



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***ASPERGİLLUS BRASİLİENSİS*'TEN SIVI KÜLTÜR
KOŞULLARINDA ÜRETİLEN SEKONDER
METABOLİTLERİN TARANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Hatice Cemre ÜNVER

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

***ASPERGILLUS BRASILIENSIS*'TEN SIVI KÜLTÜR
KOŞULLARINDA ÜRETİLEN SEKONDER
METABOLİTLERİN TARANMASI**

Hatice Cemre ÜNVER

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Hatice Cemre ÜNVER tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Aspergillus brasiliensis*’ten Sıvı Kültür Koşullarında Üretilen Sekonder Metabolitlerin Taranması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 19/09/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Erdal BEDİR

Raportör Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN

Üye : Doç. Dr. Sayıt SARGIN

İmza


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Aspergillus brasiliensis*’ten Sıvı Kültür Koşullarında Üretilen Sekonder Metabolitlerin Taranması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

19 / 09 / 2019



Hatice Cemre ÜNVER

ÖZET***ASPERGILLUS BRASILIENSIS*'TEN SIVI KÜLTÜR
KOŞULLARINDA ÜRETİLEN SEKONDER METABOLİTLERİN
TARANMASI**

ÜNVER, Hatice Cemre

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN

Eylül 2019, 80 sayfa

Bu tezde sıvı kültür fermantasyonunda değişen kültür koşulları ve ortam bileşenleri sonunda *Aspergillus brasiliensis* tarafından üretilen sekonder metabolitler ve çeşitlilikleri incelenmiştir.

Üç farklı sıcaklık, çalkalama hızı, pH ve C/N oranı değerleri için deneysel tasarım uygulanarak YES broth ortamında yapılan üretimlerde hangi koşulların sekonder metabolit üretimi ve çeşitliliği üzerinde daha etkili olduğu taranmıştır. Tarama sonrasında sonuçlar değerlendirildiğinde beklenen en iyi sonucun sıcaklık 25 °C, çalkalama hızı 210 rpm, pH 6 ve C/N oranı 32 olduğunda elde edildiği görülmüştür.

Farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisinin incelenebilmesi için YES broth ortamı baz alınarak bir önceki denemede belirlenen koşullar altında, altı farklı karbon ve beş farklı azot kaynağının kombinasyonları ile üretimler gerçekleştirilmiştir. En fazla sekonder metabolit çeşitliliği sükroz & CSL kullanılan ortamda gözlenmiştir.

İz elementlerin etkisinin görülebilmesi için belirlenen koşullar altında ve sükroz & CSL içeren ortamlarda demir, mangan, bakır ve çinko elementlerinin kombinasyonları denenmiştir. Sonuç olarak sekonder metabolit profilleri açısından ortamlar arasında ciddi bir fark olmadığı ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: *Aspergillus brasiliensis*, sekonder metabolitler, sıvı kültür fermantasyonu, deneysel tasarım.

ABSTRACT**SCREENING OF SECONDARY METABOLITES PRODUCED IN
LIQUID CULTURE CONDITIONS FROM *ASPERGILLUS
BRASILIENSIS***

ÜNVER, Hatice Cemre

MSc in Bioengineering

Supervisor: Asst. Prof. İsmail Hakkı AKGÜN

September 2019, 80 pages

In this thesis, effects of variable culture conditions and media components on secondary metabolites produced by *Aspergillus brasiliensis* in liquid culture fermentation were investigated.

Experimental design was applied for three different values of temperature, agitation speed, pH and C/N ratio to determine which conditions were more effective on secondary metabolite production and diversity. After screening, the best results were obtained when the temperature was 25 °C, shaking speed 210 rpm, pH 6 and C/N ratio 32.

In order to examine the effect of different carbon and nitrogen sources, the productions were made with combinations of six different carbon and five different nitrogen sources based on YES broth medium. The highest secondary metabolite diversity was observed in sucrose and CSL medium.

Combinations of iron, manganese, copper and zinc were tested in sucrose & CSL medium under the determined conditions in order to see the effect of trace elements. In conclusion, there is no significant difference between the media in terms of secondary metabolite profiles.

Keywords: *Aspergillus brasiliensis*, secondary metabolites, submerged fermentation, experimental design.

ÖNSÖZ

Aspergillus brasiliensis'in farklı koşullardaki sıvı kùltür fermantasyonu ile sekonder metabolit üretimi ve metabolitlerin taranması hakkında gerçekleştirilmiş ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez kapsamında filamentöz bir fungus olan *Aspergillus brasiliensis*'in sıvı kùltür fermantasyonunda sekonder metabolit üretiminin değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır.

Tez süresince saygıdeğer hocalarımla da yardım ve destekleriyle deney tasarımları gerçekleştirilmiş, tasarlanan deneyler uygulanmış ve elde edilen verilerin analizi gerçekleştirilmiştir.

İZMİR

19/09/2019

Hatice Cemre ÜNVER

İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK.....	
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER DİZİNİ	xxiii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Aspergillus section Nigri</i> (Siyah Aspergilli)	2
2.1.1. <i>Aspergillus brasiliensis</i>	2
2.2. Sekonder Metabolitler	3
2.3. Fermantasyon.....	7

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.1. Fermantasyon teknikleri	7
2.3.2. Fermantasyonu etkileyen parametreler.....	9
2.4. Optimizasyon	13
2.4.1. Optimizasyon teknikleri	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Mikroorganizmalar	18
3.1.2. Besin ortamları	18
3.1.3. İz elementlerin stok çözeltileri.....	21
3.1.4. Organik çözenler	21
3.1.5. Cihaz ve ekipmanlar	21
3.2. Yöntem	23
3.2.1. <i>Aspergillus brasiliensis</i> 'in sıvı kültür üretim koşullarının (sıcaklık, çalkalama hızı, pH, C/N)) incelenmesi	23
3.2.2 Sıvı kültür üretim ortamlarının hazırlanması.....	25
3.2.3. Spor solüsyonunun hazırlanması.....	25
3.2.4. Mikroorganizmaların inokülasyonu	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.5. Mikroorganizmaların inkübasyonu	26
3.2.6. Sıvı üretim ortamının filtrasyonu.....	26
3.2.7. Sıvı üretim ortamından elde edilen misel ve süpernatantta yer alan metabolitlerin ekstraksiyonu.....	27
3.2.8. HPLC analizi	29
3.2.9. Veri analizi	30
4. BULGULAR	31
4.1. <i>Aspergillus brasiliensis</i> 'in Sıvı Kültürde Büyüme Özellikleri.....	31
4.1.1. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki büyüme özellikleri.....	31
4.1.2. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretim ortamındaki büyüme özellikleri	31
4.1.3. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretim ortamındaki pellet morfolojisi	34
4.2. Deneysel Tasarım ile Belirlenen <i>Aspergillus brasiliensis</i> 'in Sıvı Kültür Üretim Koşullarının (Sıcaklık, Çalkalama Hızı, pH ve C/N) Sonuçları	35
4.3. Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Kullanıldığı Sıvı Kültür Üretiminin Sonuçları	41
4.4. İz Element Kombinasyonlarının Denendiği Sıvı Kültür Üretiminin Sonuçları	48

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.5. Veri Analizlerinin Değerlendirilmesi	52
4.5.1. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarının veri analizi sonuçları.....	52
4.5.2. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretiminin veri analizi sonuçları.....	56
4.5.3. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretiminin veri analizi sonuçları.....	59
5. GENEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	62
6. ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR DİZİNİ	66
TEŞEKKÜR	77
ÖZGEÇMİŞ.....	78
EKLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Okratoksin A'nın kimyasal yapısı (Hodgson, 2012).	4
2.2. Fumonisin B2'nin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).	4
2.3. Monomerik nafto- γ -pironların üç ana grubunun kimyasal yapıları (Nielsen et al., 2009).	4
2.4. Seçilmiş bazı bikoumarinlerin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).	5
2.5. Bazı seçilmiş malforminlerin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).	5
2.6. Asperazinin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).	6
2.7. Alkaloidlerin beş grubuna ait kimyasal yapılar (Nielsen et al., 2009).	7
2.8. Bir biyoprosesin üretim performansını etkileyen parametrelerin sınıflandırılması (Vaidyanathan et al., 1999; Fazenda et al., 2008).	9
2.9. Ortam optimizasyonunda kullanılan yöntemler (Singh et al., 2017).	14
4.1. Sıcaklığın 25 °C, çalkalama hızının 210 rpm, pH'ın 6 ve C/N oranının 32 olduğu üretim koşullarında bir hafta inkübe edilen <i>Aspergillus brasiliensis</i>	31
4.2a. Bir haftalık inkübasyon sonrası galaktoz ve soldan sağa doğru NaNO ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , pepton, YE, CSL içeren fermantasyon ortamları.	32
4.3. Bir haftalık inkübasyon sonrası iz element kombinasyonlarını içeren fermantasyon ortamları (Soldan sağa doğru TMS yok, TMS, TMS+Fe, TMS+Mn ve TMS+Fe+Mn).	34
4.4. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen misel ekstre örnekleri.	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen süpernatant ekstre örnekleri.	35
4.6. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen misel ekstre örneklerinin bir arada bulunduğu HPLC analizi kromatogramları.	36
4.7. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen süpernatant ekstre örneklerinin bir arada bulunduğu HPLC analizi kromatogramları.	37
4.8. Farklı karbon ve azot kaynaklarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen misel ekstre örnekleri.	41
4.9. Farklı karbon ve azot kaynaklarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen süpernatant ekstre örnekleri.	41
4.10. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen misel ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları.	42
4.11. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen süpernatant ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları.	43
4.12. Sükroz & CSL ortamının misel ekstresi, süpernatant ekstresi ve kontrolüne ait HPLC analizi kromatogramlarının karşılaştırılması.	47
4.13. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen misel ekstre örnekleri.	48
4.14. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen süpernatant ekstre örnekleri.	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.15. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen misel ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları. . . 49	
4.16. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen süpernatant ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları. 50	
4.17. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen majör pikler kullanılarak oluşturulmuş hiyerarşik sınıf analizi grafiği. 53	
4.18. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen misel ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak oluşturulmuş hiyerarşik sınıf analizi grafiği. . 54	
4.19. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen süpernatant ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak oluşturulmuş hiyerarşik sınıf analizi grafiği. . 55	
4.20. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimine ait pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği. 56	
4.21. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimine ait misel ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği. 57	
4.22. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimine ait süpernatant ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği. 58	
4.23. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimine ait örneklerdeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği. 59	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 4.24. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimine ait misel ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği. 60
- 4.25. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimine ait süpernatant ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği. 61



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. YES broth ortam içeriği (Samson et al., 2014).....	18
3.2. TMS içeriği (Samson et al., 2014).....	19
3.3. YES broth ortamına koyulan farklı karbon ve azot kaynakları ve 1 litredeki miktarları.	20
3.4. İz element kombinasyonları denemesi için hazırlanan ortamların içerdiği bileşenler ve litredeki miktarları.	21
3.5. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür üretim koşullarına ait deney seti.	24
3.6. HPLC analiz metodunun koşulları.	29
3.7. HPLC analiz metodunun mobil faz değişimi (Gradient: 0.75).....	30
4.1. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretimin misel ekstraksiyonu sonrası yaş ağırlık, ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.	38
4.2. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretimin süpernatant ekstraksiyonu sonrası ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.	39
4.3. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinin misel ekstraksiyonu sonrası yaş ağırlık, ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.	44
4.4. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinin süpernatant ekstraksiyonu sonrası ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.	45

TABLolar DİZİNİ (devam)TabloSayfa

- 4.5. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimlerinin misel ekstraksiyonu sonrası yaş ağırlık, ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.51
- 4.6. İz element kombinasyonlarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinin süpernatant ekstraksiyonu sonrası ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.51



SİMGELER DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
C	karbon
Fe	demir
Mn	mangan
N	azot
°C	santigrat derece (sıcaklık birimi)

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BBD	Box-Behnken Design
CCD	Central Composite Design
CSL	Corn Steep Liquor
DAD	Diode Array Detection
dk	dakika
DoE	Desing of Experiments
g	gram
GRAS	Generally Regarded As Safe
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography
ITS	Internal Transcribed Spacer
L	litre
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
MEA	Malt Extract Agar
mg	miligram
ml	mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
nm	nanometre
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OFAT	One-Factor-at-a-Time
PBD	Plackett-Burman Design
PTFE	Polytetrafluoroethylene
rpm	revolutions per minute
RSM	Response Surface Methodology
SmF	Submerged Fermentation
SSF	Solid State Fermentation
TFA	Trifluoroacetic Acid
TMS	Trace Metal Solution
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV-VIS	Ultraviolet-Visible
YE	Yeast Extract
YES	Yeast Extract Sucrose

1. GİRİŞ

Siyah Aspergilli (*Aspergillus section Nigri*; Gams et al., 1985) modern toplum üzerinde önemli etkilere sahiptir. Fermantasyon endüstrisinde amilaz, lipaz gibi hidrolitik enzimlerin, glukonik asit, sitrik asit gibi organik asitlerin ve farmasötik olarak önemli metabolitlerin üretiminde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bazı türleri insanlar ve hayvanlar için zararlı olan ve gıda bozulmalarına sebebiyet veren okratoksin, fumonisin gibi mikotoksinleri üretmektedir (Varga et al., 2000).

Ayrıca, belirli endüstriyel koşullarda kullanılan *Aspergillus niger*'e ABD hükümetinin Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (genellikle güvenli olarak kabul edilir) statüsü verilmesinden bu yana genetik manipülasyonlar için aday olarak görülmektedir (Samson et al., 2007; Varga et al., 2007).

Bu grupta yer alan türler dünya çapında bir dağılım göstermekte ve toprakta, tahıllarda, mandıra ve yem ürünlerinde, çeşitli meyve ve sebzelerde, et ürünlerinde, pamuklu tekstil ürünleri ve kumaşlarda bulunmaktadır (Raper and Fennell, 1965; Pitt and Hocking, 2009; Jurjević et al., 2012). Siyah Aspergilli'nin asıl kaynağı toprak olmasına rağmen, bu grubun üyeleri çok çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir (Kozakiewicz, 1989; Abarca et al., 2004; Samson et al., 2004; Ferracin et al., 2009).

Siyah Aspergilli; biyoteknoloji, tıp ve gıda alanındaki önemi sebebiyle fungusların çeşitli yönleriyle ilgilenen çalışmalarda ilk sıralarda yer almaktadır (Varga and Samson, 2008).

Bu tez kapsamında; sıvı kültür fermantasyonundaki kültür koşulları (sıcaklık, pH, çalkalama hızı, C/N oranı) ve besin ortamı içeriklerinin (farklı karbon ve azot kaynağı kullanımı ve iz elementlerin kombinasyonu) değişmesi durumunda, endüstriyel açıdan önemli sekonder metabolitleri üretme potansiyeline sahip siyah Aspergilli grubunda yer alan *Aspergillus brasiliensis* tarafından üretilen sekonder metabolitlerin ve metabolit çeşitliliğinin taranması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Aspergillus section Nigri* (Siyah Aspergilli)

Siyah Aspergilli, sınıflandırılması ve tanımlanması zor olan gruplardan biridir (Abarca et al., 2004). Yeni moleküler yaklaşımlar biyolojik çeşitliliklerinin yüksek olduğunu fakat türlerin sadece fenotipik karakterlerine bakılarak tanınmasının zor olduğunu göstermiştir (Samson et al., 2007).

Aspergillus taksonomisinde farklı yöntemler kullanılabilir. Sınıflandırma ve tanımlama için yeni polifazik yaklaşımlar önerilmektedir (Samson et al., 2007, 2014). Bu yaklaşımlar; ITS (intergenic transcribed spacer) bölgesinin ve β -tübülin (β -tubulin) ve kalmodulin (calmodulin) genlerinin sekans analizini, morfolojik analizleri ve metabolit profillerinin karakterizasyonunu kapsamaktadır (Cabañes and Bragulat, 2018).

2.1.1. *Aspergillus brasiliensis*

Varga ve arkadaşları (2007) dünya çapında farklı yerlerden toplanan örneklerin incelenmesi sırasında bazı türlerin *Aspergillus section Nigri*'den farklı özelliklere sahip olduğunu görmüş ve bu yeni türlerin değişkenliğini görmek için polifazik taksonomik bir yaklaşım kullanmışlardır. Fenotipik analizler için izolatların makro ve mikromorfolojileri incelenmiş, enzim ve sekonder metabolit profillerine bakılmıştır. Genetik çalışmalar için ise β -tübülin ve kalmodulin genleri, ITS bölgesi ve AFLP profilleri analiz edilmiştir (Varga et al., 2007).

Bu çalışmalar sonunda; yeni türün izolatlarının *A. niger* ve *A. tubingiensis*'te yaygın olan nafto- γ -piron (naphtho- γ -pyrones), tensidol A ve B ve pirofen (pyrophen) ürettiği ama okratoksin A (ochratoxin A), kotanin (kotanins), veya pironigrin (pyranonigrins) üretmediği görülmüştür. Bunların yanında başka türlerde olmayan birkaç benzersiz metabolit ürettiği de keşfedilmiştir (Varga et al., 2007).

Brezilya, Avustralya, ABD ve Hollanda'dan gelen topraktan ve Portekiz'den gelen üzümlerden izole edilen izolatlar morfolojileri, genetik özellikleri ve metabolit profilleri bakımından diğer türlerden farklı olduğu için yeni bir tür olarak literatüre kazandırılmış ve *Aspergillus brasiliensis* olarak adlandırılmıştır (Varga et al., 2007).

2.2. Sekonder Metabolitler

Mikrobiyal sekonder metabolitler, mikroorganizmaların geç büyüme evresi (idiofaz) sırasında üretilen, düşük moleküler kütleli bileşiklerdir (Ruiz et al., 2010). Sekonder metabolitler, mikrobiyal büyüme için zorunlu olmayıp mikroorganizmalar tarafından doğada hayatta kalma fonksiyonları için üretilmektedir (Demain ve Fang, 2000). Bu metabolitler biyotik ve abiyotik streslere karşı üretilen savunma bileşikleridir (Pichersky and Gang, 2000).

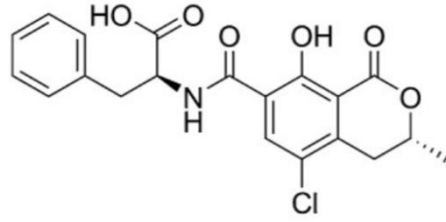
Sekonder metabolitler biyosentetik orijinlerine göre sınıflandırılmakta, farklı biyolojik aktivite göstermekte ve endüstriyel alanda ilaç (antibiyotik, antitümör ajan, antiviral ve antiparazitik ajan, bağışıklık sistemini baskılayıcı ajan vb.), aroma, koku veya renk verici ajan, gıda katkı maddesi veya biyopestisit olarak kullanılmaktadır (Murthy et al., 2014).

Mikrobiyal sekonder metabolitler, ilaç keşfi ve gelişimi için yeni bileşiklerin birincil kaynağı olarak kabul edilmektedir (Gunatilaka, 2006; Rateb et al., 2011; Deng et al., 2013). 1981-2010 yılları arasında yeni ilaçların kaynağını araştıran Newman ve Cragg'e (2012) göre, yeni tanıtılan anti-enfektif ve anti-kanser ilaçlarının sırasıyla % 69 ve % 75'i doğal ürünler veya türevleridir. Bu durum, doğal ürünlerin önemini ve yeni ilaçların keşfedilmesi için devasa potansiyeli göstermektedir (Kim et al., 2016).

Siyah Aspergilli'nin bütün türleri çok sayıda sekonder metabolit üretmektedir. Örneğin, insan ve hayvan güvenliği açısından en sorunlu bileşikler birer mikotoksin olan okratoksin A ve fumonisin B2'dir. Bunların dışında siyah Aspergilli tarafından yüksek miktarlarda üretilen malformin, nafto- γ -piron ve kotanin (bicoumarin, bicoumarin) gibi bileşikler de biyoteknoloji, gıda, yem ürünlerinde varlığı ve toksik etkisinin takip edilmesi gereken metabolitlerdir. Diketopiperazin asperazin (diketopiperazine asperazine) bazı türlerin tanımlanmasında pozitif markör olarak kullanılabilir (Nielsen et al., 2009).

Bu grupta yer alan türlerin ürettiği bazı sekonder metabolitler şunlardır:

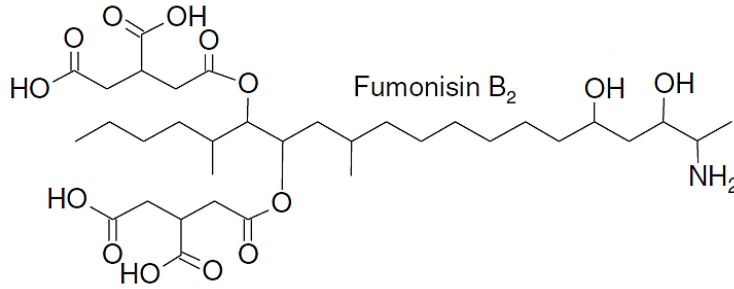
Okratoksinler: Okratoksin A ve türevleri (okratoksin B, β ve α) *A. niger* tarafından üretilen en önemli mikotoksindir (Nielsen et al., 2009).



Ochratoxin A

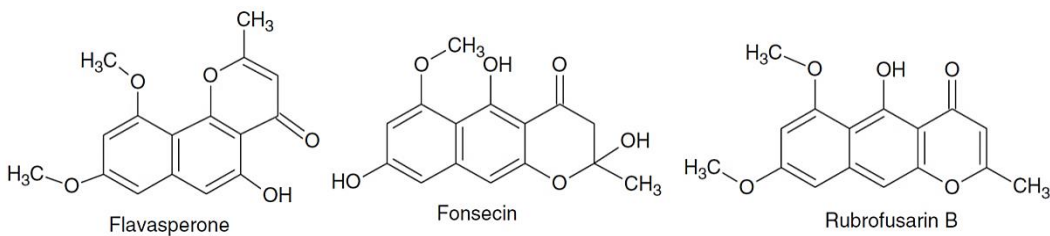
Şekil 2.1. Ochratoxin A'nın kimyasal yapısı (Hodgson, 2012).

Fumonisinler: Poliketit türevi mikotoksinlerin bir grubudur. İnsanlar için karsinojenik etkileri sebebiyle büyük öneme sahiptir (Nielsen et al., 2009).

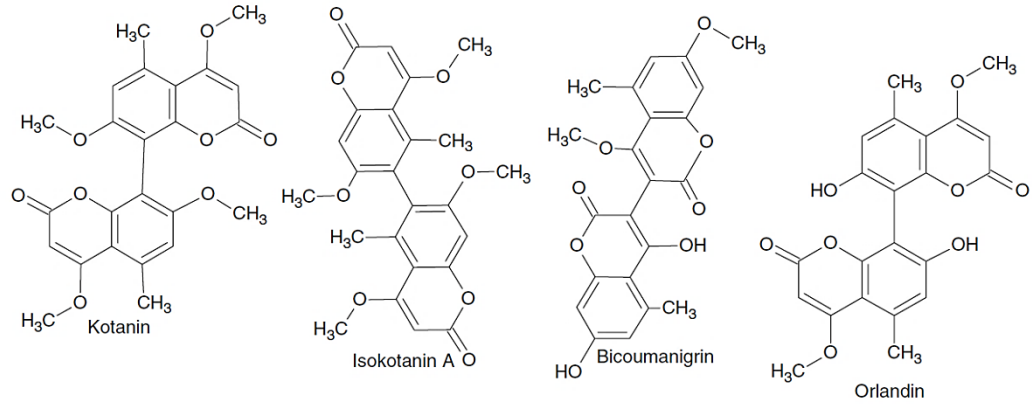


Şekil 2.2. Fumonisin B2'nin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).

Nafto- γ -pironlar: Her koşul altında siyah Aspergilli türleri tarafından üretilebildiği için kantitatif olarak en baskın üretilen sekonder metabolittir. Antibakteriyel (Song et al., 2004), antifungal (Koyama et al., 1988) ve sitotoksik (Koyama et al., 1988; Song et al., 2004) etki göstermektedir.

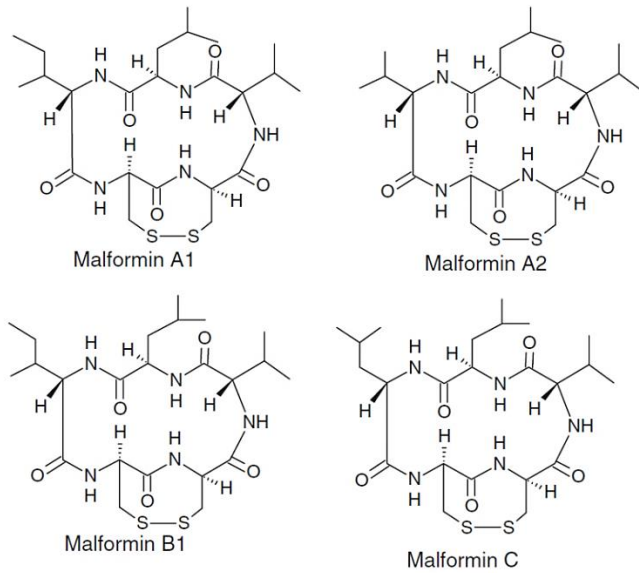
Şekil 2.3. Monomerik nafto- γ -pironların üç ana grubunun kimyasal yapıları (Nielsen et al., 2009).

Bikoumarinler: Sinnamik asit laktondan türevlenen bir grup heterosiklik dimerden oluşan bileşiklerdir (Nielsen et al., 2009).



Şekil 2.4. Seçilmiş bazı bikoumarinlerin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).

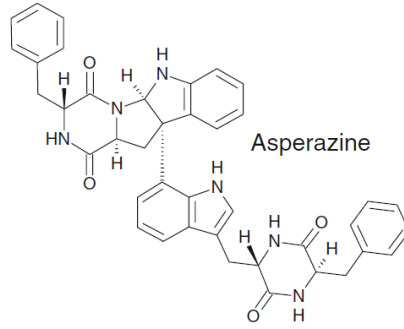
Malforminler: Bitkilerde malformasyona neden olduklarından bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Antibakteriyel özellik göstermekte (Kobbe et al., 1977) ve çeşitli insan hücrelerinde interlökin-1 β bağlanmasını engellemektedir (Herbert et al., 1994). Bu türlerden sadece *A. niger*, *A. tubingensis* ve *A. brasiliensis* malformin üretmektedir (Nielsen et al., 2009).



Şekil 2.5. Bazı seçilmiş malforminlerin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).

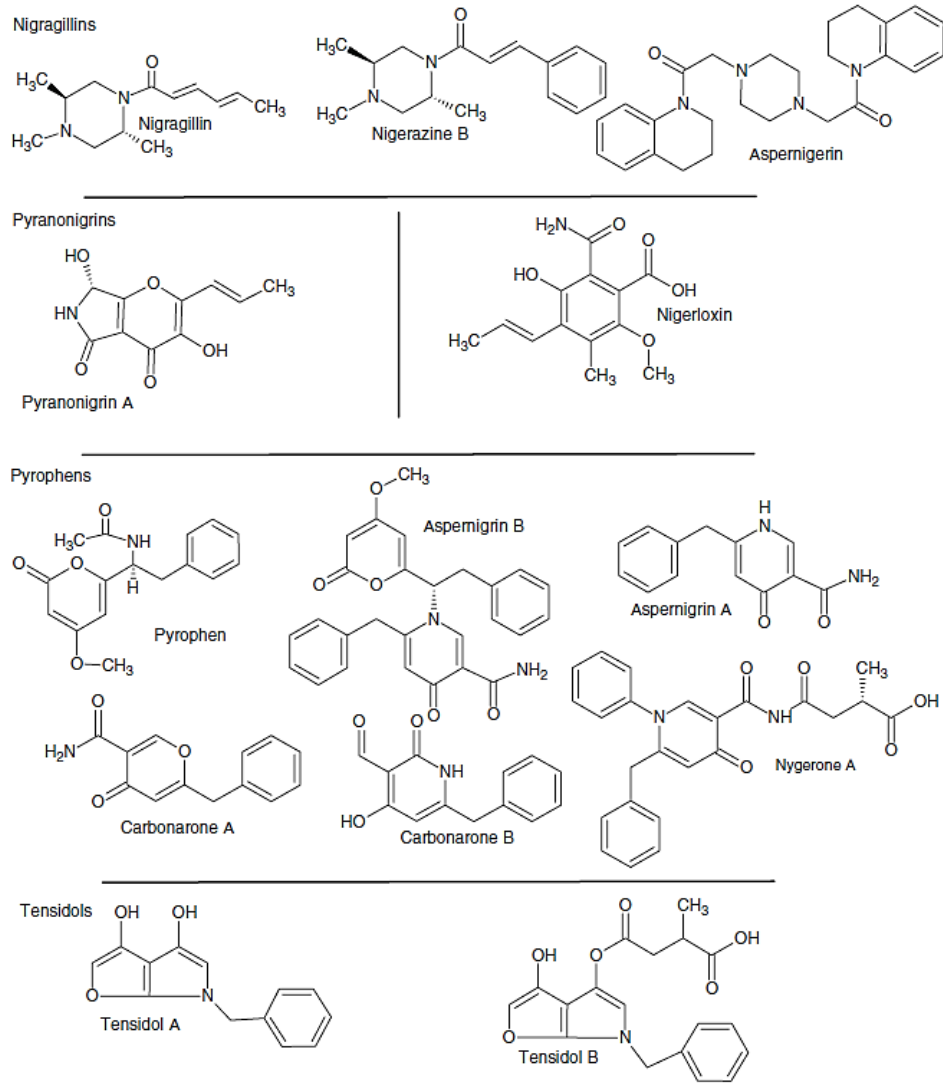
Asperazinler: Diketopiperazin dimeri olan karmaşık bileşiklerdir. İnsan lösemisine karşı *in vitro* sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiş (Varoğlu et al.,

1997) ancak *in vivo* olarak bu sonuç henüz doğrulanmamıştır (Nielsen et al., 2009; Lamboni et al., 2016).



Şekil 2.6. Asperazinin kimyasal yapısı (Nielsen et al., 2009).

Fumonisin, okratoksin, malformin ve asperazinlerin yanı sıra azot içeren başka alkaloidler de üretilmektedir. Bu alkaloidler nigragillin (nigragillins), piranonigrin (pyranonigrins), nigerloksin (nigerloxin), pirofen (pyrophens) ve tensidol (tensidols) olarak sınıflandırılabilir (Nielsen et al., 2009).



Şekil 2.7. Alkaloidlerin beş grubuna ait kimyasal yapılar (Nielsen et al., 2009).

Sonuç olarak *Aspergillus* section *Nigri*'deki türler çok çeşitli sekonder metabolitlerin üretimini gerçekleştirmektedir. Bu grupta yer alan türlerde yeni sekonder metabolitlerin ya da yeni biyosentetik yolların keşfedilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir.

2.3. Fermantasyon

2.3.1. Fermantasyon teknikleri

Fermantasyon teknolojisi ilaç, gıda ve kimya endüstrisinde ekonomik açıdan büyük öneme sahip çeşitli bileşiklerin üretimi için yaygın olarak kullanılan bir teknolojidir. (Singh et al., 2017). Yıllar geçtikçe fermantasyon teknikleri

ekonomik ve çevresel avantajları nedeniyle büyük önem kazanmıştır (Subramaniyam and Vimala, 2012).

Fermantasyon, esas olarak fermantasyon sırasında kullanılan substrat tipine bağlı olarak katı kültür fermantasyonu (Solid State Fermentation - SSF) ve sıvı kültür fermantasyonu (Submerged Fermentation - SmF) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu fermantasyon teknikleri; kullanılan organizmaların özelliklerine, kullanılan substratlar ve çevresel faktörler gibi çeşitli parametrelere dayanarak daha da geliştirilmektedir (Subramaniyam and Vimala, 2012).

