

**KOÇ BOYNUZ PEPTONU VE MELAS KULLANILARAK
Rhodotorula glutinis İZOLATI TARAFINDAN KAROTENOİD
ÜRETİMİ**

Yağmur ÜNVER

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU
2010
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOÇ BOYNUZ PEPTONU VE MELAS KULLANILARAK
Rhodotorula glutinis İZOLATI TARAFINDAN
KAROTENOİD ÜRETİMİ

Yağmur ÜNVER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2010

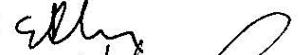
Her hakkı saklıdır.

Doç. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU danışmanlığında, Yağmur ÜNVER tarafından hazırlanan bu çalışma 28/07/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Bařkan: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(imza)

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOÇ BOYNUZ PEPTONU VE MELAS KULLANILARAK *Rhodotorula glutinis* İZOLATI TARAFINDAN KAROTENOİD ÜRETİMİ

Yağmur ÜNVER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU

Bu çalışmada, *Rhodotorula glutinis* YU-14 izolatı tarafından karotenoid üretimi üzerine koç boynuz peptonu (KBP) ve şeker pancarı melasının kullanımı araştırılmıştır. İlk olarak KBP yeniden üretilmiş, daha sonra Erzurum çevresinden toplanan çeşitli numunelerden izole edilerek VITEK 2 Compact cihazı ile tanılanan *Rhodotorula glutinis* strainleri bu çalışma için kullanılmıştır. Karotenoid üretimi için *R. glutinis* YU-14 en iyi izolat olarak seçilmiştir. Melasın toplam şeker (454 g/l) ve protein (75,4 g/l) içeriği belirlendikten sonra *R. glutinis* YU-14 tarafından toplam karotenoid ve biyomas üretimi için melas (%1-5) ve KBP'nin (%0,1-0,7) farklı konsantrasyonları çalışılmıştır. Optimum karotenoid üretim besiyeri (OKÜB) melas konsantrasyonunun %3 ve KBP miktarının %0,5 olduğu belirlenmiştir. OKÜB kullanılarak *R. glutinis* YU-14 tarafından karotenoid ve biyomas üretimi üzerine pH, sıcaklık, zaman, çalkalama hızı gibi fermentasyon şartlarının etkileri araştırılmıştır. En iyi fermentasyon şartları pH 5,5; sıcaklık; 25 °C, zaman; 6 gün, çalkalama hızı; 250 rpm olarak belirlenmiştir. Optimum fermentasyon şartları altında karotenoid ve biyomas miktarlarının sırasıyla 5,79 mg/l ve 11,4 g/l olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, fermentasyon şartlarının karotenoid üretimini önemli ölçüde etkileyebildiğini göstermiştir. Aynı şartlarda melas, ticari karbon kaynakları ile karşılaştırılırken KBP, ticari organik azot kaynakları ile karşılaştırılmıştır. Her iki durumda yapılan karşılaştırma sonucu melas ve KBP içeren OKÜB'den elde edilen karotenoid miktarı daha fazla bulunmuştur (5,79 mg/l). Bunun yanısıra, en iyi biyomas miktarı melas ve maya ekstraktından elde edilmiştir (11,8 g/l). Sonuç olarak, melas ve KBP'nin *R. glutinis* YU-14 tarafından karotenoid üretimi için fermentasyon ortamında kullanılabileceği bulunmuştur.

2010, 75 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Rhodotorula glutinis*, karotenoid, koç boynuz peptonu (KBP), melas, fermentasyon

ABSTRACT

MS Thesis

CAROTENOİD PRODUCTION BY *Rhodotorula glutinis* ISOLATE USING RAM HORN PEPTONE AND SUGAR BEET MOLASSES

Yağmur ÜNVER

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU

In this study, the utilization of the ram horn peptone (RHP) and sugar beet molasses on carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YU-14 was investigated. Firstly, the RHP was reproduced. Then, *Rhodotorula glutinis* strains which were isolated from various samples collected from around Erzurum and identified with VITEK 2 Compact device were used for this study. The contents of total sugar (454 g/l) and protein (75,4 g/l) of the sugar beet molasses were determined. Then, the different concentrations of molasses and RHP were studied for optimum carotenoid and biomass production by *R. glutinis* YU-14. The concentrations of molasses (3%) and RHP (0,5%) of optimum carotenoid production medium (OCPM) were determined. The effects of fermentation conditions such as pH, temperature, time and agitation on carotenoid and biomass production by *R. glutinis* YU-14 using OCPM were investigated. The best fermentation conditions were determined as pH 5,5; temperature 25 °C; time; 6 days and agitation 250 rpm. Under optimum fermentation conditions, the carotenoid and biomass amounts were found to be 5,79 mg/l and 11,4 g/l, respectively. The results showed that cultivation conditions could significantly effect the production of carotenoid. When molasses was compared with the commercial carbon sources, the RHP was also compared with the commercial organic nitrogen sources. In both cases, the carotenoid amount obtained from OCPM which contains molasses and RHP was found higher. Besides this, the best biomass amount (11,8 g/l) was obtained from molasses and yeast extract. As a result, the molasses and RHP could be used in the fermentation medium for carotenoid production by *R. glutinis* YU-14.

2010, 75 pages

Keywords: *Rhodotorula glutinis*, carotenoid, ram horn peptone (RHP), molasses, fermentation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

Çalışmalarım süresince görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR'a ve tüm bölüm elemanlarına, çalışmalarım sırasında her konuda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Arş. Gör. Özden CANLI'ya, Sayın Arş. Gör. Mesut TAŞKIN'a ve Sayın Arş. Gör. Serkan ERDAL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında maddi, manevi desteklerini ve ilgilerini esirgemeyen çok kıymetli anneme, babama, abime ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Yağmur ÜNVER

Temmuz 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Mikrobiyal Pigmentler.....	1
1.1.1. Pigmentin tanımı ve önemi.....	1
1.2. Karotenoidler.....	2
1.2.1. Karotenoid tanımı.....	2
1.2.2. Karotenodlerin keşfi.....	3
1.2.3. Karotenodlerin kimyasal yapısı.....	3
1.2.4. Karotenodlerin fiziksel özellikleri.....	4
1.2.5. Karotenodlerin biyosentezi.....	5
1.2.6. Karotenodlerin fonksiyonları	8
1.2.7. Karotenoidlerin önemi.....	10
1.2.8. Karotenoidlerin kaynakları.....	12
1.3. <i>Rhodotorula glutinis</i> 'in genel özellikleri.....	15
1.4. Melasın Kullanım Alanları.....	15
1.5. Koç Boynuzu Peptonunun Kullanım Alanları	17
1.6. Araştırmanın Amacı.....	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Mikroorganizma ve atık materyaller.....	26
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	26
3.2. Yöntem.....	27

3.2.1. <i>Rhodotorula glutinis</i> suşlarının izolasyonu ve identifikasyonu.....	27
3.2.2. KBP'nin üretilmesi.....	27
3.2.3. Melasın toplam şeker tayininin yapılması.....	29
3.2.4. Melasın protein tayininin yapılması	30
3.2.5. Melas ön muamelesi.....	31
3.2.5.1.Sülfirik asit (H ₂ SO ₄) muamelesi.....	32
3.2.5.2. Potasyum ferrosiyanid ve EDTA muamelesi.....	32
3.2.5.3. Melasın hidroliz edilmesi.....	33
3.2.6. Kullanılan besiyerleri.....	33
3.2.7. İnokülüm hazırlanması.....	34
3.2.8. Karotenoid üretimi ve biyomas miktarının ölçümü.....	34
3.2.9. Toplam karotenoid tayininin yapılması.....	34
3.2.10. Farklı konsantrasyonlardaki melasın biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	36
3.2.11. Melasın ön muamele ve hidroliz işlemlerinin biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	36
3.2.12. Farklı konsantrasyonlardaki KBP'nin biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	37
3.3. KBP'nin ve Farklı Organik Azot Kaynaklarının Karotenoid Üretimi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması.....	37
3.4. Melasın ve Farklı Karbon Kaynaklarının Karotenoid Üretimi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması.....	37
3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	38
4.1. Melasın Toplam Şeker ve Protein Miktarı.....	38
4.2. Standart Besiyerinde <i>R. glutinis</i> İzolatlarının Biyomas ve Karotenoid Miktarları İle İlgili Sonuçlar.....	38
4.3. Melasın <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları.....	39

4.4. Melasın Ön Muamele ve Hidroliz İşlemlerinin <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları.....	41
4.5. Melas İçerikli Besiyeri Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun KBP Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları.....	42
4.6. Optimum Karotenoid Üretim Besiyeri (OKÜB) Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları.....	44
4.7. OKÜB Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Ortam pH'sının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları.....	46
4.8. OKÜB Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Çalkalama Hızının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları.....	47
4.9. OKÜB Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Ortam Sıcaklığının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları.....	49
4.10. Optimum Fermentasyon Şartları Altında <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkilerinin Karşılaştırılmasına İlişkin Araştırma Sonuçları.....	50
4.11. Optimum Fermentasyon Şartları Altında <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkilerinin Karşılaştırılmasına İlişkin Araştırma Sonuçları	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
5.1. Melas ve Koç Boynuz Peptonunun Özellikleri.....	55
5.2. Farklı <i>R. glutinis</i> İzolatlarının Karotenoid Üretimi ve Biyomas Miktarları ile İlgili Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	59
5.3. Melasın <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Konsantrasyonun Belirlenmesi, Ön Muamele ve Hidroliz İşlemlerine İlişkin Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	60

5.4. <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından En Yüksek Verimde Karotenoid Üretimi İçin Gereken KBP Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	61
5.5. OKÜB'nin <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Zaman Bağlı Olarak Biyomas ve Karotenoid Üretimine İlişkin Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	62
5.6. OKÜB Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Ortam pH'sının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	63
5.7. OKÜB Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Çalkalama Hızının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	64
5.8. OKÜB Kullanılarak <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Sıcaklığın Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	64
5.9. Optimum Fermentasyon Şartları Altında <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	65
5.10. Optimum Fermentasyon Şartları Altında <i>R. glutinis</i> YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi...	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

dk	Dakika
$E^{1\%}_{1\text{ cm}}$	Spesifik Absorpsiyon Katsayısı
g	Gram
g/l	Gram/Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/l	Miligram/Litre
ml	Mililitre
N	Normal
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
µg/l	Mikrogram/Litre
µg/ml	Mikrogram/Mililitre

Kısaltmalar

BHT	Butil Hidroksi Toluen
DMAPP	Dimetilalil Pirofosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNSA	Dinitro Salisilik Asit
FPP	Farnesil-Pirofosfat
GPP	Geranil-Pirofosfat
GGPP	Geranil geranil-Pirofosfat
HMG-CoA	3-Hidroksi-3-Metil glutaril-CoA
IPP	İzopentenil pirofosfat
KBH	Koç Boynuzu Hidrolizatı
KBP	Koç Boynuzu Peptonu

KBPB	Koç Boynuzu Peptonlu Besiyeri
KBU	Koç Boynuzu Unu
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat
MMS	Mısır Mazerasyon Sıvısı
MVA	Mevalonik asit
OKÜB	Optimum Karotenoid Üretim Besiyeri
PDA	Patates Dekstroz Agar
UV	Ultra Viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Halkasal olmayan (asiklik) $C_{40}H_{56}$ yapısı.....	3
Şekil 1.2. Karotenoidlerin biyosentezi.....	7
Şekil 3.1. Koç boynuzlarının hidrolizi ile pepton üretimi.....	28
Şekil 3.2. Şeker tayini için kullanılan standart grafik.....	30
Şekil 3.3. Protein tayini için kullanılan standart grafik.....	31
Şekil 4.1. Melasın farklı konsantrasyonlarının <i>R. glutinis</i> YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri.....	40
Şekil 4.2. Melasın ön muamele işlemlerinin <i>R. glutinis</i> YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri.....	42
Şekil 4.3. KBP'nin farklı konsantrasyonlarının <i>R. glutinis</i> YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri.....	43
Şekil 4.4. OKÜB'nin zamana bağlı olarak <i>R. glutinis</i> YU-14 tarafından biyomas ve karotenoid üretimi ve arta kalan şeker miktarı.....	45
Şekil 4.5. <i>R. glutinis</i> YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı pH'ların etkileri.....	47
Şekil 4.6. <i>R. glutinis</i> YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkileri.....	48
Şekil 4.7. <i>R. glutinis</i> YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkileri.....	50
Şekil 4.8. Farklı azot kaynaklarının <i>R. glutinis</i> YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.9. Farklı karbon kaynaklarının <i>R. glutinis</i> YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>R. glutinis</i> izolatlarının toplam karotenoid ve biyomas miktarları.....	38
Çizelge 4.2. Melasın farklı konsantrasyonlarının <i>R. glutinis</i> YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri.....	40
Çizelge 4.3. Melas ön muamele işlemlerinin <i>R. glutinis</i> 'in biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri.....	41
Çizelge 4.4. KBP konsantrasyonunun <i>R. glutinis</i> 'in biyomas ve toplam karotenoid üretimi üzerine etkileri.....	43
Çizelge 4.5. OKÜB'nin zamana bağlı olarak <i>R. glutinis</i> YU-14 tarafından biyomas ve karotenoid üretimi ve arta kalan şeker miktarı.....	45
Çizelge 4.6. <i>R. glutinis</i> YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı pH'ların etkileri.....	46
Çizelge 4.7. <i>R. glutinis</i> YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkileri.....	48
Çizelge 4.8. <i>R. glutinis</i> YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkileri.....	49
Çizelge 4.9. Farklı azot kaynaklarının <i>R. glutinis</i> YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.10. Farklı karbon kaynaklarının <i>R. glutinis</i> YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması.....	52
Çizelge 5.1. Şeker pancarı melasının ortalama bileşimi.....	55
Çizelge 5.2. KBP'nin kimyasal içeriği.....	57
Çizelge 5.3. KBP'nin amino asit içeriği	58

1. GİRİŞ

1.1. Mikrobiyal Pigmentler

1.1.1. Pigmentin tanımı ve önemi

Pigment; bitki ya da hayvanlarda bulunan, hücre zarlarında veya hücre içindeki granüllerde oluşan, dokularda birikmiş olarak ya da vücut sıvılarında süspanse halde bulunan renkli maddedir (Babitha 2009). Doğal renk maddeleri olan pigmentler, çeşitli bitkisel ve hayvansal kaynaklarda bulunmalarının yanı sıra bazı mikroorganizmalar tarafından da sentezlenmektedir. Öyle ki, mikroorganizmalardan birçok önemli ürün elde edilir. Alkol, antibiyotik, enzim, amino asit, tek hücre proteinleri, vitamin ve pigmentler bu ürünlerden bazılarıdır. Meyve ve sebzelerden elde edilen çeşitli pigmentlerin varlığına rağmen doğal olmaları, mevsimsel ve coğrafik koşullardan bağımsız olarak üretililebilmeleri, kontrol edilebilir olmaları ve mahsulün tahmin edilebilir olması gibi niteliklerinden dolayı mikrobiyal pigmentlere artan bir ilgi vardır. Bu yüzden mikrobiyal pigmentler, hayvanlardan veya sebzelerden ekstrakte edilen benzer pigmentlerle karşılaştırıldığında üretimde daha avantajlıdır ve üreme hızı oldukça yüksek olan mikroorganizmalarla pigment üretiminin endüstriyel üretimde önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir. Dahası yeni strainlerin izolasyonu ve geliştirilmesi, farklı ve yeni pigmentlerin keşfedilmesini de sağlayabilmektedir (Babitha 2009).

Riboflavin (*Ashbya gossypi* ve *Eremothecium ashbyii*), monaskus pigmenti (*Monascus purpureus* ve *Monascus ruber*), fikosiyanin gibi fikobiliproteinler (*Spirulina sp.*) ve **karotenoidler** (*Duaniella salina*, *Duaniella bordawil*, *Haematococcus pluviialis*, *Rhodotorula sp.*, *Phaffia rhodozyma*) mikroorganizmalar tarafından ticari olarak üretilen pigmentlerdir (Carvalho et al. 2008).

Doğal pigmentlerin önemli bir grubu olan karotenoidler, A vitamini öncüsü, antioksidan, renklendirici ajan ve tümör inhibisyonu aktivitesine sahip olmaları nedeniyle ilaç, kimya, gıda ve yem sanayinde bir grup değerli molekülü temsil eder (Frengova and Beshkova 2009). Son yıllarda bu moleküllerin insan ve hayvan sağlığı üzerine potansiyel faydalarından dolayı artan bilimsel deliller neticesinde ve gıda (boya maddesi ve besin katkısı olarak), ilaç, kozmetik, yem sanayindeki ihtiyaç doğrultusunda alternatif doğal kaynakları araştırma üzerine ticari ilgi artmakta (Nelis and De-Leenher 1991) ve bu bileşiklerin dünya piyasasının yıllık yaklaşık 935 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Fraser and Bramley 2004).

Karotenoidlerin uygun mikroorganizmalar tarafından ticari üretiminin, kimyasal sentez yöntemlerine göre daha iyi bir yöntem olduğu kabul edilmektedir. Karotenoid üretim maliyetinin oldukça düşük olduğu kimyasal sentez yöntemi ile çoğu karotenoidin üretimi mümkündür. Ancak karotenoidlerin kimyasal sentezi sonucunda stereoizomer karışımı üretilir, bunların bazıları doğada bulunmayabilir, doğal olarak oluşan karotenoid izomerleri kadar aktif olmayabilir, tüketici tarafından istenmeyebilir veya istenmeyen yan etkilere neden olabilir. Bunun yanı sıra, üretim maliyeti sentetik üretimden daha yüksek olan ve yalnızca doğal stereoizomerlerin üretildiği biyolojik üretimle 600'ün üzerindeki farklı doğal karotenoidin biyosentezi geniş bir ilgi alanı oluşturmaktadır (Ausich 1997).

1.2. Karotenoidler

1.2.1. Karotenoid tanımı

Karotenoid; çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmaların sarı, turuncu, kırmızı ve mor renklerinden sorumlu olan ve doğal olarak oluşan biyoaktif bileşikler grubudur (Wilhelm and Helmut 1996). Karotenoidler, ortalama yıllık üretimi 100 milyon ton olan, doğal pigmentlerin en önemli gruplarından biridir. Doğal kaynaklardan 600'den fazla karotenoid izole edilmektedir. Bunların yaklaşık 50'si besinlerden alınabilmekte

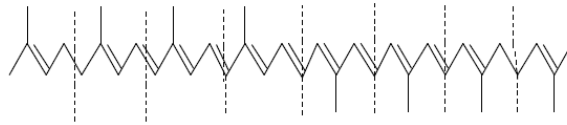
ve 22'si yeterince emilip kana geçebilmektedir (Atkinson 1991; Simpson 1992; Rodriguez-Amaya 2003). Karotenoidler, çoğu zaman rastlanan varlıkları, çeşitli fonksiyonları ve ilginç özellikleri nedeniyle biyokimya, biyoloji, kimya, tıp, mikrobiyoloji ve bilimin çoğu diğer branşlarında disiplinlerarası araştırmanın konusu olmuştur (Bhosale 2001).

1.2.2. Karotenoidlerin keşfi

Guibourt, ilk olarak 1827 yılında yeşil yapraklarda bu pigmentlerin varlığını ileri sürmüştür. 'Karoten' pigmenti, 1837 yılında Wakenroder tarafından havuçtan izole edilmiştir. Karotenoidler üzerine araştırma, Tswet'in 1911'de karotenoidleri kromatografi ile ayırmasıyla daha da gelişmiştir. 1943 yılında Zechmeister ve Polgav, karotenoid kimyasını araştırmayı sağlayan, çoğu karotenoidin spektroskopik davranışını ve kimyasal yapısını göstermiştir. 1972 yılında Wilstatter ve Meig, karotenoidlerin temel yapısının izopren türevli moleküller olduğunu bildirmiştir (Goodwin 1980).

1.2.3. Karotenoidlerin kimyasal yapısı

Kimyasal yapılarına göre karotenoidler, hidrokarbon karotenoidler (karotenler) ve bunların oksijenlenmiş türevleri (ksantofiller) olarak iki büyük sınıfa ayrılır. Karotenoidlerin merkezi iskeleti sekiz izoprenoid ünitesinin yan yana dizilmesiyle oluşmuştur (Bağdatlıoğlu ve Demirbükler 1999). Tüm karotenoidler, konjuge çift bağların uzun bir merkezi zincirine sahip, düz (halkasal olmayan) $C_{40}H_{56}$ yapısından türetilir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Halkasal olmayan (asiklik) $C_{40}H_{56}$ yapısı

Ayrıca karotenoidlerin $C_{40}H_{56}$ temel karbon iskeletinin yıkımı ile veya bazı yeniden düzenleme ile türetildiğine dair bilgiler vardır (Pfander 1992). Sadece karbon ve hidrojenden oluşan hidrokarbon karotenoidler, ‘karotenler’ olarak ta adlandırılırlar. Özel bir bileşiğin ismi, karoten gövdesine ön ek eklenerek oluşturulur (eta, beta, teta, gama gibi). Hidrokarbon karotenoidlerin yaygın örnekleri, β -karoten, α -karoten ve likopendir. Oksijen içeren karotenoidler, ‘ksantofiller’ olarak ta adlandırılırlar. İsimlendirmeleri organik kimya kurallarına göre yapılır. En sık gözlenen fonksiyonel gruplar, hidroksi, metoksi, karboksi, okso, aldehit ve epoksidir. En yaygın örnekleri, zeaksantin, spirilloksantin ve anteraksantindir. Ayrıca yapısında keton grubu bulunduran karotenoidlere ketokarotenoidler denmektedir. Astaksantin ve kantaksantin ketokarotenoidlerdendir (Bhosale 2001).

1.2.4. Karotenoidlerin fiziksel özellikleri

Karotenoidlerin renk özellikleri, yapılarındaki konjuge çift bağlardan kaynaklanmaktadır. Karotenoidler, belirli bir renk oluşumu için en az yedi konjuge çift bağ içermelidir. Konjuge bağ sayısı arttıkça renk yoğunluğu da artmaktadır. Örneğin, beş konjuge çift bağ içeren fitoen renksiz, onbir konjuge çift bağ içeren likopen ise kırmızı renklidir. Aynı sayıda çift bağ içeren karotenoidler, siklizasyon (halkalanma) nedeniyle farklı renk tonlarında bulunabilmektedir. Karotenoidlerin UV ışığına (Shi and Chen 1997), beyaz flouresan ışığa (Biacs and Fekete 1998), oksijene (Henry *et al.* 1998), ısıya ve asite maruz kalmaya (Ancos *et al.* 1999) duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu etkenlere maruziyet sonucu karotenoidlerin yıkımı sırasında; molekülün uzaysal konformasyonunun modifikasyonlarına öncülük eden belirli trans çift bağlarda çeşitli izomerizasyonlar ve böylece kararlılıkta değişiklik olması, karotenoid molekülünün oksidasyonu ve doymamış zincirleri kısaltan oksidatif kırılma gibi kimyasal reaksiyonların birkaç tipi açığa çıkarılmıştır (Berset and Marty 1992). Bu durumda karotenoidlerin yıkımının, Butil Hidroksi Toluen (BHT) ve tokoferol gibi antioksidanların kullanımıyla önlenebileceği bildirilmiştir (Orset *et al.* 1999). Ayrıca çoğu gıda hazırlıklarında karotenoidler, yıkımı önlemek veya kararlılığı artırmak için

sodyum alginat (Go *et al.* 1999), maltodekstrin (Desorby *et al.* 1997), arap zımkı (Leach *et al.* 1998) ve jelatin (Xuan *et al.* 1998) gibi kapsülleyici ajanlarla birleştirilir.

