonda Kullanımı 21

3. MATERYAL VE METOT **24**
3.1. Materyaller 24
3.1.1. Küf Kültürleri 24
3.1.2. Meyve Posaları 24
3.2. Metotlar 24
3.2.1. İnokulum Hazırlanması 24
3.2.2. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması 24
3.2.3. Küflerin Sıvı Besi Ortamından Ayrılması 25
3.2.4. MEA Besiyerinin Hazırlanması 25
3.2.5. Katı Faz Fermantasyon Besi Ortamının Hazırlanması 25
3.2.6. Kuru Madde Değerlerinin Belirlenmesi 26
3.2.7. Toplam Azot ve Ham Protein Değerlerinin Belirlenmesi 26
3.2.8. pH Ölçümleri 26
3.2.9. Lipit Ekstraksiyonu 26
3.2.10. Yağ Asitleri Bileşiminin Belirlenmesi 27
3.2.11. Toplam Karbonhidrat Tayini 27
3.2.12. İstatistiksel Analizler 28

4. BULGULAR VE TARTIŞMA **29**
4.1. Sıvı Besi Ortamında ve MEA Besiyerinde Geliştirilen Test Kültürlerinin Lipit İçerikleri 29
4.2. Sıvı ve MEA Besiyerinde Geliştirilen Test Kültürlerinden Elde Edilen Lipitlerin Yağ Asidi Bileşimleri 31
4.3. Katı Faz Fermantasyon Besi Ortamlarının Fermantasyon Öncesi ve Sonrası Lipit İçerikleri 38
4.4. Fermantasyon Sonrası Sıvı Besi Ortamının pH Değişimi 44
4.5. Katı Faz Fermantasyon Besi Ortamlarının *Rhizopus oryzae* ve *Mucor racemosus* ile Fermantasyonları Sonucunda Toplam Azot ve Protein Miktarlarındaki Değişim 45
4.6. Fermantasyon Sonrası Besi Ortamlarında Toplam Karbonhidrat Değişimi 46

5. SONUÇ **49**

KAYNAKLAR **52**

ÖZGEÇMİŞ **59**

KISALTMALAR

LA	**:**	Linoleik Asit
ALA	**:**	α-Linolenik Asit
GLA	**:**	γ-Linolenik Asit
DHGLA	**:**	Dihomo-γ-Linolenik Asit
AA	**:**	Arakhidonik Asit
EPA	**:**	Eikosapentaenoik Asit
DPA	**:**	Dokosapentaenoik Asit
DHA	**:**	Dokosahekzaenoik Asit
MEA	**:**	Malt Ekstrakt Agar

TABLO LİSTESİ

		Sayfa No
Tablo 2.1.	Bazı bakteri türlerinin ürettiği toplam lipit miktarları…….	6
Tablo 2.2.	Bazı küflerin içerdiği lipit miktarları, çoklu doymamış yağ asitleri ve miktarları…….	8
Tablo 2.3.	Farklı substratlar üzerinde geliştirilen bazı mayalardan elde edilen toplam lipit miktarları……...	10
Tablo 4.1.	MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinin iki ekstraksiyon yöntemiyle saptanan lipit verimleri…….	29
Tablo 4.2.	Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinin iki ekstraksiyon yöntemiyle saptanan lipit verimleri……	30
Tablo 4.3.	Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri……...	32
Tablo 4.4.	MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri……...	36
Tablo 4.5.	Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi, *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ve *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonucu lipit içerikleri……..	39
Tablo 4.6.	Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi ve *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ve *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonları sonrası iki aşamalı ekstraksiyonları sonucu elde edilen lipidlerin yağ asidi bileşimleri……...	41
Tablo 4.7.	Fermantasyon sonrasında sıvı besi ortamlarının ölçülen pH değerleri…….....	44
Tablo 4.8.	Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi ve fermantasyon sonrası toplam azot ve protein değerleri……...	46
Tablo 4.9.	Fermantasyon sonrası sıvı besi ortamlarının ölçülen toplam heksoz değerleri……...	47

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 2.1.	*De novo* sentezi sonrasında yağ asitlerinin modifikasyonunun şematik gösterimi……	13
Şekil 2.2.	Türkiye'de 2001 yılına ait meyve üretim yüzdeleri……	22
Şekil 4.1.	Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden iki farklı yöntemle ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri……	34
Şekil 4.2.	MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinden iki farklı yöntemle ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri……	38
Şekil 4.3.	Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi, *R. oryzae* 70085-955-D1 ve *M. racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonucu lipit içerikleri……...	39
Şekil 4.4.	Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi (A) ve *R. oryzae* 70085-955-D1 (B) ve *M. racemosus* 73364 (C) ile fermantasyonları sonrası iki aşamalı ekstraksiyonları sonucu elde edilen lipidlerin yağ asidi bileşimleri……...	42
Şekil 4.5.	Fermantasyon sonrasında sıvı besi ortamlarının ölçülen pH değerleri……...	44
Şekil 4.6.	Glikoz standartlarına karşılık gelen absorbans değerleri…….	47
Şekil 4.7.	Fermantasyon sonrasında sıvı besi ortamlarının saptanan toplam heksoz miktarları…….	48

KATI FAZ FERMANTASYON YÖNTEMİYLE KÜFLERDEN LİPİT ÜRETİMİ

ÖZET

Çoklu doymamış yağ asitleri içeren yağların sağlık üzerine olumlu etkilerinin saptanması insanların bu yağ asitlerine ve doğal kaynaklarına olan ilgisini artırmıştır. Bu kapsamda mikroorganizmalar lipit üretimi açısından bitkisel ve hayvansal kaynaklara alternatif oluşturmalarının yanı sıra endüstriyel atık ve yan ürünler üzerinde gelişebilme, kısa sürede çoğalabilme gibi olumlu özelliklere sahiplerdir.

Ticari olarak kozmetik ve gıda sektöründe kullanılan yağlar genel olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen yağların ticari olarak üretilebilmesi için, geleneksel yağlarla özellikleri ve/veya ekonomik değerleri açısından rekabet edebilmesi gereklidir.

Mikroorganizmalardan metabolit eldesi için çeşitli fermantasyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerden biri olan katı faz fermantasyon yönteminde, substrat olarak katı bir materyal besin öğesi olarak kullanılmaktadır.

Bir çok faktör mikroorganizmalardan elde edilen lipidin miktarını ve bileşimini etkileyebilmektedir. Mikroorganizmanın geliştirildiği ortamın bileşimi, sıcaklık, sürfektan ilavesi, bazı besin elementlerinin eksikliği veya fazlalığı, mikroorganizmanın içinde bulunduğu gelişme dönemi ile lipit eldesi için uygulanan ekstraksiyon yöntemleri bu faktörler arasında yer almaktadır. Mikrobiyal lipit (tek hücre yağı) eldesinde maksimum verim ve değerli yağ asidi bileşiminin sağlanması için bu faktörlerin ayarlanması büyük önem taşımaktadır.

Yapılan çalışma kapsamında çeşitli *Mucor* ve *Rhizopus* türlerinden oluşan test kültürleri sıvı besi ortamında ve malt ekstrakt agar (MEA) besiyerinde geliştirilerek elde edilen biyokütlelerden kloroform:metanol (2:1, v/v) ve kloroform:metanol (2:1, v/v) ardından hekzanla lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon yöntemlerinin lipit verimi ve yağ asidi bileşimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Kloroform:metanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen lipit verimlerinin kloform:metanol (2:1, v/v) ardından hekzan uygulaması sonucu elde edilen lipit verimlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. MEA üzerinde geliştirilen küflerden en yüksek lipit verimine *M. racemosus* 73364'ün (%15,69), sıvı besi ortamında geliştirilen küflerden ise *R. oryzae* 70082-976-D1'in (%29,84) sahip olduğu saptanmıştır. Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimlerinde başlıca yağ asitlerini palmitik asit (%14,87-25,23), stearik asit (%7,63-19,11), oleik asit (%21,11-40,86) ve linoleik asitin (%10,70-17,20) oluşturduğu tespit edilmiştir. MEA üzerinde geliştirilen küflerden ekstrakte edilen lipitlerin yapısında ise başlıca yağ asitlerini palmitik asit (%15,51-30,16), oleik asit (%12,93-39,34) ve linoleik asit (%7,20-21,49) oluşturmuştur. Sıvı besi ortamında geliştirilen küflerden ekstrakte edilen lipitlerin %3,40-10,17 düzeyinde, MEA besiyerinde geliştirilen küflerden ekstrakte edilen lipitlerin ise %2,94-19,98

düzeyinde γ-linolenik asit (GLA) içerdikleri saptanmıştır. Sıvı besi ortamından filtre edilen biyokütlelerden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimlerinin uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinden etkilenmediği belirlenmiştir.

M. racemosus 73364 ve *R. oryzae* 70085-955-D1 greyfurt posası, malt küspesi ve her ikisinin sırasıyla 3'e 1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen substratlar üzerinde katı faz fermantasyon işlemine tabi tutulmuş, lipit üretimleri açısından incelenmişlerdir. Test kültürlerinin malt küspesi dışında diğer substratlar üzerinde lipit ürettikleri sonucuna ulaşılmıştır. *R. oryzae* 70085-955-D1'in substratlar üzerinde geliştirilmesi sonucunda *M. racemosus* 73364'ten daha fazla lipit ürettiği belirlenmiştir. Katı substratların fermantasyon sonrası içerdikleri lipitlerin yağ asitleri bileşimlerinin fermantasyon öncesine göre oldukça farklı olduğu saptanmıştır. Fermente edilmemiş substratlardan ekstrakte edilen lipitlerin hiç birinin yapılarında GLA içermediği, ancak her iki test kültürüyle de fermantasyonları sonrasında elde edilen biyokütlelerden ekstrakte edilen lipitlerde GLA içeriğinin toplam yağ asitlerinin yaklaşık %2,35-6,64'ünü oluşturduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon sonrasında bütün katı substratların toplam azot içeriklerinin arttığı belirlenmiştir.

Fermantasyon sonrasında sıvı besi ortamları, pH değerlerindeki ve toplam karbonhidrat içeriklerindeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla analize tabi tutulmuşlardır. Sıvı besi ortamlarının pH değerlerinin bütün test kültürleriyle fermantasyonu sonucunda azaldığı belirlenmiştir. Toplam karbonhidrat analizi sonucunda fermente edilen sıvı besi ortamlarında toplam karbonhidrat miktarlarının azaldığı saptanmıştır. Ancak incelenen mikroorganizmalardan hiç birinin ortamda karbon kaynağı olarak bulunan glikozu tamamen kullanmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Toplam karbonhidrat miktarındaki azalma yüzdesi en fazla *M. racemosus* 73364'le fermente edilen besi ortamında olup %63,24 seviyesindedir, bu küfü sırasıyla *R. oryzae* 70084-930-D1 (%60,80), *R. oryzae* 70082-976-D1 (%59,18 azalma), *R. oryzae* 70085-955-D1 (%49,67), *M. racemosus* 70095-3135-1 (%40,05) ve *R. oryzae* 70083-947-D1 (%37,10) takip etmektedir.

PRODUCTION OF LIPIDS BY MOULDS BY SOLID STATE FERMENTATION

SUMMARY

Lipids containing polyunsaturated fatty acids have gained considerable attention because of their beneficial effects on health. This situation has led to an increased interest in finding new natural lipid sources. Microorganisms are considered as an alternative source of vegetable and animal oils and have some advantages over these conventional sources such as having the ability to grow on waste materials and by-product in a short time.

Lipids which are used commercially in cosmetic and food industries are generally obtained from plant and animal sources. Characteristics and economical value of the lipids obtained from microorganisms should be able to compete with other traditional lipids in order to be produced commercially.

Different fermentation techniques are used in order to produce metabolites from microorganisms and solid state fermentation is one of them in which solid materials are used as substrate.

There are many factors affecting the yield and fatty acid composition of microbial lipids (single cell oil/fat) such as substrate composition, temperature, surfactant addition, absence or excess of some nutrients, growth phase of microorganism and different extraction methods. Adjustment of these factors is important to have maximum lipid yield with desired fatty acids composition.

In this study, several *Mucor* and *Rhizopus* strains were cultivated on liquid medium and malt extract agar (MEA) and lipids from fungal biomass were extracted by using two different extraction methods including chloroform:methanol (2:1, v/v) and hexan after chloroform:methanol (2:1, v/v) . The effect of extraction procedures on the lipid yield and fatty acids composition of total lipid was investigated. The lipid yields determined after extraction by chloroform:methanol (2:1, v/v) were higher than the lipid yields determined after extraction by hexan after chloroform:methanol (2:1, v/v). *M. racemosus* 73364 had the highest lipid yield (15.69%) by chloroform:methanol extraction in MEA and *R. oryzae* 70082-976-D1 had the highest lipid yield (29.84%) by chloroform:methanol extraction in liquid cultivation media. Palmitic acid (14.87-25.23%), stearic acid (7.63-19.11%), oleic acid (21.11-40.86%) and linoleic acid (10.70-17.20%) were the predominant fatty acids found in lipids extracted from the fungal biomass obtained from liquid cultivation media. The γ-linolenic acid (GLA) contents in the lipids changed between 3.40% and 10.17% of the total fatty acids. The lipids extracted from biomass which were obtained from test strains cultivated on MEA contained palmitic acid (15.51-30.16%), oleic acid (12.93-39.34%) and linoleic acid (7.20-21.49%) as their major fatty acids. The GLA contents in the lipids changed between 2.94% and 19.98% of the total fatty acids. It

was determined that extraction methods didn't affect the fatty acid composition of lipids extracted from biomass filtered from liquid cultivation media.

The production of lipid by *Mucor racemosus* 73364 and *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 were studied in solid state fermentations on various solid substrates containing grapefruit peel, spent malt grains and mixture of both having a ratio of grapefruit peel to spent malt grains of 3 to 1. Test strains were found to accumulate lipid on all solid substrates except spent malt grains. Lipid accumulation of *R. oryzae* 70085-955-D1 was higher than lipid accumulation of *M. racemosus* 73364 on grapefruit peel and substrate mixture containing grapefruit peel and spent malt grains. There were considerable differences in fatty acid composition of the fungal biomass plus residual substrate depending on the original substrates. Lipids extracted from non fermented solid substrates did not contain GLA. The GLA content of the lipids extracted from all fungal biomass was between 2.35-6.64%. The lipid extracted from biomass (grapefruit peel and mixture of grapefruit peel and spent malt grains) fermented with *M. racemosus* 73364 had higher GLA content compared to the GLA content of lipid extracted from biomass fermented with *R. oryzae* 70085-955-D1. Total nitrogen content of all solid substrates increased after fermentation with *M. racemosus* 73364 and *R. oryzae* 70085-955-D1.

Liquid fermentation mediums were analyzed to determine changes in pH and total carbohydrate content after fermentation with *Mucor* and *Rhizopus* strains. The pH decreased after fermentation of liquid cultivation medium with all tested microorganisms. Result of the carbohydrate analysis showed that carbohydrate content of liquid medium decreased after fermentation, but none of the microorganisms used all the glucose in the medium. The highest total carbohydrate consumption ratio was found in medium fermented with *M. racemosus* 73364 (63.24%) and was followed by *R. oryzae* 70084-930-D1 (60.80%), *R. oryzae* 70082-976-D1 (59.18%), *R. oryzae* 70085-955-D1 (49.67%), *M. racemosus* 70095-3135-1 (40.05%) and *R. oryzae* 70083-947-D1 (37.10%).

1. GİRİŞ

Gıda endüstrisinde mikroorganizmalar farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Mikrobiyal biyomas üretiminin amaçları, artan gıda talebini karşılamak ve çevre kirliliğine yol açabilen substratları ekonomik değeri olan ürünlere dönüştürmektir (Karapınar, 1984). Bu kapsamda lipit biyoteknolojisi başlıca iki alandan oluşmaktadır; bunlardan ilkini hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan yağ eldesi, diğerini ise yağların modifikasyonu (hidroliz, interesterifikasyon, ampifilik moleküllerin sentezi, oksidasyon vb.) oluşturmaktadır (Graille, 1996; Mukherjee, 2000).

Dünya yağ ihtiyacının yaklaşık %80'i tarımsal ürünlerden, geri kalanı ise hayvansal kaynaklardan ve su ürünlerinden elde edilmektedir. Hızla artan Dünya nüfusunun besin açığı probleminin çözülmesi için yeni kaynakların bulunması gerekmektedir (Bayizit ve Başoğlu, 2000). Mikroorganizmalardan lipit eldesi, hayvansal ve bitkisel kaynaklı yağlara alternatif olarak geliştirilmekte olan bir konudur. Yapılan çalışmalarla fotosentetik algler dışında bir çok mikroorganizmanın farklı karbon kaynakları üzerinde gelişerek önemli miktarlarda lipit üretebilme özelliklerine sahip oldukları belirlenmiştir (Kavadia ve diğ., 2001). Ökaryotik mikroorganizmalardan mayalar, küfler ve algler bitkisel yağlara benzer triaçilgliseroller, prokaryotik mikroorganizmalar arasında yer alan bakteriler ise polihidroksi alkanoik asit gibi özel lipitler üretebilmektedir (Mukherjee, 2000; Gema ve diğ., 2002). Ancak mikroorganizmalardan elde edilen yağın verimi ve bileşimi mikroorganizmanın geliştirildiği ortam bileşimi ve koşulları, geliştirilen mikroorganizmanın türü, mikroorganizmanın içinde bulunduğu gelişme dönemi ve uygulanan ekstraksiyon yöntemi gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir (Kennedy ve diğ., 1993; Hassan ve diğ., 1996; Bhatia ve diğ., 1972; Atkinson ve Mavituna, 1991; Certik ve diğ., 1996; Somashekar ve diğ., 2001; Bayizit ve Başoğlu, 2000).

Yağ üretebilme özelliğine sahip bir çok mikroorganizma farklı karbon kaynakları üzerinde geliştirilerek bu özellikleri açısından incelenmektedir. Küf ve mayalar başta olmak üzere yeni türlerin yağ üretimi açısından araştırılması bilimsel ve endüstriyel

olarak ilgi çekmektedir (Kavadia ve diğ., 2001). Ayrıca elde edilen ürünlerin değerlerinin artırılması ve yağ eldesi için gerekli aşamaların azaltılması bilimsel açıdan ilgi çeken konular arasında yer almaktadır (Certik ve Shimizu, 1999).

Konu ile ilgili geliştirilmiş yöntemler daldırma yöntemi ve katı faz fermantasyon yöntemidir. Katı faz fermantasyon yöntemi, geleneksel gıdaların ve alkollü içeceklerin üretimi için geliştirilmiş bir yöntem olup bu yöntemde mikroorganizmalar substrat ya da hareketsiz destek olarak kullanılan nemli katı bir yüzey üzerinde geliştirilmektedir (Emelyanova, 1996; Stredansky ve diğ, 2000a; Stradansky ve diğ., 2000b; Sato ve Sudo, 1999; Pandey, 1992). Katı atıkların değerlendirilebilmesi mikrobiyal yağ üretim yöntemlerinden biri olan katı faz fermantasyon tekniği üzerine olan ilgiyi artırmıştır (Pandey, 1992; Pandey, 1991). Mikrobiyal yağ üretiminde fermantasyon işlemi için seçilen karbon kaynağının fiyatı ve elde edilebilirliği, prosesin ekonomik boyutunu etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (Ratledge, 1987). Bu nedenle ucuz substratların mikroorganizmalardan lipit eldesinde kullanımı büyük önem taşımaktadır (Certik ve Shimizu, 1999).

Bu çalışmada Zygomycetes sınıfı küfler greyfurt posası ve bira üretim atığı olan malt küspesinin substrat olarak kullanılıp hazırlandığı farklı besi ortamlarında geliştirilerek mikrobiyal yağ ve yağ asitleri üretimi açısından incelenmiştir. Ayrıca gelişme öncesi besi ortamlarında ve sonrasında elde edilen biyomaslarda protein, yağ ve yağ asidi bileşimi analizleri yapılarak değişimler incelenmiştir. Sıvı besi ortamı ve malt ekstrakt agar üzerinde geliştirilen küflerden yağ eldesinde uygulanan farklı ekstraksiyon yöntemlerinin verim ve yağ asidi bileşimi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Yağ Asitleri ve Sağlık Üzerine Etkileri

Yağlar insan beslenmesinde çok önemli bir role sahip olup; yağ asidi zincirinde doymamış çift bağların bulunması ve sayısına bağlı olarak doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asitleri şeklinde gruplandırılabilmektedir (Garcia, 1998). Bir çok yağın bileşeni olan yağ asitleri, uzun karbonlu karboksilik asitlerdir.

Hücresel enerji depoları ve hücre zarı bileşeni olan çoklu doymamış yağ asitlerinin biyolojik sistemler üzerine çeşitli etkileri bulunmaktadır (Gill ve Valivety, 1997; Stredansky ve diğ., 2000a). Çoklu doymamış yağ asitleri, biyolojik rollerine bağlı olarak biyomedikal ve insan sağlığını geliştirici biyolojik aktiviteleri bulunan gıda ürünlerinde yerlerini almışlardır (Gill ve Valivety, 1997). Çoklu doymamış yağ asitlerinin kalp dolaşım hastalıkları, aterosıklerosis, koroner kalp hastalıkları, ve kanda yüksek lipit içeriği gibi sorunlar üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır ve bu nedenle diyetle alınmaları vücut gelişimi ve bazı hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir (Franke ve diğ., 1994; Stredansky ve diğ., 2000a).

