

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROORGANİZMALARIN YENİLEBİLİR YAĞ
ÜRETİMİ POTANSİYELLERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMA**

Meryem Selcen GÖKTAŞ

**Danışman
Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2016**



© 2016 [Meryem Selcen GÖKTAŞ]

TEZ ONAYI

Meryem Selcen GÖKTAŞ tarafından hazırlanan "**Mikroorganizmaların Yenilebilir Yağ Üretimi Potansiyelleri Üzerine Araştırma**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Doç.Dr. Hakan KULEAŞAN**
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi **Prof.Dr. Aynur Gül ÇAKMAKÇI**
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi **Yrd.Doç.Dr. Şükran KULEAŞAN**
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Enstitü Müdürü **Doç.Dr. Yasin TUNCER**

.....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Meryem Selcen GÖKTAŞ



İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| İÇİNDEKİLER | i |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜR | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ | 3 |
| 2.1. Lipidlerin Sınıflandırılması | 3 |
| 2.2. Yağ Kaynakları | 3 |
| 2.3. Yağ Asitleri | 5 |
| 2.4. Yağların İnsan Sağlığı Açısından Önemi | 8 |
| 2.5. Mikrobiyel Yağ Sentezi | 12 |
| 2.6. Mikrobiyel Yağların Yağ Asidi İçerikleri | 15 |
| 2.7. Yağ Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar | 17 |
| 2.7.1. Algler | 17 |
| 2.7.2. Mayalar | 18 |
| 2.7.3. Bakteriler | 19 |
| 2.7.4. Funguslar | 20 |
| 2.8. Mikrobiyel Yağ Üretim Koşulları | 21 |
| 2.9. Mikrobiyel Yağ Üretiminde Kullanılan Karbon Kaynakları | 21 |
| 2.10. Mikrobiyel Yağların Ticari Üretimi | 23 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 24 |
| 3.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu | 24 |
| 3.2. İzolatların Mikroskopik Yöntemle İncelenmesi | 25 |
| 3.3. İzolatların Gruplandırılması | 25 |
| 3.3.1. <i>Bacillus</i> türlerinin seçilmesi ve üretilmesi | 26 |
| 3.3.2. <i>Candida</i> türlerinin seçilmesi ve üretilmesi | 26 |
| 3.3.3. <i>Saccharomyces</i> türlerinin izolasyonu | 26 |
| 3.3.4. Gram Negatif bakterilerin izolasyonu | 27 |
| 3.4. Lipolitik Aktivite Testi | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.5. Sudan Black B Boyama | 28 |
| 3.6. İzolatların Seçimi | 28 |
| 3.7. Farklı Besiyeri Formülasyonlarının Denenmesi | 28 |
| 3.8. Büyük Ölçekte Üretim | 30 |
| 3.9. Hücresel Yağın Elde Edilmesi | 31 |
| 3.10. Atıklardan Besiyeri Hazırlanması | 33 |
| 3.11. Gıda Sanayi Atıklarından büyük hacimli üretimlerin yapılması..... | 34 |
| 3.12. Genetik Tanımlama | 39 |
| 3.13. Yağ Asitleri Kompozisyonu..... | 39 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA | 41 |
| 4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu | 41 |
| 4.2. İzolatların Mikroskopik Yöntemle İncelenmesi..... | 41 |
| 4.3. İzolatların Gruplandırılması | 43 |
| 4.4. Lipolitik Aktivite Testi..... | 45 |
| 4.5. Sudan Black B Boyama | 46 |
| 4.6. Genetik Tanımlama | 46 |
| 4.7. Örneklerden Elde Edilen Yağ Miktarları | 50 |
| 4.8. Yağ Asitleri Kompozisyonu..... | 56 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 64 |
| KAYNAKLAR | 65 |
| ÖZGEÇMİŞ | 73 |

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROORGANİZMALARIN YENİLEBİLİR YAĞ ÜRETİMİ POTANSİYELLERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMA

Meryem Selcen GÖKTAŞ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN

Araştırmada, gıda sanayi atıklarını içeren besiyerinde mikroorganizmalar ile yağ üretimi amaçlanmıştır. Mikroorganizmaların elde edilmesinde, fazla sayıda lipolitik mikroorganizma bulunabileceği düşünülen proteince zengin gıdalar ve yüksek oranda yağ içeren materyaller seçilmiştir. Mikroorganizmaların yağ üretim yetenekleri incelenerek en yüksek miktarda yağ üretenler ile büyük hacimlerde üretime geçilmiştir. Çalışmada kullanılan karışık besiyeri; gıda atıklarını (elma kabuğu, patates kabuğu vb.) içeren bir besiyeri olarak formülize edilmiştir. Hazır besiyerinde ve atıkları içeren karışık besiyerinde yapılan yağ üretimleri karşılaştırılmıştır. Yağ üretimi en başarılı bulunan mikroorganizmaların genetik tanısı yapılmıştır.

Çalışmada en yüksek yağ üretimi *Pichia membranaefaciens* ile sağlanmıştır. *Pichia membranaefaciens*'in orijinal besiyerinde kuru hücre ağırlığının % 64.58'ü, ve karışık besiyerinde % 32.49'si oranlarında yağ ürettiği bulunmuştur. Bunun aksine *Klebsiella oxytoca* suşu orijinal besiyerinde % 11.63 oranında yağ üretirken karışık besiyerinde % 15.20 yağ oranına ulaşmıştır. Son olarak denemelerde elde edilen yağ örneklerinin Gaz Kromatografisi cihazında analizleri yapılarak içerdikleri yağ asitlerinin dağılımı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyel yağ, gıda atıkları

2016, 73 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

RESEARCH ON POTENTIAL MICROORGANISMS IN PRODUCTION OF EDIBLE OILS

Meryem Selcen GÖKTAŞ

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN

In the study, the microorganisms in a medium containing food industry wastes were employed for the production of edible oil. In order to achieve a selective isolation of microorganisms, protein-rich foods and high fat materials were selected due to high presence probability of various lipolytic microorganisms. The strains producing the highest amount of edible oils were selected and carried on large volume edible oil production. The mixed medium was a type of media which was prepared by using food wastes (such as apple peels and potato skins, etc.). The edible oil amounts produced in mixed medium and ready to use original medium was compared. Microbial strains which yielded the highest amounts of edible oil were genetically identified.

In the study, the highest edible oil production was achieved by *Pichia membranaefaciens*. *Pichia membranaefaciens* produced 64.58% of its dry weight in original medium and 32.49% in the mixed media. In contrast, *Klebsiella oxytoca* strain produced 11.63% oil in original medium while it reached 15.20% oil production rate in mixed medium. Finally, the oil samples obtained in the experiments were analyzed in Gas Chromatography for the determination of their fatty acid distribution.

Keywords: Microbial oil, food waste

2016, 73 pages

TEŞEKKÜR

Bu alıőma için beni yönlendiren, karőılaőtıđım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aőmamda yardımcı olan değerli danıőmanım Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN'a ve Yrd. Doç. Dr. őukran KULEAŞAN'a teőekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında bana destek olan aileme, eőime ve oğluma sonsuz sevgilerimi sunarım.

Meryem Selcen GÖKTAŞ
ISPARTA, 2016



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 2. 1. Omega-3 ve omega-6 serilerinin çoklu doymamış yağ asitleri ile ilişkileri..... | 10 |
| Şekil 2.2. Kesikli Kültürde Gelişen Yağlı Maya veya Küflerde Lipit Birikimi | 15 |
| Şekil 3.1. Küçük hacimlerde geliştirilen örnekler..... | 29 |
| Şekil 3.2. Büyük hacimde üretimden örnekler..... | 31 |
| Şekil 3.3. Rotary evaporatördeki erlen içinde biriken yağ..... | 33 |
| Şekil 3.4. Örneklerin atık besiyerindeki gelişimleri..... | 34 |
| Şekil 3.5. Büyük hacimde üretim..... | 35 |
| Şekil 3.6. Süzme..... | 36 |
| Şekil 3.7. Ayırma hunisi ile çözgenlerin ayrılması..... | 36 |
| Şekil 3.8. Buharlaştırma..... | 37 |
| Şekil 3.9. Üretim Aşamaları..... | 38 |
| Şekil 3.10. Yağ ve hekzan karışımlarından örnekler. | 39 |
| Şekil 4.1. Kaşar peyniri örneğinden yapılan ekim sonucu..... | 41 |
| Şekil 4.2. Patates örneğinden yapılan ekim sonucu | 41 |
| Şekil 4.3. Tereyağı örneğinden elde edilen mikroorganizmaların mikroskopik görüntüsü | 42 |
| Şekil 4.4. Peyniraltı suyundan elde edilen mikroorganizmaların mikroskopik görüntüsü | 42 |
| Şekil 4.5. Sucuk örneğinden elde edilen mikroorganizmaların mikroskopik görüntüsü | 42 |
| Şekil 4.6. Üzüm ve kaşar peyniri örneklerinden yapılan ekim sonucu..... | 43 |
| Şekil 4.7. Tereyağı örneğinden yapılan ekim sonucu | 43 |
| Şekil 4.8. Kaşar peynirinden yapılan ekim sonucu | 44 |
| Şekil 4.9. Çiğ süt ve peyniraltı suyundan yapılan ekim sonucu | 44 |
| Şekil 4.10. Pastörize edilmiş süttten üretilen peynirin peyniraltı suyundan ve çiğ süttten yapılan ekimlerin sonucu | 44 |
| Şekil 4.11. Üzüm ve sucuk örneklerinden elde edilen mikroorganizmaların lipolitik aktivite sonuçları..... | 45 |
| Şekil 4.12. Tereyağı ve kaşar peyniri örneklerinden elde edilen mikroorganizmaların lipolitik aktivite sonuçları..... | 45 |
| Şekil 4.13. Çiğ süttten elde edilen mikroorganizmaların boyama sonucu..... | 46 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.14. Genetik tanımlaması yapılan örnekler | 47 |
| Şekil 4.15. M9 numaralı örneğin yağ asidi profili | 57 |
| Şekil 4.16. M5 numaralı örneğin yağ asidi profili | 57 |
| Şekil 4.17. 50 numaralı örneğin yağ asidi profili..... | 58 |
| Şekil 4.18. 33 numaralı örneğin yağ asidi profili..... | 58 |
| Şekil 4.19. 14 numaralı örneğin yağ asidi profili..... | 59 |
| Şekil 4.20. 13 numaralı örneğin yağ asidi profili..... | 59 |



ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Çizelge 2.1. Yemelik yağların sınıflandırılması | 4 |
| Çizelge 2.2. Dünyada en fazla üretimi yapılan yağ bitkileri ve yağ içerikleri..... | 5 |
| Çizelge 2.3. Doymamış Yağ Asitleri ve Yapısal Formülleri | 7 |
| Çizelge 4.1. Çalışmada bulunan yağların gram ve yüzde olarak miktarları. | 52 |
| Çizelge 4.2. Mikroorganizmalar Tarafından Üretilen Yağlarda Yağ asitlerinin oransal dağılımı..... | 60 |



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------|--|
| AA | Araşidonik asit |
| ALA | Alfa linoleik asit |
| BPA | Baird parker agar |
| CLA | Konjuge linoleik asit |
| DHA | Dokosahegzaenoik asit |
| dk | Dakika |
| EMB | Eoisin metilen blue agar |
| EPA | Eikosapentaenoik asit |
| FTS | Fizyolojik tuzlu su |
| g | Gram |
| GC | Gaz kromatografisi |
| GLA | Gamma linoleik asit |
| HCl | Hidroklorik asit |
| HUFA | Highly unsaturated fatty acids |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| kcal | Kilokalori |
| KOH | Potasyum hidroksit |
| kPa | kilopascal |
| l | Litre |
| LA | Linoleik asit |
| ltd | Limited |
| M | Molar |
| MEA | Malt ekstrakt agar |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| N | Normal |
| NA | Nutrient agar |
| °C | Santigrat derece |
| PCA | Plate count agar |
| PEMBA | Polymyxin egg yolk mannitol bromotyhmol blue agar |
| pH | Power of Hydrogen |
| PUFA | Polyunsaturated fatty acids |
| rpm | Revolutions Per Minute/ dakikada devir sayısı |
| SDA | Saboraud dekstroz agar |
| spp. | Taksonomide bir cinse ait tüm türleri ifade eden bir kısaltma. |
| TA | Tributyryn agar |
| TSB | Triptik Soya Broth |
| vb. | ve benzeri |
| vd. | ve diğerleri |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| % | Yüzde |

1. GİRİŞ

Yağlar, üç molekül serbest yağ asidinin gliserol molekülü ile oluşturmuş oldukları esterlerdir. Gliserolden bir yağ asidi uzaklaşınca digliserit, iki yağ asidi uzaklaşınca monogliserit adını alır. Gliserol molekülüne bağlı üç yağ asiti birbirinin aynısı olabileceği gibi üç farklı yağ asiti de olabilmektedir (Gürbilek, 2011).

Yağların karakterlerini büyük ölçüde yağ asitleri etkilemektedir. Yağ asitlerinin gliserole bağlandıkları yer ve içerdikleri karbon sayıları başta erime noktası olmak üzere yağın fiziksel ve metabolik özelliklerini belirler. Ayrıca bu yağ asitlerinin yapısındaki çift bağ sayısı ve yeri de yağ asitlerinin fiziksel özellikleri üzerinde etkilidir (Saldamlı, 2007).

Yağlar, insan bünyesinde vücut sıcaklığının ve suyunun korunmasında izolatör olarak görev yapar. Sindirilmeleri diğer besin öğelerine kıyasla daha uzun sürdüğünden, canlılarda daha uzun süreli bir tokluk hissi yaratırlar. Vücuda alınan gereksinim fazlası enerji, gerektiğinde kullanılmak üzere yağ olarak depolanmaktadır (Kayahan, 2003).

Bir yağın kalitesi, yapısında yer alan yağ asitlerinin çeşit ve miktarları ile yakından ilgilidir. Bu nedenle yağ asitleri beslenme fizyolojisi açısından, buldukları yağlara önemli özellikler kazandırır (Bayrak, 1997).

Yağların ortak özelliklerinden biri de sudan daha düşük yoğunluğa sahip olmalarıdır. Oda sıcaklığında sıvı formdan katı forma kadar değişim gösteren bir erime derecesi aralığında bulunurlar. Oda sıcaklığında katı formda iseler katı yağlar (fats), sıvı formda iseler sıvı yağlar (oils) olarak tanımlanırlar. Katı ve sıvı yağlar, gliserol ve yağ asitlerinden oluşan trigliseridlerin hakim olduğu bileşikler grubudur (Nas vd., 2001). Yağlar suda çok az çözünebildikleri halde, nonpolar çözücüler diye adlandırılan, kloroform, eter ve benzen gibi çözenlerde kolaylıkla çözülebilen heterojenik yapıda bileşiklerdir (Bingöl, 1976). Lipidler, trigliseritlere ilave olarak yapılarında mono ve digliseridler, fosfatidler, serebrosidler, steroller, terpenler, yağ alkolleri, yağ asitleri, yağda çözünen vitaminler (A, D, E ve K) ve diğer bazı bileşenleri de içeren bileşikler grubudur (Nas vd., 2001).

Günümüzde insan tüketimine uygun temel yağ kaynağı olarak büyük ölçüde bitkiler ve kısmen hayvanlar kullanılmaktadır. Bunun yanında bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen değerli yağlar da biyoreaktörlerde fermantasyon yolu ile elde edilmektedir. Bu yağlar, kolesterol, ağır metaller ve pestisitleri içermemekte ve hayvansal yağlara göre daha basit bir bileşime sahip olmaktadır (Aran, 2010).

Mikroorganizmalardan yağ üretimi çalışmaları ilk olarak I. Dünya Savaşı sırasında Almanya'da gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki çalışmalar ise 1950'lerde yoğunlaşmıştır. Ancak analitik cihazların (Gaz ve Sıvı Kromatografisi vb.) ve biyoteknoloji konusundaki bilgilerin yetersiz olması nedeniyle mikrobiyel yağların özellikleri yeterince ortaya konulamamıştır. Günümüzde ise yapılan analizler sonucunda mikroorganizmaların ve özellikle de mayaların çok farklı yağ asitlerini sentezleyebildikleri ve uygun koşullarda toplam biyokitlelerinin % 70' ine varan oranlarda yağ depolayabildikleri belirlenmiştir. Mayalar arasında *Saccharomyces cerevisiae* kolay bulunabilirliği ve metabolizmasının ortaya konulmuş olmasından dolayı mikrobiyel yağ üretim çalışmalarının temelini teşkil etmektedir (Kuleaşan ve Hızal, 2009).

Bu yüksek lisans çalışmasında, çeşitli doğal kaynaklardan mikroorganizmalar izole edilerek bu mikroorganizmaların kullanımı ile gıda sanayii atıklarından mikrobiyel yağların üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen yağların oransal miktarları ve yağ asidi içerikleri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Lipidlerin Sınıflandırılması

Lipidler, kimyasal yapılarına göre basit lipidler, bileşik lipidler ve lipid benzeri bileşikler olmak üzere üç genel gruba ayrılmaktadır.

Basit Lipidler:

- **Yağlar:** Yağ asitleri ile gliserinin oluşturduğu gliseritler.
- **Mumlar:** Yüksek yapılı yağ asitleri ile mum alkollerinin oluşturdukları esterler.
- **Renk Mumları:** Poliyenik yağ asitleri ile poliyenik alkollerin oluşturdukları esterler.
- **Sterol Esterleri:** Yağ asitleri ile sterollerin oluşturdukları esterler.
- **Triterpenik Alkol Esterleri:** Triterpenik alkollerle yağ asitlerinin oluşturdukları esterler (Kayahan, 2003).

Bileşik Lipidler:

Bileşik lipidler kendi aralarında, fosfor ve azot İçeren lipidler (gliserofosfatitler, lesitin, sefalin, bakteri fosfatitleri vb.), ile Sfingomiyelinler, şeker içeren lipidler (serebroglikozitler, sulfatitler vb.), protein içeren lipidler gibi gruplara ayrılırlar (Kayahan, 2003).

Lipid Benzeri Maddeler:

Bu grupta yağ asitleri, hidrokarbonlar, yağda eriyen renk maddeleri, yağda eriyen vitaminler, antioksidanlar, yüksek alkoller ve tat-koku maddeleri yer alır (Kayahan, 2003).

2.2. Yağ Kaynakları

İnsanların beslenmesinde önemli bir yere sahip olan yağlar, bitkisel ve hayvansal hücreler ile mikroorganizmalar tarafından özellikle bazı maya ve küf türlerince sentezlenmektedir (Başoğlu, 2006).

Günümüzde gıda olarak tüketilen yağları, elde edildiği kaynağına, yağ asitleri bileşimine, fiziksel özelliklerine ya da modifiye edilmiş şekline bağlı olarak, değişik şekillerde gruplandırmak mümkündür (Kayahan, 2003).

Çizelge 2.1. Yemelik yağların sınıflandırılması (Kayahan, 2003).

| Doğal Yemelik Yağlar | | Modifiye Yemelik Yağlar | | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| Katı yağlar | Sıvı yağlar | Katı yağlar | Yumuşak yağlar | Sıvı yağlar |
| Kara hayvanları yağları | Su ve deniz ürünleri yağları | Sanayi margarinleri | Sürülebilir margarinler | Kızartma yağları |
| Süt yağları | Tohum ve meyve yağları | Kahvaltılık margarinler | Diyetik margarinler | Salata yağları |
| Bitkisel katı yağlar | | Mutfak margarinleri | Özel yağ fraksiyonları | |

Bitkisel yağ kaynakları; Bugün dünyada elde edilen yağın % 95'i 12 bitki türünden elde edilmektedir. Bitkisel yağ kaynakları; yağlı tohumlardan (ayçiçeği, çığit, susam, kolza, aspir, soya fasulyesi) ve yağlı meyvelerden (zeytin, badem, fındık, palm meyvesi, hindistan cevizi, ceviz avokado) elde edilenler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Başoğlu, 2006).

Dünya'da bitkisel yağ üretiminin yılda yaklaşık olarak 176 milyon ton olduğu bildirilmektedir (Statista, 2016). Yağların insan beslenmesindeki önemini yanı sıra bitkisel yağ asitleri, sabun, deterjan, gres, biyo-yakıt, kozmetik ve boya sanayi için de hammadde niteliğindedir. Bu nedenle bitkisel yağlara olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Ayrıca bitkisel üretim fazlası yağın petrole alternatif olarak kullanılabilmesi de belirtilmektedir (Kuleaşan, 2008).

Çizelge 2.2. Dünyada en fazla üretimi yapılan yağ bitkileri ve yağ içerikleri (Başoğlu, 2006).

| Yağ Bitkisi | Ortalama Yağ Oranı (%) |
|--------------------------|------------------------|
| Hindistan cevizi (Kopra) | 65-68 |
| Brezilya palmı (Babassa) | 60-65 |
| Susam | 50-55 |
| Palm meyvesi | 45-50 |
| Palm çekirdeği | 45-50 |
| Amerikan yer fıstığı | 45-50 |
| Kolza tohumu | 40-45 |
| Ayçiçek tohumu | 35-45 |
| Aspir tohumu | 30-35 |
| Zeytin (meyvede) | 25-30 |
| Pamuk tohumu (çiğit) | 18-20 |
| Soya fasulyesi | 18-20 |

Hayvansal yağ kaynakları ise çok fazla değildir. Bunlar kendi içinde 3 grup altında incelenebilir:

- **Kara hayvanlarının iç yağları, kuyruk yağları:** Özellikle koyun, sığır ve domuz gibi hayvanlardan elde edilen yağlar.
- **Deniz hayvanlarından elde edilen yağlar:** Çeşitli balıklardan elde edilen yağlar ve balina iç yağları ile karaciğerinden elde edilen yağlar.
- **Kara hayvanlarının sütünden elde edilen yağlar:** Koyun, inek gibi hayvanların sütlerinden elde edilen tereyağları (Başoğlu, 2006).

2.3. Yağ Asitleri

Yağ asitleri, yağın doymuşluk derecesini gösteren farklı uzunluktaki karbon zincirinden oluşan, trigliseridleri oluşturduklarından hem kompleks lipidlerin önemli bir parçası hem de kendisinden kolayca enerji sağlanan bir kaynaktır. Doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak iki çeşidi bulunmaktadır. Doymamış yağ asitleri de tekli doymamış (monoansature) ve çoklu doymamış (poliansature) yağ asitleri olarak iki gruba ayrılmaktadır (Kaya, 2004).

Doymuş yağ asitleri oda sıcaklığında katı halde buldukları için vücutta birikmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri ise oda sıcaklığında sıvı halde bulunmakta ve aynı zamanda insan hayatının devamlılığı için de büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı temel yağ asitleri olarak adlandırılarak omega-6 ve omega-3 yağ asitleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Omega -6'ların ana kaynağı yüksek oranda linoleik asit içeren mısır ve soya fasulyesi yağıdır. Omega-3 ise keten tohumu, ceviz ve özellikle planktonlar ile yağlı balıklarda bol miktarda bulunmakta, keten tohumu ve cevizde alfa-linolenik asit, balık yağlarında ise Eikosapentaenoik asit (EPA) ve Dekosahegzaenoik asit (DHA) en önemli yağ asitleridir. EPA ve DHA'nın mutlaka dışardan alınması gerekmektedir. Çünkü vücut tarafından sentezlenemedikleri için elzem yağ asitleri olarak adlandırılmaktadır (Kaya, 2004).