1.2.5. Karotenoidlerin biyosentezi

Karotenoidler, doğada bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Karotenoid biyosentezinde iki ayrı metabolik yol vardır. İlki ‘Mevalonat (MVA) metabolik yolu’, ikincisi ise ‘2-C-metil-D-eritritol-4-fosfat (MEP) metabolik yolu’dur (Rohmer *et al.* 1993). Her iki yoldan da tüm karotenoidlerin sentezinde rol alan izopentenil pirofosfat (IPP) ve onun izomeri olan dimetilalil pirofosfat (DMAPP) sentezlenir. Asetil-CoA, funguslarda, domateste ve fotosentetik dokularda karotenoid üretiminin anahtar öncüsü (prekürsör) olarak bilinir (Goodwin 1993). Ökaryotik hücreler, asetil-CoA’yı IPP’ye çevirmek için genellikle MVA metabolik yolunu kullanırlar. IPP ise daha sonra DMAPP’ye izomerleşir. Bazı istisnalar dışında prokaryotik hücreler, MEP metabolik yolunu kullanarak pirüvat ve gliseraldehit-3-fosfattan (G3P) IPP ve DMAPP sentezlerler (Rohdich *et al.* 2002). Bitkiler ve *Streptomyces* cinsi bakteriler ise her iki metabolik yolu da kullanabilirler (Lichtenthaler *et al.* 1997; Hamano *et al.* 2002).

Simpson *et al.* (1964) ve daha sonra Goodwin (1980, 1993), karotenoid biyosentezinin metabolik yolunun genel olarak üç basamaktan oluştuğunu bildirmiştir.

1. İzopentenil pirofosfatın (IPP) oluşumu;

İlk basamakta asetil-CoA’nın 3-hidroksi-3-metil glutaril-CoA’ya (HMG-CoA) dönüşümü ‘HMG-CoA sentaz’ tarafından katalizlenir. HMG-CoA, terpenoid biyosentezinde ilk spesifik prekürsör olan mevalonik aside (MVA) dönüştürülür. MVA daha sonra ‘MVA kinaz’ tarafından fosforilasyon içeren bir seri reaksiyonla izopentenil pirofosfata (IPP) dönüştürülür.

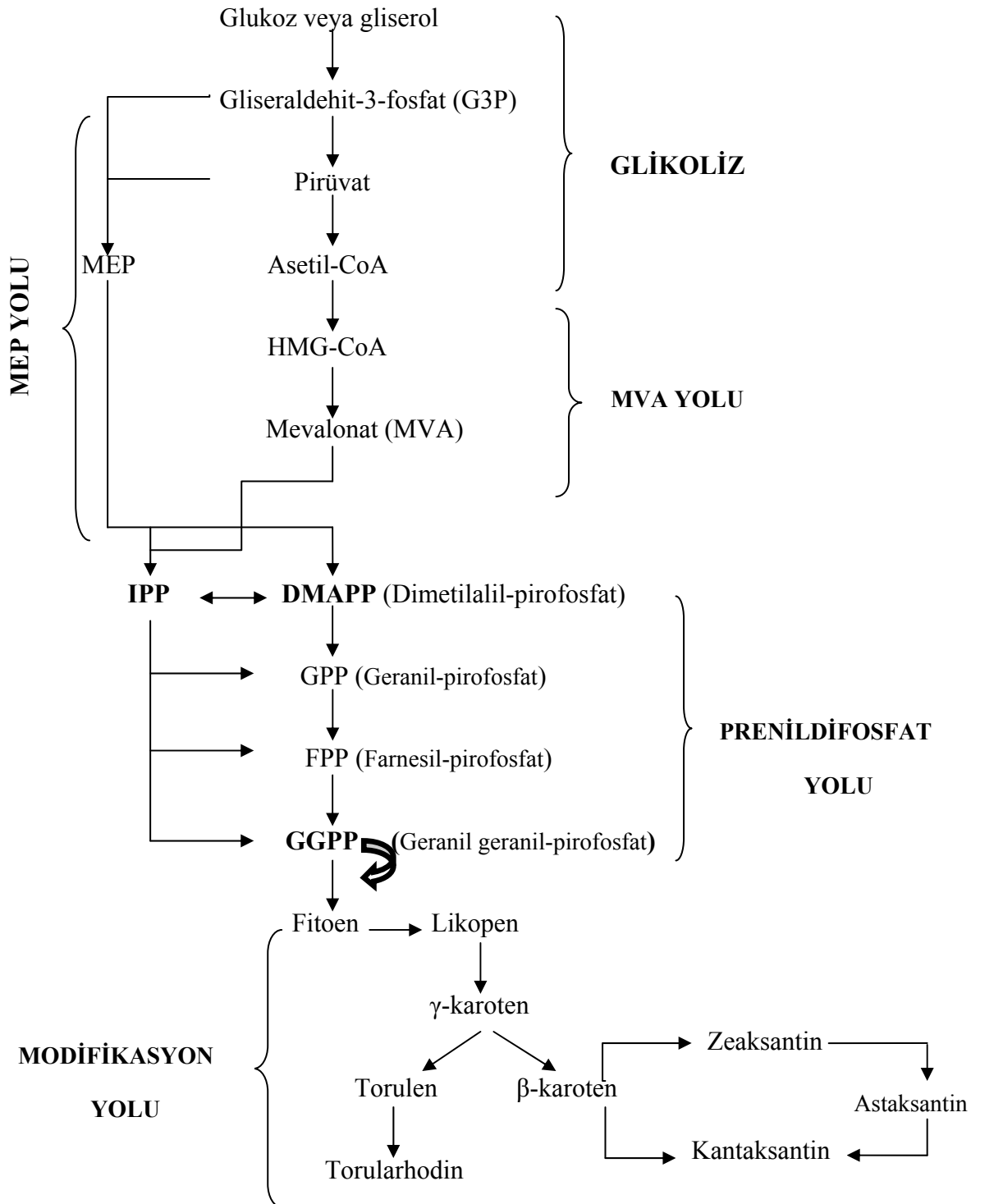
2. Fitoenin oluşumu;

İzopentenil pirofosfat (IPP), dimetilalil pirofosfata (DMAPP) izomerleşir ve 3 IPP molekülü DMAPP'ye sırayla eklenir. Bu reaksiyonlar, geranil geranil-pirofosfat (GGPP) oluşumu için 'prenil transferaz' ile katalizlenir. GGPP'ye ikinci bir GGPP molekülünün eklenmesiyle 'fitoen sentaz' enziminin katalizörlüğünde renksiz fitoen oluşur.

3. Halkalanma ve likopenin diğer reaksiyonları;

'Fitoen desaturaz' enzimi ile fitoenin desatürasyonu sonucu kırmızı renkli likopen oluşur. Likopen, karotenoid döngüsünün prekürsörü olarak rol oynar ve halkasal karotenoidlerin sentezi, likopenin bir veya her iki uç grubunun halkalanmasını gerektirir. Böylece likopen, modifikasyon yolunda diğer karotenoidlerin oluşumu için birçok metabolik reaksiyona uğrar.

Karotenoidlerin biyosentez yolları Şekil 1.2'de kısaca özetlenmiştir.



Şekil 1.2. Karotenoidlerin biyosentezi

1.2.6. Karotenoidlerin fonksiyonları

Epidemiyolojik delil ve deneysel sonuçlar, diyet karotenoidlerinin arteriyoskleroz (damar sertliği), katarakt, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, çeşitli sertleşmeler (skleroz) ve çoğu önemli kanser gibi, esas itibarıyla tümü serbest radikaller tarafından başlatılan çoğu hastalığın başlangıcını inhibe ettiğini göstermiştir (Peto *et al.* 1981; Henneckens 1997; Stahl and Sies 1996; Greenberg *et al.* 1990). Karotenoidlerin bu koruyucu etkilerinin arkasında provitamin-A (A vitamini öncüsü) aktiviteleri ve antioksidan olarak görev yapma yetenekleri vardır.

Provitamin-A aktivitesi

α -karoten, β -karoten ve β -kriptoksantin A vitamini öncüsü (provitamin-A) olan karotenoidlerdir. Bunlar, vücutta retinole (A vitamini) dönüştürülebilirken lutein, zeaksantin ve likopen provitamin-A aktivitesine sahip değildir. Önemli bir karotenoid olan β -karotenin, barsak mukoza hücrelerinde retinole dönüşümü birkaç enzimin faaliyeti sonucu gerçekleşir. ' β -karoten 15-15' dioksijenaz' enzimi karoten molekülünü ortadan ikiye böler ve iki tane retinaldehit molekülü oluşur. Retinaldehit moleküllerinden biri 'retinal redüktaz' enzimi ile 'retinol'e indirgenirken diğeri 'retinoik asit'e yükseltgenir (Bhosale 2001).

Antioksidan aktivitesi

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar, bu olaya da antioksidan savunma denir (Çavdar vd. 1997; Scheibmer *et al.* 2005).

Karotenoidlerin antioksidan olarak rol oynadığı birkaç mekanizma vardır. Bu mekanizmalar, karotenoidlerin oksijen ve ışığın zararlı etkilerine karşı 'fotokoruyucu'

ajan olarak ya da hücrelerde meydana gelen kimyasallara karşı koruyucu bileşikler olarak rol oynaması ve oksidatif zararı azaltma yeteneği şeklinde özetlenebilir (Bhosale 2001).

Karotenoidlerin antioksidan rolünün mekanizması, kısaca üç şekilde tarif edilebilir.

Tekli (singlet) oksijen ile reaksiyon

Tekli oksijen, oksijenin enerji ile uyarılmış formudur ve reaktivitesi çok yüksektir. Tekli oksijenin DNA hasarını içeren yıkıcı etkiye, proteinlerin inaktivasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açabileceği bildirilmiştir (Bhosale 2001). Karotenoidler, bitkilerde fotosentez esnasında oluşan ve oksitleyici ajan olan tekli oksijeni inaktive eden önemli bir antioksidan fonksiyona sahiptir. İn vitroda yapılan çalışmalar, likopenin tekli oksijenin inaktivasyonunda en etkili karotenoid çeşidi olduğunu göstermiştir. Karotenoidlerin tekli oksijeni inaktive etme yeteneği, dokuz ya da daha fazla konjuge çift bağa sahip olmalarıyla ilgilidir (Edge *et al.* 1997). Bu yetenek, ayrıca karotenoidlerin yapıları ve fonksiyonel gruplarına da bağlıdır (Mascio *et al.* 1989).

Oksijen radikalleri ile reaksiyon

Reaktif oksijen, hücrede çeşitli metabolik işlevlerin veya ksenobiyotik (canlı organizma için yabancı ve zararlı endüstriyel veya evsel kimyasal maddeler) maruziyetinin bir sonucu olarak meydana gelir. Reaktif oksijenin DNA'yı kırdığı, lipidleri peroksidlediği, enzim aktivitesini değiştirdiği, polisakkaritleri depolimerize ettiği ve hücrelerin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Brawn and Fridovich 1981; Slater 1982). Karotenoidlerin bu radikalleri inaktif hale getirdiği, çekirdeksel ve hücresel hasarı önlediği bilinmektedir (Bhosale 2001).

Serbest radikallerle reaksiyon

Serbest radikaller, organizmada oksijen kullanımı sonucu ortaya çıkan metabolik yolun yan ürünleridir. Eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller hücrelerin zarar gördüğü reaksiyon dizisini başlatır. Vücutta serbest radikallerin oluşumu, katabolik reaksiyonların yanı sıra yağlı diyetler, sağlıksız beslenme, sigara, ilaç tedavileri, alkol tüketimi, radyasyon, böcek ilaçları ve çevre kirliliği gibi nedenlerle başlamakta ve artmaktadır. Serbest radikaller, bağışıklık sistemini zayıflatarak çeşitli hastalıklara ve erken yaşlanmaya neden olurlar. Bu bakımdan antioksidanlar, hücre koruyucu olarak, tedavide ve dejeneratif hastalıklardan korunmada önemlidir (Temür 2008). Proteinlerin elektronca yoğun bölgelerinin, nükleik asitlerin ve hücre zarlarının hem yapısı hemde fonksiyonuna zarar verebilen serbest radikaller, ayrıca kirli havadaki ozon (O₃) ve azotdioksit (NO₂), ağır metaller, halojenlenmiş hidrokarbonlar ve iyonize edici radyasyon gibi çevresel kirliliklerden orjinlenir. Doğal antioksidan olan karotenoidler, bu serbest radikalleri inaktif hale getirme yeteneğine sahiptir (Bhosale 2001).

1.2.7. Karotenoidlerin önemi

Karotenoidler, A vitamini öncüsü, antioksidan, renklendirici ajan ve tümör inhibisyonu aktivitesine sahip olmaları nedeniyle ilaç, kimya, gıda ve yem sanayinde bir grup değerli molekülü temsil eder (Frengova and Beshkova 2009). Bu moleküllerin hayvan ve insan sağlığı üzerine potansiyel faydalarını belirten çok sayıda bilimsel delil bulunmaktadır. Bu yüzden, son yıllarda bu alternatif doğal kaynakları araştırma üzerine olan ilgi artmaktadır (Nelis and De-Leenher 1991).

Epidemiyolojik çalışmalarda, diyetinde ve kan plazmasında yüksek oranda β -karoten bulunan kişilerde akciğer kanser riskinin önemli derecede azaldığı bulunmuştur (Pierre 1997; Glisson *et al.* 1998). Tümör hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, karotenoidlerin şekil değişikliğine uğramış hücrelerin büyümesine engel olabileceğini göstermiş ve kanserin belirli tiplerinin tedavisinde etkili olabileceğini bildirmiştir (Smith 1998).

β -karoten ve diyetle alınan diğer karotenoidler, DNA hasarına neden olan serbest radikallerin seviyesini düşürerek karaciğerde kanser oluşumunu önleyebilen antioksidanlar olarak bildirilmiştir (Dawson 2000). Karotenoidce zengin gıdaların hayvanlarda karaciğer kanseri oluşumunun erken basamağında rol aldığı düşünülen biyokimyasal ve hücreyel olayları önemli derecede inhibe ettiği bildirilmiştir (Youping *et al.* 1997). Ayrıca β -karoten, astaksantin ve kantaksantin gibi karotenoidlerin, mide kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Yoshiyuki *et al.* 1999). Güçlü antioksidan aktivitesine sahip likopen içeren domatesin alınması ile prostat kanserinin azalması arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda bildiri vardır (Giovannucci and Clinton 1998; Peter *et al.* 1999). Birkaç epidemiyolojik çalışma, domates ve domates ürünlerinden likopeni fazla miktarda alan erkeklerin prostat kanseri olma riskinin düşük miktarda alanlardan daha az olduğunu göstermiştir. Likopen, β -karoten, α -karoten, lutein, astaksantin, fukoksantin, halosintaksantin ve β -kriptoksantin antioksidan aktiviteleri nedeniyle göğüs kanserine karşı güçlü aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Jaervinen *et al.* 1997; Sang-Pill *et al.* 1998; McEligot *et al.* 1999). Kimyasal kanserojenlere maruz bırakılan farelerle yapılan çalışmalar, karotenoidlerin cilt kanserinin teşvikini geciktirdiğini veya önlediğini göstermiştir (Lambert *et al.* 1994; Nishino 1997). Karotenoidlerin tüm bu kanser türlerine karşı muhtemel koruyucu etkisi, onların özellikle tekli oksijen inaktive ediciler olarak rol aldığı antioksidan doğalarına atfedilebilir (Bhosale 2001).

Yaşa bağlı Makula Dejenerasyonu, yaşlılarda körlüğün en yaygın nedenidir. Bu hastalık, retinanın küçük merkezi parçası olan ve en net görmeden sorumlu olan makula densayı (sarı benek) etkiler. Lutein ve zeaksantin gibi karotenoidlerin bu hastalığın riskini azalttığı bildirilmiştir (Seddon *et al.* 1994). Ayrıca göz merceği epitelinde aktif olarak bulunan lutein ve zeaksantin, gözü UV teşvikli oksidatif hasarlara karşı korumada ve katarakt oluşum riskinin azalmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Yeum *et al.* 1999).

β -karoten, likopen, lutein, fitoen ve fitofluen gibi karotenoidleri içeren kozmetik ürünlerinin UV ışığa maruz kalma ve oksidasyondan kaynaklanan hasarın çoğunu

önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (Etienne *et al.* 2000). Karotenoid yıkım ürünlerinden aroma kimyasalları (iyononlar, damaskonlar ve damaskenonlar) parfüm endüstrisinde yaygın olarak kullanılan kokulu maddelerdir. Karotenoidler, gıda endüstrilerinde renklendirici ve A vitamini kaynağı olarak kullanılırlar. β -karoten, α -karoten, astaksantin, fukoksantin, halosintaksantin ve peridinin, antioksidan doğaları ve provitamin-A aktiviteleri nedeniyle gıda renklendirici olarak kullanılırlar. Ancak karotenoidler gıda işleme koşullarına duyarlı olduklarından siklodekstrin gibi ajanlarla kapsüllenirler (Lajos *et al.* 1998).

Akuakültür endüstrilerinde somon balığı ve diğer balıkların pigmentasyonu için *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) mayası tarafından üretilen astaksantin karotenoidi yem katkısı olarak kullanılmakta ve bu karotenoidin yıllık piyasasının 100 milyon dolardan fazla olduğu tahmin edilmektedir (Johnson 2003). Ayrıca astaksantin, düşük bir karotenoid diyeti ile beslenen tavukların yumurta sarılarının pigment kaynağı olarak ta değerlendirilmiştir (Akiba 2000).

Hayvanlar karotenoidleri sentezleyemezler ve onları beslenme yoluyla elde etmek zorundadırlar. Mukoza hücreleri tarafından olduğu gibi absorbe edilen ve sonradan perifer doku ve kan dolaşımında değişmemiş şekilde görülen karotenoidler, konjuge safra tuzlarının varlığında absorbe edilir. Vücuttaki yağlar, safra tuzlarının sekresyonunu uyardığından yağların karotenoid absorpsiyonunda önemli bir etkiye sahip olduğu görülür. Adipoz (yağ) doku ve karaciğer, karotenoidler için büyük depolardır (Omenn *et al.* 1996).

1.2.8. Karotenoidlerin kaynakları

Karotenoidler, meyve, sebze ve liflerin en çok göze çarpan sarı ve kırmızı renklerinin kaynağı olarak bilinmektedir (Türkkan 2007). Havuç (*Daucus carota*) şüphesiz β -karotenin en önemli ve en yaygın kaynakları arasındadır. Havuçtan başka, varlıkları klorofil tarafından engellense de çeşitli yeşil yapraklı sebzeler de önemli miktarda

karotenoide sahiptir. Çeşitli doğal ve sentetik karotenoidlerin varlığına rağmen son yıllarda karotenoidlerin mikrobiyal kaynakları üzerinde artan bir ilgi vardır (Nelis ve De Leenheer 1991; Ausich 1997). İlk olarak, *Blakeslea trispora* fungusundan β -karoten üretim süreci Ciegler ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (1963). Fakat sonraları sentetik imalatla rekabete girilemediğinden bu süreç terk edilmiştir. Ancak son yıllarda sentetik gıda katkı maddelerine karşı halkın bilinçlenmesiyle mikrobiyal kaynaklardan karotenoid üretimi üzerine yenilenen bir ilgi vardır. Ayrıca karotenoidlerin mikrobiyal üretimi, kimyasal üretim metotlarıyla karşılaştırıldığında çevre dostu bir metottur ve böylelikle doğal karotenoidlerin artan gereksinimini de karşılayabilir niteliktedir (Bhosale 2001). Alg, bakteri, küf ve maya gibi birçok mikroorganizma karotenoid üretiminde kullanılmaktadır.

Dunaliella sp. algi ile β -karoten üretimi iyi gelişmiş bir teknolojidir (Ben-Amotz 1999). *Dunaliella* katı hücre duvarından yoksun olan, yüksek tuz ve şiddetli ışık koşullarında yetiştirildiğinde yüksek seviyede β -karoten üreten tek hücreli bir algdır (Haouazine *et al.* 1999). Ayrıca *Haematococcus pluvialis* algi de astaksantin potansiyel endüstriyel kaynağıdır (Sang-Pill *et al.* 1998; Kopecky *et al.* 2000). *Blakeslea trispora* yüksek miktarda β -karoten üretme yeteneğine sahip olan küflerdendir (Goksungur 2002). Bir siyanobakteri cinsi olan *Spirulina* gıda kaynağı olarak dünyanın pek çok yerinde yetiştirilen, önemli miktarda β -karoten, zeaksantin ve kriptoksantin içeren çok zengin bir besin kaynağıdır. *Rhodobacter sphaeroides* ve *Rhodospirillum rubrum* gibi fotosentetik bakterilerde de karotenoidler doğal olarak oluşan renkli bileşiklerdir. Bu karotenoidler, ışık enerjisini toplama ve UV hasarına karşı koruma gibi temel biyolojik fonksiyonlara sahiptir. *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Sporidiobolus* ve *Sporobolomyces* karotenoid sentezleyen maya cinsleridir. Genel olarak oluşturdıkları karotenoidler, β -karoten, γ -karoten, torulen ve torularhodindir. Son yıllarda tanımlanan *X. dendrorhous* (*P. rhodozyma*) mayasının ise diğer mayalardan farklı olarak astaksantin oluşturduğu saptanmıştır. Ticari açıdan ilgiyi ise *X. dendrorhous* ve *Rhodotorula* mayaları çekmiştir (Vandamme 1992).

Kırmızı pigmentli *X. dendrorhous* mayasının yüksek konsantrasyonda içerdiği astaksantin, akuakültür endüstrisinde yem katkısı olarak kullanılmaktadır. Ancak *X. dendrorhous*, parçalanmayı veya biyolojik olarak sindirimini zorlaştıran dayanıklı hücre duvarına sahiptir ve bu da karotenoid içeriğinin tümünden faydalanmayı sınırlamaktadır (Hari *et al.* 1992).

