



**KOYUNYÜNÜ HİDROLİZATINDAN
MİKROBİYAL PEPTON ÜRETİMİ**

Abdulahdi FIRAT

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

2017

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOYUNYÜNÜ HİDROLİZATINDAN MİKROBİYAL PEPTON
ÜRETİMİ**

Abdulhadi FIRAT

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

KOYUNYÜNÜ HİDROLİZATINDAN MİKROBİYAL PEPTON ÜRETİMİ

Doç. Dr. Mesut TAŞKIN danışmanlığında, Abdulhadi FIRAT tarafından hazırlanan bu çalışma 12/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Biyoteknoloji Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 19/01/2017 tarih ve 03/41 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. CAVİT KAZAZ
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan alıntılar, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOYUNYÜNÜ HİDROLİZATINDAN MİKROBİYAL PEPTON ÜRETİMİ

Abdulahdi FIRAT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

Peptonlar veya protein hidrolizatları esas olarak mikrobiyal kültür ortamında organik azot kaynakları olarak kullanılırlar. Bunlar, en pahalı besiyeri bileşenlerinden biri olarak kabul edilir. Son çalışmaların amacı yeni tasarlanmış bir kimyasal yöntem vasıtasıyla koyun yünden mikrobiyal pepton üretmek ve elde edilen peptonun endüstriyel ve / veya biyoteknolojik açıdan ciddi öneme sahip bazı mantar ve bakteriler için bir büyüme substratı olarak kullanılabilirlik testi yapmaktır.

BULGULAR: Yün peptonun (YP) hazırlanması alkalın hidroliz ve nötralizasyon adımları ile gerçekleştirildi. KOH (2,5 N) ve H₃PO₄ (%85 çözelti) hidroliz ve nötralizasyon aşamaları için sırasıyla kullanıldı. Kül analizi, YP'nin yüksek protein (67,8 g/100 g) ve kül (29,2 g/100 g) seviyelerine sahip olduğunu gösterdi. YP'deki en fazla bulunan aminoasit glutamik asittir (8175 mg/100 g). YP'nin nispeten yüksek miktarda sistine sahip olduğu da gösterildi. Sırasıyla mantarlar ve bakteriler için YP konsantrasyonları 5 ve 6 g / L olarak belirlendi. Test edilen bakterilerin, *Staphylococcus aureus* YP ortamında çok düşük bir büyüme gösterdi. YP'nin, üç test mikroorganizması (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* ve *Penicillium chrysogenum*) için orta düzeyde bir büyüme performansı sağladığı bulundu. *Aspergillus niger* için en yüksek biyo kütle üretimi (8,17 g/L) YP ile elde edildi. Diğer ticari test peptonlarına kıyasla, test bakterisi *Escherichia coli* için YP içeren kültür ortamında ikinci en yüksek biyokütle üretimine ulaşıldı. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, YP'nin, özellikle *A. niger* ve *E. coli* gibi test edilen organizmaların bazıları için umut verici bir besiyeri bileşeni olduğu sonucuna varılabilir. Bu çalışmada yünlerin funguslar ve bakteriler için pepton kaynağı ya da besleyici bileşen olarak kullanılması ilk defa gösterildi. Bu çalışmada hem ülkemize ekonomik getiri sağlayan yeni bir ürünün ve yöntemin geliştirilmesi hem de dünya literatürü için orijinal değere sahip yeni bulguların elde edilmesi amaçlandı.

2017, 50 sayfa

Anahtar Kelimeler: Koyunyünü, hidroliz, mikrobiyal gelişim, pepton

ABSTRACT

Master Thesis

PRODUCTION OF MICROBIAL PEPTON FROM SHEEP WOOL HYDROLISATE

Abdulahdi FIRAT

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mesut TASKIN

Peptones or protein hydrolysates are mainly used as organic nitrogen sources in microbial culture media. They are accepted as one of the most expensive cultivation substrates. The purposes of the recent work were to generate the microbial peptone from sheep wool via a newly designed chemical method and to test the feasibility of the obtained peptone as a growth substrate for some fungi and bacteria having industrial and/or biotechnologically important importance.

RESULTS: The preparation of wool peptone (WP) was performed via alkaline hydrolysis and neutralization steps. KOH (2,5 N) and H₃PO₄ (85% solution) were used for the hydrolysis and neutralization steps, respectively. The ash analysis indicated that WP possessed high protein (67,8 g /100 g) and ash (29,2 g/100 g) levels. The major amino acid in WP was glutamic acid (8175 mg/100 g). WP was shown to possess relatively high amount of cystine. WP concentrations of 5 and 6 g/L were determined as optimal for the fungi and bacteria, respectively. Of the tested bacteria, *Staphylococcus aureus* showed too weak growth in WP medium. WP was found to provide growth performance at moderate level for three test microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* and *Penicillium chrysogenum*). The highest biomass production (8,17 g/L) for *Aspergillus niger* was attained with WP. When compared to the other commercial test peptones, second highest biomass production for the test bacterium *Escherichia coli* was reached in the cultivation medium containing WP. Based on the results from this study, it can be concluded that WP is a promising medium component for some of the tested organisms, particularly *A. niger* and *E. coli*. Utilization of wools as peptone source or nutritional component for fungi and bacteria was demonstrated for the first time in the present work. In this study, both development of a new product and method providing economic income to our country and the obtaining of new findings having original value for world literature are aimed.