Yağ asitlerinin fiziksel, kimyasal ve besleme özellikleri; molekülündeki karbon atomu sayısı, karbon atomları arasında çift bağ sayısı ve karbon atomlarının pozisyonu ile belirlenmektedir. Fiziksel özellikler açısından yağ asitleri ele alındığında, karbon sayısı 10'a kadar olan bütün doymamış yağ asitlerinin oda sıcaklığında sıvı özellikte olduğu ve uçucu bir nitelik kazandığı belirtilmektedir. Ayrıca suda erimemekteler. Daha uzun karbon zincirine sahip olan yağ asitleri ise katı halde bulunmaktadır. Katı ve sıvı yağlar, yağ asidi zincirlerinden oluşmaktadır. Omega-3; uzun zincir yapıda, çoklu doymamış yağların bir grubuna verilen isimdir. Doymamış yağ asitleri molekül dizilişlerinde karbon atomları arasında çeşitli sayıda çift bağ içermektedirler. Doymamış yağ asitlerinin belirtilmesinde isimlerin yanında özel nümerik sistemler de kullanılmaktadır. Örneğin; 18:3 (n-3) şeklinde gösterilen linolenik asidin, 3 adet çift bağ içeren 18 karbon atomundan oluştuğu, (n-3) veya ω -3 (Omega-3) ifadesi ise ilk çift bağın 3. karbon atomu ile 4. karbon atomu arasında olduğunu belirtmekte ve formül uçta bir metil grubu (CH₃) bulundurmaktadır (Karabulut, 2006).

Çizelge 2.3. Doymamış Yağ Asitleri ve Yapısal Formülleri (Karabulut, 2006).

| Yağ Asidinin Adı | Moleküler Formülü | Numerik Formülü | Yapısal Formülü |
|------------------|-------------------|-----------------|---|
| Palmitoleik Asit | $C_{16}H_{30}O_2$ | 16:1n7 | $CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$ |
| Oleik Asit | $C_{18}H_{34}O_2$ | 18:1n9 | $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$ |
| Vaksonik Asit | $C_{18}H_{34}O_2$ | 18:1n7 | $CH_3.(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9.COOH$ |
| Linoleik Asit | $C_{18}H_{32}O_2$ | 18:2n6 | $CH_3.(CH_2)_4.CH=CHCH_2CH=CH(C H_2)_7COOH$ |
| Linolenik Asit | $C_{18}H_{30}O_2$ | 18:3n3 | $CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH =CH(CH_2)_7COOH$ |
| Araşidonik Asit | $C_{20}H_{32}O_2$ | 20:4n6 | $CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2 CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$ |

Düz zincir yapısındaki yağ asitleri farklı uzunluk, farklı karbon sayısı ve farklı bağ yapıları ihtiva etmektedir. Bunlardan bir çift bağı olanlar tekli doymamış yağ asitleri olarak eğer birden çok çift bağ içerirlerse çoklu doymamış yağ asitleri olarak isimlendirilirler. Bunların molekül dizilişlerinde karbon atomu sayısı 18-20 arasında ve 2-4 adet çift bağa sahip olduklarından bu yağ asitlerine PUFA (polyunsaturated fatty acids, çoklu doymamış yağ asitleri), 20'den fazla karbon atomu ve 4'ten fazla sayıda çift bağ içeren yağ asitlerine ise HUFA (highly unsaturated fatty acids, aşırı doymamış yağ asitleri) adı verilmektedir. Zincir uzunluğu, karbon sayısı ve çift bağın pozisyonu yağın biyolojik özelliklerini belirlemektedir (Karabulut, 2006).

Doğada bitkiler 200'den fazla yağ asidi çeşidi içerirler. Bitkilerden elde edilen yağlarda bulunan yağ asitleri dallanmamış yapıda, 12 ile 22 arasında karbon sayısına sahiptirler ve 0 ile 3 arasında değişebilen cis formunda çift bağ bulunur. Bunun yanı sıra bitkiler, doğada çok sık görülmesine de epoksi, hidroksi, siklopropen ve asetilenik gibi fonksiyonel grupları olan yağ asitlerini de içerirler. Dünya'da üretilen yemeklik bitkisel yağların % 71'ini soya, palm ve ayçiçeği yağları oluşturmaktadır (Statista, 2016). Yukarıda bahsedilen 200'den fazla yağ asidinin ancak 4 tanesi, linoleat, palmitat, laurat ve oleat ticari öneme sahiptir (Kuleaşan, 2008).

Bir yağdaki çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarı, o yağın diğer özelliklerinin yanında kuruyan veya yarı kuruyan karakterde olmasını da belirlemektedir. Konjuge yapıdaki polienik yağ asitleri izolen yağ asitlerine kıyasla kimyasal tepkimelere daha

kolay girmektedir. Bu özellikleri nedeniyle bu tip yağlar l k ve boya sanayi için önemli ve aranan hammaddelerdir (Kuleaşan, 2008).

Ayrıca orta zincir uzunluğundaki doymuş yağ asitleri Laurik asit (12C), Palmitik asit (16C) margarinde oluşturdukları kristal formlar ve yapıya kazandırdığı plastisite itibarı ile margarin üretimi açısından önem taşımaktadır. Bu yağ asitleri oksidasyona karşı stabildirler ve yağda çözünen flavor, renk maddeleri, vitaminler ve ilaç bileşenleri için de taşıyıcı g revindedirler. Bu yağ asitlerinin 8.3 kcal/g enerji değerine sahip olmaları d Őuk kalorili gıda ürünlerinin üretiminde kullanılmalarını da mümkün kılmaktadır (Kuleaşan, 2008).

Ana kaynağı hindistan cevizi ve palm çekirdeği olan orta zincir uzunluğundaki yağ asitlerinden Laurik asit, yüzey aktif madde olmasından dolayı sabun, deterjan ve kiŐisel bakım ürünleri sanayi için de önemli bir hammaddedir (Kuleaşan, 2008).

2.4. Yağların İnsan Sağlığı Açısından  nemi

Hayvansal organizmaların başlıca besin kaynaklarından birisini meydana getiren lipidler enerji verme ve enerji depolama bakımından karbonhidratlardan daha üstün bir niteliğe sahiptir. Lipidlerin, yapılarında yer alan yağ asitlerine göre, membranlarda yapı taŐı olarak bulunmak, metabolizma için gerekli hücresel enerji deposu görevi görmek, metabolizma için gerekli yakıtın taŐınabilir Şekli olmak, böcekler, bakterilerin hücre duvarları, bazı bitki yaprakları ve cilt için koruyucu madde olmak gibi başlıca dört fonksiyonu bulunmaktadır. Bunun dışında lipidlerin hayvanlarda cilt altı yalıtım maddesi ve i dokulara destek olarak ayrıca önemli görevleri olduğu görülmektedir. Bazı vitaminlerin absorpsiyonunun sağlanması ve prostoglandinler gibi önemli biyolojik etkiye sahip maddelerin  n maddesi olarak kullanılmaları yönünden de lipidler çok değerli organik maddelerdir (Bingöl, 1976). Yağları oluşturan yağ asitlerinin de insan vücudunda önemli işlevleri vardır. İnsan gözünün doğru bir Şekilde çalıŐmasına, beynin fonksiyonlarını eksiksiz olarak yerine getirmesine yardımcı olurlar ve kandaki yağ konsantrasyonunu düzenlerler (Kaya, 2004).

Esansiyel yağ asitleri doğal kan inceltici özelliğe sahip olup, kalp krizine yol açabilen kan pıhtılaşmasını önleyebilmektedirler. Bu yağ asitleri, artrit ve otoimmün hastalıklarının semptomlarını hafifleten doğal iltihap giderici bileşikler de içermektedir. Esansiyel yağ asitleri açısından fakir bir beslenme rejimi; kepek, egzema, çatlak tırnaklar, mat ve kırılğan saçlar gibi deri problemlerine neden olabilmektedir. Bağırsak sistemi boyunca uzanan hücrelerin yapısını etkilemekte, ince bağırsağın içini kaplayan sindirici-emici hücrelerin kalınlığını ve yüzey alanını arttırmaktadır. Bu da besinlerin daha iyi emilimi, alerjenlerin daha az emilimi demektir. Ayrıca esansiyel yağ asitlerinin içerdiği bileşiklerin hayvanlarda kanser hücrelerini bloke edebildiği, insanlarda ise omega-3 grubu yağ asitlerinin göğüs kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebildiği birçok araştırmada ortaya konmuştur (Eseceli, 2006).

Beslenmenin lipid metabolizması üzerine olan etkisinde diyetin içeriğinin yanı sıra bunun ne kadar süre uygulanacağı da önemli bir konudur. Erken gelişim döneminde uygulanan ve uzun süreli tüketilen diyetin beyin lipid içeriğini değiştirebileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Akan, 2000).

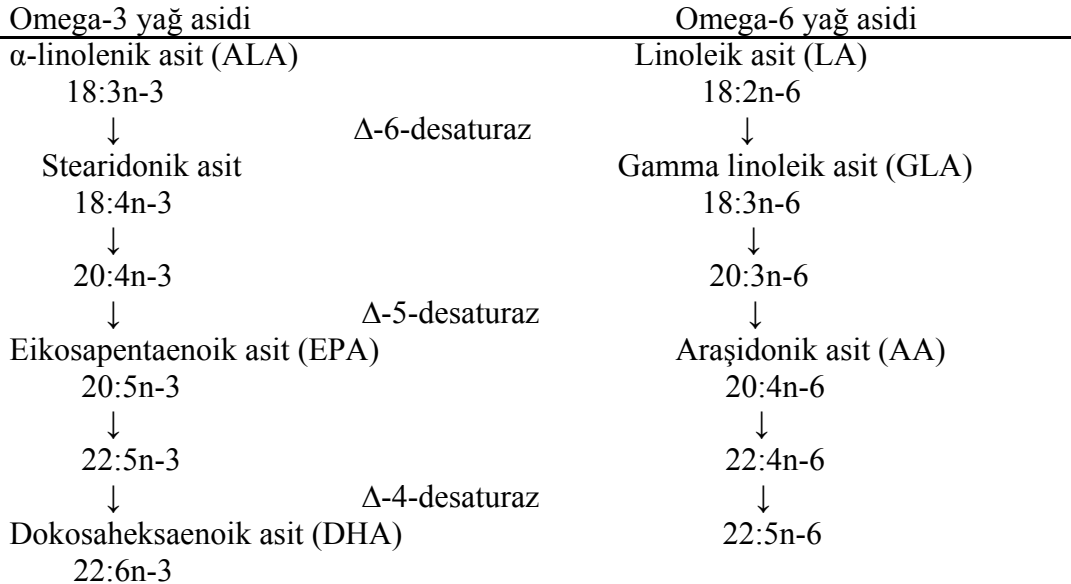
Orta zincir uzunluğundaki doymuş yağ asitlerinin sindirimlerinin, emilimlerinin, taşınmalarının ve metabolize edilmelerinin uzun zincirli yağ asitlerine göre daha hızlı olduğu belirlenmiştir. Bu yağ asitlerinin vücutta depolanma eğilimi de daha düşüktür, bu nedenle pankreatik sorunları ve emilim problemi olan hastalarda tedavi amaçlı kullanıldıkları bildirilmektedir. Orta zincir uzunluğundaki yağ asitleri ketojenik özellikte olduklarından ilaç tedavisinin yeterli olmadığı epileptik çocuklarda faydalı oldukları belirtilmektedir. Ayrıca bu yağ asitleri HIV(+) hastalarda diarenin önlenmesi ve yetersiz yağ asiti absorpsiyonununun tedavi edilmesi gibi alanlarda kullanıldığı ve ketojenik diyetin tümör büyümesini azalttığı da bildirilmektedir (Kuleaşan, 2008).

Bilim adamları ilk olarak, Gröndland'da Eskimoların sağlığı üzerine çalışma yaptıklarında Omega-3'ün önemini fark etmişlerdir. Eskimoların geleneksel gıdalarının yüksek oranlarda yağ içermesine karşın, kalp hastalığı, romatizmal kireçlenme, astım ve gelişmiş ülkelerde yaygın olan pek çok hastalığa karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Bunun sebebi, doymamış yağları içeren balık etlerinin ve

deniz memelilerinin yağlarının Eskimolar tarafından bitkisel yağlara göre daha çok tüketilmesidir. Yağ asitleri, insan sağlığına olan olumlu etkileri nedeniyle gittikçe artan bir şekilde ticari ilgi odağı haline gelmektedir (Karabulut, 2006). Günümüzde modern toplumun bir sendromu olarak omega-3 yağ asitlerinden eksik beslenme söz konusudur. Omega-3 yağ asitlerince fakir beslenen deney hayvanlarının nöron ve retina işlevleri ve kavrama yetenekleri olumsuz yönde etkilenmektedir (Akan, 2000). İngiliz Beslenme Vakfı diyetlerdeki kaloringin % 6'sının Omega-6 yağ asitlerinden, %1.5'inin ise Omega-3 yağ asitlerinden sağlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Buna göre alınması tavsiye edilen günlük ortalama miktarlar aşağıda verilmiştir:

1. Linoleik asit: Erkekler 17.0 g, Bayanlar 13.0 g.
2. Alfa-linoleik asit: Erkekler 3.0 g, Bayanlar 2.0 g.
3. EPA ve DHA: Erkekler 1.4 g, Bayanlar 1.1 g. (Karabulut, 2006).

ALA, EPA ve DHA beyin ve retinanın ilk gelişimlerinde elzemdirler. ALA'dan türeyen DHA beyin gelişimi ve görsel fonksiyonlar için elzem iken LA'dan türeyen araşidonik asit (AA) neonatal büyüme ve ovulasyon için esansiyeldir (İşleroğlu, 2005).



Şekil 2. 1. Omega-3 ve omega-6 serilerinin çoklu doymamış yağ asitleri ile ilişkileri (İşleroğlu, 2005).

Omega 3 (alfa-linolenik asit), Omega 6 (linoleik asit) ve Omega 9 (oleik asit)'dan oluşan omega yağ asitlerinin beyin gelişimi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, koroner kalp hastalıklarının önlenmesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Bu yağ asitlerinin en çok bulunduğu gıda maddeleri arasında; Omega-3 yağ asidi açısından balık yağı, keten tohumu, soya ve yeşil yapraklı sebzeler, omega-6 yağ asitleri açısından bitkisel sıvı yağlar, omega-9 yağ asitleri açısından ise, zeytinyağı yer almaktadır. Gerek gıda maddelerinin doğrudan bileşimine eklenerek gerekse hayvansal kaynaklı gıdalarda elde edildiği canlı hayvanların rasyonlarına ilave edilerek, gıda maddelerinin omega yağ asitleri açısından zenginleştirilmesi sağlık açısından daha uygun gıda eldesi için önemli bir uygulamadır (Eseceli, 2006).

Yapılan araştırmalarda omega-3 yağ asitinin insanlarda kalp krizi ve diğer hastalıkların riskini azalttığı belirlenmiştir. Karada yetişen bitkiler genellikle omega-6 yağ asitleri üretmekle birlikte, belirli bazı deniz ve tatlı su bitkileri (özellikle algler ve soğuk su bitkileri) omega-3 yağ asidi üretmektedir. Balık yağında önemli olan PUFA'lar grubunda ayırım yapmak için 5 veya daha fazla çift bağ içeren omega-3 PUFA'lar, yüksek doymamış yağ asitleri (HUFA) olarak adlandırılır. Tüketilen gıdalardaki yağların, doymamış yağlar bakımından zengin olması büyük önem taşımaktadır. Çünkü omega-3 serisi yağ asitlerinin vücutta, biyokimyasal ve fizyolojik aktivitelerde önemli görevler üstlendiği artık kesin olarak bilinmektedir (Kaya, 2004).

Keten tohumu yağı, yağ asitlerinin yaklaşık % 55'ini oluşturan omega 3 yağ asitlerinden α -linolenik asidin (ALA) en zengin kaynaklarından birisidir. Keten tohumuna gösterilen ilgi soğuk presleme ile elde edilen yağında % 50 oranında omega-3 yağ asidi bulunduğunun anlaşılmasından sonra başlamıştır. Keten tohumları, % 5 palmitik asit (16:0), % 3 stearik asit (18:0), % 17 oleik asit (18:1n-9), % 15 linoleik asit (18:2n-6) ve % 59 α -linolenik asit (ALA; 18:3n-3) içermektedir. α -linolenik asit (ALA) ve linoleik asit (LA, n-6)'in her ikisi de esansiyel yağ asitleridir ve diyetle alınmaları gereklidir (İşleroğlu, 2005).

2.5. Mikrobiyel Yağ Sentezi

Mikroorganizmalar hücrelerinde genel olarak yaklaşık % 20-30 oranında yağ içermektedirler. Mikroorganizma hücrelerinde yağların büyük bir kısmı hücre zarında bulunmakta olup çeşitli fonksiyonel görevleri vardır. Bazı mikroorganizmalarda ise yapısal yağların yanı sıra yüksek miktardaki yağ hücre içerisinde depo materyali olarak normalin oldukça üzerinde bir oranda üretilmektedir. Normalden çok daha fazla yağ depolama özelliğine sahip bu mikroorganizmalar “yağ üreten” (oleaginous) veya “yağ depolayan” mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Ratledge, 2004). Mikroorganizmalar arasında bakterilerin (prokaryot) trigliserit formundaki yağ üretimi oransal olarak çok düşük miktarlarda olup, ürettikleri yağlar büyük oranda poly- β -hidroksibütirat formundadır. Bütün mikroorganizmalar yağ üretme konusunda aynı yetkinlikte değildir. Örneğin, bakteriler triaçilgliserol sentezlemede nispeten zayıf, bunun yanı sıra bazı mayalar ve özellikle küfler iyi birer kaynak olabilirler. Bakteriler ise mum esterleri, polyester, poli- β -hidroksibütirat gibi daha spesifik yağların üretimine daha yatkınlardır (Aran, 2010).

Yağ depolama özelliğine sahip mikroorganizmaların hemen hepsini ökaryotik yapıdaki maya ve küfler oluşturmaktadır. Bu nedenle ökaryotik yapı gösteren küfler ve mayalar trigliserit formundaki yağ üretimi açısından daha zengin bir kaynaktır. Maya ve küflerde normal besin koşullarında yağ depolama özelliğine sahip olmayan bazı türlerin dahi uygun koşullarda yüksek oranda yağ depolayabilme kabiliyetine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle ökaryotik bir mikroorganizma için yağ depolama özelliği her zaman mikroorganizmanın türüne bağlı olmayıp, ortamdaki besin elementlerinin oranına bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (Mukherjee, 2002).

Günümüzde hayvansal ve bitkisel yağların ve bu yağların kimyasal yapılarındaki farklılıkların insan metabolizması ve sağlığı üzerindeki etkileri kapsamlı olarak açıklanmış olup bunun sonucunda bilinçli olarak tüketilen yağların insan sağlığını geliştirici hatta bazı hastalıklara karşı önleyici etkileri üzerinde durulmaktadır (Veen ve Lang, 2003). İnsan beslenmesinde doymuş yağ asitleri ve trans yağ asitlerinin tüketimine karşı duyulan hassasiyet artmıştır. Bu hassasiyete paralel olarak, daha

detaylı biyokimyasal çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yağların sadece kaynağının değil, yağ asitlerinin zincir uzunluklarının (karbon sayısı), trigliserit molekülü üzerindeki bulunma yerlerinin (α , β , α'), çift bağ sayılarının ve hatta çift bağların kaçınıcı karbon atomları arasında yer aldığı konusunun dahi insan sağlığı açısından önemli olduğu belirlenmiştir (Adamczak vd., 2008).

İnsan beslenmesinde sıvı ve katı yağlar doğal bir enerji kaynağı olarak gıda bileşenleri arasında önemli bir paya sahiptir. Günümüzde tüketilen yağların tamamına yakını bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanmaktadır. Ancak hızla artan dünya nüfusu, yağların sadece insan tüketiminde kullanılmayıp sabun, deterjan, boya ve kozmetik sanayilerinde de hammadde olarak çok miktarda kullanılıyor olması, bitkisel ve hayvansal kaynakların yetersiz kalmasına yol açmaktadır (Azeem vd., 1999).

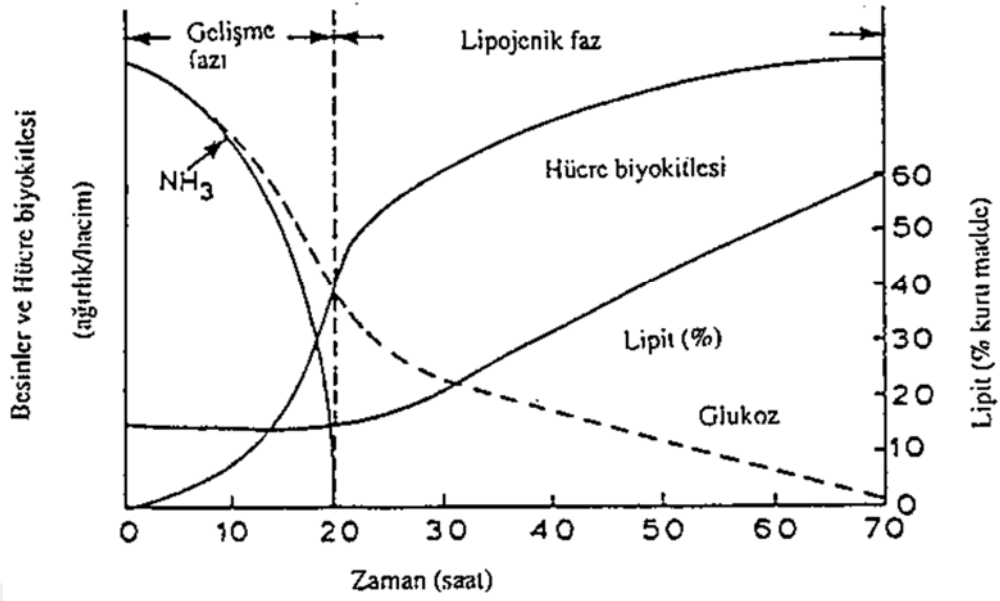
Genel bir ifadeyle mikrobiyel yağ üretimi ile ilgili olarak yapılan çalışmaların iki temel sebebi mevcuttur. Bunlardan ilki mikrobiyel yağ üretiminin ucuz hammaddelerden yararlanılarak daha değerli bir ürün olan yağa çevrilmesidir. Pek çok atık veya ucuz karbon kaynakları insan tüketiminde kullanılmamakta ve doğaya atılmaktadır. Bu durum hem ekonomik olarak büyük bir hammadde kaybı olmakta hem de doğada parçalanmaları sırasında tüketilen yüksek orandaki oksijenden dolayı atıldıkları çevredeki ekolojik dengeyi de tehdit etmektedirler.

Mikrobiyel yağ üretiminde üzerinde durulan ikinci önemli sebep ise mikroorganizmalar tarafından oldukça özel yağ asitlerini içeren trigliseritlerin üretilebiliyor olmasıdır. Bilindiği üzere bazı çoklu doymamış (PUFA) yağ asitleri insan beslenmesinde önemli bir yer teşkil etmektedir. Ancak bunların kaynakları olarak bitkisel ve hayvansal yağlar yeterli olamamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, mikrobiyel yolla üretimi hedeflenmesi gereken önemli yağ asitleri arasında GLA (gama linoleik asit), AA (araşidonik asit), DHA (dokosahegsaenoik asit), ve EPA (Eikosapentaenoik asit) gösterilmektedir (Ward ve Singh, 2005). Ayrıca Konjuge linoleik asit (CLA) ve diğer bazı önemli yağların da kaynakları hayvansal yağlar olarak belirtilmekle birlikte, yapılan çalışmalar bu yağ asitlerinin sentezinin büyük oranda çok mideli otçullarda (ruminant) bağırsak ve sindirim

sistemlerinde bulunan mikroorganizmalara dayalı olduğunu göstermiştir (Medina vd., 1998; Palmquist, 2007). Mikrobiyel yolla, γ -Linolenik (GLA) (C18:3n-6) üretimi üzerine yapılan bir çalışmada (Kavadia vd., 2001) araştırmacılar *Zygomycetes* cinsi küflerde glukozu kullanarak bu yağ asitini üretmeyi başarmışlar ve ayrıca aynı yağ asitinin *Mucor*, *Mortierella*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, ve *Zygorhynchus* cinsi küfler tarafından da sentezlenebildiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde yapılan bir diğeri çalışmada ise (Sakuradani ve Shimizu, 2009) araştırmacılar *Mortierella alpina* cinsi küfün, içlerinde 20 karbonlu araşidonik asitin de bulunduğu birkaç farklı önemli çoklu doymamış yağ asitleri yüksek oranda sentezlediğini göstermişlerdir.