Son yıllarda esansiyel yağ asitleri başta olmak üzere çoklu doymamış yağ asitleri üzerine olan ilgi artmıştır (Certik ve diğ., 1998; Franke ve diğ., 1994; Yamamura ve Shimamura, 1997). Esansiyel yağ asitleri, hücre zarlarına akışkan ve esnek yapı kazandırmaları, zara bağlı belirli proteinlerin hareketinin düzenlenmesini sağlamaları açısından önemlidir (Certik ve diğ., 1998). Ayrıca esansiyel yağ asitleri, prostaglandin, lökotrien ve hidroksi yağ asitleri gibi vücutta önemli biyolojik fonksiyonları düzenleyen metabolitlerin öncüleridir (Certik ve diğ., 1998; Certik ve Shimizu, 2000). Esansiyel yağ asitleri, dokuzuncu karbon ve terminal metil grupları arasına çift bağın yerleştirilememesinden dolayı vücutta sentezlenememektedir. Linoleik asit (LA) ve alfa linolenik asit (ALA) vücut tarafından sentezlenememektedir (Certik ve diğ., 1998).

En az iki çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitleri, yağ asidi molekülünün metil ucundan itibaren ilk çift bağın pozisyonuna göre ω-3 ve ω-6 yağ asitleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Garcia, 1998). ALA, eikosapentaenoik asit (EPA), dokosapentaenoik asit (DPA) ve dokosahekzaenoik asit (DHA) ω-3 yağ asitlerinin; LA, gama linolenik asit (GLA), dihomogama linolenik asit (DHGLA) ve arakhidonik asit (AA) ω-6 yağ asitlerinin önemli üyeleridir (Bajpai ve Bajpai, 1993). Bu yağ asitlerinin insan sağlığı üzerine olumlu etkilerini gösterebilmeleri için ω-6 yağ asitlerinin ω-3 yağ asitlerine oranının 6:1 olması önerilmektedir (Garcia, 1998).

EPA ve DHA ω-3 yağ asitleri içersinde önemli yağ asitleri olup kalp dolaşım ve kanser üzerine fizyolojik etkileri vardır (Kennedy ve diğ., 1993; Garcia, 1998). DHA sinir, görme ve üreme sistemleri üzerinde olumlu etkileri olup bebeklerin beyin dokusunun gelişmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir (Bajpai ve diğ., 1991a). Bu yağ asitleri için günlük önerilen tüketim miktarı 1-2 gr olarak belirtilmektedir (Garcia, 1998).

GLA, prostoglandinlere ve lökotrienlere dönüşümde ara basamağı oluşturan DHGLA ve AA'nın öncüsü olup bu yağ asitleri vücudun normal işlevleri ve hücre yapısı için gereklidir (Emelyanova, 1997; Certik ve Shimizu, 2000; Emelyanova, 1996; Hansson ve Dostalek, 1988; Kennedy ve diğ., 1993; Conti ve diğ., 2000; Hansson ve diğ., 1989). Bu nedenle GLA içeren yağlar romotit artritis, şizofreni, egzama, adet öncesi sendromlar, diyabet ve kanser gibi bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Somashekar ve diğ., 2001; Emelyanova, 1996; Stredansky ve diğ., 2000b). Ayrıca alerji tedavilerinde başarılı sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Kawashima ve diğ., 2000). GLA, ilaç ve gıda alanları için önemli bir bileşiktir (Certik ve diğ., 1996). GLA eksikliği cilt hastalıklarına neden olabilmektedir. Diyabet ve kanser hastalıkları ile yaşlılık gibi durumlarda LA'nın GLA'ya dönüştürülmesinde rol oynayan Δ-6 desaturaz enziminin aktivitesi azalabilmekte, bu da prostaglandin sentezinde eksikliklere neden olabilmektedir. Bu nedenle diyetle birlikte GLA alımı önem kazanmaktadır (Conti ve diğ., 2000).

AA'nın vücut üzerinde düzenleyici etkileri ve fizyolojik fonksiyonları bulunmakta; EPA ise bir çok hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde büyük önem taşımaktadır (Higashiyama ve diğ., 1998; Bajpai ve Bajpai, 1993). AA ve EPA, eikosanoid metabolizması içinde prostaglandin, lökotrienlerin, 20 karbonlu ve 22 karbonlu bileşiklerinin öncüleridir (Bajpai ve diğ., 1991b; Higashiyama ve diğ., 1999).

2.2. Mikrobiyal Lipitler

Mikroorganizmalar, polar ve nötral olmak üzere iki tip lipit sentezleyebilmektedir. Polar lipitleri, hücre membran yapısında bulunan fosfolipit ve glikolipitler oluştururken triaçilgliseroller, ökaryotik mikroorganizmalarca da sentezlenen nötral lipitleri oluşturmaktadır (Rose, 1978). Sifingolipitler, polyol yağ-açil esterleri gibi diğer tip lipitler de mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedir (Rose, 1978; Mukherjee, 2000).

Mikroorganizmalar yağ üretimi açısından bitkisel ve hayvansal kaynaklara alternatif oluşturmaktadırlar (Certik ve Shimizu, 1999; Whitworth ve Ratledge, 1974; Graille, 1996; Ratledge, 1987; Somashekar ve diğ., 2001, Certik ve diğ., 1998). Bütün mikroorganizmalar hücre yapılarının içinde doymuş ve doymamış yağ asitleri ve gliseritler içermektedirler. Ancak ticari olarak mikroorganizmalardan yağ eldesinin düşünülebilmesi için sentezlenen yağın GLA, AA, EPA gibi değerli yağ asitlerince zengin olması, diğer kaynaklardan eldesinin daha pahalı olması, geleneksel kaynaklardan elde edilen yağlarla rekabet edebilecek özellikte olması ve en az %40 oranında yağ içermeleri gereklidir (Graille, 1996; Certik ve Shimizu, 1999; Anderson ve Wynn, 2001; Atkinson ve Mavituna, 1991).

Fermantasyon kontrollerindeki yeni gelişmeler ve mikroorganizmalardan yağ sentezi mekanizmasının daha anlaşılır duruma gelmesi mikroorganizmaların ticari olarak yağ üretiminde kullanımlarını ön plana çıkarmıştır (Whitworth ve Ratledge, 1974).

Mikroorganizmalardan yağ eldesinin geliştirilmesi istenen bir konu olmasının çeşitli nedenleri vardır:

(i) Mikroorganizmalardan değerli mikrobiyal çoklu doymamış yağ asidi eldesi mümkündür (Certik ve Shimizu, 1999; Ratledge, 1987).

(ii) Mikroorganizmalar hızlı gelişebilme özelliğine sahiplerdir (Ratledge, 1987).

(iii) Lipit sentezinde kullanılan mikroorganizmalar endüstriyel yan ürünlerde ve atıklarda düşük maliyetle geliştirilebilirler (Certik ve Shimizu, 1999; Graille, 1996).

(iv) Yağ üretimi mevsimsel değildir (Certik ve Shimizu, 1999).

(v) Gelişme koşulları kontrol edilerek ve/veya yapılan değişikliklerle yağ asidi bileşiminde ve miktarında istenilen ayarlamalar yapılabilmektedir (Certik ve Shimizu, 1999; Ratledge, 1987; Anderson ve Wynn, 2001).

(vi) Mikroorganizmaların genetik modifikasyonu ile elde edilen biyomasın verimi artırılabilir, bileşimi değiştirilebilmektedir (Ratledge, 1987).

Mikroorganizmalardan lipit eldesinde organizmaların gelişme hızı, yağın ekstraksiyon kolaylığı, yüksek konsantrasyonlarda ürün eldesi, elde edilen yağın toksik özellikte olmaması ve bitkisel veya hayvansal yağ olarak kabul edilmesi gibi özellikler önem taşımaktadır (Whitworth ve Ratledge, 1974).

2.2.1. Bakteriler

Bakteriler, polihidroksi alkanoik asit ve diğer polihidroksi asitler gibi endüstriyel açıdan önemli özel lipitler üretebilmektedirler (Gema ve diğ., 2002; Waltermann ve diğ., 2000; Graille, 1996). Bakterilerin kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu fosfolipitlerin oluşturduğu ve fosfolipit içeriğinin trigliserit içeriğinden daha fazla olduğu belirtilmektedir (Heath ve diğ., 2002; Biacs ve Gruiz, 1984).

Tablo 2.1'de bazı bakteri türlerinin ürettiği toplam lipit miktarları belirtilmektedir (Atkinson ve Mavituna, 1991).

Tablo 2.1. Bazı bakteri türlerinin ürettiği toplam lipit miktarları (*)

Bakteri	Toplam lipit (% kuru ağırlık)
Bacillus megaterium	21
Bacillus subtilis	6,1
Escherichia coli	4-6
Lactobacillus acidophilus	7
Lactobacillus casei	0,6

(*) Atkinson ve Mavituna, 1991

Hızlı gelişebilme özelliğine sahip olan bakterilerin düşük hücre verimleri ve lipit içerikleri, mikrobiyal lipit kaynağı olabilmelerini engellemektedir. Ancak "mycobacteria-nocardia-corynebacteria" grubu üyelerinin hücre ağırlıkları üzerinden %20 oranında yağ içerdikleri belirtilmektedir (Whitworth ve Ratledge, 1974). Bu grup bakterilerin lipit içeriği genel olarak yüksek olmakla beraber elde edilen lipit

çoğunlukla toksin ve alerjen moleküller içermektedirler (Graille, 1996; Whitworth ve Ratledge, 1974). Ayrıca mevcut ekstraksiyon yöntemlerinin bakterilere adapte edilememesi bu mikroorganizmaların çok fazla çalışılamamasına neden olmaktadır (Graille, 1996).

Mycobacterium, Streptomyces, Acinetobacter, Nocardia ve *Rhodococcus* cinsi bakterilerin triaçilgliserol üretimi açısından önemli oldukları vurgulanmaktadır (Waltermann ve diğ., 2000). *Arthrobacter* cinsi bakterilerin kuru biyomas üzerinden %80'lere varan düzeylerde lipit içerdiği, bu lipidin de yaklaşık %90'ının triaçilgliseroller olduğu belirtilmektedir (Mukherjee, 2000). Bazı deniz kaynaklı bakterilerin çeşitli çoklu doymamış yağ asitleri içerdiği de belirlenmiştir (Certik ve Shimizu, 1999). Bakterilerin kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu fosfolipitler oluşturmaktadır (Heath ve diğ., 2002).

2.2.2. Küfler ve Mayalar

Küfler genel olarak mayalara kıyasla daha yavaş gelişmekle beraber yüksek hücre verimliliğine sahiplerdir. Ayrıca küflerden elde edilen yağların çoklu doymamış yağ asitleri içeriği mayalarınkine göre daha yüksektir. Mayalar tarafından sentezlenemeyen belirli yağ asitleri küfler tarafından sentezlenebilmektedirler (Hansson ve Dostalek, 1988; Whitworth ve Ratledge, 1974). Küflerden GLA, AA, EPA, DHA, DHGLA gibi çoklu doymamış yağ asitlerince zengin lipit üretimi mümkündür (Stredansky ve diğ., 2000a; Gema ve diğ., 2002; Certik ve Shimizu, 2000; Graille, 1996; Hansson ve diğ., 1989; Bajpai ve diğ., 1991b; Radwan, 1991).

Penicillium, *Aspergilli*, *Fusarium*, *Mucor* ve *Phycomyces* cinsi küfler yağ üretimi açısından potansiyel kaynak olarak belirtilmektedir (Whitworth ve Ratledge, 1974; Murali ve diğ., 1987).

Zygomycetes sınıfı GLA üretimi açısından önemli *Mucorales*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Cunninghamella* ve *Zygorhyncus* cinsi küflerden oluşmaktadır (Gema ve diğ., 2002; Kavadia ve diğ., 2001; Stredansky ve diğ., 2000b; Somashekar ve diğ., 2001; Graille, 1996).

Tablo 2.2'de bazı küflerin içerdiği çoklu doymamış yağ asitleri ve miktarları verilmektedir (Certik ve Shimizu, 1999).

Tablo 2.2. Bazı küflerin içerdiği lipit miktarları, çoklu doymamış yağ asitleri ve miktarları(*)

Küf	Yağ asidi	Yağ asidi (%)	Toplam lipit (% kuru ağırlık)
Mortierella ramanniana	18:3 ω-6	17,6	50
Mortierella isabellina	18:3 ω-6	4,5	53
Mortierella alpina	20:3 ω-6	42	50
Mortierella alpina	20:4 ω-6	50	45
Mortierella alpina	18:2 ω-9	16	40
Mortierella alpina	20:2 ω-9	25	44
Pythium ultimum	20:5 ω-3	20	18
Thraustochytrium roseum	22:6 ω-3	48,8	23
Mucor circinelloides	18:3 ω-6	24,3	23

(*) Certik ve Shimizu, 1999

Mucorales cinsi küfler geliştirildiği ortam koşullarına bağlı olarak misel ve maya benzeri oluşumlar göstermektedir (Hansson ve diğ., 1989). Bu küflerin oluşturduğu lipidin %30'lara varan seviyelerde GLA içerdiği ve GLA üretiminde kullanılabildiği belirtilmektedir (Hansson ve Dostalek, 1988; Emelyanova, 1996; Sajbidor ve diğ., 1988; Graille, 1996; Lindberg ve Hansson, 1991). *Mucor* sp. gibi yüksek GLA içeriğine sahip küflerden lipit üretimi bitkisel tohumlardan GLA eldesine alternatif oluşturmaktadır (Emelyanova, 1996). *Mucorales* cinsi küflerin türlere ve sıcaklık başta olmak üzere gelişme koşullarına bağlı olarak yüksek EPA ve AA verimine sahip oldukları tespit edilmiştir (Bajpai ve Bajpai, 1993).

Mortierella cinsi küflerin de GLA üretimi açısından uygun olduğu belirtilmektedir (Hansson ve Dostalek, 1988; Graille, 1996). Ayrıca bu küflerden DHGLA, AA ve EPA da üretilebilmektedir (Bajpai ve Bajpai, 1993; Garille, 1996; Shimizu ve diğ., 1991; Yamada ve diğ., 1987; Shimizu ve diğ., 1989a; Shimizu ve diğ., 1989b; Shimizu ve diğ., 1989c; Shinmen ve diğ., 1989; Zhu ve diğ., 2002). Bu küfler triaçilgliserol tip yağ içinde yüksek oranda AA içermeleri nedeniyle önemli kaynaklardır (Certik ve Shimizu, 2000). GLA üretimi açısından da alternatif kaynak olma özelliğini taşıyan *Mortierella* cinsi küfler filamentli yapılarına bağlı olarak

zayıf gelişim ve karbon kaynaklarından düşük biyomas verimi gibi çeşitli dezavantajlara sahiplerdir (Hansson ve diğ., 1989).

Küflerden endüstriyel boyutta GLA üretimi ilk kez 1985 yılında *Mucor circinelloides* kullanılarak İngiltere'de gerçekleştirilmiştir ve üretim ürünün karlı olmaması nedeniyle ancak 1990 yılına kadar devam ettirilebilmiştir (Conti ve diğ., 2001; Certik ve Shimizu, 1999; Anderson ve Wynn, 2001). *Mortierella* ve *Mucor* türü küfler endüstriyel boyutta geliştirilerek yağ asidi üretimi sadece Japonya'da yapılmaktadır (Stredansky ve diğ., 2000b; Conti ve diğ., 2001).

Küflerden elde edilen lipitlerin yağ asitleri bileşimi türlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. *Aspergillus terreus* ve *Tolyposporium ehrenbergii,* yağ asidi bileşimi bitkisel yağlarınkine benzeyen lipit üretebilmektedir. Bununla birlikte küfler, rikinoleik asit gibi gıda olarak kullanılan yağın bileşiminde bulunması istenmeyen yağ asitleri de üretebilmektedir (Mukherjee, 2000). Ayrıca küflerden steroid, karotenoid ve fosfolipit gibi diğer tür lipitler de üretilebilmektedir (Graille, 1996).

Entomophthora cinsi küflerin kısa zincirli yağ asitleri (C 10:0, C 12:0), *Rhizopus* cinsi küflerin ise uzun zincirli yağ asitleri (C 20:0, C 22:0, C 24:0) ürettikleri belirtilmektedir (Hansson ve Dostalek, 1988). Saprolegniales ve Entomophthorales sınıfı küfler DHA üretebilmektedirler. *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304'ün toplam yağ asidinin yaklaşık %50'sinin DHA olduğu belirtilmektedir (Bajpai ve diğ., 1991b). *Pythium irregulare* EPA üretimi açısından önemli bir kaynak olarak gösterilmektedir (O'Brien ve diğ., 1993).

Küflerin düşük gelişme hızları, yüksek viskoziteleri ve filamentli yapıları lipit üretimi amacıyla besi ortamında geliştirilmelerinde çeşitli zorluklara neden olabilmektedir (Hansson ve Dostalek, 1988; Kendrick ve Ratledge, 1992b).

Mayalar, lipit üretimi açısından yüksek gelişme hızı ve fermentörlerde kolay gelişme gösterdiklerinden dolayı üzerlerinde çok çalışılan mikroorganizmalardır (Graille, 1996; Hassan ve diğ., 1996; Whitworth ve Ratledge, 1974).

Mayaların gelişimi sonucunda homojen bir karışım meydana gelmektedir (Whitworth ve Ratledge, 1974). Yağca zengin mayalardan yüksek miktarda lipit üretimi mümkündür (Hassan ve diğ., 1996; Mukherjee, 2000). Elde edilen mikrobiyal lipidin yaklaşık %80-90'ını triaçilgliseroller oluşturmaktadır ve bu triaçilgliserol fraksiyonu bitkisel yağlara benzerlik göstermektedir (Hassan ve diğ.,

1996; Mittal, 1992; Mukherjee, 2000). Ayrıca mayalardan elde edilen yağların toksin ve alerjen içermedikleri de belirtilmektedir (Graille, 1996).

Mikrobiyal lipit üretimi açısından potansiyel kaynaklar olan bazı mayaların geliştirildiği substratlar ve lipit içerikleri Tablo 2.3'de verilmektedir (Atkinson ve Mavituna, 1991).

Tablo 2.3. Farklı substratlar üzerinde geliştirilen bazı mayalardan elde edilen toplam lipit miktarları(*)

Maya	Substrat	Toplam lipit (% kuru ağırlık)
Candida sp. No.107	Glikoz	42
	n-alkan	15-37
C. guilliermondii	n-alkan	30
C. intermedia	n-alkan	20
C. tropicalis	n-alkan	32
C. curvata D	Laktoz	58
Cryptococcus albidus	Glikoz-etanol	65
Cryptococcus terricolus	Glikoz	55-65
Hansenula anomala	Glikoz	17
Hansenula saturnus	Glikoz	28
Lipomyces sp.	Glikoz	67
	Ksiloz	48
Lipomyces lipofer	Glikoz	38
Lipomyces starkeyi	Laktoz	31
	Glikoz	31-38
Rhodotorula gracilis	Glikoz	64
	Şeker kamışı şurubu	67
	Etanol	62
	Sentetik etanol	60
	Alkan	32
Trichosporon pullulans	Etanol-glikoz	65

(*) Atkinson ve Mavituna, 1991; Mukherjee, 2000

Yağca zengin mayalar kakao yağı gibi yağlara benzer özellikte lipit üretiminde kullanılabilmektedir (Kavadia ve diğ., 2001; Gema ve diğ., 2002). *Candida curvata*'dan elde edilen trigliserit kakao yağınınkine benzer erime sıcaklığı aralığına sahiptir (Mittal, 1992).

Gelişme ortamında bulunan düşük azot miktarına bağlı olarak *Rhodotorula gracilis*'in gram kuru hücre ağırlığı başına %65 lipit ürettiği belirtilmektedir (Somashekar ve Joseph, 2000).

Cryptococcus curvatus glikoz, galaktoz, sakaroz ve laktoz gibi çeşitli karbon kaynaklarını yüksek verimde yağ asitlerine dönüştürme özelliğine sahip bir mayadır. *Cryptococcus curvatus* azotun sınırlı olduğu besi ortamlarında geliştirildiği takdirde kuru biyomas ağırlığı üzerinden %60'lara varan düzeylerde lipit üretebilmektedir. Elde edilen lipidin %90'ından fazlasını palm yağına benzer yağ asidi kompozisyonuna sahip triaçilgliserollerin oluşturduğu belirtilmektedir (Hassan ve diğ., 1994).

Belirli ortam koşulları sağlandığı takdirde mayalar önemli miktarlarda ergosterol gibi steroidler üretebilmektedirler. *Saccharomyces cerevisiae* yoğunlaştırılmış kültür ortamında geliştirilerek kuru biyomasda %7-10 oranında ergosterol elde edildiği belirtilmektedir (Graille, 1996).

Mayalar kullanılarak elde edilen yağların bileşimi düşük erime noktasına sahip palm yağı fraksiyonu olan "palm oleon"a benzemektedir (Mittal, 1992).