2017, 50 pages

Keywords: Sheep wool, hydrolysis, microbial growth, peptone

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca beni her konuda destekleyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'a gösterdiği özveri ve hoşgöründen dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında, deneysel aşamalarda yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ' ye, Sayın Yrd. Doç. Dr. Yağmur ÜNVER'e ve Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım yardımlarını ve hoşgörülerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm yüksek lisans ve doktora öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen başta annem Büşra FIRAT ve babam Mustafa FIRAT olmak üzere kardeşlerim Tezay KARSLI, Gülay FIRAT ve Ramazan FIRAT'a teşekkür ederim. Son olarak beni hep cesaretlendiren ve bana olan inancını hiç kaybetmeyen Tuğba METE'ye de teşekkür ederim.

Abdulhadi FIRAT

Ocak, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mikroorganizmaların Beslenmesi	1
1.1.1. Karbon.....	1
1.1.2. Azot	2
1.1.3. Diğer başlıca makrobesinler.....	2
1.1.4. Mikrobesinler (iz elementler).....	3
1.1.5. Gelişme (üreme) faktörleri	3
1.1.6. Kültür besiyerleri.....	6
1.2. Peptonlar.....	8
1.2.1. Pepton kaynağı olarak koyunyünü	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL ve METOD.....	25
3.1. Materyaller	25
3.1.1. Yararlanılacak alet ve cihazlar	25
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	25
3.1.3. Koyunyünü	26
3.1.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	26
3.2. Metod.....	26
3.2.1. Koyunyünü peptonunun üretilmesi	26
3.2.2. Yün peptonun (YP) kimyasal bileşiminin belirlenmesi	29
3.2.2.a. YP'nin toplam şeker miktarının belirlenmesi.....	29
3.2.2.b. YP'nin azot içeriğinin belirlenmesi.....	29
3.2.2.c. YP'nin toplam lipit içeriğinin belirlenmesi	29

3.2.2.d. YP'nin kül içeriğinin belirlenmesi	29
3.2.2.e. YP'nin makro ve mikro element içeriğinin belirlenmesi	29
3.2.3. Test mikroorganizmaları için besiyerlerinin hazırlanması ve biyokütle ölçümü	30
3.2.3.a. Test mikroorganizmaları için ön kültürün hazırlanması ve peptonlu besiyerine inokulasyon	30
3.2.3.b. Test mikroorganizmaları için peptonlu besiyerinin hazırlanması	30
3.2.3.c. Biyokütle konsantrasyonunun ölçülmesi	30
3.2.3.d. İstatistiksel analiz	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	32
4.1. YP'nin Hazırlanışı ve Kimyasal Analizi	32
4.2. Test Mikroorganizmaları İçin Optimum Yün Pepton (YP) Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
4.3. Test Mikroorganizmalarının Gelişme Performansları Üzerinde YP ve Ticari Peptonların Etkileri	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
5.1. Test Bakterilerinin ve Test Küflerinin Maksimum Gelişimi İçin Gerekli Yün Pepton (YP) Konsantrasyonunun Tespit edilmesi	39
5.2. Test Bakterilerinin ve Test Küflerinin Gelişmeleri Üzerinde YP ve Standart Olarak Kullanılan Ticari Peptonların Etkilerinin Karşılaştırılması	41
5.3. Sonuç	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
h	: Saat
lt	: Litre
ml	: Mililitre
rpm	: Dakika/devir
sp.	: Cins
TSA	: Trypticase soy agar
TSB	: Trypticase soy broth

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Koyunyünü peptonunun üretim aşamalarının şematik gösterimi	27
Şekil 3.2. 150 ml KOH ile hazırlanmış yün hidrolizatı	28
Şekil 3.3. Kurutulmuş ve öğütülmüş toz halinde yün pepton	28
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda yün peptonun test mikroorganizmalarının hücre büyüme performansı üzerine etkisi	36



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Doğada ki ve kültür besiyerlerindeki makrobeseinler.....	4
Çizelge 1.2. Organizmaların gereksindiğı mikrobeseinler (iz elementler).....	5
Çizelge 1.3. Üreme faktörleri (Vitaminler) ve işlevleri.....	6
Çizelge 4.1. Yün peptonun ve diğere standart peptonların kimyasal bileşimleri	34
Çizelge 4.2. Yün peptonun aminoasit içeriğı.....	34
Çizelge 4.3. YP’de ki makro ve mikro elementlerin konsantrasyonları	35
Çizelge 4.4. Test mikroorganizmalarının gelişme performansları üzerinde YP ve standart olarak kullanılan ticari peptonların etkileri (g/l)	35

1. GİRİŞ

Bir hücre çoğalabilmek için kimyasal reaksiyonları ve molekülleri gerektiğince organize etmelidir. Bu tepkimelerin hepsine birden metabolizma denir. Metabolik tepkimeler enerji açığa çıkarabildiği gibi enerjiye gereksinim duyan tepkimeler de vardır. Enerji açığa çıkaranlara katabolik (yıkım) tepkimeler, enerji gereksinenlere anabolik (yapım) tepkimeler denir. Katabolizma ve anabolizma birlikte metabolizmayı oluşturur (Brock 2010).