Rhodotorula sp. mayası tarafından karotenoid üretimi üzerine çalışmalar ilk olarak Nakayama *et al.* (1954), Peterson *et al.* (1954,1958) ve Simpson *et al.* (1964) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar, *Rhodotorula*'nın çevresel ve kültür şartlarına bağlı olarak, çeşitli oranlarda dominant olarak 'torularhodin, torulen ve β -karoten' ürettiğini bildirmişlerdir.

Mayalarla karotenoid üretiminin alg ve funguslara nazaran birkaç avantajı vardır. Bunlar;

- 1- Mayalar tek hücreli mikroorganizmalardır ve büyük miktarlarda üretilebilirler.
- 2- Mayaların büyüme hızı yüksek olduğundan hücre kütlelerinin büyük miktarda üretimi oldukça kolaydır.
- 3- Maya hücreleri dayanıklıdır ve istenen hücre yoğunluklarında üretilebilir.
- 4- Kurutulmuş şekilde hücre kütlesi çeşitli farmakolojik ürünlerde ve yem katkısı olarak kullanılabilir (Bhosale 2001).

Ayrıca *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* ve *Candida utilis* gibi karotenogenik olmayan mikroorganizmalara karotenogenik mikroorganizmalardan gen transferiyle de karotenoid üretimi mümkün olmaktadır.

1.3. *Rhodotorula glutinis*'in Genel Özellikleri

Genellikle ‘pembe maya’ olarak adlandırılan *Rhodotorula glutinis* serbest yaşar, doğada yaygın olarak toprak, hava, su, meyve suyu ve süt ürünleri gibi çok çeşitli ortamlarda bulunan, Basidiomycota üyesi, parlak, mukoid, renkli koloniler oluşturan, obligat aerobik olarak gelişen tek hücreli mikroorganizmadır.

1.4. Melasın Kullanım Alanları

Biyoteknolojik yöntemlerde önemli bir karbon kaynağı olarak bilinen melas, şeker fabrikasyonunun teknik ve ekonomik koşulları ile şuruplardan mümkün olan en fazla şeker kristali alındıktan sonra arta kalan koyu kahverenkli pekmez görünümünde bir maddedir. Dünyadaki melas üretiminin %75’i şeker kamışından (*Saccharum officinarum*), geri kalanının en büyük kısmı ise şeker pancarından (*Beta vulgaris*) elde edilmektedir ve bu üretimin 1990’lı yılların sonunda 46 milyon ton olduğu bildirilmektedir (Ediz 2004). Ülkemizde elde edilen melas, şeker pancarı melasıdır. İşlenen şeker pancarına göre %4-5 oranında melas elde edilir. Melasın bileşiminin bitki türüne, mevsim ve toprak şartlarına, hasata, şeker rafinasyon işlemlerine ve melas depolama koşullarına bağlı olarak son derece değişken olduğu görülmektedir (Göksungur 1998). Melasın yaklaşık %15’ini su, %50’sini sakkaroz ve %35’ini sakkaroz dışı maddeler oluşturur. Sakkaroz dışı maddenin de %35’i anorganik, %65’i organik olup, organik maddelerin büyük kısmı azotlu bileşiklerden oluşur (Ulubaş 1991).

Yıllara bağlı olarak ülkemizde yılda yaklaşık 500 000 ton melas elde edilmekte ve başlıca alkol, sitrik asit, asetik asit, ekmek mayası ve melaslı kuru küspe üretiminde kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda şekersiz kuru küspe ile melasın karıştırılarak kurutulmasından elde edilen kuru hayvan yemi besicilikte önemli bir yer almaktadır. Melasta bulunan şeker dışındaki organik maddelerin başlıcaları; azotlu maddeler, organik asitler, nişasta, çözünür gamlar ve pentozanlar gibi kompleks

karbonhidratlardır. Melasta bulunan azotlu maddeler; aminoasitler, amidler ve diğer basit azotlu maddelerdir. Şeker pancarı melasında baskın halde bulunan betain ve glutamik asit, melasın karakteristik koku ve lezzetinin büyük bir kısmından sorumlu olan azotlu maddelerdendir. Melasta bulunan başlıca organik asitler; asetik asit, propiyonik asit, formik asit ve bütirik asittir. Potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, sodyum, sülfat, klor ve fosfat melasta bulunan başlıca inorganik bileşiklerdir. Melasta ayrıca biyotin, pantotenik asit, inositol, nikotinik asit, riboflavin, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler de vardır (Göksungur 1998)

Yukarıdaki bilgilerden de anlaşılacağı üzere melas, yalnız şeker bakımından değil, içerdiği şeker dışı maddeler yönünden de değerli bir üründür. Melasın bu özelliğinden ve kullanılabilir karbon kaynakları bakımından zengin olmasından dolayı çeşitli fermentasyonlarda substrat olarak kullanımı üzerindeki çalışmalar artmıştır ve birçok ticari üretimde ucuz bir substrat kaynağı olarak kullanılmaktadır. Melas kullanılarak yapılan bu çalışmalardan bazıları; Anaerobik fermentasyonla biyohidrojen üretimi (Lay *et al.* 2010), polihidroksialkanoat üretimi (Bengtsson *et al.* 2010), immobilize *Clostridium tyrobutyricum* ile bütirik asit üretimi (Jiang *et al.* 2009), bazı *Rhizobium* bakterilerinin PHB üretimlerinin incelenmesi (Türkoğlu 2009), termofilik şartlarda *Bacillus licheniformis* ile biyosülfektan üretimi (Joshi *et al.* 2008), *Saccharopolyspora erythraea* ile eritromisin üretiminin geliştirilmesi (El-Enshasy *et al.* 2008), *Saccharomyces cerevisiae* ile biyoetanol üretimi (Siqueira *et al.* 2008), *Actinobacillus succinogenes* ile süksinik asit üretimi (Liu *et al.* 2008), *Aspergillus niger* ile glukonik asit üretimi (Sharma *et al.* 2008), *Lactobacillus delbrueckii* ile laktik asit üretimi (Dumbrepatil *et al.* 2008), *Zymomonas mobilis* ile etil alkol üretimi (Cazetta *et al.* 2007), rekombinant *Escherichia coli* ile polihidroksialkanoat üretimi (Li *et al.* 2007), *X. dendrorhous* mutanları ile karotenoid üretimi (Jirasripongpong *et al.* 2007), melasta laktik asit ve ekzopolisakkarit üretiminin belirlenmesi (Yeniel 2006), *Enterococcus faecalis* ile laktik asit üretimi (Wee *et al.* 2004), bazı *Bacillus* cinsi bakterilerin PHB üretimleri, toplam protein profilleri ve plazmid DNA'larının incelenmesi (Ediz 2004), *Xanthomonas campestris* ile ksantan üretimi (Kalogiannis *et al.* 2003), *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretimi (Roukas 1998; Lazaridou *et al.* 2002), ekmek mayası

üretim parametrelerinin tespiti ve sıvı mayanın likid ferment sistemi ile ekmek yapımında kullanılma imkanları (Bilgiçli 2000).

Melas, genellikle küspe ile karıştırılıp hayvan yemi olarak olduğu gibi kullanılırken kimyasal yöntemlerle demir ve çeliğin esmerleştirme ve düzgünleştirmesinde de kullanılır. Melasın romatizma hastalığında tedavi edici etkisinin bulunduğu, katran veya asfalt ile asitli ortamda reçineleştirilmesinden kolay yumuşayan bir asfaltlama maddesinin elde edilebildiği bildirilmektedir (Yenieli 2006).

1.5. Koç Boynuz Peptonunun Kullanım Alanları

Mikroorganizmaları laboratuvarlarda üretmek, saf olarak ayırmak, teşhislerini yapmak ve işlevleriyle ilgili her türlü çalışmaları yürütebilmek için, onların ihtiyacı olan besin maddelerini ihtiva eden ortamlar hazırlanır. Bu ortamlara «besiyeri» veya «besi ortamı» adı verilir. Mikroorganizmalar için daha kapsamlı ve güçlü besiyerleri hazırlama çalışmaları 1860 yılında Pasteur tarafından başlatılmış olup, günümüzdeki araştırmalar daha çok ucuz besiyerleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Kurbanoglu 1999). Fermentasyon ortamının en önemli bileşenlerini oluşturan mikronütrient maddeler, mikrobiyal fermentasyon işlemlerinin toplam maliyetinin %30'unu oluşturmaktadır. Atık maddeler, pahalı pepton ve maya ekstraktlarının yerini alabilecek mikronütrientler olarak kullanılabilirler. Herhangi bir atık maddenin endüstriyel fermentasyon işlemlerinde kullanımı için ticari olarak kullanılan besiyeri ortamlarının formülasyonlarıyla gösterdiği tutarlılık ve ürün eldesinde önemli artış ya da maliyetin düşürülmesi oldukça büyük önem taşıyan özelliklerdir (Lee *et al.* 1998). Mikrobiyal besiyerlerinde KBP kullanımına ilk defa 1999 yılında başlanmıştır (Kurbanoglu 1999). Daha sonra KBP veya koçboynuzu hidrolizatı (KBH) laktik asit, (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2003a,c), gliserol (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2004), sitrik asit, (Kurbanoglu 2003b, 2004), ksantan (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2007), (R)-1-(4-Bromo-phenyl)-ethanol (Zilbeyaz and Kurbanoglu 2008) ve glukoz oksidaz enzimi (Canlı 2009) gibi önemli maddelerin üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilmiştir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, *R. glutinis* YU-14 izolatı tarafından karotenoid üretiminde, besin kaynağı olarak şeker pancarı melası ve koç boynuz peptonunun (KBP) kullanılabilirliğini araştırmaktır. Çalışmanın diğeri bir amacı ise melas ve KBP'den hazırlanan besiyerinde *R. glutinis* tarafından üretilen karotenoid miktarlarını ticari karbon ve organik azot kaynaklarının kullanımıyla elde edilen karotenoid miktarlarıyla karşılaştırmaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan araştırmalarda karotenoidlerin çeşitli substratlarda mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen üretimi, kullanılan yöntemler ve karotenoid üretimi üzerine etki eden faktörler tespit edilerek özet halinde aşağıda belirtilmiştir.

Frengova *et al.* (1994), %3,9 ve %7,1 laktoz içeren peynir ultrafiltrasyonunda *Lactobacillus helveticus* ile birlikte yetiştirilen *R. glutinis* tarafından karotenoid üretimini çalışmıştır. 15 l'lik fermentörde 220 rpm'de 120 saatlik fermentasyon sonucunda karotenoid üretiminin hücre üremesine paralel olarak arttığı ve maksimum karotenoid üretimine durağan fazın erken basamağında ulaşıldığı bildirilmiştir. Ayrıca *R. glutinis*'ten elde edilen üç önemli karotenoidin (β -karoten, torulen ve torularhodin) de maksimum konsantrasyonu elde edilmiştir.

Frengova *et al.* (1995), yaptığı başka bir çalışmada peyniraltı suyu ultrafiltrasyonunda *Lactobacillus helveticus* ile birlikte yetiştirilen *R. glutinis* tarafından karotenoid üretimi üzerine sıcaklık değişiminin etkisini çalışmıştır. Fermentasyon ortamında sıcaklık değişiminin karotenoid oluşumunu ve karotenoidleri oluşturan bireysel pigmentlerin oranını etkilediğini bildirmiştir.

Buzzini and Martini (1999), çeşitli zirai-endüstriyel orjinli ham maddeleri (üzüm şırası, glukoz şurubu, şeker pancarı melası, soya fasülyesi unu ekstraktı ve mısır unu ekstraktı) kullanarak *R. glutinis* ile karotenoid üretimi üzerine bir araştırma yapmıştır. Maksimum üretimi tek karbon kaynağı olarak konsantre üzüm şırası içeren substratta 120 saatlik kesikli kültürden elde etmiştir. Tüm deneylerde karotenoidleri oluşturan pigmentlerin (β -karoten, torulen ve torularhodin) miktarları HPLC ile hesaplanmıştır.

Buzzini (2000), tek karbon kaynağı olarak konsantre üzüm şırasında *R. glutinis* ile karotenoid üretiminin optimizasyonu için çok değişkenli istatistiksel yaklaşımı

kullanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sırasında çeşitli deneysel parametreleri (karbonhidrat, maya otolizati, tuz konsantrasyonu ve pH) test etmiştir. Karotenoid oluşumunun pH ve maya otolizati konsantrasyonuna oldukça duyarlı olduğunu, pH'nın 5,8, maya otolizati konsantrasyonunun 4,67 g/l olduğu 120 saatlik fermentasyon ortamının karotenoid üretimi için en iyi ortam olduğunu, bu ortamda üretilen toplam karotenoid ve β -karoten miktarlarının sırasıyla 6,9 mg/l ve 1100 μ g/l olduğunu bildirmiştir.

Bhosale and Gadre (2001a), ana strainden 36 kat daha fazla β -karoten üreten *R. glutinis* mutant 32 ile şeker kamışı melasında toplam karotenoid ve β -karoten miktarını tespit etmek için bir araştırma yapmıştır. *R. glutinis* mutant 32 ile toplam indirgen şeker konsantrasyonu ve pH üzerine optimizasyon çalışması yapmış, bu değerleri sırasıyla 40 g/l ve 6 olarak saptamıştır. Bu optimal şartlarda toplam karotenoid içeriğinin % 70'inin β -karoten olduğunu tespit etmiştir. 14 l hacimli karıştırılmalı fermentörde yaptıkları çalışmada sadece melasın kullanıldığı, herhangi bir azot kaynağının ilave edilmediği durumda torulen içeriğinde %20 artış gözlerken azot kaynağı olarak maya ekstraktı ilave edildiğinde β -karoten içeriğinde % 31 artış gözlemlenmiştir.

Bhosale and Gadre (2001b), yaptığı başka bir çalışmada deniz suyu ile hazırlanan besiyerinde *R. glutinis* mutant 32 tarafından üretilen toplam karotenoidin 86 mg/l ve kuru hücre biyomasının 16 g/l, saf su ile hazırlanan besiyerinde ise bu değerlerin sırasıyla 70 mg/l ve 12 g/l olduğunu bildirmiştir. Deniz suyu ile hazırlanan besiyerinde üretilen β -karoten miktarında 2 kat artış olduğunu torulen miktarında ise 2,3 kat azalma olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu besiyerinde pH 6'da karotenoidlerin %83'ünün herhangi bir mekaniksel parçalanmaya gerek kalmaksızın ekstrakte edilebilirliği de bildirilmiştir.

Buzzini (2001), tek karbon kaynağı olarak mısır şurubunun kullanıldığı kesikli ve kesiksiz fermentasyonda *Debaryomyces castelli* ve *R. glutinis*'in birlikte üretilmesiyle karotenoid üretimini çalışmıştır. Yapılan çalışmada kesiksiz kültürde kesikli kültürden

%150 daha fazla verim elde edilmiştir. Ayrıca torularhodin, torulen ve β -karoten miktarları da hesaplanmıştır. Sonuç olarak mısır şurubunun içerdiği oligosakkarit ve dekstrinlerin *D. castelli* ile birlikte kültüre edilen *R. glutinis* tarafından karotenoid üretiminde kullanılabilirliği görülmüştür.

An *et al.* (2001), şeker pancarı melasında *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*P. rhodozyma*) mutanti ile karotenoid üretimini çalışmıştır. %5 melas konsantrasyonundan sonra maya biyomasında önemli miktarda düşüş gözlemlemiş, %5 melas, 30 g/l üre, 5 g/l NaH_2PO_4 ile hazırlanan besiyerinde pH 4,9 da optimum karotenoid üretimini belirlemiştir.

Squina *et al.* (2002), şeker kamışı suyu ile hazırlanan besiyerinde *Rhodotorula rubra* ve *Rhodotorula glutinis* tarafından karotenoid üretimini araştırmıştır. Karotenoid üretimi üzerine farklı şeker ve maya ekstraktı konsantrasyonunun, pepton ve inorganik tuzun varlığı veya yokluğunun (0-10 g/l) etkisini çalışmıştır. Tüm çalışmalarda torularhodin, torulen, β -karoten ve γ -karotenin besiyeri içeriğine bağlı olarak farklı oranlarda oluştuğunu bildirmiştir.

Göksungur *et al.* (2002), çalkalamalı kültürde *Blakeslea trispora* ile β -karoten üretimi üzerine melas ön muamelesi, çeşitli azot kaynakları, doğal yağlar, yağ asitleri, antioksidanlar, prekürsörler ve bunların karışımlarının etkisini çalışmıştır. Ayrıca maksimum β -karoten üretimi için linoleik asit, kerosene ve antioksidanın optimum miktarlarını tespit etmeye çalışmıştır. Karotenoid pigmentinin yüksek konsantrasyonu invertaz ile muamele edilen melas solüsyonundan elde edilmiştir. Mısır mazerasyon sıvısı (%5) ve maya ekstraktı (%0,5) β -karoten konsantrasyonunu az miktarda artırırken doğal yağlar, yağ asitleri ve kerosene dışındaki prekürsörler besiyerine ayrı ayrı eklendiğinde pigment üretimini artırmamıştır. Diğer yandan linoleik asit, kerosene ve antioksidan karışımı besiyerine ilave edildiğinde β -karoten konsantrasyonunu önemli miktarda artırdığı gözlenmiştir.

Frengova *et al* (2003), peyniraltı suyu ile hazırlanan besiyerinde laktozu kullanamayan *R. rubra* ile laktozu kullanan homofermentatif *Lactobacillus casei*'yi birlikte yetiştirerek karotenoid üretimini çalışmıştır. Maya gelişiminin durağan fazında hücrelerdeki karotenoid içeriğinin maksimuma ulaştığı gözlenmiştir.

Bhosale *et al.* (2003), *R. glutinis* mutant 32 mayasını 14 l'lik karıştırmalı fermentörde yetiştirmiş, elde ettiği hücre biyomasını mikrofiltasyonla 10 kat konsantre hale getirerek toz halde kurutmuştur. Koruyucu ajan olarak Bütil Hidroksi Toluen (BHT) ve tokoferol kullanılmıştır. İki seviyede üç değişkenle optimizasyon çalışması yapılmış ve β -karotene zengin yem katkı maddesi elde edilmiştir. Sonuç olarak toz haldeki β -karotene zengin *R. glutinis* mayasının hayvan beslenmesinde β -karotenin alternatif bir kaynağı olabileceği bildirilmiştir.

Tinoi *et al.* (2005), karbon kaynağı olarak tatlı patates (*Ipomoea batatas*) ve azot kaynağı olarak hidroliz edilmiş mongo fasülyesi atık ununu kullanarak *R. glutinis* ile karotenoid üretimi üzerine yaptığı optimizasyon çalışmasında sequential simplex metodunu kullanmıştır. Optimal koşulların pH; 5,91, sıcaklık; 30°C, çalkalama hızı; 258 rpm ve inkübasyon süresi; 94,78 saat olduğunu ve bu optimal koşullar altında toplam karotenoid miktarının 3,48 mg/l ve kuru hücre biyomasının ise 10,3 g/l olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen biyomas ve toplam karotenoid miktarının bir-defada-bir-faktör yöntemiyle elde edilen miktarlardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Simova *et al.* (2004), peyniraltı suyu ile hazırlanan besiyerinde *R. rubra*'yı yoğurt bakterileri (*Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) ile birlikte yetiştirerek karotenoid üretimini çalışmıştır. Karışık yoğurt bakterileri ile olan birliktelikte (*R.rubra*, *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*) karotenoid üretiminin saf yoğurt bakterisiyle (*R.rubra* ve *L. bulgaricus* veya *R. rubra* ve *S. thermophilus*) olan birliktelikten yaklaşık iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *R.rubra*'dan elde edilen karotenoidlerden β -karotenin %50, torulenin %12,3 ve torularhodinin %35,2 oranında olduğu ve *R. rubra* + *L. bulgaricus*, *R. rubra* + *S. thermophilus* ve *R. rubra* +

L. bulgaricus + *S. thermophilus* tarafından sentezlenen β -karoten, torulen ve torularhodin oranları arasında önemli fark olmadığı görülmüştür.

Park *et al.* (2005), şeker kamışı melasında *R. glutinis*'in karotenoid üretimini artırmak için iki basamaklı optimizasyon çalışması yapmıştır. İlk basamakta, beş fermentasyon faktörünün (pH, şeker kamışı melası konsantrasyonu, üre, KH_2PO_4 ve NaCl) etkisini değerlendirmiş, sonuç olarak, melas, üre ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarının biyomas ve karotenoid üretimi üzerine önemli etkileri olduğunu bildirmiştir. İkinci basamakta, karotenoid ve biyomas üretimini daha da artırmak amacıyla bu üç faktörün (melas, üre ve KH_2PO_4) optimizasyonunu çalışmıştır. Bu iki basamaklı optimizasyon çalışması ile toplam karotenoid konsantrasyonunun 2,5 kat daha fazla olduğunu bildirmiştir.

Aksu and Eren (2007), *R. glutinis* mayası tarafından karotenoid üretimi üzerine pH, sıcaklık, havalandırma oranı, başlangıç şeker (glukoz, melas sukrozu ve peyniraltı suyu laktozu), amonyum sülfat konsantrasyonu ve aktivatör (pamuk tohumu yağı, Tween 80) ilavesi ile optimizasyon çalışması yaparak toplam karotenoid üretimi için optimum pH ve sıcaklığın sırasıyla 6 ve 30°C, havalandırma oranının 2,4 vvm olduğunu bildirmişlerdir. 2 g/l amonyum sülfat konsantrasyonu maksimum karotenoid üretimini verirken sadece pamuk tohumu yağı ve 5 g/l glukoz içeren fermentasyon ortamında karotenoid konsantrasyonu önemli ölçüde artmıştır. Genelde glukoz ve melas sukrozu konsantrasyonundaki artış maya büyümesini ve toplam karotenoid üretimini artırırken peyniraltı suyu laktozu konsantrasyonundaki artışın aynı etkiyi göstermediği belirlenmiştir. En yüksek karotenoid miktarı karbon kaynağı olarak 20 g/l melas sukrozu kullanımıyla elde edilmiştir.

Libkind and Broock (2006), Arjantin'in Patagonia bölgesi habitatından izole edilen maya izolatlarının biyomas ve karotenoid üretimini araştırmıştır. Öncelikle en iyi karotenoid üreten strainleri seçmiş ve bunlarla optimizasyon çalışması yapmıştır. Patagonia bölgesine ait maya izolatlarının biyomasları ve karotenoid üretim potansiyelleri, besiyerine azot kaynağı olarak üre ve amonyum sülfat, karbon kaynağı

olarak ta şeker kamışı melası, mısır şurubu ve malt ekstrakt eklenerek incelenmiştir. Maksimum pigment üretimi, *Rhodotorula mucilaginosa* ve *Cryptococcus sp.* ile elde edilmiştir. Ayrıca bu türlerde β -karoten, torulen ve torularhodinin ana karotenoid türleri olduğu bildirilmiştir.