2.2.3. Algler ve Fitoplanktonlar

Algler ve fitoplanktonlar lipit üretimi açısından yüksek potansiyele sahip mikroorganizmalardır. Yağca zengin fitoplanktonların kuru ağırlık üzerinden %50'lere varan oranlarda lipit depoladıkları belirtilmektedir. Organik karbon kaynağı olmadan da gelişim gösterebilmeleri alg ve fitoplanktonlara büyük avantaj sağlamaktadır. Ozmotik basınca dayanıklı olan türler deniz suyunda dahi geliştirilebilmektedirler (Graille, 1996).

Chrysophyceae, Xanthophyceae ve Eustigmatophyceae sınıfı bazı alglere ait lipitlerin yüksek oranda EPA içerdiği saptanmıştır (Bajpai ve Bajpai, 1993). *Spirulina platensi*'nin içerdiği yağın yaklaşık %20'sinin GLA olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bazı algler önemli miktarlarda steroid üretebilmektedirler (Graille, 1996). Diatomlarda (Bacillariophyceae) temel çoklu doymamış yağ asidinin EPA olduğu belirtilmektedir (Bajpai ve Bajpai, 1993).

Alglerin gelişimleri için özel koşullara ve yağın eldesi için özel tekniklere gereksinim duyulmaktadır (Certik ve Shimizu, 1999). Mikroalglerin bir çoğu

fototrofik olup gelişmeleri için sadece ışık, karbondioksit ve diğer minerallere gereksinim duymaktadırlar (Cohen ve diğ., 1995).

Alglerden elde edilen yağların, balık yağlarına kıyasla daha temiz ve konsantre EPA ve DHA kaynakları olabileceği düşünülmektedir. Bu özelliklerinin yanı sıra algal biyomaslar, balıkların ω-3 çoklu doymamış yağ asidi üretimini artırmak amacıyla besin kaynağı olarak da kullanılabilirler (Cohen ve diğ., 1995).

2.3. Mikrobiyal Yağ Sentez Mekanizması

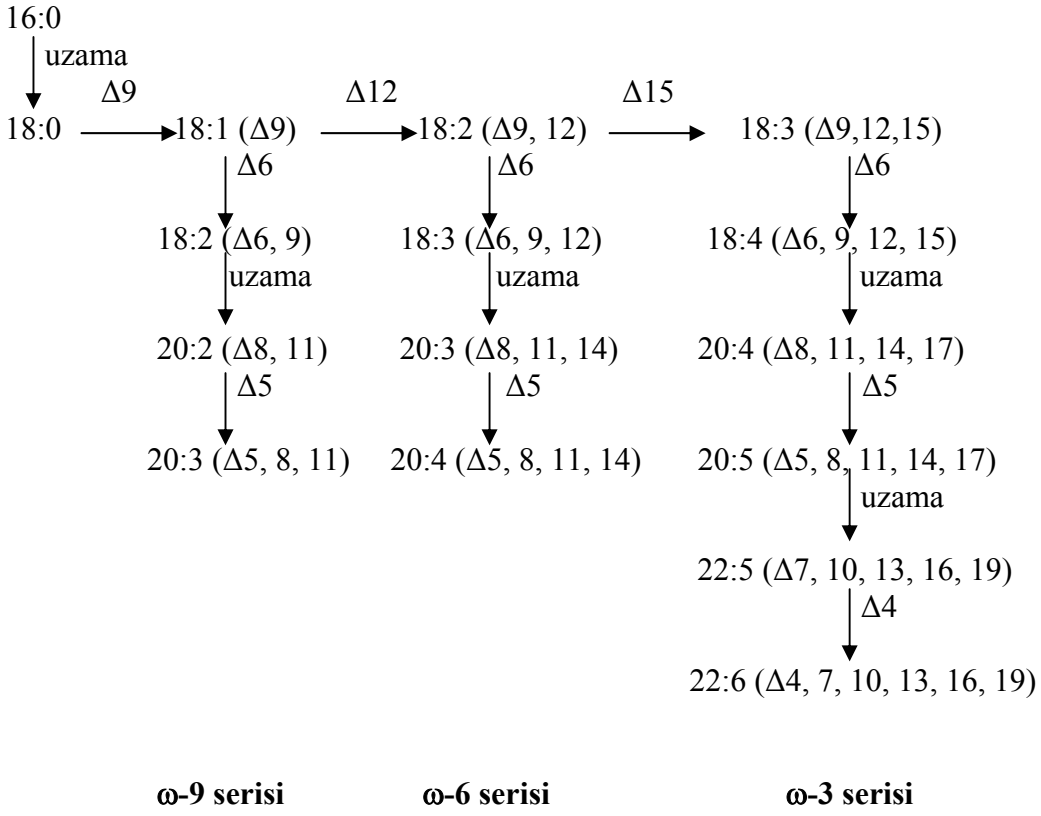
Doymuş yağ asidi biyosentezinin esas öncüsü karbonhidrat veya amino asit kaynaklarından türeyen acetyl-CoA'dır (Atkinson ve Mavituna, 1991). Bu nedenle sitoplazmik sitrattan acetyl-CoA oluşumu (Eşitlik 2.1) lipit üretiminin anahtar basamağını oluşturmaktadır ve reaksiyon sadece yağca zengin mikroorganizmalarda bulunan ATP sitrat liyaz enzimi varlığında gerçekleşebilmektedir (Graille, 1996).

$$\text{Sitrat} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{oksaloasetat} + \text{ADP} + \text{Pi} \qquad (2.1)$$

Yağ asidi sentezi reaksiyonu sitozol de gerçekleşmektedir. Reaksiyonun son ürünü diğer doymuş ve doymamış uzun zincirli yağ asitlerinin öncüsü olan palmitik asittir (Eşitlik 2.2) (Atkinson ve Mavituna, 1991).

$$\text{Acetyl-CoA} + 7\ \text{malonyl-CoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ H^{+} \longrightarrow \qquad (2.2)$$
$$(CH_3(CH_2)_{14}COOH) + 7CO_2 + 8\ \text{CoA} + 14\ NADP^{+} + 6H_2O$$

Yağ asitleri, acetyl-CoA ve malonyl-CoA'dan enzimler yardımıyla sentezlendikten sonra doymuş durumdadırlar. Bu aşamadan sonra çoklu doymamış yağ asitlerinin eldesinde iki temel reaksiyon rol oynar; doymuş yağ asitlerine, yağ asidi desaturazları ile çift bağ ilave edilir ve yağ asidi zincirleri bir C_2 biriminin bağlanmasıyla uzatılır (Anderson ve Wynn, 2001; Bajpai ve Bajpai, 1993). Palmitik asitten sonra ilk çift bağ yağ asidinin karboksil grubundan itibaren dokuzuncu karbonda, sonrasında ise ω-3, ω-6, ω-9 serilerini oluşturacak şekilde uygun karbonlarda yer bulur. Şekil 2.1.'de *de novo* sentezi sonrasında yağ asitlerinin modifikasyonunun şematik gösterimi yer almaktadır. Bu şekilde "Δ" şekli, desaturaz enzimini temsil etmektedir (Anderson ve Wynn, 2001).



Şekil 2.1. *De novo* sentezi sonrasında yağ asitlerinin modifikasyonunun şematik gösterimi (Anderson ve Wynn, 2001)

2.4. Mikroorganizmalardan Elde Edilen Lipidin Miktar ve Bileşimini Etkileyen Faktörler

Mikroorganizmalardan elde edilen yağın verimini ve bileşimini etkileyen bir çok faktör bulunmaktadır (Kennedy ve diğ., 1993; Graille, 1996; Hansson ve Dostalek, 1988). Mikroorganizmanın geliştirildiği ortam bileşimi ve geliştirilen mikroorganizmanın türü bu faktörlerin başında gelmektedir (Kennedy ve diğ., 1993; Hassan ve diğ., 1996; Bhatia ve diğ., 1972; Atkinson ve Mavituna, 1991). Yağca zengin mikroorganizmalar, metabolizmalarını kültür ortamına bağlı olarak ayarlama özelliğine sahiplerdir.

Yağ üretebilme özelliğine sahip mikroorganizmalar glikoz, fruktoz, sakaroz, maltoz ve ksiloz gibi farklı bir çok karbon kaynağı üzerinde gelişebilmektedir (Whitworth ve Ratledge, 1974; Kavadia ve diğ., 2001). Bunların yanı sıra asetik asit, etanol, lipitler ve yağların endüstriyel türevleri de mikroorganizmalardan yağ eldesinde karbon kaynağı olarak kullanılabilmektedir (Jeffery ve diğ., 1999). Biyokimyasal

açıdan bu karbon kaynakları, 6 karbonlu (glikoz, diğer şeker ve polisakkaritler) ve 2 karbonlu (asetik asit, etanol, lipitler) bileşikler şeklinde metabolize edilenler olarak gruplandırılabilmektedir (Kavadia ve diğ., 2001). Mikroorganizmalardan elde edilen yağın miktar ve bileşimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkilerinin incelendiği bir çok çalışma vardır (Chen ve Chang, 1996; Bajpai ve Bajpai, 1993). *Cunninghamella echinulata*'nın çözünür nişasta üzerinde geliştirilmesi sonucunda elde edilen lipit miktarının, diğer karbon kaynakları üzerinde geliştirilmesi sonucunda elde edilen lipit miktarına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Chen ve Chang, 1996). Glikoz, fruktoz, maltoz, nişasta ve gliserol *Mortierella*'dan AA üretiminde etkili karbon kaynaklarıdır (Bajpai ve Bajpai, 1993).

Temel karbon kaynağı dışında kültür ortamında bulunan diğer besin öğeleri de mikrobiyal lipit eldesini etkileyebilmektedir (Whitworth ve Ratledge, 1974).

Küfler başta olmak üzere mikroorganizmalardan elde edilen lipit miktar ve bileşimi geliştirildikleri ortamın azot içeriği, miktarı ve kaynağından etkilenmektedir. Ayrıca üretilen doymuş yağın doymamış yağa olan oranının da ortamda bulunan azot miktarından etkilendiği belirtilmektedir (Bajpai ve Bajpai, 1993). Küf ve mayaların spesifik azot kaynağı gereksinimleri sentezlenen lipit miktar ve bileşimi üzerine etkili olmakta, ancak farklı mikroorganizmaların azot kaynağı değişimine karşı verdikleri farklı tepkiler nedeniyle bir genelleme yapılamamaktadır (Bhatia ve diğ., 1972). Karbon azot oranı (C:N) yüksek tutulan besiyerlerinde geliştirilen mikroorganizmaların yağca zengin biyomas oluşturdukları belirtilmektedir (Bajpai ve Bajpai, 1993; Karapınar, 1984). *Mortierella ramanniana* ile yapılan çalışmada yüksek C:N oranının elde edilen lipit miktarını artırdığı belirtilmektedir. Maya ekstraktı ve peptonun EPA üretimini artırdığı, ancak et ekstraktının, tripton ve kasamino asitlerin toplam lipit üretimini artırmalarına karşın EPA üretimini azalttıkları tespit edilmiştir (Bajpai ve Bajpai, 1993).

Mikroorganizmalardan lipit üretiminde çeşitli metal iyonlarının teşvik edici özellikleri olduğu saptanmıştır. *Euglena*'dan EPA üretiminin, mangan eksikliğinde azaldığı belirlenmiştir (Bajpai ve Bajpai, 1993).

Bu bilgilerin dışında lipit biyosentezinin mikroorganizmanın gelişimi sırasında olduğu, yağ birikiminin ise karbon kaynağı dışında bir besin öğesinin eksikliğinde artış gösterdiği belirtilmektedir (Karapınar, 1984). Mikroorganizmalardan yağ eldesi

için genellikle ortamda bulunan azot miktarı sınırlandırılmaktadır. Fosfat, sülfat, demir ve magnezyum gibi diğer besin öğelerinin de azalması bazı mikroorganizmalarda yağ üretimini teşvik edebilmektedir (Atkinson ve Mavituna, 1991; Karapınar, 1984).

Sıcaklık, mikroorganizmalardan elde edilen yağın yağ asidi kompozisyonunu ve lipit doymamışlık derecesini etkileyen bir faktördür (Kennedy ve diğ., 1993; Graille, 1996; Hansson ve Dostalek, 1988; Kendrick ve Ratledge, 1992a; Cohen ve diğ., 1995). Mikroorganizmaların çevresel koşullara adaptasyonunu sağlayan membran lipit kompozisyonu inkübasyon sıcaklığından etkilenmektedir (Conti ve diğ., 2001). Membran lipit yağ asidi doymamışlık derecesinin gelişme sıcaklığındaki düşüşe bağlı olarak arttığı düşünülmektedir ve bu durum siyanobakteriler (cyanobacteria), ökaryotik algler, mayalar ve küflerde tespit edilmiştir (Cohen ve diğ., 1995). Buna örnek olarak termofilik küflerden elde edilen yağ asitlerinin mezofilik küflerden elde edilenlere kıyasla daha doymuş bir yapıya sahip olmaları, psikrofilik mikroorganizmaların ise mezofiliklere göre 20°C'nin altında inkübasyonları sonucunda daha yüksek oranda doymamış yağ asidi üretmeleri verilebilir (Kendrick ve Ratledge, 1992a; Bajpai ve Bajpai, 1993). Aynı şekilde EPA üretiminin düşük inkübasyon sıcaklıklarında daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır (Bajpai ve Bajpai, 1993). Sıcaklık değişiminin, mikroorganizma gelişme hızını ve ortamda bulunan çözünmüş oksijen konsantrasyonunu etkileyerek dolaylı yoldan yağ asidi profilinin değişimine neden olduğu düşünülmektedir (Kendrick ve Ratledge, 1992a). Bu durum, çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki düşüşün oksijen elde edilebilirliğini azaltmasına bağlı olarak oksijene bağlı yağ asidi doyurma mekanizmasının etkilenmesi şeklinde özetlenebilmektedir (Cohen ve diğ., 1995).

Kültür ortamının C:N oranı, pH, sürfektan ilavesi, oksijen varlığı/havalandırma, yağ asidi üretimini teşvik edici maddelerin ilavesi, inkübasyon süresi, organizmanın gelişme hızı ve içinde bulunduğu gelişme dönemi mikroorganizmalardan elde edilen lipidin miktar ve bileşimini etkileyen diğer faktörler arasında yer almaktadır (Kennedy ve diğ., 1993; Graille, 1996; Hansson ve Dostalek, 1988; Chen ve Chang, 1996).

Substrat olarak yağların kullanımı mikroorganizmalardan yeni ve doymamış özellikteki yağ asitlerinin elde edilmesini teşvik edebilmesi açısından büyük ilgi çekmektedir (Graille, 1996; Certik ve diğ., 1997). Besiyerine yağ ilavesinin

küflerden elde edilen lipit miktarını artırdığı ve yağ asidi bileşimini değiştirdiği tespit edilmiştir (Certik ve diğ., 1997). Palm yağı gibi doymuş özellikteki bir yağdan yüksek teknik özelliğe sahip doymamış yağlar üretilebilmektedir. Küf ve mayalardan GLA üretiminde LA içeriği yüksek yağların substrat olarak kullanımı verim artışı sağlamıştır (Graille, 1996). Temel yağ asidi olarak (yaklaşık %58 oranında) ALA içeren keten tohumu yağının *Mortierella*'dan EPA üretimi için en uygun karbon kaynağı olduğu belirtilmektedir (Bajpai ve Bajpai, 1993).

2.4.1. Uygun Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi

Uygun mikroorganizma türünün belirlenmesi ve geliştirme şartlarının ayarlanması mikroorganizmalardan lipit eldesinde çalışmaların büyük oranda yoğunlaştığı konular olup uygulanan ekstraksiyon yöntemleri üzerine olan ilgi nispeten daha azdır (Certik ve Shimizu, 1999; Certik ve diğ., 1996). Ancak mikroorganizmaların gelişimi sonucu elde edilen biyomasdan lipit ekstraksiyonu, mikrobiyal lipit eldesinde önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Uygulanan ekstraksiyon yöntemi lipit verim ve yağ asidi kompozisyonunu etkileyebilmektedir (Certik ve diğ., 1996; Somashekar ve diğ., 2001).

Mikrobiyal biyomasdan lipit ekstraksiyonu ve saflaştırılması sırasında çeşitli sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Walker ve diğ., 1999; Certik ve diğ., 1996). Lipit ekstraksiyonunda oluşan temel problemin lipolizis olduğu belirtilmektedir (Certik ve diğ., 1996). Etkili bir ekstraksiyon yönteminin lipolizisi önleyici, otooksidatif indirgenme reaksiyonlarını ise minimize edici nitelikte olması gerekmektedir (Certik ve Shimizu, 1999).

Uygun ekstraksiyon yönteminin seçimi çalışılan mikroorganizmanın türüne, örneğin kimyasal yapısına ve ekstraktın kullanım alanına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Certik ve diğ., 1996; Certik ve Shimizu, 1999). Hücrelerden lipit ekstrakte edilebilirliği, hücrelerin ve içerdiği lipitlerin özelliğine bağlı olup lipitlerin heterojen bileşikler olması ekstraksiyonlarının güç olmasına neden olmaktadır (Certik ve diğ., 1996).

Mikrobiyal lipit eldesinde çoğunlukla ekstraksiyon yöntemi olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklardan yağ eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır (Certik ve Shimizu, 1999; Certik ve diğ., 1996). Ancak mikroorganizmaların hücre yapıları bitkisel ve hayvansal dokulardan farklı

olduğundan bu yöntemlerin uygulanması sırasında çeşitli problemler ortaya çıkabilmektedir (Certik ve Shimizu, 1996). Genel olarak lipit ekstraksiyonu için kullanılan çözgen karışımları, lipit ve proteinler arasındaki hidrojen bağları ve iyonik güçleri koparacak alkolleri içermektedir (Certik ve diğ., 1996). Hücrelerden lipit ekstraksiyonunda dehidrasyon, protein denaturasyonu ve lipit kompleksleri ve proteinler arasındaki hidrojen bağının degradasyonu, polar ve polar olmayan çözgenlerin kombinasyon halinde kullanımı ile sağlanabilmektedir. Ayrıca kullanılan çözgenler ekstrakte edilen lipitlerle kimyasal reaksiyona girmeyecek özellikte olmalıdır (Certik ve diğ., 1996). Elde edilen lipit, gıda ve ilaç sanayinde kullanılabileceğinden dolayı seçilen çözgenlerin toksisitesi ve güvenliği büyük önem taşımaktadır (Certik ve diğ., 1996; Certik ve Shimizu, 1999). Küflerin hücre duvarlarının kalın olmasına bağlı olarak lipit ekstraksiyonu için daha iyi yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Somashekar ve diğ., 2001).

Lipit ekstraksiyonunda kullanılan çözgenler, polaritelerine bağlı olarak hücrelerde bulunan toplam lipidin içerdiği farklı sınıflarını (fosfolipitler, triaçilgliseroller, diaçilgliseroller, serbest yağ asitleri, sterol esterleri) belirli oranlarda ekstrakte ettiklerinden dolayı ekstrakte edilen lipidin yağ asidi bileşimini etkileyebilmektedirler (Certik ve diğ., 1996).

Polar özelliği yüksek olan çözgenlerin doymamış yağ asitlerinin ekstraksiyonu için, polar özelliği daha düşük olan çözgenlerin ise uzun karbon zincirli yağ asitlerinin ekstraksiyonu için uygun olduğu belirtilmektedir. Kloroform:metanol (2:1, v/v) ekstraksiyonu biyolojik yapılardan yüksek lipit verimi sağladığı için genel olarak lipit ekstraksiyonu için standart yöntem olarak kabul edilmektedir (Folch ve diğ., 1956). Kloroform özellikle polar olmayan bileşiklerin, metanol ise polar bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun çözgenlerdir (Certik ve diğ., 1996). Yapılan bazı çalışmalarda ise ekstraktının temel olarak nötral lipitleri (trigliseritler) içermesi nedeniyle hekzan çözgen olarak tercih edilmiştir (Kavadia ve diğ., 2001; Certik ve diğ., 1996). Gema ve diğ. (2002) tarafından portakal kabuğundan *Cunninghamella echinulata* ile GLA üretimi amacıyla yapılan çalışmada lipit ekstraksiyonunun ikinci basmağında lipit olmayan kısmın uzaklaştırılması için hekzan kullanılmıştır (Gema ve diğ., 2002).

Somashekar ve diğ. (2001) tarafından yapılan çalışmada, kloroform/metanol (2:1) ekstraksiyonu, hekzan/izopropanol (3:2) ekstraksiyonu ve çözgen olarak hekzanın

kullanıldığı Soxhelet ekstraksiyonu yöntemlerinin farklı küflerden elde edilen yağın verimi ve yağ asidi kompozisyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu yöntemlerin içersinde kloroform/metanol (2:1) yönteminin yağ asidi eldesi için en uygun yöntem olduğu saptanmıştır (Somashekar ve diğ., 2001). Süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyonun, çözgenlerin kullanımına alternatif oluşturduğu belirtilmektedir (Walker ve diğ., 1999).

2.5. Mikroorganizmalardan Lipit Üretim Yöntemleri

Daldırma yöntemi ve katı faz fermantasyon yöntemi mikroorganizmalardan lipit üretimi için geliştirilmiş yöntemlerdir (Certik ve Shimizu, 1999).