1.1. Mikroorganizmaların Beslenmesi

Hücreler monomer denen küçük yapı birimlerinden oluşmuş makromolekül ve sudan oluşmuştur. Hücrelerin makromolekül oluşturmak için metabolizmalarında gereksinim duyduğu monomer veya monomer öncüllerine besin denir. Metabolizma için tüm besinlere eşit miktarda ihtiyaç duyulmaz. Bazı besinler hücresel işlevlerin devamlılığı için hücrede çok miktarda bulunmalıdır ki böyle besinlere makrobesin denir. Yaşamsal tepkimeler için çok az hatta eser miktarları gerekli ve yeterli olan besinler de vardır, bunlara ise mikrobesein denir. En temel makrobesinler karbon ve azottur (Brock 2010).

1.1.1. Karbon

Karbon tüm hücreler için vazgeçilmez bir makrobesindir. Bir hücrenin ortalama kuru ağırlığının yarısını karbon oluşturur. Ayrıca tüm makrobesinlerinde bulunan temel element karbondur. Bazı prokaryotlar kendi hücresel bileşenlerini üretebilmek için farklı karbon bileşiklerini özümserken bazıları ihtiyaç duydukları tüm karbon temelli molekülleri CO₂'den sentezlerler (Brock 2010).

1.1.2. Azot

Azot karbondan sonra hücrelerde en çok bulunan elementtir. Ortalama bir bakteri hücresinin kuru ağırlığının %12'sini azot teşkil eder. Azot elementi, proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer hayati hücre bileşenlerinin yapısında bulunur. Bu nedenle hazırlanan bir kültür ortamında muhakkak bulunması gerekir. Azot doğada hem organik hem inorganik formda bulunabilir ancak azotun büyük kısmı amonyak (NH_3), nitrat ya da N_2 formunda olup inorganik haldedir. Bakterilerin büyük kısmı tek azot kaynağı olarak NH_3 'ü kullanabilirken bazıları amonyağın yanında nitratı da kullanabilir. Bununla beraber azot fikse eden bakterilerin tek azot kaynağı havadaki serbest azot gazıdır (N_2) (Brock 2010).

1.1.3. Diğer başlıca makrobisimler

Fosfor (P): Doğada inorganik yahut organik formda bulunabilir. Hücrede en önemli olarak nükleik asitlerin ve fosfolipidlerin yapısına katılır.

Kükürt (S): Sistein ve metionin gibi aminoasitlerin, tiyamin, biyotin, ve lipoik asit gibi birtakım vitaminlerin ve koenzim A'nın yapısında bulunur. Kükürt doğada birçoğu sadece mikroorganizmalarca gerçekleştirilen çeşitli kimyasal dönüşümlere uğrar.

Potasyum (K): Tüm organizmalar için elzemdir. Protein sentezi gibi bazı işlevlerini yerine getirmek için çeşitli enzimler potasyuma ihtiyaç duyarlar.

Magnezyum (Mg): Ribozomları, zarları ve nükleik asitleri kararlı hale getirmesinin yanı sıra çoğu enzimin aktivite göstermesi için de gereklidir.

Sodyom (Na): Tüm organizmalarca değilse de bazı organizmalar için gereklidir. Bir canlının sodyuma duyduğu ihtiyaç onun karakteristik olarak yaşadığı habitat hakkında da bilgi sunar.

Kalsiyum (Ca): Çoğu organizmalarda gerekmemekle birlikte kalsiyumu kullanan canlılarda hücre duvarının kararlılığını artırır ve endosporların ısıya karşı direnç oluşturmalarını sağlar (Brock 2010).

1.1.4. Mikrobelerin (iz elementler)

Hücreler için çok az miktarları dahi yeterli olsa da mevcut olmalarının hayati önemi vardır. Mikrobelerin (örneğin demir) metal olduklarından genelde iz elementler olarak adlandırılırlar. İz elementler, canlılığın katalizörleri olan çeşitli enzimlerin bileşenleri olarak görev yapar. Hücreler çok az gereksindikleri için laboratuvarlarda rutin mikrobiyoloji çalışmalarında kültür ortamına iz elementler eklenmez. Ancak hazırlanan besi yeri çok saf distile suda çözünmüş çok saf kimyasal içeriyorsa iz elementlerin seyreltik çözeltiler halinde kültüre eklenmeleri gerekir.

Demir (Fe): Hücresel solunumda elektron taşımakla görevli sitokromların ve demir-kükürt (FeS) proteinlerinin bileşeni olarak rol oynayan bir iz elementtir (Brock 2010).

1.1.5. Gelişme (üreme) faktörleri

Üreme faktörleri organik materyallerdir, bu faktörlere sadece bazı hücreler ihtiyaç duyar ve az miktarları dahi yeterlidir. Vitaminler, aminoasitler, pürin ve primidinler gelişme faktörü olarak görev yaparlar. Mikroorganizmaların çoğu bu organik maddeleri sentezleyebilirken bazıları çevreden hazır olarak temin etmek zorundadır. Böyle mikroorganizmalar için laboratuvarlarda kültür ortamına bu gelişme faktörlerinden eklemek gerekmektedir.