Jirasripongpung *et al.* (2007), karakteristik karotenoid pigmenti astaksantin olan *X. dendrorhous* mayasının mutanti ile melaslı besiortamında toplam karotenoid üretimini çalışmıştır. %5 melas içeren besiyerinde iki farklı *X. dendrorhous* mutantını karşılaştırmış ve en iyi karotenoid üretimi gözlenen mutant ile optimum karotenoid üretimini %2 melas konsantrasyonlu 4 g/l potasyumnitrat içeren besiyerinde elde etmiştir.

Weber *et al.* (2007), Basidiomycota üyesi kırmızı renkli mayaların dondurulmuş hücrelerinden karotenoid pigmentlerinin ekstraksiyonu için basit bir yöntem geliştirmiş ve HPLC ile bu pigmentlerin analizlerini yapmıştır. Bu yöntemle Monosiklik (tek halkalı) γ -karotenden 2-hidroksitorularhodine, bisiklik (çift halkalı) β -karotenden astaksantine kadar kırmızı mayaların tipik karotenoidleri ayrılmıştır. Pigment kimlikleri (identifikasyonu) benzer kromatografik şartlar kullanılarak LC-APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) kütleli spektrometri ile belirlenmiştir.

Park *et al.* (2007), Karotenoid pigmentlerinin izolasyonu için maya hücrelerinin kimyasal olarak yıkımı ile ilgili bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada intrasellüler olarak üretilen karotenoidlerin hücre dışına çıkmasını sağlamak için *R. glutinis* hücre duvarını yıkmada beş farklı çözücü kullanılmıştır. Yapılan kromatografik analizler ekstraktta üç farklı karotenoid pigmentinin (β -karoten, torulen ve torularhodin) bulunduğunu göstermiştir. Ekstraksiyon derecesinde test edilen beş çözücünden üçünün (DMSO, aseton ve petrol eteri) ve doymuş NaCl solüsyonunun ana ve interaktif etkilerini istatistiksel olarak araştırmada Box-Behnken deneysel dizaynı kullanılmıştır. Deneysel sonuçların temelinde bu dört değişkene ekstraksiyon ürünü ile ilgili deneysel bir model geliştirilmiş ve bu model, *R. glutinis* karotenoidlerinin ekstraksiyonunda hücre duvarının

bütünlüğünü bozmada ve bu değişkenlerin en etkili kombinasyonunu elde etmede başarılı bir şekilde kullanılabilmektedir.

Malisorn and Suntornsuk (2008), fermente turp salamurasında *R. glutinis* ile β -karoten üretimini artırmak için kültür şartlarının optimizasyonu üzerine bir araştırma yapmıştır. β -karoten üretimi için optimum sıcaklığın 30°C, pH'nın 6 ve çözünmüş oksijen miktarının %80 olduğu saptanmıştır. Bu şartlar altında başlangıç şartlarına göre %15 daha yüksek oranda β -karoten üretimini elde etmiştir.

Valduga *et al.* (2008a), sülfirik ve fosforik asitle ön muamele yapılan şeker kamışı melası ve mısır mazerasyon sıvısını kullanarak *Sporidiobolus salmonicolor* mayası ile karotenoid üretimi üzerine optimizasyon çalışması yapmıştır. En iyi üretimi 10 g/l şeker kamışı melası, 5 g/l mısır mazerasyon sıvısı ve 5 g/l maya hidrolizatı kullanarak 25°C'de, pH 4'te 180 rpm çalkalama hızıyla elde etmiştir.

Valduga *et al.* (2008b), yaptığı başka bir çalışmada tepkili yüzey tekniğini (Response Surface Technique) kullanarak *S. salmonicolor* tarafından karotenoid üretimi üzerine optimizasyon çalışması yapmıştır. Maksimum karotenoid üretimini 40 g/l glukoz, 10 g/l malt ekstrakt ve 14 g/l pepton kullanarak 25°C'de, pH 4'te 180 rpm çalkalama hızı ile elde etmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma ve atık materyaller

Karotenoid üretimi için kullanılan *R. glutinis* izolatları, Erzurum bölgesinden, toprak, meyve ve sebze kabukları, ağaç yaprakları gibi çeşitli numunelerden izole edilmiştir. Mikroorganizmalar, yatık patates dekstroza agar (PDA) üzerinde 4°C’de muhafaza edilmiş ve birer aylık aralıklarla taze ortamlara aktarılmıştır. Melas, Erzurum Şeker Fabrikası’ndan temin edilmiştir. KBP’nin elde edilmesi için gerekli olan koçboynuzları Erzurum’da bulunan bir kombinadan temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir. Mikroorganizmaların üretilmesi için Patates Dekstroza Agar (PDA, Fluka) kullanılmıştır. Besiyeri için potasyum ve fosfor kaynağı olarak Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4 , Fluka), Magnezyum ve kükürt kaynağı olarak Magnezyum Sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fluka) kullanılmıştır. Farklı organik azot kaynaklarının etkilerinin araştırılması için Bakto Pepton (Oxoid), Balık Peptonu (Fluka), Tripton (Oxoid), Kazein Pepton (Oxoid), Proteoz Pepton (Oxoid) ve Maya Ekstraktı (Difco) kullanılmıştır. Farklı karbon kaynaklarının etkilerinin araştırılması için glukoz (Merck), fruktoz (Fluka) ve sukroz (Fluka) kullanılmıştır. Melas ön muamelesi ve hidroliz işlemi için H_2SO_4 (Riedel-de Haën), Potasyum Ferrosiyanid (Merck), Etilendiamintetraasetikasit (EDTA, Merck) ve HCl (Riedel-de Haën) kullanılmıştır. Karotenoid ekstraksiyonu için Dimetilsülfoksit (DMSO, Merck), Aseton (Merck), Petrol eteri (Sigma-Aldrich) ve doymuş NaCl (Fluka) çözeltisi kullanılmıştır. KBP’nin

eldesinde kullanılan kimyasallar Oxoid (Hampshire, UK) ve Difco (MI, USA) firmalarından satın alınmıştır.

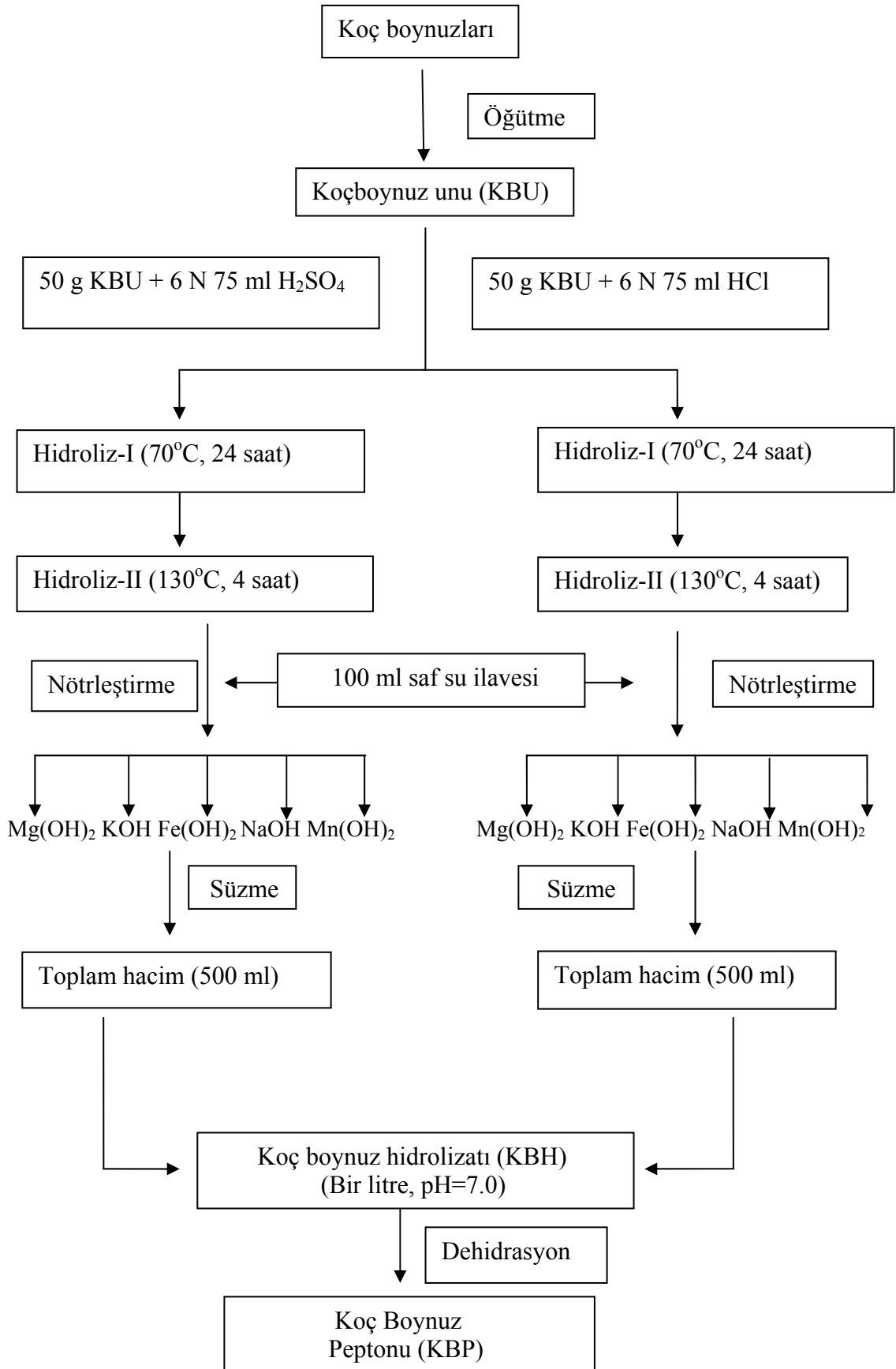
3.2. Yöntem

3.2.1. *Rhodotorula glutinis* suşlarının izolasyonu ve identifikasyonu

Karotenoid üretimi için kullanılan *R. glutinis* izolatları, Erzurum bölgesinden toprak, meyve ve sebze kabukları, ağaç yaprakları gibi çeşitli numunelerden izole edilmiştir. İzolasyon işlemleri standart tekniklere göre dilüsyon işlemleri ile yapılmıştır (Nakayama 1981). Suşlar VITEK 2 compact cihazı kullanılarak identifiye edilmiştir. İdentifikasyon işlemlerinde 24 saatlik kültür kullanılmıştır. Organizmalar yatık patates dekstroz agar (PDA) üzerinde 4°C’de muhafaza edilmiş ve birer aylık aralıklarla taze ortamlara aktarılmıştır.

3.2.2. KBP’nin üretilmesi

Boynuz materyalleri önce musluk suyu ile daha sonra deiyonize su ile yıkanıp kurutulmuş, kuruyan boynuzlardan belirli miktarlarda alınarak Kurbanoglu and Kurbanoglu (2004) tarafından tarif edilen metoda göre KBP üretimi yeniden gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Koç boynuzlarının hidrolizi ile pepton üretimi

3.2.3. Melasın toplam şeker tayininin yapılması

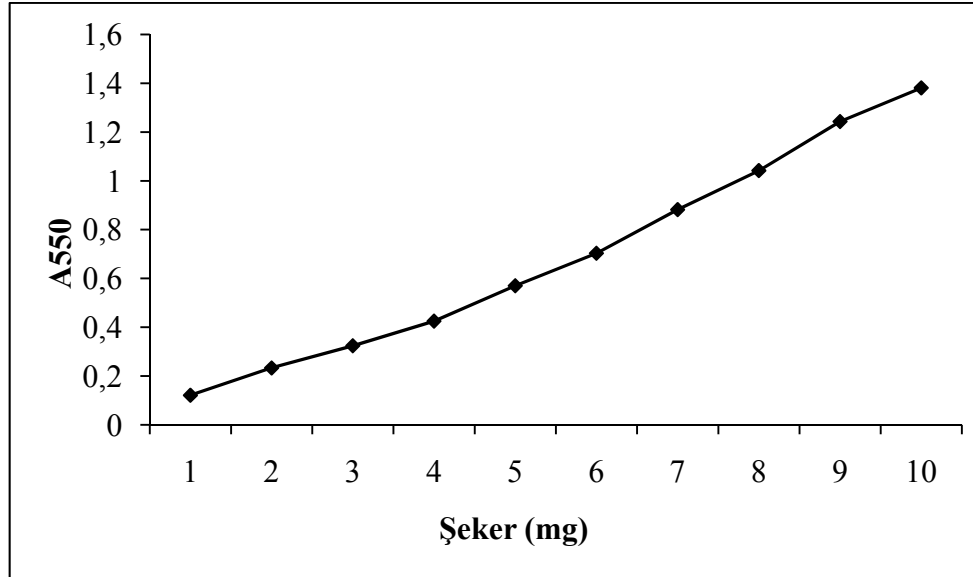
Toplam şeker tayini dinitro-salisilik asit (DNSA) metoduna göre yapılmıştır. Metot, melas hidrolizat örneğindeki şeker miktarına bağlı olarak oluşan kahverengi rengin spektrofotometrede 550 nm’de okunması esasına dayanmaktadır (Miller 1959; Bhosale 2001).

Şeker tayini için kullanılacak olan DNSA çözeltisi; 1 gram DNSA, 20 ml 2 N NaOH ve 50 ml saf su içinde iyice çözüldükten sonra 30 gram Rochelle tuzu (potasyum sodyum tartarat tetrahidrat) eklenerek, son hacim saf su ile 100 ml’ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Kona *et al.* 2001).

Şeker tayini için önce bir standart grafik hazırlanmıştır. Standart grafik hazırlamak için 10 tüp ve kör olarak kullanılmak üzere 1 tüp hazırlanmıştır. 100 mg glukoz 100 ml saf su içinde çözülerek glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. Tüplere sırasıyla bu çözeltiden 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml ve 10 ml konmuştur (yani 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg ve 10 mg glukoz konmuş olmaktadır). Daha sonra her tüpe 2 ml DNSA eklenmiş ve son hacim saf suyla 15 ml’ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan tüpler vortekste karıştırılarak kaynar su banyosunda 90°C’de 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüpler kaynar su banyosundan çıkarılarak soğutulmuştur. Oluşan kahverengi rengin absorbansı spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda köre karşı üç tekrar şeklinde okunmuş, elde edilen absorbansların ortalamaları kullanılarak şeker tayini için bir standart grafik hazırlanmıştır. Hazırlanan standart grafik Şekil 3.2’de verilmiştir.

Hazırlanan %1’lik melas solüsyonunun pH’sı 10 N HCl ile 2’ye ayarlanarak sukroz hidrolizi için 40 dk kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Hidroliz işleminden sonra oda sıcaklığına getirilen solüsyonun pH’sı 10 N NaOH ile 6’ya ayarlanmıştır. Solüsyon 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra oluşan çökelti santrifüjle uzaklaştırılmıştır (Bhosale 2001). Şeker tayini için elde edilen süpernatanttan 0,1 ml bir tüp içine alınarak

üzerine 2 ml DNSA çözeltisi ilave edilmiş ve son hacim saf su ile 15 ml'ye tamamlanmıştır. Kör olarak ise bir tüp içine 2 ml DNSA çözeltisi konup üzeri 15 ml'ye tamamlanmıştır. Çalkalanan tüpler kaynar su banyosunda 90°C'de 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüpler kaynar su banyosundan çıkarılarak soğutulmuş ve oluşan kahverengi rengin absorbansı, spektrofotometrede köre karşı 550 nm'de üç tekrar şeklinde okunmuş ve daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanılarak şeker miktarı belirlenmiştir.



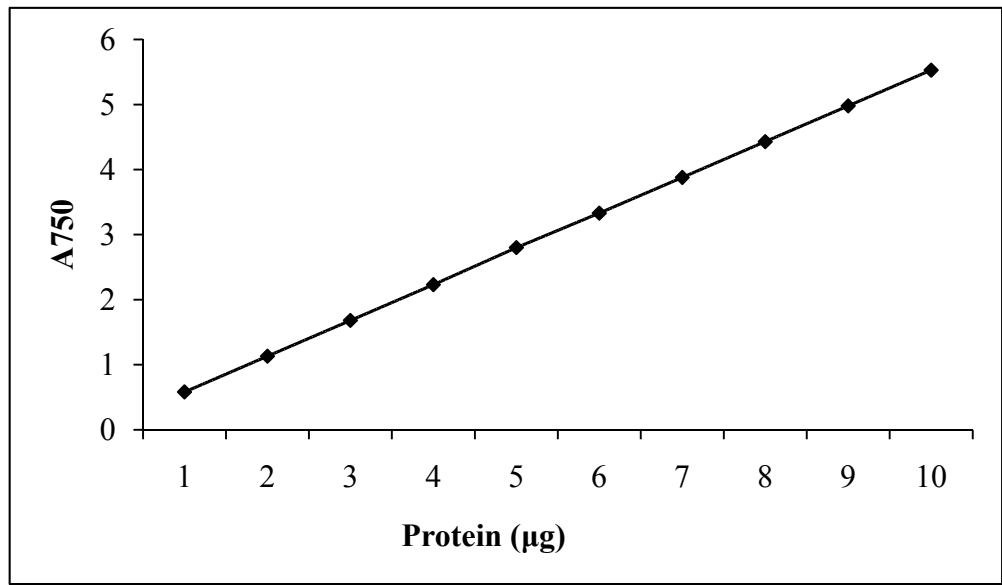
Şekil 3.2. Şeker tayini için kullanılan standart grafik

3.2.4. Melasın protein tayininin yapılması

Protein miktarının tayini, Lowry metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntem, alkali ortamda bir bakır-protein kompleksi oluşması ve kompleksin fosfomolibdat-fosfowolframat (Folin Ciocalteu fenol) reaktifini indirgeyerek yoğun bir mavi yeşil renk oluşturması esasına dayanmaktadır (Lowry *et al.* 1951).

Protein tayini için 0,5 ml %1'lik melas solüsyonu, 5 ml alkali bakır reaktifine (Alkali bakır reaktifi; %0,5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve %1 sodyum potasyum tartaratın 1 ml'si, %2

sodyum karbonat ihtiva eden 50 ml, 0,1 M NaOH içine katılarak hazırlanır) katılarak çözelti 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 0,5 ml Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (1:1 oranında saf su ile seyreltilmiş) hızlıca eklenerek karıştırılmıştır. Bu çözelti 30 dk inkübe edilerek absorbansı 750 nm’de ölçülmüştür. Serum albumin kullanılarak hazırlanan standart grafik Şekil 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.3. Protein tayini için kullanılan standart grafik

3.2.5. Melas ön muamelesi

Melasın endüstriyel fermentasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır, ancak kompleks bir substrat olduğundan kükürtdioksit, hidroksimetil furfurol, potasyum imidodisulfonat, fenoller ve bazı uçucu bileşikler gibi toksik maddeler de içerir (Burrows 1970). Bu toksik maddelerle birlikte melasın içerdiği demir, çinko, bakır, mangan, magnezyum ve kalsiyum gibi ağır metaller, fermentasyon esnasında mikroorganizmanın üremesini inhibe etme, substrat pH’sını etkileme ve ürün biyosentezi ile ilgili enzimleri inaktive etme gibi önemli problemlere yol açar (Roukas 1998).

Melasa fermentasyondan önce uygulanan ön muamele işlemleri ile yukarıda belirtilen toksik maddelerin bir kısmının ayrılması veya inaktif hale getirilmesi sağlanırken maillard reaksiyonu (indirgen şekerlerle azotlu bileşikler arasında meydana gelen reaksiyon) sonucunda meydana gelen kolloidal haldeki koyu renkli çözünür bileşikler de uzaklaştırılarak melasın rengi açılır. Ayrıca süspanse halde bulunan bazı katılar, Ca tuzları gibi bazı mineral tuzlar, SO₂ ve uçucu organik bileşikler de melastan ayrılmış olur (Göksungur 1998).

Çalışmamızda melasa ön muamele işlemlerinden sülfirik asit, potasyum ferrosiyenid ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) muamele işlemleri uygulanmış, bu muamelelerin biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır.

3.2.5.1. Sülfirik asit (H₂SO₄) muamelesi

%3'lük melas solüsyonunun pH'sı 1 N H₂SO₄ ile 3'e ayarlanarak solüsyon 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda solüsyon 3000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant pH'sı 10 N NaOH ile pH 5,5'e ayarlanarak 121°C'de 15 dk steril edilmiştir (Roukas 1998; Valduga *et al.* 2008a).

3.2.5.2. Potasyum ferrosiyenid ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) muamelesi

%3'lük melas solüsyonunun pH'sı 5N HCl ile 5,5'e ayarlanarak solüsyon 100 °C'de 15 dk bekletilmiş, solüsyona henüz sıcakken 100 ppm potasyum ferrosiyenid veya etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ilave edilmiştir. Solüsyonlar 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve süpernatantlar 121°C'de 15 dk steril edilmiştir (Roukas 1998).

3.2.5.3. Melasın hidroliz edilmesi

Sülfirik asit (H_2SO_4) ile muamele edilen melas solüsyonunun pH'sı 10 N HCl ile 2'ye ayarlanarak sukroz hidrolizi için 40 dk kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Hidroliz işleminden sonra oda sıcaklığına getirilen solüsyonun pH'sı 10 N NaOH ile 7,0'a ayarlanarak 121°C'de 15 dk steril edilmiştir (Bhosale 2001). Hazırlanan bu solüsyon, daha sonraki çalışmalarda diğer besin kaynaklarının da eklenmesiyle üretim besiyeri olarak kullanılmıştır.

3.2.6. Kullanılan besiyerleri

İnokülüm ortamı: (g/l) 25 glukoz, 3 yeast ekstrakt, 0,5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 KH_2PO_4 . Sterilizasyondan önce besiyerinin pH'sı 1N NaOH ile 5,5'e ayarlanmıştır. Bu ortamdan üretim besiyerlerine %1 oranında inokülasyon yapılmıştır.

Karotenoid üretim ortamı: (g/l) 0,5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 KH_2PO_4 , değişik konsantrasyonlarda melas (%1-5) ve KBP (1-7). Besiyerlerinin pH'sı sterilizasyondan önce değişik pH parametrelerine (4,5-7,5) ayarlanmıştır. Besiyerleri değişik sıcaklıklarda (20-35°C) ve değişik çalkalama hızlarında (100-300 rpm) inkübasyona bırakılmıştır.

Standart peptonlarla hazırlanan besiyeri (g/l): 5 çeşitli peptonlar, 0,5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 KH_2PO_4 ve %3 melas.

Standart karbon kaynakları ile hazırlanan besiyeri (g/l): 13,6 glukoz, sukroz, fruktoz, 5 KBP, 0,5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 KH_2PO_4 .

3.2.7. İnokülüm hazırlanması

R. glutinis stok kültürden PDA (patates dekstrozu agar) üzerine ekim yapılmış ve 48 saat 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizma platin öze ile alınarak içerisinde 100 ml inokülüm ortamı bulunan erlenmayere aktarılmıştır. Bu kültür, 30°C’de 200 rpm fermentasyon şartlarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, kültürün 1 ml’si toplam karotenoid üretimi için inokülüm olarak kullanılmıştır.