2.5.1. Daldırma Yöntemi

Daldırma yöntemi; ortam bileşimi sabit tutularak, sıvı substrat üzerinde, ortama hava verilerek ve karıştırılarak fermentörlerde gerçekleştirilen bir yöntemdir. Uygun ön işlemlerin ardından, substrat istenen koşullarda yığın veya sürekli fermantasyona tabi tutulabilir (Certik ve Shimizu, 1999).

2.5.2. Katı Faz Fermantasyon Yöntemi

Katı faz fermantasyon yöntemi, mikroorganizmaların substrat ya da hareketsiz destek olarak kullanılan nemli katı bir yüzey üzerinde geliştirildiği bir fermantasyon tekniğidir (Emelyanova, 1996; Stredansky ve diğ., 2000a; Stredansky ve diğ., 2000b; Sato ve Sudo, 1999; Pandey, 1992).

Geleneksel gıdaların ve alkollü içeceklerin üretimi için geliştirilmiş bir yöntem olan katı faz fermantasyonu bunların yanı sıra biyokimya ve ilaç endüstrisinde de kullanılabilmekte, organik atıklar kullanılabilir ürünlere dönüştürülebilmektedir (Sato ve Sudo, 1999; Pandey, 1992). Bu teknik özellikle talebin kısıtlı olduğu ürünlerin küçük ölçekli üretiminde kullanılmaktadır (Emelyanova, 1996). Araştırmacıların bu teknik üzerine ilgileri biyomas enerji korunumundaki yeni gelişmeler, katı atıkların değerlendirilebilmesi ve ikincil metabolitlerin üretilebilmesi nedeniyle artmıştır (Pandey, 1992). Ancak katı faz fermantasyon yönteminde yüksek hacimli biyoreaktörlerle çalışmanın güç olduğu belirtilmektedir (Pandey, 2000).

Katı faz fermantasyon yöntemiyle üretilebilen ürünler aşağıda özetlenmektedir (Pandey ve diğ., 2000; Sato ve Sudo, 1999; Pandey, 1992).

(i) Enzimler: α-amilaz, β-amilaz, glikoamilaz, selülaz, ksilanaz, β-glikosidaz, lakkaz, poligalakturanaz, ligninaz, pektinaz, glikoz oksidaz, proteaz, renin, asetoesteraz, α-arabinofuranosidaz, Li-peroksidaz, Mn-peroksidaz, katalaz, fenol oksidaz, proteaz (asidik, nötral ve alkali), lipaz, fitaz, tannas, glutaminaz, α-galaktosidaz, β-galaktosidaz,

(ii) Metabolitler: etanol, sitrik asit, fumarik asit, oksalik asit, laktik asit, gibberellik asit, gallik asit, L-glutamik asit, pigmentler, karotenoid, ksantan gam, aroma bileşikleri

(iii) Antibiyotikler: penisilin, tetrasilin, "cephalosporins", "iturin", "surfactin"

(iv) Gıda maddeleri: "natto", "tempeh", "tape", peynir, ekmek hamuru, "koji", "sake", soya sosu, "miso", "ragi"

(v) Tek hücre proteini

(vi) Biyopestisitler/biyoherbisitler

Bunlar dışında katı faz fermantasyon yöntemi mikrobiyal lipit üretimi açısından da alternatif oluşturmaktadır (Stredansky ve diğ., 2000a; Stredansky ve diğ., 2000b; Conti ve diğ., 2001; Gema ve diğ., 2002).

Katı faz fermantasyon yönteminde doğal ve sentetik maddeler substrat olarak kullanılabilmekte; maliyet ve elde edilebilirlik, uygun substratın seçiminde önem taşımaktadır (Pandey, 1992; Pandey ve diğ., 2000). Substrat mikroorganizmanın ihtiyacına göre içermediği diğer besin öğelerince de ayrıdan zenginleştirilebilir (Pandey ve diğ., 2000). Tahıllar, soya fasulyesi, gıda endüstrisi atık ve yan ürünleri katı faz fermantasyon yönteminde substrat olarak kullanılabilmektedir (Sato ve Sudo, 1999; Stredansky ve diğ., 2000a; Stredansky ve diğ., 2000b; Pandey ve diğ., 2000). Bu substratlar mikrobiyal gelişim ve metabolit üretimi açısından gerekli besinleri karşılayabilmeleri açısından önemlidir (Conti ve diğ., 2001; Pandey ve diğ., 2000). Tarımsal atıkların ve ucuz hammaddelerin kullanımı bu tekniği daha da çekici hale getirmektedir (Stredansky ve diğ., 2000a; Pandey, 1992). Kullanılan katı substratların genel olarak nem içerikleri düşüktür (Sato ve Sudo, 1999).

Substratların mikroorganizmalarca kullanılabilirliği çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerden etkilenebilmektedir. Substratın partikül büyüklüğü ve porozitesi mikroorganizma gelişimi ve aktivitesini etkileyen önemli faktörlerdir (Pandey, 1992;

Pandey ve diğ., 2000). Küçük partikül boyutu mikroorganizma gelişimi için daha geniş bir yüzey alanı oluşturabilmektedir. Ancak partiküllerin çok küçük olması topaklanmaya bağlı olarak mikrobiyal solunumu/havalandırmayı olumsuz yönde etkileyerek zayıf mikroorganizma gelişimine neden olabilmektedir (Pandey ve diğ., 2000; Sato ve Sudo, 1999). Büyük partikül boyutu daha iyi mikrobiyal solunum/havalandırma sağlayabilmekte ancak mikroorganizma gelişimi için yeterli yüzey alanını sağlayamamaktadır. Bu nedenlerden ötürü optimum partikül boyutunun ayarlanması önemlidir (Pandey ve diğ., 2000). Polimerleşme derecesi gibi substratın kimyasal yapısı da mikroorganizmaların gelişimi için önemli bir kriterdir (Pandey, 1992).

Katı faz fermantasyonunda mikrobiyal gelişim ve ürün oluşumu substratın yüzeyinde gerçekleşmekte, ancak heterojen bir ortam oluşmaktadır (Sato ve Sudo, 1999).

Uygun mikroorganizma türünün ve substratın seçimi; fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal proses parametreler katı faz fermantasyon yöntemini etkileyebilmektedir (Pandey ve diğ., 2000; Pandey, 1992).

Katı faz fermantasyon prosesi, doğal ve saf kültür (tek veya karışık kültür) katı faz fermantasyonu olmak üzere iki temel gruba ayrılabilmektedir. Doğal katı faz fermantasyon yönteminde substrat üzerinde bir çok mikroorganizma türü simbiyotik gelişme göstermektedir. Saf kültürler ise genellikle endüstriyel katı faz fermantasyonunda üretimde kontrolü sağlayabilmek için kullanılmaktadır (Pandey, 1992).

Bir çok mikroorganizma türü katı substratlar üzerinde gelişebilmektedir. Ancak katı faz biyoprosesi sırasında düşük miktarda su kullanılabilir durumda olduğundan bu proses için sıklıkla kullanılan mikroorganizma sınıfını ürettiği amilazla nişastayı (nişasta içeren substratlarda) indirgeyerek katı substrat içine girebilen küfler oluşturmaktadır (Pandey, 1992; Zheng ve Shetty, 2000; Sato ve Sudo, 1999). Düşük su aktivitesi (0.6-0.7) değerlerinde gelişebilen ve metabolik aktivitelerini sürdürebilen mikroorganizmaların katı faz fermantasyonu için uygun olabilecekleri belirtilmektedir. Küflerin arasında katı faz fermantasyonunda en sık kullanılan üç sınıfı Phycomycetes (*Mucor* ve *Rhizopus*), Ascomycetes (*Aspergillus* and *Penicillium*) ve Basidiomycetes (*Polyporus*) oluşturmaktadır (Pandey, 1992).

Katı faz fermantasyon yöntemi ile daha sık kullanılan daldırma yöntemi arasında çeşitli farklılıklar bulunmaktadır (Conti ve diğ., 2001; Sato ve Sudo, 1999). Ucuz hammadde, endüstriyel atık ve yan ürünlerin kullanılabilirliği bu tekniğin en önemli avantajlarından biri olup enerji ve kapital giderleri düşüktür (Conti ve diğ., 2001). Düşük su aktivitesine bağlı olarak katı faz fermantasyon yönteminde bakteriyel kontaminasyon riski düşüktür. Ayrıca ürünün ekstraksiyonu sırasında çözgen gereksinimi daldırma yöntemindekine kıyasla daha azdır (Sato ve Sudo, 1999).

Bu özelliklerin yanı sıra katı faz fermantasyon yönteminde substratın karıştırılması ve sıcaklık kontrolü güçtür. Mikrobiyal gelişim ve fermantasyon parametreleri hızlı bir şekilde tespit edilemez (Sato ve Sudo, 1999).

2.6. Turunçgil Posası ve Malt Küspesinin Fermantasyonda Kullanımı

Meyve ve sebzelerin işlenmesi sonucunda ortaya çıkan proses atıkları yüksek oranda katı süspansiyonlar içermektedir. Meyve, sebze işlem atıklarının biyokimyasal oksijen ihtiyaçları yüksektir. Meyve atıklarının kimyasal bileşimi meyvenin cinsine bağlı olarak değişmekle birlikte protein ve yağ içeriği düşük olup nem oranı %80-90 arasında değişmektedir. Bu atıkların büyük bir kısmını şekerler, azot ve selüloz lifler oluşturmaktadır (Thassitou ve Arvanitoyannis, 2001).

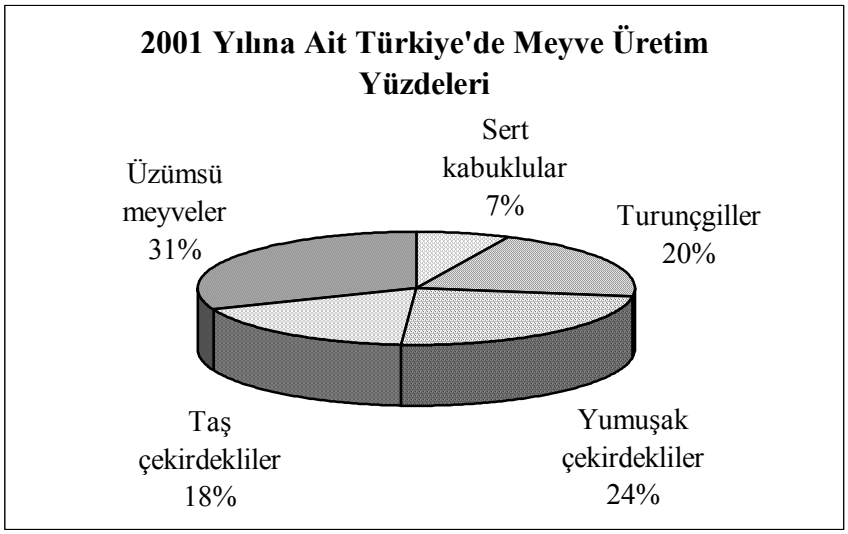
Akdeniz ülkeleri, Dünya'da en önemli turunçgil üreticilerini oluşturmaktadır (Karapınar ve Okuyan, 1982).

Turunçgil meyveleri meyve suyu, reçel gibi ürünlere işlendikten sonra ağırlıklarının yaklaşık %45-60'ı atılmaktadır ve ortaya çıkan bu atıklar kabuk, membran ve çekirdekleri içermektedir (Siliha ve diğ., 1999; Heerden ve diğ., 2002; Karapınar ve Okuyan, 1983; Karapınar ve Okuyan, 1982; Kimball, 1996). Bu atıklar karbonhidrat açısından zengin olup protein içerikleri düşük olmakla beraber kimyasal yapıları meyve çeşidine, yetiştirme koşulları ve hasat zamanına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Karapınar ve Okuyan, 1982; Kimball, 1996; Karapınar ve Okuyan, 1983). Yüksek su oranına sahip turunçgil atıkları, mikrobiyal bozulmaya elverişli ortam yarattığı için çevre kirliliğine sebep olabilmektedir (Karapınar ve Okuyan, 1983). Bu nedenle atıkların değerlendirilmesi çevre kirliliğinin önlenmesi ve ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır (Siliha ve diğ., 1999).

Kurutulmuş turunçgil posalarının hayvan yemi olarak kullanımı en önemli atık değerlendirme çalışmalarından biri olup bu uygulama Amerika Birleşik Devletleri'nde 1927'lere kadar uzanmaktadır (Kale ve Adsule, 1995; Karapınar ve Okuyan, 1983; Lopez ve diğ., 2000). Karbonhidrat içeriğinin yüksek olması bu atıkların hayvan beslenmesindeki değerini artırmaktadır (Karadeniz, 2002). Bunun yanı sıra melas, endüstriyel alkol, sirke, bütilen, laktik asit, soğuk preslenmiş yağ, d-limonen, lif, pektin ve flavanoidler turunçgil atıklarından elde edilebilen ürünleri oluşturmaktadır (Karadeniz, 2002; Heerden ve diğ., 2002).

Meyve posaları arasında yer alan turunçgil atıkları önemli atık materyallerdir. Turunçgil atıklarının mikrobiyal biyomas eldesinde substrat olarak kullanımı konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Karadeniz, 2002; Karapınar ve Okuyan, 1982; Heerden ve diğ., 2002). Portakal kabuğunun katı faz fermantasyon yöntemiyle proteince zenginleştirilmesi sonucunda hayvan yemi olarak besin değeri artırılmıştır (Karadeniz, 2002). Turunçgil atıkları üzerinde *Candida* geliştirilerek %18,5-22 protein içeren biyomas elde edilmiştir (Karapınar ve Okuyan, 1982).

Türkiye'deki meyve üretim yüzdeleri (2001 yılı) Şekil 2.2'de verilmektedir (Anonim, 2003b).



Şekil 2.2. Türkiye'de 2001 yılına ait meyve üretim yüzdeleri (Anonim, 2003b)

2001 yılında Türkiye'de üretilen elma ve greyfurt'un toplam meyve üretimine oranları sırasıyla %18,7 ve %1'dir. Üzüm üretimi bu yılda toplam 3,250,000 ton olup istatistiksel verilerde toplam meyve üretimine dahil edilmemiştir (Anonim, 2003b).

Malt küspesi, bira üretimi sonucunda ortaya çıkan bir atık olup süt verimini artırması amacıyla ineklerin beslenmesinde ve balık yetiştirilmesinde yem olarak kullanılabilmektedir. Ancak malt küspesinin selüloz miktarının yüksek olması, sütün besin maddeleri ve vitamin değeri açısından fakirleşmesine neden olduğundan tek başına yem olarak kullanılmamaktadır. Değerli besin içeriği nedeniyle mikroorganizma gelişimi için uygun bir ortam oluşturan malt küspesi çabuk bozulabilmektedir (Yazıcıoğlu, 1965). Yüksek miktarda selüloz ve diğer çözünmeyen polisakkaritleri içeren malt küspeleri ("spent malt grain") katı faz besi ortamlarının hazırlanması amacıyla farklı besi ortamları (elma posası, pirinç, arpa, darı, buğday, keten tohumu yağı, ay çiçek yağı, yer fıstığı yağı, hindistan cevizi yağı) içersine ilave edilmiştir (Stredansky ve diğ., 2000b; Conti ve diğ., 2001; Stredansky ve diğ., 2000a). Katı faz fermantasyonu için besi ortamına ilave edilen malt küspesi, katı yüzey ortamının gözenekli olmasını sağlayarak geliştirilen mikroorganizmanın oksijen elde edebilirliğini artırdığı belirtilmektedir (Stredansky ve diğ., 2000b).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Küf Kültürleri

Bu çalışmada kullanılan küf kültürleri TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü'nden liyofilize formda temin edilmiştir. Kullanılan küf kültürleri ve suş numaraları; *Mucor racemosus* (73364), *Mucor racemosus* (70095-3135-1), *Rhizopus oryzae* (70082-976-D1), *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1), *Rhizopus oryzae* (70084-930-D1) ve *Rhizopus oryzae* (70085-955-D1)'dir. Küfler Malt Ekstrakt Agar (MEA) (Merck, Darmstadt, Almanya) üzerinde aktif hale getirilmiş, ve 4°C' de muhafaza edilmişlerdir. Her inokülasyon öncesinde küfler MEA besi yeri içeren petriler içersinde (25°C/7 gün) tazelenmiştir.

3.1.2. Meyve Posaları

Çalışmada kullanılan greyfurt kabukları Penkon Penguen Konsantre San. A.Ş.'den ve malt küspesi Anadolu Efes Biracılık ve Malt Sanayi A.Ş.'den temin edilmiştir. Greyfurt kabukları ve malt posası analiz süresine kadar -18°C' de depolanmışlardır.

3.2. Metotlar

3.2.1. İnokulum Hazırlanması

MEA'da petriler üzerinde üretilmiş 7 günlük küf kültürleri 9 ml steril peptonlu suda süspanse edilerek spor süspansiyonları hazırlanmıştır.

3.2.2. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması

Küflerin geliştirildiği sıvı besi ortamı litrede; 95.75 g glikoz (Riedel-de Haen, Seelze), 7.02 g $(NH_4)_2SO_4$ (Merck, Darmstadt, Almanya), 6 g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Almanya), 1.2 g $MgSO_4.7H_2O$ (Merck, Darmstadt, Almanya), 1 g yeast

ekstrakt (Merck, Darmstadt, Almanya), 0.01 g $ZnSO_4.7H_2O$ (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 0.005 g $CuSO_4.5H_2O$ (Merck, Darmstadt, Almanya) içermektedir (Jackson ve diğ., 1998b; Samson ve diğ., 1995). Her bir test kültürü için hazırlanan spor süspansiyonlarından 2 ml alınarak, 100 ml besi ortamı içeren 500 ml'lik 6 erlene iki tekrarlı olacak şekilde küf inokülasyonu yapılmıştır. Erlenler 25°C'de 10 gün boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.3. Küflerin Sıvı Besi Ortamından Ayrılması

Sıvı besi ortamında inkübasyon süresince gelişen küfler, filtre kağıdıyla vakum altında filtrasyon (Sartorius AG, Goettingen, Almanya) yöntemiyle ayrılmıştır (Kendrick ve Ratledge, 1992a; Kavadia ve diğ., 2001; Kawashima ve diğ., 2000; Bajpai ve diğ., 1991b). Filtrasyon sonucunda elde edilen biyokütleler analiz süresine kadar -18°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.4. MEA Besiyerinin Hazırlanması

Hazırlanan MEA, 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 90 mm çaplı steril petrilere dağıtılmıştır. Her bir küf kültürü 10'ar adet petriye iki tekrarlı olacak şekilde inoküle edilmiştir ve 25°C'de 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişen küfler spatula ile kazınarak cam kavanozlarda toplanmış, lipit üretimi ve yağ asidi bileşimi açısından incelenmiştir (Totani ve Oba, 1987). Analize kadar geçen süre içersinde biyokütleler -18°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir.

3.2.5. Katı Faz Fermantasyon Besi Ortamının Hazırlanması

Katı faz besi ortamları, katı faz fermantasyonunun gerçekleştirileceği petrilere dağıtılmadan önce homojen bir karışımın sağlanması amacıyla ayrıdan hazırlanmıştır. Greyfurt kabukları, 1-4 mm çaplı olacak şekilde öğütülmüştür (Waring Commerical Blendor) (Gema ve diğ., 2002). Gryefurt posası, malt küspesi ve her ikisinin sırasıyla ağırlıkça 3:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan substratlar besin öğelerince zenginleştirilmiştir. Bu amaçla, katı substratlar %10 glikoz, %0,27 $NaNO_3$, %0,13 K_2HPO_4, %0,034 $MgSO_4.7H_2O$, %0,066 yeast ekstrakt, %0,108 $ZnSO_4.7H_2O$ ve %0,054 $CuSO_4.5H_2O$ içerecek şekilde ayrıdan hazırlanan besi çözeltisinden ilave edilmiştir (Stredansky ve diğ., 2000b; Samson ve diğ., 1995).

Katı faz besi ortamları hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika boyunca sterilize edilmiştir. Besiyeri aseptik koşullarda katı faz fermantasyon işleminin gerçekleştirileceği 90 mm çapında plastik petrilere, her bir petri her besi yerinden 25 g içerecek şekilde (2 tekrarlı) dağıtılmıştır (Emelyanova, 1996). *Mucor racemosus* (73364) ve *Rhizopus oryzae* (70085-955-D1) kültürlerinden hazırlanan spor süspansiyonlarından 2 ml alınarak (10^5-10^7 spor/ml) petrilere küf inokülasyonu yapılmıştır. Petriler 25°C'de 10 gün boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.6. Kuru Madde Değerlerinin Belirlenmesi

Kullanılan substratların ve elde edilen biyokütlelerin kuru madde değerleri 105°C de etüvde (Memmert UM 400) sabit tartıma getirilerek yapılmıştır (Pearson, 1976).

3.2.7. Toplam Azot ve Ham Protein Değerlerinin Belirlenmesi

Kullanılan substratların ve katı faz besiyerinde geliştirilerek elde edilen biyomasların azot tayini AOAC'nin 920.152 numaralı yöntemine uygun olarak Kjeldahl yöntemiyle VELP SCIENTIFICIA-UDK 126 A marka azot tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (AOAC, 1996b). Yöntemde katalizör olarak bakır sülfat ve potasyum sülfat kullanılmıştır. Örnekler 420°C'de 30 dakika süreyle yakılmış, hidroklorik asit ile titre edilerek sarfiyat bulunmuştur. Sarfiyat değeri kullanılarak saptanan azot değeri 6.25 faktörü ile çarpılarak toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.8. pH Ölçümleri

Sıvı besi ortamının inokülasyon öncesi ve inkübasyon sonrasındaki pH değerleri "Jenway, 3010 pH meter" (Jenway Ltd., İngiltere) pH metre cihazı ile ölçülmüştür.