Vitaminler koenzim bileşeni olarak görev yaptıkları için en çok ihtiyaç duyulan gelişme faktörleridir. Mikroorganizmalar en çok tiyamin (vitamin B₁), biyotin, piridoksin (vitamin B₆) ve kobalamin (B₁₂) vitaminlerine ihtiyaç duyarlar (Brock 2010).

Çizelge 1.1. Doğada ki ve kültür besiyerlerindeki makrobeseinler (Brock 2010)

Element	Doğada bulunan besin formu	Kültür ortamına eklenen kimyasal form
Karbon (C)	CO ₂ , organik maddeler	Glukoz, malat, asetat, piruvat, aminoasitler, yüzlerce farklı bileşik ya da kompleks karışım (maya özütü pepton vb.)
Hidrojen(H)	H ₂ O, organik maddeler	H ₂ O, organik maddeler
Oksijen (O)	H ₂ O, O ₂ , organik maddeler	H ₂ O, O ₂ , organik maddeler
Azot(N)	NH ₃ , N ₂ , nitrat, organik azot bileşikleri	<u>İnorganik:</u> NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ <u>Organik:</u> Aminoasitler, nükleotidlerin azotlu bazları, N içeren diğer organik maddeler.
Fosfor (P)	Fosfat	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Kükürt (S)	H ₂ S, sülfat, organik S bileşikleri, metal sülfürler (FeS, CuS, ZnS, NiS vb.)	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, sistein veya diğer organik kükürt bileşikleri
Potasyum(K)	Çözeltide K ⁺ veya çeşitli K tuzları olarak	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnezyum (Mg)	Çözeltide Mg ⁺² veya çeşitli Mg tuzları olarak	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sodyum (Na)	Çözeltide Na ⁺ , NaCl veya çeşitli Na tuzları olarak	NaCl
Kalsiyum (Ca)	Çözeltide Ca ⁺² , CaSO ₄ veya çeşitli Ca tuzları olarak	CaCl
Demir (Fe)	Çözeltide Fe ⁺² , Fe ⁺³ , FeS, Fe(OH) ₃ veya diğer Fe tuzları	FeCl ₃ , FeSO ₄ , kelatlanmış demir çözeltileri, Fe ⁺³ EDTA, Fe ⁺³ sitrat vb.

Çizelge 1.2. Organizmaların gereksindiği mikrobeseinler (iz elementler) (Brock 2010)

ELEMENT	HÜCRESEL İŞLEVİ ve YAPISINA KATILDIĞI ENZİMLER
Bor (B)	Bakterilerde quorum-sensing otoindükleyicisi olmanın yanında bazı poliketid antibiyotiklerde bulunur.
Krom (Cr)	Memelilerde glukoz metabolizması için gereklidir, mikrobiyal olarak ihtiyaç yoktur.
Kobalt (Co)	Vitamin B ₁₂ ; transkarboksilaz (propiyonik asit bakterisi)
Bakır (Cu)	Solunum, sitokrom c oksidaz; fotosentez, plastosiyanin, bazı süperoksit dismutazlar
Demir (Fe)	Sitokromlar; katalaz; peroksidaz, demir-kükürt proteinleri, oksijenazlar; tüm nitrojenazlar. Diğer iz elementlere kıyasla daha çok miktarda gereklidir.
Manganez (Mn)	Pek çok enzimin aktivatörü, belli bazı süperoksit dismutazlarda ve oksijenik fototroflarda (Fotosistem II) suyu parçalarına ayıran enzimde mevcut
Molibden (Mo)	Flavin içeren bazı enzimler; bazı nitrojenazlar, nitrat redüktazlar, sülfid redüktazlar, sülfid oksidazlar, DMSO-TMAO redüktazlar, bazı format dehidrogenazlar
Nikel (Ni)	Hidrojenazların çoğu, metanojenlerdeki F ₄₃₀ ; karvon monoksit dehidrogenaz, üreaz
Selenyum (Se)	Formatdehidrogenaz, bazı hidrojenazlar, selenosistein aminoasidi
Tungsten (W)	Bazı format dehidrogenazlar; hipertermofillerin oksotransferazları
Vanadyum (V)	Vanadyum nitrojenaz, bromoperoksidaz, karbonik anhidraz, alkol dehidrogenaz
Çinko (Zn)	RNA ve DNA polimeraz ve birçok DNA bağlanma proteinleri

Çizelge 1.3. Üreme faktörleri (Vitaminler) ve işlevleri (Brock 2010)

Vitamin	İşlevi
p-Aminobenzoik asit	Folik asit öncülü
Folik asit	Tek-karbon mekanizması, metil grup transferi
Biyotin	Yağ asitleri biyosentezi, β -dekarboksilasyonlar, bazı CO_2 fiksasyon tepkimeleri
Kobalamin (B_{12})	Tek karbon fragmanlarının redüksiyonu ve transferi, deoksiriboz sentezi
Lipoik asit	Piruvat ve α -ketoglutarat dekarboksilasyonunda açıl gruplarının transferi
Pantotenik asit	Koenzim A öncülü, asetil ve diğer açıl türevlerinin aktivasyonu
Riboflavin	FMN ve elektron taşınmasında gerekli olan flavoproteinlerdeki FAD'nin öncülü
Tiyamin (B_1)	α -Dekarboksilasyonlar, transketolaz
Vitamin B_6 (pidoksal-piridokamin grubu)	Aminoasit ve ketoasit transformasyonları
Vitamin K grubu , kinonlar	Elektron taşınması, sfingolipid sentezi
Hidroksamatlar	Demir bağlayan bileşikler, demirin çözünür hale getirilmesi ve hücre içine aktarılması