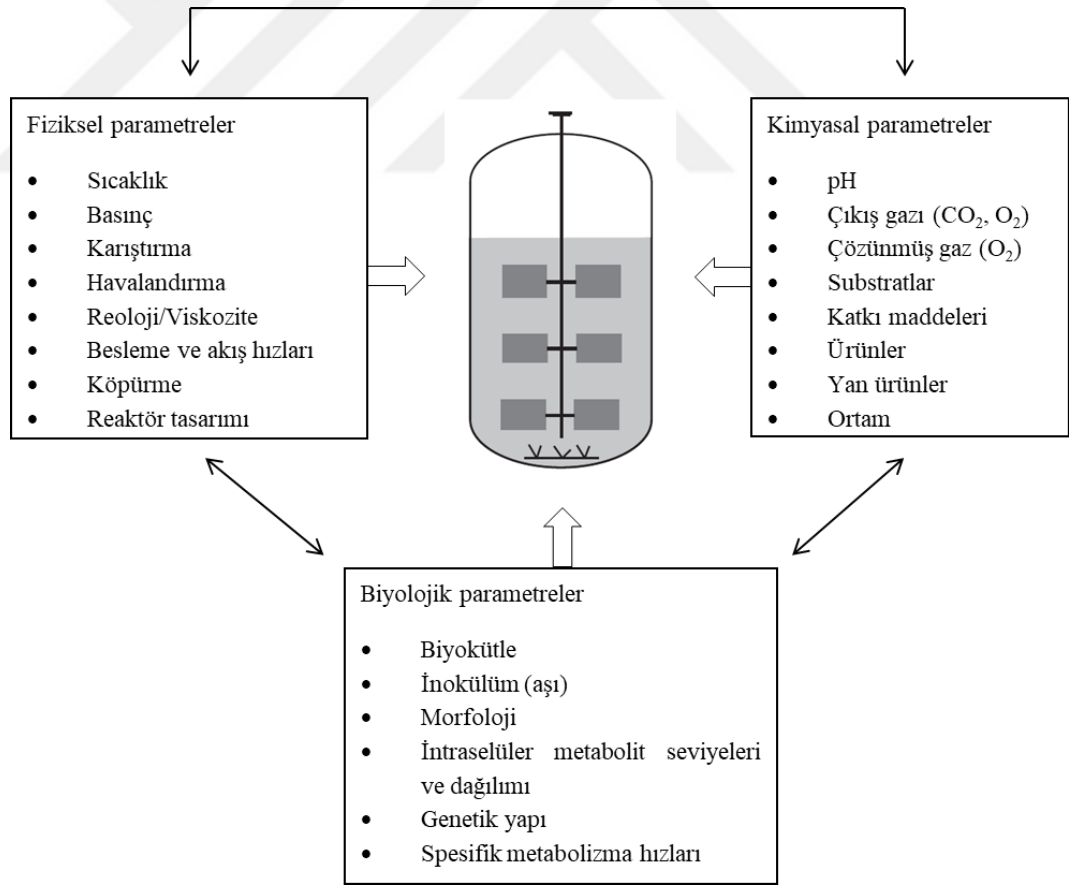
Katı kültür fermantasyonu, mikrobiyal gelişim için yeterli derecede nem ve besin öğelerine sahip kepek, küspe, kağıt hamuru gibi katı substratlar üzerinde gerçekleşen bir üretim sürecidir. Mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olan nem, katı içerisinde absorblanmıştır (Pandey, 2003; Prabhakar et al., 2005; Suriya et al., 2016). Bu substratların kullanılmasının en büyük avantajı besin açısından zengin katı atıkların substrat olarak kullanılarak geri dönüştürülebilmesidir. Bu fermantasyon tekniğinde substratlar çok yavaş ve düzenli bir şekilde kullanıldığından üretim uzun süre aynı substrat ile devam edebilmektedir (Subramaniyam and Vimala, 2012). Katı kültür fermantasyonu az nem ihtiyacı olan fungus ve mikroorganizmalar için oldukça uygun bir tekniktir. Fakat küçük ölçekte verimli bir şekilde üretim gerçekleştirilebilirken büyük ölçekli üretimlerde sıkıntılar yaşanmaktadır (Hölker and Lenz, 2004).

Sıvı kültür fermantasyonu sıvı ortamda gerçekleşen bir fermantasyon tekniğidir. Substratlar ortamda oldukça hızlıca tükendiği için ortama sürekli besleme yapılması gerekmektedir. Bakteri gibi yüksek nem ihtiyacı olan mikroorganizmalar için en uygun yöntemdir (Couto and Sanromán, 2006; Subramaniyam and Vimala, 2012). Bu fermantasyon tekniğinde sıcaklık, pH, nem, oksijen transferi, havalandırma gibi proses parametreleri kolayca takip edilip kontrol altında tutulabilmektedir (Kunamneni et al., 2005). Besinlerin ve oksijenin ortamda kolayca çözünmesinden ötürü kütle ve ısı transferi iyi bir şekilde gerçekleşmektedir. Kültür ortamı katı kültür ortamına göre daha homojendir. Belirtilen bu durumlar bu tekniğin güvenilir ve tekrarlanabilir olmasını sağlamaktadır (Fazenda et al., 2008). Ayrıca katı kültür fermantasyonu ile kıyaslandığında; genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmaların büyümesi, ortam sterilizasyonu, saflaştırma ve son ürünlerin geri kazanımında sıvı kültür fermantasyonu daha avantajlıdır (Suriya et al., 2016).

Sıvı kültür fermantasyonu, ticari uygulamalar için tercih edilen fermantasyon tekniği haline gelmiştir (Fazenda et al., 2008). Ekonomik ve sosyal öneme sahip sekonder metabolitlerin büyük çoğunluğu sıvı kültür fermantasyonuyla üretilmektedir (Singh et al., 2010). Filamentöz funguslardan sekonder metabolit üretimi için de endüstriyel olarak kullanılan bir yöntemdir (Gibbs et al., 2000).

2.3.2. Fermantasyonu etkileyen parametreler

Bir biyoprosesi etkileyen parametreler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.8). Bu parametrelerin değişiklik göstermesi biyokütleyi ve üretilen son ürünü etkilemektedir. Optimum kültür koşulları; üretilmek istenen ürünün biyokütle ya da bir metabolit olup olmamasına ve kullanılan mikroorganizmaya göre şekillenmektedir (Fazenda et al., 2008).



Şekil 2.8. Bir biyoprosesin üretim performansını etkileyen parametrelerin sınıflandırılması (Vaidyanathan et al., 1999; Fazenda et al., 2008).

Bazı proses parametrelerinin üretime etkisi aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır:

Sıcaklık: Sıcaklık; çözülmüş oksijen, ortamın buharlaşma hızı, büyüme hızı, pellet oluşumu ve ürün oluşumu gibi diğer kültür değişkenlerini etkilemektedir (Papagianni, 2004). Artan sıcaklık genellikle metabolizma hızını artırmakta fakat oksijenin ortamdaki çözünürlüğünü azaltmaktadır. Sıcaklıktaki küçük değişimler verimliliği önemli derecede azaltabilmektedir (Fazenda et al., 2008).

Fungusların sıvı kültürde 25 °C – 36 °C sıcaklık aralığında daha iyi büyüme gösterdiği bilinmektedir ve çalışmalarda bu sıcaklık aralığı tercih edilmektedir (Francis et al., 2003; Samson et al., 2007; Fazenda et al., 2008; Ho and Iyilia, 2015; Talukdar et al., 2016).

pH: Ortamın başlangıç pH değeri; hücre morfolojisi ve yapısını, hücre membran fonksiyonunu, tuzların çözünürlüğünü, substratların tüketim hızlarını ve biyokütle ve metabolit üretimini etkileyebilmektedir (Fang and Zhong, 2002).

Tarama ve optimizasyon çalışmalarında genellikle 5-7 arasındaki pH değerleri seçilerek pH'ın üretim üzerindeki etkileri incelenmektedir (Dasu et al., 2003; Djekrif-Dakhmouche et al. 2006; Teng and Xu, 2008; Talukdar et al., 2016).

Karıştırma: Karıştırma hızı ısı ve kütle transferini etkilediğinden mikroorganizmaların büyüme hızının belirlenmesinde önemli bir faktördür. Ayrıca karıştırma hücre içi ve dışı arasında konsantrasyon farkı oluşturarak difüzyon hızını artırmakta ve yan ürünlerin ve atık gazların ortamdaki uzaklaşmasını sağlamaktadır (Oh et al., 2007). Aerobik proseslerde, hücrelere yeterli miktarda oksijen sağlanabilmesi için uygun karıştırma gerekmektedir. Bununla beraber misel oluşumu karıştırmadan dolayı oluşan kayma geriliminden olumsuz etkilenmektedir. Kayma gerilimi, hücre yapısına zarar vermektedir. Aynı zamanda morfolojik değişimlere ve büyüme hızında ve ürün oluşumunda farklılıklara neden olmaktadır (Papagianni, 2004). Bu nedenle optimum karıştırma hızı hücrelere yeterli oksijen sağlanması ile kayma gerilimi arasındaki denge açısından önemli bir parametredir (Wagner et al., 2003).

150 – 250 rpm arasındaki karıştırma hızı araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen bir aralıktır (Dasu et al., 2003; Teng and Xu, 2008)

Havalandırma: Havalandırma, karıştırma ile birlikte hücrelerin oksijen ihtiyacını karşıladığı için kritik bir faktördür. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu; biyokütle ve diğer substrat konsantrasyonlarından 10 kat hızlı değiştiği için optimize edilmesi gereken önemli bir değişkendir (Gomes ve Menawat, 2000).

İnkübasyon süresi: İnkübasyon süresi sıklıkla ürünün son kalitesini etkilemektedir (Fazenda et al., 2008). Funguslar genel olarak 7 gün inkübe edilmektedir (Samson et al., 2014).

İnokülüm (Aşı): İnokülüm miktarının ve formunun fungal fermantasyon üzerinde etkisi olduğu kabul edilmektedir. İnokülüm miktarı, tipi ve yaşı gibi faktörler de hücrenin morfolojik durumunu, özellikle pellet üretimini etkileyebilmektedir (Gibbs et al., 2000; Fazenda et al., 2008).

Sekonder metabolizma; öncüller, karbon ve azot kaynakları, fosfat, iz elementler, sekonder metabolizma enzimlerinin indüksiyonu, geri besleme inhibisyonu gibi faktörler tarafından düzenlenmektedir (Parra et al., 2005).

Besinlerin türü ve ortamdaki konsantrasyonları, primer ve sekonder metabolitlerin üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Çünkü ortamdaki farklı besinlerin varlığına bağlı olarak hücreler farklı metabolik yollar kullanmaktadır (Kim et al., 2016). Temel bir besin kaynağının ortamda sınırlı miktarda bulunması hücrelerin büyümesini ve/veya ürün oluşumunu kısıtlayabilmektedir. Metabolit üretimini diğer ortam bileşenlerine göre karbon ve azot kaynakları daha çok etkilemektedir (Singh et al., 2017). Ayrıca C/N oranı da fermantasyon ürünlerini etkileyen önemli faktörlerden biridir (Karakoç ve Aksöz, 2004; Brzonkalik et al., 2012; Dinarvand et al., 2013).

Karbon kaynağı: Mikroorganizmalara enerji sağlamakta, büyüme ve sekonder metabolit üretiminde oldukça önemli bir rol oynamakta ve sekonder metabolitlerin karbon birimlerini oluşturmaktadır (Singh et al., 2017; Pan et al., 2019).

Funguslar tarafından monosokkaritler ve disakkaritler polisakkaritlerden daha hızlı metabolize edildiği için karbon kaynağı olarak bunlar tercih

edilmektedir (Mattey, 1992; Show et al., 2015). Funguslar ile yapılan çalışmalarda karbon kaynağı olarak sıklıkla glikoz, sükröz, maltoz, laktoz, gliserol kullanılmaktadır (Lai et al., 2003; Fazenda et al., 2008; Singh et al., 2017).

Azot kaynağı: Tıpkı karbon kaynakları gibi azot kaynaklarının türü ve konsantrasyonları da metabolit üretiminde önemli bir parametredir. Azot kaynağı nükleik asitlerin, esansiyel proteinlerin ve sekonder metabolitlerdeki azot içeren birimlerin sentezi için gerekmektedir (Pan et al., 2019). Azot kaynaklarının sekonder metabolizma üzerindeki etkisi; üretici organizmaya, organizmanın kullanacağı metabolik yolağa, azot kaynaklarının türü ve konsantrasyonuna ve kültürün katı ya da sıvı olup olmadığına bağlı olarak şekillenmektedir (Parra et al., 2005).

Mikroorganizmalar hem inorganik (nitrit, nitrat, amonyum tuzları) hem organik (amino asit, kazein, pepton) azot kaynaklarını kullanabilmektedir (Singh et al., 2017). Azot bakımından zengin olan melas, mısır ıslatma şurubu, peynir altı suyu tozu, soya unu, maya ekstraktı da azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Fazenda et al., 2008).

Sekonder metabolik yollar, büyüme üzerinde olumlu etkisi olan azot kaynaklarından genellikle olumsuz etkilenmektedir (Betina, 1994). Demain'in (1992) yaptığı bir çalışmada sefalosporin ve diğer metabolitlerin üretiminde amonyum tuzlarının olumsuz etkilerinden söz edilmektedir (Parra et al., 2005). Spesifik amino asitlerin kullanılması bazı durumlarda verimi artırırken uygun olmayan amino asitlerin kullanılması sekonder metabolit sentezini inhibe edebilmektedir (Marwick et al., 1999; Singh et al., 2017).

Metaller ve diğer iyonlar: Temel metaller ve diğer iyonlar fungal büyüme için gerekmektedir. Genellikle tuz (örneğin magnezyum sülfat ve potasyum fosfat) olarak düşük seviyelerde ortama eklenmektedir. Enzimler için kofaktör olarak görev yapmaları nedeniyle birçok iz elementin (demir, bakır, manganez, çinko ve molibden) büyüme açısından gerekli olduğu bilinmektedir (Fazenda et al., 2008). Sekonder metabolizma için en önemli iz elementler demir, mangan ve çinkodur. Bu üç elementin aflatoksin üretimindeki önemi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (Betina, 1994; Parra et al., 2005).

Fermantasyon prosesleri yıllar boyunca kullanılıyor olmasına rağmen sürdürülebilir ürün üretimine duyulan pazar ihtiyaçları, karşılanması zorlu bir

talep ortaya koymaktadır. Herhangi bir ürün için en önemli şey o ürünün piyasa talebine eşit olmasıdır. Çeşitli bitki ve mikroorganizmaların birçok primer ve sekonder metabolit ürettiği fakat ürün miktarının oldukça az olduğu bilinmektedir (Singh et al., 2017).

Endüstride oldukça önemli bir yere sahip olan sekonder metabolitlerin üretiminde bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Pazar talebini karşılamak adına mikroorganizmaların doğal ürün verimliliğini arttırmak genellikle; kültür ortamının ve/veya kültür koşullarının optimizasyonu ve metabolik yolak mühendisliği olmak üzere iki yaklaşıma dayanmaktadır (Náhlík et al., 2017).

2.4. Optimizasyon

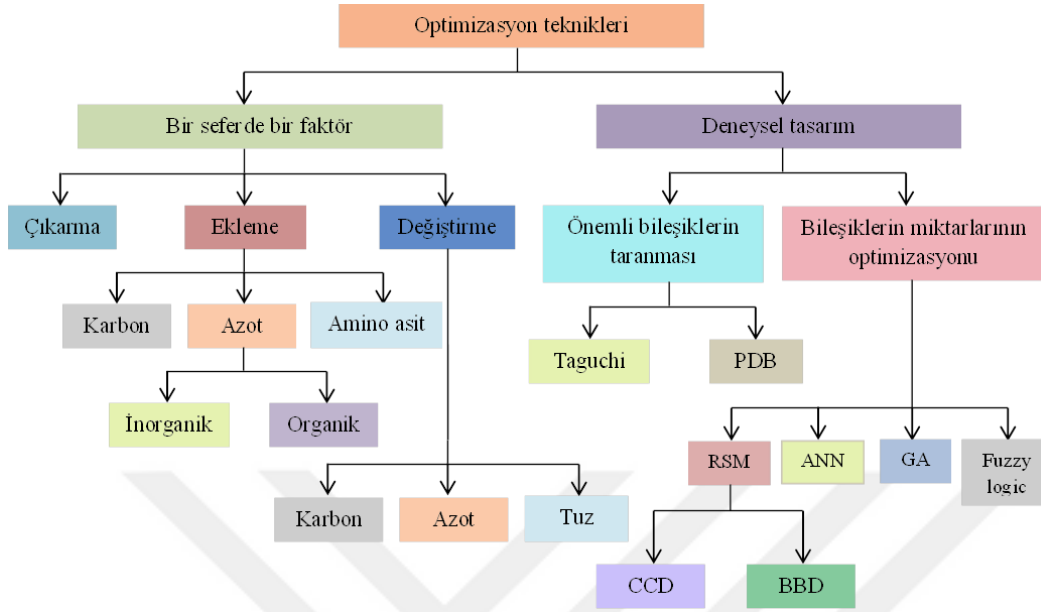
Fermantasyon koşullarının, özellikle fiziksel ve kimyasal parametrelerin optimizasyonu, ekonomi üzerindeki etkileri ve prosesin uygulanabilirliği açısından herhangi bir fermantasyon prosesinin geliştirilmesinde birincil öneme sahiptir (Francis et al., 2003).

Optimizasyon, herhangi bir büyük ölçekli metabolit üretiminden önce gerçekleştirilen ve birçok zorluğa sahip olan en kritik noktalardan biridir. Üretim ortamı ve kültür koşulları ürün verimini ve proses verimliliğini etkilemektedir. Ayrıca prosesin genel maliyetini etkileyeceğinden, optimizasyon ile ortam maliyetini olabildiğince düşürmek ekonomik açıdan önem kazanmaktadır (Parra et al., 2005; Singh et al., 2017).

1970'lerden önce optimizasyon, pahalı ve zaman alıcı klasik yöntemler kullanılarak yapılmaktaydı. Modern matematiksel/istatistiksel tekniklerin ortaya çıkmasıyla, optimizasyon daha etkili, verimli, ekonomik ve sonuç vermede daha sağlam hale gelmiştir (Singh et al., 2017). Bir üretimi tasarlamak için, en uygun ortam bileşenleri (örneğin; karbon, azot vb.) ve fermantasyon koşulları (örneğin; pH, sıcaklık, çalkalama hızı vb.) tanımlanmalı ve optimize edilmelidir. Belirtilen parametrelerin optimize edilmesiyle maksimum ürün konsantrasyonu elde edilebilmektedir (Gupte and Kulkarni, 2003; Franco-Lara et al., 2006; Wang et al., 2011).

Ortam tasarımı ve optimizasyonu sırasında, üretim ortamının verimliliğini arttırmak için sıklıkla kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Şekil 2.9 ortam

optimizasyonunda kullanılan çeşitli tekniklerin şematik gösterimidir (Singh et al., 2017).



Şekil 2.9. Ortam optimizasyonunda kullanılan yöntemler (Singh et al., 2017).

2.4.1. Optimizasyon teknikleri

2.4.1.1. Bir seferde bir faktör

Bir seferde bir faktör (One-Factor-at-a-Time - OFAT) deneylerinde, diğer değişkenler sabit tutulurken bir seferde yalnızca bir faktör değiştirilmektedir. Uygulanan yaklaşıma göre, OFAT alt gruplara ayrılmaktadır:

Kaldırma/Çıkarma deneyleri (Removal experiments): Bu tür bir deneyde, tüm ortam bileşenleri üretim ortamından birer birer çıkarılmakta ve uygun inkübasyon süresinden sonra, ortam bileşenlerinin sekonder metabolit veya ilgilenilen ürün üretimi üzerindeki etkileri gözlenmektedir.

Ekleme deneyleri (Supplementation experiments): Ekleme deneyleri genellikle çeşitli karbon ve azot takviyelerinin metabolit üretimi üzerindeki etkilerini incelemek için yapılmaktadır.

Değiştirme deneyleri (Replacement experiments): Ortam formülasyonu için, ekleme deneylerinde istenilen metabolitin üretimi üzerinde olumlu etki

gösteren karbon ya da azot kaynağı o ortamda daha önce bulunan karbon ya da azot kaynağının yerine kullanılmaktadır.

Fiziksel parametreler (Physical parameters): Kimyasal ve biyolojik değişkenlere ek olarak birçok araştırmacı sıcaklık, pH, karıştırma ve havalandırma gibi fiziksel parametrelerin optimizasyonu için de OFAT deneylerini kullanmaktadır (Niwas et al., 2013).

Her teknikte olduğu gibi OFAT tekniğinin de kendi avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. OFAT'ın en büyük avantajı, bir dizi deneyin yapılabilmesi ve sonuçların üst düzey istatistiksel analizlerin ya da istatistiksel programların yardımı olmadan basit grafikler kullanılarak analiz edilebilmesidir. OFAT'ın en büyük dezavantajı ise gelişigüzel tasarlanmış deneylerden “etkileşimleri” tahmin etmedeki zorluktur (Gupte ve Kulkarni, 2003). Vaidya ve arkadaşları (2003) ise en büyük dezavantajın çok sayıda değişkenin analizinde harcanan zaman ve maliyet olduğunu söylemektedir (Singh et al., 2017).

2.4.1.2. Deneysel tasarım

Optimizasyon için klasik metodları kullanarak proses faktörlerinde değişiklik yapmak pratik bir yöntem değildir. Buradaki zorluk, mümkün olan en iyi üretim performansı için en uygun ortamın ve kültür koşullarının mümkün olan çok sayıda kombinasyon ile belirlenmesidir. Çok sayıda değişkeni taramak için etkili yöntemlere duyulan ihtiyaç, istatistiksel deneysel tasarımların geliştirilmesine yol açmıştır (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006; Mandenius and Brundin, 2008; Kim et al., 2016).

İstatistiksel deneysel planlama, faktöriyel tasarım ve deney tasarımı (DoE, Design of Experiments), bir sistemin girdileri ve çıktıları arasındaki matematiksel ilişkileri araştırmak için kullanılan eş anlamlı kavramlardır. Bu yöntemin temelleri 1900'lerin başından beri bilinmesine rağmen (Yates, 1937; Pilar et al., 1976; Montgomery, 2005) biyoteknoloji alanındaki kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır (Mandenius and Brundin, 2008).

Deneysel tasarım, önemli yanıtların elde edilmesi için farklı tasarımlar kullanılarak önemli faktörlerin seçilip kontrol edildiği ve ardından istatistiksel analizlerin yapıldığı bir süreçtir. Deneysel tasarımın ilk adımı bir deneyin hedeflerini belirlemektir. Bir prosesin önemli değişkenlerini optimize etmedeki

ikinci adım ise proses faktörlerinin ve analiz edilecek yanıtların taranmasıdır (Mandenius and Brundin, 2008; Keskin Gündoğdu vd., 2016).

Bu yöntemde, çeşitli kültür koşulları ve/veya ortam bileşenleri eş zamanlı olarak karşılaştırılmakta ve sonuçlar gözlenmektedir. Çok sayıda deneyin gerçekleştirileceği durumlarda OFAT zaman alıcı ve maliyetli olmaktadır deneysel tasarımda az sayıda deney ve daha kısa zamanda aynı sonuçlar elde edilmektedir (Aydınarayan and Ellaiah, 2002; Keskin Gündoğdu vd., 2016). Ayrıca bu yöntem ile faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri de sistematik olarak incelenebilmektedir (Singh et al., 2017).

Biyomühendislik proseslerinde kullanılan deneysel tasarım yöntemlerini tam faktöriyel tasarım (full factorial design), kesirli faktöriyel tasarım (fractional factorial design), Plackett-Burman tasarımı (Plackett-Burman design - PBD), Taguchi tasarımı (Taguchi design), merkezi kompozit tasarımı (central composite design - CCD) ve Box-Behnken tasarımı (Box-Behnken design - BBD) olarak sıralamak mümkündür (Keskin Gündoğdu vd., 2016).

Tam faktöriyel tasarım: İki veya daha fazla değişkenin olduğu ve her bir değişkenin tek tek birbirleri ile olan etkileşimlerinin farklı seviyelerde incelendiği tasarımdır. Buradaki asıl amaç her bir faktörün etkisini ve birbirleriyle etkileşimlerini belirlemektir (Keskin Gündoğdu vd., 2016). n faktör için a seviyede gerçekleştirilecek deney sayısı a^n şeklinde gösterilmektedir. En yaygın kullanılan 2^n olarak belirtilen 2 seviyeli (two-level) tasarımdır (Wang and Wan, 2009).

Plackett-Burman tasarımı: Plackett ve Burman tarafından geliştirilmiş 2 seviyeli tasarımdır. Bu yöntem, çok sayıda faktörden yanıt üzerinde önemli etkisi olanların taranmasında kullanılmaktadır. PBD’de faktörlerin birbiri ile olan etkileşimi değil yanıt üzerindeki etkisi gözlenmektedir. n sayıda faktör için $n+1$ sayıda deney gerçekleştirilmekte ve faktörlerin düşük ve yüksek olmak üzere iki seviyesi bulunmaktadır (Singh et al., 2017).

Taguchi tasarımı: PBD’de karşılaşılan problemleri aşmak için Dr. Genichi Taguchi tarafından dikey sıralanışı (orthogonal array) temel alan bir yöntem geliştirilmiştir. Taguchi tasarımı, faktöriyel tasarımda olduğu şekilde tüm kombinasyonları denemek yerine faktörlerin yanıtı nasıl etkilediğini daha az sayıda deney ile incelemeye olanak vermektedir. Bu yöntem 3-50 arasındaki

faktör sayısına başarılı şekilde uygulanmaktadır (Keskin Gündoğdu vd., 2016; Singh et al., 2017).

RSM, proseslerin iyileştirilmesi ve optimize edilmesi için kullanılan, istatistiksel deney tasarımlarını ve çoklu regresyon analizlerini içeren matematiksel bir yaklaşımdır (Singh et al., 2017). Asıl amaç düşük sayıda deney gerçekleştirilerek en yüksek verimi sağlayan koşulların belirlenmesidir. BBD ve CCD bu yöntem içerisinde sınıflandırılmaktadır (Keskin Gündoğdu vd., 2016).

Merkezi kompozit tasarımı: CCD, deneysel bölgedeki bir orta noktayı ve dış noktaları kullanan beş seviyeli kesirli faktöriyel tasarım olarak tanımlanmaktadır (Tarley et al., 2009). Az sayıda gerçekleştirilen deneyler sonunda karşılaştırılabilir sonuçlar elde edildiği için 3 seviyeli tam faktöriyel tasarıma önemli bir alternatiftir. Bu nedenle ikinci dereceden modeller için en çok kullanılan deneysel tasarım yöntemidir (Keskin Gündoğdu vd., 2016).

Box-Behnken tasarımı: BBD, Box ve Behnken tarafından geliştirilen 3 seviyeli kesirli faktöriyel tasarımıdır (Wang and Wan, 2009). Faktörlerin düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç seviyesi bulunmaktadır (Majumder et al., 2009). Aşırı alt ve üst seviyeler gerektirmediği için daha az sayıda deney gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle zamandan tasarruf sağlamak ve ekonomik olarak CCD için bir alternatif sunmaktadır (Yin et al., 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Mikroorganizmalar

Bu tez kapsamında kullanılan *Aspergillus brasiliensis* Ege Üniversitesi Biyomühendislik kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2. Besin ortamları

3.1.2.1. Aktivasyon için kullanılan besin ortamı

Aspergillus brasiliensis'in aktivasyonu için ticari Malt Ekstrakt Agar (MEA, Oxoid) ortamı kullanılmıştır. Litrede 50 g olacak şekilde MEA tartılarak ortam hazırlanmış ve otoklavda 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle sterilizasyon gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.2. Sıvı kültür koşullarının belirlenmesinde kullanılan besin ortamı

Bu tez kapsamında *Aspergillus brasiliensis*'in kültivasyonu için kullanılan YES (Yeast Extract Sucrose) broth ortam içeriği Tablo 3.1'de verilmiştir. Ortam içeriğinde bulunan TMS (Trace Metal Solution, İz Element Solüsyonu) Tablo 3.2'de belirtilen miktarlarda $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ içermektedir.

Tablo 3.1. YES broth ortam içeriği (Samson et al., 2014).

Ortam İçeriği	Madde Miktarı
Sükroz (Merck)	150 g/L
Maya Ekstraktı (Merck)	20 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck)	0,5 g/L
TMS	1 ml/L
Distile Su	1 L

Tablo 3.2. TMS içeriği (Samson et al., 2014).

Ortam İçeriği	Madde Miktarı
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	10 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O (Merck)	5 g/L

Maya ekstraktı (Yeast Extract – YE) yaklaşık olarak kütlece % 10 azot ve % 12,5 karbonhidrat içermektedir (Biotech Solabia Group, 2006; BD Bionutrients™).

3.1.2.3. Farklı karbon ve azot kaynağı içeren besin ortamları

YES broth ortamı baz alınarak bu ortamdaki karbon (sükroz) ve azot (maya ekstraktı) kaynağı yerine farklı karbon ve azot kaynakları kullanılmıştır. Bu ortamların kombinasyonları Tablo 3.3'te yer almaktadır.

Tablo 3.3. YES broth ortamına koyulan farklı karbon ve azot kaynakları ve 1 litredeki miktarları.

Erlen Numarası	C Kaynağı	Ortamdaki C Kaynağı Miktarı	N Kaynağı	Ortamdaki N Kaynağı Miktarı
1	D-(+)-Galaktoz (Merck)	160,00 g	NaNO ₃ (Sigma)	12,12 g
2		160,00 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sigma)	9,48 g
3		160,00 g	Pepton (Merck)	16,66 g
4		157,50 g	YE (Merck)	20,00 g
5		130,90 g	CSL (Sigma)	26,40 ml
6	D-(+)-Glikoz Monohidrat (Merck)	176,00 g	NaNO ₃	12,12 g
7		176,00 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,48 g
8		176,00 g	Pepton	16,66 g
9		173,24 g	YE	20,00 g
10		143,98 g	CSL	26,40 ml
11	Gliserol (Merck)	130,00 ml	NaNO ₃	12,12 g
12		130,00 ml	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,48 g
13		130,00 ml	Pepton	16,66 g
14		127,90 ml	YE	20,00 g
15		106,30 ml	CSL	26,40 ml
16	Laktoz Monohidrat (Merck)	160,00 g	NaNO ₃	12,12 g
17		160,00 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,48 g
18		160,00 g	Pepton	16,66 g
19		157,50 g	YE	20,00 g
20		130,90 g	CSL	26,40 ml
21	D-(+)-Maltoz Monohidrat (Sigma)	160,00 g	NaNO ₃	12,12 g
22		160,00 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,48 g
23		160,00 g	Pepton	16,66 g
24		157,50 g	YE	20,00 g
25		130,90 g	CSL	26,40 ml
26	Sükroz (Merck)	152,00 g	NaNO ₃	12,12 g
27		152,00 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,48 g
28		152,00 g	Pepton	16,66 g
29		149,64 g	YE	20,00 g
30		124,36 g	CSL	26,40 ml

Pepton yaklaşık olarak % 12 azot (Biotech Solabia Group, 2003; Organotechnie® S.A.S., 2008); mısır ıslatma şurubu (Corn Steep Liquor - CSL), % 37,77 karbon ve % 6,49 azot (Berger et al., 2014) içermektedir.

3.1.2.4. İz element kombinasyonlarını içeren besin ortamları

Tablo 3.4. İz element kombinasyonları denemesi için hazırlanan ortamların içerdiği bileşenler ve litredeki miktarları.

Erlen Numarası	Ortam Bileşenlerinin Miktarı					
	Sükroz	CSL	MgSO ₄ .7H ₂ O	TMS	FeSO ₄ .7H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O
1	124,36 g	26,32 ml	0,5 g	-	-	-
2	124,36 g	26,32 ml	0,5 g	1 ml	-	-
3	124,36 g	26,32 ml	0,5 g	1 ml	20 ml	-
4	124,36 g	26,32 ml	0,5 g	1 ml	-	18 ml
5	124,36 g	26,32 ml	0,5 g	1 ml	20 ml	18 ml

3.1.3. İz elementlerin stok çözeltileri

İz elementlerin sekonder metabolit üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, farklı iz element kombinasyonlarını denemek için besin ortamına eklenmek üzere Merck marka demir (II) sülfat heptahidrat (FeSO₄.7H₂O) ve mangan (II) sülfat monohidratın (MnSO₄.H₂O) 0,005 g/L konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır (Efe, 2019).

3.1.4. Organik çözenler

Carlo Erba marka organik çözenlerden; aseton misel ekstraksiyonunda, etil asetat süpernatant ekstraksiyonunda, metanol kuru ekstrelerin -20 °C'de muhafaza edilmek üzere belirli konsantrasyonda çözdürülmesinde, asetonitril ise HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography – Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) analizlerinde mobil faz olarak kullanılmıştır.

3.1.5. Cihaz ve ekipmanlar

BINDER marka inkübatör (Seri No: 05-77452) *Aspergillus brasiliensis*'in aktivasyonu için inkübasyonda kullanılmıştır.

ÇALIŞKAN marka LAB.ULT.4022 model ultrasonik banyo (Seri No: 01150027507) misel ve süpernatantların ekstraksiyonunda kullanılmıştır.

ESCO marka AC2-4E8 model sınıf II biyogüvenlik kabini (Seri No: 2018-126363) mikroorganizmaların aktivasyonu, mikroorganizmaların inokülasyonu, spor solüsyonlarının hazırlanması gibi işlemlerin steril şekilde gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

HEIDOLPH marka Heizbad Hei-VAP model evaporatör (Seri No: 041002370) ekstraksiyon sonrasında organik çözümlerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.

HMC HIRAYAMA marka HICLAVE HV-85 model otoklav sterilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

METTLER TOLEDO marka AB 204-S model hassas terazi (Seri No: 1127353825) tartım işlemlerinde kullanılmıştır.

METTLER TOLEDO marka pH metre (Seri No:1226306055) ortamların pH değerinin ayarlanmasında kullanılmıştır.

THERMO FISHER SCIENTIFIC marka SPD121P-230 model vakumlu buharlaştırıcı (SpeedVac Concentrator) (Seri No: W14U-425283-WU) ekstraksiyon sonrasında organik çözümlerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.

THERMO FISHER SCIENTIFIC marka U-HPLC cihazındaki ACCELA model autosampler (Seri No:750218) ve ACCELA PDA model dedektör (Seri No: 850043) misel ve süpernatant ekstraktlarının kromatografik analizinde kullanılmıştır.

SHIMADZU marka HPLC cihazındaki LC-10ATVP model pompa (Seri No: C20973705107 LP) misel ve süpernatant ekstraktlarının kromatografik analizinde kullanılmıştır.

ZHICHENG marka ZHWY-2102C model çalkalayıcı inkübatör sıvı kültür çalışmalarında *Aspergillus brasiliensis*'in inkübasyonunda kullanılmıştır.

ELGA marka Classic UV MK2 model ultra saf su cihazı (Seri No: CLUVK273344) HPLC analizleri için ultra saf suyun sağlanmasında kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Aspergillus brasiliensis*'in sıvı kültür üretim koşullarının (sıcaklık, çalkalama hızı, pH, C/N) incelenmesi

3.2.1.1. Deneysel tasarım ile sıvı kültür koşullarının belirlenmesi

Aspergillus brasiliensis'in sıvı kültür üretim koşullarının incelenmesine; sıcaklık, çalkalama hızı, pH, karbon/azot (C/N) parametrelerinin değerlendirilmesi ile başlanmıştır. Bu amaçla her bir parametre için üç seviye belirlenmiştir. Sıcaklık için 25 °C, 30 °C, 35 °C, çalkalama hızı için 150,180, 210 rpm, pH değeri için 5, 6, 7, C/N oranı için 16, 32 ve 48 değerleri seçilmiştir. Bu değerler kullanılarak Design-Expert 7.0.0 programında Box-Behnken deney tasarımı uygulanmıştır. Tasarım sonucunda 27 tane denemeden oluşan bir set elde edilmiştir (Tablo 3.5). C/N oranı parametresindeki hesaplamalarda maya ekstrakt miktarı sabit tutulup sakkaroz miktarı değiştirilerek deney setinde belirtilen oranlar uygulanmıştır.