3.2.9. Lipit Ekstraksiyonu

Katı faz fermantasyon besiyerinde geliştirilerek elde edilen biyokütleler homojenize (Arçelik Valso ARK 31 VS) edilmiştir. Kullanılan substratlardan ve elde edilen biyokütlelerden lipit, 33 ml/g koloroform:metanol (2:1, v/v) karışımı ile yaklaşık 12-15 saat boyunca oda sıcaklığında (20°C) ekstrakte edilmiştir (Waeltermann ve diğ., 2000; Kendrick ve Ratledge, 1992a; Stredansky ve diğ., 2000b). Ekstrakte edilen lipit susuz sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Sodyum sülfat süzüldükten sonra

çözgen, döner buharlaştırıcıda uçurulmuştur. Daha sonra 40 ml hekzan ilave edilerek lipit ikinci kez hekzana alınmıştır ve 60°'de sabit tartıma getirilen balonlara süzülmüştür. Çözgen uçurulduktan sonra balonlar tekrar 60°C'de sabit tartıma getirilerek lipit verimleri saptanmıştır (Gema ve diğ., 2002). Sıvı besi ortamında ve MEA üzerinde geliştirilerek elde edilen lipitlerin verimleri iki ekstraksiyon yöntemiyle de belirlenmiştir.

3.2.10. Yağ Asitleri Bileşiminin Belirlenmesi

Ekstrakte edilen yağlar metanollü NaOH ile 80°C'de 5-10 dakika ısıtılmış, BF_3/metanol kompleksi (Merck, Schuchardt, Almanya) ilavesi sonrası 2 dakika kaynatıldıktan sonra karışımdan metil esterleri heptan (Merck, Darmstadt, Almanya) ile ekstrakte edilmiştir ve alev iyonizasyon dedektörü bulunan GC Trace 2000 (İtalya) model gaz kromatografisi cihazına beslenmiştir (AOAC, 1996a; Stredansky ve diğ., 2000b). Kromatogramda yer alan piklerin tanımlanmasında yağ asidi metil ester karışımı standardı (Supelco, Amerika Birleşik Devletleri) ve "borage" yağı (Supelco, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır.

Film kalınlığı 0,25 μm (ZB-wax) olan 0,25 mm iç çaplı 30 m uzunluğunda kapiler yağ asidi kolonu (polietilen glikol) kullanılmıştır. 1 μL örnek, 165°C başlangıç fırın sıcaklığı ve 1:33 dağıtma oranında enjekte edilmiştir. Bu sıcaklıkta 3 dakika tutulmuştur, daha sonra kolon sıcaklığı dakikada 5°C artacak şekilde 220°C'ye çıkarılmıştır. Kolon sıcaklığı 220°C'de 1 dakika boyunca sabit tutulmuştur. Son basamakta kolon sıcaklığı tekrar dakikada 5°C artacak şekilde 225°C'ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta da 3 dakika tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak 50 cm/sn hızda helyum kullanılmıştır. Dedektör sıcaklığı 260°C'de ve enjektör sıcaklığı 250°C'de sabit tutulmuştur.

3.2.11. Toplam Karbonhidrat Tayini

Sıvı besi ortamlarının test kültürleri ile fermantasyonları öncesinde ve sonrasında toplam karbonhidrat miktarları fenol sülfürik yöntemi ile belirlenmiştir (Norris ve Ribbons, 1971). 20, 40, 60, 80 ve 90 μg/ml glikoz içeren standartlardan ve kör olarak kullanılan sudan deney tüplerine birer ml konmuştur. Üzerlerine 1 ml %5'lik (w/v) fenol çözeltisi ilave edilmiş, ardından hızlı bir şekilde 5 ml derişik sülfürik asit (Merck, Darmstadt, Almanya) konarak tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. 10 dakika

bekletme süresinin ardından tekrar karıştırılan tüpler 10-20 dakika daha bekletilmiş ve 488 nm'de spektrofotometrede (Phillips, PU8625, İngiltere) okunmuştur. Standartlara uygun sınırlar içersinde seyreltilen örneklere de aynı işlemler uygulanmıştır.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden iki farklı ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimlerinin ve katı substratlar üzerinde geliştirilen test kültürlerinin lipit verimlerinin kontrollerden istatistiksel açıdan farklı olup olmadığını test etmek amacıyla 0,05 önem düzeyinde tek yollu Anova testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sıvı Besi Ortamında ve MEA Besiyerinde Geliştirilen Test Kültürlerinin Lipit İçerikleri

MEA besiyerinde ve sıvı besi ortamında iki tekrarlı olacak şekilde geliştirilen *Mucor racemosus* (73364), *Mucor racemosus* (70095-3135-1), *Rhizopus oryzae* (70082-976-D1), *Rhizopus oryzae* (70083-947-D1), *Rhizopus oryzae* (70084-930-D1) ve *Rhizopus oryzae* (70085-955-D1) kloroform:metanol (2:1, v/v) (tek aşamalı) ve kloroform:metanol (2:1, v/v) ardından hekzanla (iki aşamalı) lipit ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulmuş, lipit içerikleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinin iki ekstraksiyon yöntemiyle saptanan lipit verimleri[a]

Test Kültürleri	**MEA besiyeri**	
	Tek aşamalı ekstraksiyon, toplam lipit/ kuru hücre ağırlığı (%)	**İki aşamalı ekstraksiyon, toplam lipit/ kuru hücre ağırlığı (%)**
Mucor racemosus 73364	15,686±1,389	8,397±0,155
Mucor racemosus 70095-3135-1	5,372[b]	2,922[b]
Rhizopus oryzae 70082-976-D1	7,813±0,593	3,037±0,809
Rhizopus oryzae 70083-947-D1	6,167±0,605	2,309±0,418
Rhizopus oryzae 70084-930-D1	6,339±0,200	3,664±0,372
Rhizopus oryzae 70085-955-D1	5,301[b]	1,922[b]

(a): veriler iki ayrı ölçümün ortalaması alınarak ve ± standart sapmaları ile birlikte belirtilmiştir.
(b): iki ayrı ölçüm olmadığı için standart sapma değerleri verilmemiştir.

MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinin verimleri üzerinde yapılan tek yollu Anova testi ile iki ekstraksiyon yönteminin değerlendirilen test kültürleri için lipit verimleri açısından fark yarattığı sonucuna ulaşılmıştır ($P<0,05$).

Tablo 4.2. Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinin iki ekstraksiyon yöntemiyle saptanan lipit verimleri[a]

Test Kültürleri	Sıvı besi ortamı	
	Tek aşamalı ekstraksiyon, toplam lipit/ kuru hücre ağırlığı (%)	**İki aşamalı ekstraksiyon, toplam lipit/ kuru hücre ağırlığı (%)**
Mucor racemosus 73364	15,490±1,508	8,808±2,621
Mucor racemosus 70095-3135-1	6,419[b]	3,215[b]
Rhizopus oryzae 70082-976-D1	29,842±1,066	12,063±1,456
Rhizopus oryzae 70083-947-D1	6,755[b]	2,969[b]
Rhizopus oryzae 70084-930-D1	22,055±1,392	12,052±2,277
Rhizopus oryzae 70085-955-D1	25,659±0,772	12,039±0,697

(a): veriler iki ayrı ölçümün ortalaması alınarak ve ± standart sapmaları ile birlikte belirtilmiştir.
(b): iki ayrı ölçüm olmadığı için standart sapma değerleri verilmemiştir.

Sıvı besi ortamında geliştirilen küfler için tek yollu Anova testinin uygulandığı *M. racemosus* 73364, *R. oryzae* 70082-976-D1, *R. oryzae* 70084-930-D1 ve *R. oryzae* 70085-955-D1 için iki ekstraksiyon yönteminin verim üzerine istatistiksel olarak fark yarattığı tespit edilmiştir ($P<0,05$).

İki farklı besiyerinin tek aşamalı ekstraksiyon sonucunda test kültürlerinin (*M. racemosus* 73364, *R. oryzae* 70082-976-D1, *R.oryzae* 70084-930-D1 ve *R. oryzae* 70085-955-D1) lipit verimleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılan tek yollu Anova testi sonucunda ise besiyerlerinin *M. racemosus* 73364'ün dışında lipit verimleri üzerinde farklılık yarattığı belirlenmiştir ($P<0,05$). Buna göre sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden *R. oryzae* 70082-976-D1, *R.oryzae* 70084-930-D1 ve *R. oryzae* 70085-955-D1'in lipit verimlerinin MEA besiyerinde geliştirilen küflerin lipit verimlerinden daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu

mikroorganizmalar için sıvı besi ortamının MEA besiyerinden lipit üretimi açısından daha uygun olduğu sonucuna varılabilmektedir.

Test edilen kültürler içersinde her iki ekstraksiyon yöntemiyle de kuru hücre ağırlığı üzerinden lipit verimleri en yüksek olanlar sıvı besi ortamı için *R. oryzae* 70082-976-D1 ve MEA besiyeri için *M. racemosus* 73364'tür. *M. racemosus* 73364'ün iki besi ortamında ve iki ekstraksiyon yöntemiyle de saptanan lipit verimlerinde farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).

Kavadia ve diğ. (2001) tarafından Zygomycetes sınıfı küflerin içinde yer alan *Zygorhyncus*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Mucor* ve *Cunninghamella* suşlarının karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı besi ortamında geliştirilmesi sonucunda kuru ağırlık üzerinden %10-28 arasında değişen lipit verimine sahip oldukları belirlenmiştir. Yapılan çalışmada sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinin *M. racemosus* 70095-3135-1 ve *R. oryzae* 70082-976-D1 dışında lipit içeriklerinin bu değerlerle uyum gösterdiği saptanmıştır. MEA besiyerinde geliştirilen küflerden belirtilen aralıkta lipit verimine sahip olan sadece *M. racemosus* 73364'tür. Sıvı besi ortamında geliştirilen *R. oryzae* 70082-976-D1, *R. oryzae* 70085-955-D1'in tek aşamalı ekstraksiyonları sonucu saptanan lipit verimleri glikoz ve maltozun substrat olarak kullanıldığı besi ortamlarında geliştirilen, kuru ağırlık üzerinden lipit verimleri sırasıyla %27 ve %20 olan *Rhizopus* sp. ve *R. arrhizus*'la benzerlik göstermektedir (Atkinson ve Mavituna, 1991). Bunun yanı sıra lipit üretimi açısından yapılan çalışmada incelenen mikroorganizmaların lipit verimlerinin yağca zengin mikroorganizmaların lipit verimlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir (Atkinson ve Mavituna, 1991; Karleskind, 1996; Mittal, 1992). Her iki besi ortamında da yüzey fermantasyonu uygulanmış; bu nedenle kaynaklarda belirtilen düzeylerde lipit verimi değerlerine ulaşılamamış olabilir.

4.2. Sıvı ve MEA Besiyerinde Geliştirilen Test Kültürlerinden Elde Edilen Lipitlerin Yağ Asidi Bileşimleri

Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden iki farklı yöntemle ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.1'de, MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinden iki farklı yöntemle ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri ise Tablo 4.4 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri

Yağ asidi bileşimi (%)	Test kültürleri ve ekstraksiyon yöntemi											
	1A	**1B**	**2A**	**2B**	**3A**	**3B**	**4A**	**4B**	**5A**	**5B**	**6A**	**6B**
Kaprilik asit (8:0)	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	0,15	-[a]
Kaprik asit (10:0)	2,55	2,77	2,51	3,11	0,24	0,30	0,35	0,36	0,25	0,19	0,29	0,07
Laurik asit (12:0)	5,23	4,77	3,86	3,40	0,24	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	0,03
Lauroleik asit (12:1)	0,69	0,83	0,74	1,38	0,43	0,31	0,44	0,40	0,38	0,25	0,34	0,28
Tridekanoik asit (13:0)	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	0,07	0,03	-[a]	-[a]
Miridtik asit (14:0)	8,51	8,29	8,59	8,53	0,93	0,65	0,55	0,65	0,50	0,54	0,33	0,38
Pentadekanoik asit (15:0)	0,14	0,08	0,49	0,95	0,50	-[a]	0,38	-[a]	0,34	0,05	0,29	0,10
Palmitik asit (16:0)	17,80	17,60	14,87	15,73	24,60	25,23	21,66	23,50	21,60	22,34	22,80	22,63
Palmitoleik asit (16:1)	5,20	5,85	4,58	4,47	1,89	1,10	1,51	1,62	1,58	1,41	1,10	1,01
Margarik asit (17:0)	1,35	0,78	0,66	0,83	0,26	-[a]	0,30	-[a]	0,45	0,12	0,20	0,06
Heptadesenoik asit (17:1)	-[a]	0,08	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]
Stearik asit (18:0)	8,12	7,63	11,57	11,14	15,83	16,76	18,91	19,11	13,08	12,67	14,63	14,73
Oleik asit (18:1)	21,11	21,51	29,44	28,49	38,43	39,99	36,64	36,71	39,75	40,86	39,76	40,48
Konjuge linoleik asit (18:2[*])	1,96	2,06	1,75	1,52	0,16	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	0,03	-[a]	-[a]
Linoleik asit (18:2)	16,77	17,20	11,63	12,03	10,70	10,83	13,44	13,52	15,00	16,12	14,58	14,91
Gama linolenik asit (18:3 ω6)	10,16	10,17	8,21	8,43	4,43	4,26	3,43	3,40	4,34	4,76	3,61	3,99
Alfa linolenik asit (18:3 ω3)	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	1,45	-[a]	0,08	-[a]
Araşidik asit (20:0)	0,16	0,14	0,45	-[a]	0,62	0,58	1,74	0,73	0,50	0,26	0,67	0,59
Ekosenik asit (20:1)	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	0,20	-[a]	-[a]	-[a]	0,23	0,15	0,46	0,11
Behenik asit (22:0)	0,25	0,24	0,65	-[a]	-[a]	-[a]	0,68	-[a]	0,50	0,22	0,71	0,26
Erüsik asit (22:1)	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	0,53	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	0,39

1: *M. racemosus* 73364, 2: *M. racemosus* 70095-3135-1, 3: *R. oryzae* 70082-976-D1, 4: *R. oryzae* 70083-947-D1, 5: *R. oryzae* 70084-930-D1, 6: *R. oryzae* 70085-955-D1, A: Tek aşamalı ekstraksiyon, B: İki aşamalı ekstraksiyon

[a] Yağ asidi bileşiminde bulunmamaktadır

Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden her iki ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilen lipitlerin incelenen yağ asidi bileşimlerinde yapılan tek yollu Anova testi ile farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$).

Tablo 4.2 ve Şekil 4.1'deki bulgular ışığında sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimlerinde başlıca yağ asitlerini palmitik asit, stearik asit, oleik asit ve linoleik asitin oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu temel yağ asitlerinden palmitik asit, toplam lipit içeriğinin %14,87-25,23'ünü, stearik asit %7,63-19,11'ini, oleik asit %21,11-40,86'sını ve linoleik asit %10,70-17,20'sini oluşturmaktadır. Glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada 28°C'de 6 gün boyunca inkübe edilen *M. rouxii*, *M. hiemalis* ve *Mucor* sp.'den ekstrakte edilen lipitlerin de yapısında bulunan temel yağ asitlerinin palmitik, stearik ve oleik asit olduğu tespit edilmiştir (Somashekar ve diğ., 2001).

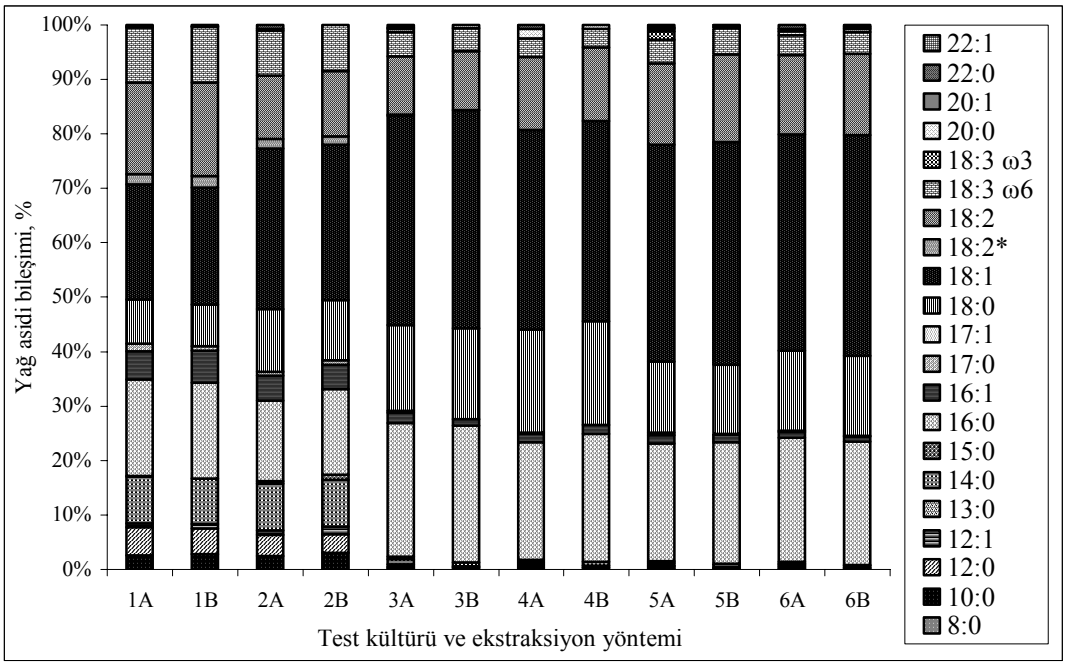
Lipit üretimi ve yağ asidi bileşimleri açısından sıvı besi ortamında gelişimi sonucu incelenen küflerin içerdikleri lipidin linoleik asit değerleri, Hansson ve diğ. (1989) tarafından sıvı besi ortamında geliştirilen *Mucor rouxii*'den elde edilen lipidin linoleik asit (%15-%21) miktarına yakındır. Jackson ve diğ. (1998a) tarafından gerçekleştirilen çalışmada sıvı besi ortamında geliştirilen *M. circinelloides*'in triaçilgliserol yapısında %34,2 oleik asit ve %14,2 linoleik asit içerdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan test kültürlerinden en yüksek oranda oleik asit (%38,43-40,86) içeriğine sahip lipit, *R. oryzae* 70082-976-D1, *R. oryzae* 70084-930-D1 ve *R. oryzae* 70085-955-D1'den elde edilmiş olup belirtilen oleik asit değerleri Jackson ve diğ. (1998a) tarafından bulunan değerden yüksektir. Ayrıca bu test kültürleri, tek aşamalı ekstraksiyonla kuru hücre ağırlığı üzerinden en yüksek lipit içeriğine sahip olanlardır.

Glikoz üzerinde geliştirilen *M. mucedo*, *M. plumbeus*, *M. ramanniana* ve *R. arrhizus*'dan elde edilen lipitlerin toplam yağ asidi bileşimlerinin %20,9-21,6'sını palmitik asidin ve % 36,9-41,2'sini oleik asidin oluşturduğu belirtilmektedir (Sajbidor ve diğ., 1988). Tablo 4.3'deki veriler ışığında *M. racemosus* 73364 ve *M. racemosus* 70095-3135-1'in palmitik asit ve oleik asit değerleri bu değerler kadar yüksek değildir.

Sıvı besi ortamında geliştirilen küflerden ekstrakte edilen lipitlerin %3,40-10,17 düzeyinde GLA içerdikleri saptanmıştır. Hansson ve diğ. (1989) tarafından yapılan

çalışmada sıvı besi ortamında geliştirilen *M. rouxii*'nin %19,8-39,7 oranında GLA içerdiği belirtilmektedir. Farklı karbon kaynakları üzerinde geliştirilen *M. mucedo*, *M. plumbeus*, *M. ramanniana* ve *R. arrhizus*'un lipit içeriklerinin %2,3-28,1'ini GLA'nın oluşturduğu belirlenmiştir (Sajbidor ve diğ., 1988). Bu çalışmada test edilen kültürlerden ekstrakte edilen lipitlerin yapılarında bulunan GLA miktarları Hansson ve diğ. (1989) tarafından belirtilen değerler kadar yüksek değildir, ancak Sajbidor ve diğ. (1988) tarafından saptanan değerler arasında bulunmaktadır. Test kültürleri arasında en yüksek GLA içeriğine sahip lipit *M. racemosus* 73364 tarafından üretilmiştir.

Kavadia ve diğ. (2001) tarafından yapılan çalışmada *Zygorhyncus* sp., *Rhizopus* sp. ve *Cunninghamella* sp.'den %15-20 düzeylerinde GLA üretilmiştir. GLA miktarının lipit verimiyle ters orantılı olduğu, yüksek lipit verimine sahip olan test kültürlerinin yapılarında düşük GLA içeriğine sahip oldukları belirtilmiştir (Kavadia ve diğ., 2001).