1.1.6. Kültür besiyerleri

Besiyeri, mikroorganizmaların laboratuvarında saflaştırılmasında, geliştirilmelerinde, yapısal ve biyokimyasal niteliklerinin araştırılmasında ve biyolojik ürünlerinin incelenmesinde kullanılan mikroorganizmaların gereksinim duyduğu besin

maddelerini içerisinde bulunduran steril ortamdır (Kurbanoğlu 1999; Halkman 2005).

Besiyerleri, fiziksel özelliklerine (yarı katı, katı, sıvı veya bitkisel, hayvansal, sentetik, karışık) ve kullanım alanlarına (genel besiyeri, özel besiyeri) göre gruplandırılabilir.

Genel besiyerleri içerisinde herhangi bir kısıtlayıcı şart yahut bileşen bulundurmayan, geniş bir spektrumda mikroorganizma grubunun çoğalmasını destekleyecek şekilde hazırlanan besiyerleridir. Genel besiyerlerinden laboratuvar çalışmalarında en çok kullanılanları; plate count agar, nutrient agar, nutrient broth ve tryptic soy agar ticari besiyerleridir.

Özel besiyerleri temelde dörde ayrılır (selektif, transport, diferansiyel (ayırt edici), zenginleştirilmiş besiyerleri).

Selektif (seçici) besiyerleri, üstlerinde çoğalması istenen mikroorganizmaların gelişmesini sağlarken diğerlerinin çoğalmasını baskırlar (EMB agar).

Transport besiyerleri sadece tuz ve tampon içerirler ve üzerinde çalışılmak üzere elde edildiği kaynaktan laboratuvara getirilirken kullanılırlar.

Diferansiyel besiyerleri, kültüre alınan mikroorganizmaların kendi karakteristik özelliklerinin ortaya çıkmasını destekleyen genelde boya gibi bazı indikatörlerin ilave edildiği besiyerleridir.

Zenginleştirilmiş besiyerleri; gelişmek için çok özel istekleri olan mikroorganizmalar da dahil hemen her türlü mikroorganizmanın çoğalmasını destekleyecek bileşenler içerirler besleyici özellikleri oldukça elverişlidir. Ortama konakçıdaki koşulları

oldukça iyi taklit eden serum ya da tam kan gibi besinler ilave edilir (kanlı agar ve çikolata agar).

Besiyerleri ayrıca kimyasal özelliklerine göre de sınıflandırılır. Bu sınıflandırma türüne göre besiyerleri kimyasal içeriği tam olarak bilinmeyen doğal besiyerleri ve kimyasal içeriği bilinen yapay olarak ikiye ayrılmaktadır.

Yapay besiyerleri formüllerinde belirtilen kimyasalların dikkatlice ölçülerek saf su ile karıştırılarak hazırlanmaktadır. Doğal besiyerleri ise genellikle daha ucuz olduklarından fermentasyon süreçlerinde sıkça kullanılırlar (üzüm ve bira şıraları, melas, soya küspesi, süt ve artıkları, pepton, toprak ekstraktı, soya fasüyesi ve maya ekstraktı) (Kurbanoğlu 1999; Hasenekoğlu 2002; Halkman 2005; Brock 2010).

Besiyerlerinin bileşimine giren başlıca maddeler su, tuz, agar, inhibitörler, maya ekstraktı, et ekstraktı, malt ekstraktı, beyin ekstraktı ve kalp ekstraktı, kimyasal tamponlar, pH indikatörleri, redoks indikatörleri, karbonhidratlar ve peptonlardır (Halkman 2005).

1.2. Peptonlar

Mikroorganizmaların ve onların ürettikleri ürünlerin üretimi için kullanılan besiyeri bileşenleri oldukça pahalıdır. Bu besiyeri bileşenleri arasında da azot kaynakları en fazla maliyetli olanıdır.

1880 yılında Naegel ilk defa laboratuvar şartlarında bakteri üretimi için pepton kullanmayı önermiştir. Bu madde böylece besiyerlerinin çok önemli bir temel elemanı olarak "et sulu pepton" tanımıyla bakteriyoloji bilimine girmiştir (Uzeh *et al.* 2006). Ahmet Refik Güran (1870-1963) ise pek çok mikrobiyolojik araştırmasının yanı sıra ilk Türk pepton üreticisidir (Çetin 1983; Arda 2000).

Pepton, proteince zengin kaynakların hidroliz edilmesiyle elde edilen ürünleri tanımlayan genel terimdir. Peptonlar mikrobiyal çalışmalar için hazırlanan besiyerlerinde kullanılan en önemli organik azot kaynaklarından. Bu protein hidrolizat ürünleri suda kolayca çözünebilir, ısı ya da alkali muamelesi veya amonyum sülfat ile koagüle olmaz (Poernomo and Buckle 2002; Vasileva-Tonkova *et al.* 2007).