Bitkisel yağ üretimi ile karşılaştırıldığında, yağ üreten mikroorganizma kültürlerinin iklim şartlarından etkilenmemesi ve yağlı mikroorganizmalarda kısa bir süre içinde lipidlerin birikmesi birer üstünlük olarak görülmektedir. Buna ek olarak, pek çok yağlı mikroorganizma, çeşitli ucuz tarımsal-endüstriyel atıklardan lipid üretebilmektedir. Bu sayede üretim maliyetleri daha düşük tutulabilmektedir. Bakteri, maya, küf ve mikroalg dahil olmak üzere, yağlı mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyel yağlar, bitkisel yağlara benzerlik gösteren yağ asidi kompozisyonları nedeniyle biyodizel üretiminde de umut verici hammaddelerdendir (Wu vd. 2011).

Mikrobiyel yağ üretiminde yüksek miktarda ürün elde edebilmek için, üretim koşullarının ve mikroorganizmaların fizyolojik durumlarının dikkatli bir şekilde incelenmesi ve belirlenmesi oldukça önemlidir. Bir mikroorganizmanın yüksek düzeyde yağ üretmesi özellikle boyut ve hücre yapısıyla ilgilidir (Denli ve Tekin, 2000).



Şekil 2.2. Kesikli Kültürde Gelişen Yağlı Maya veya Küflerde Lipit Birikimi (Denli ve Tekin, 2000).

Şekil incelendiğinde mikrobiyel lipid üretiminin 2 aşamalı olduğu görülmektedir. 1. aşamada hücrelerin gelişimi için gerekli bütün besin elementleri bulunduğu için, dengeli bir gelişim söz konusu olmaktadır. Ortamda seçilen besin elementi tükenince bu aşama biter ve yağ üretim aşaması veya “lipojenik faz” denen aşamaya sıra gelir. Bu safha, ortamda bulunan karbon kaynağı tükeninceye veya yağ üretimi için gerekli diğer besin elementleri hücreler tarafından tamamen kullanılıncaya kadar sürer (Denli ve Tekin, 2000).

2.6. Mikrobiyel Yağların Yağ Asidi İçerikleri

Aspergillus sydowii, *Fusarium oxysporum* ve *F. equiseti* gibi küflerden elde edilen mikrobiyel yağlardaki yağ asidi profili ve yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde, bu yağlarda yüksek oranda doymamış yağ asitlerine, özellikle oleik aside rastlanmıştır. Ayrıca bu mikrobiyel yağların yenilebilir yağlara, yerfıstığı yağına ve palm yağına benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Küflerde lipid oluşum oranı ve yağ asidi kompozisyonu, beslenme ve çeşitli fiziksel parametrelerden etkilenmektedir. Tek Hücre Yağı gibi ürünlerin üretiminde küflerin kullanımı, ülkelerin ekonomisi için uygun ve önemli bir yöntem olmaktadır (Azeem vd., 1999).

Farklı uzun zincirli doymamış yağ asitleri içermeleri nedeniyle mikroorganizmalar ilgi çekmektedir. Bunlardan dokosahegzaenoik asit (C22:6 n-3, DHA) insan fizyolojisi üzerindeki öneminden dolayı en çok çalışılan yağ asidi türü olmuştur (Shene vd., 2010). Dokosahegzaenoik asit (C22:6 n-3, DHA), sinir dokusu ve retinanın önemli yapısal bileşenlerinden olan uzun zincirli, doymamış bir yağ asididir. Beyin gelişimi söz konusu olduğundan, bebeklerin beslenmesi için gerekli olarak kabul edilir. Günlük DHA alımının hipertansiyon, depresyon, artrit gibi bazı hastalık türleri üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Horrocks ve Yeo, 1999).

Yapılan çalışmalarda çeşitli karbon kaynakları denenerak DHA konsantrasyonları ölçülmüştür. Günümüzde, soğuk deniz suları balıkları ve balık yağları DHA için başlıca kaynaklardır. Metabolik ve yapısal fonksiyonlarla ilgili olan PUFA'lar, % 95'in üzerinde doğal cis izomeri yapısına sahiptirler. Balıklar da tıpkı insanlar gibi düşük kapasitede DHA gibi uzun zincirli yağ asitlerini sentezleme yeteneğine sahiptirler. Bu maddeleri elde edebilmek için fitoplanktonlara, ototrofik bakterilere ve zooplanktonlardaki bileşenlere ihtiyaç duyulur. Bazı deniz bakteri türleri özellikle soğuk ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşayanlar, yüksek oranda eikosapentaenoik asit (C20:5 n-3, EPA) ve DHA içeren yağlar üretebilirler. Deniz bakterileri tarafından sentezlenen yağ asitlerinin profilleri, balık ve fototrofik mikroalglerin yağlarının karmaşık profillerinin aksine oldukça basittir. Bu mikrobiyel PUFA kaynağının dezavantajı düşük lipid verimidir (Shene vd., 2010).

Doymamış yağ asidi, özellikle oleik asit içeriği yüksek mikrobiyel yağlar, yüksek kaliteli biodizel üretimi için de iyi bir hammaddedir. *Trichosporon capitatum*'un azotu sınırlandırılmış ortamda, yaklaşık % 80 oleik asit ve % 89 toplam doymamış yağ asidi içeriğine sahip bir yağ biriktirdiği bulunmuştur (Wu vd., 2011).

Mayalardan elde edilen yağların yağ asidi kompozisyonları, gelişme sıcaklığına, fermantasyon süresine ve ortama göre değişmektedir. Bu yağlar 18:1, 16:0 ve 18:0 yağ asitleri açısından zengindir. Mayalarla yapılan çalışmalarda elde edilen yağlar oktadekanik asit bakımından zengin bulunmuştur ve önemli miktarda palmitik ve stearik asit içermektedir (Moon ve Hammond, 1978).

Organizmanın büyüme sıcaklığı düşürüldüğünde, doymamış yağ asitleri genellikle lipid akışkanlığını korumak için artmaktadır. Yağ asidi kompozisyonu kültürün yaşı ile de değişmektedir. İlk büyüme aşamasında az miktarda yağ birikirken, maksimum hücre sayısına ulaşıldığında fazla miktarda şekerin yağa dönüştüğü görülmüştür. Büyüme aşamasında, doymamışlık derecesi ve/veya kısa zincirli yağ asidi içeriği iyi seviyededir. Bu aşamada, hücreler muhtemelen fosfolipit açısından trigiliseritlere göre daha zengindir (Moon ve Hammond, 1978).

2.7. Yağ Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

2.7.1. Algler

Yağca zengin fitoplanktonlar kuru ağırlık üzerinden %50'lere varan oranda lipid depolayabilmektedir. Organik karbon kaynağı olmadan da gelişim gösterebilmeleri alg ve fitoplanktonlara avantaj sağlamaktadır. Ozmotik basınca dayanıklı türler deniz suyunda da geliştirilebilmektedir. Böylece bu mikroalglerden düşük maliyetle yağ üretimi olası olmaktadır. *Chrysophyceae*, *Xanthophyceae* ve *Eustigmatophyceae* sınıfı bazı alglere ait lipidler yüksek oranda eikosapentaenoik asit (EPA) içermektedir. *Spirulina platensis*'nin içerdiği yağın yaklaşık %20'si GLA'dır. Diatomlarda (*Bacillariophyceae*) temel PUFA'nın EPA olduğu bilinmektedir (Darcan ve Sarıgül, 2015). *Arthrospira maxima* gibi alglerin ürettiği mikrobiyel yağların yağ asidi kompozisyonlarının da incelendiği çalışmalar mevcuttur (Gürbüz vd., 2009).

Alglerden elde edilen yağların, balık yağlarına kıyasla daha temiz ve konsantre EPA ve DHA kaynakları olabileceği düşünülmektedir. Bu özelliklerinin yanı sıra algal biyomaslar, balıkların omega-3 çoklu doymamış yağ asidi üretimini artırmak amacıyla besin kaynağı olarak da kullanılabilirler (Aytuna, 2004).

Mikroalgler bitkiler gibi, yağ üretimi için güneş ışığını kullanırlar fakat bu enerjiyi bitkilere oranla daha verimli kullanmaktadırlar. Birçok mikroalg türünün yağ verimliliği, en iyi yağ bitkisinin verimliliğinden daha üstündür. Son çalışmalarda ise, fosil kökenli yakıtlar ile mikroalglerle dayalı biyodizel arasındaki ekonomik rekabet şartları araştırılmaktadır (Eliçin vd., 2009).

Uygun üreme koşullarında bazı alglerin sahip oldukları yüksek lipid içeriği ve etkili yağ üretme potansiyelleri araştırılmıştır. 2. Dünya Savaşı sırasında Almanya’da *Nitzschia palea* ve *Chlorella pyrenoidosa* ‘nın hücre büyümesi durdurulduğunda lipid depoladığı bulunmuştur. 1949’da çevre koşullarının değişimiyle hücrelerin protein ve yağ içeriklerinin artırılabilirdiği görülmüştür. Bu yıllarda *Chlorella*’nın % 5-85 oranında yağ depolayabildiği saptanmıştır. 1953’te alglerle yapılan çalışmalarda, hücrelerde % 40-70 oranında yağ tespit edilmiştir. Sonuç olarak çeşitli alglerin çevre şartlarındaki lipid içerikleri ve biriktirme yetenekleri arasında farklılıklar bulunmuştur (Bunker, 1963).

2.7.2. Mayalar

Mayaların intraselüler olarak yüksek miktarda yağ biriktirme yetenekleri, oldukça yüksek büyüme hızları ve TAG fraksiyonlarının bitki yağlarına benzemeleri sebebiyle şimdiye kadar çalışmaların çoğu mayalar üzerine gerçekleştirilmiştir (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Yağca zengin mayalar kakao yağı gibi yağlara benzer özellikte lipid üretiminde kullanılabilir. *Candida curvata*’dan elde edilen trigliserit kakao yağının kine benzer erime sıcaklığı aralığına sahiptir (Aytuna, 2004).

Rhodosporidium sp., *Rhodotorula sp.*, ve *Lypomyces sp.* gibi bazı maya türleri hücrelerinde kuru ağırlıklarının %70’i kadar lipid biriktirebilme yeteneğine sahiptir (Dönmez ve Karatay, 2011).

Mayalardan *Trichosporon pullulans* aerobik koşullarda iyi bir yağ üretimi gerçekleştirdiği saptanmıştır. Normalde yağ üreten mikroorganizma olarak görülmeyen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida utilis*’in oldukça yüksek miktarda yağ ürettiği saptanmıştır. *Pichia farinosa* % 7-9, *Candida utilis* ve *Geotrichum candidum* % 4-14, *Hansenula anomala* % 9-16 oranında yağ ürettikleri bulunmuştur (Bunker, 1963).

Yapılan çalışmalarda, yağ üretiminde en umut verici mikroorganizmanın *Rhodotorula gracilis* olduğu görülmüştür. Besiyerindeki sindirilebilir azot miktarı

kısıtlandığında *Rhodotorula gracilis* 'te yağ birikiminin arttığı gözlenmiştir. Diğer umut verici yağ üreticiler ise *Lipomyces lipofer* ve *Lipomyces starkeyi* olarak bulunmuştur. *Lipomyces lipofer* ile yapılan çalışmalarda % 40, *Lipomyces starkeyi* ile yapılan çalışmalarda ise % 50-63 oranında yağ birikimi gözlenmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda ise inositol içermeyen besiyerinde geliştirildiğinde yağ içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı görülmüştür (Bunker, 1963).

2.7.3. Bakteriler

Bakteriler polihidroksi alkanoik asit ve diğer polihidroksi asitler gibi endüstriyel açıdan önemli özel lipidlerin üretiminde kullanılmaktadırlar. *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter* triaçilgliserol (TAG) üretimi için potansiyel mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar organik asitler ve n-alkanlar gibi farklı karbon kaynakları üzerinde inkübasyon süresince değişen miktarlarda nötral lipid üretmektedirler. Bu mikroorganizmalar biyokütlelerinin %20'sinden fazlasını lipid olarak biriktirdikleri için yağ üreten bakteri olarak tanımlanabilirler (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Hızlı gelişebilme özelliğine sahip olan bakterilerin düşük hücre verimleri ve lipid içerikleri, mikrobiyel lipid kaynağı olabilmelerini engellemektedir. Ancak "*Mycobacteria-Nocardia-Corynebacteria*" grubu üyelerinin hücre ağırlıkları üzerinden %20 oranında yağ içerdikleri belirtilmektedir. Bu grup bakterilerin lipid içeriği genel olarak yüksek olmakla beraber elde edilen lipid çoğunlukla toksin ve alerjen moleküller içermektedirler. Ayrıca mevcut ekstraksiyon yöntemlerinin bakterilere adapte edilememesi bu mikroorganizmaların çok fazla çalışılmamasına neden olmaktadır (Aytuna, 2004).

Bakterilerde yağ üretimi ile ilgili mevcut bilgiler daha çok patojenlerle ilgilidir. Bu kategoride, yağ oranları % 7-21 arasında değişen 5 mikroorganizmanın içerisinde *Mycobacterium* türleri göze çarpmaktadır. Patojen olmayanlarda ise ölçülebilir yağ üretenler, *Spirillum lipoferum*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium xerose*, *Bacillus megaterium*, *Proteus vulgaris*, *Azotobacter indicum* ve *Aerobacter cloacae* olarak bulunmuştur (Bunker, 1963).

2.7.4. Funguslar

1980'li yıllardan bu yana funguslar ilgi çeken yağlı mikroorganizmalar olmuştur. Yüksek lipit içeriğine sahip funguslara örnek olarak *Mortierella sp.* cinsine ait türler verilebilmektedir. Yağlı mayalar ve küfler çoklu doymamış yağ asitlerince zengin triaçilgliserol biriktirmektedirler. Bu hücrelerde en fazla rastlanan yağ asitleri arasında C18:1, C18:2, C16:0, C16:1 gelmektedir. Bu bilgiler ışığı altında yağlı maya ve fungusların biyodizel üretimi için alternatif yağ kaynakları olduğu söylenebilmektedir (Dönmez ve Karatay, 2011).

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. Ayrıca küflerden steroid, karotenoid ve fosfolipit gibi diğer tür lipitler de üretilmektedir (Aytuna, 2004).

Küfler genel olarak mayalara kıyasla daha yavaş gelişmektedirler fakat, elde edilen yağların çoklu PUFA içeriği mayalardan elde edilen yağlara göre daha yüksektir. Mayalar tarafından sentezlenemeyen belirli yağ asitleri küfler tarafından sentezlenebilir. Fakat filamentli yapılarına bağlı olarak yavaş gelişim ve karbon kaynaklarından düşük biyokütle verimi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptirler (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Fungilerde kuru ağırlıkta miselyumlarda % 1-50 aralığında, sporların içinde ise % 14'e kadar yağ biriktiği görülmüştür. *Aspergillus fischeri*, yüksek konsantrasyonda glukoz ve düşük konsantrasyonda NH₄NO₃ içeren besiyerinde yağ üretebilmiştir. *Geotrichum candidum*, mikrobiyel lipid üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalardanıdır. *Mucor mucedo*, *Pullularia pullulans* da yağ üretiminde kullanılmıştır ancak en çok tercih edilenler *Fusarium*, *Penicillium* ve *Aspergillus* türleridir (Bunker, 1963).

2.8. Mikrobiyel Yağ Üretim Koşulları

Yağ üretiminde kullanılacak bir mikroorganizmanın fermantasyon öncesinde, sırasında ve sonrasındaki durumlarının pilot ölçeğinde yapılacak bir deneyle önceden bilinmesi gereklidir. Böyle bir deneyin sonunda elde edilen bilgilerden o mikroorganizmanın fermantasyona uygun olup olmadığı, fermantasyonun hızı ve süresi, köpük, zar, adacık veya halka vb. yapılar oluşturup oluşturmadığı, ortam cidarına tutunup tutunmadığı, fermantasyon sırasında ve sonrasında sıvının berrak olup olmadığı, yaptığı tortunun durumu ve rengi, hangi şekerleri kullandığı vb. özellikleri belirlenebilir (Pamir, 1984).

Mayalardan yağ ekstraksiyonunda yeni, ekonomik, uygulanabilir bir metot gereklidir. Çünkü mayaların ekstraksiyonu genellikle zordur. Fermantasyondan sonra ortamın biyolojik oksijen ihtiyacı çok düşük olmalıdır. Fermantasyon diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında ekonomik açıdan daha uygun olmalıdır (Moon ve Hammond, 1978).

2.9. Mikrobiyel Yağ Üretiminde Kullanılan Karbon Kaynakları

Tüm maya suşları karbon kaynaklarını iki aşamalı olarak fermente ederler. Bunlar, büyüme aşaması ve çok az yağ birikiminin takip ettiği yağlanma aşamasıdır. Bu iki aşama büyüme için gerekli besinlerin tükenmesi ve artık karbonhidratların yağa dönüşmesi ile sonuçlanır (Moon ve Hammond, 1978).

Karbonhidrat dönüşüm verimi iki ifade ile tanımlanmaktadır. Bunlardan "Rippel's faktörü", 100 gram glukozun tüketilmesi sırasında üretilen lipidin gram cinsinden ifadesidir. Diğeri ise Kleinzeller 'in kurduğu bir bağlantı olan "dönüşüm katsayısı" dır. Substrat karbon yüzdesi ve yağa dönüşen karbon yüzdesi arasında bir bağlantı gösterir (Bunker, 1963).

Karbon kaynakları aralarında yapılan testte patates tozu, en yüksek biyokütle konsantrasyonuna sahip kaynak olarak bulunmuştur. DHA verimi de yeast ekstrakta göre neredeyse 2 kat daha fazla elde edilmiştir (Shene vd., 2010).

Peyniraltı suyu kullanımı teknik olarak uygulanabilir bir yöntemdir. Karbonhidratların fermantasyon ile yağa dönüştürülmesi, uzun yıllar boyunca ciddi ticari bir süreç olarak görülmemiştir. Ancak gıda işleme atıkları ve yan ürün bertaraf sorunları bu süreci tekrar cazip hale getirebilir. Peyniraltı suyu ve özellikle ultrafiltre edilmiş peyniraltı suyu, yan ürünlerden gıda üretimine tipik örneklerdir. Bunlar seyreltiktir, genelde % 6-7 katı madde içerirler. Bu katıların başında laktoz gelmektedir. Organizmaların laktozu yağa verimli dönüştürebilme yeteneklerinin keşfedilmiş olması gerekmektedir. Çünkü neredeyse tüm mikroorganizmalar laktozdan yağ üretiminde başarısızdır. Ultrafiltre edilmiş ve edilmemiş peyniraltı sularından izole edilen *Candida curvata* ve *Trichosporon cutanecum* suşlarının laktozu fermente ederek yağ ürettikleri bulunmuştur. Hızlı fermantasyon oranları ve laktoz kullanımı *C.curvata* tarafından sağlanmıştır (Moon ve Hammond, 1978).

Singh ve Ward (1996) tarafından yapılan çalışmada, *T. roseum* ATCC28210 'un gelişmesi ve DHA üretimi için oluşturulan ortamda karbon kaynağı olarak 25 g/l nişasta kullanılmıştır. Amonyum sülfat (0.2 g/l) ve sodyum glutamat (2 g/l) ise N kaynağı olarak kullanılmıştır. Biyokütle ve DHA verimleri 6.1 g/l ve 528 mg/l olarak 5 gün sonunda elde edilmiştir. Gelişme ortamının 2 g/l yeast ekstrakt ile desteklenmesi, sırasıyla biyokütle ve DHA miktarlarının, kuru hücre ağırlığında 8.6 g/l ve 892 mg/l'ye ulaşmasına sebep olmuştur. KH_2PO_4 konsantrasyonundaki 0.1 g/l'lik artış, DHA verimini % 40 oranında yükseltmiştir. Oysa tuz konsantrasyonundaki azalmanın DHA verimi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Maksimum biyokütle (12.1 g/l), biyokütlerde lipid (% 23.7) ve biyokütlerde DHA (118 mg/g) değerleri 8 gün sonunda elde edilmiştir. Son DHA verimi 1433 mg/l olarak bulunmuştur. Shene ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada; glukoz konsantrasyonunun litrede 5g'dan 20 g'a çıkarılması, biyokütlerdeki lipid oranını da % 2.7'den % 16.5'e yükseltmiştir. 6 günlük inkübasyon sonucunda DHA verimi de litrede 26 mg'dan 270 mg'a çıkmıştır. Aynı işlemde glukoz yerine nişasta kullanıldığında daha düşük değerlere (1130 mg/l) ulaşılmıştır (Shene vd., 2010).

2.10. Mikrobiyel Yağların Ticari Üretimi

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. *Mortierella* ve *Mucor* türü küfler endüstriyel boyutta geliştirilerek yağ asidi üretimi sadece Japonya’da yapılmaktadır (Aytuna, 2004).

Mucor javanus ve *Mortierella* türü mikroorganizmaların ticari anlamda GLA (18:3 n6) üretiminde bitkisel kaynaklara alternatif olarak kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde DHA üretimi farklı mikroorganizmalar kullanılarak (*Cryptocodinium cohnii*, *Schizochytrium* spp., *Ulkenia* spp.) gerçekleştirilmektedir. Örneğin, *Schizochytrium* spp. bir mikroalg olup biyokütlesinin % 70’i yağdan meydana gelmektedir. DHA içeriğinin toplam yağın % 35’ini oluşturduğu bulunmuştur. Bu mikroalgi kullanarak Martek Biosciences Corp. (ABD) ve Nagase Biochemicals Ltd. (Japonya) tarafından ticari DHA üretimi yapılmaktadır (Aran, 2010).

Mikroalg, maya, küf ve bakterilerin, triaçilgilsenol içeren yağların ve ticari önemi olan diğer yağların üretiminde kullanılması araştırılmıştır. Ayrıca izole edilen mikroorganizmalarla ve enzimlerle yağ ve yağ asitlerinin dönüşümleri incelenmiştir (Mukherjee, 2002).

DHA’nın insan sağlığı açısından öneminin keşfedilmesiyle günümüzde endüstriyel ve ticari olarak üretim amacıyla yeni DHA kaynaklarına ilgi artmıştır. Günümüzde iki izolat *Schizochytrium* sp., 20888 ve *Ulkenia* sp., ticari DHA üretiminde kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarda yağ birikimi, karbon kaynağının arttırıldığı ve azot miktarının sınırlandırıldığı ortamlarda oluşmaktadır. Böylece mikroorganizma gelişir, azot kaynağı hızla tükenir ama karbon kaynağını asimile etmeye devam eder, bu da doğrudan lipid sentezine kanalize eder. Ancak düşük azot konsantrasyonuna sahip kültürel koşullar hücre büyümesini azaltıcı yönde etki eder. Dolayısıyla düşük lipid ve DHA verimi elde edilir (Shene vd., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların izolasyonu için lipolitik mikroorganizmaların fazla sayıda bulunabileceği düşünülen proteince zengin gıdalar ile yüksek oranda yağ içeren materyaller seçilmiştir. Bu gıdalar arasında başlıcaları dana kıyması, tavuk eti ve sosis örnekleri gelmektedir. Piyasadan alınan örnekler ağzı kapalı ortamda bir süre bekletilerek lipolitik bozulmaya yol açan mikroorganizma sayılarının artırılmasına çalışılmıştır. Ayrıca izolat sayısını arttırmak ve çeşitlendirmek amacıyla izolasyon işlemine farklı gıda örneklerinden de ekimler yapılmaya devam edilmiştir. Çeşitli üzüm örnekleri, patates ve kabuğu, Muğla ilinden getirilen tereyağı örneği, yeşil zeytin örneği ve marketten temin edilen kaşar peyniri, Ünsüt işletmesinden alınan çiğ süt, pastörize ve çiğ peyniraltı suyu da izolasyonda kullanılan gıdalar arasında yer almıştır.