3.2.8. Karotenoid üretimi ve biyomas miktarının ölçümü

Karotenoid üretimi için 250 ml erlenmayerlerde 100 ml çalışma hacmi kullanılmıştır. Karotenoid üretim ortamı hazırlandıktan ve 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak uygun pH ayarlaması yapıldıktan sonra otoklavda steril edilmiştir (121°C’de 15 dk). Bu ortamlar oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulduktan sonra inokülasyon yapılmış ve sonra çalışılan parametrelere uygun olarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kültür ortamından 10 ml alınarak toplam karotenoid miktarı belirlenmiştir. Aynı ortamdan 50 ml alınarak 5000 rpm’de 15 dk süre ile santrifüj edilmiş, elde edilen pelet kısmı iki kez saf su ile yıkandıktan sonra sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Kurutulmuş biyomas g/l olarak verilmiştir.

3.2.9. Toplam karotenoid tayininin yapılması

İnkübasyondan sonra fermentasyon ortamından alınarak 4°C ve 5000 rpm’de 15 dk santrifüj edilen maya peleti iki kez saf su ile yıkandıktan sonra pelet üzerine 3 ml DMSO (dimetilsülfoksit) ilave edilmiş ve ekstraksiyon etkisini artırmak için süspansiyon 50°C’de 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda solüsyon santrifüjlenerek pigment içeren süpernatant pipetle alınmıştır. Daha sonra pelet üzerine 3 ml aseton ilave edilerek iyice vortekslenmiştir. Bu solüsyon, maya peleti tamamen renksizleşinceye

kadar santrifüjlenmiş ve renkli fazlar birleştirilmiştir (pelette hala pigment bulunması durumunda DMSO veya aseton muamelesi tekrarlanmıştır). Birleştirilen renkli fazlar eşit hacimde su ve petrol eteri bulunan ekstraksiyon hunisine aktarılmış, karotenoidler yavaş çalkalama ile petrol eterinde alttaki fazda hiçbir pigmentasyon görünmeyinceye kadar ekstrakte edilmiştir. Ayrıca gerekli görüldüğünde faz ayrımı için birkaç ml doygun NaCl (%20'lik) solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra petrol eteri fazı alınarak spektrofotometrede 448 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (Martin *et al.* 1993; Weber *et al.* 2007).

R. glutinis'ten ekstrakte edilen karotenoidlerin konsantrasyonu aşağıdaki formül ile belirlenmiştir.

$$\text{Toplam karotenoid } (\mu\text{g/ml}) = A_{448} \cdot D \cdot V / E^{1\%}_{1\text{ cm}}$$

A₄₄₈: 448 nm'deki absorbans değeri

D: Dilüsyon oranı

V: Petrol eteri hacmi

E^{1%}_{1 cm}: Toplam karotenoid için spesifik absorpsiyon katsayısı (2,592)

Açıklama: Kullanılacak absorbans değeri ve spesifik absorpsiyon katsayısı, miktarı belirlenmek istenen karotenoid türüne göre değişmektedir. *R. glutinis* mayasında torulen, torularhodin ve β-karoten karotenoidleri dominant olarak bulunur. Bu karotenoidlerin miktarı, strainlere ve kültür şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterir (Peterson *et al.* 1954, 1958; Simpson *et al.* 1964). Bu yüzden toplam karotenoid miktarı belirlenirken formülde β-karoten için verilen absorbans değeri ve spesifik absorpsiyon katsayısı kullanılmıştır (Davies 1976).

3.2.10. Farklı konsantrasyonlardaki melasın biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Melasın farklı konsantrasyonlarının *R. glutinis* YU-14 tarafından biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkilerini belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda (%1-5) melas içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin pH'sı 5,5'e ayarlanarak, inokülüm ortamından 1'er ml ekim yapılmıştır. Kültür, 30°C'de ve 200 rpm çalkalama hızında 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda biyomas ve toplam karotenoid miktarları ölçülmüştür.

3.2.11. Melasın ön muamele ve hidroliz işlemlerinin biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Melasa uygulanan ön muamele işlemleri ile karotenoid biyosentezinde görevli enzimlerin aktivitesini ve mikroorganizmanın üremesini inhibe edebilecek toksik maddelerin bir kısmının ayrılması veya inaktif hale getirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle %3'lük melas solüsyonu, sülfirik asit (H_2SO_4), potasyum ferrosiyamid ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile muamele edilerek besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin pH'sı 5,5'e ayarlanarak inokülüm ortamından 1'er ml ekim yapılmıştır. Kültür, 30°C'de ve 200 rpm çalkalama hızında 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda biyomas ve toplam karotenoid miktarları ölçülmüştür.

H_2SO_4 ile muamele edilen melas solüsyonu 3.2.5.3'teki gibi hidroliz edilerek besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin pH'sı 5,5'e ayarlanarak inokülüm ortamından 1'er ml ekim yapılmıştır. Kültür, 30°C'de ve 200 rpm çalkalama hızında 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda biyomas ve toplam karotenoid miktarları ölçülmüştür.

3.2.12. Farklı konsantrasyonlardaki KBP'nin biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi

İzole edilen *R. glutinis* YU-14 suşunun, en yüksek miktarda karotenoid üretebilmesi için gereken KBP'nin konsantrasyonunu belirlemek üzere besiyerine farklı konsantrasyonlarda (%0,1–0,7) KBP eklenmiştir. Kültür, 30°C'de 200 rpm'de pH 5,5'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

3.3. KBP'nin ve Farklı Organik Azot Kaynaklarının Karotenoid Üretimi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

R. glutinis YU-14 tarafından gerçekleştirilen toplam karotenoid üretiminin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra kültür ortamına %0,5 konsantrasyonunda KBP, bakto pepton, balık peptonu, tripton, kazein pepton, proteoz pepton ve maya ekstraktı ilave edilerek KBP ve diğer organik azot kaynaklarının biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır.

3.4. Melasın ve Farklı Karbon Kaynaklarının Karotenoid Üretimi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

R. glutinis YU-14 tarafından gerçekleştirilen toplam karotenoid üretiminin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra kültür ortamına %1,36 konsantrasyonunda glukoz, fruktoz ve sukroz ilave edilerek melas ve diğer karbon kaynaklarının biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır.

3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Duncan çoklu karşılaştırmalı testi uygulanarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Melasın Toplam Şeker ve Protein Miktarı

Melasın toplam şeker ve protein miktarları sırasıyla 454 g/l ve 75,4 g/l olarak tespit edilmiştir.

4.2. Standart Besiyerinde *R. glutinis* İzolatlarının Biyomas ve Karotenoid Miktarları İle İlgili Sonuçlar

Standart besiyeri kullanılarak *R. glutinis* izolatlarının toplam karotenoid miktarları Çizelge 4.1’de verilmiştir. En düşük karotenoid miktarı (1,65 mg/l) *R. glutinis* YU-16 izolatı kullanılarak elde edilmiştir. En yüksek karotenoid miktarı ise (3,61 mg/l) *R. glutinis* YU-14 izolatından elde edildiğinden dolayı bu izolat sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.1. Standart besiyeri kullanılarak üretilen *R. glutinis* izolatlarının toplam karotenoid ve biyomas miktarları

İzolatlar	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
YU- 1	7,3 ^b	1,85 ^{ab}
YU- 2	8,3 ^{de}	3,04 ^{ef}
YU- 3	8,5 ^{ef}	3,17 ^{fg}
YU- 4	8,8 ^{fg}	3,10 ^{ef}
YU- 5	6,5 ^a	1,77 ^{ab}
YU- 6	9,1 ^{gh}	3,27 ^{fg}
YU- 7	8,6 ^{ef}	3,08 ^{ef}

(devam)

İzolatlar	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
YU- 8	8,4 ^{de}	2,81 ^{de}
YU- 9	7,7 ^{bc}	2,11 ^c
YU-10	8,0 ^{cd}	2,51 ^d
YU-11	9,0 ^{gh}	3,01 ^{ef}
YU-12	9,4 ^h	3,44 ^{gh}
YU-13	8,4 ^{de}	2,85 ^e
YU-14	9,2^{gh}	3,61^h
YU-15	7,3 ^b	1,96 ^{bc}
YU-16	6,6 ^a	1,65 ^a

*Besiyeri içeriği (g/l): 25 glukoz, 3 yeast ekstrakt, 0,5 MgSO₄7H₂O, 8 KH₂PO₄

Fermentasyon şartları: Sıcaklık 30°C, süre 5 gün, pH 5,5, çalkalama hızı 200 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).

4.3. Melasın *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

Melasın farklı konsantrasyonlarının (%1-5) *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

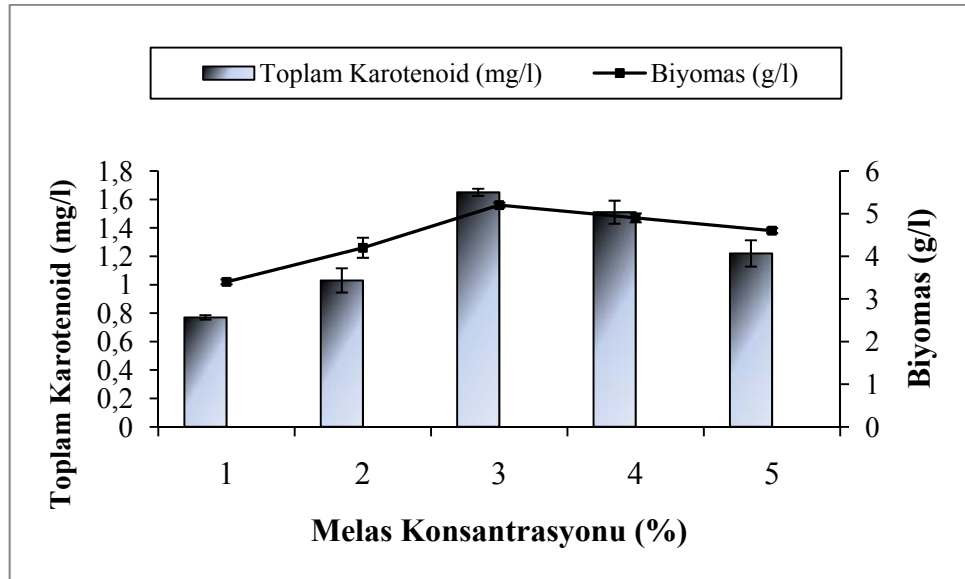
Çizelge 4.2. Melasın farklı konsantrasyonlarının *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri

Melas konsantrasyonu (%)	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
1	3,4 ^a	0,77 ^a
2	4,2 ^b	1,03 ^b
3	5,2^d	1,65^c
4	4,9 ^{cd}	1,51 ^c
5	4,6 ^{bc}	1,22 ^b

*Besiyeri içeriği (g/l): %1-5 melas, 0,5 MgSO₄7H₂O, 8 KH₂PO₄

Fermentasyon şartları: Sıcaklık 30°C, süre 5 gün, pH 5,5, çalkalama hızı 200 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.1. Melasın farklı konsantrasyonlarının *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1'deki sonuçlardan görüldüğü gibi, en yüksek karotenoid ve biyomas üretimi sırasıyla 1,65 mg/l ve 5,2 g/l olarak %3'lük melas kullanımıyla, en düşük karotenoid ve biyomas üretimi sırasıyla 0,77 mg/l ve 3,4 g/l olarak %1'lik melas kullanımıyla elde edilmiştir. Diğer taraftan, %3'lük konsantrasyondan sonra karotenoid ve biyomas üretiminde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, %3'lük

melas konsantrasyonunun karotenoid üretimi için en uygun konsantrasyon olduğu kabul edilmiştir ve daha sonraki optimizasyon çalışmalarında bu konsantrasyon kullanılmıştır.

4.4. Melasın Ön Muamele ve Hidroliz İşlemlerinin *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

Melas ön muamele işlemlerinin *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

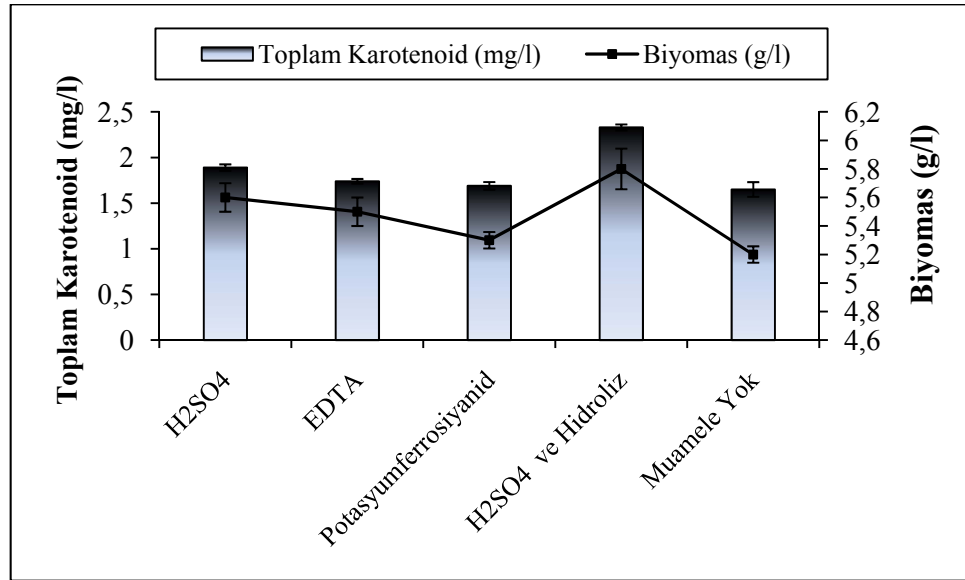
H₂SO₄ muamelesi uygulanan melas solüsyonu hidroliz edilmiş ve bu işlemin *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Melas ön muamele işlemlerinin *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri

Muamele türü	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
H ₂ SO ₄	5,6 ^{bc}	1,89 ^b
EDTA	5,5 ^{abc}	1,74 ^a
Potasyumferrosiyanid	5,3 ^{ab}	1,69 ^a
H ₂ SO ₄ ve Hidroliz	5,8 ^c	2,33 ^c
Muamele yok	5,2 ^a	1,65 ^a

*Fermentasyon şartları: Sıcaklık 30°C, süre 5 gün, pH 5,5, çalkalama hızı 200 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.2. Melas ön muamele işlemlerinin *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2'deki sonuçlardan görüldüğü gibi, %3'lük melasa uygulanan ön muamele işlemlerinden en yüksek karotenoid ve biyomas üretimi, sırasıyla 1,89 mg/l ve 5,6 g/l olarak H₂SO₄ muamelesiyle en düşük karotenoid ve biyomas üretimi, sırasıyla 1,69 mg/l ve 5,3 g/l olarak potasyumferrosiyenid muamelesiyle elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu sonuçlara göre melas, H₂SO₄ ile muamele edilerek hidroliz işlemine tabi tutulmuş ve karotenoid üretiminde önemli ölçüde bir artış görülmüştür (2,33 mg/l). Dolayısıyla, melasa uygulanan H₂SO₄ ve hidroliz muamelesinin karotenoid üretimi için en uygun işlem olduğu kabul edilmiş ve daha sonraki optimizasyon çalışmalarında melas, H₂SO₄ ve hidroliz muamelesine tabi tutularak kullanılmıştır.

4.5. Melas İçerikli Besiyeri Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun KBP Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

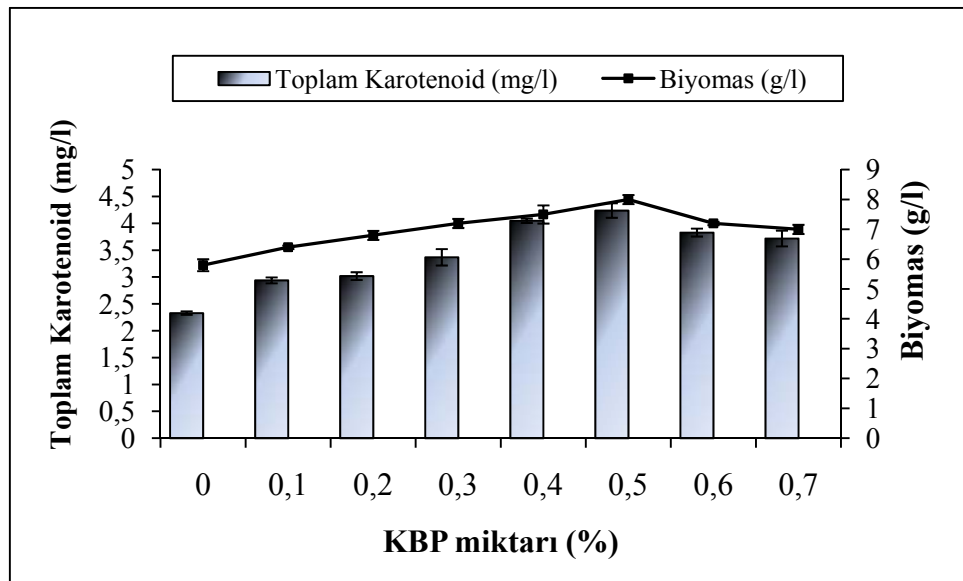
KBP'nin farklı konsantrasyonlarının (%0,1-0,7) *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. KBP konsantrasyonunun *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve karotenoid üretimi üzerine etkileri

KBP miktarı (%)	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
0	5,8 ^a	2,33 ^a
0,1	6,4 ^b	2,94 ^b
0,2	6,8 ^{bc}	3,02 ^b
0,3	7,2 ^{cd}	3,37 ^c
0,4	7,5 ^d	4,05 ^{ef}
0,5	8,0^e	4,24^f
0,6	7,2 ^{cd}	3,83 ^{de}
0,7	7,0 ^c	3,72 ^d

*Fermentasyon şartları: Sıcaklık 30°C, süre 5 gün, pH 5,5, çalkalama hızı 200 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.3. KBP'nin farklı konsantrasyonlarının *R. glutinis* YU-14'ün biyomas ve toplam karotenoid üretimi üzerine etkileri

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3'teki sonuçlardan görüldüğü gibi, en yüksek karotenoid ve biyomas üretimi, sırasıyla 4,24 mg/l ve 8,0 g/l olarak %0,5'lik KBP kullanımıyla en düşük karotenoid ve biyomas üretimi, sırasıyla 2,94 mg/l ve 6,4 g/l olarak % 0,1'lik KBP kullanımıyla elde edilmiştir. %0,5'lik KBP konsantrasyonundan sonra karotenoid ve biyomas üretiminde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, % 0,5'lik KBP konsantrasyonunun karotenoid üretimi için en uygun pepton konsantrasyonu olduğu kabul edilmiştir ve daha sonraki optimizasyon çalışmalarında bu konsantrasyon kullanılmıştır.

4.6. Optimum Karotenoid Üretim Besiyeri (OKÜB) Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

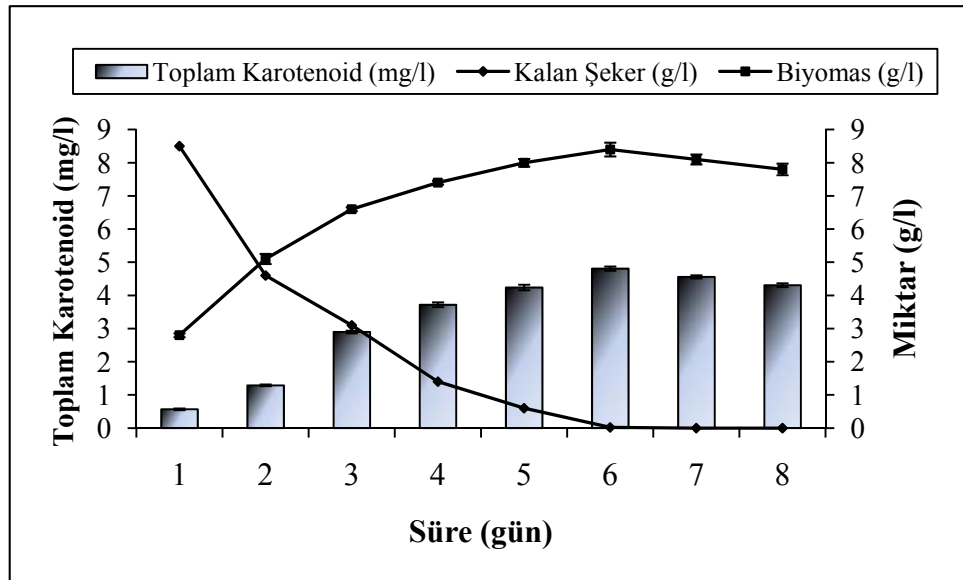
Bu araştırmada OKÜB'nin kimyasal içeriği (g/l): 5 KBP, 8 KH_2PO_4 , 0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve %3 melas olarak belirlenmiştir. OKÜB'nin pH'sı 5,5'e ayarlanmış ve inokülüm ortamından 1 ml ekim yapılarak 30°C'de 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat aralıklarla biyomas, toplam karotenid ve arta kalan şeker miktarları ölçülmüş ve Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. OKÜB'nin zamana bağlı olarak *R. glutinis* YU-14 tarafından biyomas ve karotenoid üretimi ve arta kalan şeker miktarı

Süre (gün)	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)	Kalan Şeker (g/l)
1	2,8 ^a	0,57 ^a	8,5 ^f
2	5,1 ^b	1,29 ^b	4,6 ^e
3	6,6 ^c	2,90 ^c	3,1 ^d
4	7,4 ^d	3,72 ^d	1,4 ^c
5	8,0 ^{ef}	4,24 ^e	0,6 ^b
6	8,4^f	4,81^g	0,02^a
7	8,1 ^{ef}	4,56 ^{fg}	0,0 ^a
8	7,8 ^{de}	4,31 ^{ef}	0,0 ^a

*Fermentasyon şartları: Sıcaklık 30°C, pH 5,5, çalkalama hızı 200 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.4. OKÜB'nin zamana bağlı olarak *R. glutinis* YU-14 tarafından biyomas ve karotenoid üretimi ve arta kalan şeker miktarı

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'e göre *R. glutinis* YU-14 tarafından en yüksek karotenoid ve biyomas üretimi, sırasıyla 4,81 mg/l ve 8,4 g/l olarak 6. günün sonunda elde edilmiştir. Mayada karotenoid toplanmasında 2. günden sonra hızlı bir artış olduğu görülmektedir. 6. günden sonra ise biyomas ve karotenoid üretiminde sürekli bir düşüş gözlenmiştir. Bu nedenle mevcut sonuçlara göre 6 gün en uygun inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir.