Peptonlar mikrobiyal besiyerlerinde azot kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra karbon kaynağı kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Peptonların içeriğindeki bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü fonksiyonunu yerine getirir. Ayrıca peptonlar mikroorganizmaların gelişimi için lüzumlu olan temel maddeleri sağlayan proteazlar ve peptidlerin bir karışımının yanısıra, bazı üreme faktörleri ve inorganik tuzlar bulundurur. Peptonlar tüm bu zengin içerik ve özellikleriyle mikrobiyoloji çalışmalarında tek başlarına besiyeri olarak kullanılabilen nadir bileşenlerden birisidir. Pek çok bakteri türü içeriğinde sadece %1 pepton bulunan besiyerinde gelişebilmektedir (Sert 1988; Bilgehan 2002; Cengiz vd 2004; Halkman 2005).

Ayrıca %0,1'lik pepton çözeltisi farklı yoğunluklarda mikrobiyal hücre yoğunlukları oluşturma amacıyla hazırlanan fizyolojik su ve fosfat tamponuna göre çok daha iyi bir diluenttir (Mc Feters *et al.* 1982; Mian *et al.* 1997; Beuchat *et al.* 2002).

Yapılan endüstriyel çalışmalarda mikrobiyal kaynaklı ürünlerin verimlerini artırmak için mikroorganizmaların kullandıkları besiyerlerinin içeriklerinde organik (pepton, malt ekstrakt, maya ekstratı, üre v.b) ve inorganik (amonyum sülfat, sodyum nitrat, amonyum nitrat v.b) azot kaynakları denenmiş ve sonuçta organik kaynakların daha yüksek verim sağladıkları görülmüştür (Kunamneni *et al.* 2005; Cho *et al.* 2006; Erdal ve Taskin 2010).

Protein ihtiva eden materyallerin enzimatik muamele ve asit hidrolizi sonucu peptonlar elde edilir. Bu işlemlerde asit ile hidrolizasyon yüksek oranda verim sağlar.

Ancak bu işlemde nötralizasyon yapmak zorunludur ve nötrleştirme sonucu son üründe çok miktarda kül oluşur (Dufosse 1997; Kurbanoglu ve Kurbanoglu 2004).

Çevre kirliliğini önlemek için ve besiyerlerindeki maliyeti düşürmek için fibröz protein içeren hayvansal atıklar pepton üretimi için kullanılır (Kurbanoglu ve Kurbanoglu 2002; Vasileva-Tonkova *et al.* 2007).

1.2.1. Pepton kaynağı olarak koyunyünü

Peptonlar, çeşitli hayvansal (ahtapot, balık artıkları, et, karideslerin bas kısmı, kazein, koçboynuzu, süt, vb) ya da bitkisel dokulardan (Afrika çekirge fasulyesi; akaju ağacı, ayçiçeği, soya fasulyesi, vb) elde edilebilirler (Rale 1984; Usawakesmanee 1995; Aksit vd 1996; Ellouz *et al.* 2001; Parrado *et al.* 2001; Kurbanoglu ve Kurbanoglu 2002; Halkman 2005; Rozman *et al.* 2005; Uzeh *et al.* 2006; Vazquez ve Murado 2008).

Pepton üretiminde kullanılan fibröz proteinler kollajenler ve keratinler olarak ikiye ayrılırlar. Bu proteinler suda çözünmezler, yapılarındaki disülfid bağları sayesinde enzimatik parçalanmaya ve kimyasal maddelere karşı dirençleri yüksektir. Kollajenler kopmaya ve uzamaya karşı dirençlidir. Kemiklerde ve tendonlarda bol miktarda bulunur. Keratin ise deri, tırnak, saç, boynuz ve yün gibi yapılarda bolca mevcuttur (Harrap ve Woods 1964; Cherry *et al.* 1975; Luong ve Payne 1977). Yün %95'den daha fazla saf keratin içeren bir fibröz proteindir (Wang *et al.* 2015). İşlenmemiş yün fiberleri 20 farklı aminoasit içerir bu aminoasitlerin çoğunluğu glutamik asit, serin, glisindir. Ayrıca kükürtçe zengin aminoasitler de, özellikle sistin, içerirler (Rippon 1992). Diğer yandan kimyasal ya da enzimatik yöntemlerle hazırlanmış yün hidrolizatlarından bitki gübresi ya da hayvan yemi olarak faydalanabileceği de ortaya atılmıştır. Ancak, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Zymomonas mobilis* ve *Lactobacillus bulgaricus*

gibi endüstriyel, biyoteknolojik ve klinik öneme sahip olan mikroorganizmalar için substrat ya da pepton kaynağı olarak yün hidrolizatlarının kullanımı konusunda hiçbir girişim yoktur.

Fibröz proteinlerinin yapısal özelliklerinden ötürü diğer proteinlere ve hidrokarbonca zengin materyallere göre parçalanması çok daha zor olduğundan bu proteinlerin hidrolizasyon işlemi sırasında kullanılan işlem basamakları daha etkili koşullarda gerçekleştirilmelidir. Fibröz proteinlerin hidrolizi sırasında istenen sonuca ulaşabilmek için standart hidrolizasyon işlemlerini bir miktar değiştirmek gerekir ki bunlar:

- Kullanılan asit ya da bazın konsantrasyonu artırmak,
- Hidroliz süresini uzatmak,
- Yüksek sıcaklık ve basınçlarda hidroliz işlemlerini gerçekleştirmek.