Gıda örnekleri üzerindeki mikroorganizmaların izole edilmesi amacıyla, katı gıda örnekleri steril FTS içerisinde seyreltilerek homojenizatör (Pro-scientific CS-200 USA) yardımı ile homojen hale getirilmiştir. Patates ve üzüm örneklerinde ise kabuktan agar yüzeyine sürme ekimler yapılmıştır. Sıvı gıda örnekleri ise doğrudan seyreltilmeksizin ekime alınmıştır. Homojenizattan veya gıdadan alınan 0.1 ml'lik örnek öncelikle selektif olmayan besiyerlerine yayma yöntemi ile ekilmişlerdir. Bu amaçla mayalar için Malt Ekstrakt Agar (MEA, Merck, Almanya), bakteriler için Plate Count Agar (PCA, Merck, Almanya) besiyerleri kullanılmıştır. MEA petrileri 28°C'de 48 saat, PCA petrileri ise 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyerlerinde çeşitli mikroorganizmalara ait kolonilerin gelişimi gözlenmiştir.

Besiyerleri üzerinde gelişen koloniler arasında farklı görünüme sahip olanlar iğne öze yardımıyla alınarak tekrar aynı besiyerlerine sürme ekim yöntemi ile ekilmişlerdir. Bu işlem saf görünümlü koloniler elde edilinceye değin tekrarlanmıştır.

Katı besiyerinde gelişen saf izolatlar, çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılacak olan sıvı ortamlardaki üreme durumlarının gözlemlenmesi amacıyla sıvı

besiyelerine alınmışlardır. Bu amaçla maya kolonileri 5 ml ME Broth, bakteri kolonileri ise 5 ml Triptik Soya Broth (TSB, Merck, Almanya) sıvı besiyeleri içerisinde tekrar geliştirilmişlerdir. Sıvı ortamda elde edilebilecek maksimum hücre kitlesinin gözlemlenebilmesi amacıyla inkübasyon süreleri 72 saate çıkartılmıştır. Yine hücre kitlesinde farklılık olabileceği düşünülerek sıcaklıklar da değiştirilmiş, ME Broth besiyeleri 30°C, TSB besiyeleri ise 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüplerde oluşan hücre kitlesi miktarları karşılaştırılmıştır.

Sıvı besiyerinde yeterli gelişim sağladığı düşünülen izolatlardan stok oluşturulması amacıyla 1.5 ml hacminde alınarak 0.75 ml steril gliserol ile karıştırılmış 3 ml kriyojenik tüplerde -18°C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2. İzolatların Mikroskopik Yöntemle İncelenmesi

Bir önceki aşamada elde edilen izolatların hücre şekilleri ve büyüklükleri ile bakteri veya maya olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla önce basit boyamaya tabi tutulmuşlardır. Basit boyamada bütün izolatlar hem Safranin hem de Kristal Viyole ile paralel boyanarak incelenmişlerdir. Basit boyamanın ardından bakteri olduğu gözlemlenen izolatların Kristal Violet ve Safranin kullanımı ile Gram özellikleri belirlenmiştir. Bu aşamada mikroorganizmaların mikroskop altında hücre şekli, büyüklüğü, spor yapıp yapmadıkları ve Gram boyama özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen izolatların birbirlerinden çok farklı özellikler göstermeleri nedeniyle ilave olarak seçici izolasyon aşaması uygulanmasına karar verilmiştir.

3.3. İzolatların Gruplandırılması

Yapılan literatür araştırmasında yağ miktarı/hücre kitlesi oranının en fazla gram negatif bakterilerde ardından *Pichia* cinsi mayalarda ve gram pozitif bakterilerden *Bacillus* cinsi bakteriler arasında olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle sadece istenen türlerin gelişimini sağlamak ve diğerlerini elimine etmek amacıyla genel amaçlı besiyelerinden izole edilen mikroorganizmalar spesifik besiyelerine alınarak belirli mikroorganizma cinslerine yönelik spesifik izolasyon yöntemine geçilmiştir. Genel izolasyon aşaması sonucunda kıyma, siyah üzüm, patates, tereyağı, kaşar peyniri, yeşil zeytin, çiğ süt, peynir altı suyu ve çiğ peynir altı suyu gibi farklı kaynaklardan

yapılan izolasyonlarda 95 adet farklı koloni elde edilmiştir. Çalışmanın devamında bu izolatların kullanılmasına karar verilmiştir. Seçici izolasyon aşamasında tüm izolatlar, seçilmiş spesifik besiyerlerinin hepsine ekilerek en iyi gelişme gösterdikleri besiyerlerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

3.3.1. *Bacillus* türlerinin seçilmesi ve üretilmesi

Genel izolasyon yöntemleri ile elde edilmiş olan 95 izolattan bakteri oldukları tespit edilenlerin, *Bacillaceae* familyasında yer alan *Bacillus* cinsine ait olanlarının belirlenmesi amacıyla, Polymyxin Egg Yolk Mannitol Bromotyhmol Blue Agar (PEMBA-Merck, Almanya) kullanılmıştır. Sürme yöntemi ile ekilen Petri kutuları *Bacillus* cinsi bakteriler için yaygın olarak kullanılan gelişme sıcaklığı olan 30°C'de 48 saat tutulmuşlardır. İnkübasyon sonrasında *Bacillus* kolonileri PEMBA besiyeri üzerinde pürüzlü, mumsu, turkuaz mavimsi renkte koloniler oluşturmuşlardır. Bu kolonilerden bazılarının lesitinaz aktivitesine bağlı olarak şeffaf renkte bir presipitasyon halkası ile çevrili olduğu, bazı kolonilerin ise mavi renk verdiği gözlenmiştir.

3.3.2. *Candida* türlerinin seçilmesi ve üretilmesi

Candida cinsi mayaların seçilmesi amacıyla, 50 mg/l Kloramfenikol antibiyotiği içeren Sabouraud dekstroz-agar (SDA-C, Merck, Almanya) besiyeri kullanılmıştır. Sürme kültür yöntemiyle yapılan ekim sonrasında petri kutuları 30°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında koloni gelişimi olan petrilere örnek alınarak mikroskopta incelemeleri tekrarlanmıştır.

3.3.3. *Saccharomyces* türlerinin izolasyonu

Saccharomyces türlerinin seçilmesi için 50 mg/ml Kloramfenikol antibiyotiği içeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyeri hazırlanmıştır. İzolatlar petrilere ekildikten sonra 30°C'de 48 saat inkübe edilmiş, morfolojik özelliklerine göre seçilen koloniler mikroskop altında incelenmiş ve tipik maya görünümünde olanlar belirlenmiştir.

3.3.4. Gram negatif bakterilerin izolasyonu

Denemelerde Gram negatif bazı bakteri cinslerine de yer verilmesi amacıyla PCA besiyerinde elde edilen izolatlar Eosin Metilen Blue agar'a (EMB-A) sürülmüşlerdir. 37°'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında saydam, pembe renkli ve yeşilimsi metalik renkli koloniler seçilmiştir. Bu koloniler arasında *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Hafnia* ve *Escherichia* cinsi Gram negatif bakterilerin olması amaçlanmıştır.

3.4. Lipolitik aktivite testi

Lipitleri fazla miktarda üreten mikroorganizmaların bazıları aynı zamanda kuvvetli lipolitik aktivite de gösterebilmektedirler. Bu mikroorganizmalar çoğu zaman gıdaların bozulmasında da rol oynamaktadırlar. Lipolitik aktivite gösteren başlıca bakteri türleri *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* ve *Staphylococcus*, küf türleri *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* ve *Penicillium* ve maya türleri ise *Candida*, *Rhodotorula* ve *Hansenula* cinsleri içinde yer almaktadır. Lipolitik mikroorganizma aranmasında kullanılan besiyerlerinden bazıları Tributyrin Agar (TA), yumurta sarısı içermeyen Baird-Parker Agar (BPA), Nutrient Agar (NA)'dır.

Mikroorganizmaların lipolitik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Tributyrin Agar hazırlanmıştır. 2.5 g/l et peptonu, 2.5 g/l kazein peptonu, 3 g/l maya ekstraktı ve 12 g/l agar karıştırılarak litreye saf suyla tamamlanmıştır. 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 10 g/l tereyağı ilave edilerek petrilere dökülmüştür. Aktif mikroorganizma kültürleri öze yardımı ile petrilere sürülerek opak zon oluşumu gözlenmiştir (Doğan vd., 2000).

İlk uygulanan yöntemde opak zonların elde edilememesinden dolayı lipaz aktivitesi belirlenmesinde bir başka yöntemge geçilmiştir. Bir polisorbata olan ve emülgatör görevi yapan Tween-20 maddesiyle hazırlanan besiyerinde, 8 g/l Nutrient Broth, 0.1 g/l CaCl₂ 2H₂O ve 15 g/l Agar bulunmaktadır. 121°C'de 15 dk sterilize edilen karışıma 10 ml/l steril Tween-20 ilave edilerek petrilere dökülmüştür (Samad vd., 1989).

3.5. Sudan Black B Boyama

Yağ üreten mikroorganizmaların hücre içerisinde depoladıkları veya hücre zarında biriktirmiş oldukları yağ zerreciklerini gözlemlemek amacıyla Sudan Black B boyası kullanılarak boyama işlemi Burdon yöntemi ile yapılmıştır.

Burdon yöntemi

Basit boyamada yapıldığı gibi katı besiyerinden alınan koloni ile preparat hazırlanır, kurutulur ve bek alevinde tespit edilir. Preparat üzerine Sudan Black B boya çözeltisi damlatılarak 15 dakikada boyanır. Boyanın fazlası lam üzerinden dökülür ve havada kurutulur. Ksilol içerisinde kısa bir süre tutularak boyanın fazlası yıkanır ve tekrar kurutulur. Preparat Safranin boyası ile 5-10 saniye tekrar boyanır. Boyanın fazlası su ile yıkanarak uzaklaştırılır ve kurutulur. Hazırlanan preparat immersiyon objektifi (x100) altında incelenenerek yağ birikimi gözlenir. Mikroskop altında lipid granülleri mavi-siyah veya mavi-gri renkte görülürler. Bakteri protoplazması ise pembe boyanır (Burdon, 1946).

Yapılan mikroskop incelemesinin ardından yağ birikimi olan mikroorganizmaların iç kısımlarının mavi-siyah boyandığı görülmüştür.

3.6. İzolatların Seçimi

Burdon yöntemi ile yapılan Sudan Black B boyama sonuçlarına, mikroorganizmaların katı ve sıvı besiyerlerindeki gelişme durumlarına göre bazı izolatlar seçilerek besiyeri optimizasyon denemelerine bu izolatlarla devam edilmiştir.

3.7. Farklı Besiyeri Formülasyonlarının Denenmesi

Seçilen mikroorganizmaların maya veya bakteri olmalarına göre çeşitli besiyerleri hazırlanmıştır. Maya olanlar için hazırlanan besiyerine “karışık besiyeri” adı verilmiştir. Bu besiyerinin içeriği aşağıdaki şekildedir (g/l):

- 5g Maya özütü,
- 4g Bakteriyel pepton,
- 2g Triptik soya besiyeri,

8g Glukoz,
10g Malt özütü,
12ml % 10'luk laktik asit çözeltisi

Verilen oranlardaki besiyerleri önce 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra laktik asit ilavesiyle pH'sı 3.5-4 aralığında ayarlanmış ve 5 ml'lik steril tüplere dağıtılmıştır.

Soğuyan besiyerlerine seçilen örneklerin ekimi yapılmıştır. 30°C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda gelişme gözlenen tüplerdeki örnekler 100 ml'lik hacimlerde hazırlanan aynı besiyerlerine % 1 oranında aşılanmıştır.



Şekil 3.1. Küçük hacimlerde geliştirilen örnekler.

İnkübasyon süresi bitiminde yapılan incelemede, örneklerin istenen düzeyde gelişmedikleri gözlenmiştir. Bunun üzerine inkübasyon süresi uzatılmıştır. Ancak yine düşük oranda gelişme tespit edilmesi üzerine besiyeri içeriği değiştirilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında, besiyerine ilave edilen yağ bazlı maddelerin mikroorganizmaların yağ sentezini desteklediği bulunmuştur. Bu amaçla yeni besiyeri formülasyonlarına Tween-20 maddesi eklenmiştir. Mikroorganizmanın beslenmesi, hücre sayısını arttırması ve yağ sentezlemesi için glukoz miktarında da artışa gidilmiştir.

Çalışmada uygulanan yeni besiyeri içeriği şöyledir (g/l):

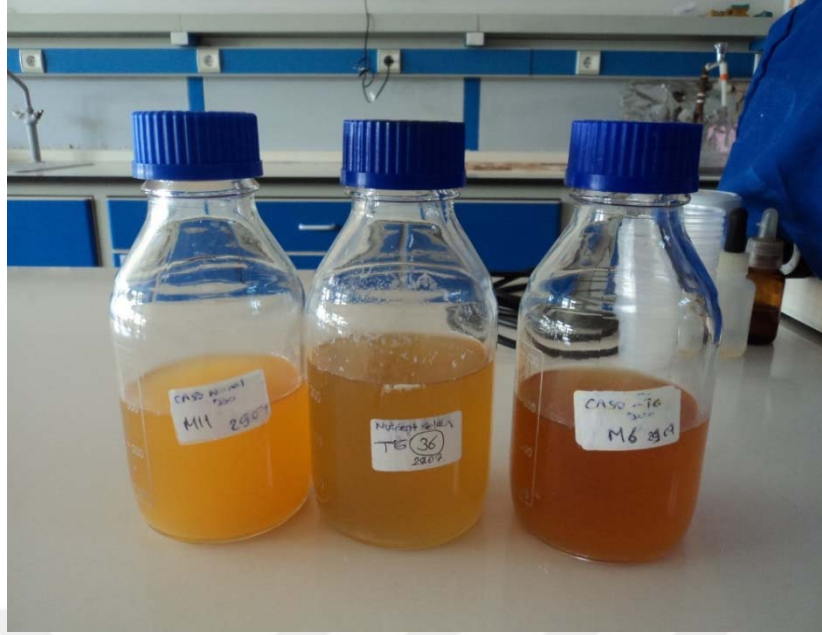
- 3 g Maya özütü,
- 0.5 g Triptik soya besiyeri,
- 25 g Glukoz,
- 5 g Malt özütü,
- 5 ml Tween-20,
- 12 ml % 10'luk laktik asit çözeltisi

Aynı sterilizasyon şartlarına tabi tutulan besiyerlerine seçilen örneklerin yeniden ekimi gerçekleştirilmiştir. Glukoz oranı arttırılan ve Tween-20 ilavesi yapılan karışık besiyerinde örneklerin daha iyi geliştiği gözlenmiştir.

Bakteri örnekleri için Nutrient Broth, ve CASO Broth besiyerleri önce 5'er ml'lik tüplerde hazırlanmıştır. Sıvı besiyerlerine ekilen ve inkübasyona bırakılan örneklerin gelişme durumları takip edilmiştir. Daha fazla verim eldesi için araştırmaya bu besiyeri içeriklerinin de değiştirilmesi ile devam edilmiştir. İlk kullanılan besiyeri içerisinde 22 g/l Nutrient Broth, 10 g/l Glukoz, 5 ml/l Tween-20 mevcuttur. İkinci besiyerinde ise 22 g/l Triptik Soya besiyeri, 5 g/l Glukoz ve 5 ml/l Tween-20 vardır.

3.8. Büyük Ölçekte Üretim

13, 14, 33, M5, M9 ve 50 numaralı örnekler büyük hacimde üretimde kullanılmak üzere uygun besiyerlerinde aktifleştirilmiştir. Seçilen örnekler için 300'er ml'lik Karışık besiyeri, zenginleştirilmiş Nutrient Broth ve zenginleştirilmiş Triptik Soya Broth besiyerleri hazırlanarak 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Gerekli pH ayarlamaları yapılmıştır. Aktifleştirilen örnekler uygun besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilmiştir. Bazı örneklerin oksijen ihtiyacını karşılamak amacıyla şişelerin ağızlarına sterilize edilmiş filtre kağıtları kapatılmıştır. 28-30 °C'lerde inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin 5-7 gün arası değişen inkübasyon süreleri sonucu gelişme oranları incelenmiştir.



Şekil 3.2. Büyük hacimde üretimden örnekler.

3.9. Hücresel Yağın Elde Edilmesi

Yağ elde etmede kullanılan yöntemler klasik ve gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri olarak iki ana başlık altında toplanmaktadır. Destilasyon, ekstraksiyon, mekanik yöntemler ve gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Klasik ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak, ekstraksiyon süresini kısaltan, organik solvent tüketimini azaltan ve çevre kirliliğini önleyen üstünlüklerinden dolayı enstrümental ekstraksiyon yöntemlerine olan ilgi artmaktadır (Yaman ve Kuleaşan, 2016).

En yaygın kullanılan örnek önışlem tekniklerinden, homojenizasyon, santrifüjleme, hücre parçalanması, solvent ekleme, su buharı kullanımı gibi işlemler uygulanmıştır (Büyüktuncel, 2012).

İnkübasyon sonrası besiyeri içerisinde gelişen mikroorganizmaların ayrılması amacıyla santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi (Nüve NF 800 R) 50 ml santrifüj tüplerine alınan örneklerin 4100 devirde, 5°C'de 10 dakika santrifüjlenmesi ile yapılmıştır.

Santrifüjleme sonrasında üstte kalan sıvı besiyeri uzaklaştırılarak tüplere tekrar mikroorganizma içeren sıvı besiyeri ilave edilerek tüpün dibinde hücre birikimi

sağlanmıştır. Hücre kitlesinin tamamen elde edilmesinin ardından, besiyeri kalıntılarının uzaklaştırılması için dipteki hücre kitlesi saf su içerisinde süspanse edilerek son kez santrifüjlenerek yıkanmıştır. Su uzaklaştırıldıktan sonra yağ hücre miktarı tartılarak belirlenmiştir. Ardından mikroorganizma kitlesi hücrelerin parçalanması ve hücre içeriğinde bulunan proteinlerin denatüre edilmesi amacıyla 1 gün süreyle aseton içerisinde bekletilmiştir. Asetonda bekletilmiş hücre kitlesi 60°C'ye ayarlı su banyosuna alınarak asetonun uçması sağlanmıştır.

Mikroorganizmalardan lipid ekstraksiyonu hücre yapıları nedeniyle görünüşte zordur. *Saccharomyces cerevisiae* için çeşitli ardışık ekstraksiyon metotları karşılaştırıldığında, metanol, metanol-benzen (1:1, v/v), etanol ve hekzan gibi çözücüler en verimli olarak bulunmuştur (Moon ve Hammond, 1978).

Dönmez ve Karatay (2011)'in maya ve funguslardan yağ ekstraksiyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada yine çözen olarak hekzan kullanılmıştır.

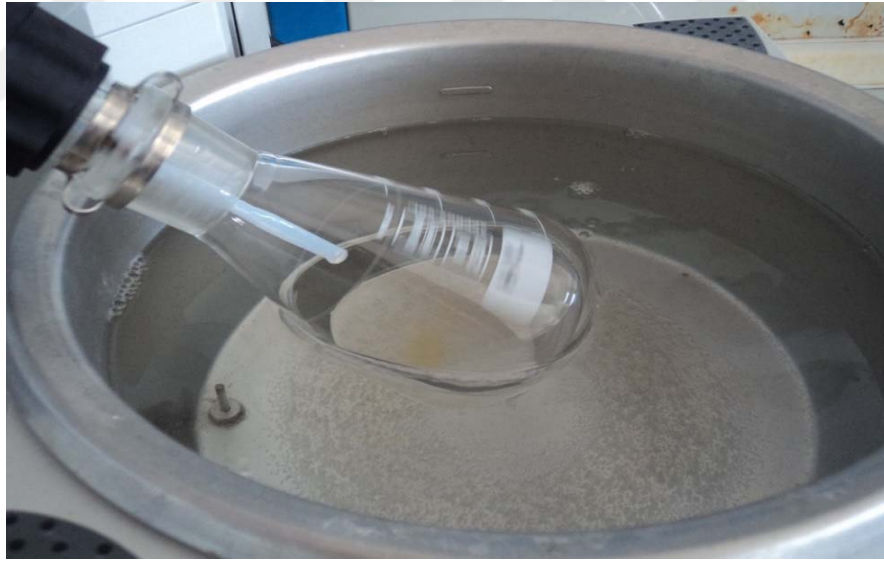
Mikroorganizmalardan lipid eldesi için uygulanan ekstraksiyon yöntemi lipid verimini ve yağ asidi kompozisyonunu etkilemektedir. Etkili bir ekstraksiyon yönteminin lipolizisi önleyici, otooksidatif indirgenme reaksiyonlarını ise minimize edici nitelikte olması gerekmektedir. Uygun yöntemin seçimi çalışılan mikroorganizmanın türüne, örneğin, kimyasal yapısına ve ekstraktın kullanım alanına bağlı olarak değişiklik gösterir. Genel olarak lipid ekstraksiyonu için kullanılan çözen karışımları, lipid ve protein arasındaki hidrojen bağları ve iyonik güçleri koparacak alkolleri içermektedir. Hücrelerden lipid ekstraksiyonunda dehidrasyon, protein denatürasyonu ve lipid kompleksleri ile proteinler arasındaki hidrojen bağının degradasyonu, polar ve apolar çözenlerin kombinasyon hâlinde kullanılması ile sağlanabilir. Kullanılan çözenler ekstrakte edilen lipidlerle kimyasal reaksiyona girmeyecek özellikte olmalıdır (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Kloroform:metanol (2:1, v/v) ekstraksiyonu yüksek lipid verimi sağladığı için standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ekstraktın temel olarak nötral lipidleri içerdiği çalışmalarda ise çözen olarak hekzan tercih edilmektedir. Kloroform/metanol (2:1) ekstraksiyonu, hekzan/ izopropanol (3:2) ekstraksiyonu ve çözen olarak hekzanın kullanıldığı Soxhlet ekstraksiyonu yöntemlerinin farklı

küflerden elde edilen yağın verimi ve yağ asidi kompozisyonu üzerine etkileri araştırılmıştır ve kloroform/metanol (2:1) yönteminin en uygun yöntem olduğu saptanmıştır (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Çalışmamızda, kalan parçalanmış hücre kitlesi üzerine hücre miktarının 5 katı hekzan ilave edilerek yağın çözünmesi sağlanmıştır. 3 gün süresince hekzan içinde bekletilen hücreler, sodyum sülfat eklenmiş kaba filtre kağıdından geçirilerek katı partiküller ve kalan su sodyum sülfat ile uzaklaştırılmıştır. Hekzan içinde çözünmüş yağı ayırabilmek amacıyla süzöntü tartıldıktan sonra, hekzan fazı rotary evaporatörde buharlaştırılmıştır. İşlem sonunda darası daha önceden alınmış, yağ içeren erlenlerin tartımı yapılarak yağ miktarı tespit edilmiştir.

Yine yapılan üretimlerde yağ verimini artırmak amacıyla metanol, benzen, kloroform gibi çözügenler de ekstraksiyona dahil edilerek denemeler yapılmıştır.