Şekil 4.1. Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden iki farklı yöntemle ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri. 1A: *M. racemosus* 73364-tek aşamalı ekstraksiyon, 1B: *M. racemosus* 73364-iki aşamalı ekstraksiyon, 2A: *M. racemosus* 70095-3135-1-tek aşamalı ekstraksiyon, 2B: *M. racemosus* 70095-3135-1-iki aşamalı ekstraksiyon, 3A: *R. oryzae* 70082-976-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 3B: *R. oryzae* 70082-976-D1-iki aşamalı ekstraksiyon, 4A: *R. oryzae* 70083-947-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 4B: *R. oryzae* 70083-947-D1-iki aşamalı ekstraksiyon, 5A: *R. oryzae* 70084-930-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 5B: *R. oryzae* 70084-930-D1-iki aşamalı ekstraksiyon, 6A: *R. oryzae* 70085-955-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 6B: *R. oryzae* 70085-955-D1-iki aşamalı ekstraksiyon.

Test kültürleri içersinde *M. racemosus* 73364, *M. racemosus* 70095-3135-1, *R. oryzae* 70082-976-D1 ve *R. oryzae* 70084-930-D1'in yağ asidi bileşimlerinde %0,03-2,06 oranında konjuge linoleik asit içerdiği belirlenmiştir. Ancak konjuge linoleik asidin *9c, 11t*-18:2; *9c, 11c*-18:2; *9t, 11t*-18:2; *10t, 12c*-18:2 gibi hangi izomerinin bulunduğu saptanmamıştır (Warwel ve Borgdorf, 2000).

Test edilen mikroorganizmaların sıvı besi ortamında gelişmeleri sonucu elde edilen lipitlerin araşidik asit ve behenik asit içerikleri bakımından balık yağlarının belirtilen yağ asitleri bileşimlerine yakınlık gösterdiği sonucuna varılmıştır (Erturhan, 2001).

Tablo 4.4 ve Şekil 4.2'deki veriler sonucunda MEA besiyerinde geliştirilen küflerden elde edilen lipitlerin yağ asidi bileşimlerinde temel yağ asitlerini palmitik asit, oleik asit ve linoleik asitin oluşturduğu belirlenmiştir. Bu temel yağ aditlerinden palmitik asitin toplam lipit içeriğinin %15,51-30,16'sını, oleik asitin %12,93-39,34'ünü ve linoleik asitin %7,20-21,49'unu oluşturduğu tespit edilmiştir. Ekstrakte edilen lipitler alfa linolenik asit (18:3 ω3) içermemektedir. MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinden en yüksek oranda oleik asit (%24,42-39,34) içeriğine sahip lipit, *M. racemosus* 73364 ve *M. racemosus* 70095-3135-1'den elde edilmiştir.

MEA üzerinde geliştirilen küflerden ekstrakte edilen lipitlerin yapıları içersinde %2,94-19,98 düzeyinde GLA içerdikleri tespit edilmiştir. Bu değerlerin Sajbidor ve diğ. (1988) tarafından saptanan değerler içersinde olduğu sonucuna varılmıştır. Test kültürleri arasında en yüksek GLA verimine sahip olan küfün *M. racemosus* 73364 olduğu belirlenmiştir.

MEA'da geliştirilen test kültürlerinden *M. racemosus* 73364'ün içerdiği lipitin iki aşamalı ekstraksiyonu sonucunda yağ asidi bileşiminde %0,36 oranında konjuge linoleik asit içerdiği saptanmıştır.

Oleik asidin farklı mikroorganizma suşlarından, farklı fermantasyon zamanlarında elde edilen yağların bileşiminde bulunan temel yağ asidi olduğu belirtilmektedir. Palmitik asit ise Zygomycetes sınıfı küflerde önemli düzeylerde (%20-%25) bulunmaktadır (Kavadia ve diğ., 2001). Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'deki veriler bu bilgilerle uyum göstermektedir.

Tablo 4.4. MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri

Yağ asidi bileşimi (%)	Test kültürleri ve ekstraksiyon yöntemi											
	1A	**1B**	**2A**	**2B**	**3A**	**3B**	**4A**	**4B**	**5A**	**5B**	**6A**	**6B**
Kaprik asit (10:0)	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	3,60	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]
Laurik asit (12:0)	-[a]	-[a]	3,55	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	7,87
Lauroleik asit (12:1)	1,19	1,06	4,27	5,24	13,31	10,09	5,54	10,20	8,52	-[a]	5,34	5,56
Tridekanoik asit (13:0)	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	2,95	-[a]	-[a]
Miridtik asit (14:0)	2,27	2,55	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	4,81
Pentadekanoik asit (15:0)	1,33	0,35	6,05	6,77	12,80	8,37	8,10	10,50	9,91	4,97	10,44	8,98
Palmitik asit (16:0)	20,08	20,75	15,51	15,71	22,33	16,74	30,16	16,14	19,88	22,59	21,27	20,01
Palmitoleik asit (16:1)	6,04	5,02	5,54	8,50	-[a]	-[a]	-[a]	6,60	6,24	-[a]	9,68	6,58
Margarik asit (17:0)	1,65	3,08	4,60	12,20	17,03	21,53	14,30	21,91	10,84	14,64	13,12	6,74
Stearik asit (18:0)	1,57	3,54	5,51	8,37	-[a]	-[a]	9,69	7,96	-[a]	7,01	-[a]	6,82
Oleik asit (18:1)	24,42	24,78	39,34	30,21	16,30	28,11	18,92	12,93	15,68	22,00	17,35	21,06
Konjuge linoleik asit (18:2[*])	-[a]	0,36	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]
Linoleik asit (18:2)	21,49	19,60	8,74	7,20	18,22	15,17	13,30	10,16	20,48	17,55	16,29	8,64
Gama linolenik asit (18:3 ω6)	19,98	18,92	6,89	5,81	-[a]	-[a]	-[a]	-[a]	8,46	8,29	6,51	2,94

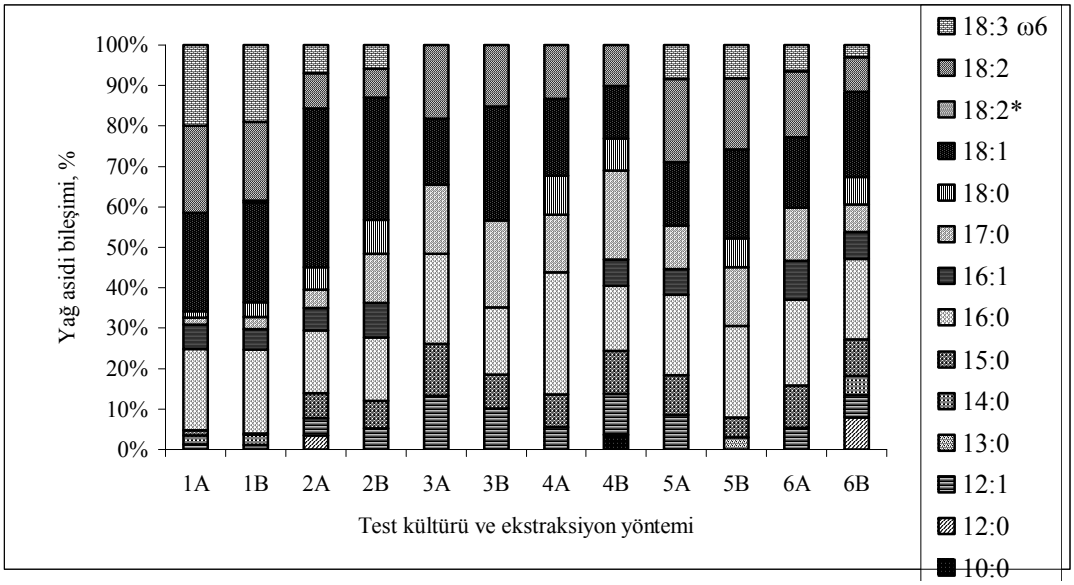
1: *M. racemosus* 73364, 2: *M. racemosus* 70095-3135-1, 3: *R. oryzae* 70082-976-D1, 4: *R. oryzae* 70083-947-D1, 5: *R. oryzae* 70084-930-D1, 6: *R. oryzae* 70085-955-D1, A: Tek aşamalı ekstraksiyon, B: İki aşamalı ekstraksiyon

[a] Yağ asidi bileşiminde bulunmamaktadır

Yapılan araştırmada her iki besi ortamında da geliştirilen test kültürlerine ait lipitlerin yağ asidi bileşimlerinin bitkisel yağlara benzerlik gösterdiği ancak hiç biriyle tam olarak örtüşmediği sonucuna varılabilmektedir.

Bitkisel yağların palmitik asit içerikleri %4-48 aralığında değişiklik göstermektedir. Sıvı besi ortamında geliştirilen küflerin yağ asidi bileşimlerinde palmitik asit toplam yağ asitlerinin yaklaşık %14,87-25,23'ünü oluşturmaktadır. Bu nedenle mikrobiyal lipitler palmitik asit içerikleri açısından kakao yağı, keten tohumu yağı ve zeytinyağına benzerlik göstermektedir (Potter ve Hotchkiss, 1995; Wang, 2002; Boskou, 2002). Tablo 4.3'de belirtildiği üzere mikrobiyal lipitlerin stearik asit içerikleri %7,63-19,11 düzeylerinde değişmektedir. Bitkisel yağların stearik asit içerikleri, kakao yağı dışında %6,5 seviyesinin üzerine çıkmadığından incelenen mikrobiyal lipitlerin stearik asit açısından bir çok bitkisel yağdan daha zengin olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir (Potter ve Hotchkiss, 1995; Wang, 2002; Boskou, 2002; Anonim, 2003a). Değerlendirilen lipitlerin oleik asit içerikleri, zeytinyağının oleik asit içeriği (%55-83) kadar yüksek olmamakla beraber ayçiçek yağının (%14-39,4) oleik asit miktarı düzeyinde olduğu saptanmıştır (Boskou, 2002; Anonim, 2003a).

MEA besiyerinde geliştirilen küflere ait lipitlerin oleik asit ve linoleik asit içerikleri ayçiçek yağının oleik asit ve zeytinyağının linoleik asit içeriklerine yakındır.



Şekil 4.2. MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinden iki farklı yöntemle ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri. 1A: *M. racemosus* 73364-tek aşamalı ekstraksiyon, 1B: *M. racemosus* 73364-iki aşamalı ekstraksiyon, 2A: *M. racemosus* 70095-3135-1-tek aşamalı ekstraksiyon, 2B: *M. racemosus* 70095-3135-1-iki aşamalı ekstraksiyon, 3A: *R. oryzae* 70082-976-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 3B: *R. oryzae* 70082-976-D1-iki aşamalı ekstraksiyon, 4A: *R. oryzae* 70083-947-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 4B: *R. oryzae* 70083-947-D1-iki aşamalı ekstraksiyon, 5A: *R. oryzae* 70084-930-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 5B: *R. oryzae* 70084-930-D1-iki aşamalı ekstraksiyon, 6A: *R. oryzae* 70085-955-D1-tek aşamalı ekstraksiyon, 6B: *R. oryzae* 70085-955-D1-iki aşamalı ekstraksiyon.

4.3. Katı Faz Fermantasyon Besi Ortamlarının Fermantasyon Öncesi ve Sonrası Lipit İçerikleri

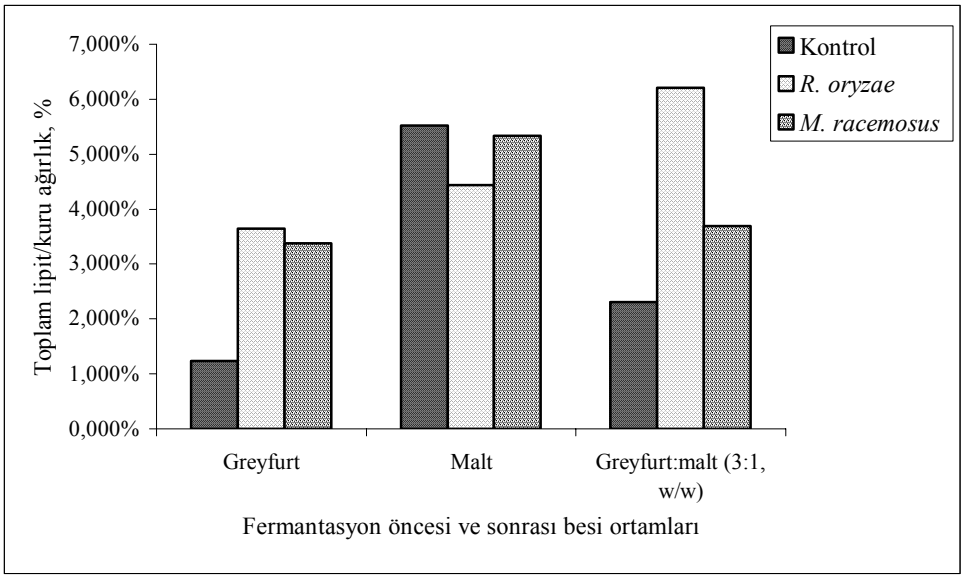
Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde hazırlanan katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi, *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ve *Mucor racemosus* 73364 test kültürleri ile 25°C'de 10 gün boyunca inkübasyonları sonrası elde edilen biyokütlelerin lipit içerikleri Tablo 4.5 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4'teki veriler değerlendirildiğinde katı faz fermantasyon yöntemi kullanılarak greyfurt, malt ve greyfurt: malt (3:1, w/w) üzerinde geliştirilen *R. oryzae* 70085-955-D1 ve *M. racemosus* 73364 suşlarının, malt haricinde diğer besi ortamlarının tümünde lipit ürettikleri sonucuna ulaşılabilmektedir. Belirtilen substratlar üzerinde geliştirilen küflerden *R. oryzae* 70085-955-D1'in, *M. racemosus* 73364'ten greyfurt ve greyfurt: malt (3:1, w/w) besiyerlerinin her ikisinde de daha fazla lipit ürettiği saptanmıştır ($P<0,05$).

Tablo 4.5. Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi, *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ve *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonucu lipit içerikleri

Katı faz besi ortamı	**Fermantasyon öncesi, iki aşamalı ekstraksiyon, toplam lipit/ kuru ağırlık (%)**	***Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ile fermantasyon sonrası, iki aşamalı ekstraksiyon, toplam lipit/ kuru ağırlık (%)**	***Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyon sonrası, iki aşamalı ekstraksiyon, toplam lipit/ kuru ağırlık (%)**
Greyfurt	1,230±0,134	3,642±0,315	3,378±0,285
Malt	5,526±0,332	4,442±0,217	5,333±0,522
Greyfurt:malt (3:1, w/w)*	2,306	6,210±1,252	3,687±0,232

* Hesap yoluyla bulunmuştur.



Şekil 4.3. Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi, *R. oryzae* 70085-955-D1 ve *M. racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonucu lipit içerikleri.

R. oryzae 70085-955-D1 ve *M. racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonrası greyfurtun kuru ağırlık üzerinden toplam lipit içeriğinin %196 ve %175 oranında, greyfurt:malt'ın (3:1, w/w) lipit içeriğinin ise sırasıyla %169 ve %60 oranında arttığı belirlenmiştir. Malt küspesinde bulunan bileşiklerin mikroorganizmaların gelişimi için yeterli düzeyde asimile edilebilir özellikte olmaması, sadece malt içeren besi ortamında test kültürlerinin lipit üretememelerinin sebebi olabilir (Stredansky ve diğ., 2000b).

Katı faz fermantasyon yöntemiyle farklı substratlar üzerinde çeşitli küf kültürleri geliştirilerek lipit üretimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Conti ve diğ., 2001; Gema ve diğ., 2002; Stredansky ve diğ., 2000a; Stredansky ve diğ., 2000b; Emelyanova, 1996). Nemlendirilmiş hububat (arpa, darı, buğday ve pirinç) üzerinde *Cunninghamella elegans* geliştirilmesi sonucu kuru ağırlık üzerinden %9,7-15,8 aralığında değişen lipit elde edildiği belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada harcanmış malt küspesi ve arpanın ağırlıkça 1:3 ve 1:5 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan besi ortamında 21°C'de 7 gün boyunca inkübe edilen *C. elegans*, %11 ve %12,6 düzeyinde lipit üretmiştir. Malt küspesinin arpaya ağırlıkça olan oranının artırılmasının substratın kullanımını artırdığı tespit edilmiştir (Conti ve diğ., 2001). Portakal kabuğunun %1 oranında glikoz ve %0,05 oranında $(NH_4)_2SO_4$ ile zenginleştirilmesiyle elde edilen substrat üzerinde *C. echinulata*'nın geliştirilmesi sonucunda poratakal kabuğunun lipit içeriği %4,4'ten %22,3 seviyesine çıkmıştır (Gema ve diğ., 2002). Elma posasına 3'de 1 oranında malt küspesi ilavesi ile hazırlanan substrat üzerinde *Mortierella*, *Cunninghamella* ve *Thamnidium* suşlarının geliştirilmesi sonucunda fermente edilmiş biyokütlenin kuru ağırlığı üzerinden %15-17,2 aralığında lipit içerdiği belirlenmiştir (Stredansky ve diğ., 2000b). Arpa ve buğday üzerinde *Cunninghamella japonica*'nın geliştirilmesi sonucunda elde edilen biyokütlelerin lipit içerikleri sırasıyla %5,02 ve %5,16 olarak bulunmuştur (Emelyanova, 1996).

Bu çalışmada katı faz fermantasyonu sonucu elde edilen veriler diğer kaynaklarla içerik ve benzerlik açısından kolay kıyaslanabilecek durumda değildirler. Ancak greyfurt, malt ve greyfurt:malt (3:1, w/w) substratlarının üzerinde geliştirilen test organizmalarının hiç birinin kaynaklarda belirtilen düzeylerde lipit üretimi sağlayamadığı, bu çalışmada saptanan lipit verimlerinin sadece Emelyanova (1996) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına yakın olduğu belirlenmiştir. *R. oryzae* 70085-955-D1 test kültürünün greyfurt:malt (3:1, w/w) üzerindeki lipit üretiminin sadece greyfurtun substrat olarak kullanıldığı besi ortamındaki lipit üretiminden daha yüksek olduğu sonucuna varılabilmektedir.

Daha önce de belirtildiği üzere mikroorganizmalardan lipit üretimi bir çok faktörden etkilenebilmektedir. Substrat bileşimi, nem, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, çalışılan mikroorganizma ve havalandırma bu faktörler arasında yer almaktadır (Stredansky ve diğ., 2000a; Stredansky ve diğ., 2000b). Katı faz fermantasyon sunucunda lipit

verimlerinin düşük olması test kültürlerinin substratları yeterince kullanamamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu faktörlerden biri veya bir kaçı yapılan çalışmada lipit verimlerinin düşük çıkmasına neden olmuş olabilir.

Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi ve *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ve *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonları sonrası iki aşamalı ekstraksiyonları sonucu elde edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi ve *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ve *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonları sonrası iki aşamalı ekstraksiyonları sonucu elde edilen lipidlerin yağ asidi bileşimleri

Yağ asidi bileşimi (%)[a]	Katı faz besi ortamı								
	Greyfurt			Malt			Greyfurt /malt (3:1, w/w)		
	A	B	C	A	B	C	A[b]	B	C
8:0	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]	0,10	-[c]
10:0	-[c]	2,50	0,52	0,38	1,14	0,37	0,23	1,10	0,64
12:0	-[c]	-[c]	0,06	0,06	-[c]	0,47	0,04	-[c]	-[c]
12:1	2,06	4,53	1,70	0,68	2,72	0,97	1,23	1,84	1,75
13:0	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]	0,30	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]
14:0	-[c]	1,48	1,03	0,56	0,48	0,61	0,34	0,53	0,91
15:0	3,55	4,54	1,99	0,65	3,02	1,02	1,81	1,86	1,94
16:0	19,78	18,65	17,07	23,15	19,49	26,91	21,80	20,30	21,26
16:1	3,33	3,67	4,60	0,71	3,54	1,67	1,76	2,14	3,78
17:0	8,26	4,59	4,53	1,07	3,19	1,14	3,95	2,75	3,28
17:1	-[c]	-[c]	0,39	0,05	-[c]	0,70	0,03	-[c]	0,38
18:0	20,82	6,19	7,76	2,41	6,17	3,60	9,78	5,49	5,32
18:1	23,39	32,97	36,38	13,18	15,86	14,76	17,27	29,62	24,87
18:2*	-[c]	-[c]	0,09	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]	-[c]
18:2	11,60	14,33	12,91	49,28	34,30	39,40	34,19	27,48	25,44
18:3 ω6	-[c]	2,35	6,48	-[c]	4,45	4,03	-[c]	2,70	6,64
18:3 ω3	5,79	3,33	2,05	4,89	1,82	2,77	5,25	2,21	1,74
20:0	-[c]	0,21	0,72	0,35	0,94	0,45	0,21	0,49	0,59
20:1	1,43	0,66	1,33	0,99	1,72	0,95	1,17	0,94	1,01
22:0	-[c]	-[c]	0,39	0,32	0,84	0,19	0,19	0,46	0,47
22:1	-[c]	-[c]	-[c]	1,28	-[c]	-[c]	0,77	-[c]	-[c]

A: Fermantasyon öncesi
B: *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ile fermantasyonları sonrası
C: *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonları sonrası

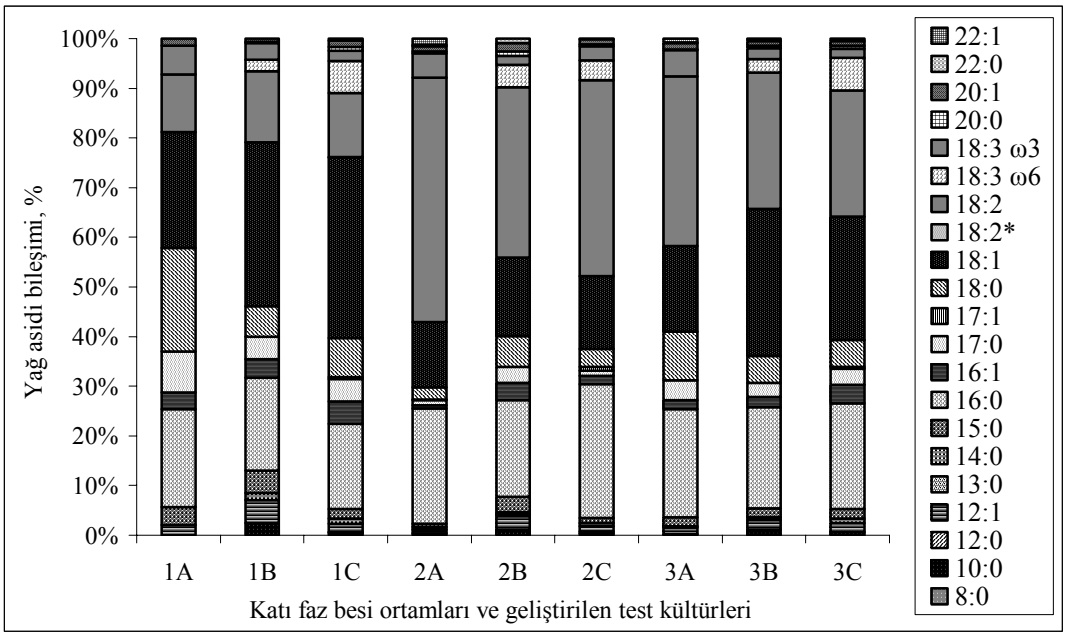
[a] 8:0, kaprilik asit; 10:0, kaprik asit; 12:0, laurik asit; 12:1, lauroleik asit; 13:0, tridekanoik asit; 14:0, miristik asit; 15:0, pentadekanoik asit; 16:0, palmitik asit, 16:1, palmitoleik asit; 17:0, margarik asit; 17:1, heptadesenoik asit; 18:0, stearik asit; 18:1, oleik asit; 18:2*, konjuge linoleik asit; 18:2, linoleik asit; 18:3 ω6, gama linolenik asit; 18:3 ω3, alfa linolenik asit; 20:0, araşidik asit; 20:1, ekosenoik asit; 22:0, behenik asit; 22:1, erusik asit

[b] Hesap yoluyla bulunmuştur.

[c] Yağ asidi bileşiminde bulunmamaktadır.

Substratların belirtilen test kültürleri ile fermantasyonları sonrasında yağ asidi bileşimlerinin değiştiği saptanmıştır. Greyfurt posasının içerdiği lipitin fermantasyon öncesi kaprilik asit, kaprik asit, laurik asit, tridekanoik asit, miristik asit, heptadesenoik asit, konjuge linoleik asit, GLA, araşidik asit, behenik asit ve erusik asit içermediği ancak her iki test kültürüyle de fermantasyonu sonrası elde edilen

lipitin kaprik asit, miristik asit, GLA ve araşidik asit içerdiği; laurik asit, heptadesenoik asit, konjuge linoleik asit ve behenik asitin ise sadece *M. racemosus* 73364'le fermantasyonu sonucunda oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca palmitik asit, margarik asit, stearik asit, ALA ve ekosenoik asit miktarlarının incelenen küflerle fermantasyon sonucu azaldığı; palmitoleik asit, oleik asit ve linoleik asit miktarlarının ise arttığı belirlenmiştir. Bu artışlar içersinde en dikkat çekici olanın *R. oryzae* 70085-955-D1 ve *M. racemosus* 73364'le fermantasyon sonucu %23,39'dan %32,97 ve %36,38 seviyelerine ulaşan oleik asit olduğu soncuna ulaşılmıştır. Arpa, buğday, darı ve pirincin *Cunninghamella japonica* ile katı faz fermantasyonu sonunda da elde edilen lipitin yağ asidi içeriğinde linoleik asit ve oleik asitin miktarının fermantasyon öncesine göre arttığı belirtilmektedir (Emelyanova, 1996).



Şekil 4.4. Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi (A) ve *R. oryzae* 70085-955-D1 (B) ve *M. racemosus* 73364 (C) ile fermantasyonları sonrası iki aşamalı ekstraksiyonları sonucu elde edilen lipidlerin yağ asidi bileşimleri. 1: Greyfurt, 2: Malt, 3: Greyfurt:malt (3:1, w/w)

Katı substratların fermantasyon öncesi yağ asitleri bileşiminde GLA içermedikleri saptanmıştır. Greyfurt posası, malt küspesi ve greyfurt-malt karışımının her iki test kültürüyle de fermente edilmesi sonucunda tamamının yağ asitleri bileşiminde GLA içerdikleri belirlenmiştir. Buna göre greyfurt üzerinde *R. oryzae* 70085-955-D1 küfünün geliştirilmesi sonucunda elde edilen lipidin yapısında %2,35 oranında, *M. racemosus* 73364 küfünün geliştirilmesi sonucunda elde edilen lipidin yapısında ise %6,48 oranında GLA içerdiği ve bu miktarın diğerine göre daha yüksek olduğu

saptanmıştır (P<0,05). Greyfurt ve malt karışımının da substrat olarak kullanılması sonucunda *M. racemosus* 73364'ün GLA üretiminin *R. oryzae* 70085-955-D1'e göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (P<0,05). Malt posasının her iki küfle fermantasyonu sonucunda ekstrakte edilen lipitlerin yapısında içerdikleri GLA miktarları arasında farklılık bulunmamıştır (P>0,05).

Katı faz fermantasyon yöntemiyle küflerden lipit üretimi konusunda Gema ve diğ. (2002) tarafından yapılan çalışmada fermantasyon öncesi portakal posasının GLA içermediği ancak *C. echinulata* ile fermantasyonları sonrasında %5,1-5,6 oranında GLA içerdikleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada greyfurt ve greyfurt:malt üzerinde geliştirilen *R. oryzae* 70085-955-D1'in GLA üretiminin Gema ve diğ. (2002) tarafından belirtilen değerler kadar yüksek olmadığı ancak *M. racemosus* 73364'ün GLA üretiminin aynı substratlar için bu değerlerden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Malt posası üzerinde geliştirilen her iki test kültürünün de GLA üretiminin, belirtilen değerlerden düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Gema ve diğ., 2002). Katı substrat olarak arpa, buğday, darı ve pirincin kullanıldığı bir çalışmada *C. japonica*'nın toplam yağ asidi bileşimi üzerinden %9,3-21,4 düzeylerinde GLA ürettiği belirtilmektedir (Emelyanova, 1996). Bu çalışmada saptanan GLA oranlarının hiç biri, Emelyanova (1996) tarafından belirtilen değerlerin seviyesine ulaşamamıştır. Elma posasının ağırlıkça 3:1 oranında malt posası ile karıştırılması sonucunda elde edilen substratın *Mortierella isabelina*, *C. echinulata*, *C. elegans* ve *Thamnidium elegans* ile fermantasyonu sonucunda içerdikleri lipidin yağ asitleri bileşiminde %4,23-7,53 oranında GLA bulunduğu tespit edilmiştir (Stredansky ve diğ., 2000b). Greyfurt posası ve greyfurt:malt posasının *R. oryzae* 70085-955-D1 ile fermantasyonu sonucu elde edilen biyokütlenin içerdiği GLA miktarı dışında saptanan diğer GLA değerlerinin belirtilen aralıkta olduğu sonucuna varılmıştır (Stredansky ve diğ., 2000b). Portakal posasının azot ve glikoz ile zenginleştirilmesi sonucunda GLA üretiminin arttığı belirtilmektedir (Gema ve diğ., 2002).

Katı substrat olarak sadece malt üzerinde geliştirilen *R. oryzae* 70085-955-D1 kaprik asit, lauroleik asit, pentadekanoik asit, palmitoleik asit, margarik asit, stearik asit, oleik asit, araşidik asit, ekosenoik asit ve behenik asit dışında kalan diğer yağ asitlerinin miktarlarının azalmasına neden olmuştur. *M. racemosus* 73364'le fermentasyonu sonucunda ise fermente edilmiş malt posasından elde edilen lipitin kaprik asit, linoleik asit, ALA, araşidik asit, ekosenoik asit ve behenik asit

içeriklerinin fermente edilmemiş malt posasına göre daha az olduğu saptanmıştır. Ayrıca greyfurt:malt karışımının her iki test kültürüyle de fermantasyonu sonucunda kaprik asit, lauroleik asit, miristik asit, pentadekanoik asit, palmitoleik asit, oleik asit, araşidik asit ve behenik asit içeriklerinin arttığı belirlenmiştir.

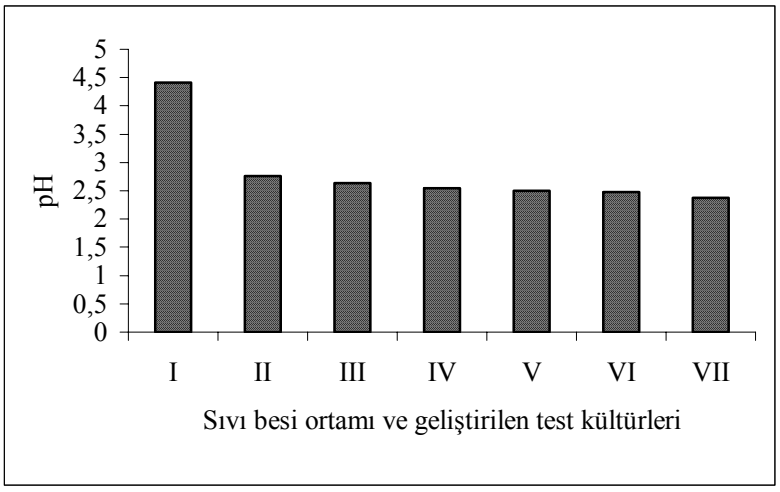
4.4. Fermantasyon Sonrası Sıvı Besi Ortamının pH Değişimi

Test kültürleri, sıvı besi ortamında 25°C'de 10 gün inkübe edildikten ve fermantasyon bitiminde test kültürleri ortamdan filtrasyonla ayrıldıktan sonra sıvı besi ortamlarının ölçülen pH değerleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Fermantasyon sonrasında sıvı besi ortamlarının ölçülen pH değerleri

Mikroorganizmalar	**pH(*)**
Mucor racemosus 73364	2,76
Mucor racemosus 70095-3135-1	2,64
Rhizopus oryzae 70082-976-D1	2,54
Rhizopus oryzae 70083-947-D1	2,5
Rhizopus oryzae 70084-930-D1	2,48
Rhizopus oryzae 70085-955-D1	2,375

(*) Sıvı besi ortamının başlangıç pH değeri: 4,41



Şekil 4.5. Fermantasyon sonrasında sıvı besi ortamlarının ölçülen pH değerleri. I: İnkübasyon öncesi besi ortamı, II: *M. racemosus* 73364, III: *M. racemosus* 70095-3135-1, IV: *R. oryzae* 70082-976-D1, V: *R. oryzae* 70083-947-D1, VI: *R. oryzae* 70084-930-D1, VII: *R. oryzae* 70085-955-D1.

Çalışmada yapılan pH ölçümlerinde, 10 günlük fermantasyon süresinin bitiminde sıvı besi ortamlarının hepsinin pH değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. pH değerindeki azalmanın en fazla *R. oryzae* 70085-955-D1 test kültürü için olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizma gelişiminin ilk aşamasında, sitrik asit olması muhtemel organik asit üretiminin arttığı; sonrasında ise oluşan organik asitin mikroorganizma tarafından tekrar tüketilebildiği belirtilmektedir (Gema ve diğ., 2002). *Rhizopus* test kültürlerinin geliştirildiği sıvı besi ortamlarının pH değerlerindeki düşüşlere laktik asit üretimi de neden olmuş olabilir, çünkü *Rhizopus* suşları laktik asit üretimi açısından potansiyel kaynak olarak belirtilmektedir (Kristofikova, 1991).

4.5. Katı Faz Fermantasyon Besi Ortamlarının *Rhizopus oryzae* ve *Mucor racemosus* ile Fermantasyonları Sonucunda Toplam Azot ve Protein Miktarlarındaki Değişim

Katı faz fermantasyonunda test kültürlerinin geliştirilmesi için kullanılan substratların ve fermantasyon sonucunda elde edilen biyomasların toplam azot ve protein miktarları Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir ve belirlenen değerler Tablo 4.8'de verilmiştir.

Katı faz fermantasyonu için kullanılan substratların kuru ağırlık üzerinden toplam azot içeriklerinin test kültürlerinin her ikisiyle de fermantasyonu sonucunda arttığı ve bu artışın malt dışında diğer substratlar için *M. racemosus* 73364'le fermente edilenlerde *R. oryzae* 70085-955-D1'le fermente edilenlere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

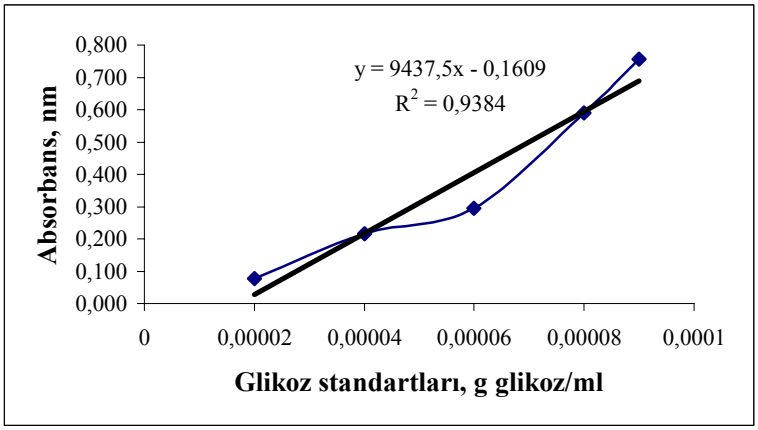
Tablo 4.8. Katı faz besi ortamlarının fermantasyon öncesi ve fermantasyon sonrası toplam azot ve protein değerleri

Katı faz besi ortamı	Toplam azot / kuru ağırlık (%)	Protein / kuru ağırlık (% w/w)
Greyfurt, fermantasyon öncesi	0,572	3,575
Greyfurt, *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ile fermantasyonu sonrası	0,690	4,312
Greyfurt, *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonrası	0,927	5,796
Malt, fermantasyon öncesi	2,250	14,063
Malt, *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ile fermantasyonu sonrası	3,768	23,550
Malt, *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonrası	3,700	23,128
Greyfurt:malt (3:1, w/w), fermantasyon öncesi*	0,992*	6,201*
Greyfurt:malt (3:1, w/w), *Rhizopus oryzae* 70085-955-D1 ile fermantasyonu sonrası	1,865	11,655
Greyfurt:malt (3:1, w/w), *Mucor racemosus* 73364 ile fermantasyonu sonrası	2,022	12,640

* Hesap yoluyla bulunmuştur.

4.6. Fermantasyon Sonrası Besi Ortamlarında Toplam Karbonhidrat Değişimi

20, 40, 60, 80 ve 90 µg glikoz içeren standartlar kullanılarak 488 nm'de ölçülen absorbans değerleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bu grafiğe göre ml'deki glikoz miktarı (g) ile absorbans (nm) arasındaki ilişki Eşitlik 4.1 ile ifade edilmiştir.



Şekil 4.6. Glikoz standartlarına karşılık gelen absorbans değerleri

$$y = 9437,5x - 0,1609 \quad (4.1)$$

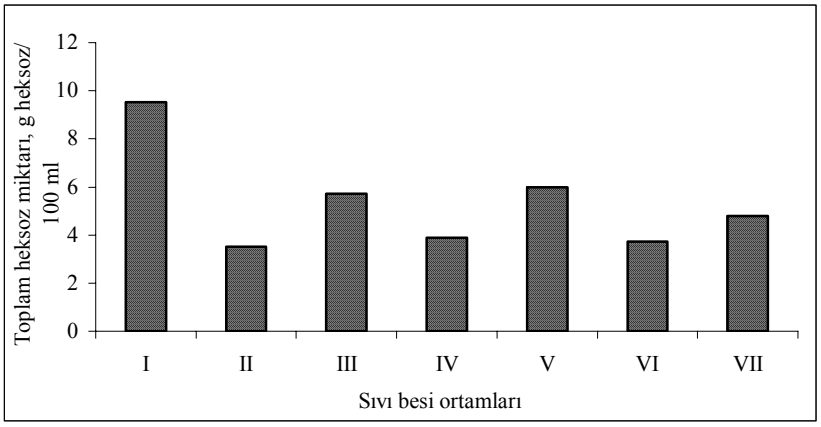
Eşitlik 4.1'de y değeri 488 nm'de okunan absorbans değerini, x değeri ise ml'deki glikoz miktarını (g) ifade etmektedir.

Sıvı besi ortamlarının test kültürleri ile fermantasyonları öncesinde ve sonrasında fenol sülfürik yöntemi ile belirlenen toplam heksoz miktarları Tablo 4.9 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.9. Fermantasyon sonrası sıvı besi ortamlarının ölçülen toplam heksoz değerleri

Test Kültürleri	**Toplam heksoz miktarı(*) (g/100 ml)**	**Toplam heksoz miktarındaki azalma (%)**
Mucor racemosus 73364	3,5	63,244
Mucor racemosus 70095-3135-1	5,71	40,049
Rhizopus oryzae 70082-976-D1	3,89	59,183
Rhizopus oryzae 70083-947-D1	5,99	37,101
Rhizopus oryzae 70084-930-D1	3,73	60,797
Rhizopus oryzae 70085-955-D1	4,79	49,672

(*) Sıvı besi ortamının test kültürleri ile fermantasyonları öncesi saptanan toplam heksoz miktarı: 9,52 g/100 ml



Şekil 4.7. Fermantasyon sonrasında sıvı besi ortamlarının saptanan toplam heksoz miktarları. I: İnkübasyon öncesi besi ortamı, II: *M. racemosus* 73364, III: *M. racemosus* 70095-3135-1, IV: *R. oryzae* 70082-976-D1, V: *R. oryzae* 70083-947-D1, VI: *R. oryzae* 70084-930-D1, VII: *R. oryzae* 70085-955-D1.

Sıvı besi ortamında bulunan toplam heksozun test kültürleri tarafından %37,1-%63,2 düzeylerinde kullanıldığı tespit edilmiştir. Besi ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan glikozu en fazla *M. racemosus* 73364'ün tükettiği (%63,244) saptanmıştır. Toplam heksoz miktarlarındaki en düşük azalma yüzdeleri %37,1'lik azalma ile *R. oryzae* 70083-947-D1 ve %40'lık azalma ile *M. racemosus* 70095 test kültürlerine ait olduğu belirlenmiştir. Bu test kültürleri, sıvı besi ortamında en düşük lipit verimine sahip olanlardır.

Sıvı besi ortamlarında test kültürlerinin gelişimi sonrası gerçekleştirilen toplam karbonhidrat tayini sonucunda her besi ortamında önemli miktarda karbonhidratın kullanılmadan kaldığı tespit edilmiştir. Bu duruma, inkübasyon süresinin toplam karbonhidratın tüketimi açısından yeterli olmaması veya mikroorganizmaların gelişmelerinin kültür ortamında kısıtlanması neden olarak gösterilebilir. Mikroorganizmaların gelişimlerini, fermantasyon sırasında organik asit üretimine bağlı olarak besi ortamının pH değerinin düşmesi kısıtlamış olabilir (Stredansky ve diğ., 2000b).

5. SONUÇ

Bu çalışmada sıvı besi ortamında, MEA besiyerinde ve farklı katı substratlar üzerinde çeşitli *Mucor* ve *Rhizopus* kültürleri geliştirilerek lipit üretimleri ve yağ asitleri bileşimleri açısından incelenmiştir. Test kültürlerinin 25°C'de 10 gün inkübasyonunun ardından sıvı besi ortamlarının pH ve toplam karbonhidrat değerlerindeki değişimler, katı substratların ise toplam azot miktarı ve toplam karbonhidrat miktarlarındaki değişimler tespit edilmiştir.