Yapılan denemeler sonucunda her bir sıvı kültür üretiminden elde edilen misel ekstreleri için sırasıyla yaş ağırlık (g), ekstre kütlesi (mg), pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve toplam pik alanı/ekstre kütlesi; süpernatantlar ekstreleri için ise sırasıyla ekstre kütlesi (mg), pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve toplam pik alanı/ekstre kütlesi değerleri incelenmiştir.

Tablo 3.5. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür üretim koşullarına ait deney seti.

Erlen Numarası	Sıcaklık (°C)	Çalkalama Hızı (rpm)	pH	C/N
1	25	150	6	32
2	30	150	6	48
3	30	150	7	32
4	30	150	6	16
5	30	150	5	32
6	35	150	6	32
7	25	180	5	32
8	25	180	6	48
9	25	180	7	32
10	25	180	6	16
11	30	180	5	48
12	30	180	6	32
13	30	180	7	48
14	30	180	5	16
15	30	180	6	32
16	30	180	6	32
17	30	180	7	16
18	35	180	6	48
19	35	180	7	32
20	35	180	5	32
21	35	180	6	16
22	25	210	6	32
23	30	210	5	32
24	30	210	7	32
25	30	210	6	16
26	30	210	6	48
27	35	210	6	32

3.2.2 Sıvı kültür üretim ortamlarının hazırlanması

3.2.2.1. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür üretim ortamlarının hazırlanması

Ortamlar, Tablo 3.1’de belirtilen miktarlar doğrultusunda C/N oranlarına göre 250 ml’lik erlenlerde 50 ml olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamların deney setlerinde belirtildiği şekilde pH değerleri ayarlanmış ve erlenler 121 °C’de 20 dakika otoklavlanmıştır.

3.2.2.2. Farklı karbon ve azot kaynakları içeren sıvı kültür üretim ortamlarının hazırlanması

Tablo 3.3’te belirtilen miktarlara göre ortamlar YES broth ortamındaki karbon ve azot kaynakları değiştirilerek 250 ml’lik erlenlerde 50 ml olarak hazırlanmıştır. Ortamların pH değeri 6’ya ayarlanmış ve erlenler 121 °C’de 20 dakika otoklavlanmıştır.

3.2.2.3. İz element kombinasyonlarını içeren sıvı kültür üretim ortamlarının hazırlanması

Farklı iz element kombinasyonlarının deneneceği ortamlar Tablo 3.4’te belirtilen miktarlara göre 250 ml’lik erlenlerde 50 ml olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamların pH değeri 6’ya ayarlanmış ve erlenler 121 °C’de 20 dakika otoklavlanmıştır.

3.2.3. Spor solüsyonunun hazırlanması

250 ml’lik erlenlerde yatık olarak hazırlanan MEA ortamına inoküle edilen ve bir hafta süresince inkübasyonu gerçekleştirilen *Aspergillus brasiliensis*’in spor solüsyonu hazırlanmıştır. Biyogüvenlik sınıf 2 kabininde sporların olduğu erlene, homojen spor solüsyonu hazırlamak amacıyla steril tween-80 eklenmiş, sporlar steril öze ile nazikçe kazınmış ve elde edilen spor solüsyonu steril schott şişelerine alınmıştır.

Biyogüvenlik sınıf 2 kabininde steril tween-80 kullanılarak hazırlanan spor solüsyonundan (Thoma lamında) 10x büyütmedeki mikroskop altında spor sayımı

yapılmıştır. Sıvı kültür koşullarının taranmasında kullanılmak üzere $5,8 \times 10^6$ spor/ml olacak şekilde gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

Farklı karbon ve azot kaynaklarının ve farklı iz element kombinasyonlarının denenmesinde kullanılmak üzere yeni spor solüsyonu hazırlanmıştır. Bu spor solüsyonu için Thoma lamında 10x büyütmedeki mikroskopta sayım yapılmış ve seyreltmeler yapılarak $2,5 \times 10^6$ spor/ml elde edilmiştir.

3.2.4. Mikroorganizmaların inokülasyonu

Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan spor solüsyonundan biyogüvenlik sınıf 2 kabininde her bir erlene 1 ml inokülasyon yapılmıştır.

3.2.5. Mikroorganizmaların inkübasyonu

İnoküle edilen erlenler Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen koşullardaki sıcaklık ve çalkalama hızı ayarındaki çalkalayıcı inkübatöre yerleştirilip bir hafta inkübe edilmiştir.

Farklı karbon ve azot kaynakları ve iz element kombinasyonları denemeleri için inoküle edilen erlenler 25 °C ve 210 rpm ayarındaki çalkalayıcı inkübatöre yerleştirilip bir hafta inkübe edilmiştir.

3.2.6. Sıvı üretim ortamının filtrasyonu

Filtrasyonda kullanılmak üzere whatman filtrelerden (No 4) filtre düzeneğine uygun olarak filtreler kesilmiş ve nemden tamamen uzaklaşmaları için cam petriyer içerisinde 80 °C'deki etüvde bir gece bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan filtreler kullanılmak üzere desikatöre koyulmuştur.

Bir haftalık inkübasyon süresi dolan erlenler çalkalayıcı inkübatörden çıkarılmıştır. Filtrasyon düzeneği kurulmuştur. Filtre kağıtları ilgili şekilde etiketlenmiş tartım kaplarına koyulmuş ve hassas terazide filtre kağıtlarının daraları alınmıştır. Filtre kağıdı filtrasyon düzeneğine yerleştirilmiştir. Fungal pelletleri içeren sıvı üretim ortamı filtre kağıdının üzerine dökülmüş ve vakum pompası kullanılarak süzölmüştür. Elde edilen süpernatant (hücresiz/pelletsiz fermantasyon ortamı), ekstraksiyonu yapılmak üzere 50 ml'lik falkona koyulmuştur. Erlenin duvarında kalan fungal pelletlerin alınması için erlene bir

miktar steril distile su koyulmuş ve tekrar filtre edilmiştir. Bu işlem birkaç kez tekrarlanmıştır. Filtre kağıdında biriken biyokütle ilgili tartım kabına koyularak yaş ağırlık tartılmıştır. Tartılan biyokütle filtre kağıdından alınarak ekstraksiyonu yapılmak üzere 50 ml'lik falkona koyulmuştur. Sıvı atık ise atık kabına boşaltılmış ve otoklavda steril edildikten sonra atılmıştır.

Bu işlemler inkübe edilen her bir erlen için yapılmıştır. Falkonlar ekstraksiyonları yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7. Sıvı üretim ortamından elde edilen misel ve süpernatantta yer alan metabolitlerin ekstraksiyonu

3.2.7.1. Miselden sekonder metabolit ekstraksiyonu

Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde elde edilen ekstraksiyonu yapılacak falkonlar -20 °C'den çıkarılmış ve oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir. Oda sıcaklığına gelen her bir falkona çeker ocakta 15 ml aseton koyulmuştur. Bu falkonlar 30 dk boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Miseller hareket ettirilmeden aseton kaba filtre kağıdına dökülüp süzülerek 100 ml'lik erlende toplanmıştır. Falkonlara iki kez daha aseton koymak suretiyle bu işlemler tekrarlanmıştır.

Üç kez gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda erlende toplanan aseton whatman filtre kağıdından (No 1) geçirilerek 100 ml'lik beherde toplanmıştır. Süpernatantta bulunan suyun tutulması için behere 10 g susuz sodyum sülfat koyulmuş ve süpernatant berraklaşana kadar spatül ile karıştırılmıştır. Sodyum sülfatın çökmesi için 5 dakika beklenmiştir. Suyu tutulan süpernatant 0,45 µm'lik PTFE (politetrafloroetilen - polytetrafluoroethylene) membrandan geçirilerek 50 ya da 100 ml'lik balona alınmıştır. Sodyum sülfatta kalan metabolitlerin alınması için beherde kalan sodyum sülfat iki kez 5 ml aseton ile muamele edilmiştir. Daha sonra bu aseton da 0,45 µm'lik PTFE membrandan geçirilerek balona alınmıştır.

Çözgenin büyük bir kısmı 45 °C'de evapore edilmiştir. Evaporatörde uçmayıp balonda kalan çözgen speed vac vialine alınmıştır. Balonda kalan kuru madde de 3 ml aseton ile çözdürülerek aynı vialine aktarılmıştır. Bu süreç her erlen için gerçekleştirilmiştir. Viallerdeki çözgen speed vac cihazında 45 °C'de uçurulmuştur.

Çözgen tamamen uçuktan sonra tartım yapılarak elde edilen kuru ekstre miktarı hesaplanmıştır. Ekstrelerin konsantrasyonları 20 mg/ml olacak şekilde ekstrere metanolde çözdürülmüş ve sonrasında viallere alınıp -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7.2. Süpernatanttan sekonder metabolit ekstraksiyonu

Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde elde edilen ekstraksiyonu yapılacak falkonlar -20 °C'den çıkarılmış ve oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir. Her bir falkondaki süpernatantın sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır.

Falkondaki süpernatantta çöken partiküller olduğu için süpernatant pamuk filtreden geçirilerek 50 ml'lik mezürde toplanmış ve hacmi ölçülmüştür. Süpernatant, musluğu kapalı durumda olan 250 ml'lik ayırma hunisine dökülmüş ve üzerine 1:1 oranında etil asetat eklenmiştir. Sıvılar birbirine karışacak şekilde üç kez ayırma hunisinin sallanması ve her sallama arasında huninin kapağının açılıp kapatılması suretiyle sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Huninin musluğu açılarak etil asetat fazı 250 ml'lik beherde, su fazı ise 100 ml'lik beherde toplanmıştır. Su fazı tekrar ayırma hunisine koyulmuş ve hiç kayıp olmadığı düşünülerek ayırma hunisine aynı miktarda etil asetat eklenmiştir. Ekstraksiyon işlemi tekrar gerçekleştirilmiştir. Etil asetat fazı bir önceki etil asetat fazının toplandığı beherde toplanarak su fazından ayrılmıştır. Aynı şekilde üçüncü kez ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Su fazı aynı falkona koyularak -20 °C'ye kaldırılmıştır. Etil asetat fazının bulunduğu beherde 10 g susuz sodyum sülfat koyulmuş ve sıvı berraklaşana kadar spatül ile karıştırılmıştır. Sodyum sülfat beherin dibinde kalacak şekilde berrak sıvı 250 ml'lik erlene alınmıştır. Beherde kalan sodyum sülfatın üzerine 20 ml etil asetat koyulmuş ve karıştırılmıştır. Bu etil asetat da 250 ml'lik erlene aktarılmıştır. Erlenler evaporasyon işlemine kadar çeker ocakta muhafaza edilmiştir.

Evaporasyonun yapılacağı balonların darası alınmıştır. Erendeki etil asetat fazından bir miktar balona alınarak 45 °C'de evaporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Balondaki etil asetat uçunca aynı şekilde balona erlendeki sıvıdan ekleme yapılmış ve evaporasyon işlemine devam edilmiştir. Bu işlemler tüm çözgen uçuncaya kadar sürmüştür. Bu süreç her erlen için gerçekleştirilmiştir.

Evaporasyon işleminden sonra balonlar tartılmış ve elde edilen kuru ekstre miktarları hesaplanmıştır. Ekstrelerin konsantrasyonları 20 mg/ml olacak şekilde

ekstreler metanolde çözdürülmüş ve sonrasında viallere alınarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Ayrıca büyüme ortamı içeriklerinin sekonder metabolit profilini ve süpernatant ekstre kütesini etkileyip etkilemediğinin görülebilmesi ve üretim yapılan erlenler ile karşılaştırma yapılabilmesi için kontrol amaçlı kullanılmak üzere hazırlanıp spor inokülasyonu yapılmayan üç farklı C/N oranındaki ortamın (16, 32 ve 48) ve C/N oranı 32 olanlardan gliserol ve/veya CSL içeren tüm ortamların sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. HPLC analizi

Misel ve süpernatant ekstre örneklerinin sekonder metabolit profillerinin çıkarılması için örneklerin konsantrasyonları metanol ile seyreltilerek 10 mg/ml olarak ayarlanmıştır. Her bir örneğin HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. HPLC analizinin çalışma koşulları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. HPLC analiz metodunun koşulları.

HPLC Kolonu	Serial no: H5ODS-11506 Teknokroma TR-016824 Inertsil ODS2
Mobil Faz	Asetonitril, Su, Trifloroasetik Asit (TFA)
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Akış Hızı	1 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µl
Enjeksiyon Modu	Partial Loop
UV Deteksiyon	254 nm, 210 nm, 280 nm

Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen koşullarda yapılan üretime ait misel ve süpernatant ekstre örneklerinin analizi H5ODS-11506 kolonunda; farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı üretim ve iz element kombinasyonlarının denendiği üretim sonunda elde edilen misel ve süpernatant ekstre örneklerinin analizi ise Teknokroma TR-016824 kolonunda gerçekleştirilmiştir.

HPLC analiz metodunun mobil faz değişimi Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. HPLC analiz metodunun mobil faz değişimi (Gradient: 0.75).

Zaman (dk)	Pompa	Değer (%)	Pompa	Değer (%)
5.00	Pompa A	95	Pompa B	5
25.00	Pompa A	80	Pompa B	20
50.00	Pompa A	55	Pompa B	45
70.00	Pompa A	15	Pompa B	85
75.00	Pompa A	15	Pompa B	85
80.00	Pompa A	95	Pompa B	5
90.00	Pompa A	95	Pompa B	5

Pompa A % 0.025 TFA içeren ultra saf su, pompa B ise % 0.025 TFA içeren asetonitril mobil fazını temsil etmektedir.

3.2.9. Veri analizi

Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen koşullarda yapılan üretime ait örneklerin, farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı üretime ait örneklerin ve iz element kombinasyonlarının yapıldığı üretime ait örneklerin kendi içerisinde metabolit kütüphaneleri oluşturulmuştur.

Tablo 3.6’da belirtilen koşullardaki metod ile analizlenen örneklerdeki her bir majör pike bir kod verilmiş ve bu piklerin UV-VIS spektrumları (220-800 nm) kütüphaneye kaydedilmiştir. İlk kütüphanede (Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen koşullar) 170, ikinci kütüphanede (karbon ve azot kaynakları) 302, üçüncü kütüphanede (iz elementler) ise ikinci kütüphaneye ek 32 pik tanımlanmıştır. Sekonder metabolit karşılaştırmaları her bir değişken için oluşturulan metabolit kütüphaneleri aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

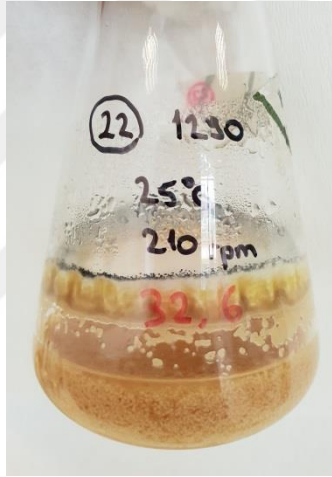
Bu kütüphanelerdeki metabolitlerin pik alanları kullanılarak Python yazılımında Hiyerarşik Sınıf Analizi (HCA) yöntemi ile metabolit profillerinin sınıflandırması incelenmiştir. Süpernatant ve misel ekstre örneklerinde yapılan sınıflandırmalar hiçbir örnekte görülmeyen pikler çıkartılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Aspergillus brasiliensis*'in Sıvı Kültürde Büyüme Özellikleri

4.1.1. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki büyüme özellikleri

Kültür koşullarına bağlı olarak büyüme (fermantasyon) ortamlarının renkleri, pellet büyüklükleri ve biyokütle gibi özelliklerde farklılıklar gözlenmiştir. Şekil 4.1'de sıcaklığın 25 °C, çalkalama hızının 210 rpm, pH'ın 6 ve C/N oranının 32 olduğu üretim sonrasında gözlenen büyüme özellikleri görülmektedir.



Şekil 4.1. Sıcaklığın 25 °C, çalkalama hızının 210 rpm, pH'ın 6 ve C/N oranının 32 olduğu üretim koşullarında bir hafta inkübe edilen *Aspergillus brasiliensis*.

4.1.2. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür ortamındaki büyüme özellikleri

Şekil 4.2a, 4.2b, 4.2c, 4.2d, 4.2e ve 4.2f'de görüldüğü üzere sıvı kültür üretimlerinde farklı karbon (galaktoz, glikoz, gliserol, laktoz, maltoz ve sükroz) ve azot (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, YE ve CSL) kaynakları kullanımına bağlı olarak büyüme (fermantasyon) ortamlarının renkleri, pellet büyüklükleri ve biyokütle gibi özelliklerde farklılıklar gözlenmiştir.



Şekil 4.2a. Bir haftalık inkübasyon sonrası galaktoz ve soldan sağa doğru NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, YE, CSL içeren fermantasyon ortamları.



Şekil 4.2b. Bir haftalık inkübasyon sonrası glikoz ve soldan sağa doğru NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, YE, CSL içeren fermantasyon ortamları.



Şekil 4.2c. Bir haftalık inkübasyon sonrası gliserol ve soldan sağa doğru NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, YE, CSL içeren fermantasyon ortamları.



Şekil 4.2d. Bir haftalık inkübasyon sonrası laktöz ve soldan sağa doğru NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, YE, CSL içeren fermantasyon ortamları.



Şekil 4.2e. Bir haftalık inkübasyon sonrası maltoz ve soldan sağa doğru NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, YE, CSL içeren fermantasyon ortamları.



Şekil 4.2f. Bir haftalık inkübasyon sonrası sükröz ve soldan sağa doğru NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, YE, CSL içeren fermantasyon ortamları.

4.1.3. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretim ortamındaki pellet morfolojisi

Şekil 4.3'te görüldüğü üzere sıvı kültür üretimlerinde farklı iz element kombinasyonlarının kullanımına bağlı olarak pellet büyüklükleri ve biyokütle gibi özelliklerde farklılıklar gözlenmiştir. Ortam renklerinde ise belirgin bir fark gözlenmemiştir.



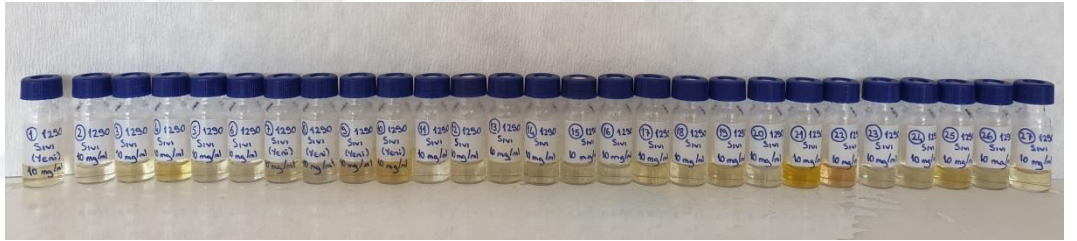
Şekil 4.3. Bir haftalık inkübasyon sonrası iz element kombinasyonlarını içeren fermantasyon ortamları (Soldan sağa doğru TMS yok, TMS, TMS+Fe, TMS+Mn ve TMS+Fe+Mn).

4.2. Deneysel Tasarım ile Belirlenen *Aspergillus brasiliensis*'in Sıvı Kültür Üretim Koşullarının (Sıcaklık, Çalkalama Hızı, pH ve C/N) Sonuçları

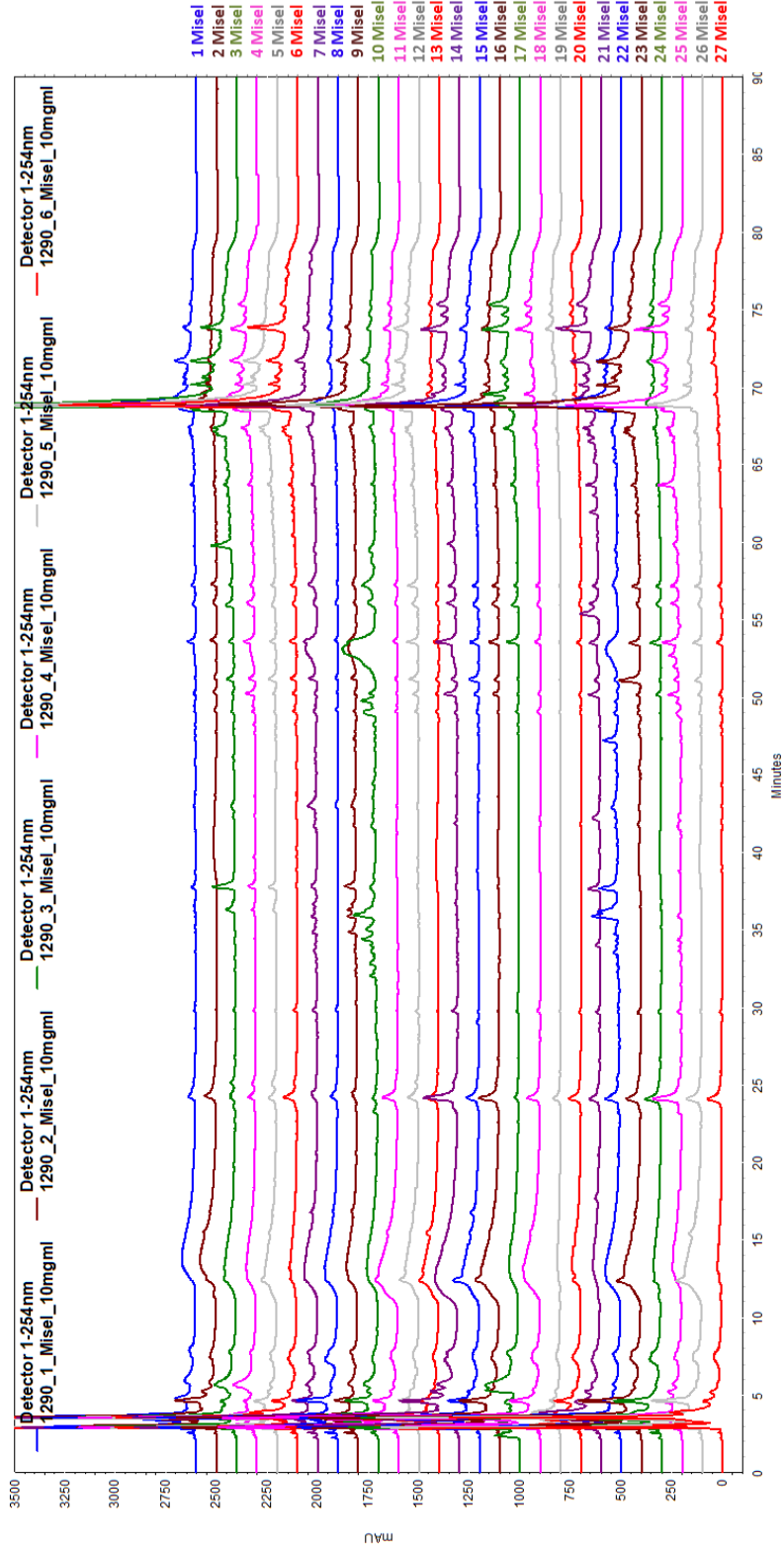
Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimler sonunda 27 misel ekstre örneğinin (Şekil 4.4) HPLC analizinin kromatogramları Şekil 4.6, 27 süpernatant ekstre örneğinin (Şekil 4.5) HPLC analizinin kromatogramları ise Şekil 4.7'deki gibidir.



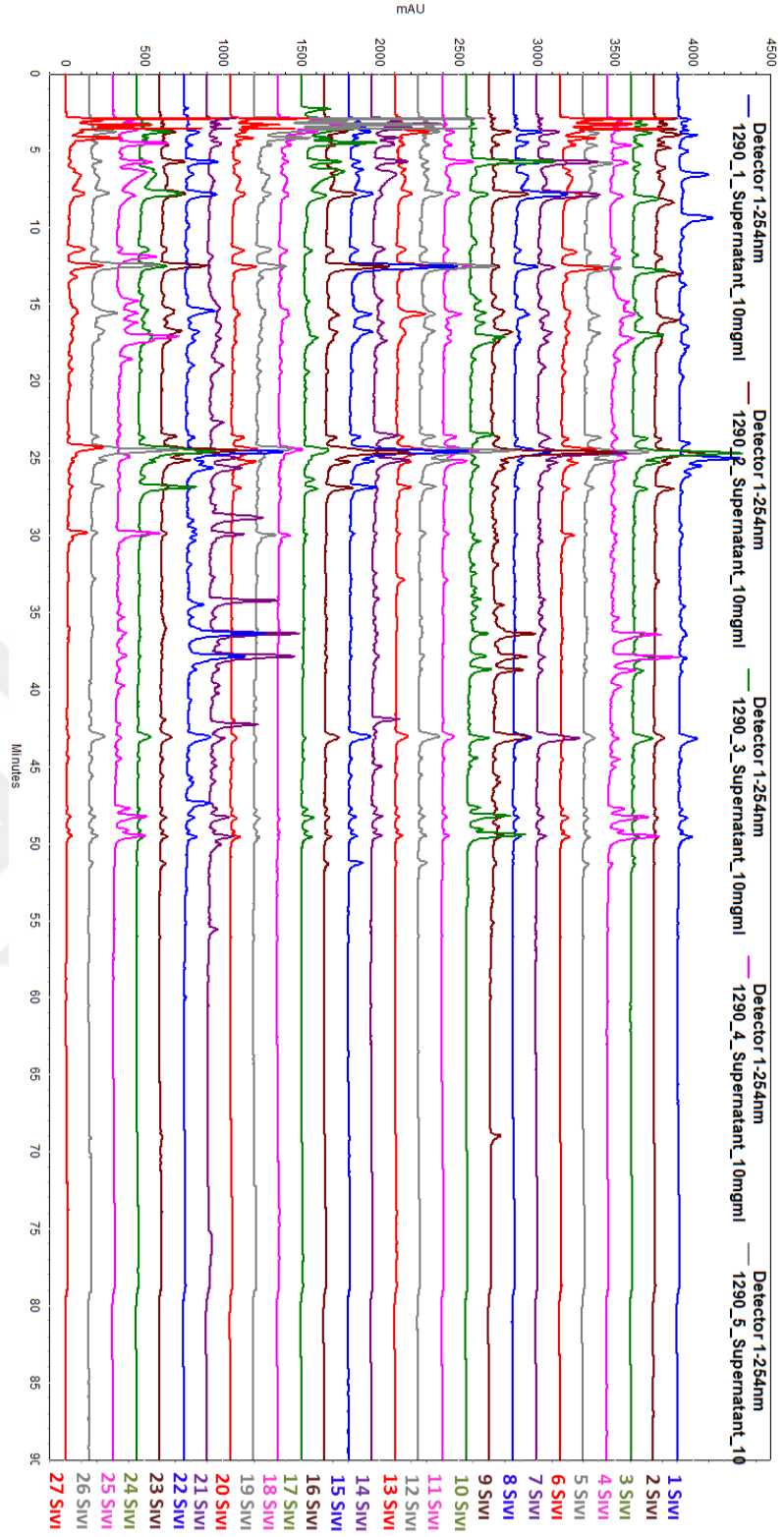
Şekil 4.4. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen misel ekstre örnekleri.



Şekil 4.5. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen süpernatant ekstre örnekleri.



Şekil 4.6. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen misel ekstre örneklerinin bir arada bulunduğu HPLC analizi kromatogramları.



Şekil 4.7. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretim sonrası elde edilen süpernatant ekstre örneklerinin bir arada bulunduğu HPLC analizi kromatogramları.

Bölüm 3.2.7.1’de belirtildiği şekilde ekstraksiyonu gerçekleştirilen misel örneklerinin Box-Behnken deney tasarımıdaki sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretimin misel ekstraksiyonu sonrası yaş ağırlık, ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.

Erlen Numarası	Yaş Ağırlık (g)	Ekstre Kütlesi (mg)	Pik Sayısı	Pik Alanı	Toplam Pik Alanı	TPA/EK
1	9,155	268,90	98	23368577	628381035,53	2336857,70
2	6,424	188,80	67	15580071	294151740,48	1558007,10
3	11,893	299,00	85	50122353	1498658354,70	5012235,30
4	12,450	122,20	88	27383973	334632150,06	2738397,30
5	9,656	288,80	87	36054413	1041251447,44	3605441,30
6	8,341	212,80	73	34726872	738987836,16	3472687,20
7	7,620	248,10	97	24181914	599953286,34	2418191,40
8	7,295	226,80	52	11361273	257673671,64	1136127,30
9	10,251	313,80	96	26131665	820011647,70	2613166,50
10	8,819	151,80	89	26496743	402220558,74	2649674,30
11	7,215	166,30	67	13341387	221867265,81	1334138,70
12	7,004	133,10	74	24521223	326377478,13	2452122,30
13	6,693	242,90	58	8945504	217286292,16	894550,40
14	8,125	108,70	89	29609039	321850253,93	2960903,90
15	6,749	192,00	72	19537813	375126009,60	1953781,30
16	7,398	193,30	71	14175778	274017788,74	1417577,80
17	10,557	91,00	68	16047601	146033169,10	1604760,10
18	4,853	130,90	47	10462169	136949792,21	1046216,90
19	6,107	84,20	34	4878532	41077239,44	487853,20
20	7,465	200,50	40	7747331	155333986,55	774733,10
21	8,952	97,00	76	28387520	275358944,00	2838752,00
22	9,321	269,20	96	36888587	993040762,04	3688858,70
23	9,239	118,10	82	45978335	543004136,35	4597833,50
24	9,921	134,60	54	14892031	200446737,26	1489203,10
25	7,410	78,50	90	33476832	262793131,20	3347683,20
26	7,652	161,70	65	20280940	327942799,80	2028094,00
27	8,612	119,50	46	8206633	98069264,35	820663,30

Bölüm 3.2.7.2’de belirtildiği şekilde ekstraksiyonu gerçekleştirilen süpernatant örneklerinin Box-Behnken deney tasarımındaki sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarındaki üretimin süpernatant ekstraksiyonu sonrası ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.

Erlen Numarası	Ekstre Kütlesi (mg)	Pik Sayısı	Pik Alanı	Toplam Pik Alanı	TPA/EK
1	80,50	70	32775103	295303678,03	3668368,67
2	88,40	60	27223652	261074822,68	2953335,10
3	57,70	76	45646438	307200527,74	5324099,27
4	9,40	94	48708076	80855406,16	8601638,95
5	81,60	69	30956411	282322468,32	3459834,17
6	46,00	74	26561609	147682546,04	3210490,13
7	80,50	75	46677347	420562896,47	5224383,81
8	77,70	70	32539499	277236531,48	3568037,73
9	68,50	107	53802312	420196056,72	6134249,00
10	13,00	84	49519245	100028874,90	7694528,84
11	128,40	64	25780941	350362988,19	2728683,71
12	85,60	80	42194959	401696009,68	4692710,39
13	88,40	76	29882630	286574421,70	3241792,10
14	20,60	84	33485081	93088525,18	4518860,45
15	74,90	79	55070092	465342277,40	6212847,50
16	67,30	78	39200670	301453152,30	4479244,46
17	24,70	77	34372391	109647927,29	4439187,34
18	84,90	73	13261131	122532850,44	1443260,90
19	43,60	82	23301618	123964607,76	2843224,95
20	75,10	77	23557639	199533202,33	2656900,16
21	5,30	90	67682447	84603058,75	15962841,27
22	83,30	91	62652586	582042523,94	6987305,21
23	87,10	76	36653273	354437149,91	4069312,86
24	36,10	76	41996960	191926107,20	5316512,66
25	9,70	86	52237278	88280999,82	9101134,00
26	96,00	66	39057099	404240974,65	4210843,49
27	32,00	82	25375333	105561385,28	3298793,29

Toplam pik alanı; ekstrelerin 10 mg/ml konsantrasyona ulaşması için çözüldüğü metanol hacmi ile pik alanı çarpılarak elde edilmiştir. Süpernatant ekstre kütlesi; ekim yapılmamış sıvı ortamların (C/N:16, C/N:32 ve C/N:48) ekstraksiyonu sonucunda elde edilen kuru madde kütlesinin süpernatant

ekstraksiyonu sonucunda elde edilen kuru madde kütlesinden çıkarılması ile elde edilmiştir. TPA/EK ifadesi ise toplam pik alanının ekstre kütlesine bölümüdür.

Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'deki sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; misel ekstrelerinde sıcaklık 25 °C ve 30 °C iken daha iyi biyokütle (yaş ağırlık) ve ekstre kütlesi elde edilmiştir. Artan sıcaklık ile birlikte misel ekstre kütlelerinin çoğunda azalma görülmüştür. Toplam pik alanlarından yüksek olanların çoğu 25 °C'deki üretimlerde gözlenmektedir. Süpernatant ekstrelerinde de 25 °C ve 30 °C'de yüksek ekstre kütleleri ve toplam pik alanları elde edilmiştir.

Çalkalama hızı sıcaklık ile birlikte değerlendirildiğinde artan çalkalama hızı ile birlikte hem misel hem süpernatant ekstre örneklerinin ekstre kütlesi ve toplam pik alanlarında çoğunlukla artış gözlenmiştir.