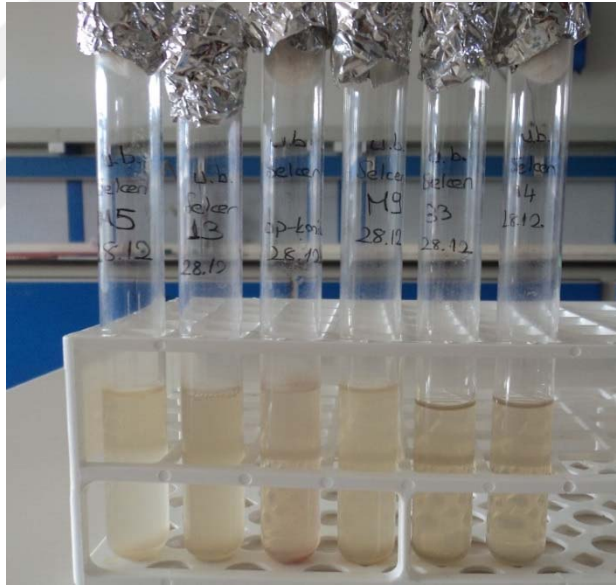
Şekil 3.3. Rotary evaporatördeki erlen içinde biriken yağ.

3.10. Atıklardan Besiyeri Hazırlanması

Bileşimi belirli besiyeri içerisinde yağ üretimleri belirlenen mikroorganizmaların gıda sanayi atıklarından yağ üretimleri bu aşamada gerçekleştirilmiştir. Yağ üretimi için aşağıda bileşimi verilen ve büyük bir kısmı gıda atıklarından oluşturulan besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerinin içeriği:

30 g/l elma kabuğu (% 20 kuru maddeye sahip)
20 g/l patates kabuğu (% 15 kuru maddeye sahip)
15 g/l glukoz
5 g/l Malt Özütü

Bu besiyerinin hazırlanması amacıyla önce, elma ve patates kabukları homojenizatör yardımıyla parçalanmıştır. Tartımları yapıldıktan sonra diğer bileşenlerle karıştırılarak saf suyla istenen hacme tamamlanmıştır. 8'er ml'lik hacimlerde tüplere doldurulan besiyeri 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Üretimde kullanılan kültürler aktiveştirildikten sonra tüplerdeki besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. İnkübasyon sonundaki gelişmelerine göre büyük miktarda üretime geçilmesi planlanmıştır. Atıklardan oluşan besiyerindeki örneklerin gelişimi Şekil 3.4.'deki gibidir.



Şekil 3.4. Örneklerin atık besiyerindeki gelişimleri

3.11. Gıda Sanayi Atıklarından büyük hacimli üretimlerin yapılması

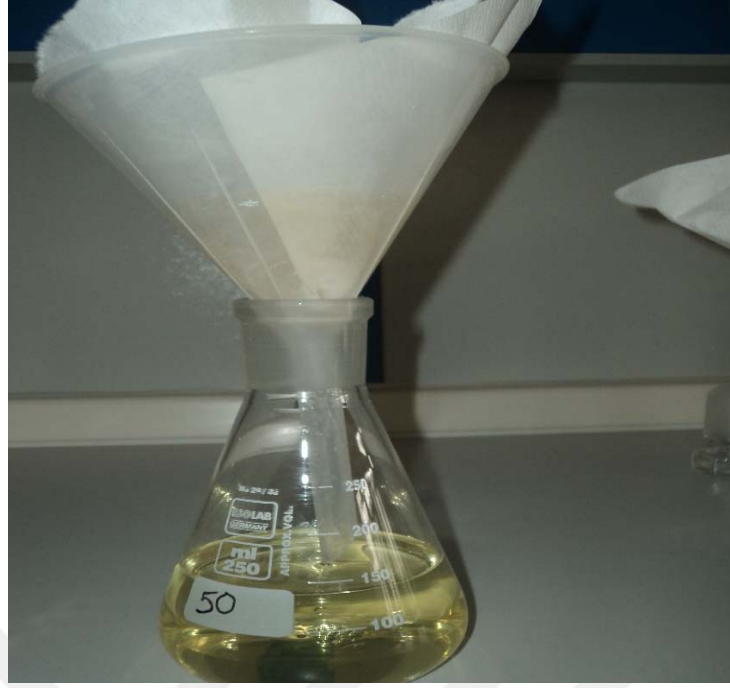
Seçilen mikroorganizmalar, yukarıda belirtilen besiyerinin daha büyük hacimleri kullanılarak denemelere alınmıştır. Bu amaçla kullanılan besiyerleri 800 ml hacminde hazırlanmıştır. Mayalar için kullanılacak besiyerlerinin pH değeri %

10'luk tartarik asit çözeltilisi yardımıyla 4.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Yine oksijen ihtiyacı için akvaryum pompası ile sisteme filtre edilmiş oksijen sağlanmıştır.

Elde edilen hücre kitlesinde oluşan yağ, daha önceki üretimlerde olduğu gibi santrifüjleme, çözümlenme, bekletme, süzme, ayırma hunisinden geçirme, buharlaştırma gibi aşamalardan geçirilerek yağ elde edilmiştir. Elde edilen yağ miktarının istenen düzeyde olmaması nedeniyle yağ üretiminin artırılması için mikroorganizmalar aynı besiyerinde farklı pH'larda ve farklı sıcaklıklarda da test edilmişlerdir. Ayrıca inkübasyon süresi, çözümlenin cinsi gibi bazı parametrelerde değişiklikler yapılmıştır. Bu aşamada denemesi yapılan örneklerin en verimli oldukları parametre değerlerinin bulunması hedeflenmiştir. Daha fazla hücre kitlesi elde edilebilmesi için besiyeri hacimleri 1600 ml'ye kadar çıkartılmış ve içeriklerinde farklı bileşenler uygulanmıştır.



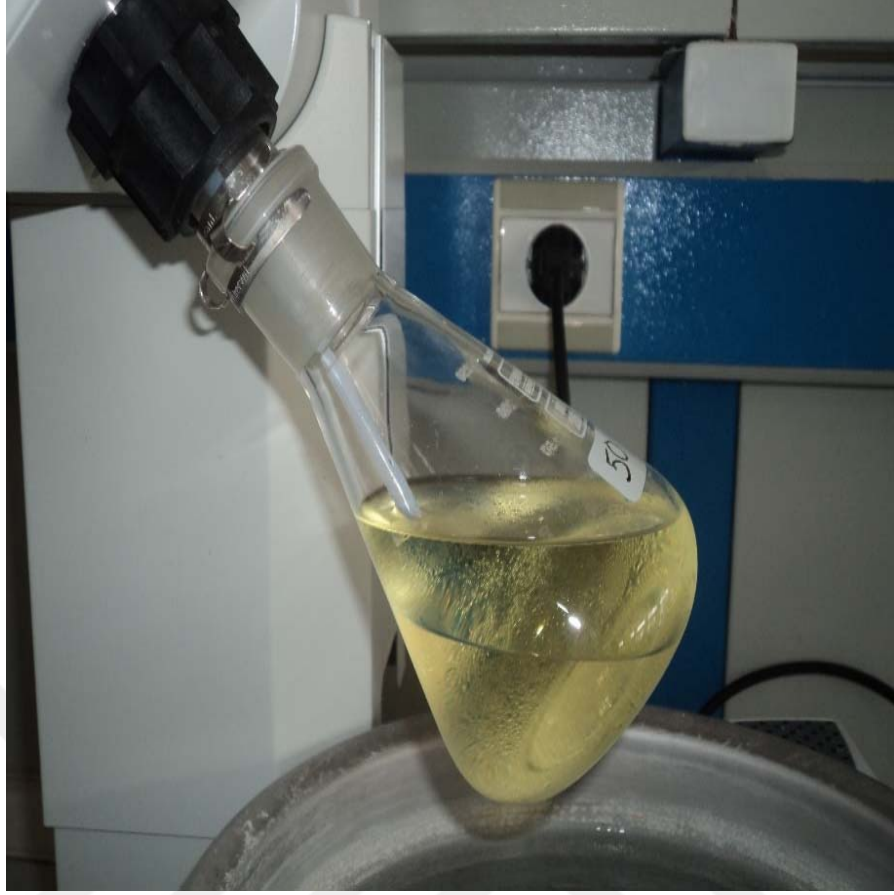
Şekil 3.5. Büyük hacimde üretim



Şekil 3.6. Süzme

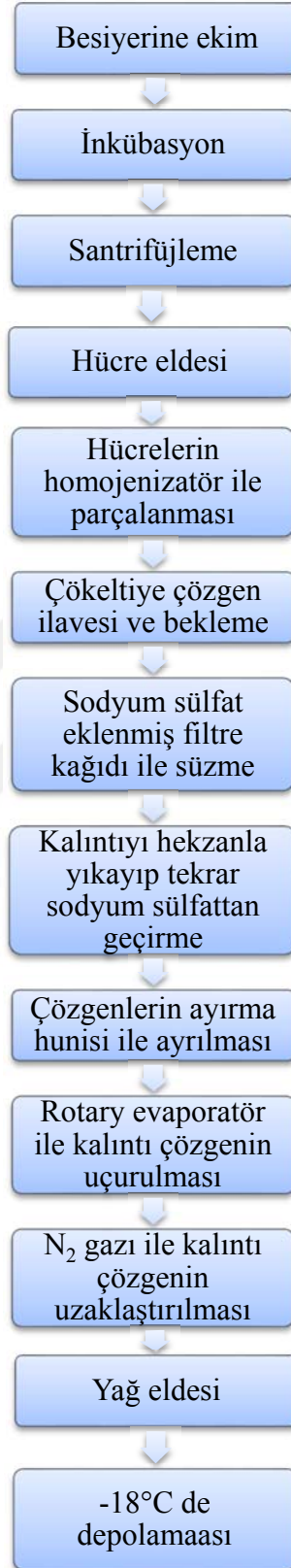


Şekil 3.7. Ayırma hunisi ile çözümlerin ayrılması



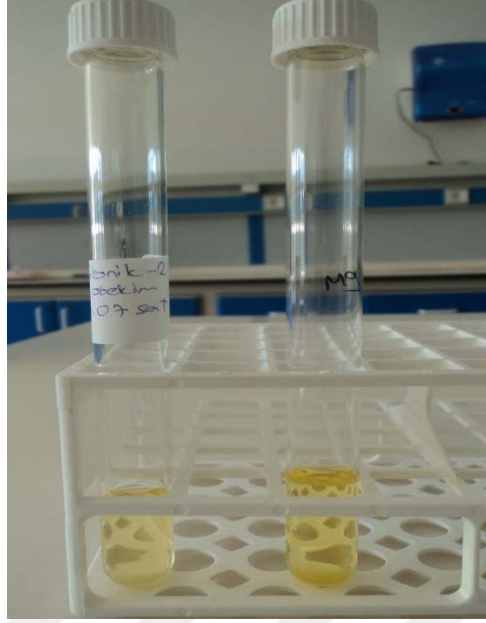
Şekil 3.8. Buharlaştırma

Hazırlanan besiyerlerinde büyük hacimlerde üretim aşamaları genel olarak Şekil 3.9.'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Üretim Aşamaları

Elde edilen yağ örnekleri hekzan ile karıştırılarak -18°C 'de depolanmaya alınmıştır. Yağ ve hekzan karışımları Şekil 3.10.'da görülmektedir.



Şekil 3.10. Yağ ve hekzan karışımlarından örnekler.

3.12. Genetik Tanımlama

Yağ üretimi en başarılı bulunan 6 adet suşun genetik tanısı, Ref-Gen (Ankara-ODTÜ Teknokent) firmasından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.13. Yağ Asitleri Kompozisyonu

Gaz kromatografisi (GC) mol kütlesi 2-1000 g/mol arasında olan organik ve inorganik gazların, kolayca buharlaşabilen sıvı ve katıların uçucu bir çözücü içinde çözülmüş haldeki örneklerini analiz etmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Gülcan, 2012).

Denemelerde elde edilen yağ örneklerine ait GC analizleri Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

Elde edilen mikrobiyel yağlar içerdikleri yağ asitlerinin cinsi ve oranlarının belirlenmesi amacıyla gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sabit

yağların gaz kromatografisi analizine alınması amacıyla önce esterleştirme işlemi yapılmıştır.

Bu amaçla; IUPAC Method 2.301. modifiye edilerek uygulanmıştır. 0.01 g yağ örneği 1.5 ml izooktan içerisinde çözülmüştür. Ardından 0.2 ml 2 M KOH çözeltisi (kromatografik saflıkta metanol içerisinde hazırlanmış) ile doyurulmuştur. Daha sonra örnekler 30 saniye süresince hafif şekilde karıştırılmış ve karanlık ortamda 6 dakika bekletilmişlerdir. Süre sonunda örnekler 1-2 damla metil oranj indikatörü (1:1 v/v su/etanol karışımında % 0.1 g metil oranj içeren) damlatılmıştır. Son aşamada ise örneklerde kalan fazla KOH 'un nötralize edilmesi amacıyla örnekler içerisinde renk dönüşümü gözleninceye kadar 1 N HCl ilavesi yapılmıştır. Reaksiyonlar sonrasında faz oluşumunun gerçekleşmesi için örnekler 25-30 dakika sabit bir şekilde bekletilmişlerdir. Süre sonunda üst kısımda oluşan berrak faz pipet yardımıyla 2 ml'lik kromatografik tüplere aktarılmışlardır. Tüpler analize alınmaya kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmışlardır (Anonim, 1987).

Esterleştirilen yağlar gaz kromatografisi cihazında analize tabi tutulmuşlardır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Çalışmada mikroorganizmaların izolasyonu için yapılan işlemler sonunda, Malt Ekstrakt Agar (MEA, pH 4, Merck, Almanya) ve Plate Count Agar (PCA, Merck, Almanya) besiyerlerinde gelişen kolonilere örnekler Şekil 4.1. ve 4.2. 'de verilmiştir:

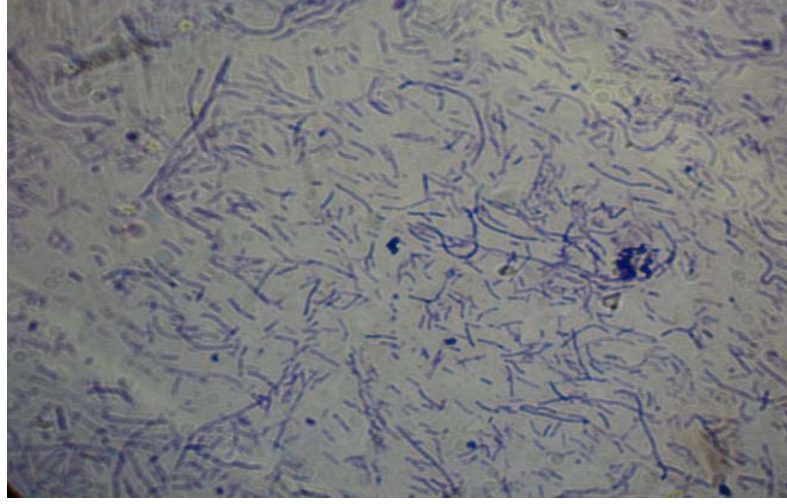


Şekil 4.1. Kaşar peyniri örneğinden yapılan ekim sonucu

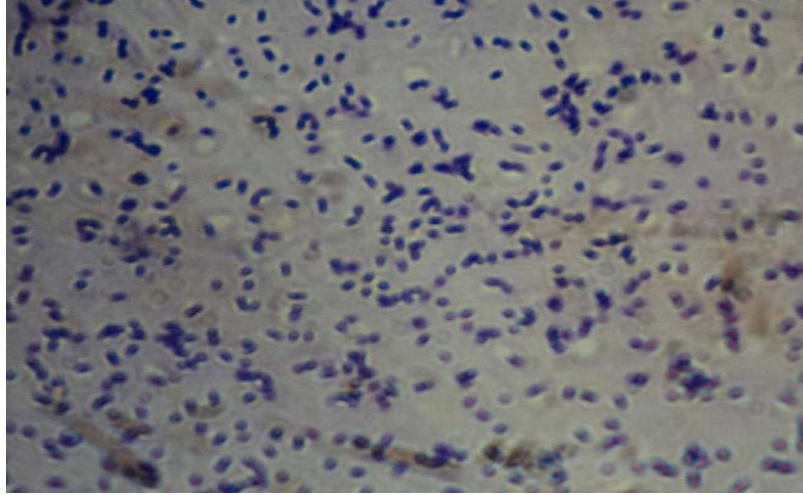
Şekil 4.2. Patates örneğinden yapılan ekim sonucu

4.2. İzolatların Mikroskopik Yöntemle İncelenmesi

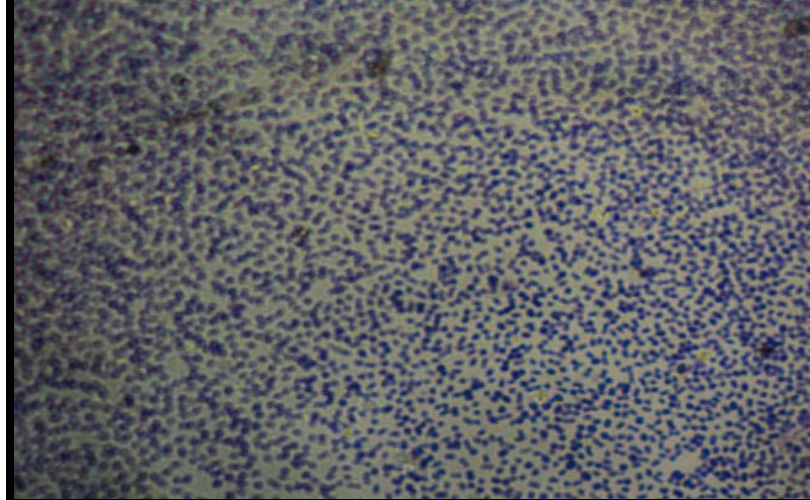
Elde edilen izolatlar, basit boyamada hem Safranin hem de Kristal Viyole ile paralel boyanarak incelenmişlerdir. Basit boyamanın ardından bakteri olduğu gözlemlenen izolatların Kristal Viyole ve Safranin kullanımı ile Gram özellikleri belirlenmiştir. Bu incelemelerden elde edilen görüntülere örnekler Şekil 4.3, Şekil 4.4., Şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Tereyağı örneğinden elde edilen mikroorganizmaların mikroskopik görüntüsü



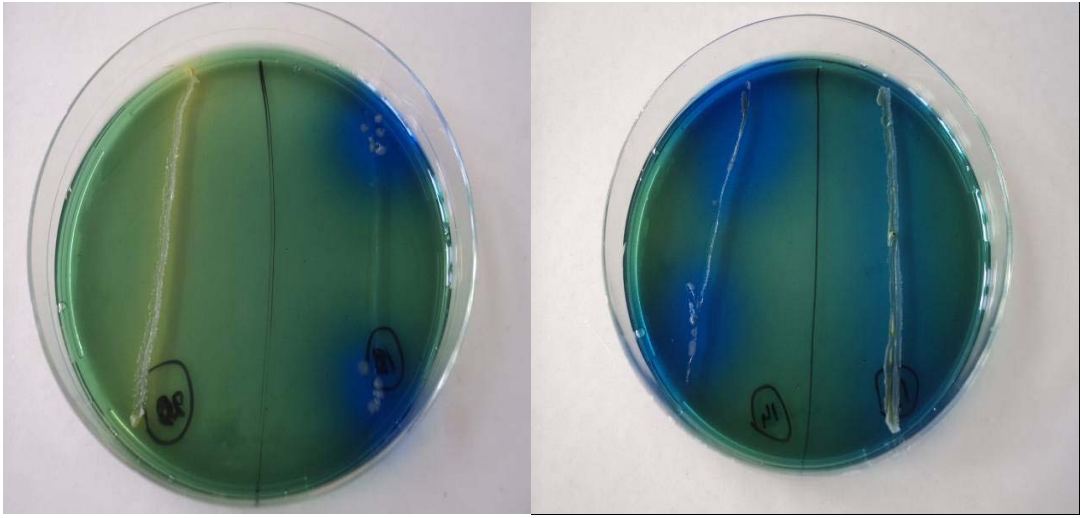
Şekil 4.4. Peyniraltı suyundan elde edilen mikroorganizmaların mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.5. Sucuk örneğinden elde edilen mikroorganizmaların mikroskopik görüntüsü

4.3. İzolatların Gruplandırılması

Bacillaceae familyasında yer alan *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla, Polymyxin Egg Yolk Mannitol Bromotymol Blue Agar (PEMBA-Merck, Almanya) kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında PEMBA besiyeri üzerinde pürüzlü, mumsu, turkuaz mavimsi renkte koloniler oluşturmuşlardır. Bu kolonilerden bazılarının lesitinaz aktivitesine bağlı olarak şeffaf renkte bir presipitasyon halkası ile çevrili olduğu, bazı kolonilerin ise mavi renk verdiği gözlenmiştir.



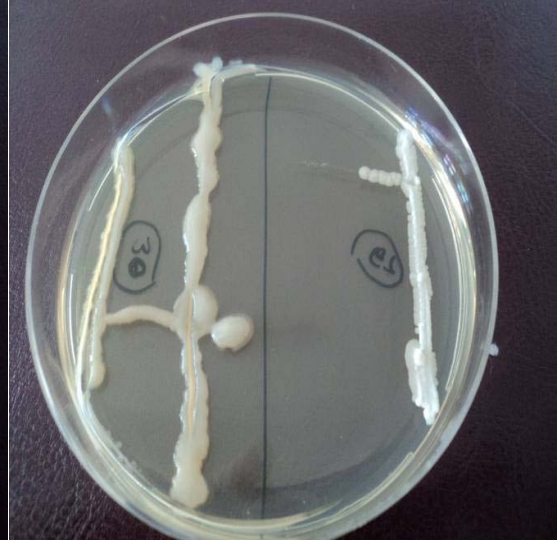
Şekil 4.6. Üzüm ve kaşar peyniri örneklerinden yapılan ekim sonucu

Şekil 4.7. Tereyağı örneğinden yapılan ekim sonucu

Candida cinsi mayaların seçilmesi amacıyla izolatlar, 50 mg/l Kloramfenikol antibiyotiği içeren Saboraud dekstroz-agar (SDA-C, Merck, Almanya) besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında koloni gelişimi olan petrilerden örnek alınarak mikroskopta incelemeleri tekrarlanmıştır. Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'da SDA'daki gelişimlere örnekler verilmiştir.



Şekil 4.8. Kaşar peynirinden yapılan ekim sonucu



Şekil 4.9. Çiğ süt ve peyniraltı suyundan yapılan ekim sonucu

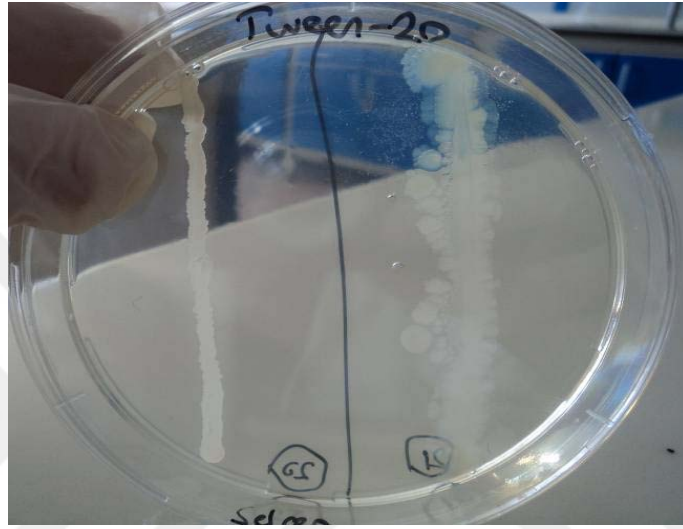
Saccharomyces türlerinin seçilmesi için 50 mg/ml Kloramfenikol antibiyotiği içeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyeri hazırlanmıştır. Morfolojik özelliklerine göre seçilen koloniler mikroskop altında incelenmiş ve tipik maya görünümünde olanlar seçilmiştir. Şekil 4.10.'da örneklerin gelişimi verilmiştir.