Örnek olarak; proteinlerin hidrolizinde kullanılan 6N HCl asidi, polipeptit zincirindeki aminoasitleri birbirinden ayırabilmekte ancak kükürtlü aminoasitleri polipeptitten koparamamaktadır. Kükürt bulunduran aminoasitlerin polipeptitten kopabilmesi içinse yüksek sıcaklıkta inkubasyon yapılmalıdır. Bununla beraber çok fazla sıcaklık ve basınç uygulaması, çok yüksek konsantrasyonlarda hazırlanmış asitler ya da bazlar ve hidroliz süresini çok uzatmak, hidrolizasyon işleminde bazı aminoasitlerin yapılarının bozulmasına yol açmaktadır. Benzer bir çalışmada; tavuk tüyünün yüksek derecede buhar hidroliziyle muamelesi neticesi yapısındaki sistin aminoasidi lanthionine, lizin aminoasidi de lisinoalanine dönüştüğü gözlenmiştir. Lanthionin ve lisinoalanin ise canlı organizmalarca sistin ve lizine oranla daha düşük verimle kullanılmaktadır. Fibröz proteinlerin hidroliz işlemlerinde ayrıca enzimler, asitler ve bazlar birlikte uygulanarak daha yüksek hidroliz verimleri elde edilmeye çalışılmaktadır (Papadopoulos *et al.* 1985; Latshaw *et al.* 1994; Kurbanoglu 1999; Taşkın 2011).

Giyim ve mefruşat endüstrisinde eskiden tek seçenek olan koyunyünü son zamanlarda yerini sentetik ürünlere bırakmıştır. Kolay ulaşılabilir, uygun fiyatlı ve daha kolay kullanışı olması nedeniyle sentetik ürünler artık daha fazla tercih edilir olmuştur. Bunun sonucunda yünlerini satacak merci bulamayan küçükbaş hayvancılıkla uğraşan üreticiler ellerinde kalan bu ürünlerin çok büyük kısmını adeta bir çeşit atık gibi yakmak mecburiyetinde kalabilmektedir. Üreticinin bu mağduriyetinin giderilmesi ve laboratuvarların olmazsa olmazı olan peptonun yerli bir kaynaktan üretilmesi için bu tez çalışmasının faydalı olabileceğini düşünüyoruz. Örnek vermek gerekirse Sigma Aldrich firmasının pazarladığı proteaz peptonun 1kg fiyatı 536 euro' dur. Ocak 2016 tarihi kuru itibariyle bu rakam yaklaşık 2105 tl' ye tekabül etmektedir. Ülke çapında hemen her mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak sıkça kullanıldığını da düşünürsek ülkeye maliyeti ve tez konumuzun ehemmiyeti daha net anlaşılacaktır.

Türkiye ve dünyada mikrobiyolojik araştırmaların artması sonucu laboratuvarlarda kullanılacak besiyeri ihtiyacı da artmaktadır. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ise piyasada oldukça fazla ücretler karşılığında satılmaktadır. Eğitim, tedavi, araştırma-geliştirme ve kontrol çalışmalarını yürüten hastane, üniversite, çeşitli sağlık ve araştırma kuruluşlarının yaptıkları çalışmalarda kullandıkları besiyerlerinin miktarı düşünülürse, bunun milli ekonomimize ne kadar maliyet yüklediği daha da iyi anlaşılabilir. Türkiye'de ticari besiyeri üretimi olmadığı için mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan besiyerleri Difco, Oxoid ve Merck vb. küresel çapta üretim yapan yabancı sermayeli firmalardan sağlanmaktadır. Pek çok kurum ve kuruluşta rutin çalışmalarda bile çok miktarlarda kullanılan en temel besiyerlerinin ithali, Türkiye'de ki halkımızın alın teriyle yaptığı üretim sonucu elde edilen ve aslında ülke içinde değerlendirilmesi gereken dövizin dış kaynaklı şirketlere kaptırılmasına neden olmaktadır. Yerli bilgi ve sermaye ile kendi besiyerimizi üretme yönünde adım atılmaması da ülkemizi mikrobiyolojik araştırmalarda sürekli dışarıya bağımlı hale getirmektedir. Ayrıca yerli olarak üretilen besiyeri içeriklerini araştırmacıların elde etmesi de kolay ve kısa süreçeğinden yapılan çalışmalar daha hızlı ilerleyecektir. Bu ekonomik ve bilimsel nedenler dolayısıyla, yerli kaynaklardan

besiyeri malzemesi üretme ve hazırlama çalışmalarının artırılmasına şiddetle ihtiyaç vardır (Kurbanoglu 1999).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Maciel *et al.* (2016) gerçekleştirdikleri deneylerde tavukçuluk sektörünün faaliyetleri sonucu çevreye zararsız hale getirilmesi için uygun metodlar geliştirilmesi gereken devasa tüy atıkları üretmekte olduğunu söylemişlerdir. Keratinolitik potansiyeli olan *Chryseobacterium sp.*'nin ve *Bacillus sp.*'nin kr16 ve kr6 suşlarından enzimatik yolla protein hidrolizatları üretmek için tüylerin biyolojik dönüşümü için istifade etmişlerdir.