Artan C/N oranı ile birlikte süpernatant ekstre kütlesi genel anlamda artış göstermiştir. Süpernatant ekstre örneklerinde en düşük toplam pik alanları C/N oranının 16 olduğu üretimlerde gözlenmiştir. Misel ekstrelerinde ise en iyi ekstre kütlesi ve toplam pik alanı sonuçları C/N oranı 32 olan üretimlerde elde edilmiştir. Oran 16 ve 48 iken ekstre kütlelerinde ve toplam pik alanlarında azalma gözlenmiştir. C/N oranı 48 iken biyokütle üretimi azalmış, C/N oranı 16 ve 32 iken daha iyi biyokütle üretimi gerçekleşmiştir.

Süpernatant ekstre kütlelerinde C/N oranı artarken pH 7 olduğunda azalma gözlenmiştir. En iyi ekstre kütlesi ve toplam pik alanı sonuçları pH 6 iken elde edilmiştir. Misel ekstre örneklerinde ise C/N oranı 32 iken artan pH ile birlikte ekstre kütlesi artış göstermiştir. Toplam pik alanını diğer değişkenlerin (sıcaklık, çalkalama hızı ve C/N oranı) pH değerinden daha çok etkilediği gözlenmektedir.

Yapılan 27 denemenin sonuçları değerlendirildiğinde sekonder metabolit üretimi (toplam pik alanı) ve sekonder metabolit çeşitliliği (pik sayısı) açısından en uygun üretimin sıcaklığın 25 °C, çalkalama hızının 210 rpm, pH değerinin 6, C/N oranının 32 olduğu koşullarda gerçekleştiğine karar verilmiştir.

4.3. Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Kullanıldığı Sıvı Kültür Üretimine Sonuçları

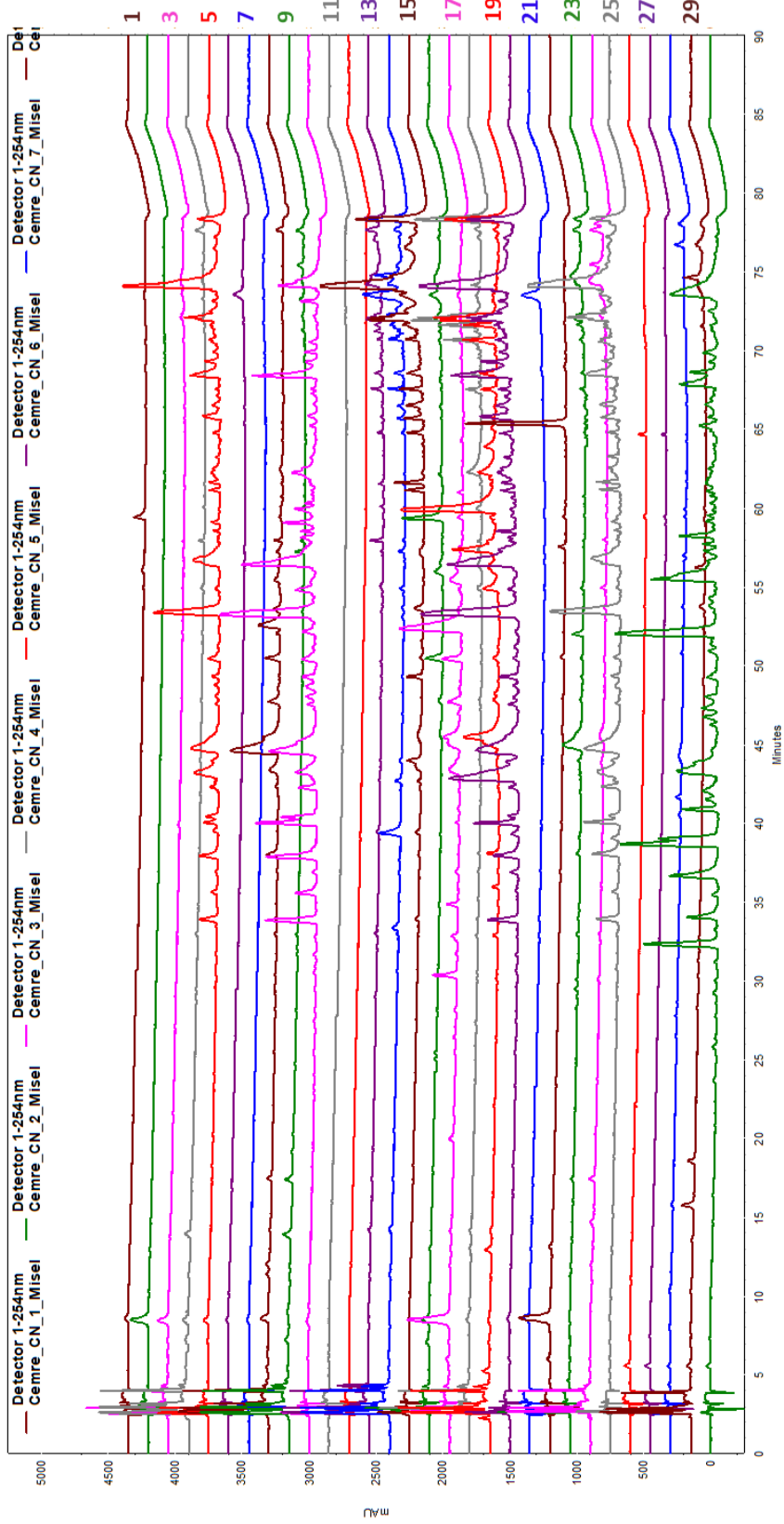
Farklı karbon ve azot kaynaklarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonunda 30 misel ekstre örneğinin (Şekil 4.8) HPLC analizinin kromatogramları Şekil 4.10, süpernatant ekstre örneğinin (Şekil 4.9) HPLC analizinin kromatogramları ise Şekil 4.11'deki gibidir.



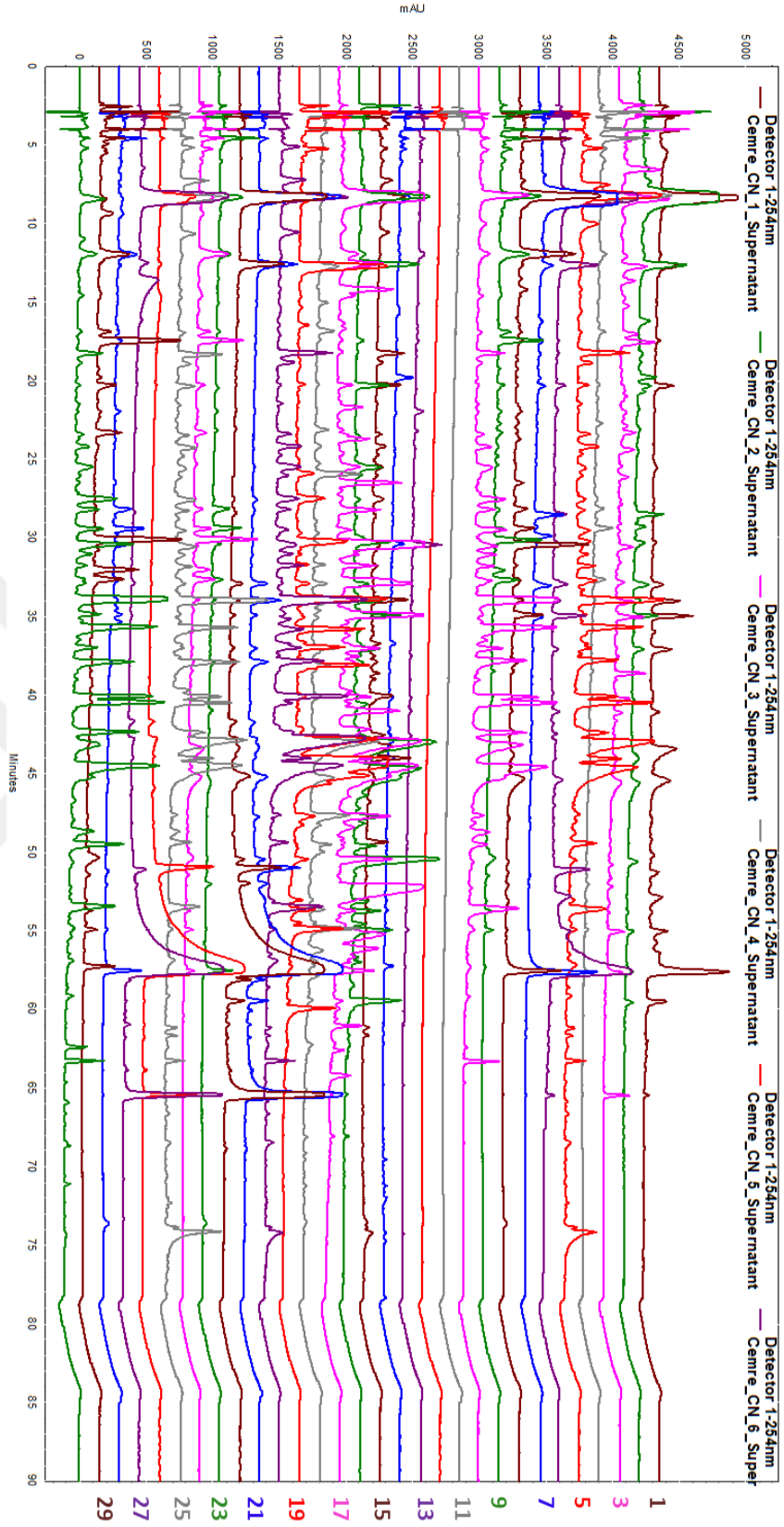
Şekil 4.8. Farklı karbon ve azot kaynaklarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen misel ekstre örnekleri.



Şekil 4.9. Farklı karbon ve azot kaynaklarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen süpernatant ekstre örnekleri.



Şekil 4.10. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen misel ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları.



Şekil 4.11. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen süpernatant ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları.

Bölüm 3.2.7.1’de belirtildiği şekilde ekstraksiyonu gerçekleştirilen misel örneklerinin sonuçları Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinin misel ekstraksiyonu sonrası yaş ağırlık, ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.

Üretim Ortamı (C&N Kaynağı)	Yaş Ağırlık (g)	Ekstre Kütlesi (mg)	Pik Sayısı	Pik Alanı	Toplam Pik Alanı	TPA/EK
Galaktoz & NaNO ₃	0,464	12,20	7	2097197	2558580,34	209719,70
Galaktoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	0,610	10,90	4	2632157	2869051,13	263215,70
Galaktoz & Pepton	2,799	92,40	22	2751699	25425698,76	275169,90
Galaktoz & YE	7,928	104,20	31	4105043	42774548,06	410504,30
Galaktoz & CSL	3,267	166,30	68	74634752	1241175925,76	7463475,20
Glikoz & NaNO ₃	0,541	22,30	4	1691910	3772959,30	169191,00
Glikoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	0,106	8,70	6	466914	406215,18	46691,40
Glikoz & Pepton	3,472	68,60	52	29238422	200575574,92	2923842,20
Glikoz & YE	8,705	155,10	26	5566064	86329652,64	556606,40
Glikoz & CSL	4,205	198,20	84	106973610	2120216950,20	10697361,00
Gliserol & NaNO ₃	0,113	17,90	2	73948	132366,92	7394,80
Gliserol & (NH ₄) ₂ SO ₄	0,204	23,50	2	56188	132041,80	5618,80
Gliserol & Pepton	3,400	48,30	51	10803764	52182180,12	1080376,40
Gliserol & YE	6,425	233,70	51	24067753	562463387,61	2406775,30
Gliserol & CSL	2,800	293,50	65	41748400	1225315540,00	4174840,00
Laktoz & NaNO ₃	1,049	14,30	41	13423609	19195760,87	1342360,90
Laktoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	2,294	8,60	67	43448806	37365973,16	4344880,60
Laktoz & Pepton	1,369	16,40	64	22563393	37003964,52	2256339,30
Laktoz & YE	1,731	31,40	77	63067211	198031042,54	6306721,10
Laktoz & CSL	2,990	148,20	87	132795183	1968024612,06	13279518,30
Maltoz & NaNO ₃	1,412	19,10	7	4418556	8439441,96	441855,60
Maltoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	0,674	6,40	30	18026759	11537125,76	1802675,90
Maltoz & Pepton	3,341	44,70	53	16174394	72299541,18	1617439,40
Maltoz & YE	9,694	125,40	40	8145742	102147604,68	814574,20
Maltoz & CSL	3,855	182,30	79	86192570	1571290551,10	8619257,00
Sükroz & NaNO ₃	0,272	18,20	6	1340701	2440075,82	134070,10
Sükroz & (NH ₄) ₂ SO ₄	0,153	10,50	7	1365936	1434232,80	136593,60
Sükroz & Pepton	3,875	114,50	22	3691444	42267033,80	369144,40
Sükroz & YE	8,504	151,00	29	7376714	111388381,40	737671,40
Sükroz & CSL	3,919	169,40	88	124840352	2114795562,88	12484035,20

Bölüm 3.2.7.2'de belirtildiği şekilde ekstraksiyonu gerçekleştirilen süpernatant örneklerinin sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinin süpernatant ekstraksiyonu sonrası ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.

Üretim Ortamı (C&N Kaynağı)	Ekstre Kütlesi (mg)	Pik Sayısı	Pik Alanı	Toplam Pik Alanı	TPA/EK
Galaktoz & NaNO ₃	3,60	58	77640724	27950660,64	7764072,40
Galaktoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	7,00	55	70982465	49687725,50	7098246,50
Galaktoz & Pepton	22,60	87	61450921	138879081,46	6145092,10
Galaktoz & YE	70,50	59	26071121	183801403,05	2607112,10
Galaktoz & CSL	90,40	107	157507465	1423867483,60	15750746,50
Glikoz & NaNO ₃	8,60	57	97632137	83963637,82	9763213,70
Glikoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	3,60	48	62317311	22434231,96	6231731,10
Glikoz & Pepton	101,90	65	68956581	702667560,39	6895658,10
Glikoz & YE	66,50	55	40275678	267833258,70	4027567,80
Glikoz & CSL	117,50	79	128866177	1514177579,75	12886617,70
Gliserol & NaNO ₃	147,20	0	0	0	0
Gliserol & (NH ₄) ₂ SO ₄	110,10	0	0	0	0
Gliserol & Pepton	168,80	37	9413763	158904319,44	941376,30
Gliserol & YE	173,30	68	12950665	224435024,45	1295066,50
Gliserol & CSL	162,40	79	47643139	773724577,36	4764313,90
Laktoz & NaNO ₃	9,20	80	127300686	117116631,12	12730068,60
Laktoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	7,90	100	222028622	175402611,38	22202862,20
Laktoz & Pepton	18,20	90	80858918	147163230,76	8085891,80
Laktoz & YE	38,20	83	155225438	592961173,16	15522543,80
Laktoz & CSL	76,00	100	159017459	1208532688,40	15901745,90
Maltoz & NaNO ₃	17,90	53	138582503	248062680,37	13858250,30
Maltoz & (NH ₄) ₂ SO ₄	19,00	47	141951553	269707950,70	14195155,30
Maltoz & Pepton	141,50	39	24820107	351204514,05	2482010,70
Maltoz & YE	58,00	61	50628987	293648124,60	5062898,70
Maltoz & CSL	102,90	102	140310251	1443792482,79	14031025,10
Sükroz & NaNO ₃	11,30	21	110114314	124429174,82	11011431,40
Sükroz & (NH ₄) ₂ SO ₄	9,80	31	116412186	114083942,28	11641218,60
Sükroz & Pepton	163,00	49	22756003	370922848,90	2275600,30
Sükroz & YE	71,30	63	60490531	431297486,03	6049053,10
Sükroz & CSL	119,20	101	153085850	1824783332,00	15308585,00

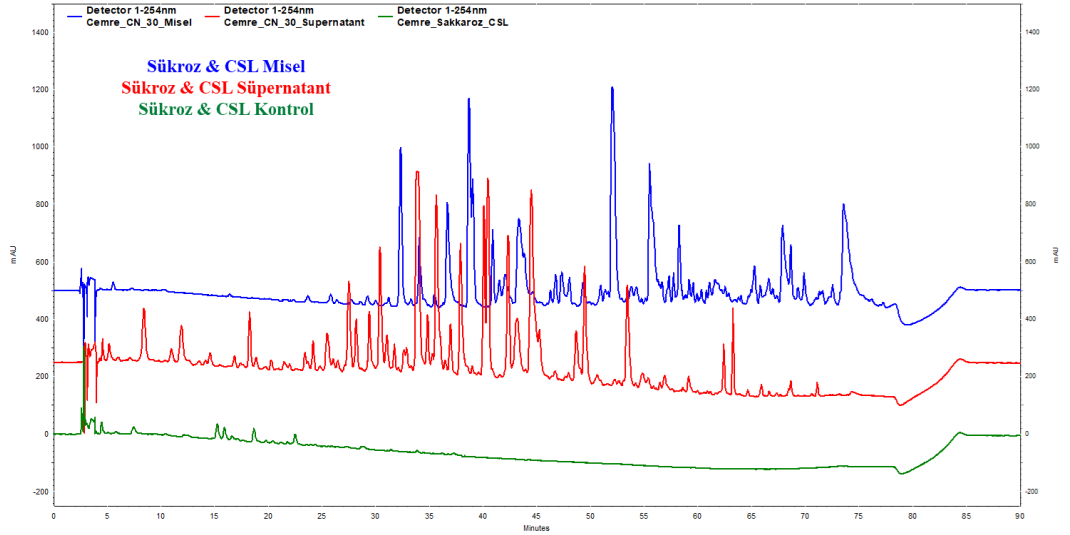
Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'teki sonuçlar değerlendirildiğinde; en yüksek biyokütle (yaş ağırlık) üretimi, laktozlu ortam hariç diğer tüm karbon kaynaklarında maya ekstraktı kullanılan ortamlarda gerçekleşmiştir. Laktoz içeren ortamlarda ise en yüksek biyokütle CSL içeren ortamda elde edilmiştir. Maya ekstraktından sonra iyi sonuçlar CSL ve pepton kullanılan sıvı üretimlerde elde edilmiştir.

Misel ekstre kütlesi, her bir karbon kaynağı için CSL kullanılan ortamlarda en yüksek sonucu vermiştir. CSL'yi maya ekstraktı ve pepton takip etmiştir. Süpernatant ekstre kütlelerinde ise galaktoz, glikoz ve laktoz içeren ortamlarda azot kaynağı olarak CSL; gliserol içeren ortamda maya ekstraktı; maltoz ve sükroz içeren ortamlarda ise pepton kullanıldığında en yüksek ekstre kütlesi elde edilmiştir.

Misel ve süpernatant ekstre örneklerinde en yüksek toplam pik alanı, her bir karbon kaynağı için CSL içeren ortamlarda gözlenmiştir. Misel ekstre örneklerinde glikoz hariç diğer karbon kaynaklarında maya ekstraktı içeren ortam CSL'den sonra en iyi azot kaynağı olarak göze çarpmaktadır. Glikozda ise pepton maya ekstraktından daha iyi sonuç vermiştir. Süpernatant ekstre örneklerinde glikoz ve maltozda ikinci en iyi azot kaynağı pepton, diğer karbon kaynaklarında maya ekstraktıdır.

Büyüme ve sekonder metabolit üretimi açısından inorganik azot kaynakları etkin sonuçlar vermemiştir. Bu ortamlarda büyüme ya hiç olmamış ya da çok az gerçekleşmiştir. Bu nedenle organik azot kaynakları ile karşılaştırıldığında inorganik azot kaynakları yetersiz kalmaktadır.

CSL'nin başarılı sonuçlar vermesi CSL'den kaynaklı bir girişim meydana gelip gelmediği sorusunu beraberinde getirmiştir. Sükroz & CSL ortamına inokülasyon yapılmadan (sükroz & CSL kontrol) ortamın süpernatant ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizi sonunda da girişim yapacak bir pik gözlenmemiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Sükroz & CSL ortamının misel ekstresi, süpernatant ekstresi ve kontrolüne ait HPLC analizi kromatogramlarının karşılaştırılması.

Gliserol ile yapılan üretimlerde yüksek ekstre kütlelerine ulaşılmasına rağmen sekonder metabolit profilleri ve toplam pik alanları diğer örneklerin oldukça gerisindedir. Bu durumun, gliserolün diğer karbon kaynaklarından farklı şekilde sıvı formda ve nispeten daha küçük molekül ağırlığına sahip olmasından ötürü etil asetat gibi organik bir solvent tarafından ekstre edildiğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu amaçla yukarıda sükroz & CSL için yapılan işlemin benzeri gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda herhangi bir üretim olmamasına rağmen gliserol & NaNO₃ örneğinin etil asetat fazında 156,2 mg, gliserol & (NH₄)₂SO₄ örneğinin etil asetat fazında 147,8 mg, gliserol & pepton örneğinin etil asetat fazında 164,5 mg, gliserol & YE örneğinin etil asetat fazında 158,5 mg, gliserol & CSL örneğinin etil asetat fazında 106,3 mg madde elde edilmiştir. Bu sonuçlar ilgili ekstrelerin büyük oranda gliserol içerdiğini göstermektedir.

HPLC kromatogramlarının ve üretim sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda sekonder metabolit çeşitliliği açısından 30 numaralı üretimin (sükroz & CSL) diğerlerine göre daha başarılı olduğu sonucuna varılmış ve iz element kombinasyonlarını içeren üretimin bu ortam baz alınarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

4.4. İz Element Kombinasyonlarının Denendiği Sıvı Kültür Üretiminin Sonuçları

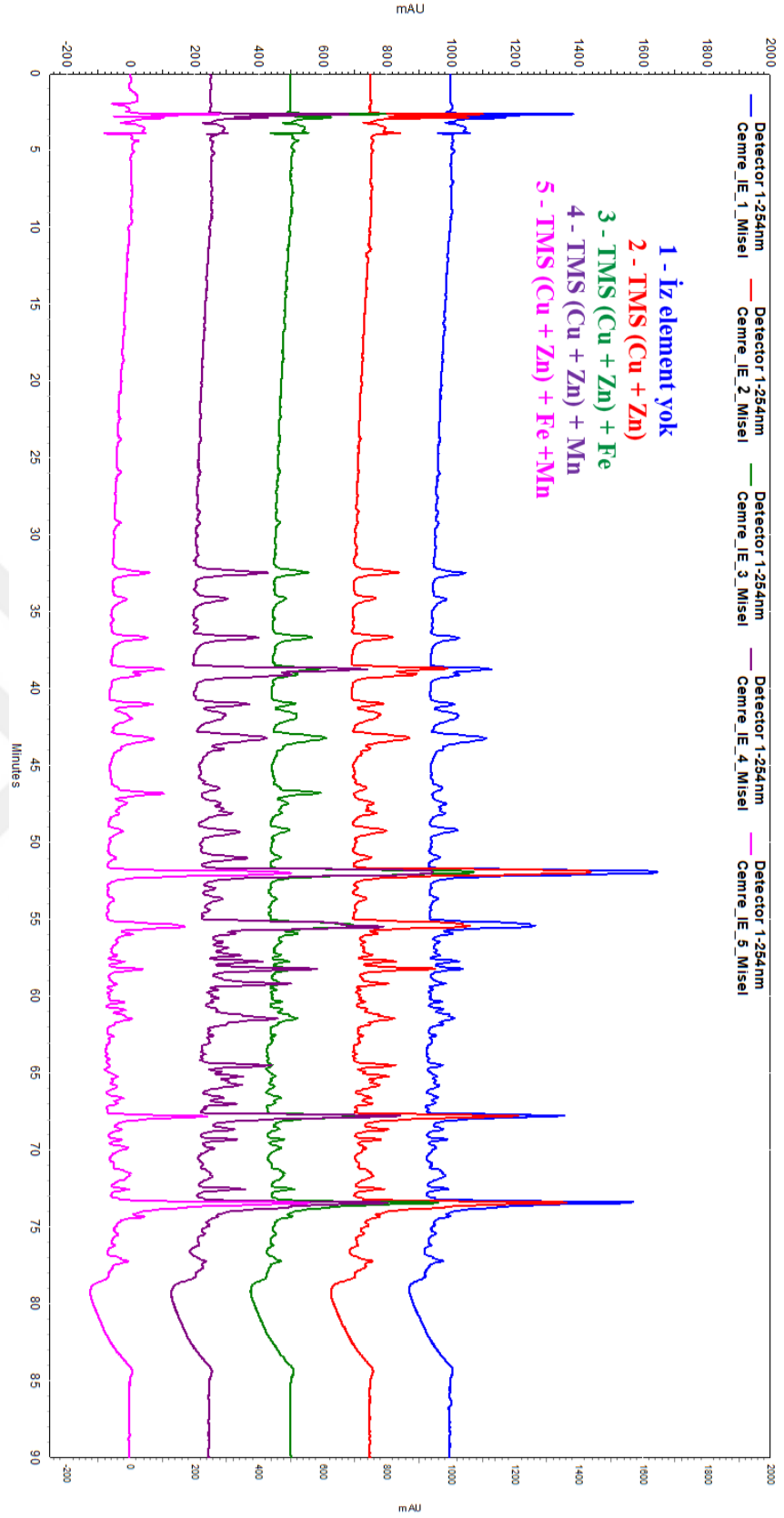
İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonunda 5 misel ekstre örneğinin (Şekil 4.13) HPLC analizinin kromatogramları Şekil 4.15, 5 süpernatant ekstre örneğinin (Şekil 4.14) HPCL analizinin kromatogramları Şekil 4.16'daki gibidir.



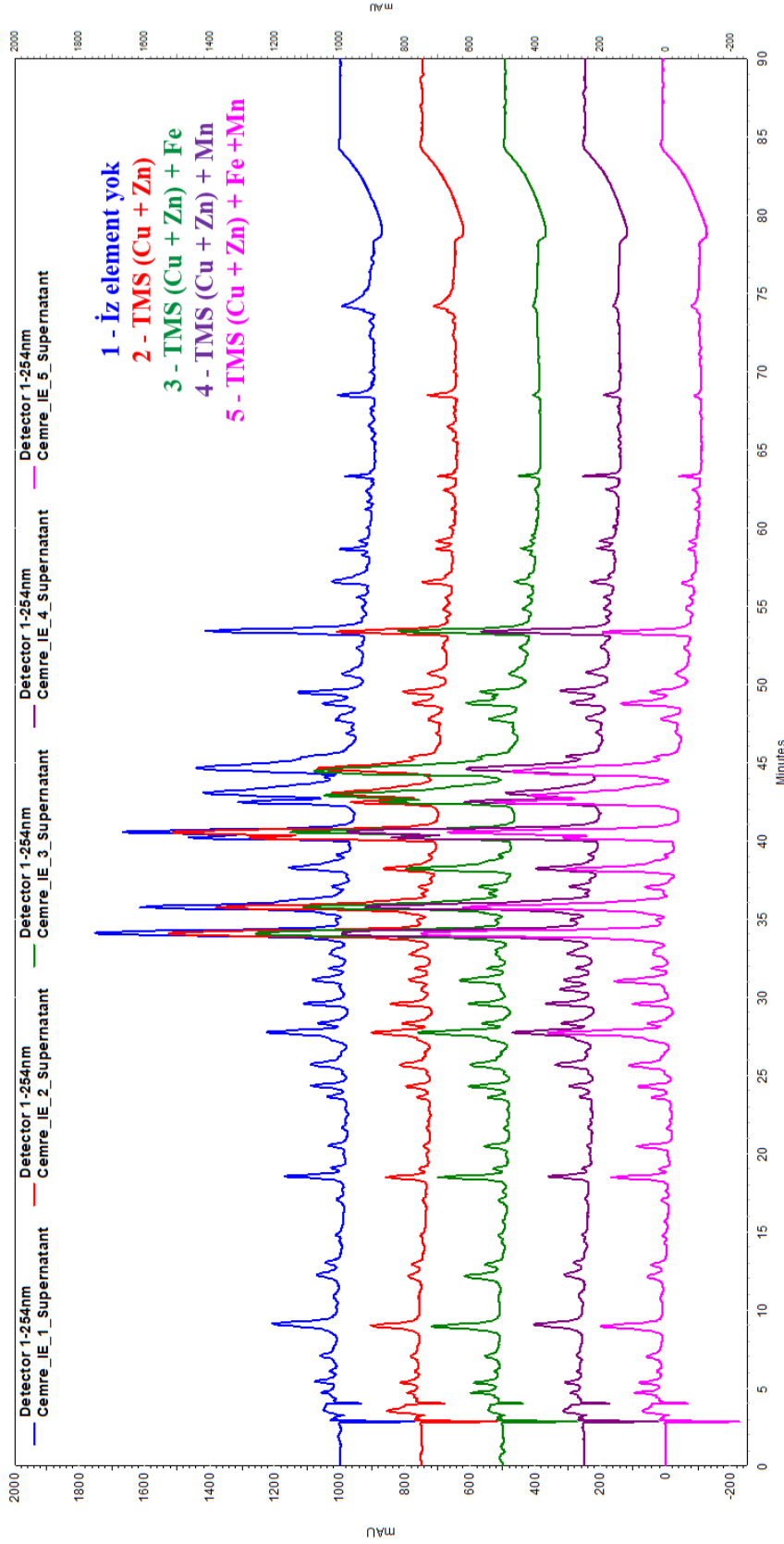
Şekil 4.13. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen misel ekstre örnekleri.



Şekil 4.14. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimi sonrası elde edilen süpernatant ekstre örnekleri.



Şekil 4.15. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen misel ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları.



Şekil 4.16. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonrası elde edilen süpernatant ekstre örneklerinin HPLC analizi kromatogramları.

Bölüm 3.2.7.1’de belirtildiği şekilde ekstraksiyonu gerçekleştirilen misel örneklerinin sonuçları Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimlerinin misel ekstraksiyonu sonrası yaş ağırlık, ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.

Erlen Numarası	Yaş Ağırlık (g)	Ekstre Kütlesi (mg)	Pik Sayısı	Pik Alanı	Toplam Pik Alanı	TPA/EK
1 (TMS yok)	3,674	138,30	68	76399676	1056607519,08	7639967,60
2 (TMS)	2,630	121,40	75	88522644	1074664898,16	8852264,40
3 (TMS + Fe)	3,847	152,90	64	66521618	1017115539,22	6652161,80
4 (TMS + Mn)	3,495	110,20	77	113480870	1250559187,40	11348087,00
5 (TMS + Fe + Mn)	3,992	168,40	62	68215918	1148756059,12	6821591,80

Bölüm 3.2.7.2’de belirtildiği şekilde ekstraksiyonu gerçekleştirilen süpernatant örneklerinin sonuçları Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. İz element kombinasyonlarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinin süpernatant ekstraksiyonu sonrası ekstre kütlesi, pik sayısı, pik alanı, toplam pik alanı ve TPA/EK sonuçları.

Erlen Numarası	Ekstre Kütlesi (mg)	Pik Sayısı	Pik Alanı	Toplam Pik Alanı	TPA/EK
1 (TMS yok)	124,80	82	143062149	1785415619,52	14306214,90
2 (TMS)	174,90	71	122228384	2137774436,16	12222838,40
3 (TMS + Fe)	84,70	71	144152939	1220975393,33	14415293,90
4 (TMS + Mn)	157,80	75	134484448	2122164589,44	13448444,80
5 (TMS + Fe + Mn)	83,30	67	138322656	1152227724,480	13832265,60

Misel ekstre örneklerinde en iyi biyokütle üretimi tüm iz elementleri içeren ortamda gerçekleşmiştir. Bu ortamı sırasıyla 3, 1, 4 ve 2 numaralı erlenler takip etmektedir. İnkübasyondan sonra erlenler incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.3) 1, 3 ve 5 numaralı erlenlerde daha büyük pellet oluşumu gözlenirken 2 ve 4 numaralı erlenlerdeki pelletler daha küçük olarak gözlenmiştir. Ekstre kütlesine bakıldığında da en iyi sonuç tüm iz elementlerin bulunduğu ortamdadır.

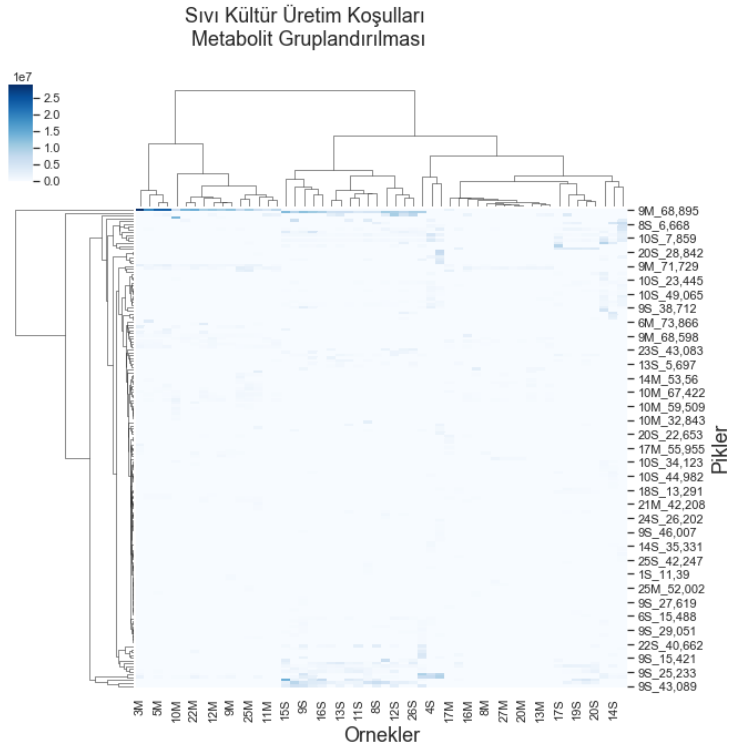
Sonrasında ise yüksek sonucu sırasıyla 3, 1, 2 ve 4 numaralı erlenler vermiştir. Toplam pik alanının üzerinde ise manganın önemli etkisi olduğu görülmüştür. En düşük toplam pik alanı ise demir içeren ortamda elde edilmiştir.