Sıvı besi ortamı ve MEA üzerinde geliştirilen küflerden lipit ekstraksiyonu için kullanılan iki ekstraksiyon yönteminden tek aşamalı olanının (kloroform:metanol, 2:1 v/v) sonucunda elde edilen lipit veriminin iki aşamalı ekstraksiyon (kloroform:metanol, 2:1 v/v ve hekzan) sonucunda elde edilen lipit veriminden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sıvı besi ortamında *R. oryzae* 70082-976-D1'in, MEA besiyerinde ise *M. racemosus* 73364'ün lipit üretimi açısından en yüksek verimi verdikleri saptanmıştır. Her iki besi ortamında da *M. racemosus* 73364'ün lipit içeriklerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme içersine alınan diğer test kültürlerinin (*R. oryzae* 70082-976-D1, *R. oryzae* 70084-930-D1 ve *R. oryzae* 70085-955-D1) lipit verimlerinin ise sıvı besi ortamı için daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimlerinde temel yağ asitlerini palmitik asit, stearik asit, oleik asit ve linoleik asitin oluşturduğu; MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimlerinde ise temel yağ asitlerini palmitik asit, oleik asit ve linoleik asit oluşturduğu belirlenmiştir. Sıvı besi ortamında ve MEA besiyerinde geliştirilen test kültürlerinin önemli miktarlarda esansiyel yağ asitlerinden linoleik asit içerdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca sıvı besi ortamında geliştirilen küflerden elde edilen lipitlerin yapısında %3,40-10,17 düzeyinde, MEA besiyerinde geliştirilen küflerden elde edilen lipitlerin yapısında ise %2,94-%19.98 düzeyinde GLA içerdikleri belirlenmiştir. Sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden *M.*

racemosus 73364, *M. racemosus* 70095-3135-1, *R. oryzae* 70082-976-D1 ve *R. oryzae* 70084-930-D1'in ve MEA besiyerinde geliştirilen *M. racemosus* 73364'ün konjuge linoleik asit içerdiği saptanmış, ancak hangi izomerinin bulunduğu belirlenmemiştir. Veriler ışığında test kültürlerine ait lipitlerin yağ asidi bileşimlerinin bitkisel yağlara benzediği ancak hiç biriyle tamamen aynı yapıda olmadığı sonucuna varılmıştır.

Katı faz fermantasyon işlemi için greyfurt posası, malt posası ve her ikisinin sırasıyla ağırlıkça 3:1 oranında karıştırılması ve çeşitli bileşenlerle zenginleştirilmesi sonucu elde edilen substratlar kullanılmıştır. Hazırlanan substratlar üzerinde *R. oryzae* 70085-955-D1 ve *M. racemosus* 73364 test kültürleri geliştirildikten sonra elde edilen biyokütleler lipit üretimi açısından değerlendirilmiştir. Buna göre malt posası dışında diğer substratlar üzerinde lipit üretimi gerçekleştiği ancak verimlerin katı faz fermantasyonla lipit üretimi yapılan çalışmalarda bulunan verimlerle karşılaştırıldığında yüksek olmadığı belirlenmiştir. Fermantasyon sonrası ekstrakte edilen lipitler yağ asidi bileşimleri açısından da fermantasyon öncesi substratlardan ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi bileşimleriyle karşılaştırılmıştır. Substratların belirtilen test kültürleriyle fermantasyonları sonucunda yağ asidi bileşimlerinin değiştiği saptanmıştır. Katı substratların fermantasyon öncesi içerdikleri lipitlerin yapısında GLA bulunmadığı ancak her iki test kültürüyle de fermantasyonları sonrasında biyokütlelerden elde edilen lipitlerin yapılarında GLA içerdikleri belirlenmiştir. Greyfurt posası ve greyfurt:malt karışımının *M. racemosus* 73364'le fermantasyonu sonrasında içerdikleri lipitlerin yapılarında bulunan GLA miktarının *R. oryzae* 70085-955-D1 ile fermantasyonu sonrasında içerdikleri lipitlerin yapılarında bulunan GLA miktarından fazla olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon sonrası katı substratların proteince de zenginleştiği saptanmıştır.

Sıvı besi ortamının fermantasyon sonrası yapılan pH ve toplam karbonhidrat analizlerinde pH değerlerinin ve toplam heksoz miktarlarının test edilen tüm küfler için düştüğü tespit edilmiştir. Deneysel veriler ışığında sıvı besi ortamlarında kullanılmamış karbon kaynağı kaldığı anlaşılmıştır. Sıvı besi ortamında toplam heksoz miktarındaki azalma yüzdelerinin en az olduğu test kültürleri (*R. oryzae* 70083-947-D1 ve *M. racemosus* 70095), en düşük lipit verimine de sahip olanlardır.

Mikroorganizmalardan lipit üretimi ekstraksiyon işleminin de etkisiyle pahalı bir proses olduğundan dolayı yüksek miktarda lipit içeren ve değerli yağ asitlerince

zengin yeni suşların incelenmesi bu yöntemin uygulanabilirliği ve geleneksel kaynaklardan yağ eldesine alternatif oluşturabilmesi açısından önem taşımaktadır. Ancak her zaman bu parametreler bir arada yüksek olamayabilmektedir. Buna örnek olarak *M. circinelloides*'ten elde edilen lipidin veriminin düşük olmasına karşın GLA içeriğinin yüksek olması verilebilir (Somashekar ve diğ., 2001). Yapılan çalışmada en yüksek lipit verimi, sıvı besi ortamında geliştirilen test kültürlerinden elde edilmiştir. Katı faz fermantasyonla lipit üretimi açısından incelenen test kültürlerinin sadece greyfurt ve greyfurt:malt da lipit üretimi sağladığı ancak verimin düşük olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizmalardan lipit üretimi test kültürü, sıcaklık, besi ortamı, inkübasyon süresi gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Katı faz fermantasyon besi ortamının incelenen kültürler tarafından yeterince kullanılabilir nitelikte olmaması veya incelenen test kültürünün özellikleri bu çalışmada lipit üretimini etkileyen faktörler olabilir. Yapılan çalışmada katı faz fermantasyon yöntemi sonucunda elde edilen lipit verimi sıvı besi ortamında elde edilen lipit verimi kadar yüksek olmamakla beraber katı faz fermantasyon yöntemi atık su probleminin olmaması, tarımsal ve endüstriyel atıkların değerlendirilebilmesi ve fermantasyon sonucu elde edilen biyokütlenin asimile edilebilir protein içeriğinin yüksek olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Stredansky ve diğ., 2000a; Stredansky ve diğ., 2000b; Conti ve diğ., 2001).

Mikroorganizmalardan yağ eldesi bitkisel kaynaklardan yağ eldesiyle yer değiştiremeyecektir ancak mikroorganizmalar ucuz karbon kaynakları üzerinde geliştirilerek beslenme ve medikal açıdan önemli olabilecek çoklu doymamış yağ asitlerinin üretimi açısından alternatif kaynakları oluşturacaklardır. Bu amaçla da farklı kültürler ve farklı besi ortamları lipit ve değerli yağ asitleri üretimi açısından incelenmeye devam edileceklerdir.

KAYNAKLAR

Anderson, A.J. and Wynn, J.P., 2001. Microbial poluhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids, in *Basic Biotechnology*, Eds. Ratledge, C. and Kristiansen, B., pp. 325-348, Cambridge University Press, Cambridge.

Anonim, 2003a. Bitki adı ile anılan yemeklik yağlar tebliği, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Resmi Gazete Tarih: 26.06.2003, Resmi Gazete Sayı: 25150.

Anonim, 2003b. Tarımsal yapı (üretim, fiyat, değer) 2001, *Devlet İstatistik Enstitüsü*, Ankara.

AOAC, 1996a. Fatty Acids in Oils and Fats Preparation of Methyl Esters Boron Trifluoride Method, method: 969.33, Ch. 41, in *Official Methods of Analysis,* pp. 963-964, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.

AOAC, 1996b. Protein (Crude) in Fruit Products: method 920.152, Ch. 37, in *Official Methods of Analysis,* pp. 917, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.

Atkinson, B. and Mavituna, F., 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. Mstockton Press, New York.

Bajpai, P. and Bajpai, P.K., 1993. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review, *Journal of Biotechnology*, **30**, 161-183.

Bajpai, P., Bajpai, P.K. and Ward, O.P., 1991a. Effects of aging *Mortierella* mycelium on production of arachidonic and eicosapentaenoic acids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **68**, 775-780.

Bajpai, P., Bajpai, P.K. and Ward, O.P., 1991b. Production of decosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**, 706-710.

Bayizit, A.A. and Başoğlu, F., 2000. Fungal lipid metabolism, *Gıda*, **25**, 249-253.

Bhatia, I.S., Raheja, R.K. and Chahal, D.S., 1972. Fungal lipids I. Effect of different nitrogen sources on the chemical composition, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **23**, 1197-1205.

Biacs, P.A. and Gruiz, K., 1984. Lipid analysis of microbial biomass, *Oleagineux*, **39**, 491-494.

Boskou, D., 2002. Olive oil, in *Vegetable Oils in Food Technology Composition Properties and Uses*, pp. 244-275, Eds. Gunstone, F.D., Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom.

Cemeroğlu, B. ve Karadeniz, F., 2001. Bazı meyvelerin meyve suyuna işlenmesi, in *Meyve Suyu Üretim Teknolojisi*, Vol:2, pp. 305-368, Eds. Cemeroğlu, B. ve Karadeniz, F., Başkent Klişe Matbaacılık, Ankara.

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

Certik, M. and Shimizu, S., 2000. Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid-producing fungus, *Mortirella alpina* 1S-4, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**, 224-230.

Certik, M., Andrasi, P. and Sajbidor, J., 1996. Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ-linolenic acid extracted from fungi, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, 357-365.

Certik, M., Balteszova, L. and Sajbidor, J., 1997. Lipid formation and γ-linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil, *Letters in Applied Microbiology*, **25**, 101-105.

Certik, M., Sakuradani, E. and Shimizu, S., 1998. Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids, *Focus*, **16**, 500-505.

Chen, H-C. and Chang, C-C., 1996. Production of γ-linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840, *Biotechnology Progress*, **12**, 338-341.

Cohen, Z., Norman, H.A. and Heimer, Y.M., 1995. Microalgae as a source of ω3 fatty acids, in *Plants in Human Nutrition*, Eds. Simpoulos, A.P., pp. 1-31, World Review of Nutrition and Diet, Basel.

Conti, E., Stredansky, M., Stredenska, S. and Zanetti, F., 2001. γ-Linolenic acid production by solid-state fermentation of Mucorales strains on cereals, *Bioresource Technology,* **76**, 283-286.

Emelyanova, E.V., 1996. γ-linolenic acid production by *Cunninghamella japonica* in solid state fermentation, *Process Biochemistry*, **31**, 434-434.

Emelyanova, E.V., 1997. Lipid and γ-linolenic acid production by *Mucor inaquisporus*, *Process Biochemistry*, **32**, 173-177.

Erturhan, 2001. Menhaden balık yağından enzimatik hidroliz ile polidoymamış yağ asitlerinin zenginleştirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Folch, J., Lees, M. and Stanley, H.S., 1956. A simple method for the isolation of total lipids from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509.

Garcia, D.J., 1998. Omega-3 long-chain PUFA nutraceuticals, *Food Technology*, **52**, 44-49.

Gema, H., Kavaida, A., Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M. and Aggelis, G., 2002. Production of γ-linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel, *Applied Microbiology and Biotechnology,* **58**, 303-307.

Gill, I. and Valivety, R., 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications, *Trends in Biotechnology*, **15**, 401-408.

Graille, 1996. Single-cell lipids, in *Oils and Fats Manual*, pp. 287-297, Eds. Karleskind, A., Lavoisier publishing.

Hansson L. and Dostalek, M., 1988. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **28**, 240-246.

Hansson, L., Dostalek, M. and Sörenby, B., 1989. Production of γ-linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**, 223-227.

Hassan, M., Blanc, P.J., Granger, L.M., Pareilleux, A. and Goma, G., 1996. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture, *Process Biochemistry*, **31**, 355-361.

Hassan, M., Blanc, P.J., Pareilleux, A. and Goma, G., 1994. Production of single cell oil from prickly-pear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **10**, 534-537.

Heath, R.J., Jackowski, S. and Rock, C.O., 2002. Fatty acid and phospholipids metabolism in prokaryotes, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Eds. Vance, D.E. and Vance, J.E., pp. 205, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Heerden, I.V., Cronje, C., Swart, S.H. and Kotze, J.M., 2002. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting, *Bioresource Technology*, **81**, 71-76.

Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E.Y. and Okabe, M., 1999. Image analysis of morphological change during arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87**, 489-494.

Higashiyama, K., Yaguchi, T., Akimoto, K., Fujikawa, S. and Shimizu, S., 1998. Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 1815-1819.

Jackson, F.M., Fraser, T.C.M., Smith, M.A., Lazarus, C., Stobart, A.K. and Griffiths, G., 1998a. Biosynthesis of C18 polyunsaturated fatty acids in microsomal membrane preparations from the filamentous fungus Mucor circinelloides, European Journal of Biochemistry, **252**, 513-519.

Jackson, F.M., Michaelson, L., Fraser, T.C.M., Stobart, A.K. and Griffiths, G., 1998b. Biosynthesis of triacylglycerol in the filamentous fungus *Mucor circinelloides*, *Microbiology*, **144**, 2639-2645.

Jeffery, J., Kock, J. L. F., Du Preez, J. C., Bareetseng, A. S., Coetzee, D. J., Botes, P. J., Botha, A., Schewe, T. and Nigam, S., 1999. Effect of acetate and pH on sunflower oil assimilation by *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*, **22**, 156-160.

Kale, P.N. and Adsule, P.G., 1995. Citrus, in *Handbook of Fruit Science and Technology Production, Composition, Storage and Processing*, pp. 39-65, Eds. Salunkhe, D.K. and Kadam, S.S., Marcel Dekker, Inc., New York.

Karadeniz, F., 2002. Turunçgil işleme atıkları ve yan ürünleri, *Gıda*, **11**, 78-83.

Karapınar, M., 1984. Mikrobiyal biyomas üretimi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, Seri B, **2**, 97-111.

Karapınar, M. and Okuyan, M., 1982. The utilisation of citrus waste as substrate for microbial protein production by the fungus *Sporotrichum pulverulentum*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **32**, 1055-1058.

Karapınar, M., ve Okuyan, M., 1983. Portakal atıklarından fungal protein eldesi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, Seri B, **1**, 27-38.

Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I. and Aggelis, G., 2001. Lipid and γ-linolenic acid accumulation in strains of *Zygomycetes* growing on glucose, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78**, 341-346.

Kawashima, H., Akimoto, K., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Shimizu, S., 2000. Industrial production of dihomo-γ-linolenic acid by a Δ5 desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4 fungus, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **77**, 1135-1138.

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

Kendrick, A. And Ratledge, C., 1992b. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids, *Lipids*, **27**, 15-20.

Kennedy, M.J., Reader, S.L. and Davies, R.J., 1993. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production, *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, 625-634.

Kimball, D., 1996. Grapefruits, lemons, and limes, in *Processing Fruits: Science and Technology Volume 2 Major Processed Products*, pp. 305-336, Eds. Somogyi, L.P., Barrett, D.M. and Hui, Y.H., Technomic Publishing, Pennsylvania.

Kristofikova, L., Rosenberg, M., Vlnova, A., Sajbidor, J. And Certik, M., 1991. Selection of *Rhizopus* strains for L(+)-lactic acid and γ-linolenic acid production, *Folia Microbiologica*, **36**, 451-455.

Lindberg, A.M. and Hansson, L., 1991. Production of γ-linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* on cheap nitrogen and carbon sources, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 26-28.

Lopez, M.A.R., Lopez, P.M.G., Mora, P.G., Estrada, J.G. and Vazquez, H.C., 2000. Pickled vegetable and fruit waste mixtures as an alternative feedstuff, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 325-328.

Mukherjee, K.D., 1998. Lipid biotechnology, in *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, pp. 589-627, Eds. Akoh, C.C. and Min, D.B., Marcel Dekker, Inc., New York.

Murali, H.S., Singh, L., Sankuran, R. and Sharma, T.R., 1987. Biosynthesis of oil by *Fusarium spp.*, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **20**, 296-299.

Norris, J.R. and Ribbons, D.W., 1971. Methods in Microbiology, Vol. 5, Academic Press, London-New York.

O'Brien, D.J., Kurantz, M.J. and Kwoczak, R., 1993. Production of eicosapentaenoic acid by the filamentous fungus *Pythium irregulare*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **40**, 211-214.

Pandey, A., 1991. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations, *Process Biochemistry*, **26**, 355-361.

Pandey, A., 1992. Recent process developments in solid-state fermentation, *Process Biochemistry*, **27**, 109-117.

Pandey, A., Soccol, C.R. and Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products, *Process Biochemistry*, **35**, 1153-1169.

Pearson, D., 1976. The Chemical Analysis of Food, Churchill Livingstone, Edinburg, London.

Potter, N.N. and Hotchkiss, J.H., 1995. Food Science, International Thomson Publishing, New York.

Radwan, S.S., 1991. Sources of C_{20}-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**, 421-430.

Ratledge, C., 1987. Lipid biotechnology: a wonderland for the microbial physiologist, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **64**, 1647-1656.

Rose, A.H., 1978. Production and industrial importance of primary products of microbial metabolism, in *Economic Microbiology*, Vol:2, pp. 11-12, Eds. Rose, A.H., Academic Press, London.

Sajbidor, J., Certik, M. and Dobronova, S., 1988. Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to mucorales, *Biotechnology Letters*, **10**, 347-350.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., 1995. Introduction to Food-Borne Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.

Sato, K. and Sudo, S., 1999. Small-scale solid state fermentations, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 61-80, Eds. Demain, A.L., Davies, J.E., Atlas, R.M., Cohen, G., Hershberger, C.L., Wilson, R.C. and Wu, J.H.D., ASM Press, Washington D.C.

Shimizu, S., Kawashima, H., Akimoto, K., Shinmen, Y. and Yamada, H., 1989a. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid-containing oil by Mortierella alpina 1S-4 at low temperature, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, 1-4.

Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H., Shinmen, Y. and Yamada, H., 1989b. Production of dihomo-γ-linolenic acid by *Mortierella alpina* 1S-4, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **66**, 237-241.

Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H., Shinmen, Y., Jareonkitmongkol, S. and Yamada, H., 1989c. Stimulatory effect of peanut oil on the production of dihomo-γ-linolenic acid by filamentous fungi, *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**, 1437-1438.

Shimizu, S., Jareonkitmongkol, S., Kawashima, H., Akimoto, K. and Yamada, H., 1991. Production of a novel ω1-eicosapentaenoic acid by *Mortierella alpina* 1S-4 grown on 1-hexadecene, *Archives of Microbiology*, **156**, 163-166.

Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H. and Yamada, H., 1989. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi: Selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**, 11-16.

Siliha, H., El-Sahy, K., Sulieman, A., Carle, R. and El-Badawy, A., 2000. Citrus wastes: Composition, functional properties and utilization, *Obst-Gemüse-und Kartoffelverarbeitung*, **85**, 31-36.

Somashekar, D. and Joseph, R., 2000. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium, *World journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**, 491-493.

Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Srividya, C., Krishnanand, Sambaiah, K. and Lokesh, B.R., 2001. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 317-320.

Stredansky, M., Conti, E. and Salaris, A., 2000a. Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation, *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 304-307.

Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S. and Zanetti, F., 2000b. γ-Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace, *Bioresource Technology,* **73**, 41-45.

Thassitou, P.K. and Arvanitoyannis, I.S., 2001. Bioremediation: a novel approach to food waste management, *Trends in Food Science and Technology*, **12**, 185-196.

Totani, N. and Oba, K., 1987. The filamentous fungus *Mortierella alpina*, high in arachidonic acid, *Lipids*, **22**, 1060-1062.

Wang, 2002. Soybean oil, in *Vegetable Oils in Food Technology Composition Properties and Uses*, pp. 18-52, Eds. Gunstone, F.D., Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom.

Walker, T.H., Cochran, H.D. and Hulbert, G.J., 1999. Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from *Pythium irregulare*, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 595-602.

Waltermann, M., Luftmann, H., Baumeister, D., Kalscheuer, R. and Steinbüchel, A., 2000. *Rhodococcus opacus* strain PD 630 as a new source of high-value single cell oil? Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids, *Microbiology*, **146**, 1143-1149.

Warwel, S. and Borgdorf, R., 2000. Substrate selectivity of lipases in the esterification of *cis/trans*-isomers and positional isomers of conjugated linoleic acid (CLA), *Biotechnology Letters*, **22**, 1151-1155.

Whitworth, D.A. and Ratledge, C., 1974. Microorganisms as a potential source of oils and fats, *Process Biochemistry*, **9**, 14-22.

Yamada, H., Shimizu, S. and Shinmen, Y., 1987. Production of arachidonic acid by Mortierella elongata 1S-5, *Agricultural and Biological Chemistry*, **3**, 785-790.

Yamamura, R. and Shimomura, Y., 1997. Industrial high performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single cell oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**, 1435-1440.

Yazıcıoğlu, T., 1965. Bira fabrikasyonunun tali ürünleri ve artıkları, in *Türk Malt ve Bira Sanayi*, pp. 143-149, Eds. Yazıcıoğlu, T., Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.

Zheng, Z. and Shetty, K., 2000. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes, *Process Biochemistry*, **35**, 825-830.

Zhu, M., Zhou, P.P. and Yu, L.J., 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids, *Bioresource Technology*, **84**, 93-95.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İstanbul'da doğdu. Lise eğitimini 1997 yılında Kabataş Erkek Lisesi'nde tamamladı ve yine 1997 yılında öğrenime başladığı İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2001 yılında Bölüm Birinciliğiyle mezun oldu. 2001 yılında yüksek lisans eğitimine başladığı İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde halen Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Gıda Mühendisliği Bölümü'nde verilmekte olan Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuarı, Gıda Kalite Kontrol Laboratuarı ve Biyoteknoloji derslerinde aktif olarak görev almaktadır.