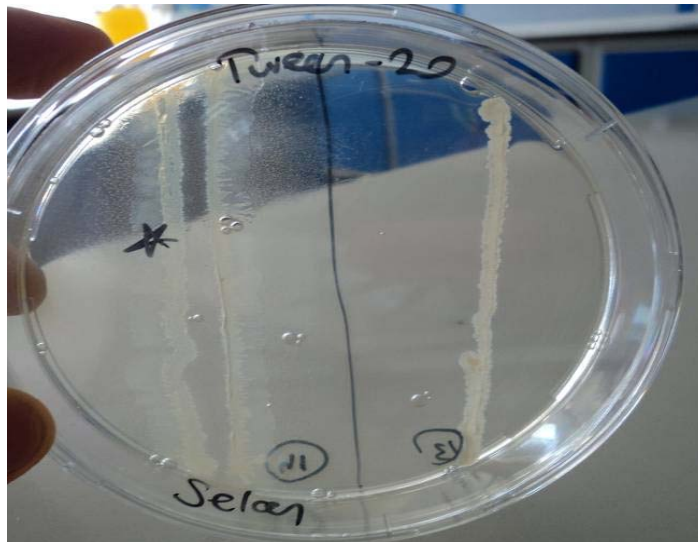
Şekil 4.10. Pastörize edilmiş süttten üretilen peynirin peyniraltı suyundan ve çiğ süttten yapılan ekimlerin sonucu

4.4. Lipolitik Aktivite Testi

Seçilen yöntemle göre Tween-20 ile hazırlanan besiyerinde, 8g/l Nutrient Broth, 0.1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 15 g/l Agar bulunmaktadır. 121°C’de 15 dk sterilize edilen karışıma 10 ml/l steril Tween-20 ilave edilerek petrilere dökülmüştür (Samad vd., 1989). Şekil 4. 11. ve Şekil 4. 12.’de lipolitik aktivite tespit edilen örnekler verilmiştir.



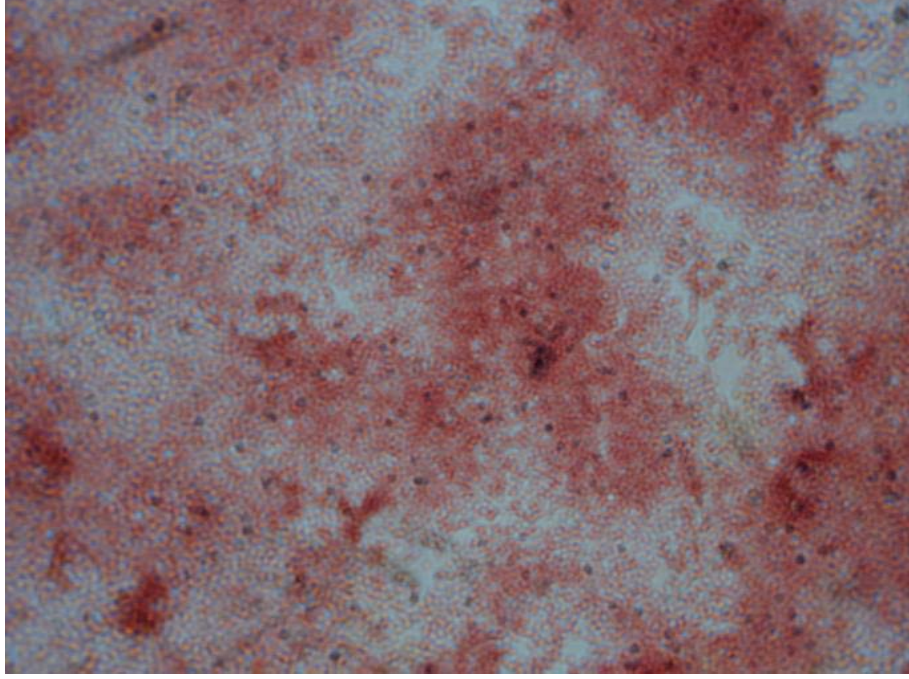
Şekil 4.11. Üzüm ve sucuk örneklerinden elde edilen mikroorganizmaların lipolitik aktivite sonuçları



Şekil 4.12. Tereyağı ve kaşar peyniri örneklerinden elde edilen mikroorganizmaların lipolitik aktivite sonuçları

4.5. Sudan Black B Boyama

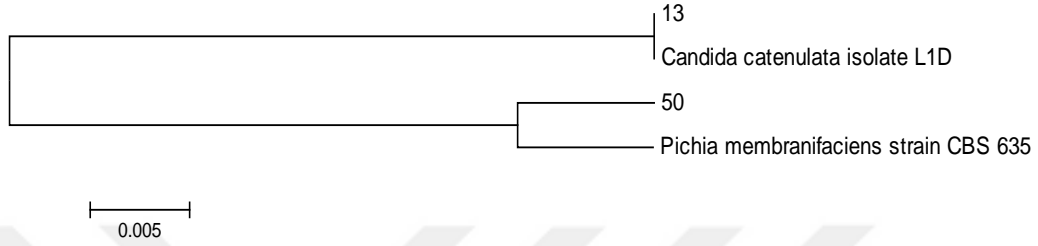
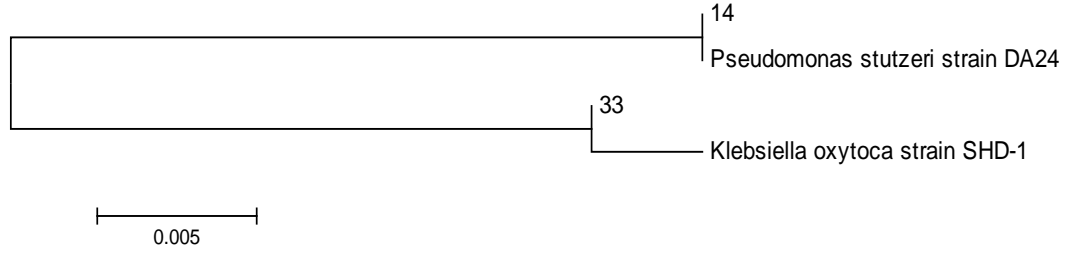
Burdon metodu ile yapılan boyama sonucu elde edilen mikroskopik görüntülere örnek Şekil 4.13.'te verilmiştir.



Şekil 4.13. Çiğ süttten elde edilen mikroorganizmaların boyama sonucu

4.6. Genetik Tanımlama

Yağ üretimi en başarılı bulunan suşların genetik tanısı, Ref-Gen (Ankara- ODTÜ Teknokent) firmasından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Tanımlama sonuçları Şekil 4.14.'te verilmiştir.



M9- *Pantoea agglomerans*

Şekil 4.14. Genetik tanımlaması yapılan örnekler

Pseudomonas stutzeri doğada yaygın olarak bulunan ve insanda nadiren enfeksiyon yapan, gram negatif bir bakteridir (Özbek vd., 2010). Gram-negatif, aerobik, fermentatif olmayan bir basil olan *Pseudomonas stutzeri*, toprak, su ve hastane ortamında yaygın olarak bulunur. Nadiren toplum kökenli enfeksiyonlara yol açar (Sünbül vd., 2009).

Bu türler özel metabolik özellikleri yönünden dikkat çekmektedir. Denitrifikasyon çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır (Lalucat vd., 2006). Sadece nitrat ve nitriti değil amonyumu da kullanabilir (Zhang vd., 2011).

Birçok suşları, genlerin transferi çalışmaları için de uygun, doğal dönüşüm özelliklere sahiptir. Bazı suşları ise çevre kirletici maddelerin azaltılmasında etkilidir. Bazıları ise toksik metallerle etkileşime girer (Lalucat vd., 2006). *Pseudomonas stutzeri* 'den hücre dışı enzim olarak amilaz enzimi sentezlenmiştir (Robyt ve Ackerman, 1971).

Klebsiella oxytoca; patojenite açısından çok önemli bir *Enterobacteriaceae* üyesidir (Yılmaz ve Uraz, 2011). *Klebsiella* türlerine; su yüzeylerinde, toprakta, bitkilerde ve insanlarda rastlanır (Aydoğan ve Başustaoglu, 2000).

Klebsiella oxytoca 'nın fermantasyon yeteneğinden yararlanılarak birçok ürünün sentezlenmesi sağlanmaktadır. Genetiği değiştirilerek üretilen *Klebsiella oxytoca* suşları, ksilenden etanol üretiminde kullanılmaktadır (Burchhardt ve Ingram, 1992).

Klebsiella oxytoca, en çok pentoz, heksoz ve disakkaritleri fermente edebilmektedir. Birincil metabolit olarak görünen butanediol, mikroorganizmanın enerji metabolizmasının bir ürünü olarak salgılanmaktadır (Jansen vd., 1984). Yine birçok çalışmada *Klebsiella oxytoca* ile bütanediol üretimi araştırılmıştır (Cao vd., 1997 ; Ji vd., 2008 ; Ji vd., 2009). Fermantasyon şartları uygun hale getirildiğinde, hücre dışı ürün olarak siklo maltodekstrin glukano transferaz üretimi de yapılabilmektedir (Lee vd., 1992).

Candida catenulata :*Candida* türleri, ökaryot, fırsatçı patojenlerdir. *Candida*'ların 200'den fazla sayıda türü bulunmaktadır (Seyedmousavi vd., 2015). *Candida catenulata* uygun sıcaklık ve koşullarda güçlü proteolitik ve lipolitik özellik gösterebilmektedir (Roostita ve Fleet, 1996). Uygun karbon kaynakları kullanıldığında izositrik asit üretiminde kullanılabilir (Nakahara vd., 1987). *Candida catenulata*, fermantasyon yeteneğinden yararlanılarak yağ ile kirlenmiş toprakların temizlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (Joo vd., 2008).

Pichia membranifaciens, organik asit üreten ve gıda bozulmalarına sebep olan bir mikroorganizmadır (Lachance, 1995). *Pichia membranifaciens* suşları, yaygın olarak gıda ile ilgili ortamlarda ve özellikle zeytin salamularında yüksek miktarlarda bulunur. Bozulmaya sebep olan maya ve mantarlara karşı öldürücü toksin salgılayan suşları da mevcuttur (Santos vd., 2009). Asetaldehit, etil asetat ve izoamil asetat üretmektedir (Rankine, 1966).

Yapılan çalışmalar, *Pichia membranifaciens* 'in üzümde bozulmaya sebep olan *Botrytis cinerea* 'ya karşı biyolojik kontrol organizması olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Masih vd., 2001).

Pantoea agglomerans: *Pantoea* türleri, bitkilerde ve toprakta yaygın olarak bulunan, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan mikroorganizmalardır (Kurşun vd., 2012).

Fakültatif aerob, gram negatif basillerden en sık izole edilen tür *Pantoea agglomerans*'tır (Yılmaz vd., 2015).

Pantoea agglomerans, (eski - *Enterobacter agglomerans*) bitkilerin yaprak ve meyvelerinin yüzeyinde bulunur. Çiğ tüketilen sebzeler, patojen ve fırsatçı mikroorganizmaların neden olduğu gıda kaynaklı enfeksiyonlara sebep olur. Aynı zamanda bu bakteri tarımda, hasat sonrası biyolojik mantar antagonisti olarak da başarıyla kullanılmaktadır (Mudryk, 2012). Bu mikroorganizmalar toz bebek sütü formulasyonlarında fırsatçı patojen olmaya adaydır (Mardaneh vd., 2013).

Saccharomyces cerevisiae, ökaryot, küresel şekilli bir mayadır. Bitkilerin yüzeylerinde, toprakta, böcek ve hayvanların vücut yüzeylerinde bulunur. Ekmek ve alkollü içkilerin üretiminde kullanılır (Anonim, 2010).

S. cerevisiae, 1930'larda laboratuvar çalışmaları için bir model olarak kabul edilmiştir. Genetik materyalin aktarımı ve rekombinasyonunu anlamak için önemli bir araç olmuştur (Forsburg, 2007). Bu mayalar; alkol toleransına sahip olması, düşük azot tüketimi, yüksek büyüme hızı gibi bazı spesifik özellikleri nedeniyle araştırmalar için sıklıkla kullanılmaktadır (Salinas vd., 2012).

Saccharomyces cerevisiae'nin, alkollü içeceklerin üretiminde en az sekiz bin yıldır var olduğu düşünülmektedir (Hazelwood vd., 2008). Fermantasyonda, şarap yapımında ve bira üretiminde yoğun olarak kullanılmaktadır (Wilkins vd., 2007).

Fermantasyon sırasında alkolün yanında, aldehitler, organik asitler, esterler, organik sülfidler ve karbonil bileşikleri gibi aromatik maddeler de açığa çıkmaktadır (Hazelwood vd., 2008). *Saccharomyces cerevisiae*'nin portakal kabuğu gibi gıda atığı içeren solüsyonlarda, şekeri fermente ederek alkol üretebildiği görülmüştür (Wilkins vd., 2007; Wilkins vd., 2007). Çeşitli fermantasyon yöntemleri ile *Saccharomyces cerevisiae*'nin ürettiği alkol verimleri artırılmaya çalışılmıştır (Maiorella vd., 1983).

S. cerevisiae tarafından bitkilerin kullanılmasıyla üretilen yakıt formundaki etanol, büyük bir ekonomik ve çevresel öneme sahiptir (Van Maris vd., 2006). Biyoetanol

üretimi ise büyüyen bir endüstri haline gelmiştir (Teixeira vd., 2009). Basit şekerlerden yağ asidi türevi biyoyakıt ve kimyasalları üretmek için *Saccharomyces cerevisiae*'nin de iyi bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (Runguphan ve Keasling, 2014). Karışık kültürde hücre içi yağ üretimi çalışmalarında *Saccharomyces cerevisiae*'den yararlanılmıştır (Shu vd., 2012).

4.7. Örneklerden Elde Edilen Yağ Miktarları

Bir mikroorganizmanın yüksek düzeyde yağ üretmesi özellikle boyut ve hücre yapısıyla ilişkilidir. Ökaryot olarak adlandırılan maya ve küfler, prokaryot olarak adlandırılan bakterilere göre daha büyük hücre yapılarına sahiptirler. Bütün ökaryot mikroorganizmalar yağ üretme yeteneğine sahip değildir. Mikroorganizmaların yağ üretme kabiliyetlerini sınırlayan bazı etkenler bulunmaktadır. Hücrede lipid üretiminin başlaması ortamdaki primer besin elementlerinin tükenmesine bağlıdır. Azot miktarının azaltılması ve karbon kaynaklarının artırılması yağ miktarını etkiler. Azotun dışında bazı inorganik tuzlar ve vitaminlerin de yağ üretimini sınırladığı görülür. Karbon kaynağı olarak genelde glukoz kullanılır. Bunun yanında laktoz ve pentozun da bu amaçla kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Genellikle besiyeri ortamı mikroorganizmaların gelişimi için gerekli bütün besin elementlerini içerecek şekilde hazırlanırsa yağ üretimi düşmektedir. İnorganik tuzlar, vitaminler, oksijen miktarı, ortam sıcaklığı ve pH gibi faktörler üretilen yağ miktarını ve bileşimini etkilemektedir. Bütün yağ üreten mikroorganizmalar aerobik olduğu için oksijen bir süre sonra sınırlayıcı etki göstermektedir. Bir besin elementi gibi düşünülerek fermentöre yeterli düzeyde oksijen verilmelidir. Mikroorganizmalar gelişme ortamındaki herhangi bir değişime oldukça hızlı reaksiyon vermektedir. Bu nedenle koşullar belirlenirken ve değiştirilirken oldukça dikkatli davranılmalıdır (Denli ve Tekin, 2000).

Fungal gelişim için en önemli karbon kaynağı glukozdur. Lipit sentezi için genel olarak % 40 oranında sukroz veya glukozun optimal olduğu ifade edilmiştir. Fungal lipit sentezinde en önemli besinsel parametre C/N oranıdır. Yüksek yağ birikimi düşük protein senteziyle ilgilidir. Genel olarak vitamin eksikliği lipit içeriğini azaltmaktadır (Denli ve Tekin, 2000).

Bakteriler en basit ve en küçük mikrobiyel hücrelerdir. Yağ üretimleri düşük olan bakterilerin çok azı istenen oranda yağ sentezleyebilmektedir (Denli ve Tekin, 2000).

Son yıllarda mikrobiyel yolla üretilen yağların pek çok gıdaya katkı olarak ilave ediliyor olması, özel yağ asitlerinin ekonomik olarak elde edilebilmesinin önemini arttırmaktadır. Bu çalışmada, tanımlaması yapılan mikroorganizmalarımız ile ilgili literatür araştırması yapılarak yağ üretimi için en uygun olabilecek parametreler belirlenmeye çalışılmıştır. Karbon kaynağı olarak büyük oranda glukoz tercih edilmiştir. Oksijen ihtiyacının sağlanabilmesi için düzenli olarak fermentöre steril hava desteği sağlanmıştır. Fermantasyon süresi bazı örneklerde uzatılarak yağ miktarının artırılması hedeflenmiştir.

Mikroorganizmaların genel gelişim sıcaklıkları bilindiği için sıcaklık üzerinde büyük değişikliklere gidilmemiştir. Gerekli örneklerde uygun pH aralığına ulaşabilmek için besiyerlerine laktik asit ilavesi yapılmıştır. Besiyeri içeriklerinin değiştirilmesi, çalışmamızda en çok üzerinde durulan kısım olmuştur.

Genetik tanımlaması yapılan mikroorganizmalardan bu çalışma ile elde edilen yağ miktarları gram cinsinden ve yüzde olarak Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada bulunan yağların gram ve yüzde olarak miktarları.

| | | orijinal besiyerlerinde alınan sonuçlar | | | | |
|---------------------------------|------------------|---|----------------|-----------------|---------------|-----------------------|
| ÖRNEKLER | 300 ml besiyeri | Yaş Hücre (g) | Kuru Hücre (g) | Net Yağ (g) | % yağ | 100 ml besiyeri/g yağ |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | M5 | 8.46 | 1.46 | 0.65 | 44.52 | 0.22 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 33 | 12.05 | 2.15 | 0.25 | 11.63 | 0.08 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 14 | 9.82 | 1.64 | 0.41 | 25.00 | 0.14 |
| <i>Candida catenulata</i> | 13 | 15.82 | 2.82 | 0.31 | 10.99 | 0.10 |
| <i>Pichia membranaefaciens</i> | 50 (ME) | 7.79 | 1.44 | 0.93 | 64.58 | 0.31 |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | M9 | 6.54 | 0.97 | 0.29 | 29.90 | 0.10 |
| | | karışık besiyerinde alınan sonuçlar | | | | |
| | 1500 ml besiyeri | Yaş Hücre (g) | Kuru Hücre (g) | Yağ miktarı (g) | % Yağ miktarı | 100 ml besiyeri/g yağ |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | M5 | 28.93 | 3.82 | 0.96 | 25.13 | 0.06 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 33 | 35.20 | 5.13 | 0.78 | 15.20 | 0.05 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 14 | 21.20 | 3.82 | 0.79 | 20.81 | 0.05 |
| <i>Candida catenulata</i> | 13 | 16.73 | 2.05 | 0.16 | 7.80 | 0.01 |
| <i>Pichia membranaefaciens</i> | 50 | 21.92 | 3.57 | 1.16 | 32.49 | 0.08 |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | M9 | 25.62 | 3.86 | 1.02 | 26.42 | 0.07 |

Orijinal besiyerinde yapılan çalışmalarda elde edilen hücre gelişimi ve yağ üretim miktarları, farklı besiyerindeki miktarlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullandığımız Karışık besiyeri; gıda atıklarını (elma kabuğu, patates kabuğu vb.) içeren ve bazı gelişme faktörlerinin bulunmadığı bir besiyeri türüdür.

Yapılan bir çalışmada (Huang vd., 2009) *Trichosporon fermentans* kullanılarak pirinç kavuzlarının asit hidrolizi sonucu elde edilen parçalanma ürünlerinden biyodizel üretimi amacıyla yağ elde edilmiştir. Ülkemizde ise yüksek oranda karbonhidrat içeren bu tip gıda sanayi atıklarına verilebilecek en önemli örnekler; elma suyu sanayinde çıkan kabuk, posa ve atık elmalar ile donmuş patates sanayilerinden çıkan patates kabukları ve atıklarıdır. Elma suyu üretiminde durultmada ve filtrelemede kizelgur, bentonit gibi yardımcı maddelerin kullanılması

nedeniyle çıkan atıklar yem olarak kullanılamamakta ve genellikle gübre olarak tarlalara atılmaktadır. Patates kabukları ise içerdikleri toksik bileşenlerden (özellikle solanin) dolayı yem rasyonlarında çok az kullanılabilir. Her iki gıda sanayi atığı da ülkemizde önemli miktarda ortaya çıkan gıda sanayi atıklarındandır.

Yapılan bir çalışmada, bazı ilave maddeler ile de yağ üretimi verimi araştırılmıştır. Xue ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *Rhodotorula glutinis*'ten mikrobiyel yağ üretimi amacıyla monosodyum glutamat içeren atık suyu, kültür ortamı olarak kullanmışlardır. *Trichosporon capitatum*'un ortam şartlarının optimizasyonu ile, 28 °C'de ve 160 rpm'de 6 günde yağ veriminde % 61 artış görülmüştür (Wu vd., 2011).

Atıkların biyoteknolojik yolla değerlendirilmesi amacıyla yaptığımız bu denemelerde, karışık besiyerinde yağ üretiminde genel bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, orijinal besiyerinde *Klebsiella oxytoca* dışındaki mikroorganizmalardan elde edilen % yağ oranları, karışık besiyerinde yapılan üretimlerden daha yüksek bulunmuştur.

Bakterilerde yağ üretimi ile ilgili mevcut bilgiler daha çok patojenlerle ilgilidir. Bunker (1963) 'in yaptığı çalışmada, yağ oranları % 7-21 arasında değişen 5 mikroorganizmanın içerisinde *Mycobacterium* türleri göze çarpmaktadır. Patojen olmayanlarda ise ölçülebilir yağ üretenler, *Spirillum lipoferum*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium xerose*, *Bacillus megaterium*, *Proteus vulgaris*, *Azotobacter indicum* ve *Aerobacter cloacae* olarak bulunmuştur (Bunker, 1963).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada (Beopoulos vd., 2009) *Rhodotorula glutinis*'in toplam hücre kütlelerinin % 72 oranında yağ depolayabildiği belirtilmektedir. Yine aynı makalede bakteriler arasında çok nadir görülen bir durum olsa da *Rhodococcus opacus* bakterisinin % 87 gibi çok yüksek bir yağ birikimi oluşturabildiği belirtilmiş ancak yağın hangi formda olduğu hakkında bilgi verilmemiştir.

Bizim çalışmamızda da örneklerin çoğu patojen özellik taşımaktadır. Örneklerden elde edilen yağ oranları % 7-64 arasında değişmektedir.

Bunker (1963) 'in yaptığı çalışmada, oldukça yüksek yağ içeriğine, normalde yağ üreten mikroorganizma olarak görülmeyen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida utilis* ile ulaşılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda ise inositol içermeyen besiyerinde geliştirildiğinde yağ içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı görülmüştür. *Pichia farinosa* % 7-9, *Candida utilis* ve *Geotrichum candidum* % 4-14, *Hansenula anomala* % 9-16 oranında yağ ürettikleri bulunmuştur (Bunker, 1963).

Çalışmamızda da aerobik koşulların devamlılığı sağlanmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* ile yaptığımız denemelerde % 25 ve % 44 oranlarında yağ elde edilmiştir. *Candida catenulata* ile % 7 ve % 10 oranında yağ elde edilmiştir. *Pichia membranaefaciens* ile yapılan yağ üretim çalışmalarında, % 32 ve % 64 yağ oranlarına ulaşılmıştır.

Çalışmamızda, hücre içinde biriken yağın hücre dışına çıkarılması için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ve bazı kimyasal çözücüler kullanılmıştır. Benzen, aseton, hekzan gibi çözücüler, ekstraksiyon aşamasında kullandığımız çözücülere örnekler olarak verilebilir.