Süpernatant ekstre örneklerinde en yüksek ekstre kütlesine sadece TMS içeren ortamda ulaşılmıştır. İkinci en yüksek sonuç TMS + Mn içeren ortamda görülmüştür. En düşük sonuçlar ise Fe içeren ortamlarda elde edilmiştir. Bunlarla paralel sonuçlar toplam pik alanında da gözlenmiştir. Bu durumda demirin süpernatant ekstrelerinden elde edilen sekonder metabolitler üzerinde olumsuz etkisi olduğu yorumu yapılabilir.

Kromatogramlar genel olarak incelendiğinde hem misel (Şekil 4.15) hem süpernatant ekstre örneklerinde (Şekil 4.16) sekonder metabolit profillerinin çok benzer olduğu ve birbiri ile örtüştüğü görülmektedir. Bu durumda bu çalışmada kullanılan iz element kombinasyonlarının sekonder metabolit çeşitliliği üzerinde önemli bir farklılık oluşturmadığını söylemek mümkündür.

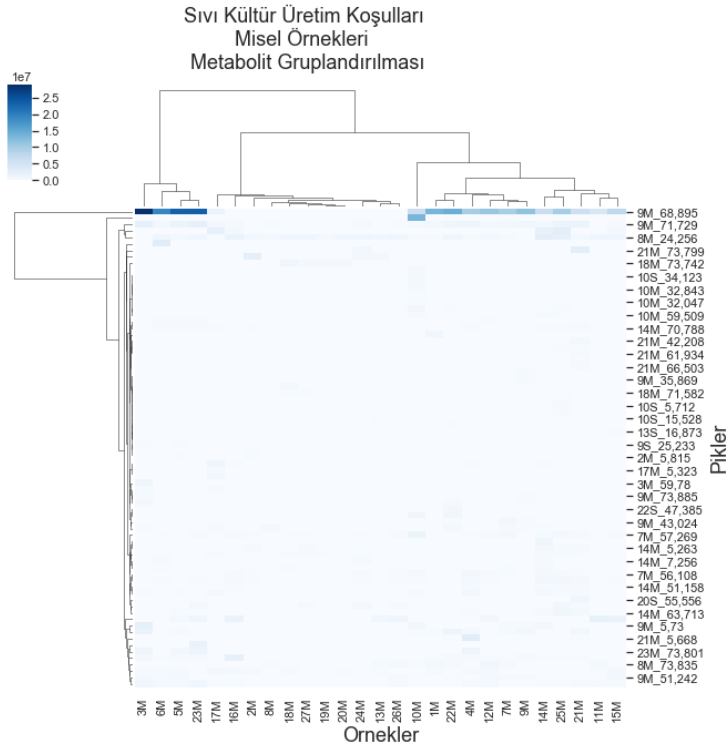
4.5. Veri Analizlerinin Değerlendirilmesi

4.5.1. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarının veri analizi sonuçları



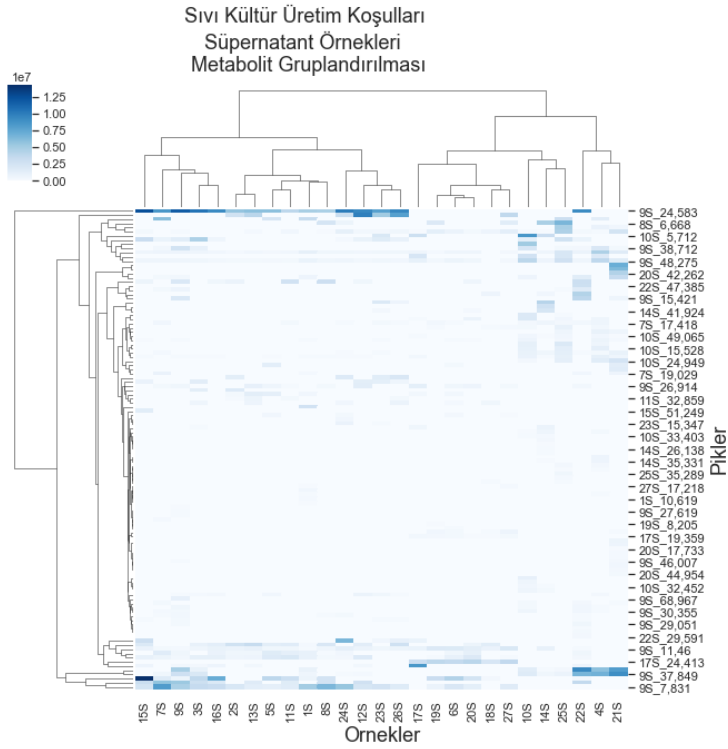
Şekil 4.17. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen majör pikler kullanılarak oluşturulmuş hiyerarşik sınıf analizi grafiği.

Şekil 4.17’de Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimdeki ekstrelerin majör piklerine ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan hiyerarşik sınıf analizi grafiği gösterilmiştir. Misel ekstrelerine ait örnekler “M”, süpernatant ekstrelerine ait örnekler ise “S” ile kodlanmıştır. Sınıflandırma grafiği incelendiğinde misel ve süpernatant ekstre örneklerinin birbirlerinden ayrı gruplarda toplandığı gözlenmiştir.



Şekil 4.18. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen misel ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak oluşturulmuş hiyerarşik sınıf analizi grafiği.

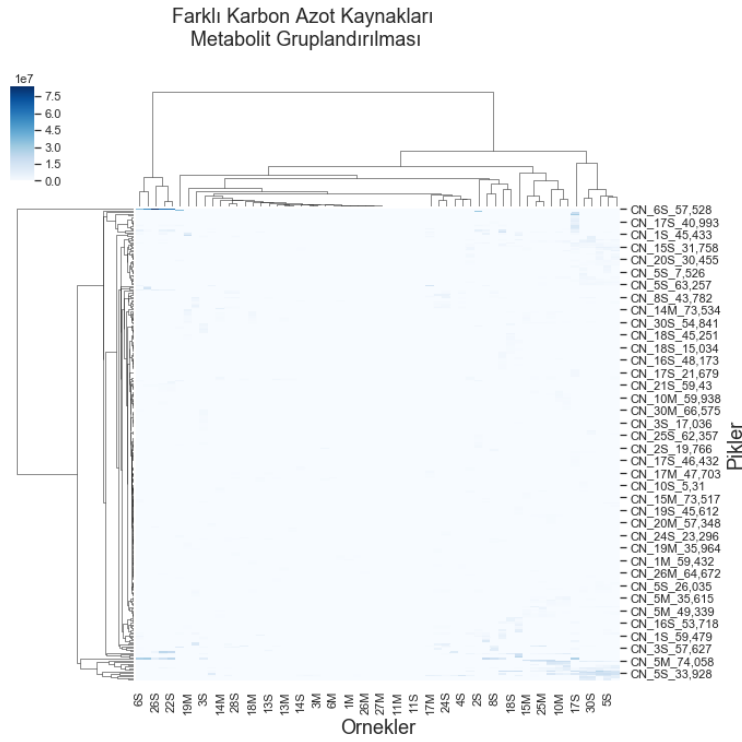
Şekil 4.18’de sıvı kültür koşulları denemesinden elde edilen misel ekstre örneklerindeki majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde örneklerin dört ayrı gruba ayrıldığı gözlenmiştir. Bu örneklerden 3M, 5M, 6M ve 23M numaralı örnekler diğer örneklerden ayrılmıştır. Bahsi geçen örneklerde 68,89. dakikada kolondan ayrılan molekül gruplanmanın gerçekleştirilmesinde baskın olmuştur. Bu örneklerin ortak özellikleri C/N oranının 32 olmasıdır. Bunun dışında kalan 3M, 5M ve 6M’nin çalkalama hızı 150 rpm, 23M örneğinin ise yüksek karıştırma hızı olan 210 rpm’dir.



Şekil 4.19. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen sıvı kültür koşullarına göre gerçekleştirilen üretimlerde elde edilen süpernatant ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak oluşturulmuş hiyerarşik sınıf analizi grafiği.

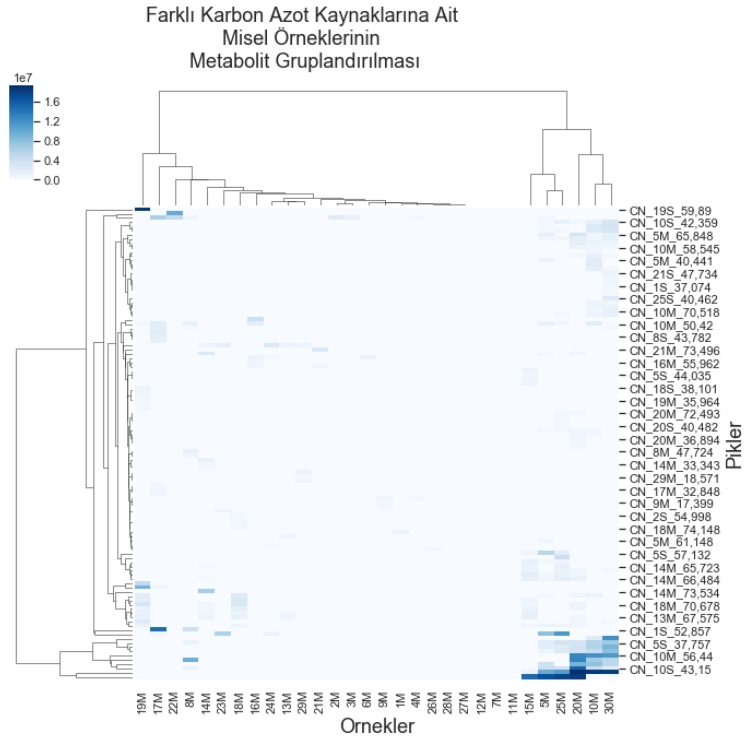
Şekil 4.19'da sıvı kültür koşulları denemesinden elde edilen süpernatant ekstre örneklerindeki majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde örneklerin iki gruba ayrıldığı gözlenmiştir. 35 °C'de yapılan üretimlerin hepsinin grafiğin sağ tarafında bulunan gruba üye olduğu görülmüştür (6S, 18S, 19S, 20S, 21S, 27S). Ayrıca C/N oranı 16 olan tüm üretimler yine sağ tarafta kalan grupta toplanmıştır (4S, 10S, 14S, 17S, 21S, 25S). Grafiğin sol tarafında kalan örneklerin hemen hepsinde alıkonma zamanı 24,58. dk olan pik sınıflandırmanın gerçekleşmesinde baskın rol oynamıştır. 22S örneğinin C/N oranı 32 olmasına rağmen 4S ve 21S örneklerine daha yakın şekilde gruplanmıştır. Bu örneklerden 22S ve 4S'ye ait HPLC profilleri incelendiğinde 35 ve 40. dakikalar arasındaki piklerin eşleştiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.7).

4.5.2. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretiminin veri analizi sonuçları



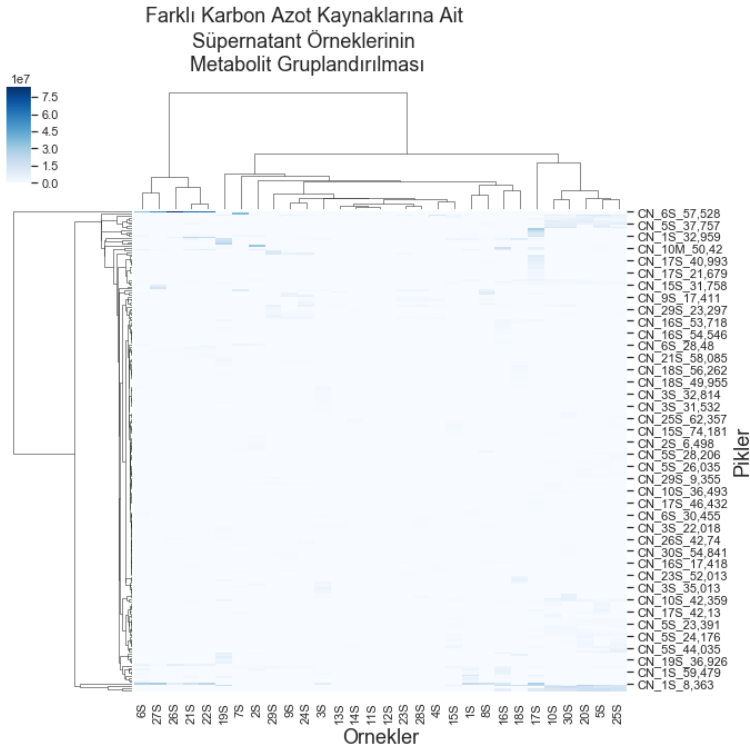
Şekil 4.20. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimine ait pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği.

Şekil 4.20’de farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerden elde edilen ekstrlerdeki majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Misel ekstrlerine ait örnekler “M”, süpernatant ekstrlerine ait örnekler ise “S” ile kodlanmıştır. Sınıflandırma grafiği incelendiğinde misel ve süpernatant ekstre örneklerinin büyük oranda birbirlerinden ayrı gruplarda toplandığı gözlenmiştir. Bu durum misel ve süpernatant ekstrlerinde farklı metabolitlerin olduğunun göstergesidir.



Şekil 4.21. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimine ait misel ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği.

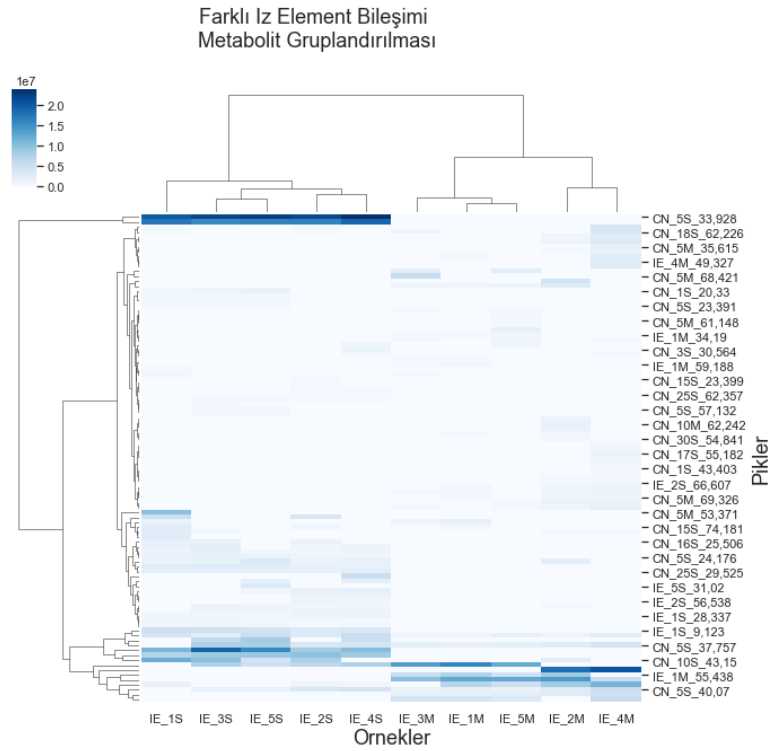
Şekil 4.21’de farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerden elde edilen misel ekstratlarındaki majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde örneklerin iki ana gruba ayrıldığı, bununla beraber birçok alt grubun oluştuğu gözlenmiştir. Grafiğin sağ tarafında kalan grup azot kaynağı olarak CSL’nin kullanıldığı örneklerdir. Bu durum, farklı karbon kaynakları kullanılsa da azot kaynağı olarak CSL’nin kullanılması halinde bu örneklerin sekonder metabolit profillerinde benzerlik olduğunu göstermektedir. Bu grubun içinde 15M olarak kodlanmış (karbon kaynağı olarak gliserol) örneğin HPLC profili diğerlerinden farklıdır.



Şekil 4.22. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimine ait süpernatant ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği.

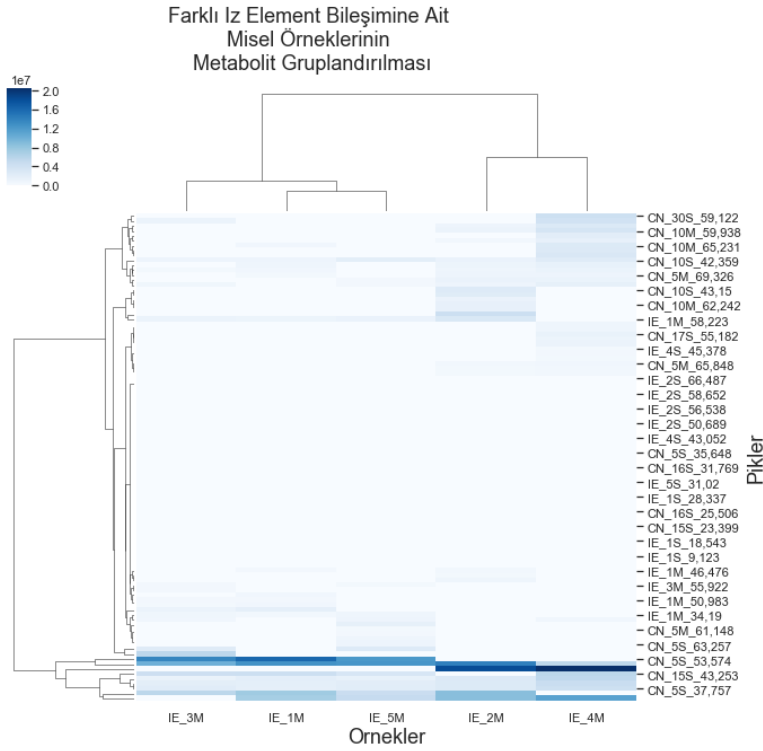
Şekil 4.22’de farklı karbon ve azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerden elde edilen süpernatant ekstrelerindeki majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde örneklerin iki ana gruba ayrıldığı gözlenmiştir. Bu ana gruplardan birisi üç alt gruba ayrılmıştır. Grafiğin sol tarafında kalan grup incelendiğinde 6S, 21S, 22S, 26S ve 27S örneklerinden oluştuğu gözlenmiştir. Bu örneklerin ortak yanları azot kaynağı olarak NaNO_3 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ’ün kullanılmış olmasıdır. Grafiğin sağ tarafında kalan grupta ise misel ekstrelerine benzer şekilde azot kaynağı olarak CSL’nin kullanıldığı örnekler yer almaktadır. Sadece karbon kaynağı olarak gliserolün kullanıldığı 15S örneği bu gruba dahil değildir.

4.5.3. İz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretiminin veri analizi sonuçları



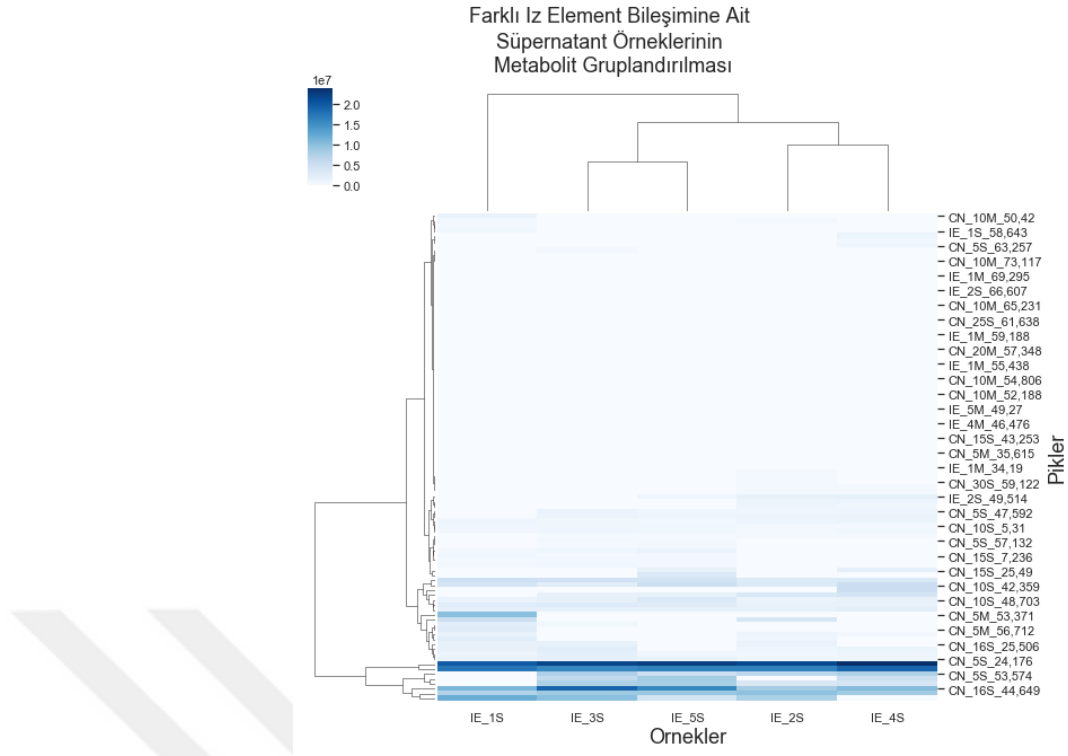
Şekil 4.23. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimine ait örneklerdeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği.

Şekil 4.23'te iz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonundaki ekstrelerde görülen majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde süpernatant ve misel ekstre örneklerinden oluşacak şekilde iki ana gruba ayrıldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.24. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimine ait misel ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği.

Şekil 4.24'te iz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonundaki misel ekstrelerinde gözlenen majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Örneklerin iki ana gruba ayrıldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.25. İz elementlerin kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimine ait süpernatant ekstre örneklerindeki majör pikler kullanılarak elde edilen sınıflandırma grafiği.

Şekil 4.25'te iz element kombinasyonlarının denendiği sıvı kültür üretimleri sonundaki süpernatant ekstrelerinde gözlenen majör piklere ait pik alanları kullanılarak elde edilmiş olan sınıflandırma grafiği gösterilmiştir. Örneklerin iki ana gruba ayrıldığı gözlenmiştir. Ortamına TMS eklenmeden gerçekleştirilen üretim tek başına bir grubu oluşturmuştur.

5. GENEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İnkübasyon sonrasında incelenen üretim erlenlerinde fermantasyon ortamının rengi ve pellet morfolojisi açısından gözle görülür şekilde farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Yaş ağırlık sonuçlarının birbirinden farklı olması değişen faktörlerin *Aspergillus brasiliensis*'in büyümesi üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Ekstraksiyon sonrasında birbirinden farklı renkler ve kütlelerde misel ve süpernatant ekstraktları elde edilmiştir. Ekstrelerin kütlelerinin farklı olması, koşullara ve ortam içeriğine göre farklı miktarlarda metabolit, ekstraktların renklerinin farklı olması ise farklı tiplerde metabolit üretildiği sonucunu çıkarmaktadır.

Çalışmamızda HPLC kromatogramları ve pik alanlarına göre yapılan sınıflandırmalar da ekstre örneklerinin sekonder metabolit profilleri arasındaki benzerlik ve farklılıkları göstermiştir. Bu tezde hedeflendiği gibi ortak olarak üretilen metabolitler olduğu kadar birbirinden farklı metabolitlerin olduğu da açıkça ortaya konmuştur. Bu durumda kültür koşullarının ve karbon & azot kaynaklarının değiştirildiği üretimlerde sekonder metabolit çeşitliliği artmaktayken iz element kombinasyonlarının denendiği üretimlerdeki metabolitler arasında ciddi fark bulunmamıştır.

Filamentöz funguslarda kültür değişkenlerinin ve/veya ortam içeriklerinin taranması ve optimizasyonu genellikle bir tane sekonder metabolitin üretimini temel alarak yapılmaktadır. Bu çalışmada ise tek bir metabolit hedef olarak belirlenmeyip metabolit üretiminin geneline bakıldığı için diğer çalışmalarla kıyaslama yapmak zorlaşmakla beraber bu çalışmada majör pikler baz alındığı için benzerlikler ve farklılıklar başarılı bir şekilde ortaya konmuştur.

Sıcaklığın 25 °C, çalkalama hızının 210 rpm, pH değerinin 6 ve C/N oranının 32 olduğu koşullar genel olarak funguslar için uygun koşullar olup çalışmamızda da bu sonuçlar doğrulanmıştır. Sıcaklık değerlendirildiğinde 25 °C ve 30 °C'de gerçekleşen üretimlerde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Funguslardan sekonder metabolit üretimi kapsamında yapılan çalışmaların çoğu (Casas López et al., 2004; Abdelhafez et al., 2016; Mouafi et al., 2016; Liu et al., 2018) 28 °C - 30 °C'de gerçekleştirilmektedir. Bu durum da bu çalışmada elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Çok sayıda çalışma sıvı kültürde filamentöz fungusların optimum büyüme ve sekonder metabolit üretimi gerçekleştirmesi için asidik pH'ın (5.0 – 6.0) gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Bae et al., 2000; Stanly Pradeep and Pradeep, 2013; Cho et al., 2002). Bu çalışmada ekstre kütlesi ve toplam pik alanları incelendiğinde yüksek sonuçlar pH 6'da görülmüştür.

Çalışmamızda farklı C/N oranlarının kullanımına bağlı olarak fungus tarafından mevcut koşullarda üretilen metabolit üretimi üzerine odaklanılmıştır. En iyi C/N oranının 32 olduğu görülmüştür. C/N oranı 16 ya da 48 iken hücre büyümesi ve metabolit üretiminde sınırlamalar meydana gelmiştir. Casas López ve arkadaşlarının (2004) yaptığı bir çalışmada ise artan C/N oranının lovastatin üretiminde pozitif etkisi olduğundan bahsedilmiştir. Azot sınırlamasının lovastatin biyosentezini tetiklediği düşünülmektedir.

Büyüme ve sekonder metabolizma için gerekli karbon kaynakları arasında farklar bulunabilmektedir. Örneğin glikoz büyüme için eşsiz bir kaynak iken sekonder metabolizma için aynı ölçüde faydalı olmayabilmektedir (Parra et al., 2005). Karbon kaynaklarının kullanım şekilleri fungal türler arasında değişiklik göstermektedir (Hwang et al., 2004). Bu çalışmada glikoz ve sükroz sekonder metabolit profilleri açısından benzerlik göstermiştir. Bu durum karbon kaynağı olarak birden fazla alternatifin kullanılabilirliği açısından avantaj sağlamaktadır.

Literatüre göre Betina'nın (1994) da belirttiği gibi inorganik azot kaynağı içeren ortamlarda organik azot kaynaklarına kıyasla sekonder metabolit üretimi ya hiç gerçekleşmemiş ya da çok az gerçekleşmiştir. Bunun yanında inorganik azot kaynakları büyüme üzerinde etki göstermemiştir.

Organik azot kaynakları ise hem mikrobiyal büyüme hem de metabolit üretimi açısından oldukça başarı göstermiştir. Maya ekstraktı, pepton ve CSL kompleks besiyeri (kimyasal tanımlaması yapılmamış) içerikleri olduklarından bu kaynakların büyüme ve sekonder metabolit üretimi üzerinde olumlu etkileri olmuştur.

Literatür özetinde de detaylı bir şekilde bahsedildiği üzere iz elementler enzimler için kofaktör olarak görev yapmaları nedeniyle büyüme açısından gereklidir (Fazenda et al., 2008). Çalışmamızda iz elementler biyokütleyi ve pellet morfolojisini belirgin şekilde etkilerken sekonder metabolit üretimi ve profili üzerinde gözle görülür bir farklılığa neden olmamıştır.

Tüm HPLC analizlerinin kromatogramları incelendiğinde, süpernatant ekstre örneklerinden nispeten polar metabolitler elde edilirken misel ekstre örneklerinden daha apolar metabolitler elde edildiği göze çarpmaktadır. HPLC analizi sırasında kullanılan kolon apolar özellikte olduğu için (RP C-18 katı fazlı kolon) süpernatant ekstre örneklerinde göze çarpan ve analizin ilk yarısında gözlenen pikler polar metabolitlere aitken misel ekstre örneklerinde göze çarpan ve analizin ikinci yarısında görülen pikler apolar metabolitlere aittir.

Hiyerarşik sınıf (küme) analizi (HCA) hem deneysel hem de gözlemsel verilerin sınıflandırılması ve yorumlanmasında oldukça kolay kullanılabilen esnek bir yöntemdir (Gries, 2015). Bu nedenle majör olarak üretilen metabolitlerden yola çıkılarak misel ve süpernatant ekstre örneklerinin sınıflandırılması HCA yöntemi ile gerçekleştirilmiş, örneklerin nasıl gruplandığının yorumları bu sınıflandırmalar üzerinden yapılmıştır.

6. ÖNERİLER

Çalışmamızda kullandığımız azot kaynaklarından biri olan CSL'yi içeren tüm ortamların zengin metabolit profiline sahip olması ve kompleks bir besiyeri olmasından ötürü CSL'nin sıvı kültür üretimlerinde karbon ve azot kaynağı olarak kullanılması ilerleyen zamanlarda gerçekleştirilecek bir çalışma olabilir. Mısır ve nişasta endüstrisinin bir yan ürünü olan CSL kolaylıkla bulunan, endüstriyel ölçekli üretimi gerçekleştiren bir hammadde olduğu için kullanılan diğer karbon ve azot kaynaklarına göre avantajlıdır. Fakat bununla beraber net bir kimyasal kompozisyonunun olmayışı standardize bir üretim yapmayı zorlaştırabilir.

Alternatif azot kaynaklarından olan pepton içeren ortamların kullanılması durumunda peptonun yağsı içeriğinden dolayı misel ekstre örneklerinin evaporasyonunda zorluklarla karşılaşmıştır. Tüm sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda CSL'ye alternatif olarak başka bir azot kaynağı kullanılması gereken durumlarda maya ekstraktı kullanılması önerilmektedir.

Karbon kaynağı olarak gliserol kullanılması durumunda büyümeye bağlı olarak sekonder metabolit üretiminin düşük olmasından dolayı başka bir karbon kaynağı tercih edilebilir.

Yüksek ekstre miktarı gereken durumlarda, en iyi sekonder metabolit miktarı ve çeşitliliğine ulaşılan kültür koşulları (sıcaklık 25 °C, çalkalama hızı 150 rpm, pH 6, C/N oranı 32) ve ortam içeriği (sükroz & CSL) kullanılarak yüksek miktarda misel ve süpernatant ekstresi elde edilebilecektir.

Kültür koşulları ve ortam içerikleri değiştirilerek sekonder metabolit üretimindeki benzerlik ve farklılıklar başarılı bir şekilde ortaya konmuştur. İlerleyen aşamalarda ise yüksek miktarlarda üretilen sekonder metabolitlerin yapılarının LC-MS, NMR gibi yöntemler ile aydınlatılması mümkündür. Böylelikle metabolitin ne olduğu net olarak ortaya koyulabilecektir.