4.7. OKÜB Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Ortam pH'sının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

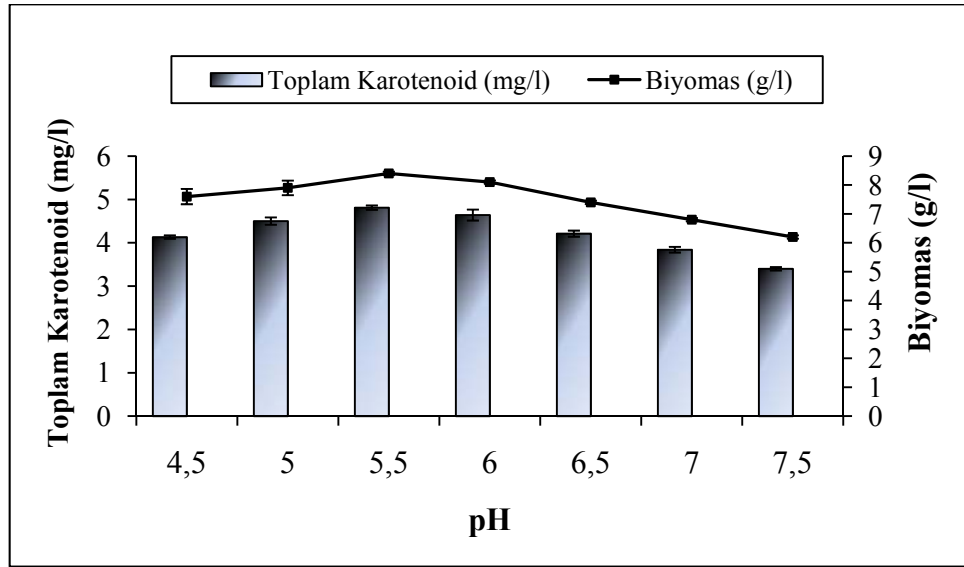
OKÜB'nin *R. glutinis* YU-14 tarafından karotenoid ve biyomas üretimi için en uygun ortam pH'sının belirlenmesi amacıyla hazırlanan farklı pH'lardaki (4,5–7,5) OKÜB'de *R. glutinis* YU-14 üretilmiş 6 gün sonra biyomas ve toplam karotenoid miktarları ölçülerek Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir

Çizelge 4.6. *R. glutinis* YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı pH'ların etkileri

pH	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
4,5	7,6 ^{cd}	4,13 ^c
5,0	7,9 ^{de}	4,50 ^d
5,5	8,4^f	4,81^e
6,0	8,1 ^{ef}	4,64 ^{de}
6,5	7,4 ^c	4,21 ^c
7,0	6,8 ^b	3,84 ^b
7,5	6,2 ^a	3,40 ^a

*Fermentasyon şartları: Sıcaklık 30°C, süre 6 gün, çalkalama hızı 200 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.5. *R. glutinis* YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı pH'ların etkileri

Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5'e göre pH 5,5'te maksimum biyomas (8,4 g/l) ve karotenoid (4,81 mg/l) üretiminin elde edildiği görülmektedir. pH 5,5'ten daha düşük ve daha yüksek pH' larda biyomas ve karotenoid üretiminde düşüş gözlenmektedir. Dolayısıyla bundan sonraki çalışmalarda da kültür ortamının pH değeri 5,5 olarak kullanılmıştır.

4.8. OKÜB Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Çalkalama Hızının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

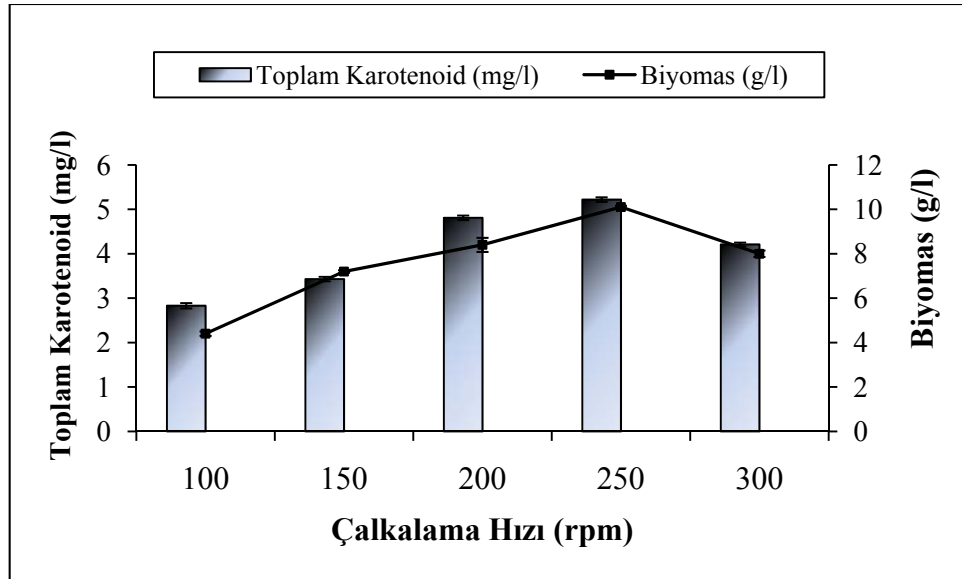
OKÜB'nin *R. glutinis* YU-14 tarafından toplam karotenoid ve biyomas üretimi için en uygun çalkalama hızının belirlenmesi amacıyla hazırlanan OKÜB'lerin pH'sı 5,5'e ayarlanmış ve kültürler farklı çalkalama hızlarında (100, 150, 200, 250, 300 rpm) 30°C'de inkübasyona bırakılmış ve 6 gün sonunda biyomas ve karotenoid miktarları ölçülerek, ölçüm sonuçları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. *R. glutinis* YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkileri

Çalkalama Hızı (rpm)	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
100	4,4 ^a	2,83 ^a
150	7,2 ^b	3,43 ^b
200	8,4 ^c	4,81 ^d
250	10,1^d	5,22^e
300	8,0 ^c	4,21 ^c

*Fermentasyon şartları: Sıcaklık 30°C, süre 6 gün, pH 5,5

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($p < 0,05$).



Şekil 4.6. *R. glutinis* YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı çalkalama hızlarının etkileri

Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6'ya göre *R. glutinis* YU-14 tarafından maksimum biyomas ve karotenoid üretiminin 250 rpm çalkalama hızında elde edildiği görülmektedir. Çalkalama hızı 100 rpm iken 2,83 mg/l olan karotenoid miktarı, çalkalama hızının artışına paralel olarak 250 rpm'de 5,22 mg/l değeri ile en yüksek oranda elde edilmiştir.

Aynı şekilde 100 rpm’de biyomas miktarı 4,4 g/l iken 250 rpm’de 10,1 g/l olarak en yüksek oranda elde edilmiştir. 300 rpm çalkalama hızında ise karotenoid ve biyomas üretiminde önemli ölçüde bir düşüş gözlenmiştir. Dolayısıyla bundan sonraki çalışmalar için optimum çalkalama hızı 250 rpm olarak seçilmiştir.

4.9. OKÜB Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Ortam Sıcaklığının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

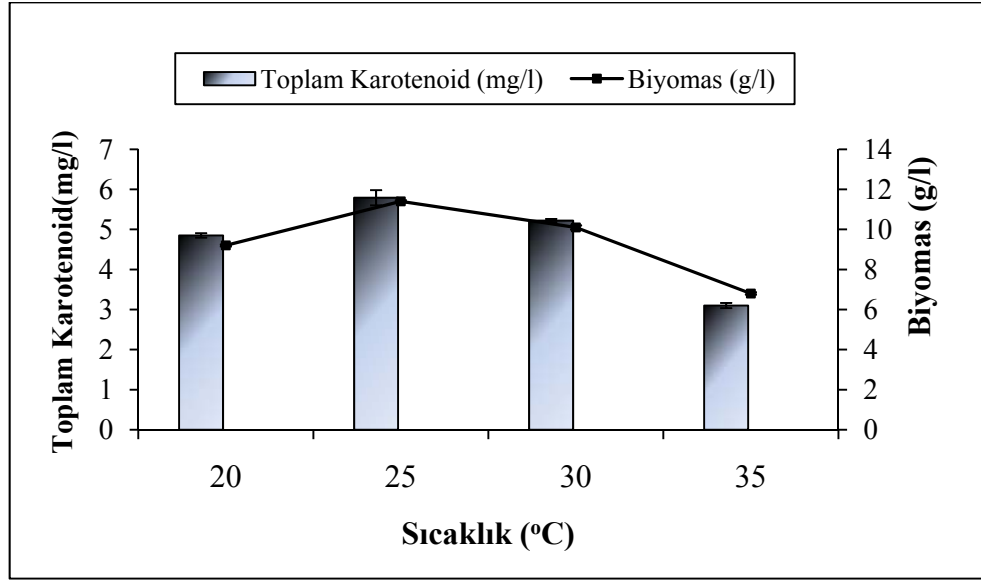
OKÜB’nin *R. glutinis* YU-14 tarafından toplam karotenoid ve biyomas üretimi için en uygun ortam sıcaklığının belirlenmesi amacıyla hazırlanan OKÜB’ler farklı sıcaklıklarda (20, 25, 30, 35°C) ve 250 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmış ve 6 gün sonunda biyomas ve karotenoid miktarları ölçülerek Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. *R. glutinis* YU-14’ün OKÜB’de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkileri

Sıcaklık (°C)	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
20	9,2 ^b	4,85 ^b
25	11,4^d	5,79^d
30	10,1 ^c	5,22 ^c
35	6,8 ^a	3,10 ^a

*Fermentasyon şartları: Süre 6 gün, pH 5,5, çalkalama hızı 250 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.7. *R. glutinis* YU-14'ün OKÜB'de biyomas ve karotenoid üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkileri

Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7'den elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *R. glutinis* YU-14 tarafından maksimum biyomas ve karotenoid üretiminin (sırasıyla 11,4 g/l, 5,79 mg/l) 25°C sıcaklıkta elde edildiği görülmektedir. 25°C'nin altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda üretimde önemli bir düşüş gözlenmiştir.

Sonuç olarak; OKÜB'nin *R. glutinis* YU-14 tarafından karotenoid üretimi için optimum fermentasyon şartları; pH 5,5; çalkalama hızı 250 rpm, sıcaklık 25°C ve fermentasyon süresi 6 gün olarak belirlenmiştir.

4.10. Optimum Fermentasyon Şartları Altında *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkilerinin Karşılaştırılmasına İlişkin Araştırma Sonuçları

R. glutinis YU-14 tarafından gerçekleştirilen toplam karotenoid üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkileri şimdiye kadar belirlenmiş olan optimum fermentasyon

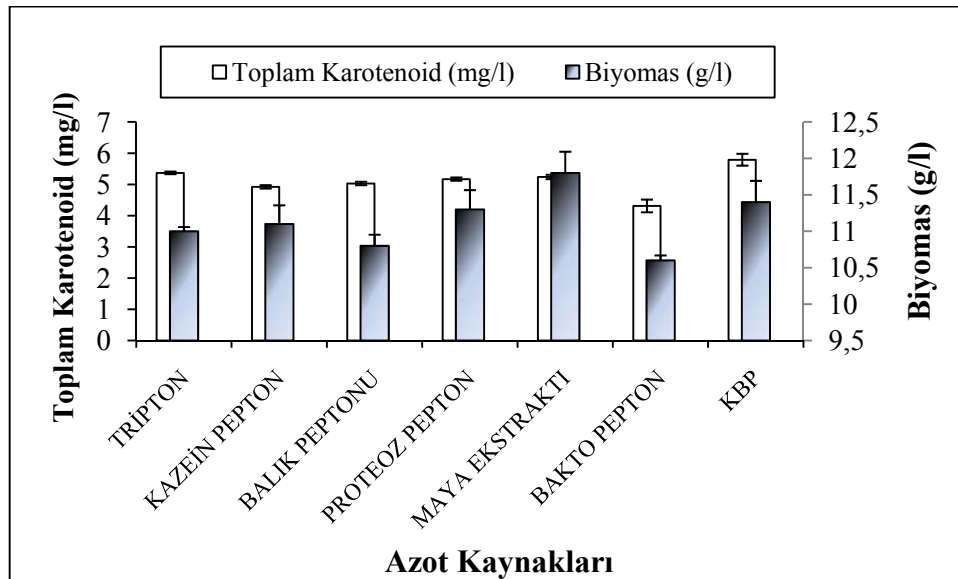
şartları altında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı azot kaynaklarının *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması

Azot Kaynağı	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
Trypton	11,0 ^{bc}	5,37 ^d
Kazein pepton	11,1 ^{bc}	4,92 ^b
Balık peptonu	10,8 ^{ab}	5,03 ^{bc}
Proteoz pepton	11,3 ^c	5,17 ^{cd}
Maya Ekstraktı	11,8 ^d	5,24 ^{cd}
Bakto pepton	10,6 ^a	4,31 ^a
KBP	11,4^{cd}	5,79^e

*Fermentasyon şartları: Sıcaklık 25°C, süre 6 gün, pH 5,5, çalkalama hızı 250 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.8. Farklı azot kaynaklarının *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.9 ve şekil 4.8’de görüldüğü gibi en yüksek karotenoid üretimi 5,79 mg/l olarak azot kaynağının KBP olduğu kültür ortamından elde edilmiştir. Diğer peptonlar arasında en yüksek karotenoid üretimi (5,37 mg/l) triptondan elde edilmiştir. En düşük karotenoid üretimi (4,31 mg/l) ise bakto peptonun kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, en yüksek biyomas eldesi 11,8 g/l olarak maya ekstraktının kullanımıyla ve en düşük biyomas 10,6 g/l olarak bakto peptonun kullanımıyla elde edilmiştir. Kullanılan azot kaynaklarını karotenoid üretimi için fazladan aza doğru sıralayacak olursak KBP > tripton > maya ekstraktı > proteoz pepton > balık peptonu > kazein pepton > bakto pepton şeklinde bir sıralama ortaya çıkmaktadır.

4.11. Optimum Fermentasyon Şartları Altında *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkilerinin Karşılaştırılmasına İlişkin Araştırma Sonuçları

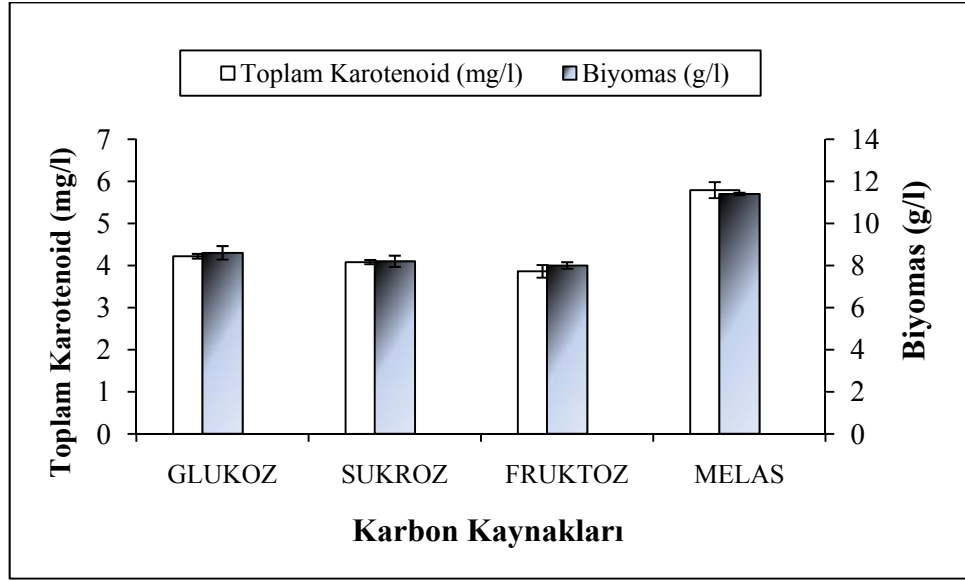
R. glutinis YU-14 tarafından gerçekleştirilen toplam karotenoid üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkileri şimdiye kadar belirlenmiş olan optimum fermentasyon şartları altında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10 ve Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı karbon kaynaklarının *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması

Karbon Kaynağı	Biyomas (g/l)	Toplam Karotenoid (mg/l)
Glukoz	8,6 ^b	4,22 ^b
Sukroz	8,2 ^{ab}	4,08 ^{ab}
Fruktoz	8,0 ^a	3,86 ^a
Melas	11,4^c	5,79^c

*Fermentasyon şartları: Sıcaklık 25°C, süre 6 gün, pH 5,5, çalkalama hızı 250 rpm

Aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (p<0,05).



Şekil 4.9. Farklı karbon kaynaklarının *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen biyomas ve toplam karotenoid üretimlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.10 ve şekil 4.9’da görüldüğü gibi en yüksek karotenoid üretimi 5,79 mg/l olarak karbon kaynağının melas olduğu kültür ortamından elde edilmiştir. Diğer karbon kaynakları arasında en yüksek karotenoid üretimi (4,22 mg/l) glukozdan elde edilmiştir. En düşük karotenoid üretimi (3,86 mg/l) ise fruktoz kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, en yüksek biyomas eldesi 11,4 g/l olarak melas kullanımıyla ve en düşük biyomas 8,0 g/l olarak fruktoz kullanımıyla elde edilmiştir. Kullanılan karbon kaynaklarını karotenoid üretimi için fazladan aza doğru sıralayacak olursak melas > glukoz > sukroz > fruktoz şeklinde bir sıralama ortaya çıkmaktadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda doğal karotenoidlere artan ticari ilgi ile birlikte kullanım alanlarının çeşitli olması ve ekonomik değerlerinin yüksek olması nedeniyle karotenoid üretimiyle ilgili çeşitli araştırmalar giderek artmakta ve daha fazla önem kazanmaktadır. Gıda, ilaç, kimya, kozmetik ve yem sanayinde geniş kullanım alanlarına sahip olan bu doğal bileşiklerin endüstriyel üretimle elde edilmesinde önemli rolü olan mikroorganizmalardan *Rhodotorula* ve *Phaffia* mayaları yaygın olarak kullanılmaktadır (Bhosale and Gadre 2001). Karotenoidler gibi ticari açıdan önemli olan mikrobiyal ürünlerin üretiminde düşük maliyetli, uygun besiyeri bileşenlerinin seçimi ve en iyi fermentasyon koşullarının saptanması önemli bir husustur. Yapmış olduğumuz bu çalışmada şeker endüstrisinin önemli bir atığı olan melas ve yine bir atık olan koç boynuzundan elde edilen peptonun birlikte kullanılmasıyla karotenoid üretimi için ekonomik bir substrat elde edilmiştir. Ticari protein ve şeker kaynaklarının yerine koç boynuz peptonu ve melasın kullanılması, karotenoid üretiminde uygun bir besiyeri formülasyonu elde etmede ekonomik bir avantaj sağladığı gibi aynı zamanda her iki atık maddenin de meydana getireceği çevre kirliliğini önlemede de etkili olacaktır.

Karotenoidlerin gıda ve yem katkısı olarak özellikle de antikanserojen olarak bilinmesindeki ilerleme, bu bileşiklerin mikroorganizmalar tarafından ekonomik olarak üretimi üzerindeki araştırmaların artmasına neden olmuştur. Bu bakımdan çeşitli endüstriyel yan ürünleri içeren, düşük maliyetli besiyeri bileşenlerinin kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Daha önce yapılan çalışmalarda üzüm şırası, glukoz şurubu, şeker pancarı melası, soya fasülyesi unu ekstraktı, mısır unu ekstraktı, turba ekstraktı, şeker kamışı melası, şeker kamışı suyu, fermente turp salamurası, peynir altı suyu, mongo fasülyesi atığı ve tatlı patates ekstraktı gibi çeşitli zirai ve endüstriyel yan ürünler karotenoid üretimi için karbonhidrat ve protein kaynağı olarak kullanılmıştır (Tinoi *et al.* 2005; Frengova *et al.* 1994; Buzzini and Martini 1999; Bhosale and Gadre 2001; Squina *et al.* 2002; Malisorn and Stornsuk 2008). Ancak KBP kullanımıyla yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle bu çalışma özgün bir

çalışma niteliğinde olup, elde edilen sonuçları itibarıyla KBP'nin mikrobiyal yolla karotenoid üretiminde kullanılabilirliği açısından da büyük önem taşımaktadır.

5.1. Melas ve Koç Boynuz Peptonunun Özellikleri

Endüstriyel işlemlerde ticari ürün üretimi ve pazarlamayı sınırlandıran en önemli faktörlerden biri de fermentasyonda kullanılan karbon kaynağıdır, özellikle de karbonhidratın maliyetidir. Bu nedenle maliyet giderini düşürmek amacıyla farklı ve ucuz karbon kaynaklarının fermentasyonda kullanımı önemlidir. Bu amaçla son yıllarda endüstriyel proseslerde melas gibi ucuz atık maddelerin fermentasyon ortamı olarak kullanımı artmıştır (Yeniel 2006). Mikroorganizmalar tarafından fermentasyonla ürün üretiminde yaygın olarak kullanılan ve şeker endüstrisinin yan ürünü olan melas, yalnız şeker bakımından değil, içerdiği şeker dışı maddeler yönünden de değerli bir üründür. Çizelge 5.1'de melasın ortalama bileşimi verilmiştir.

Çizelge 5.1. Şeker pancarı melasının ortalama bileşimi (Burrows 1970; Anon. 1982)

Bileşen	%
Kuru madde	78-85
Toplam şeker	48-58
Toplam azot	0,2-2,8
Kül	8,7
Fosfor (P_2O_5)	0,02-0,07
Kalsiyum (CaO)	0,15-0,7
Magnezyum (MgO)	0,01-0,1
Potasyum (K_2O)	2,2-5,0
Sodyum	1
Klor	0,9
Toplam karbon (C)	28-34
Kükürt (SO_3)	0,3-0,4

(devam)

Bileşen	%
Toplam inorganik madde	4-11
Toplam lipit	0
Toplam lif	0
Mineral ve Vitaminler	µg/g
Bakır	13
Demir	117
Manganez	10
Çinko	40
Biyotin	0,01-0,13
Pantotenik asit	7
Riboflavin	0-0,75
Pridoksin	2,3-5,6
Folik asit	0,21
Tiamin	1-4
Nikotinamid	37-51

Çizelge 5.1’den de görüldüğü gibi melas, sahip olduğu şeker, şeker dışı maddeler, mineral ve vitaminler bakımından mikroorganizmaların üretimi için uygun bir besin kaynağıdır. Bu nedenle yapılan bu araştırmada, fermentasyon ortamı için ucuz bir besin kaynağı olan melasın başlıca karbon kaynağı olarak karotenoid üretiminde kullanılabilirliği test edilmiş, KBP ile birlikte fermentasyon ortamı oluşturmada başarılı bir şekilde kullanılabildiği gözlenmiştir.