Mayalardan lipid ekstraksiyonu hücre duvarlarının karakteristik yapısı nedeniyle görünüşte zordur. *Saccharomyces cerevisiae* için çeşitli ardışık ekstraksiyon metotları karşılaştırıldığında, metanol, metanol-benzen (1:1, v/v), etanol ve hekzan en verimli olarak bulunmuştur (Moon ve Hammond, 1978).

Kültürler yatık Malt Ekstrakt Agar'da tutulmuştur ve transferden önce tekrar aktive edilmiştir. Ortam fermantasyondan önce sterilize edilmiştir. Örnekler 9000xg 'de, 5°C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir ve süpernatantın kimyasal oksijen ihtiyacı ölçülmüştür. 15°C'de yağ bileşimi için, maya peyniraltı suyu agara ekilip 3 hafta inkübasyona bırakılmıştır (Moon ve Hammond, 1978).

Çalışmamızda, besiyeri içerikleri değiştirilerek bu durumun yağ verimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz miktarı bazı denemelerde artırılarak yağ verimine etkisi incelenmiştir. Ortam şartlarının değiştirilmesi ile yağ verimi değişimi araştırılmıştır.

Trichosporon capitatum'un ortam şartlarının optimizasyonu ile, 28 °C'de ve 160 rpm'de 6 günde yağ veriminde % 61 artış görülmüştür (Wu vd., 2011). Singh ve Ward (1996) tarafından yapılan incelemede, *T. roseum* ATCC28210 'un gelişmesi ve DHA üretimi için oluşturulan ortamda karbon kaynağı olarak 25g/l nişasta kullanılmıştır. Amonyum sülfat (0.2g/l) ve sodyum glutamat (2g/l) ise N kaynağı olarak kullanılmıştır. Biyokütle ve DHA verimleri 6.1 g/l ve 528 mg/l olarak 5 gün sonunda elde edilmiştir. Gelişme ortamının 2 g/l yeast ekstrakt ile desteklenmesi, sırasıyla biyokütle ve DHA miktarlarının, kuru hücre ağırlığında 8.6 g/l ve 892 mg/l'ye ulaşmasına sebep olmuştur. KH₂PO₄ konsantrasyonundaki 0.1 g/L'lik artış, DHA verimini % 40 oranında yükseltmiştir. Oysa tuz konsantrasyonundaki azalmanın DHA verimi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Maksimum biyokütle (12.1 g/l), biyokütlerde lipid (% 23.7) ve biyokütlerde DHA (118 mg/g) değerleri 8 gün sonunda elde edilmiştir. Son DHA verimi 1433 mg/l olarak bulunmuştur. Aynı işlemde glukoz yerine nişasta kullanıldığında daha düşük değerlere (1130 mg/l) ulaşılmıştır (Shene vd., 2010).

Çeşitli alternatif karbon ve azot kaynakları kullanımı ile *S.limacinum SR21* 'in hücre büyümesi ve DHA verimi incelenmiştir. Bu kaynaklar glukoz ile karşılaştırıldığında, biyokütlerde (12 g/l'den fazla) ve toplam yağ asidinde (2.5 g/l'den daha fazla) oleik asit ve keten tohumu yağı ile benzer verim sonuçları elde edilmiştir. Ancak bu karbon kaynaklarından elde edilen biyokütle verimi % 10 daha düşüktür. Yağ asidi üretimi için en uygun azot kaynağı mısır şurubudur. N kaynağı olarak yeast ekstrakt yerine mısır şurubu kullanıldığında yağ asidi kompozisyonunda küçük farklar bulunmuştur. Ancak en yüksek DHA verimi mısır şurubu ile elde edilmiştir. Ham gliserol biodizel üretiminde *S. limacinum SR21*'in ekiminde C kaynağı olarak kullanılmıştır. Farklı C kaynakları (glukoz, fruktoz, çözünen nişasta, patates tozu ve gliserol) ayrı ayrı 30 g/l konsantrasyonda uygulanmıştır. Bu bazal ortamda 20 g/l konsantrasyonunda soya keki hidrolizatı ve % 50 doğal deniz suyu vardır (Shene vd., 2010).

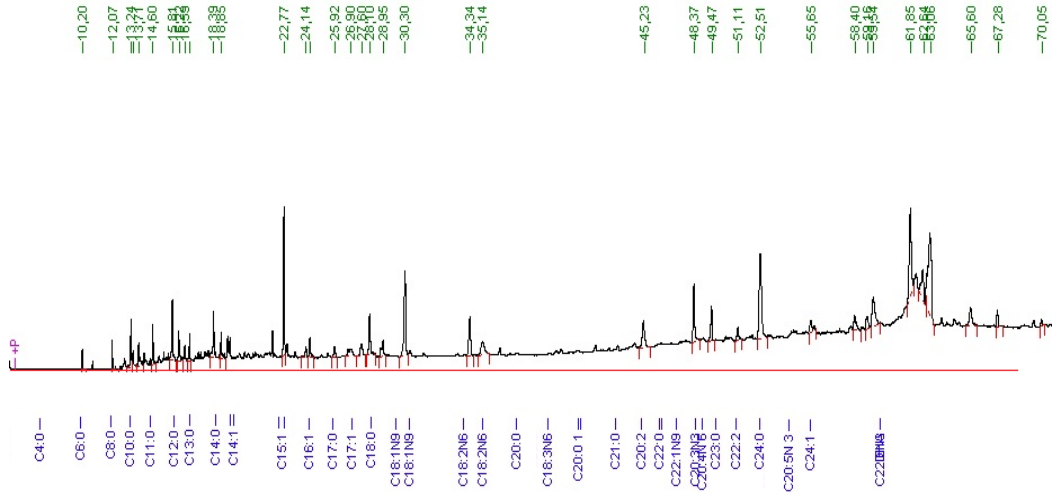
Yapılan çalışmalarda, besiyerindeki sindirilebilir azot miktarı kısıtlandığında *Rhodotorula gracilis* 'te yağ birikiminin arttığı görülmüştür. Yağ üretiminde en umut verici mikroorganizmanın *Rhodotorula gracilis* olduğu görülmüştür. Diğer umut verici yağ üreticiler ise *Lipomyces lipofer* ve *Lipomyces starkeyi* olarak bulunmuştur.

Lipomyces lipofer ile yapılan çalışmalarda % 40 oranında yağ birikimi gözlenmiştir. *Lipomyces starkeyi* ise % 50-63 oranında yağ üretebilmektedir (Bunker, 1963).

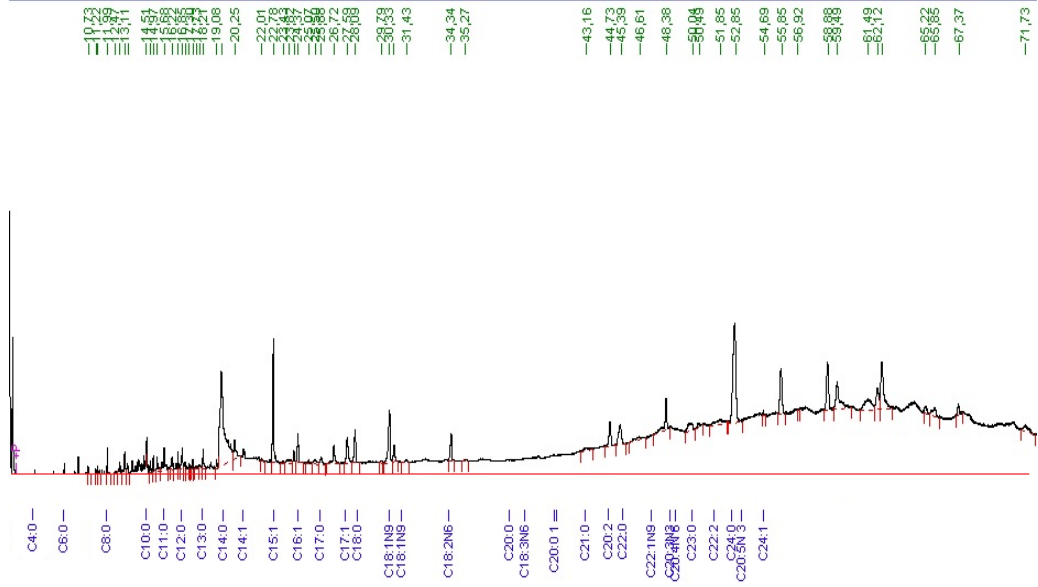
4.8. Yağ Asitleri Kompozisyonu

Gaz kromatografisi mol kütlesi 2-1000 g/mol arasında olan organik ve inorganik gazların, kolayca buharlaşabilen sıvı ve katıların uçucu bir çözücü içinde çözünmüş haldeki örneklerini analiz etmek için kullanılır. Çözelti halinde örneklerin GC ile analizi şu şekilde gerçekleştirilir: Önce uçucu bir çözücü içinde çözünmüş örnek, mikrolitre kapasiteli bir enjektör yardımıyla cihazın enjeksiyon ünitesine enjekte edilir. Enjeksiyon ünitesi, cihaz tarafından sıcaklığı kontrol edilen bir bölmedir ve mümkün olduğunca, örnekteki en yüksek kaynama noktasına sahip bileşenin kaynama noktasından daha yüksek bir sıcaklığa ayarlanır. Böylece enjekte edilen örnek bileşenlerinin kolayca buharlaşması sağlanır. Hareketli faz olarak kullanılan taşıyıcı gaz ile enjeksiyon ünitesinde buharlaşan örnek bileşenlerinin kolona taşınması sağlanır. Bileşenler kolonda sabit faz ile etkileşimleri sonucu farklı hızlarda hareket ederek kolon boyunca ilerler ve böylece birbirlerinden ayrılarak farklı zamanlarda kolonu terk ederler. Örnekteki bir maddenin enjeksiyon anından kolonu terk etmesine kadar geçen süreye alıkonma zamanı denir. Kolon ucunda bulunan bir dedektör sayesinde her bileşenin miktarıyla orantılı sinyali elde edilir. Bu sinyaller bir bilgisayar programı yardımıyla örneğe ait kromatograma dönüştürülür ve böylece bir gaz kromatografisi analiz süreci tamamlanmış olur (Gülcan, 2012).

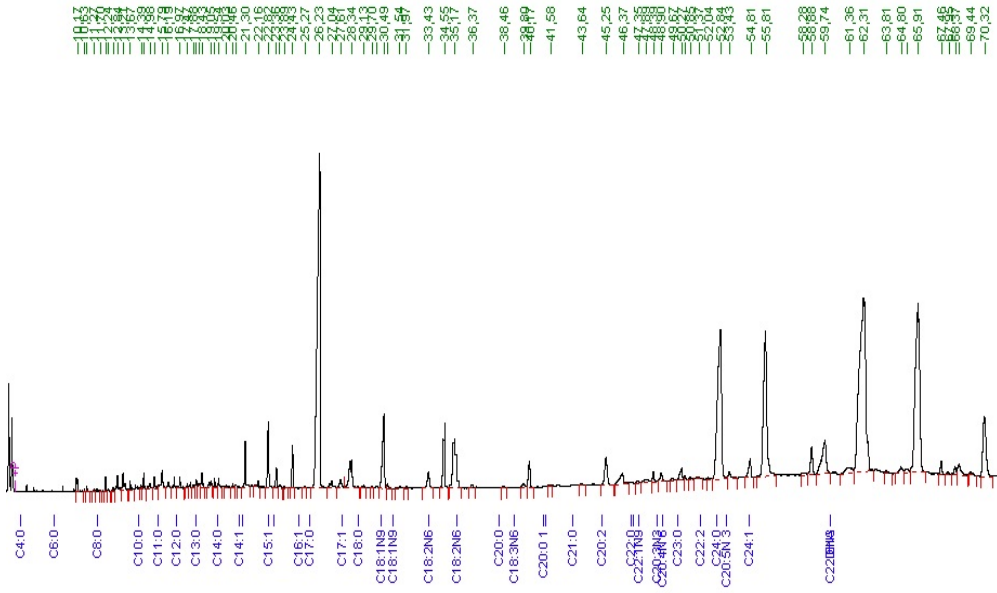
Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yağ örneklerinin GC analizleri hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Analize hazırlık amacıyla yağ asitlerinin esterleşmesi sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil.4.15, Şekil. 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20 ' de verilmiştir.



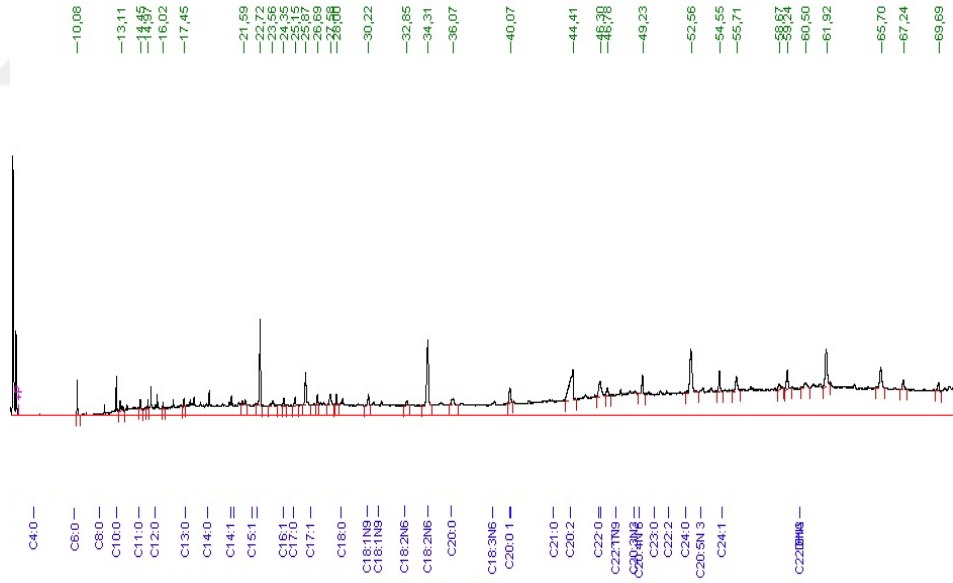
Şekil 4.15. M9 numaralı örneğin yağ asidi profili



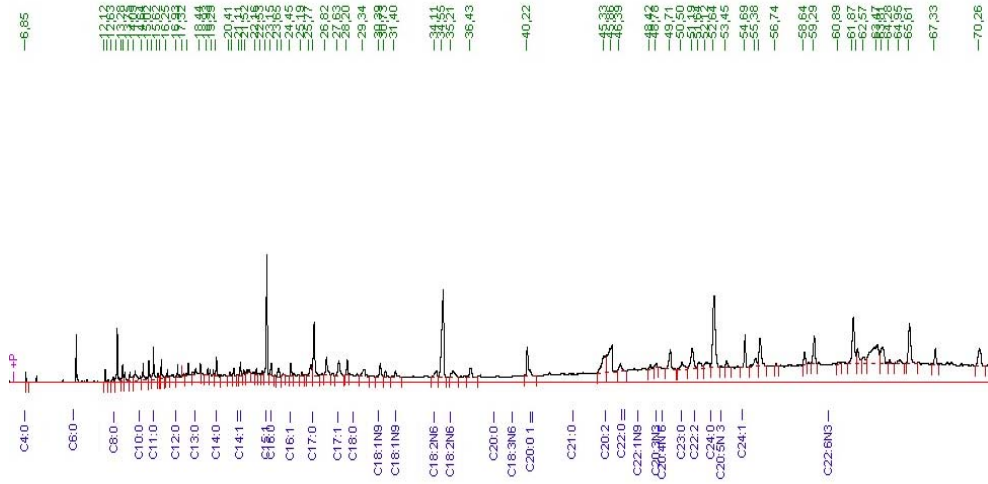
Şekil 4.16. M5 numaralı örneğin yağ asidi profili



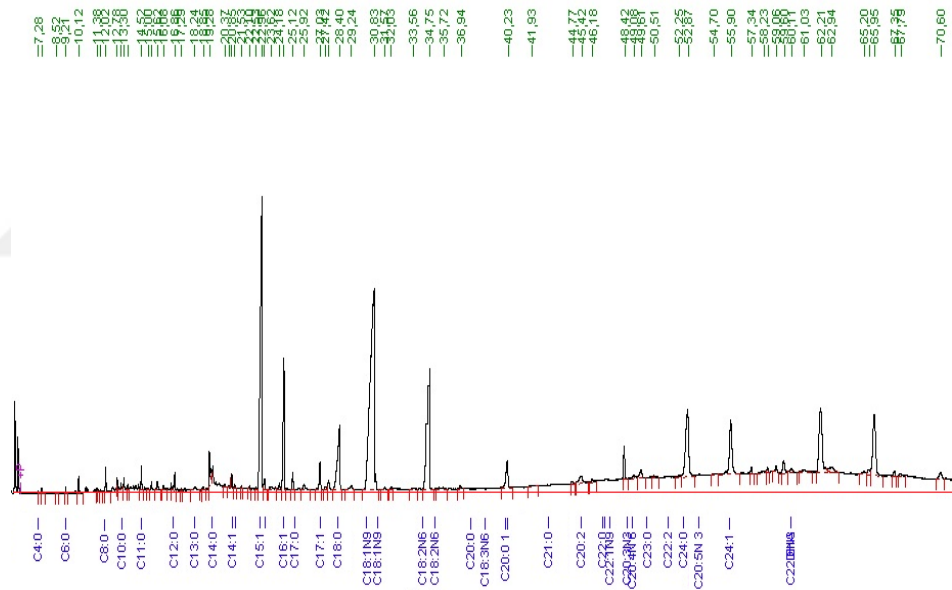
Şekil 4.17. 50 numaralı örneğin yağ asidi profili



Şekil 4.18. 33 numaralı örneğin yağ asidi profili



Şekil 4.19. 14 numaralı örneğin yağ asidi profili



Şekil 4.20. 13 numaralı örneğin yağ asidi profili

Elde edilen yağlardaki yağ asitlerinin oransal dağılımı Çizelge 4.2. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Mikroorganizmalar Tarafından Üretilen Yağlarda Yağ asitlerinin oransal dağılımı

| Yağ Asitleri | M5 | 33 | 13 | 50 | M9 | 14 |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| C4:0 | 0.29 | 0.35 | 0.23 | 0.59 | 0.00 | 1.01 |
| C6:0 | 0.66 | 3.28 | 0.45 | 0.51 | 1.20 | 4.36 |
| C8:0 | 1.53 | 1.05 | 1.58 | 0.93 | 1.69 | 4.92 |
| C10:0 | 2.11 | 3.63 | 0.98 | 1.02 | 2.89 | 1.79 |
| C11:0 | 1.53 | 1.52 | 1,66 | 1.36 | 2.53 | 3.24 |
| C12:0 | 1.46 | 2.70 | 1.13 | 1.53 | 3.94 | 1.57 |
| C13:0 | 1.38 | 1.52 | 0.45 | 1.36 | 2.04 | 1.45 |
| C14:0 | 5.83 | 2.34 | 2.41 | 0.93 | 3.31 | 2.46 |
| C14:1 | 1.46 | 1.87 | 1.13 | 3.31 | 1.97 | 1.90 |
| C15:1 | 7.65 | 8.79 | 17.04 | 4.58 | 8.87 | 11.51 |
| C16:1 | 2.33 | 1.64 | 7.76 | 2.88 | 1.83 | 1.79 |
| C17:0 | 1.02 | 1.76 | 1.21 | 22.04 | 1.41 | 5.48 |
| C17:1 | 2.11 | 3.98 | 1.81 | 0.76 | 1.13 | 2.01 |
| C18:0 | 2.48 | 1.99 | 4.00 | 2.12 | 3.10 | 0.89 |
| C18:1n9 | 5.25 | 3.52 | 11.76 | 5.09 | 5.49 | 1.90 |
| C18:2n6 | 2.33 | 7.03 | 7.24 | 4.58 | 2.96 | 8.38 |
| C20:0 | 0.87 | 1.76 | 0.38 | 0.42 | 0.92 | 0.67 |
| C18:3n6 | 0.95 | 1.52 | 0.30 | 2.03 | 1.06 | 0.78 |
| C20:01 | 1.17 | 2.58 | 1.96 | 0.51 | 1.13 | 3.35 |
| C21:0 | 1.53 | 1.41 | 0.53 | 0.68 | 1.41 | 0.89 |
| C20:2 | 2.99 | 4.22 | 1.06 | 2.29 | 2.75 | 3.47 |
| C22:0 | 2.84 | 3.28 | 0.83 | 1.27 | 1.62 | 1.79 |
| C22:1n9 | 2.26 | 2.58 | 0.83 | 0.68 | 1.83 | 1.34 |
| C20:3n3 | 4.23 | 2.23 | 2.71 | 1.36 | 4.79 | 1.68 |
| C20:4n6 | 2.55 | 4.22 | 1.13 | 1.27 | 1.83 | 3.02 |
| C23:0 | 2.91 | 2.11 | 1.06 | 1.61 | 3.52 | 2.01 |
| C22:2 | 2.99 | 2.11 | 1.06 | 1.10 | 2.39 | 3.13 |
| C24:0 | 8.52 | 6.09 | 4.90 | 10.51 | 6.34 | 7.83 |
| C20:5n3 | 3.13 | 2.70 | 1.21 | 1.36 | 2.25 | 2.01 |
| C24:1 | 3.64 | 4.22 | 4.22 | 10.34 | 2.82 | 4.36 |
| Tanımlanamayan | 20.00 | 12.00 | 17.00 | 11.00 | 21.00 | 9.00 |
| Toplam Kütle | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

Bu sonuçlara göre yağlarımızda;

C18:1n9 (Oleik asit)

C18:2n6 (Linoleik asit)

C24:0 (Lignoserik asit)

C24:1 (Nervonik asit)

C15:1 (Ginkgolik asit)

C17:0 (Heptadekanoik asit)

gibi yağ asitlerine daha yüksek oranlarda rastlanmıştır.

Yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerini, yağın büyük bir kısmını oluşturan yağ asitlerinin oranları ve kompozisyonu belirlemektedir. Gıdalarda yaygın olarak bulunan doymuş yağ asitleri palmitik (C 16:0) ve stearik (C 18:0), doymamış yağ asitleri oleik (C 18:1), linoleik (C 18:2) ve linolenik (C 18:3) asit olmakla beraber, tekli doymamış yağ asitlerinde yaygın olan yağ asidi oleik asit ve çoklu doymamış yağ asitlerinde yaygın olan ise linoleik asittir (Duru ve Konuşkan, 2014).

Bu yağ asitlerinin en çok bulunduğu gıda maddeleri arasında; omega-6 (linoleik asit) yağ asitleri açısından bitkisel sıvı yağlar, omega-9 (oleik asit) yağ asitleri açısından ise zeytinyağı yer almaktadır. Gerek gıda maddelerinin doğrudan bileşimine eklenerek gerekse hayvansal kaynaklı gıdalarda elde edildiği canlı hayvanların rasyonlarına ilave edilerek, gıda maddelerinin omega yağ asitleri açısından zenginleştirilmesi sağlık açısından daha uygun gıda eldesi için önemli bir uygulamadır (Eseceli vd., 2006).

Özellikle oleik asit, insan vücudunda en çok bulunan yağ asidi olup; yağ asitlerinin yarısını oluşturur. Bileşiminde yüksek oleik asit içeriği olan yağların insan sağlığı açısından birçok faydası vardır. Oleik ve linoleik asit miktarı yağın önemli kalite özelliklerinden olan oksidatif stabiliteyi de etkilemektedir. Bitkisel doğal yağlar, çoğunlukla oleik ve linoleik asitler içeren trigliserit karışımlardan oluşmaktadır. En önemli bitkisel yağlardan olan ayçiçek yağı tabii olarak linoleik asit oranı zengin, oleik asit oranı düşük bir yağdır. Gıda sanayinde uzun ömürlü stabilite gerektiren

ticari gıda faaliyetlerinde kullanılabilmesi nedeniyle kızartma işlemine uygun olması ve kozmetik sektörü dahil kimya sektöründe kullanımının uygun olmasıdır. Ayrıca yüksek doymamış yağ asidi içeren yağlar, özellikle oleik asit içeriği yüksek olan yağlar, düşük viskoziteli ve düşük erime noktasına sahip olduğundan soğuk iklim koşullarında, mikrobiyal yağlar ile yüksek kalitede biyodizel üretimi için iyi bir hammaddedir (Duru ve Konuşkan, 2014).