Çalışmamızda sekonder metabolit profillerinin belirlenmesinde HPLC-DAD kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda UHPLC analizinin az örnek hacmi ile daha iyi çözünürlükte daha iyi metabolit profilleri elde edilmesi açısından denenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. and Cabañes, F.J.**, 2004, Taxonomy and significance of black aspergilli, *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1):33-49 pp.
- Abdelhafez, A.A., Hussein, S.M., Ali, A.A.A. and Sanad, H.M.**, 2016, Optimization of β -carotene production from agro-industrial by-products by *Serratia marcescens* ATCC 27117 using Plackett–Burman design and central composite design, *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1):87-96 pp.
- Adinarayana, K. and Ellaiah, P.**, 2002, Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp., *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3):272-278 pp.
- Bae, J.T., Singa, J., Park, J.P., Song, C.H. and Yun, J.W.**, 2000, Optimization of submerged culture conditions for exopolymer production by *Paecilomyces japonica*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10:482-487 pp.
- BD Bionutrients™**, “Technical Manual Advanced Bioprocessing”, https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients_tech_manual.pdf (Erişim tarihi: 24 Nisan 2019)
- Berger, L., Stamford, T., Stamford-Arnaud, T., de Oliveira Franco, L., do Nascimento, A., Cavalcante, H., ... and de Campos-Takaki, G.**, 2014, Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity, *Molecules*, 19(3):2771-2792 pp.
- Betina, V.**, 1994, Bioactive secondary metabolite of microorganisms: process in industrial microbiology, In: *Physiological Regulation of Secondary Metabolism*, Elsevier Science, Amsterdam & New York, 66-80 pp.
- Biotech Solabia Group**, “Pancreatic Digest Of Casein - A1403/A1433”, <http://solabia.com/solabia/content/NT00004416.pdf> (Erişim tarihi: 24 Nisan 2019)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Biotech Solabia Group**, “Yeast Extract - A1202”, <http://solabia.com/solabia/content/NT0000440A.pdf> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2019)
- Brzonkalik, K., Hümmer, D., Syldatk, C. and Neumann, A.**, 2012, Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation, *AMB Express*, 2(1):28 p.
- Cabañes, F.J. and Bragulat, M.R.**, 2018, Black aspergilli and ochratoxin A-producing species in foods, *Current Opinion in Food Science*, 23:1-10 pp.
- Casas López, J.L., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J.M., Ación Fernández, F.G., Molina Grima, E. and Chisti, Y.**, 2004, Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(10): 1119-1126 pp.
- Cho, Y.J., Park, J.P., Hwang, H.J., Kim, S.W., Choi, J.W. and Yun, J.W.**, 2002, Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*, *Letters in Applied Microbiology*, 35(3):195-202 pp.
- Couto, S.R. and Sanromán, M.A.**, 2006, Application of solid-state fermentation to food industry-a review, *Journal of Food Engineering*, 76(3):291-302 pp.
- Dasu, V.V., Panda, T. and Chidambaram, M.**, 2003 Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method, *Process Biochemistry*, 38(6):877-880 pp.
- Demain, A.L. and Fang, A.**, 2000, Advances in biochemical engineering/biotechnology: history of modern biotechnology I, In: *The Natural Functions of Secondary Metabolites*, Springer, Berlin, 2-39 pp.
- Deng, Z.L., Du, C.X., Li, X., Hu, B., Kuang, Z.K., Wang, R., ... and Kong, D.X.**, 2013, Exploring the biologically relevant chemical space for drug discovery, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(11):2820-2828 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dinarvand, M., Rezaee, M., Masomian, M., Jazayeri, S.D., Zareian, M., Abbasi, S. and Ariff, A.B.**, 2013, Effect of C/N ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra-and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611, *BioMed Research International*, 2013.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-Aoulmi, Z., Meraihi, Z. and Bennamoun, L.**, 2006, Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder, *Journal of Food Engineering*, 73(2):190-197 pp.
- Efe, B.**, 2019, Sıvı kültürde *Aspergillus brasiliensis* biyokütle üretimi için büyüme ortamı/iz elementlerin optimizasyonu, Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, 15-16 s (yayımlanmamış).
- Fang, Q.H. and Zhong, J.J.**, 2002, Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide, *Biochemical Engineering Journal*, 10(1):61-65 pp.
- Fazenda, M.L., Seviour, R., McNeil, B. and Harvey, L.M.**, 2008, Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi, *Advances in Applied Microbiology*, 63:33-103 pp.
- Ferracin, L.M., Frisvad, J.C., Taniwaki, M.H., Iamanaka, B.T., Sartori, D., Schapovaloff, M.E. and Fungaro, M.H.P.**, 2009, Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* aggregate, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(SPE):241-248 pp.
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K.M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G. and Pandey, A.**, 2003, Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*, *Biochemical Engineering Journal*, 15(2):107-115 pp.
- Franco-Lara, E., Link, H. and Weuster-Botz, D.**, 2006, Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm, *Process Biochemistry*, 41(10):2200-2206 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H., Pitt, J.I. and Samson, R.A.**, 1985, Infrageneric taxa of *Aspergillus*, In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*, Plenum Press, New York, 55-62 pp.
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J. and Schmid, F.**, 2000, Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions, *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1):17-48 pp.
- Gomes, J. and Menawat, A.S.**, 2000, Precise control of dissolved oxygen in bioreactors—a model-based geometric algorithm, *Chemical Engineering Science*, 55(1):67-78 pp.
- Gries, S.T.**, 2015, Quantitative linguistics, *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*, 725 - 732 pp.
- Gunatilaka, A.L.**, 2006, Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence, *Journal of Natural Products*, 69(3):509-526 pp.
- Gupte, M. and Kulkarni, P.**, 2003, A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp MTCC 3340 using full factorial design, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(6):605-610 pp.
- Herbert, J.M., Savi, P., Lalé, A., Laplace, M.C., Baudry, N., Pereillo, J.M. and Emonds-Alt, X.**, 1994, Malformin-A1 inhibits the binding of interleukin-1 β (IL1 β) and suppresses the expression of tissue factor in human endothelial cells and monocytes, *Biochemical Pharmacology*, 48(6):1211-1217 pp.
- Ho, H.L. and Iyilia, Z.**, 2015, Optimised production of xylanase by *Aspergillus brasiliensis* under submerged fermentation (SmF) and its purification using a two-step column chromatography, *Journal of Advances in Biology and Biotechnology*, 4:1-22 pp.
- Hodgson, E.**, 2012, Toxins and venoms, In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press, 373-415 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hölker, U. and Lenz, J.**, 2005, Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?, *Current Opinion in Microbiology*, 8(3):301-306 pp.
- Hwang, H.J., Kim, S.W., Xu, C.P., Choi, J.W. and Yun, J.W.**, 2004, Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures, *Journal of Applied Microbiology*, 96(6):1296-1305 pp.
- Jurjević, Ž., Peterson, S.W., Stea, G., Solfrizzo, M., Varga, J., Hubka, V. and Perrone, G.**, 2012, Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air, *IMA Fungus*, 3(2):159-173 pp.
- Karakoç, S.B. and Aksöz, N.**, 2004, Optimization of carbon-nitrogen ratio for production of gibberellic acid by *Pseudomonas* sp., *Polish Journal of Microbiology*, 53(2):117-120 pp.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E.S. and Azbar, N.**, 2016, Experimental design methods for bioengineering applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2):368-388 pp.
- Kim, H.U., Charusanti, P., Lee, S.Y. and Weber, T.**, 2016, Metabolic engineering with systems biology tools to optimize production of prokaryotic secondary metabolites, *Natural Product Reports*, 33(8):933-941 pp.
- Kobbe, B., Cushman, M., Wogan, G.N. and Demain, A.L.**, 1977, Production and antibacterial activity of malformin C, a toxic metabolite of *Aspergillus niger*, *Applied and Environmental Microbiology*, 33(4):996-997 pp.
- Koyama, K., Ominato, K., Natori, S., Tashiro, T. and Tsuruo, T.**, 1988, Cytotoxicity and antitumor activities of fungal bis (naphtho- γ -pyrone) derivatives, *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 11(9):630-635 pp.
- Kozakiewicz, Z.**, 1989, *Aspergillus* species on stored products, *Mycological Papers*, 161:1-188 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kunamneni, A., Permaul, K. and Singh, S.** 2005, Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2):168-171 pp.
- Lai, L.S.T., Pan, C.C. and Tzeng, B.K.**, 2003, The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures, *Process Biochemistry*, 38(9):1317-1326 pp.
- Lamboni, Y., Nielsen, K.F., Linnemann, A.R., Gezgin, Y., Hell, K., Nout, M.J., ... and Frisvad, J.C.**, 2016, Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from raw cashew nuts from Benin, West Africa, *PLOS One*, 11(10).
- Liu, C.Q., Pan, Z.H., An, F.L. and Lu, Y.H.**, 2018, Co-addition strategy for enhancement of chaetominine from submerged fermentation of *Aspergillus fumigatus* CY018, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(2):384-399 pp.
- Majumder, A., Singh, A. and Goyal, A.**, 2009 Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization, *Carbohydrate Polymers*, 75(1):150-156 pp.
- Mandenijs, C. F. and Brundin, A.**, 2008, Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology, *Biotechnology Progress*, 24(6):1191-1203 pp.
- Marwick, J. D., Wright, P. C. and Burgess, J. G.**, 1999, Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design, *Marine Biotechnology*, 1(5):495-507 pp.
- Mattey, M.**, 1992, The production of organic acids, *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(1-2):87-132 pp.
- Montgomery, D.C.**, 2005, Design and Analysis of Experiments (6th edn.), John Wiley and Sons, New York.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mouafi, F.E., Ibrahim, G. S. and Elsoud, M.M.A.**, 2016, Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus*, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(2):253-259 pp.
- Murthy, H.N., Lee, E.J. and Paek, K.Y.**, 2014, Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1):1-16 pp.
- Náhlík, J., Hrnčířík, P., Mareš, J., Rychtera, M. and Kent, C.A.**, 2017, Towards the design of an optimal strategy for the production of ergosterol from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, *Biotechnology Progress*, 33(3):838-848 pp.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M.**, 2012, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *Journal of Natural Products*, 75(3):311-335 pp.
- Nielsen, K.F., Mogensen, J.M., Johansen, M., Larsen, T.O. and Frisvad, J.C.**, 2009, Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5):1225-1242 pp.
- Niwas, R., Singh, V., Singh, R., Tripathi, D. and Tripathi, C.**, 2013, Production, purification and characterization of the cholesterol oxidase from newly isolated *Streptomyces* sp., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29:2077–2085 pp.
- Oh, J.Y., Cho, E.J., Nam, S.H., Choi, J.W. and Yun, J.W.**, 2007, Production of polysaccharide–peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*, *Process Biochemistry*, 42(3):352-362 pp.
- Organotechnie® S.A.S.**, “Casein Peptone Plus 19544 Technical Data Sheet”, <http://www.organotechnie.com/wp-content/uploads/2016/08/19544.pdf>
(Erişim tarihi: 24 Nisan 2019)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H. and Wang, H.**, 2019, Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: a literature review, *Frontiers in Microbiology*, 10:294 p.
- Pandey, A.**, 2003, Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3):81-84 pp.
- Papagianni, M.**, 2004, Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes, *Biotechnology Advances*, 22(3):189-259 pp.
- Parra, R., Aldred, D. and Magan, N.**, 2005, Medium optimization for the production of the secondary metabolite squalestatin S1 by a *Phoma* sp. combining orthogonal design and response surface methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7):704-711 pp.
- Pichersky, E. and Gang, D.R.**, 2000, Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective, *Trends in Plant Science*, 5(10):439-445 pp.
- Pilar, P., Votruba, J., Dobersky, P. and Prokop, A.**, 1976, Application of mathematical optimization methods in microbiology, *Folia Microbiologica*, 21(5):391-405 pp.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D.**, 2009, *Fungi and Food Spoilage*, Springer, London.
- Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, A.**, 2005, An overview of engineering aspects of solid state fermentation, *Malaysian Journal of Microbiology*, 1(2):10-16 pp.
- Raper, K.B. and Fennell, D.I.**, 1965, *The Genus Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Rateb, M.E., Houssen, W.E., Harrison, W.T., Deng, H., Okoro, C.K., Asenjo, J. A., ... and Jaspars, M.**, 2011, Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment, *Journal of Natural Products*, 74(9):1965-1971 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... and Langley, E.**, 2010, Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source, *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2):146-167 pp.
- Samson, R.A., Houbraeken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F., Frank, J.M. and Frisvad, J.C.**, 2004, New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*, *Studies in Mycology*, 50:45-56 pp.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraeken, J.A.M.P., Frisvad, J.C. and Varga, J.**, 2007, Diagnostic tools to identify black aspergilli, *Studies in Mycology*, 59:129-145 pp.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H., ... and Varga, J.**, 2014, Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, *Studies in Mycology*, 78:141-173 pp.
- Show, P.L., Oladele, K.O., Siew, Q.Y., Aziz Zakry, F.A., Lan, J.C.W. and Ling, T.C.**, 2015, Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*, *Frontiers in Life Science*, 8(3):271-283 pp.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M. and Tripathi, C.K.M.**, 2017, Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review, *Frontiers in Microbiology*, 7:2087 p.
- Singh, M.P., Leighton, M.M., Barbieri, L.R., Roll, D.M., Urbance, S.E., Hoshan, L. and McDonald, L.A.**, 2010, Fermentative production of self-toxic fungal secondary metabolites, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(4):335-340 pp.
- Song, Y.C., Li, H., Ye, Y.H., Shan, C.Y., Yang, Y.M. and Tan, R.X.**, 2004, Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths, *FEMS Microbiology Letters*, 241(1):67-72 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stanly Pradeep, F. and Pradeep, B.V.**, 2013, Optimization of pigment and biomass production from *Fusarium moniliforme* under submerged fermentation conditions, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3).
- Subramaniam, R. and Vimala, R.**, 2012, Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study, *International Journal of Science and Nature*, 3(3):480-486 pp.
- Suriya, J., Bharathiraja, S., Krishnan, M., Manivasagan, P. and Kim, S.K.**, 2016, Marine microbial amylases: properties and applications, *In Advances in Food and Nutrition Research*, 79:161-177 pp.
- Talukdar, S., Talukdar, M., Buragohain, M., Yadav, A., Yadav, R.N.S. and Bora, T.C.**, 2016, Enhanced candidicidal compound production by a new soil isolate *Penicillium verruculosum* MKH7 under submerged fermentation, *BMC Microbiology*, 16:288 p.
- Tarley, C.R.T., Silveira, G., dos Santos, W.N.L., Matos, G.D., da Silva, E.G.P., Bezerra, M.A., ... and Ferreira, S.L.C.**, 2009, Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology, *Microchemical Journal*, 92(1):58-67 pp.
- Teng, Y. and Xu, Y.**, 2008, Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method, *Bioresource Technology*, 99(9):3900-3907 pp.
- Vaidya, R., Vyas, P. and Chhatpar, H.S.**, 2003, Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*, *Enzyme and Microbial Technology*, 33(1):92-96 pp.
- Vaidyanathan, S., Macaloney, G., Vaughan, J., McNeil, B. and Harvey, L.M.**, 1999, Monitoring of submerged bioprocesses, *Critical Reviews in Biotechnology*, 19(4):277-316 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Varga, J. and Samsaon, R.A.**, 2008, *Aspergillus* in the Genomic Era, Wageningen Academic Publishers, 334p.
- Varga, J., Kevei, F., Hamari, Z., Tóth, B., Téren, J., Croft, J.H. and Kozakiewicz, Z.**, 2000, Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli, In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 397-411 pp.
- Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., ... and Samson, R.A.**, 2007, *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8):1925-1932 pp.
- Varoglu, M., Corbett, T.H., Valeriote, F.A. and Crews, P.**, 1997, Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*, *The Journal of Organic Chemistry*, 62(21):7078-7079 pp.
- Wagner, R., Mitchell, D.A., Lanzi Sasaki, G., Lopes de Almeida Amazonas, M. A. and Berovič, M.**, 2003, Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides, *Food Technology and Biotechnology*, 41(4):371-382 pp.
- Wang, J. and Wan, W.**, 2009, Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(1):235-244 pp.
- Wang, Y., Fang, X., An, F., Wang, G. and Zhang, X.**, 2011, Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology, *Microbial Cell Factories*, 10:98 p.
- Yates, F.**, 1937, Design and Analysis of Factorial Experiments, Imperial Bureau of Soil Science, London.
- Yin, X., You, Q. and Jiang, Z.**, 2011, Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology, *Carbohydrate Polymers*, 86(3):1358-1364 pp.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması “117Z111” numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir. Bu tez çalışmasını proje kapsamında finansal olarak destekleyen TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca danışmanlığımı yapan, çalışmalarımda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN ve Dr. Yüksel GEZGİN’e, bu süreçte bana malzeme ve ekipman desteğinde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN ve Doç. Dr. Sayit SARGIN’a ve onların çok kıymetli yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, çalışmalarımın yürütülmesi esnasındaki yardımları ve manevi desteklerinden ötürü laboratuvar arkadaşlarım İnci ULUDAĞ, Beyza EFE, Ayşe Berçin BARLAS ve Turgut Mesut YILMAZ’a, laboratuvarında gönüllü olarak çalışan stajyer arkadaşlarıma ve en önemlisi maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

19 / 09 / 2019

Hatice Cemre ÜNVER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Hatice Cemre ÜNVER

Adres: Şenlikköy Mahallesi Mektep Sokak No:20
A Blok Daire:23 Bakırköy, 34153 İstanbul (Türkiye)

Telefon: 0537 858 9524

e-posta: haticecemre48@gmail.com

Doğum Tarihi: 05.03.1994

EĞİTİM VE ÖĞRETİM

09/2017 - 09/2019 Ege Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü /
Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir (Türkiye)
Yüksek Lisans
Doğal Ürün Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı

09/2012 - 06/2017 Ege Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi /
Biyomühendislik Bölümü, İzmir (Türkiye)
Genel Not Ortalaması: 3,47
Yeditepe Üniversitesi Genetik ve
Biyomühendislik Bölümü'nde Zorunlu Yaz Stajı
Lisans Bitirme Tezi: Biyoproses Laboratuvarı

09/2011 - 06/2012 Florya Tevfik Ercan Anadolu Lisesi, İstanbul (Türkiye)

09/2008 - 06/2011 Ataköy Cumhuriyet Anadolu Lisesi, İstanbul (Türkiye)

KİŞİSEL BECERİLER

Yabancı Dil - İngilizce Okuma: Çok iyi Yazma: İyi Konuşma: İyi

İletişim becerileri /
Organizasyonel beceriler

- İyi iletişim kurabilme
- Takım çalışması ve bireysel çalışmaya yatkınlık
- Etkili sunum hazırlama ve sunma
- Empati kurabilme
- Liderlik
- Girişimcilik
- Yüksek motivasyon

İş ile ilgili beceriler -Biyoteknoloji
-HPLC
-Alt akım işlemleri
-GMP (İyi Üretim Uygulamaları)
-GLP (İyi Laboratuvar Uygulamaları)
-GHP (İyi Hijyen Uygulamaları)
-Mikrobiyoloji
-Organik kimya
-Biyokimya
-Microsoft Office araçlarına
çok iyi derecede hakimiyet

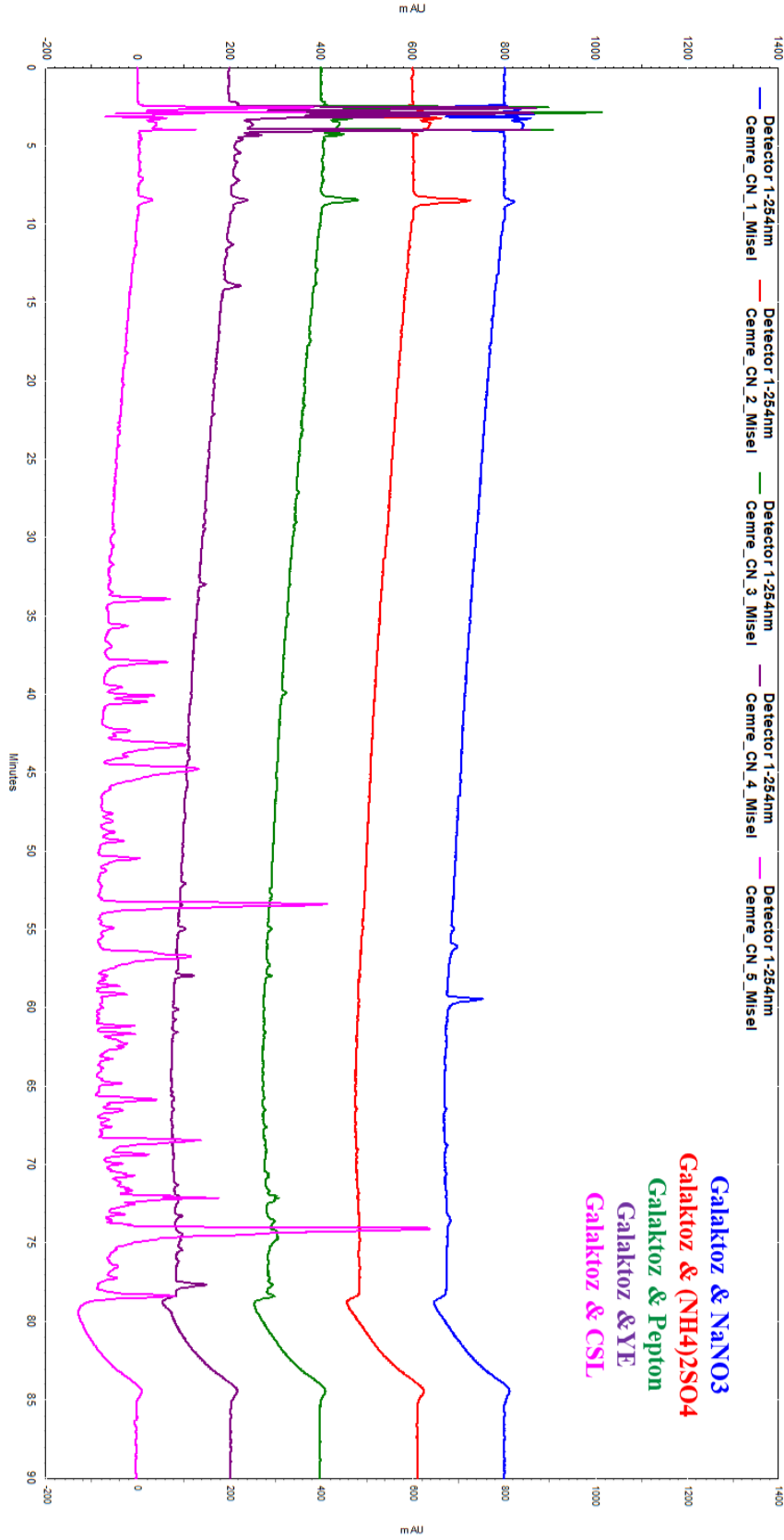
Sertifikalar -GMP (İyi Üretim Uygulamaları)
-GLP (İyi Laboratuvar Uygulamaları)
-GHP (İyi Hijyen Uygulamaları)
-ISO/IEC 17025 (Laboratuvar Akreditasyonu Eğitimi)
-KAIZEN (Sürekli İyileştirme ve Geliştirme Eğitimi)
-meristemEGE Girişimcilik Sertifika Programı
-KOSGEB Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi
-Malzeme Güvenlik Bilgi Formu Bilgilendirme Semineri
-TS EN ISO 9001-2015 Kalite Yönetim Sistemi
Bilgilendirme Eğitimi
-Analiz Hayatın Her Anında / Günlük Yaşam ve
İleri Analitik Teknikler Semineri (ANT TEKNİK)

Başarı ve ödüller -Lisans Bitirme Tezi Poster Birinciliği

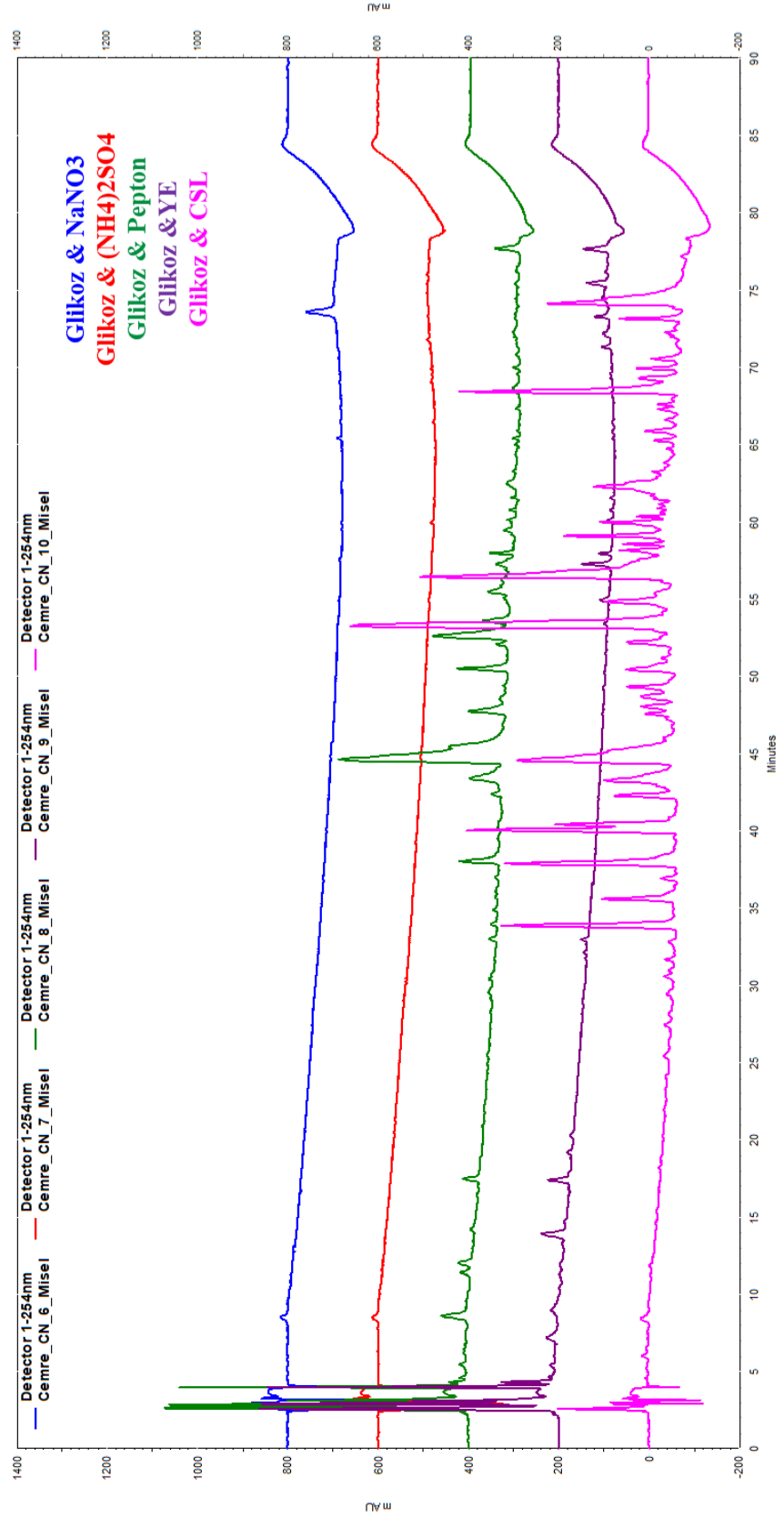


EKLER

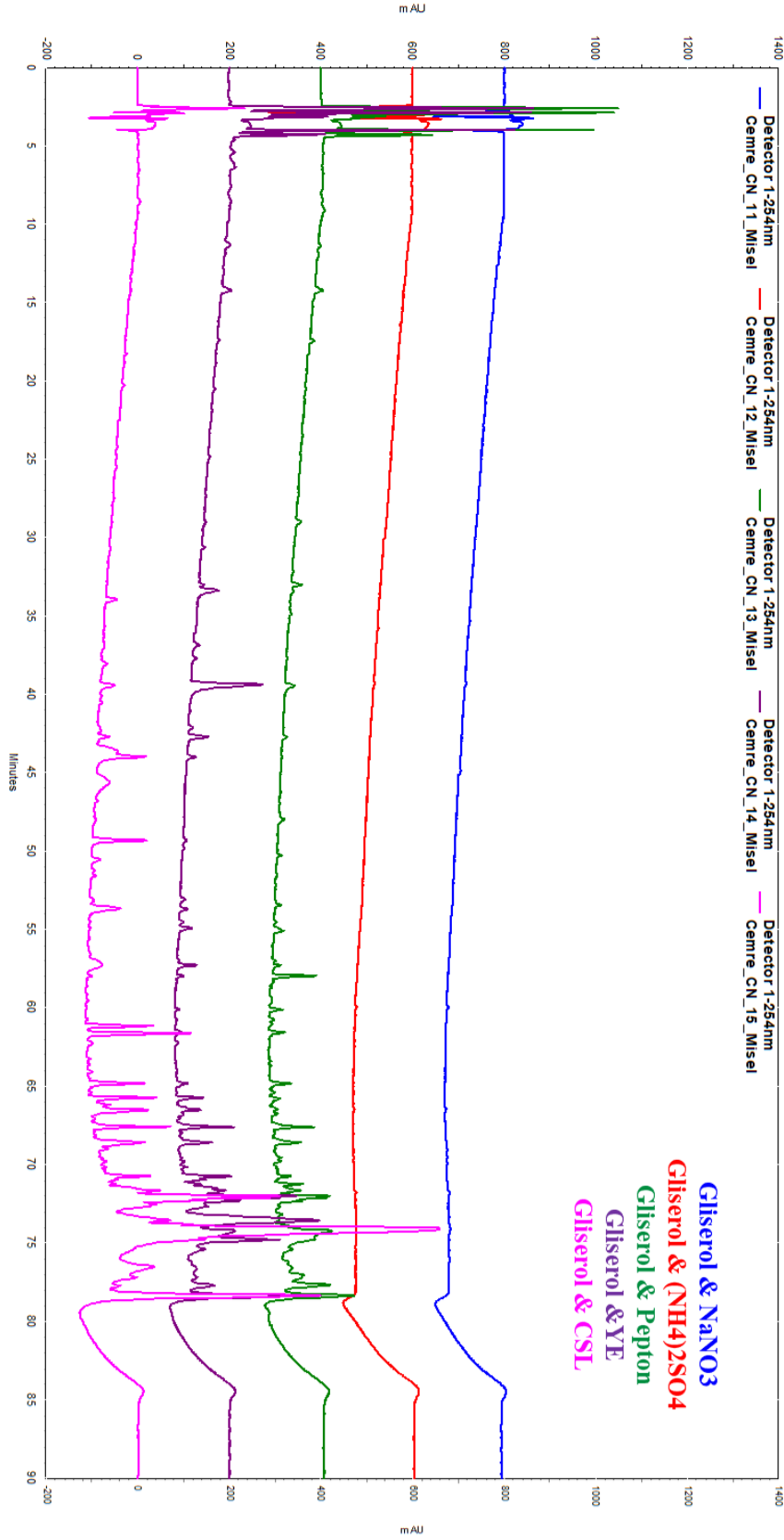
- Ek 1:** Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinde karbon kaynaklarının sabit tutularak azot kaynaklarının değiştirilmesiyle bir araya getirilen misel ekstre örneklerine ait HPLC analizi kromatogramları.
- Ek 2:** Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinde azot kaynaklarının sabit tutularak karbon kaynaklarının değiştirilmesiyle bir araya getirilen misel ekstre örneklerine ait HPLC analizi kromatogramları.
- Ek 3:** Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinde karbon kaynaklarının sabit tutularak azot kaynaklarının değiştirilmesiyle bir araya getirilen süpernatant ekstre örneklerine ait HPLC analizi kromatogramları.
- Ek 4:** Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinde azot kaynaklarının sabit tutularak karbon kaynaklarının değiştirilmesiyle bir araya getirilen süpernatant ekstre örneklerine ait HPLC analizi kromatogramları.



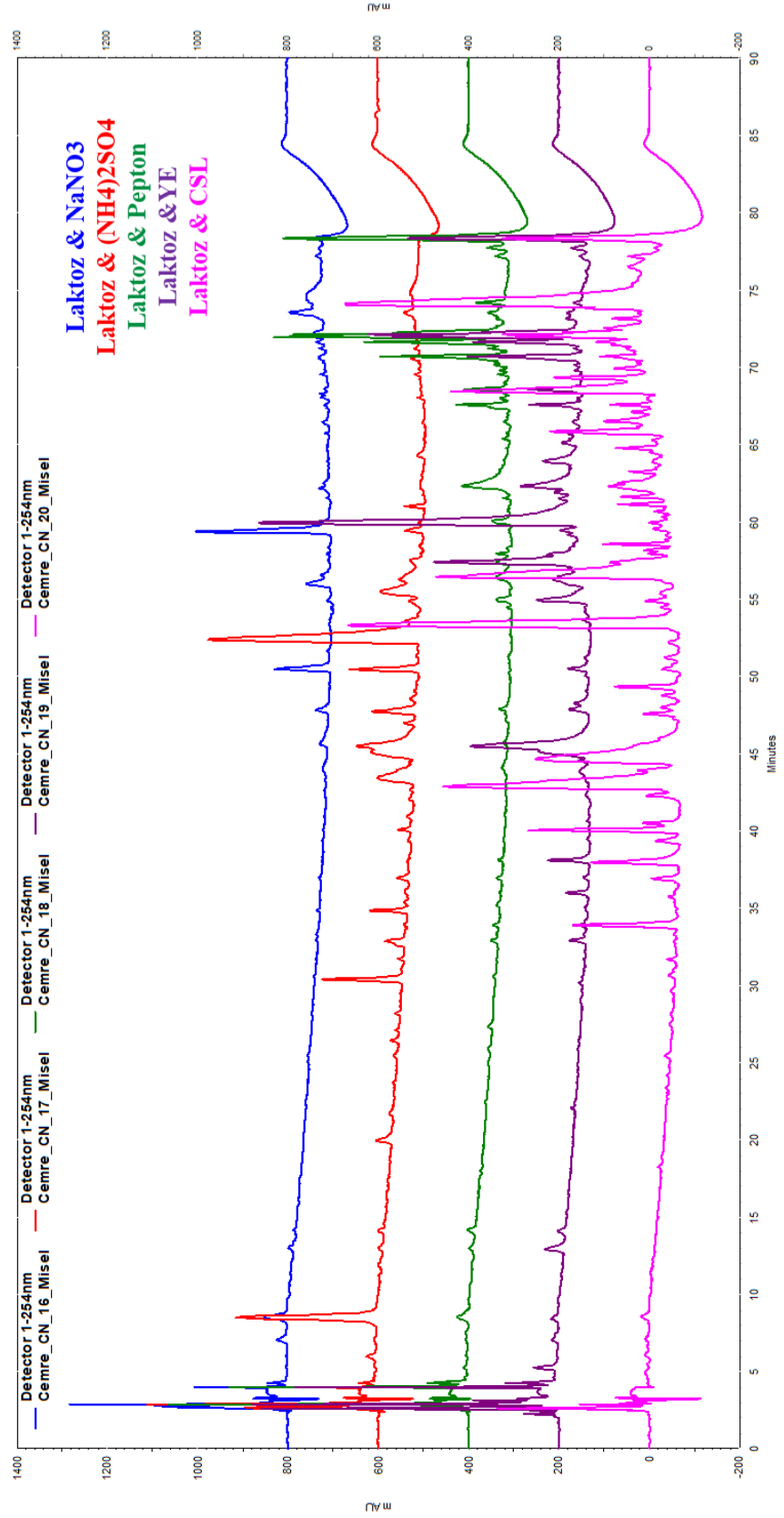
Ek 1.1. Galaktoz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



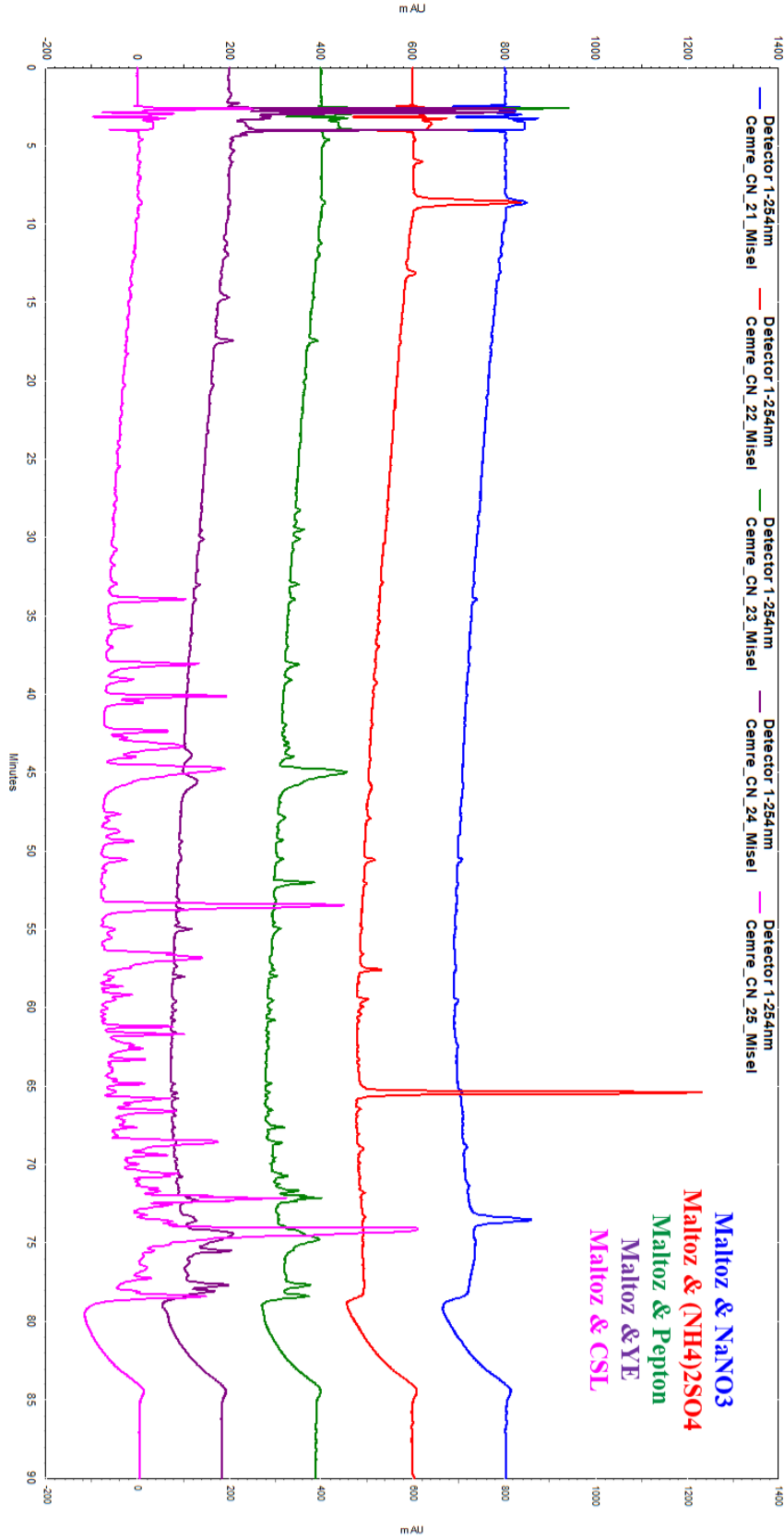
Ek 1.2. Glikoz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstraktlarının HPLC analizi kromatogramları.