Türkiye’de atık madde olarak bol bulunan koçboynuzları yaklaşık 600 tondur. Boynuz, keratin protein yapısında olup mineraller bakımından da zengindir. Yapılan ilk çalışmalarda koçboynuzlarından elde edilen koç boynuz hidrolizatı (KBH) mikroorganizmaların üretiminde besiyeri olarak başarılı bir şekilde kullanılmış ve endüstriyel değeri olan çeşitli maddeler üretilmiştir. Laboratuvarımızda üretilen koç

boynuz peptonu veya hidrolizatı genellikle mikrobiyal besiyerlerine azot ve mineral kaynağı olarak ilave edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda KBP'nin mikrobiyal besiyerleri için çok ucuz bir azot ve mineral kaynağı olduğu kanıtlanmıştır (Kurbanoglu 1999; Kurbanoglu and Algur 2002a,b,c; Kurbanoglu and Kurbanoglu 2002; Kurbanoglu 2003a,b; Kurbanoglu and Kurbanoglu 2003a,b; Kurbanoglu and Kurbanoglu 2004). KBP'nin kimyasal kompozisyonu, tırnak, balık epidermisi ve sığır toynağı gibi çeşitli fibröz proteinlerin elementel ve amino asit kompozisyonları üzerine yapılan araştırma bulguları ile uygunluk göstermektedir. Çizelge 5.2'de KBP'nin kimyasal içeriği verilmiştir (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2002).

Çizelge 5.2. KBP'nin kimyasal içeriği (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2002)

İçerik	g/100 g KBP
Azot	10,01
Protein	62,50
Kuru madde	98,00
Kül	22,50
Toplam şeker	5,68
Toplam yağ	3,40
Mg	1,81
Ca	1,86
Cu	0,19
Mn	0,40
Zn	0,72
Fe	1,39
K	1,28

Fermentasyon ortamında bulunan azot kaynağının konsantrasyonu ve kimyasal kompozisyonu, mikroorganizmalarda pigment metabolizmasının düzenlenmesi bakımından önemli bir unsurdur. Çizelge 5.2'den de görüldüğü gibi KBP, sahip olduğu yüksek miktardaki besin potansiyeline bağlı olarak mikroorganizmaların üretimi için

uygun bir besin kaynağıdır. Bu nedenle yapılan bu araştırmada KBP'nin başlıca azot kaynağı olarak karotenoid üretiminde kullanılabilirliği test edilmiştir. Ayrıca mikroorganizmaların gelişmesinde önemli rolü bulunan amino asitlerin KBP'de bol olarak bulunması, KBP'nin mikrobiyal üretimlerde kullanılabilmesi açısından önemli bir avantaj teşkil etmektedir. KBP'nin sahip olduğu amino asit içeriği Çizelge 5.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 5.3. KBP'nin amino asit içeriği (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2002)

Amino asitler	KBP (g/100 g)
Aspartik asit	4,9
Treonin	2,3
Serin	3,3
Glutamik asit	9,3
Glisin	5,9
Alanin	3,6
Sistein	0,2
Valin	2,9
Metiyonin	0,47
İzolösin	1,9
Lösin	4,6
Tirozin	1,8
Fenilalanin	1,9
Histidin	0,8
Lizin	2,5
Arjinin	5,3
Prolin*	4,43
Triptofan	Belirtilmemiş

5.2. Farklı *R. glutinis* İzolatlarının Karotenoid Üretimi ve Biyomas Miktarları ile İlgili Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Standart besiyeri kullanılarak *R. glutinis* izolatlarının toplam karotenoid ve biyomas miktarları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre en az karotenoid üretimi (1,65 mg/l) *R. glutinis* YU-16 tarafından elde edilirken en fazla karotenoid üretimi (3,61 mg/l) *R. glutinis* YU-14 tarafından elde edilmiştir. Dikkate değer karotenoid üretimi *R. glutinis* YU-3, YU-6, YU-12 ve YU-14, suşlarının kullanımıyla elde edilmiştir. İyi derecede karotenoid üreten bu suşlar arasından *R. glutinis* YU-14 suşu maksimum miktarda karotenoid ürettiğinden dolayı çalışmalar bu izolat üzerinden yürütülmüştür. Yapılan bu araştırmada aynı türün farklı izolatlarının karotenoid üretim kapasitelerinin istatistiksel boyutlarda önemli değerler verdiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre, fermentasyon ortamında herhangi bir madde üretilecekse kullanılan mikroorganizma suşlarının dikkatlice belirlenmesi gerektiği önerilir. Nitekim son zamanlarda yapılan araştırmalarda aynı türün farklı suşlarının taranması çalışmaları yaygınlaşmıştır (Canlı 2009). Kurbanoglu *et al.* (2007a,b,c) asetofenon ve analoglarının asimetrik indirgenmesinde *Aspergillus niger* ve *Alternaria alternata* funguslarının farklı suşlarını kullanmış, en başarılı sonuç veren suşları belirlemiş ve en başarılı suş üzerinden araştırmalarını gerçekleştirmiştir. Buzzini and Martini (1999), en yüksek verimde karotenoid elde etmek için *R. glutinis*’in farklı suşlarını tarama (screening) yöntemini kullanarak karşılaştırmış ve en iyi üretim yapan suş ile çalışmıştır. Bhosale and Gadre (2001), *R. glutinis* mutantları arasında tarama yapmış ve karotenoid üretiminde en iyi olan suş ile çalışmıştır. Libkind and Broock (2006), akuatik çevreden izole ettikleri karotenoid üreten maya suşlarını tarama yöntemi ile karşılaştırmış ve en iyi olan suşla yarı sentetik ve zirai atıklar ile hazırlanan besiyerlerinde çalışmıştır. Bu şekilde literatürde daha pek çok örnek bulunmaktadır. Bu nedenle yapılan bu araştırmanın başlangıcında en yüksek miktarda karotenoid üreten suş belirlenmiştir.

5.3. Melasın *R. glutinis* YU-14 Tarafından Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Konsantrasyonun Belirlenmesi, Ön Muamele ve Hidroliz İşlemlerine İlişkin Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bilindiği gibi kültür ortamına eklenen besin maddelerinin başında karbon ve azot kaynakları gelmektedir. Melas, çeşitli fermentasyonlarda substrat olarak kullanılan yalnız şeker bakımından değil, içerdiği şeker dışı maddeler yönünden de değerli bir üründür. Çalışmamızda tek karbon kaynağı olarak kullanılan melasın farklı konsantrasyonlarının karotenoid ve biyomas üretimi üzerine etkileri araştırılmış ve en iyi üretimin %3 konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. %3 konsantrasyondan sonra karotenoid ve biyomas üretiminde azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir. Bunun nedeninin melasın içerdiği toksik madde ve ağır metallerin (demir, bakır, çinko, manganez, magnezyum ve kalsiyum vb.) yüksek konsantrasyonunun mikroorganizmanın üremesini inhibe etmesi ve karotenoid biyosentezinde görevli enzimleri inaktive etmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda yukarıda bahsedilen, karotenoid ve biyomas üretiminde inhibisyona neden olan toksik madde ve ağır metalleri uzaklaştırmak ayrıca ürün verimini artırmak amacıyla melasa çeşitli ön muamele işlemleri (H_2SO_4 , EDTA ve potasyumferrosiyamid) uygulanmıştır. Uygulanan bu işlemler ile melasta bulunan tortu ve renk maddeleri ile fermentasyonda olumsuz etkiler meydana getirebilecek toksik maddelerin ayrılması veya inaktif hale getirilmesi hedeflenmiştir. Nitekim Roukas (1998), *Aureobasidium pullulans* tarafından gerçekleştirilen pullulan verimini artırmak amacıyla melasa ön muamele işlemleri uygulamış verim artışında H_2SO_4 muamelesinin en etkili muamele olduğunu bildirmiştir. Liu *et al.* (2008), *Actinobacillus succinogenes* ile süksinik asit üretiminde melasa H_2SO_4 muamelesi uygulayarak Valduga *et al.* (2008a), *Sporidiobolus salmonicolor* ile karotenoid üretiminde melasa sülfirik ve fosforik asit muamelesi uygulayarak fermentasyon ortamındaki toksik maddeleri uzaklaştırmayı hedeflemişlerdir. Aynı şekilde Goksungur *et al.* (1998), *Blakeslea trispora* tarafından gerçekleştirilen β -karoten üretiminde melastaki toksik maddeleri uzaklaştırmak amacıyla çeşitli ön muamele işlemleri uygulamışlardır. Yapılan bu çalışmada melasa

uygulanan ön muamele işlemlerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid üretimi üzerine H₂SO₄ muamelesi olumlu etki göstermiştir. Biyomas üretimi üzerine ise her üç muamelenin de göstermiş olduğu etkiler arasında önemli bir fark bulunmamıştır.

Karotenoid üretiminde özellikle glukoz ve sukroz tercih edilen karbon kaynaklarıdır. Melasın içerdiği başlıca şeker sukrozdur, şeker pancarı melasında indirgen şeker olarak glukoz ve fruktoz %1’den daha azdır (Goksungur 1998). Çeşitli fermentasyonlarda sukrozun indirgen şekerlere dönüşümü için melasa çeşitli hidroliz işlemleri uygulanmaktadır. Çalışmamızda H₂SO₄ muamelesi ile toksik maddelerden arındırılmış olan melas, hidroklorik asit (HCl) kullanılarak hidroliz edilmiş ve bu şekilde hazırlanan fermentasyon ortamında karotenoid üretiminin önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Bu yüzden bundan sonraki çalışmalarda H₂SO₄ ile muamele edilen melas solüsyonu hidroliz edilerek diğer maddelerin de ilave edilmesiyle besiyeri ortamı olarak kullanılmıştır.

5.4. *R. glutinis* YU-14 Tarafından En Yüksek Verimde Karotenoid Üretimi İçin Gereken KBP Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Melasta bulunan azotun ancak %40-60 kadarı mikroorganizmalar tarafından kullanıldığından fermentasyon ortamına azot kaynağının ilave edilmesinin gerektiği bildirilmiştir (Baker 1979). Araştırmamızın temelini oluşturan endüstriyel atıklardan biri olan koçboynuzundan elde edilen peptonun karotenoid üretiminde kullanılması ve diğer organik azot kaynaklarıyla karşılaştırılması, maksimum karotenoid üretimi için KBP’nin kültür ortamında en uygun konsantrasyonunun belirlenmesi gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Bhosale (2001), *R. glutinis* mutant 32 ile karotenoid üretimi için melaslı besiyerinde organik ve inorganik azot kaynaklarını karşılaştırmış ve en iyi karotenoid üretiminin maya ekstraktı ile elde edildiğini bildirmiştir. Park *et al.* (2005), *R. glutinis*

tarafından gerçekleştirilen karotenoid üretiminde melaslı besiyerinde azot kaynağı olarak ürenin kullanılabilirliğini araştırmış ve bu amaçla üreyi farklı konsantrasyonlarda kullanarak en uygun konsantrasyonu belirlemişlerdir. Valduga *et al.* (2008a), şeker kamışı melaslı besiyerinde azot kaynağı olarak mısır mazerasyon sıvısının (MMS) *Sporidiobolus salmonicolor* tarafından gerçekleştirilen karotenoid üretiminde kullanılabilirliğini araştırmış ve bu amaçla MMS'yi farklı konsantrasyonlarda kullanarak en uygun konsantrasyonu belirlemişlerdir. Aynı şekilde Tinoi *et al.* (2005), farklı besin kaynaklarının (tatlı patates ve hidroliz edilmiş mongo fasülyesi unu) *R. glutinis* tarafından gerçekleştirilen karotenoid üretimi üzerine etkilerini araştırmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda besin kaynaklarını kültür ortamına eklemiş ve en yüksek karotenoid eldesinin gerçekleştiği oranları tespit etmişlerdir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid üretiminin en yüksek düzeyde olabilmesi için besiyerine farklı konsantrasyonlarda KBP eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, en düşük karotenoid ve biyomas üretimi sırasıyla 2,94 mg/l ve 6,4 g/l olarak %0,1'lik KBP kullanımıyla elde edilmiştir. Diğer taraftan, en yüksek karotenoid ve biyomas üretimi sırasıyla 4,24 mg/l ve 8,0 g/l olarak %0,5 oranında KBP kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yüzden karotenoid üretimi için en uygun konsantrasyonun %0,5 olduğuna karar verilmiştir. %0,6 ve %0,7 KBP konsantrasyonlarında biyomas ve karotenoid üretiminde önemli ölçüde düşüş gözlenmiştir. Bunun nedeninin, melas ve KBP'nin sahip olduğu yüksek oranlardaki mineral madde miktarına bağlı bir enzim inhibisyonu olduğu düşünülmektedir.

5.5. OKÜB'nin *R. glutinis* YU-14 Tarafından Zamana Bağlı Olarak Biyomas ve Karotenoid Üretimine İlişkin Deney Sonuçlarının Değerlendirilmesi

R. glutinis YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid üretimi için gereken en uygun fermentasyon süresini araştırmak amacıyla, kültür ortamından yirmi dört saatte bir alınan numunelerdeki karotenoid, biyomas üretimi ve şeker tüketim oranları belirlenmiş ve en yüksek karotenoid ile biyomas üretiminin sırasıyla 4,81 mg/l ve 8,4 g/l olarak 6. günün sonunda elde edildiği görülmüştür. Sonuçlar, Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4'de

gösterilmiştir. En düşük karotenoid ve biyomas üretimi ise sırasıyla 0,57 mg/l ve 2,8 g/l olarak 1. günün sonunda gerçekleşmiştir. Diğer yandan, 6. günden sonra karotenoid ve biyomas üretiminde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu azalmanın ortamda bulunan besin kaynaklarının tükenmesinden (substrat sınırlaması) ya da ortamda ototoksik maddelerin birikmesinden (toksin sınırlaması) kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Stanbury *et al.* 1997). Ayrıca mayada karotenoid toplanmasının 3. günde önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir (karotenoid üretimi bir önceki güne göre 2,25 kat daha fazla miktarda elde edilmiştir.). Karotenoid üretiminin artırılması için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda farklı fermentasyon süreleri bulunmuştur. Tinoi *et al.* (2005), en uygun sürenin 108 saat, Buzzini (2000), 5 gün ve Frengova *et al.* (2003) 6 gün olduğunu bildirmişlerdir. En uygun inkübasyon süresi sonuçlarının birbirinden farklı olmasının, besiyeri kompozisyona bağlı olduğu sanılmaktadır.

5.6. OKÜB Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Ortam pH'sının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Karotenoid sentezini gerçekleştiren mayalarda fermentasyon için uygun ortam pH'sının türe özgü olduğu ve strain özelliğine bağlı olarak farklılık gösterdiği, ayrıca farklı karbon kaynaklarını içeren substratlarda karotenoid üreten çoğu maya için optimum pH değerlerinin 4,5-7,5 aralığında olduğu bildirilmiştir (Martin *et al.* 1993; Buzzini and Martini 1999; Bhosale and Gadre 2001). Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmada fermentasyon ortamının pH'sı 4,5-7,5 aralığına ayarlanmış ve yapılan deneylerin sonuçları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid ve biyomas üretiminin kültür ortamı başlangıç pH'sı 5,5 olduğunda sırasıyla 4,81 mg/l ve 8,4 g/l olarak en yüksek, 3,40 mg/l ve 6,2 g/l olarak pH 7,5 değerinde en düşük miktarda elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada en uygun pH değerinin 5,5 olduğu tespit edilmiş ve sonraki denemelerde bu değer kullanılmıştır.

5.7. OKÜB Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Çalkalama Hızının Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada *R. glutinis* YU-14 farklı çalkalama hızlarında inkübasyona bırakılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6'dan da görüldüğü gibi çalkalama hızı *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid ve biyomas üretimi üzerine istatistiksel olarak önemli derecede etki yapmıştır ($p<0,05$). En yüksek karotenoid ve biyomas miktarı sırasıyla 5,22 mg/l ve 10,1 g/l olarak 250 rpm'lik hıza sahip olan çalkalamalı kültürde gerçekleşmiştir. En düşük karotenoid ve biyomas miktarı ise sırasıyla 2,83 mg/l ve 4,4 g/l olarak 100 rpm çalkalama hızında elde edilmiştir. 100 rpm'de meydana gelen düşük miktardaki hücre üremesinin, bireysel hücre yüzeylerinin besin maddeleriyle zayıf temasından kaynaklandığı düşünülebilir. 100 rpm'den 250 rpm'ye kadar kültür ortamının çalkalanması sonucunda karotenoid ve biyomas üretiminde önemli bir artış meydana gelmiş olmasına rağmen bu değerden sonraki hızlarda üretimde azalma olduğu gözlenmiştir. *R. glutinis* obligat aerob olduğundan muhtemelen en iyi biyomas ve karotenoid üretimini sağlayan oksijen transferi 250 rpm çalkalama hızında sağlanmıştır. 250 rpm üzerindeki çalkalama hızının *R. glutinis*'in hücre membranının yıkımına neden olarak ya da mikroorganizmanın strese girmesinden dolayı biyomas ve karotenoid üretiminde azalmaya yol açtığı düşünülmektedir. Bu nedenle *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid üretimi için gerekli olan optimum çalkalama hızının 250 rpm olduğu kabul edilmiştir.

5.8. OKÜB Kullanılarak *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi İçin En Uygun Sıcaklığın Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Karotenoid sentezini gerçekleştiren mayalarda fermentasyon için uygun ortam pH'ında olduğu gibi sıcaklığında türe özgü olduğu ve strain özelliğine bağlı olarak farklılık gösterdiği ayrıca farklı karbon kaynaklarını içeren substratlarda karotenoid üreten çoğu

maya için optimum sıcaklık değerlerinin 20-30°C aralığında olduğu bildirilmiştir (Martin *et al.* 1993; Buzzini and Martini 1999; Bhosale and Gadre 2001). Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmada fermentasyon ortamının sıcaklığı 20-35°C aralığına ayarlanmış ve yapılan deneylerin sonuçları Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7’den de görüldüğü gibi çalkalama hızında olduğu gibi sıcaklık ta *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid ve biyomas üretimi üzerine istatistiksel olarak önemli derecede etki yapmıştır ($p<0,05$). Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid ve biyomas üretiminin kültür ortamı sıcaklığı 25°C olduğunda sırasıyla 5,79 mg/l ve 11,4 g/l olarak en yüksek, 3,10 mg/l ve 6,8 g/l olarak 35°C ortam sıcaklığında en düşük miktarda elde edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada en uygun ortam sıcaklığının 25°C olduğu tespit edilmiş ve sonraki denemelerde bu değer kullanılmıştır.

5.9. Optimum Fermentasyon Şartları Altında *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Optimum fermentasyon şartları altında farklı organik azot kaynaklarının *R. glutinis* YU-14 tarafından gerçekleştirilen karotenoid ve biyomas üretimlerine ilişkin araştırma sonuçlarına göre, en yüksek karotenoid üretimi (5,79 mg/l) KBP kullanımı ile ve en düşük karotenoid ve biyomas üretimi (sırasıyla 4,31 mg/l ve 10,6 g/l) bakto pepton kullanımı ile tespit edilmiştir. En fazla biyomas ise (11,8 g/l) maya ekstraktının kullanımıyla elde edilmiştir. Karotenoid üretiminde KBP ile diğer azot kaynakları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuş ($p<0,05$) dolayısıyla, melasla birlikte atık maddeden elde edilen KBP’nin kullanımıyla, ticari olarak kullanılan diğer peptonlardan daha yüksek miktarda karotenoid üretimi gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar karotenoid üretiminin optimizasyon çalışmaları sırasında farklı azot kaynaklarının karotenoid üretimi üzerine etkilerini tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre amonyum klorid ve ürenin iyi bir inorganik azot kaynağı olduğu, diğer taraftan da maya ekstraktı, soya peptonu ve mısır mazerasyon sıvısının (MMS) da iyi birer organik azot kaynağı oldukları tespit edilmiştir (Park *et al.* 2005; Bhosale 2001).

5.10. Optimum Fermentasyon Şartları Altında *R. glutinis* YU-14 Tarafından Biyomas ve Karotenoid Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Araştırma Sonuçları

Karotenoid üretiminde özellikle glukoz ve sukroz tercih edilen ticari karbon kaynaklarıdır. Bunların yanısıra, melas ve peyniraltı suyu gibi endüstriyel yan ürünler alternatif karbon kaynağı olarak kullanılabilir (Valduga *et al.* 2008a). Yapmış olduğumuz çalışmada karotenoid üretiminde tek karbon kaynağı olarak kullandığımız melas, ticari karbon kaynakları (glukoz, sukroz ve fruktoz) ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.10 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Çizelge 4.10 ve Şekil 4.9'da da görüldüğü gibi en yüksek karotenoid ile biyomas üretimi sırasıyla 5,79 mg/l ve 11,4 g/l olarak melas ve KBP içeren fermentasyon ortamından elde edilirken en düşük karotenoid ve biyomas üretimi ise sırasıyla 3,86 mg/l ve 8,0 g/l olarak fruktoz ve KBP içeren fermentasyon ortamından elde edilmiştir. Karşılaştırılan ticari karbon kaynakları arasında en yüksek karotenoid ve biyomas üretimi ise glukozdan elde edilmiştir (4,22 mg/l ve 8,6 g/l). Bu sonuçlara göre, melas ile içeriğindeki eş değer karbonhidrat miktarına göre fazla miktarda karotenoid üretimi gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde Bhosale (2001), hidroliz ettiği melas ve maya ekstraktı ile hazırladığı besiyerinde *R. glutinis* mutant 32 ile karotenoid üretimini gerçekleştirmiş ve melası ticari karbon kaynakları (glukoz, sukroz ve fruktoz) ile karşılaştırdığında en iyi verimi melas ve maya ekstraktlı fermentasyon ortamından elde etmiştir. Ayrıca karşılaştırılan ticari karbon kaynakları arasında en yüksek karotenoid ve biyomas üretimini glukozdan elde etmiştir.