Çalışmada üretilen mikrobiyel yağların oleik ve linoleik asit içerikleri nispeten yüksek bulunmuştur. Yağların büyük bir kısmı oda sıcaklığında sıvı haldedir. Mikrobiyel yağların oleik asit ve linoleik asit içeriğinin oksidatif stabilitelerini artırdığı düşünülmektedir.

Ginkgolik asit (GA) *Ginkgo biloba L. (Ginkgoaceae)* bitkisinin meyve ve yapraklarında bulunur (Ndjoko vd., 2000). Ginkgolik asit ve ilgili alkilfenoller, *Ginkgo biloba L.* meyvesindeki lipidlerin ana bileşenlerini oluşturmaktadır (Jaggy ve Koch, 1997). Ginkgolik asit ve ilgili alkil fenoller, şüpheli sitotoksik, alerjik, mutajenik ve karsinojenik özellikleri ile tehlikeli bileşikler olarak kabul edilmiştir (Liu ve Zeng, 2009). Ginkgo özleri içeren fitofarmasötiklerin kullanımı Federal Alman Sağlık Otoritesi Komisyonu tarafından 5 mg / g ile sınırlandırılmıştır (Ndjoko vd., 2000).

Bazı çalışmalarda, ginkgolik asitin Hep-2 (antinükleer antikor) büyümesini inhibe ettiği ve kromozomal DNA'nın parçalanmasına neden olabildiği bulunmuştur. Ayrıca ginkgolik asitin kanserli hücrelerdeki antitümör potansiyeli ve mekanizması incelenerek yeni antitümör ilacı olmasına yönelik araştırmalar da mevcuttur (Zhou vd., 2010).

Çalışmada üretilen mikrobiyel yağlarda ginkgolik asit oranları yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu yağların toksik bileşenler içermeleri sebebiyle gıda olarak tüketime uygun olmadıkları düşünülmektedir. Ancak ginkgolik asitin ilaç olarak kullanımı ile ilgili çalışmalara örnek teşkil edebileceği öngörülmektedir.

Heptadekanoik asit (margarik asit), en çok koyun kuyruk yağında, yenilebilir sakatatta, tereyağı, kaymak gibi süt ürünlerinde bulunmaktadır (Türkomp, 2014).

Heptadekanoik asitin koyun ve keçi yağlarında at, eşek, sığır, domuz yağlarına oranla daha yüksek miktarlarda olduğu görülmüştür (Turan, 2006).

Potansiyel olarak yararlı doymuş yağ asidi olan heptadekanoik asiti içeren tam yağlı süt ürünlerinin günlük diyetten çıkarılmasının, düşük heptadekanoik asit seviyelerine, yüksek ferritin oluşumuna ve metabolik sendroma sebep olacağı düşünülmektedir (Venn-Watson vd., 2015).

Çalışmada üretilen mikrobiyel yağlarda heptadekanoik asit oranlarına bakıldığında, özellikle 50 numaralı örnekte elde edilen yağda oldukça yüksek miktarda bulunduğu görülmüştür. Hayvansal yağlarda sıklıkla bulunan bu yağ asidinin varlığı, üretilen mikrobiyel yağların gıda olarak tüketime uygun olabileceğini düşündürse de toksik nitelikteki diğer yağ asitlerinin de bulunması bu durumu engellemektedir. Bunun yanısıra beslenme ve sağlık arasındaki ilişkide heptadekanoik asitin yeriyle ilgili çalışmalara örnek teşkil edebileceği düşünülmektedir.

24 karbonlu doymuş bir yağ asidi olan lignoserik asit en çok yerfıstığı, ayçiçek yağı, hamsi, mısır yağı ve kanola yağında bulunmaktadır (Türkomp, 2014). Gıdalarda çok rastlanan bu yağ asidinin çalışmada üretilen yağlardaki yüksek orandaki varlığı, toksik bileşenler olmadığı müddetçe mikrobiyel yağların yenilebilir nitelikte olabileceğini düşündürmektedir.

Nervonik asite yüksek oranda propoliste rastlanmaktadır (Dığrak vd., 1995). Nervonik asitin sağlık üzerindeki etkileri de araştırmalarda yer almaktadır (Sargent vd., 1994). Çalışmada üretilen mikrobiyel yağlardan özellikle 50 numaralı örnekte yüksek oranda nervonik asit varlığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda üretilen mikrobiyel yağlarda bulunan yağ asitlerinin miktar ve çeşitleri, bu yağların kullanım alanları etkilemektedir. Çeşitli doymuş ve doymamış yağ asitlerini içeren bu yağların gıda olarak tüketimleri yerine sağlık ile ilgili çalışmalara örnek teşkil edebileceği düşünülmektedir. Nadir bulunan ve tedavi edici özellikleri araştırılmakta olan bazı yağ asitlerinin mikrobiyel yolla üretilebiliyor olması, birçok yeni çalışmaya da ışık tutabilir niteliktedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Atıkların biyoteknolojik yolla değerlendirilmesi amacıyla yaptığımız denemelerde, atıkları içeren karışık besiyerinde mikroorganizmalar ile yapılan yağ üretiminde genel bir düşüş olduğu görülmüştür. Orijinal besiyerlerine göre büyüme faktörlerini daha az içeren karışık besiyerinde bu sonuç beklenebilir. Seçilen mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu büyüme faktörleri uygun miktarlarda eklenebilir.

Daha büyük hacimli ve daha gelişmiş sistemli fermentörler kullanılarak çalışmadaki tüm mikroorganizmaların yağ üretim miktarlarında artış sağlanabilir.

Yapılan literatür incelemelerinde birçok patojen mikroorganizmanın ve mutantlarının çeşitli maddelerin üretiminde kullanıldığı görülmüştür. Çalışmamızda da yağ üretimi açısından başarılı bulunan mikroorganizma suşlarından bazıları fırsatçı patojenlerden oluşmuştur. Bunların insan tüketimi amaçlı yağ üretimlerinde kullanılması mümkün görülmemekle beraber farklı amaçlı yağ üretimlerine örnek olması mümkündür. Çünkü bu mikroorganizmalardan bazılarının önemli miktarlarda yağ üretebildikleri (yağ oranları % 7-64) görülmüştür.

Yağ üretiminin artırılması açısından hava besleme yönteminin seçimi önemli bulunmuştur. Bu amaçla kurulacak farklı sistemlerin (çökmenin önlenmesi, oksijenle desteklenmesi, hava kabarcıklarının büyüklüğü vb.) denenmesi ile yağ üretim miktarlarında artış sağlanabileceği düşünülmektedir.

Mikroorganizmalardan elde edilen yağ miktarının düşük olmasında en önemli etkenin ekstraksiyon aşaması olduğu düşünülmektedir. İleri dönemde yapılması planlanacak çalışmalarda yağ kaybının önüne geçilebilmesi için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin denenmesi yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adamczak, M., Bornscheuer, U. T., Bednarski, W., 2008. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110:491–504.
- Akan, P., Örmen, M., Gidener, S., Fadiloğlu, M., 2000. Değişik Lipidler İle Beslenmenin Beyin Lipid Bileşimine Etkisi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, Cilt:14 Sayı: 4, 315-322.
- Anonymous, 1987. IUPAC: Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7th Edn. Blackwell Scientific, Oxford (UK). IUPAC Method 2.301.
- Aran, N., 2010. Gıda Biyoteknolojisi. Nobel Yayın Dağıtım, Yayın No: 1490, 493 syf. Ankara.
- Aydoğan, H., and Başustaoğlu A., 2000. Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella* türlerinin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi Cilt 4 (2000)*: 135-43.
- Aytuna H., 2004. Katı Faz Fermantasyon Yöntemiyle Küflerden Lipit Üretimi Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Azeem, A., Neelagund, Y.F., Rathod, V. 1999. Biotechnological production of oil: Fatty acid composition of microbial oil. *Plant Foods for Human Nutrition*. 53: 381–386.
- Ballesta I., 2010. *Saccharomyces cerevisiae*. 20.06.2016. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces_cerevisiae
- Başoğlu, F., 2006. Yemeklik Yağ Teknolojileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Yayın No: 956, Fen ve Byoloji Dizisi: 33, 349 syf. Bursa.
- Bayrak, A., 1997. Ankara ve Şanlıurfa’da Denenen Yazlık-Kışlık Aspir (*Carthamus tinctorius L.*) Çeşit ve Hatlarının Yağ Asitleri Bileşiminin Araştırılması. *Gıda Dergisi*, 22 (4): 269-277. Ankara.
- Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.M. 2009. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91:692–696.
- Bingöl, G., 1976. Lipidler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Yayın No: 41, 76 syf. Ankara.
- Bunker, H., J., 1963. Microbial Food. Rainbow, C., Rose, A., H., (Ed.), *Biochemistry of Industrial Microorganisms (47-53)*. Academic Press, 147. New York.

- Burchhardt, G., Ingram, L. O., 1992. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. Applied and environmental microbiology, Cilt 58(4), 1128-1133.
- Burdon, K.L., 1946. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. J Bacteriol., 52; 665–678.
- Büyüktuncel E., 2012. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 32 (2): 209-242.
- Cao, N., Xia, Y., Gong, C. S., Tsao, G. T., 1997. Production of 2, 3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulase. In Biotechnology for Fuels and Chemicals, Cilt 63-65, 129-139.
- Darcan S., Sarıgül N., 2015. Mikroorganizmalardan Tek Hücre Yağları Üretimi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 45(2):55-67.
- Denli, Y., Tekin, A., 2000. Yağ Üretimi ve Mikroorganizmalar. Gıda Dergisi, 25:265-270.
- Dığrak M., Yılmaz Ö., Çelik S., Yıldız S., 1995. Propolisteki Yağ Asitleri Ve Antimikrobiyal Etkisi Üzerinde İn Vitro Araştırmalar. Gıda Dergisi, Cilt: 20(4), 249-255.
- Doğan, B., H., Tükel, Ç., Çakır, İ., 2000. Lipolitik Bakteriler. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Bölüm 29, 522 s. Ankara.
- Dönmez G., Karatay S., E., 2011. Maya ve Fungus Lipitlerinin Soxhlet Sistemi ile Ekstraksiyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu. Proje Numarası: 10H4240001.
- Duru S., Konuşkan B., D., 2014. Bitkisel Yağlarda Oleik Asit Miktarının Arttırılması Ve Yağ Kalitesi Üzerine Etkileri. Gıda Dergisi, Cilt: 39 (6).
- Eliçin, A., K., Kılıçkan A., Avcıoğlu A., O., 2009. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi. 25. Tarımsal Mekanizasyon Ulusal Kongresi Isparta.
- Eseceli, H., Değirmencioğlu, A., Kahraman, R., 2006. Omega Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
- Forsburg, S. L., 2007. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. Gravitational and Space Research, Cilt 18(2).
- Gülcan, M., 2012. Anorganik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü Ders Notları, 96s, Van.

- Gürbilek, 2011. Yağlar Ve Gıda Katkı Maddeleri. 1. Ulusal Helal Ve Sağlıklı Gıda Kongresi, Konya.
- Gürbüz, F., Karahan, A. G., Kuleaşan, Ş., Bölük, S., Çakmakçı, M. L. 2009. Fatty acid composition of *Arthrospira maxima*: A new approach for possible use in the food industry. International Symposium on Biotechnology Developments and Trends, 27-20 September 2009, Ankara, Turkey, 136.
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., Dickinson, J. R., 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. Applied and environmental microbiology, Cilt 74(8), 2259-2266.
- Horrocks, L.A., Yeo, Y.K. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). Pharmacological Research, 40 (3), 211-225.
- Huang, C., Min-hua Zong, M., Wu, W., Liu, Q. 2009. Microbial oil production from rice straw Hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. Bioresource Technology, 100: 4535–4538.
- İlbilge S., 2007. Lipidler. Gıda Kimyası, Ankara Üniversitesi Yayınları, 133-140.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2005. Fonksiyonel Bir Gıda Olarak Keten Tohumu. GOU. Ziraat Fakültesi Dergisi, 22(2), 23-30.
- Jaggy, H., Koch, E., 1997. Chemistry and biology of alkylphenols from Ginkgo biloba L. Die Pharmazie, Cilt: 52(10), 735-738.
- Jansen, N. B., Flickinger, M. C., Tsao, G. T., 1984. Production of 2, 3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Biotechnology and bioengineering, Cilt 26(4), 362-369.
- Ji, X. J., Huang, H., Du, J., Zhu, J. G., Ren, L. J., Li, S., Nie, Z. K., 2009. Development of an industrial medium for economical 2, 3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. Bioresource technology, Cilt 100(21), 5214-5218.
- Ji, X. J., Huang, H., Li, S., Du, J., Lian, M., 2008. Enhanced 2, 3-butanediol production by altering the mixed acid fermentation pathway in *Klebsiella oxytoca*. Biotechnology letters, Cilt 30(4), 731-734.
- Joo, H. S., Ndegwa, P. M., Shoda, M., Phae, C. G., 2008. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. Environmental Pollution, Cilt 156(3), 891-896.
- Karabulut, H. A., Yandı, İ., 2006. Su Ürünlerindeki Omega-3 Yağ Asitlerinin Önemi ve Sağlık Üzerine Etkisi. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt: 23 Sayı: 1/3, 339-342.

- Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I., Aggelis, G. 2001. Lipid and γ -Linolenic Acid Accumulation in Strains of *Zygomycetes* Growing on Glucose. *JAOCS*, Vol. 78:341-346.
- Kaya, Y., Duyar., H. A., Erdem, M. E., 2004. Balık Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, Cilt: 21 Sayı (3-4), 365-370.
- Kayahan, M., 2003. Yağ Kimyası. ODTÜ Yayıncılık, ISBN 975-7064-76-9, 220 syf., Ankara.
- Kuleaşan, H., Hızal, M. 2009. Tek Hücre yağları Üretimi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mezuniyet Tez çalışması.
- Kuleaşan, Ş., Tekin, A., Özçelik, S., 2008. Genetiği Değiştirilmiş Tohum Yağları ve Özellikleri. *Gıda Dergisi*, 33 (4) : 175-182. Isparta.
- Kuleaşan, Ş., Yaman, T., 2016. Uçucu Yağ Elde Etmede Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Özel Sayı Cilt (1): 78-83.*
- Kurşun, Ö., Unal, N., Cesur, S., Altın, N., Canbakan, B., Argun, C., 2012. *Pantoea agglomerans*'a bağlı ventilatörle ilişkili pnömoni gelişen bir olgu. *Mikrobiyoloji Bülteni*, Cilt 46(2), 295-8.
- Lachance, M.A., 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, *Cilt* 68 (2), 151-160.
- Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., Valdes E. G., Palleroni N. J., 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *Cilt* 70, 510–547.
- Lee, J. H., Choi, K. H., Choi, J. Y., Lee, Y. S., Kwon, I. B., Yu, J. H., 1992. Enzymatic production of α -cyclodextrin with the cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. *Enzyme and microbial technology*, *Cilt* 14(12), 1017-1020.
- Liu, Z. H., Zeng, S., 2009. Cytotoxicity of ginkgolic acid in HepG2 cells and primary rat hepatocytes. *Toxicology letters*, 187(3), 131-136.
- Maiorella, B., Blanch, H. W., Wilke, C. R., 1983. By-product inhibition Effects on ethanolic fermentation by *saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, *Cilt* 25(1), 103-121.
- Mardaneh, J., Dallal, M. M. S., 2013. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea (Enterobacter) agglomerans* isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iranian journal of microbiology*, *Cilt* 5(3), 263-7.

- Masih, E. I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E. A., Vernet, G., Charpentier, C., Adholeya A., Paul, B., 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. FEMS microbiology letters, Cilt 202(2), 227-232.
- Medina, R. A., Grima, E.M., Gimenez, G.G., Gonzalez, M.J.I. 1998. Downstream Processing of Algal Polyunsaturated Fatty Acids. Biotechnology Advances, 16:517-580.
- Moon, N., J., Hammond, E., G., 1978. Oil Production by Fermentation of Lactose and the Effect of Temperature on the Fatty Acid Composition. Journal of the American Oil Chemists' Society, 55 (10), 683-688.
- Mudryk, M. R., 2012. Plant-Isolated *Pantoea agglomerans*–New Look into Potential Pathogenicity. *Мікробіологічний журнал*, Cilt 74 (6), 53-57.
- Mukherjee, K.D., 2002. Lipid Biotechnology, Chapter 25. Food lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology, pp 751-812. Expanded Second Edition. Marcel Dekker Inc. New York.
- Nakahara, T., Kaimaktchiev, A. C., Oogaki-Chino, M., Uchida, Y., Tabuchi, T., 1987. Isocitric acid production from n-alkanes by *Candida catenulata*. Agricultural and biological chemistry, Cilt 51(8), 2111-2116.
- Nas, S., Gökalp, H. S., Ünsal, M., 2001. Bitkisel Yağ Teknolojisi. Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları, Mühendislik Fakültesi Matbaası, Yayın No: 005, 321 syf. Denizli.
- Ndjoko, K., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., 2000. Determination of trace amounts of ginkgolic acids in Ginkgo biloba L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 744(2), 249-255.
- Özbek A., Aktaş O., Uyanık H., Bilici D., Yıldırım K.Z., 2010. Hematolojik Maligniteli Bir Hastada *Pseudomonas stutzeri* Bakteremisi. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt:15(1), 34-36.
- Palmquist, D. L. 2007: Special Issue: Biorumenhydrogenation A workshop supported by OECD. Eur J Lipid Sci Technol. 109, 737–884.
- Pamir., M. H., 1984. Fermantasyon Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 903. Uygulama Kılavuzu: 215. Ankara Üniversitesi Basımevi, 108 syf. Ankara.
- Rankine B.C., 1966. *Pichia membranaefaciens*, A Yeast Causing Film Formation and Off-Flavor in Table Wine. American Journal of Enology and Viticulture, Cilt 17, 82-86.

- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86:807–815.
- Robyt J. F., Ackerman J., R., 1971. Isolation, purification, and characterization of a maltotetraose-producing amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Cilt 145, (1) ,105-114.
- Roostita, R., Fleet, G. H., 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International journal of food microbiology*, Cilt 31(1), 205-219.
- Runguphan, W., Keasling, J. D., 2014. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Metabolic engineering*, Cilt 21, 103-113.
- Sakuradani, E., Shimizu, S. 2009. Single cell oil production by *Mortierella alpina* *Journal of Biotechnology* 103:12-16.
- Salinas, F., Cubillos, F. A., Soto, D., Garcia, V., Bergström, A., Warringer, J., Martinez, C., 2012. The genetic basis of natural variation in oenological traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, Cilt 7(11), e49640.
- Samad, M. Y. A., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Yunus, W. Z. W., Ampon, K., Basri, M., 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of microbiological methods*, Cilt 9(1), 51-56.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D., 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, Cilt 155(2), 624-634.
- Sargent, J. R., Coupland, K., Wilson, R., 1994. Nervonic acid and demyelinating disease. *Medical hypotheses*, 42(4), 237-242.
- Seyedmousavi, S., İlkit, M., Durdu, M., Ergin, Ç., Hilmioğlu-Polat, S., Melchers, W., J. G., Verweij, P. E., 2015. *Candida* Ve Kandidoz: Epidemiyoloji, Tanı, Tedavi, Antifungal İlaç Direnci Ve Konağın Genetik Yatkinlığında Güncel Durum. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* Cilt 45(1), 1-11.
- Shene, C., Leyton, A., Esparza, Y., Flores, L., Quilodran, B., Hinzpeter, I., Rubilar, M., 2010. Microbial Oils And Fatty Acids: Effect Of Carbon Source On Docosahexaenoic Acid (C22:6 N-3, Dha) Production By Thraustochytrid Strains. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 207-216.
- Shu, C. H., Tsai, C. C., Liao, W. H., Chen, K. Y., Huang, H. C., 2012. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of chemical technology and biotechnology*, Cilt 87(5), 601-607.

- Singh, A., & Ward, O. P., 1996. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. *Journal of industrial microbiology*, Cilt 16(6), 370-373.
- Statista, 2016. Global production of vegetable oils from 2000/01 to 2015/16 (in million metric tons). Erişim tarihi: 15.10.2016. <https://www.statista.com/statistics/263978/global-vegetable-oil-production-since-2000-2001/>
- Statista, 2016. Production of major vegetable oils worldwide from 2012/13 to 2016/2017, by type (in million metric tons). Erişim tarihi: 15.10.2016. <https://www.statista.com/statistics/263933/production-of-vegetable-oils-worldwide-since-2000/>
- Sünbül M., Zıvalıoğlu M., Fışgın T.N., 2009. İmmün Kompetan Bir Hastada Toplum Kökenli *Pseudomonas Stutzeri* Menenjitisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 43: 159-162.
- Teixeira, M. C., Raposo, L. R., Mira, N. P., Lourenço, A. B., Sá-Correia, I., 2009. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Applied and environmental microbiology*, Cilt 75(18), 5761-5772.
- Turan F., S., 2006. Karkas Yapısı, Kıl Morfolojik Özellikleri Ve Yağ Asitleri Kompozisyonlarına Göre Et Hayvan Türlerinin Tanınması Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Zootečni Anabilim Dalı, Adana.
- Türkomp, 2014. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. http://www.turkomp.gov.tr/component_results/list/F24:0/1. Erişim tarihi: 16.10.2016
- Türkomp, 2014. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. http://www.turkomp.gov.tr/component_results/list/F17:0. Erişim tarihi: 16.10.2016.
- Van Maris, A. J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A., Pronk, J. T., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Cilt 90(4), 391-418.
- Veen, M., Lang, C. 2003. Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:635–646.
- Venn-Watson, S. K., Parry, C., Baird, M., Stevenson, S., Carlin, K., Daniels, R., Jensen, E. D., 2015. Increased dietary intake of saturated fatty acid heptadecanoic acid (C17: 0) associated with decreasing ferritin and alleviated metabolic syndrome in dolphins. *PloS one*, 10(7), e0132117.

- Ward, O.P., Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry* 40:3627–3652.
- Wilkins, M. R., Suryawati, L., Maness, N. O., Chrz, D., 2007. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Cilt 23(8), 1161-1168.
- Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K., 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, Cilt 42(12), 1614-1619.
- Wu H., Li Y., Chen L., Zong M., 2011. Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum*. *Applied Energy*, 88(1), 138-142.
- Yılmaz, E., Uraz, G., 2011. *Klebsiella pneumoniae* Ve *Klebsiella oxytoca* Bakterilerinde Kombine Disk Yöntemi İle Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazın Belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Cilt 15(1), 41-45.
- Yılmaz, F., Savcı, S., Pazar-Yıldırım, E., Gönüllü, N., Bavunoğlu, I., Köksal-Çakırlar, F., Kiraz, N., 2015. *Pantoea Agglomerans*' In Neden Olduğu Kateter İlişkili Bir Sepsis Olgusu. *Turkish Bulletin Of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji*, Cilt 72(1), 59-62.
- Zhang J., Wu P., Hao B., Yu Z., 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource Technology*, Cilt 102 (21), 9866-9869.
- Zhou, C., Li, X., Du, W., Feng, Y., Kong, X., Li, Y., Zhang, P., 2010. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur via cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis. *Chemotherapy*, 56(5), 393-402.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meryem Selcen Göktaş

Doğum Yeri ve Yılı : Muğla, 1985

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : mselcen.coskun@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Muğla Anadolu Lisesi, 2003

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 2009

Mesleki Deneyim

S.D.Ü. Gelendost MYO Ücretli Öğretim Görevlisi 2010-2014

Pınargözü Yemekçilik Sorumlu Yönetici 2015- (halen)