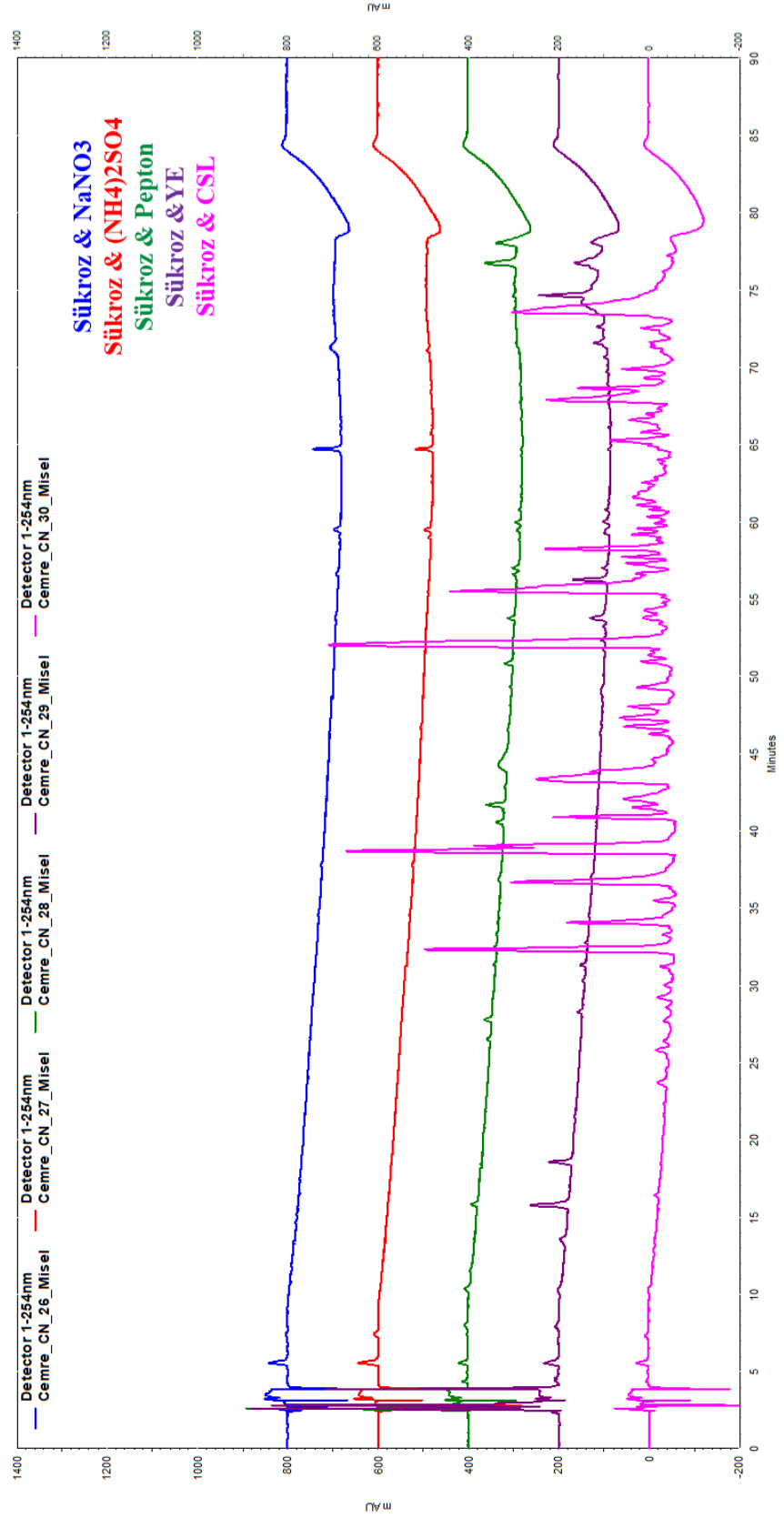
Ek 1.3. Gliserol ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



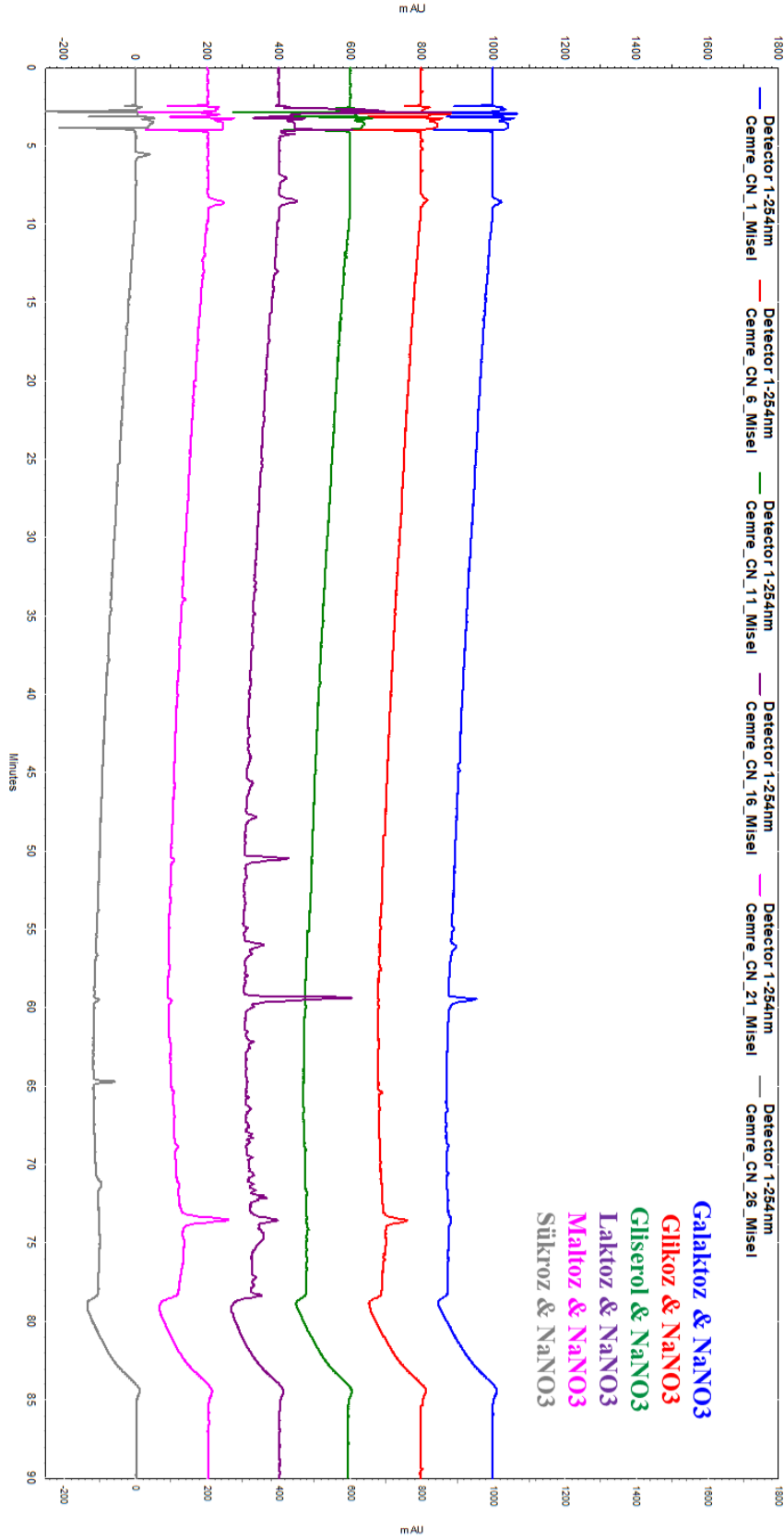
Ek 1.4. Laktoz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



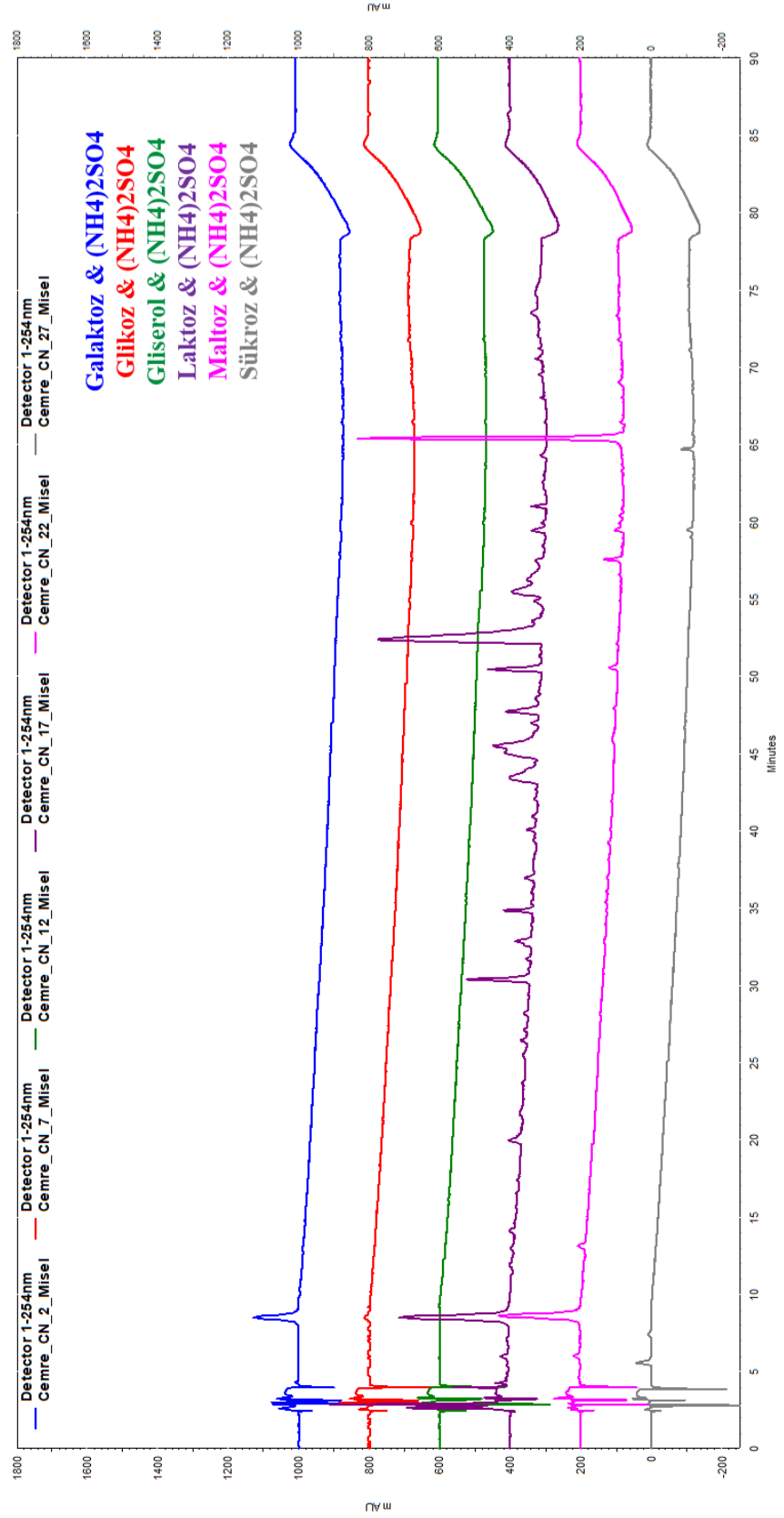
Ek 1.5. Maltos ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



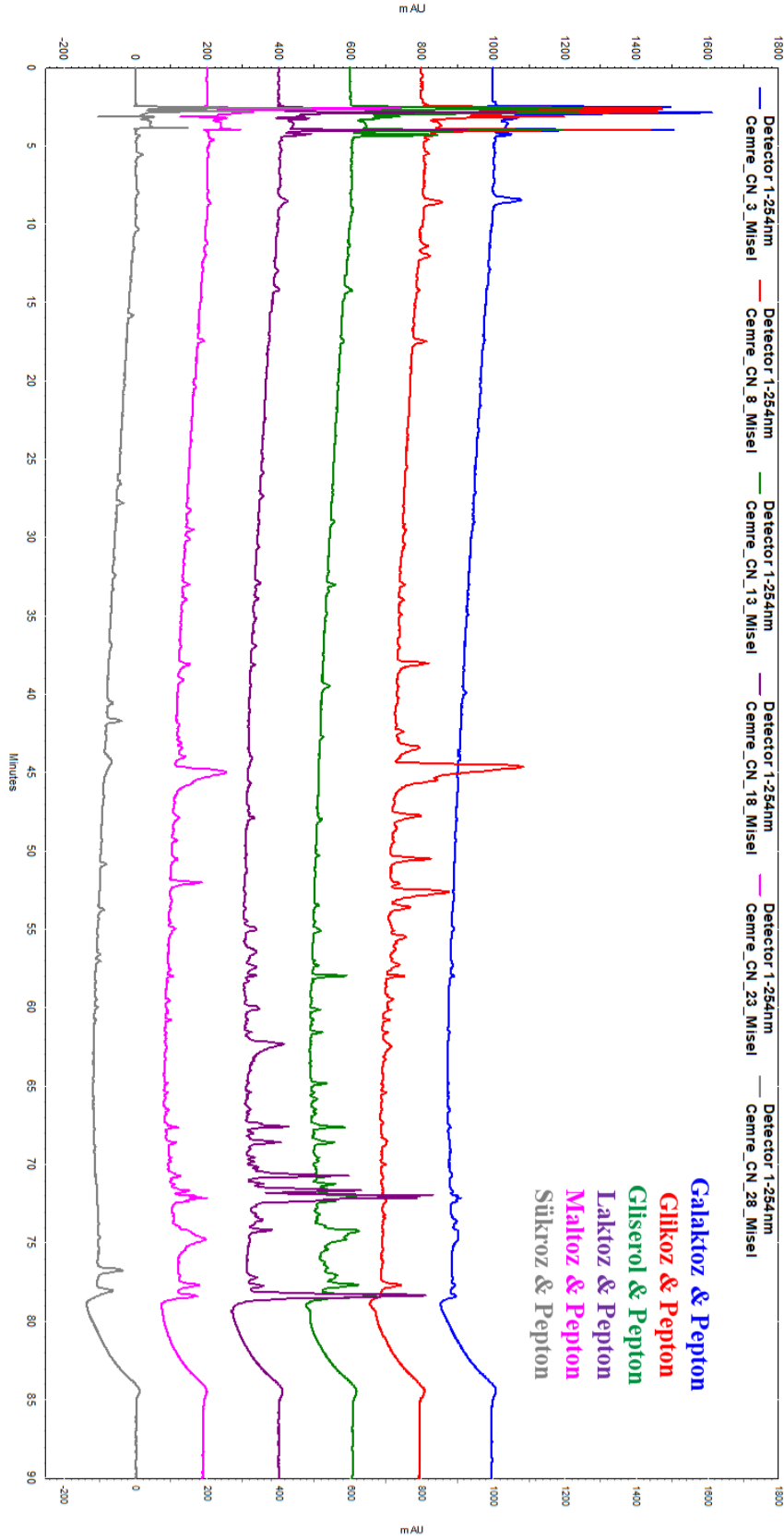
Ek 1.6. Sükroz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



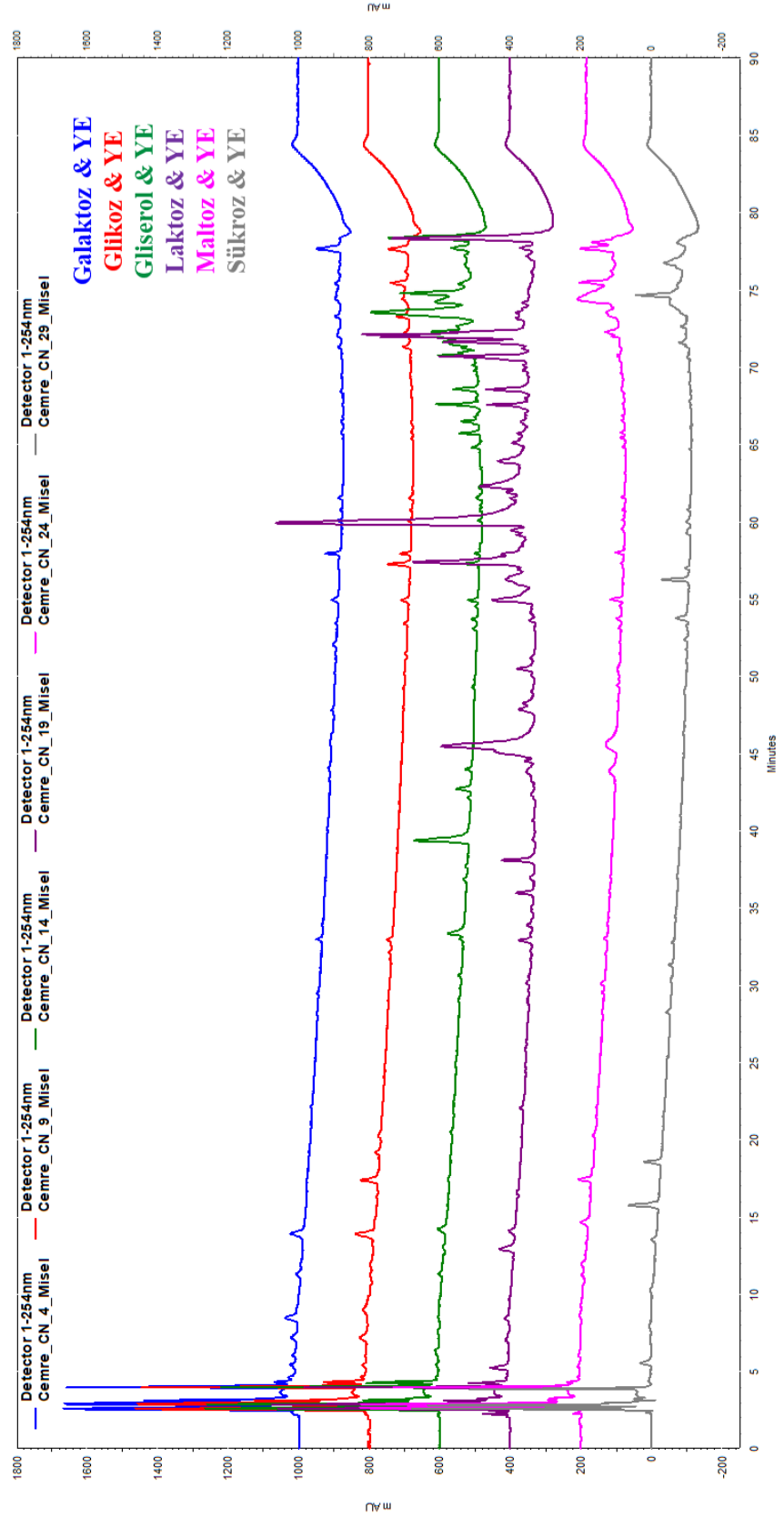
Ek 2.1. NaNO₃ ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstratlarının HPLC analizi kromatogramları.



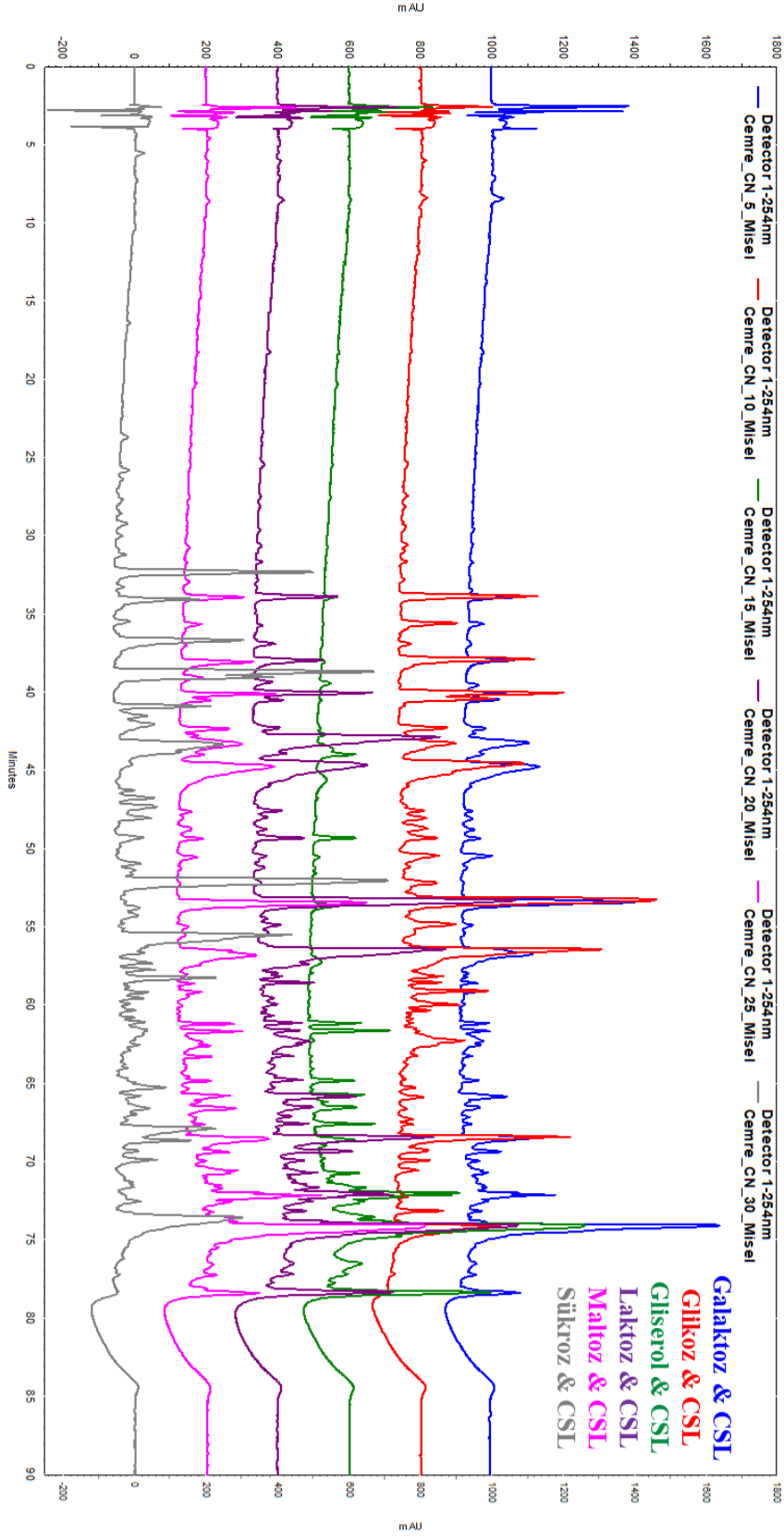
Ek 2.2. (NH₄)₂SO₄ ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstraktlarının HPLC analizi kromatogramları.



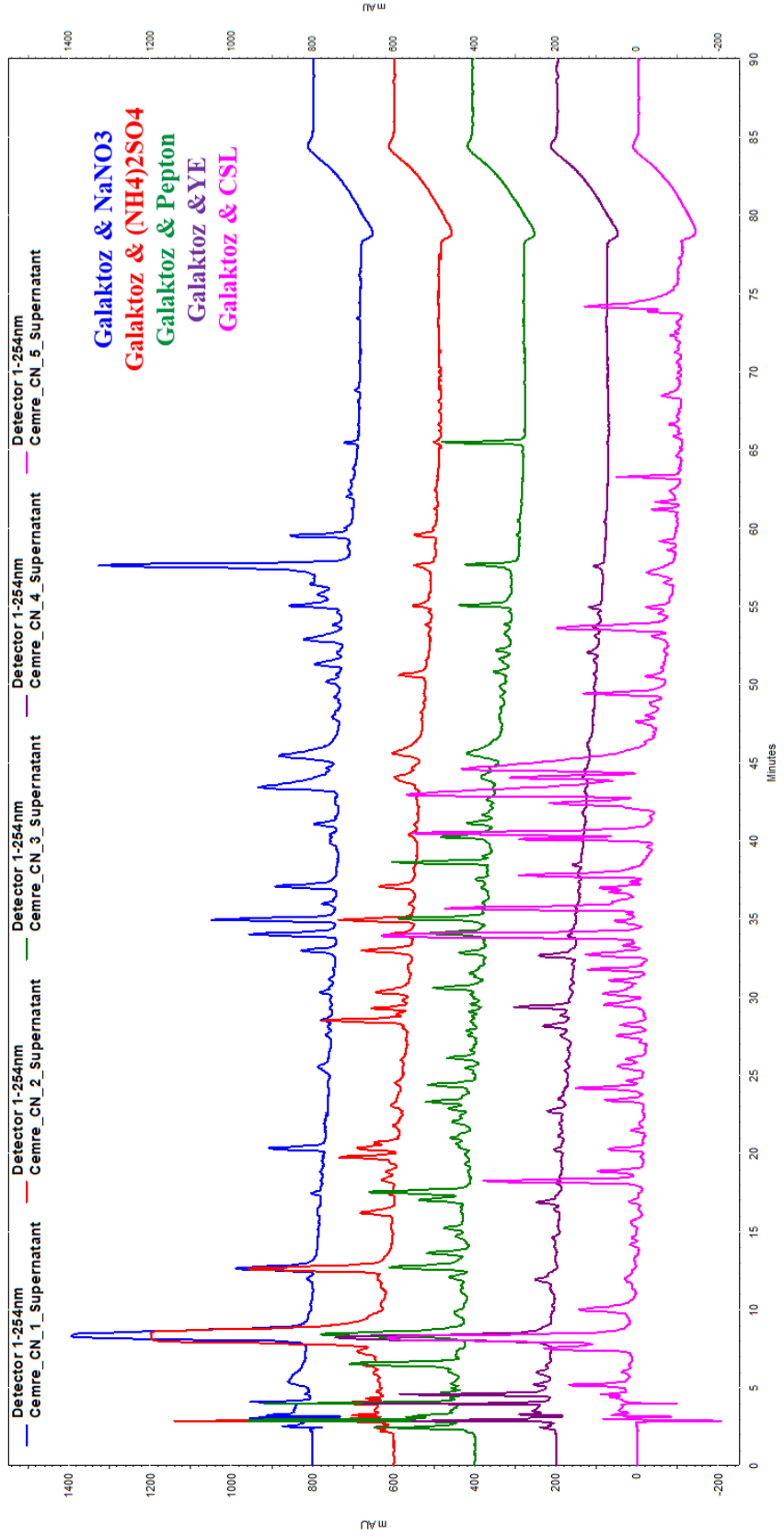
Ek 2.3. Pepton ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



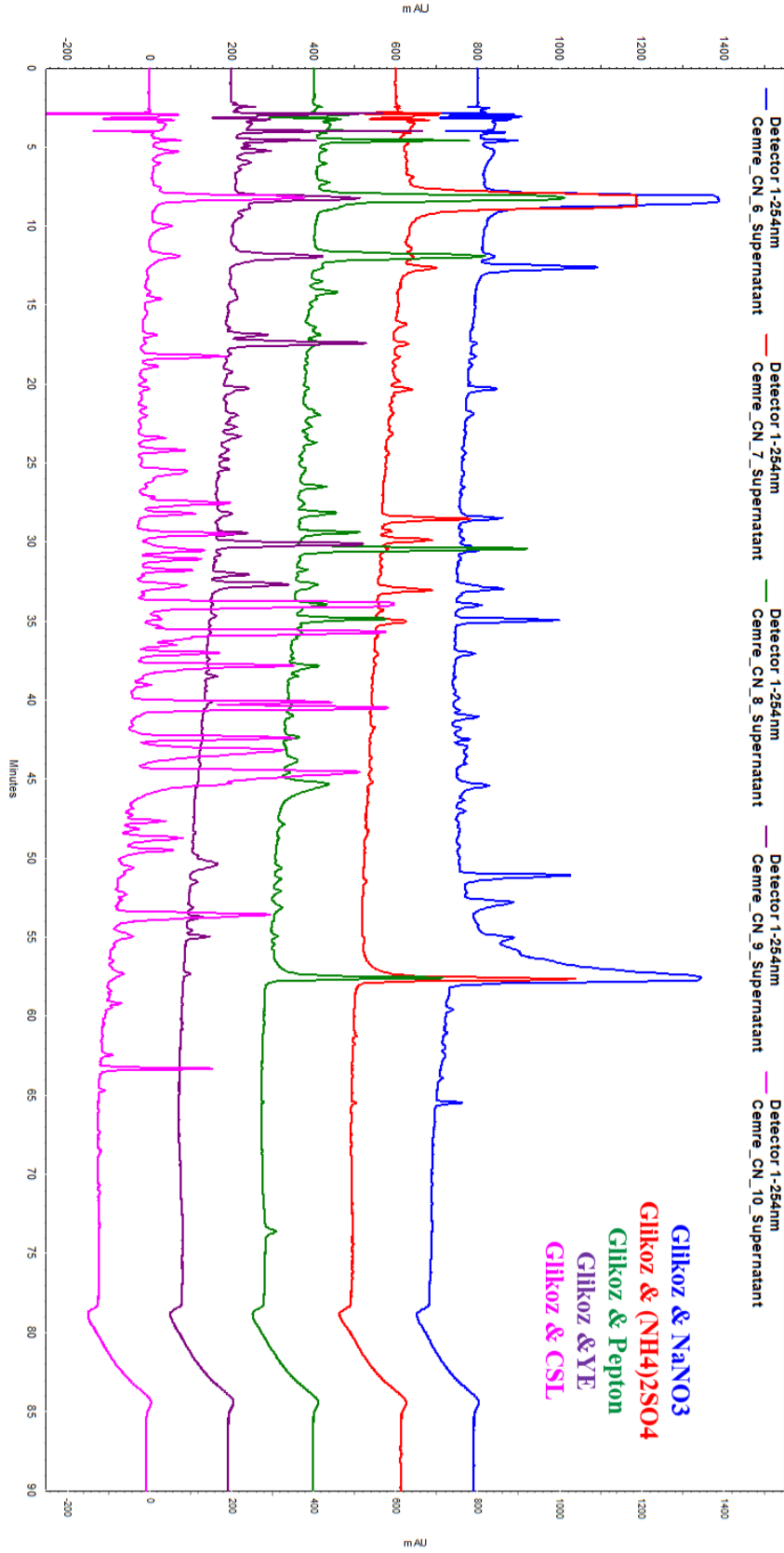
Ek 2.4. YE ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