Sonuç olarak; bu araştırma, atık madde olarak değerlendirilen melasın ve koç boynuzundan elde edilen peptonun mikrobiyal olarak karotenoid üretiminde kullanımlarının uygunluk gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Diğer taraftan, her iki atık maddenin de değerlendirilmesiyle, hem karotenoid üretimi için uygun bir besiyeri formülasyonu elde etmede ekonomik bir avantaj sağlanmış hem de atık maddelerin meydana getireceği çevre kirliliği azaltılmış olacaktır. Verim artışını sağlamak amacıyla daha fazla çalışmalara gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akiba, Y., Sato, K., Takahashi, K., Takahashi, Y., Furuki, A., Konashi, S., Nishida, H., Tsunekawa, H., Hayasaka, Y. and Nagao, H., 2000. Pigmentation of egg yolk with yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentration of astaxanthin in laying hens fed on a low-carotenoid diet. *Nippon Kakin Gakkaishi*, 37, 77-85.
- Aksu Z and Eren T., 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 107–113.
- An H., Jang B. and Cho M. 2001. Cultivation of the Carotenoid-Hyperproducing Mutant 2A2N of the Red Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with Molasses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 121-125.
- Ancos, B.D., Cano, M.P., Hernandez, A. and Monreal, M., 1999. Effects of microwave heating on pigment composition and color of fruit purees. *J. Sci. Food. Agric.*, 79, 663-670.
- Anonymous, 1982. Molasses market news. Market Summary 1981. AMS. USDA. Denver CO
- Atkinson, B., 1991. Industrial microbial processes. In *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. Stockton Press, New York, 1144–1146.
- Ausich, R.L., 1997. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure & App. Chem.*, 69 (10), 2169-2173.
- Babitha, S., 2009. Microbial Pigments. *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilisation*, Springer Netherlands, 147-162.
- Bağdatlıoğlu, N. and Demirbükür, B., 1999. Gıda İşlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelişmeler. *Gıda*, 9, 48-51.
- Baker, B.P., 1979. The availability, composition and properties of cane molasses. Symposium on problems with molasses in the yeast industry, Ed: Sinda, E. and Parkkinen, E. 113-127.
- Ben-Amotz, A., 1999. *Dunaliella* β -carotene: from science to commerce. *Cell. Origin Life Extreme Habitats*, 1 (Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments), Kluwer Academic Publishers, 401-410.
- Bengtsson, S., Pisco, A.R. Johansson, P. Lemos, P.C. and Reis, A.M., 2010. Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 147 (3-4), 172-179.
- Berset, C. and Marty, C., 1992. Formation of nonvolatile compounds by thermal degradation of β -carotene: protection by antioxidants. *Methods in Enzymology, Carotenoids Part A, Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation*. Academic press, 213, 129-141.
- Bhosale, P. and Gadre, R.V. 2001a. Production of β -carotene by *Rhodotorula glutinis* mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 327-332.
- Bhosale, P. and Gadre, R.V. 2001b. Production of β -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. *Bioresource Technology* 76, 53-55.
- Bhosale, P. 2001. Studies On Yeast *Rhodotorula*, Its Carotenoids and Their Applications. PhD Thesis, University of Pune in Microbiology, Pune, India.

- Bhosale, P., Jogdand, V.V. and Gadre, R.V., 2003. Stability of β -carotene in spray dried preparation of *Rhodotorula glutinis* mutant 32. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 584-590.
- Biacs, P.K. and Fekete, J., 1998. Carotenoid coloring matters in foodstuffs. Part II. *Elelmez. Ip.*, 52, 113-114.
- Bilgiçli, N., 2000. Melaslı Besin Ortamında Ekmek Mayası Üretim Parametrelerinin Tespiti ve Sıvı Mayanın Likid Ferment Sistemi İle Ekmek Yapımında Kullanılma İmkânları. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Brawn, K. and Fridovich, I. 1981. DNA strand scission by enzymically generate oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.*, 206, 414-419.
- Burrows, S., 1970. Baker's yeast. *The Yeasts*, Ed: Rose, A.H. and Harrison J.S. Academic Press, London and Newyork, 365-369.
- Buzzini, P. and Martini, A., 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Biores. Technol.*, 71, 41-44 .
- Buzzini, P. 2000. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, 4, 41-45.
- Buzzini, P. 2001. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* & *Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *Journal of Applied Microbiology.*, 90, 843-847.
- Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B. and Scarmino, I.S. 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, 98, 2824–2828.
- Canlı, Ö., 2009. Koç Boynuzu Peptonu Kullanılarak *Aspergillus niger* tarafından Glukoz Oksidaz Enzimi Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum,
- Carvalho J.C., Soccol, C.R., Babitha, S., Pandey, A. and Woiciechowski, A.L., 2008. Production of pigments. *Current developments in solid state fermentation*, Springer New York, 337-355.
- Ciegler, A., Lagoda, A.A., Sohns, V.E., Hall, H.H. and Jackson, R.W., 1963. β -carotene production in 20 L fermenter. *Biotech. Bioeng.*, 5, 109-121.
- Çavdar, C., Sifil, A. and Çamsarı, T., 1997. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *J Turk Nephrol.*, 3-4, 92-95.
- Davies, B.H., 1976. Carotenoid. In T.W. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Ed: Goodwin, New York: Academic.
- Davoli, P., Mierau, V. and Weber, R.W.S., 2004. Carotenoids and Fatty Acids in Red Yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis* *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40 (4), 392–397.
- Dawson, M.I., 2000. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr. Pharm.Des.*, 6, 311-325.
- Denizci, A., 1990. *Phaffia rhodozyma* NRRLY-10921 Mayası ile Astaksantin Pigmentinin Üretimi ile İlgili Bir Arastırma. Yüksek Lisans Tezi Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Desobry, S.A., Netto, F.M. and Labuza, T.P., 1997. Comparison of spray drying, drum drying and freeze drying for β -carotene encapsulation and preservation. *J. Food Sci.*, 62, 1158-1162.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D., 2008. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 333–335.
- Ediz, N., 2004. Bazı *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Melas Besi ortamında PHB Üretimleri, Toplam Protein Profilleri ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G., 1997. The carotenoids as antioxidants. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 41, 189-200.
- El-Enshasy, H.A., Mohamed, N.A. and Farid, M.A., 2008. Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource Technology*, 99, 4263–4268.
- Etienne S., Bezalel, L., Schickler, H., Paltiel, J., Ben-Amotz, A., Shaish, A. and Perry, I., 2000. Cosmetic compositions containing carotenoids for prevention of damage resulting from oxidation and exposure to UV light. *PCT Int. Appl. WO* 2000013654.
- Fraser, P.D. and Bramley, P.M., 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.*, 43, 228-265.
- Frengova, G., Simova, E., Pavlov, K., Beshkova, D.M. and Grigorova, D. 1994. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnol Bioengg.*, 44, 888-894
- Frengova, G., Simova, E. and Beshkova, D.M. 1995. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Biotechnology letters*. 17 (9) 1001-1006.
- Frengova, G., Simova, E. and Beshkova, D.M., 2003. Carotenoid production by lactose-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Z. Naturforsch*, 58c, 562-567.
- Frengova, G. and Beshkova, D., 2009. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 36, 163-180.
- Giovannucci, E. and Clinton, S. K., 1998. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 218, 129-139.
- Glisson, B.S., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Lippman, S.M. and Hong, W.K., 1998. Chemoprevention of lung cancer. In: *Infusion Chemother.-Irradiat. Interact.*, 373-381, Elsevier, Amsterdam.
- Go, K.M., Koo, J.S., Kim, Y.I. and Yang, J.H., 1999. Preparation and stability of sodium alginate beads containing β -carotene. *Yakche Hakhoechi*, 29, 323-327.
- Goksungur, Y., Mantzouridou, F and Roukas, T., 2002. Optimization of the production of β -carotene from molasses by *Blakeslea trispora*: a statistical approach *J Chem Technol Biotechnol* 77, 933–943.
- Goodwin T.W., 1980. Biosynthesis of carotenoids. *The biochemistry of the Carotenoids*, Ed: Chapman and Hall. London, 33-76.

- Goodwin, T.W., 1993. Biosynthesis of carotenoids: An overview In: Methods in Enzymology Volume 214 Carotenoids part B metabolism, Genetics and Biosynthesis pp: 330-340 (Ed: Packer, L.) Academic press, INC, San Diego
- Göksungur, Y., 1998. Melastan Laktik Asit Üretiminde Farklı Üretim Tekniklerinin Kullanılabilirliği ve Ortam Şartlarının Optimizasyonu. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Greenberg, E.R., Baron, J.A., Stuket, T.A., Stevens, M.M., Mandel, J.S., Spencer, S.K., Elias, P.M., Lowe, N., Nierenberg, D.W., Bayrd, G., Vance, J.C., Freeman, D.H., Clendenning, W.E., Kwan, T. and The Skin Cancer Prevention Study Group., 1990. A clinical trial of β -carotene to prevent basal-cell and squamous cell cancers of the skin, New Eng. J. Med., 323, 789-795.
- Hamano, Y., Dairi, T., Yamamoto, M., Kuzuyama, T., Itoh, N. and Seto, H., 2002. Growth-phase dependent expression of the mevalonate pathway in a terpenoid antibiotic-producing *Streptomyces* strain. Biosci Biotechnol Biochem, 66, 808–819.
- Haouazine, Y., Rmiki, N., Riyahi, J., Givernaud, T., Mouradi, A. and Lemoine, Y., 1999. Massive accumulation of β -carotene in green alga *Dunaliella salina* induced by variation of nitrate and salinity. Meded. Fac. Landbouwk. Toegepaste Biol. Wet., 64, 435-438.
- Hari, R.P.K., Patel, T. and Martin, A., 1992. A strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. J. Indus. Microbiol., 11, 43-51.
- Hennekens, C.H., 1997. β -Carotene supplementation and cancer prevention. *Nutrition* 13, 697-699.
- Henry, L. K., Catignani, G. L. and Schwartz, S. J., 1998. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 823-829.
- Jaervinen, R., Knekt, P., Seppanen, R. and Teppo, L., 1997. Diet and breast cancer risk in a cohort of Finnish women. *Cancer Lett.*, 114, 251-253.
- Jiang, L., Wang, J., Liang, S., Wang, X., Cen, P. and Xu, Z., 2009. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresource Technology*, 100, 3403–3409.
- Jirasripongpun K., Pewlong W., Natsathmonthra W. And Suthiyaporn S., 2007. Carotenoids Production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* Mutant Grown on Molasses. *Kasetsart J*, 41, 667-674.
- Johnson E.A., 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol*, 6, 169–174.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai A.J., 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99, 195–199.
- Kalogiannis, S., Iakovidou, G. and Liakopoulou-Kyriakides, M., 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*, 39, 249-256.
- Krinsky, N.I., 1998. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854 (20), 443–447.
- Kona, R.P., Qureshi, N., Pai, J.S., 2001. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, 78, 123–126.

- Kopecky, J., Schoefs, B., Loest, K., Stys, D. and Pulz, O., 2000. Microalgae as source for secondary carotenoid production: A screening study. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 133, 153-168.
- Kurbanoglu, E.B., 1999. Boynuz Hidrolizatının Bakteriler İçin Besiyeri Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kurbanoglu, E.B. and Algur, O.F., 2002a. The influence of ram horn hydrolyzate on the crop yield of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Sci. Horticulturae*, 94, 351-357.
- Kurbanoglu, E.B. and Algur, O.F., 2002b. Single-cell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria. *Biores. Technol.*, 85, 125-129.
- Kurbanoglu, E.B. and Algur, O.F., 2002c. Use of ram horn hydrolysate as peptone for bacterial growth. *Turk. J. Biol.*, 26, 115-123.
- Kurbanoglu, E.B. and Kurbanoglu, N.I., 2002. A New Process for the Utilization as Peptone of Ram Horn Waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 3, 202-206.
- Kurbanoglu, E.B., 2003a. Enhancement of glycerol production with ram horn hydrolysate by yeast. *Energy Conv. Mngmt.*, 44, 2125-2133.
- Kurbanoglu, E.B., 2003b. Investigation of the use of ram horn hydrolysate for fungal protein production. *J. Sci. Food Agri.*, 83, 1134-1138.
- Kurbanoglu, E.B. and Kurbanoglu, N.I., 2003a. Lactic acid production from ram horn hydrolysate with a new process. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 29-34.
- Kurbanoglu, E.B. and Kurbanoglu, N.I., 2003b. Production of citric acid from ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 38, 1421-1424.
- Kurbanoglu, E.B. and Kurbanoglu, N.I., 2003c. Utilization for lactic acid production with a new acid hydrolysis of ram horn waste. *FEMS Microbiology Letters*, 225, 1, 29-34.
- Kurbanoglu, E.B., 2004. Enhancement of citric acid production with ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 92, 1, 97-101.
- Kurbanoglu, E.B., Kurbanoglu, N.I., 2004. Utilization as peptone for glycerol production of ram horn waste with a new process. *Energy Conversion and Management*, 45, 2, 225-234.
- Kurbanoglu, E.B. and Kurbanoglu, N.I., 2007. Ram horn hydrolysate as enhancer of xanthan production in batch culture of *Xanthomonas campestris* EBK-4 isolate. *Process Biochemistry*, 42, 1146-1149.
- Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N.I. and Kilic, H., 2007a. Asymmetric reduction of acetophenone analogues by *Alternaria alternata* using ram horn peptone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 19, 2332-2335.
- Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N.I. and Kilic, H., 2007b. Enantioselective reduction of substituted acetophenones by *Aspergillus niger*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 1159-1162.
- Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, N.I. and Taskin, M., 2007c. Highly enantioselective reduction of acetophenone by locally isolated *Alternaria alternata* using ram horn peptone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 13, 1529-1532.
- Lajos, S., Mikuni, K., Hashimoto, H. and Szejtli, J., 1998. Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 32, 81-89.

- Lambert, L.A., Wamer, W.G., Wei, R.R., Lavu, S., Chirtel, S.J. and Kornhauser, A., 1994. The protective but nonsynergistic effect of dietary β -carotene and vitamin E on skin tumorigenesis in Skh mice. *Nutr.Cancer*, 21, 1-12.
- Lay, C-H., Wu, J-H.,- Hsiao, J-L., Chang, J-J. and Chen, C-C., 2010. Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *International journal of hydrogen energy*, 1-7.
- Lazaridou, A., Roukas, T., Biliaderis, C.G. and Vaikousi, H., 2002. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation, *Enzyme and Microbial Technology* 31, 122–132.
- Leach, G.C., Oliveira, G. and Morais, R., 1998. Production of a carotenoid rich product by alginate entrapment and fluid-bed drying of *D.salina* J. Sci. Food. Agric., 76, 298-302.
- Lee, B., Pometto, A.T., Demirci, A., Hinz, P.N., 1998. Media Evaluation for the Production of Microbial Enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4775-4778.
- Li, R., Zhang, H. and Qi,Q., 2007. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 98, 2313–2320.
- Libkind, D. and Broock, M., 2006. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.*, 22, 687–692.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. and Schwender, J., 1997. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101,643–652.
- Liu, Y., Zheng, P., Sun, Z., Jin-Jun Dong, Y. And Zhu, L., 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 99, 1736–1742.
- Lowry, O.H., Rosebrouh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Maldonado, I.R., Rodriguez-Amaya, D.B. and Scamparini, A.R.P., Food., 2008. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem, *Chemistry*, 107, 145–150.
- McEligot, A.J., Rock, C.L., Flatt, S.W., Newman, V., Faerber, S. and Pierce, J.P., 1999. Plasma carotenoids are biomarkers of long-term high vegetable intake in women with breast cancer. *J. Nutr.*, 129, 2258-2263.
- Malisorn, C. and Stornsuk, W., 2008. Optimization of β -karoten production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresorce technology.*, 99, 2281-2287.
- Martin, A.M., Chun, L. and Thakor R.P., 1993. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extract. *J. Ferment Bioeng.*, 76, 321-325.
- Mascio, P. Di., Kaiser, S. and Sies, H., 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 532-538.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.*, 31, 426-428.
- Nakayama, T., Mackinny, G. and Phaff, H.J., 1954. Carotenoids in asporogenous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek. J.Microbiol.Serol.*, 20, 217-228.
- Nakayama, K.,1981. Sources of industrial microorganisms, *Biotechnology, Microbial Fundamentals*. Ed: H.J. Rehm and G. Reed, Verlag Chemie, Weinheim.355–410.

- Nelis, H.J. and De Leenheer, A.P., 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in food and feeds. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 181-191.
- Nishino H., 1997. Cancer prevention by natural carotenoids. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 27, 86-91.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist M.D., Blames, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh. J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., Barnhrt, S. and Hammar, S., 1996. Effects of a combination of β -carotene and vitaminA on lung cancer and cardiovascular disease. *New. Eng.J.Med.*, 334, 1150-1155.
- Orset, S. and Young, A.J., 1999. Low-temperature-induced synthesis of β -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 35, 520-527.
- Orset, S., Leach, G.C., Morais, R. and Young, A.J., 1999. Spray drying of microalga *Dunaliella salina*: Effects on β -carotene content and isomer composition. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4782-4790.
- Park, P.K., Cho, D.H., Kim, E.Y. and Chu, K.H., 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design *World Journal of Microbiology & Biotechnology.*, 21, 429-434.
- Park, P.K., Kim, E.Y. and Chu, K.H., 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology.*, 53, 148-152.
- Peter G.H., Ma, J., Giovannucci, E., Willett, W., Sacks, F.M., Hennekens, C.H. and Stampfer, M.J., 1999. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res.*, 59, 1225-1230.
- Peterson, W. J., Bell, T.A., Etchells, J.L. and Smart, W.W.G., 1954. A procedure for demonstrating the presence of carotenoid pigment in yeasts *J. Bacteriol.*, 67, 708-713.
- Peterson, W.J., Evans, W.R., Lecce, E., Bell, T.A. and Etchells, J.L., 1958. Quantitative determination of the carotenoids in yeasts of the genus *Rhodotorula*. *J.Bacteriol.*, 75, 586-591.
- Peto, P., Doll, R., Buckley J.D. and Sporn, M.B., 1981. Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, 290, 201-208.
- Pfander, H., 1992. Carotenoids: An overview, *Methods in Enzymology, Carotenoids Part A, Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation* volume 213, Ed: Packer, L. Academic press, San Diego, 3-13.
- Pierre, A., 1997. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. *Trends Food Sci. Technol.*, 8, 406-413.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 2003. Carotenoids. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Ed: Caballero, B. Academic Press, New York, 927-943.
- Rohdich F., Hecht S., Gartner K., Adam P., Krieger C., Amslinger S., Arigoni D., Bacher A. and Eisenreich W., 2002. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 99, 1158-1163.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin P, Sutter, B. and Sahm, H., 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.*, 295 (2), 517-524.
- Roukas T., 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, 33 (8), 805-810.
- Sang-Pill, H., Kim, M.H. and Hwang, J.K., 1998. Biological functions and production

- technology of carotenoids. Han'guk Sikk'um Yongyang Kwahak Hoechi, 27, 1297-1306.
- Scheibmeir, H.D., Christensen, K., Whitaker, S.H., Jegaethesan, J., Clancy, R., Pierce, J.D., 2005. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21, 24-28.
- Seddon, J.M., Ajani, U.A., Sperduto, R.D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T.C., Farber, M.D., Gragoudas, E.S. and Haller, J., 1994. Dietary carotenoids, vitamin A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.*, 272, 1413-1420.
- Sharma, A., Vivekanand, V. and Singh, R.P., 2008. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology*, 99, 3444-3450.
- Shi, X.M. and Chen, F., 1997. Stability of lutein under various storage conditions. *Nahrung*, 41, 38-41.
- Simpson, K. L., Nakayama, T.O.M. and Chichester C.O., 1964. Biosynthesis of yeast carotenoids. *J.Bacteriol.*, 88, 1688-1694.
- Simpson, K.L., 1992, Carotenoids vitamins part IV, *Encyclopedia of Food Science and Technology*, Ed: Hui, Y.H.Wiley, New York, 293-310, 2701-2712.
- Simova, E.D., Frengova, G.I. and Beshkova, D.M., 2004. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 31, 115-121.
- Siqueira, P.F., Karp, S.G. and Carvalho, J.C., 2008. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 99, 8156-8163.
- Slater, T.F., 1982. *Free Radicals, Lipid Peroxidation, and Cancer*, Academic Press, 243p London.
- Smith, T.A.D., 1998. Carotenoids and cancer: prevention and potential therapy. *Br. J. Biomed. Sci.*, 55, 268-275.
- Squina F.M., Yamashita F., Pereira J.L. and Mercadante A.Z., 2002. Production of Carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *Rhodotorula glutinis* in Culture Medium Supplemented with Sugarcane juice. *Food Biotechnology*, 16 (3), 227-235.
- Stahl, W. and Sies, H., 1996. Lycopene-A biologically important carotenoid for humans. *Arch. Biochem. Biophys.*, 336, 1-9.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. and Hall, S. J., 1997. *Principles of fermentation technology*, 2nd ed., New Delhi, India: Aditya, 93-105.
- Tinoi, J., Rakariyatham, N. and Deming, R.L., 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*. 40, 2551-2557.
- Temür, M., 2008. Muz Kabuğu Hidrolizatının Glutasyon Üretiminde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Türkkan, E., 2007. *Rhodotorula glutinis*' den Elde Edilen Karotenoidlerin Bazı Gıda Patojenleri Üzerine Antibakteriyel Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Türkoğlu, Z., 2009. Bazı *Rhizobium* Bakterilerinin Melas Besi ortamında Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Üretimlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fırat Üniversitesi, Elazığ.

- Ulubaş, H., 1991. Şeker Pancarı Melasının Yükseltgenerek Diğer Kimyasal Maddelere Dönüştürülmesi. Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Valduga, E., Valério, A., Treichel, Luccio, M.D. H. and Júnior, A.F., 2008a. Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. Journal of Chemical Technical Biotechnological, 83, 1267–1274.
- Valduga, E., Valério, A., Treichel, H., Júnior, A.F. and Luccio, M.D., 2008b. Optimization of the Production of Total Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) Using Response Surface Technique. Food Bioprocess Technol., 2, 415–421.
- Vandamme, E. J., 1992. Production of Vitamins, Coenzymes and Related Biochemicals by Biotechnological Processes. Journal of Chemical Technical Biotechnological, 53, 313-327.
- Yeniçel, N., 2006. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Suşlarının Melas, Peynir Altı Suyu ve Pancar Suyunda Ekzopolisakkarit (EPS) ve Laktik Asit Üretimlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yeum, K-J., Wolfgang, F., Robert, S., Russell, M. and Taylor, A., 1999. Fat-soluble nutrient concentrations in different layers of human cataractous lens Current Eye Research 19 (6) 502-505.
- Yoshiyuki, N., Minenaka, Y. and Ichimura, M., 1999. Effects of astaxanthin and vitamins on prevention of gastric ulceration of stressed rat. Koshien Daigaku Kiyo., 26, 45-52.
- Youping, H., Root, M.M., Parker, R.S. and Campbell, T.C., 1997. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver and on in vivo and in vitro antioxidant status. Nutr. Cancer, 27, 238-244.
- Weber, R.W.S., Anke, H. and Davoli P., 2007. Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). Journal of Chromatography A, 1145, 118–122.
- Wee, Y-G., Kim, J-N. and Yun, J-S. 2004. Utilization of sugar molasses for economical l(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* Enzyme and Microbial Technology, 35, 568–573.
- Wilhelm, S., and Helmut, S., 1996. Lycopene: A biologically important carotenoid for humans. Archives of Biochemistry and Biophysics, 336 (1), 1–9.
- Xuan Z., Xu, S. and Wang, Z., 1998. Gelatin as microencapsulating agent for β -carotene. Shipin Yu Fajiao Gongye., 24, 11-15.
- Zilbeyaz, K., Kurbanoglu, E.B., 2008. Production of (R)-1-(4-Bromo-phenyl)-ethanol by locally isolated *Aspergillus niger* using ram horn peptone. Bioresource Technology, 99, 6, 1549–1552.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2008 yılında birincilikle mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2010 yılından beri Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.