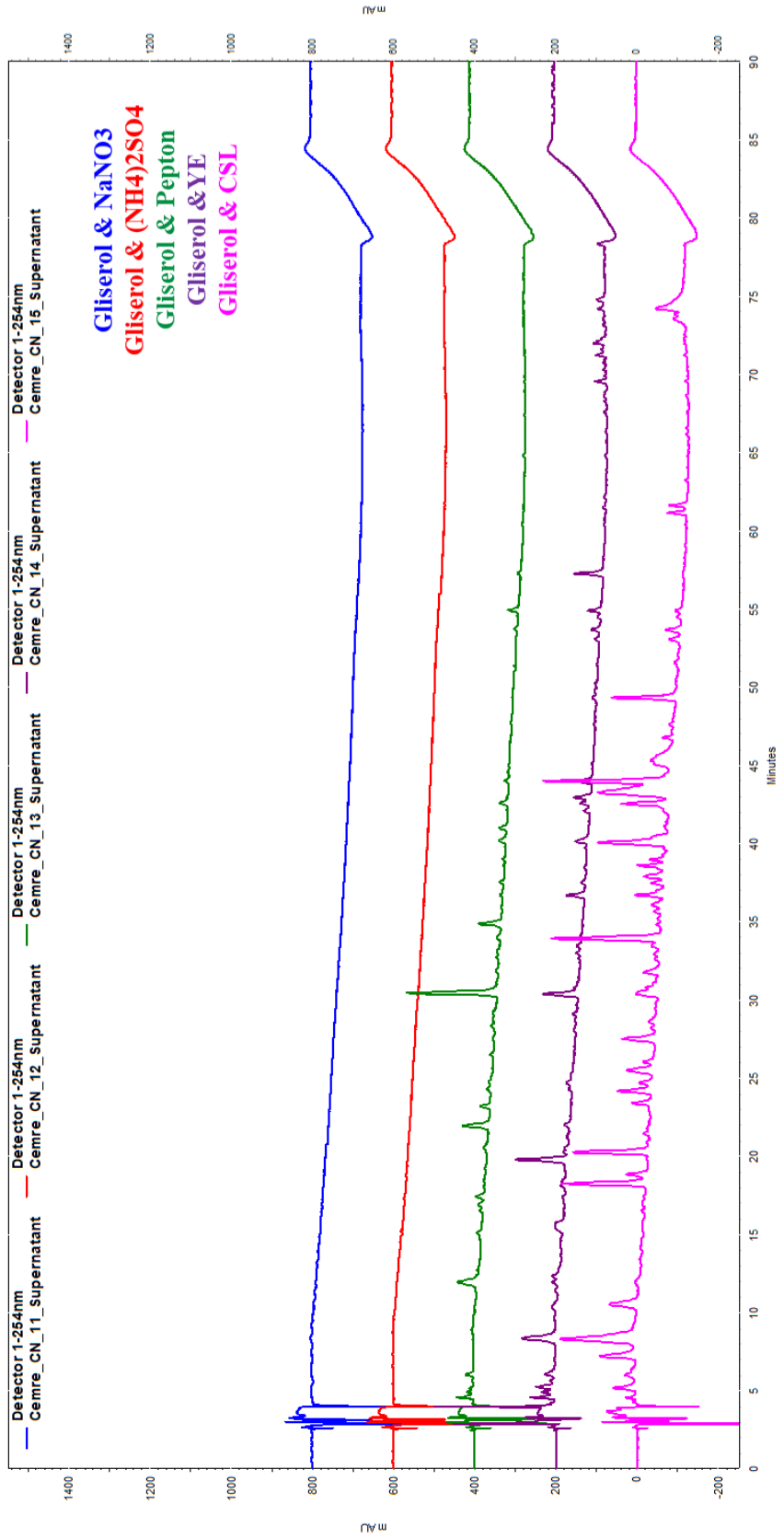
Ek 2.5. CSL ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen misel ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



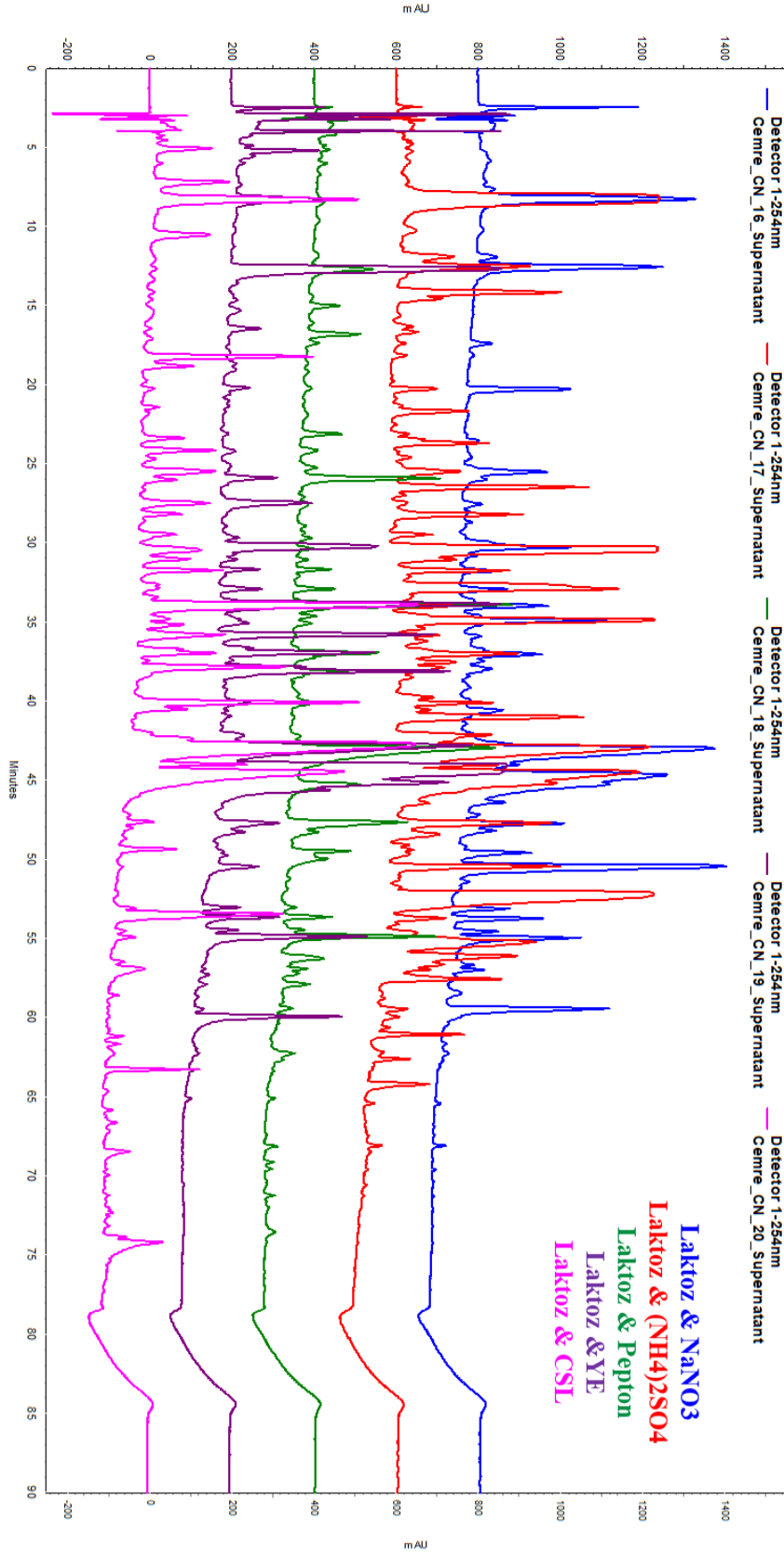
Ek 3.1. Galaktoz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



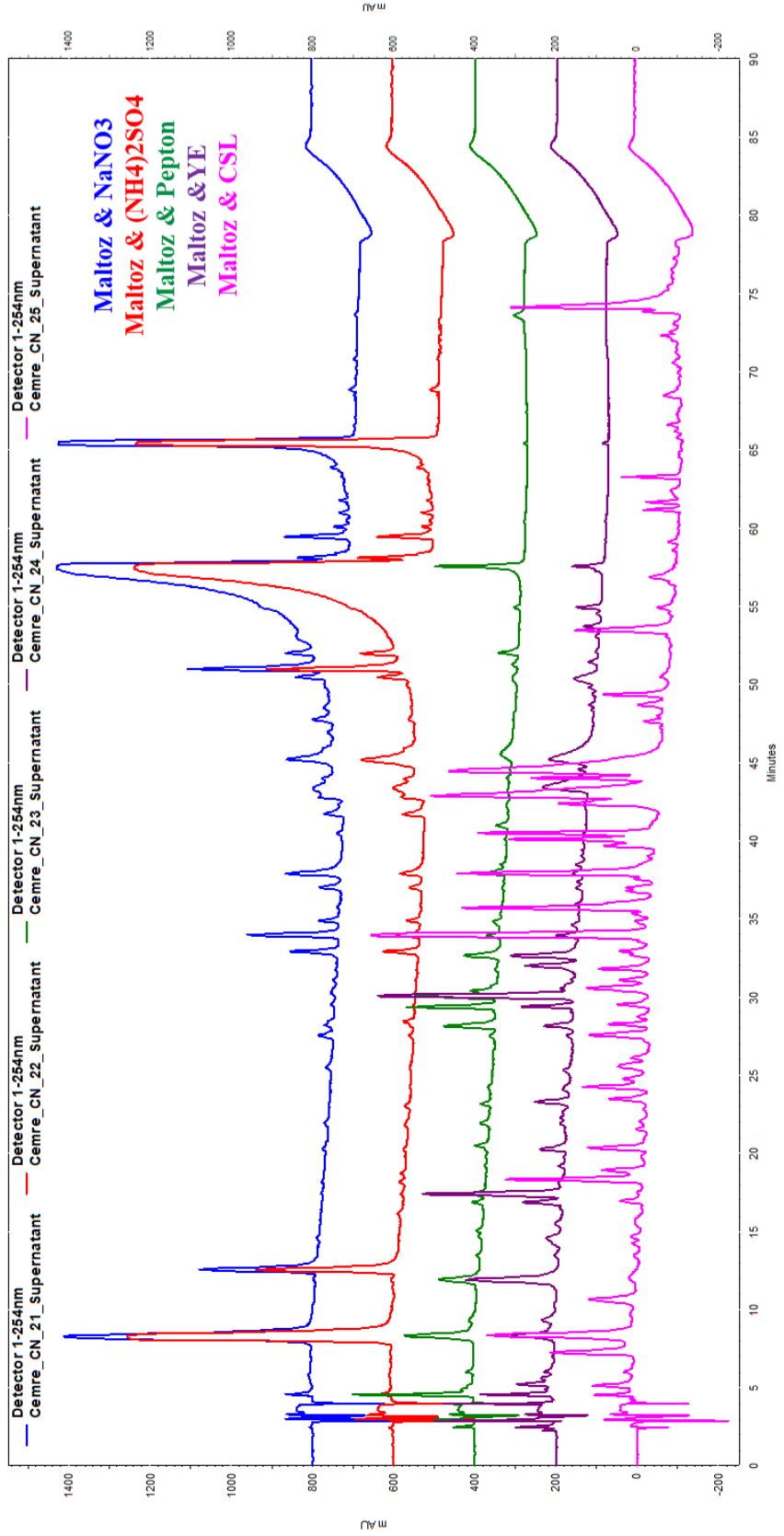
Ek 3.2. Glikoz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



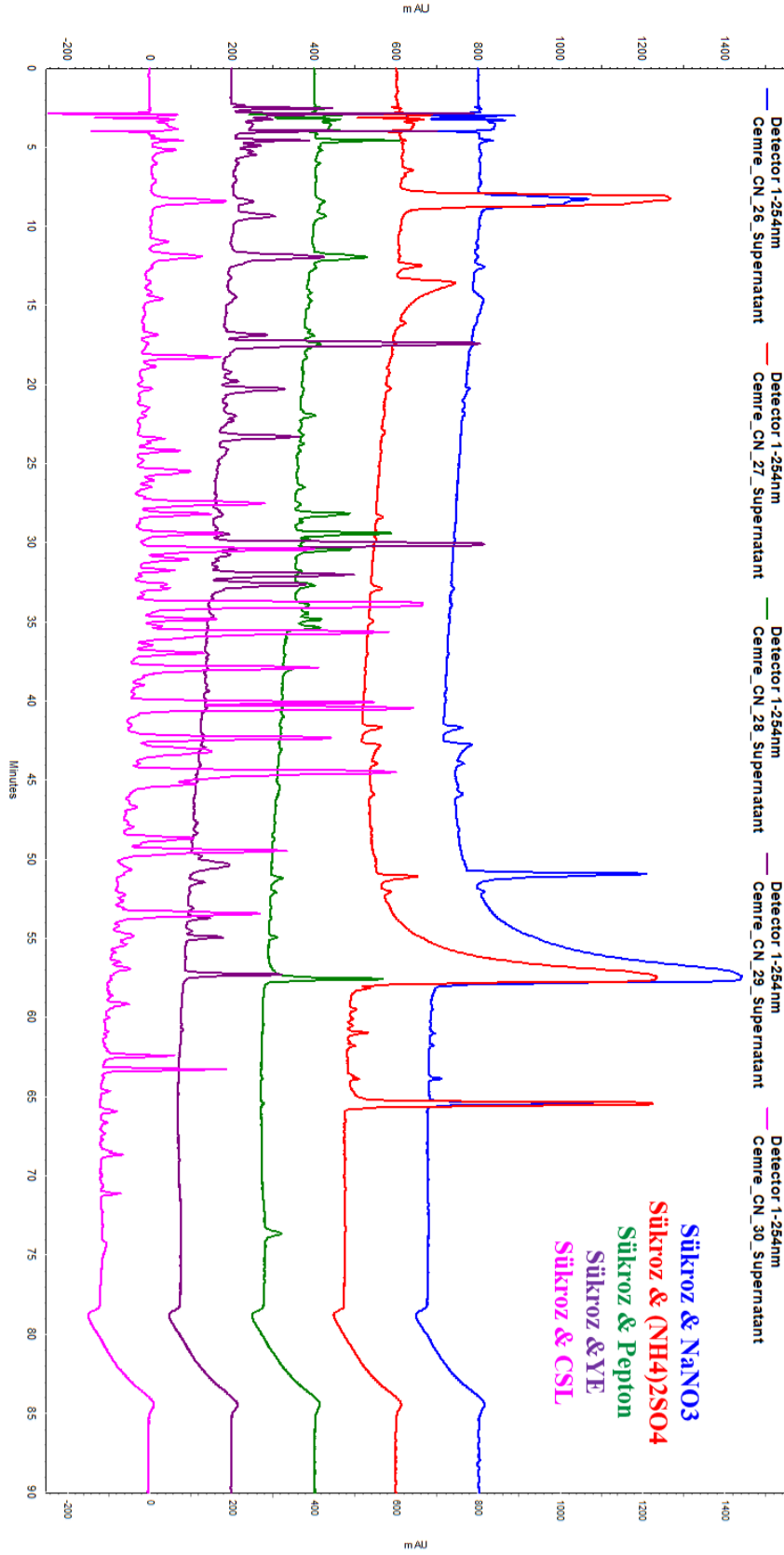
Ek 3.3. Gliserol ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



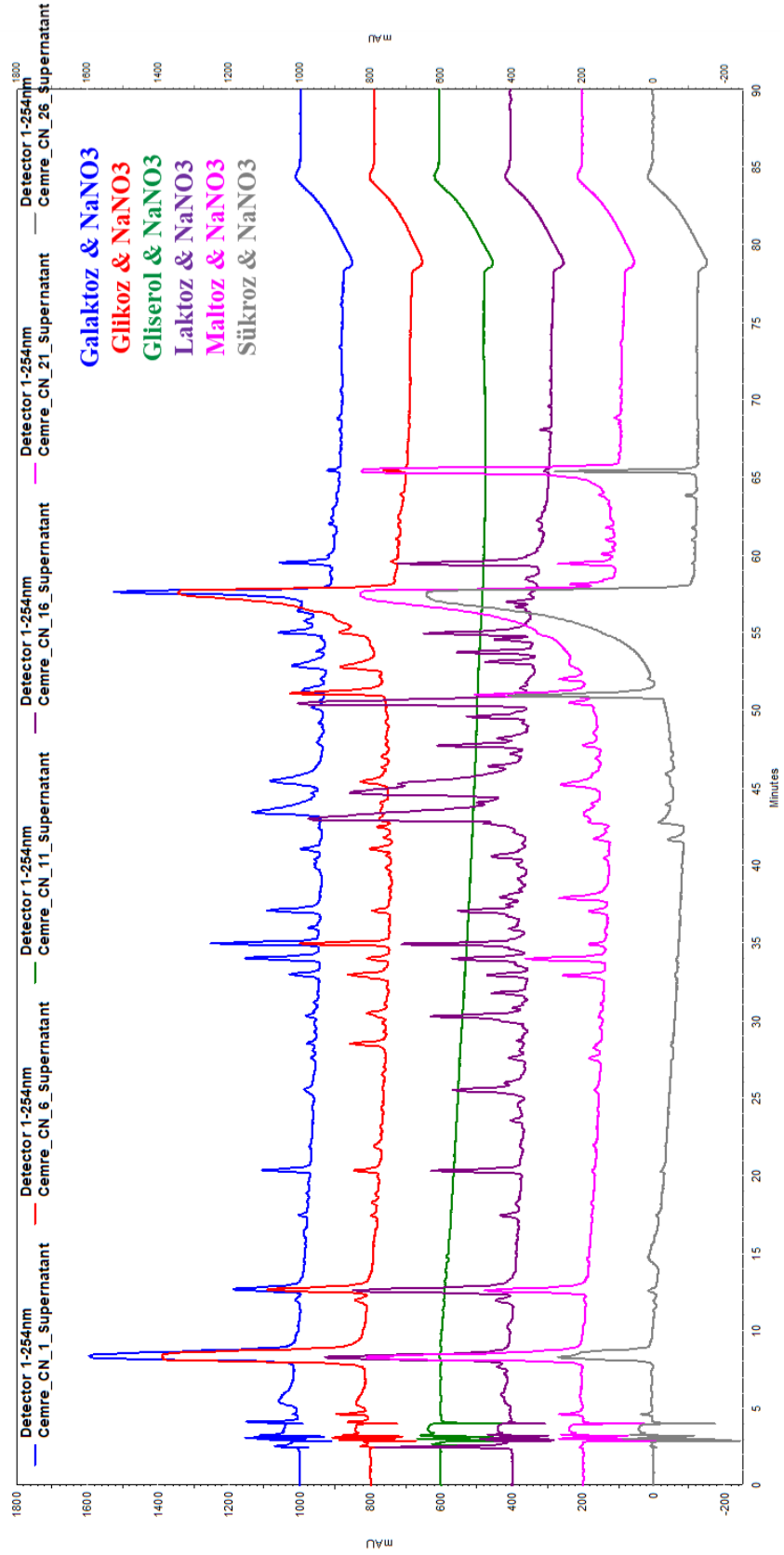
Ek 3.4. Laktöz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



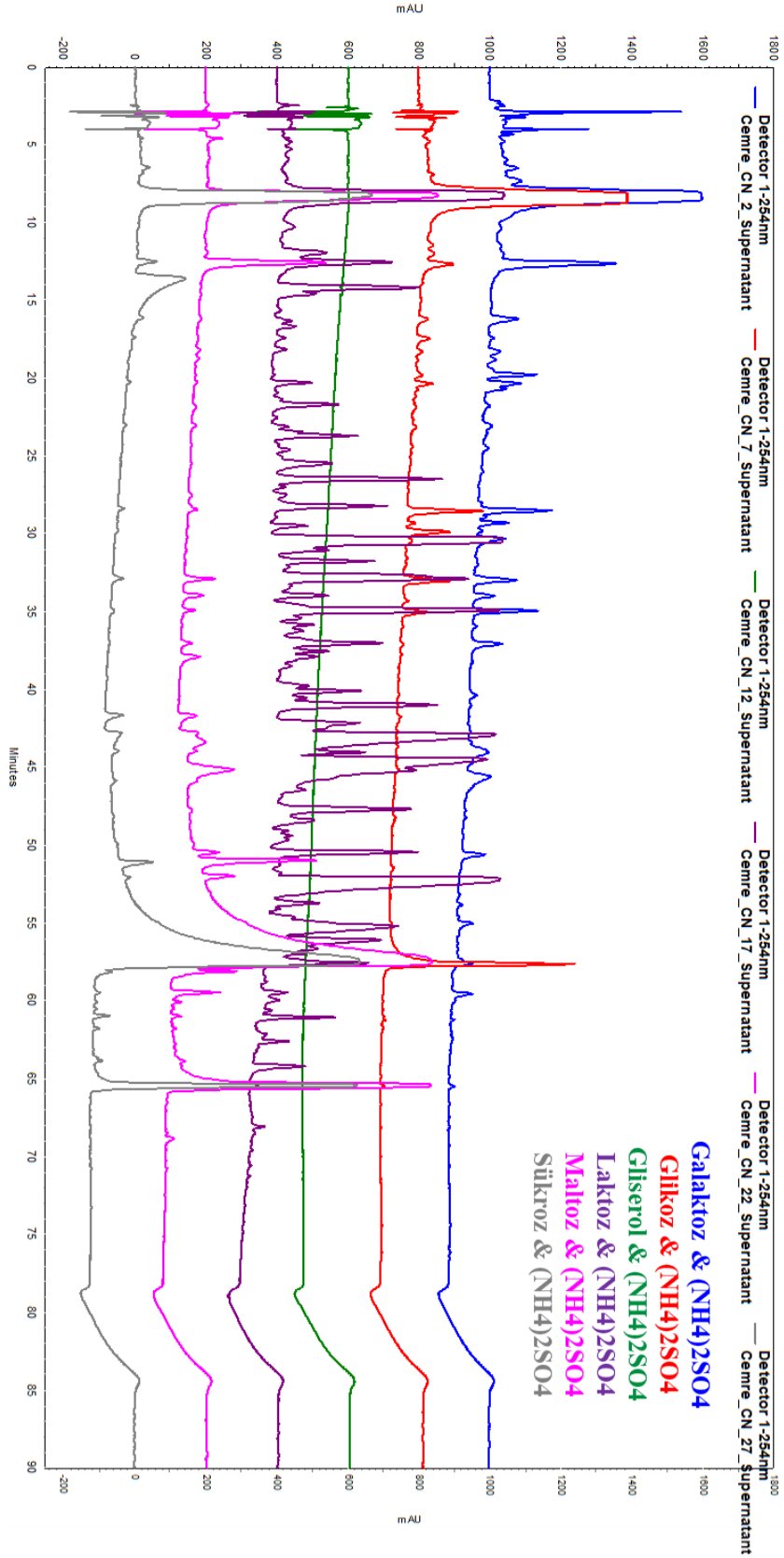
Ek 3.5. Maltoz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstratlarının HPLC analizi kromatogramları.



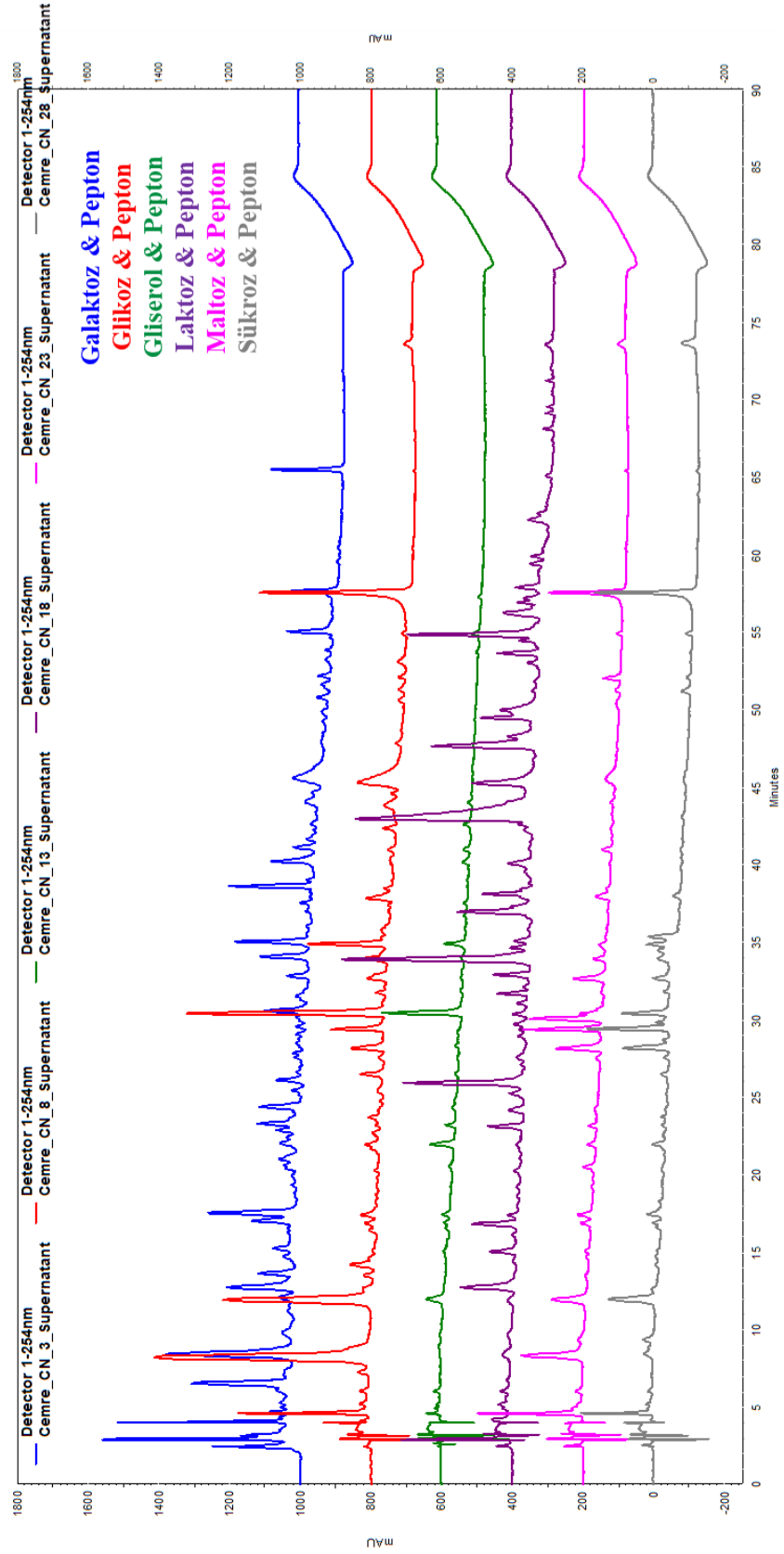
Ek 3.6. Sütkroz ve farklı azot kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



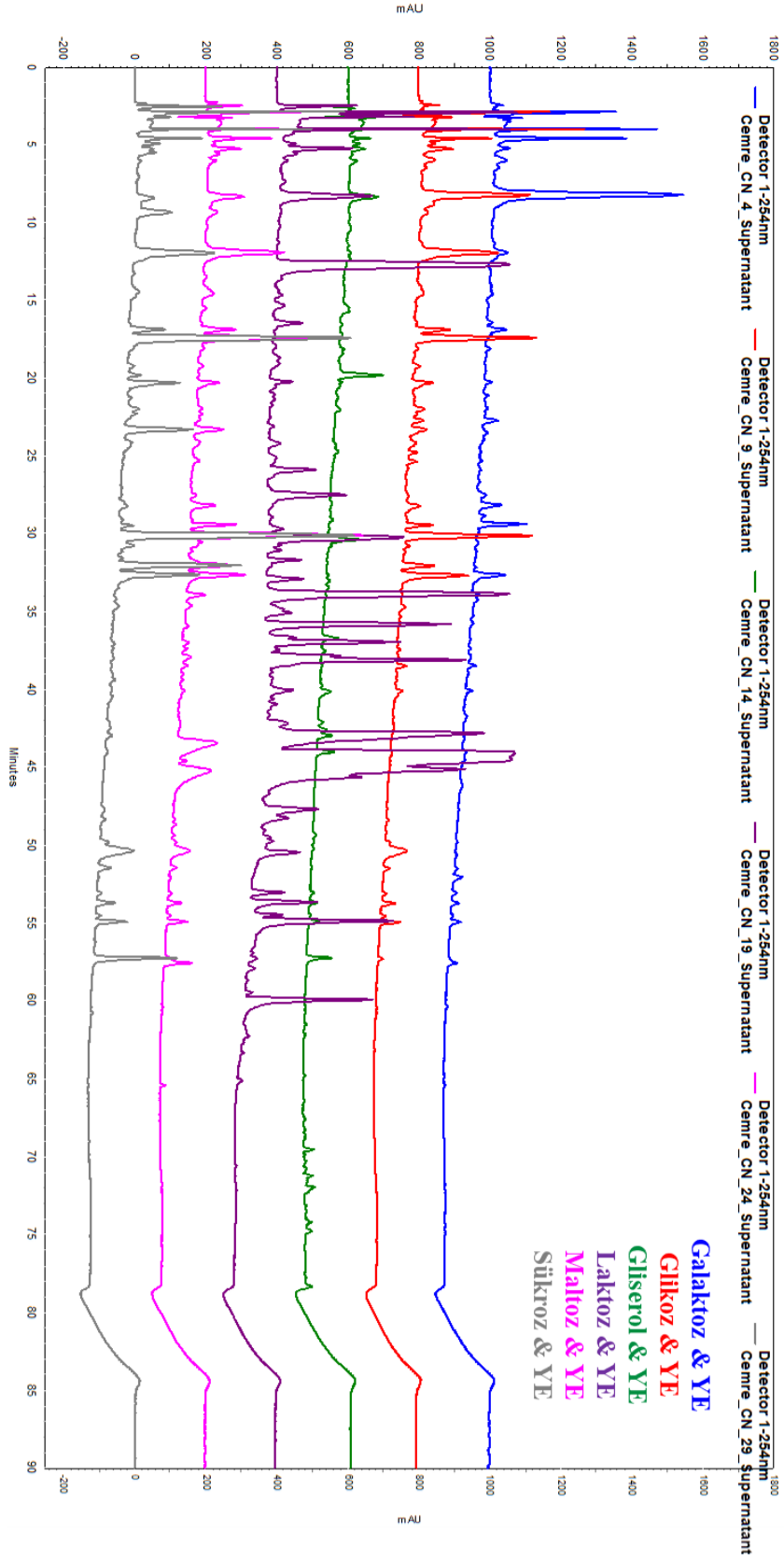
Ek 4.1. NaNO₃ ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstraktlarının HPLC analizi kromatogramları.



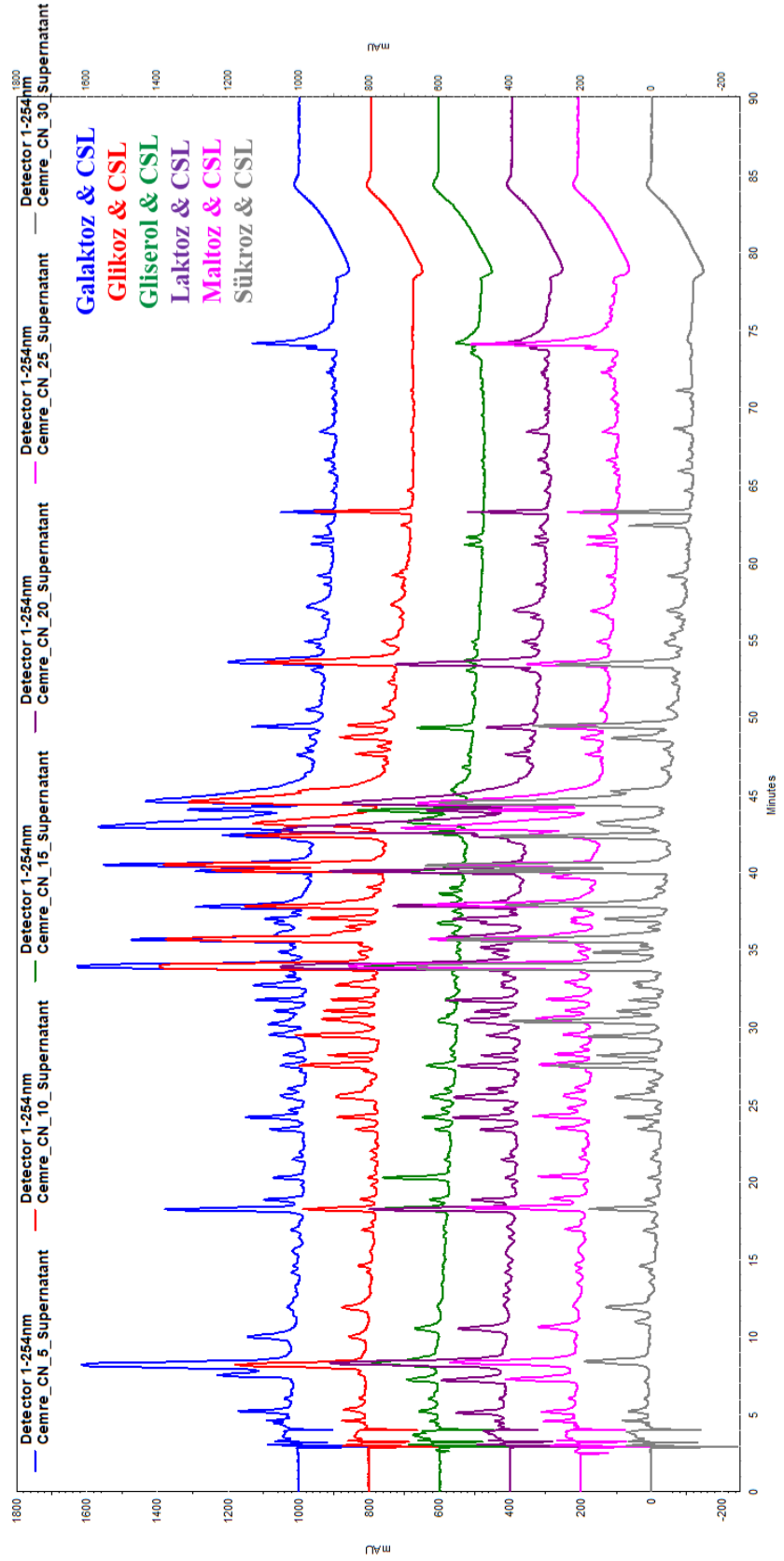
Ek 4.2. (NH₄)₂SO₄ ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstratlarının HPLC analizi kromatogramları.



Ek 4.3. Pepton ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstralarının HPLC analizi kromatogramları.



Ek 4.4. YE ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstratlarının HPLC analizi kromatogramları.



Ek 4.5. CSL ve farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı sıvı kültür üretimlerinden elde edilen süpernatant ekstratlarının HPLC analizi kromatogramları.