Laskri *et al.* (2015) iki farklı substratın biyolojik olarak parçalanabilen atık toplama havuzundan ve atık su arıtma tesisindeki çamurdan doğal lagünlerle anaerobik sindirim sürecini gerçekleştirmek üzerine çalışmışlardır. Deneylerini bir litre kapasiteli, sızdırmaz hale getirilmiş bir sindirici içinde yapmışlardır. Organik maddenin bozunumunu optimize etmek için; kimyasal oksijen ihtiyacı (CDO), sindirim sırasında oluşan biyogaz hacmi, sürecin sıcaklığı ve pH değerini ölçerek organik maddenin bozunumunun gelişimini takip etmişlerdir. Atık su arıtma tesisindeki çamurun, doğal lagün tarafından, fermente edilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir organik materyal açısından, depolama alanındaki fermente edilebilir materyal oranından çok olduğunu belirlemişlerdir. Metan bakımından oldukça zengin olduğu için oluşan biyogazın parlayıcı olduğunu ortaya koymuşlardır. Çamurun sindirimi sırasında üretilen biyogaz hacminin, düzenli depolama alanındaki organik maddenin sindirilmesine kıyasla 10 kattan fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Wang *et al.* (2015) gerçekleştirdikleri çalışmalarında birçok uygulama için yenilenebilir hammadde kaynağı olan ve tüy, kıl, yün, boynuz gibi materyallerden elde edilen keratinin çözünürlüğünü, L-sistein muamelesiyle disülfid bağlarını daha etkin kırmak suretiyle artırmışlardır.

Giese *et al.* (2013) çalışmalarında farklı azot kaynaklarının ve AreA transkripsiyon faktörünün *Fusarium graminearum*'daki mikotoksinlerin üretimi üzerindeki etkisi

incelemişlerdir. Glutamin ve NH_4 kaynakları üzerinde büyüme zayıfken asparaginin *F. graminearum* için tercih edilen bir azot kaynağı olduğunu bulmuşlardır.

Taşkın (2013) gerçekleştirdiği çalışmada tavuk tüyü hidrolizatından elde edilen peptonun substrat olarak kullanılmasının *Saccharomyces cerevisiae*'nin glutatyon üretimi üzerine etkisini incelemiştir. Kontrol besiyeriyle karşılaştırıldığında tavuk tüyü hidrolizatından elde edilen peptonun substrat olarak kullanılması neticesi mikroorganizma biyokütlesinde %53, glutatyon üretiminde %115 lik bir artış olduğunu gözlemlemiştir.

Villa *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada, saçın esas olarak keratin protein ve az miktarda lipidden oluştuğunu belirtmişlerdir. Özellikle düşük molekül ağırlıklı olan protein hidrolizatlarının, saçları kimyasal ve çevresel zararlara karşı koruduğu bilinmektedir. Tırnak, boynuz ve yünden elde edilen keratin hidrolizatlar gibi bitki ve hayvanlardan elde edilen birçok protein hidrolizati saç ve kişisel bakımda kullanılmıştır. Bu hidrolizatların çoğu kimyasal hidroliz ve hidrotermal yöntemlerle elde edilir, ancak kısa süre önce hidrolize edilmiş saç keratin ve tüy keratin peptidleri, su altı fermentasyon ile *Bacillus spp.* kullanılarak enzimatik hidroliz ile elde edilmiştir.

Taşkın *et al.* (2012) çalışmalarında tavuk tüyü hidrolizi sonucu elde edilen peptonu yenilebilir bir mantar türü olan *Morchella esculenta*'nın misel biyokütlesi ve ekstrasellüler polisakkarit üretimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma tripton pepton ve balık peptonla karşılaştırma yapmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre tavuk tüyü peptonu tripton ve balık peptonla benzer etkiye sahiptir.

Ghribi and Ellouze-Chaabouni (2011), petrol, ilaç, biyomedikal ve gıda işleme sanayilerindeki birçok ticari uygulamada potansiyel olarak kullanıldığından son yıllarda biyolojik yüzey etkin maddelere olan ilginin önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir. Üretimlerinin iyileştirilmesi büyük önem taşıdığından, *Bacillus subtilis* SPB1 suşundan biyolojik yüzey etkin üretimini optimize etmek için kültürel

koşullar analiz edilerek karbonhidrat substratını bir karbon kaynağı olarak kullanıp *B. subtilis*'in bir kültürünü kullanarak yüksek biyolojik yüzey aktif madde verimi elde edildiğini rapor etmişlerdir; Karbonhidratlar arasında ise en iyi biyolojik yüzey etkin madde üretimini glukoz kullanımının arttırdığını gözlemlemişlerdir. Optimum glikoz konsantrasyonu 40 g / l olarak bulmuşlardır.

Mokrejs *et al.* (2011) biri alkalın muamele biri de proteolitik enzimlerle muamele olmak üzere iki aşamada koyun yününden keratin hidrolizatı elde etmişlerdir.

Taşkın and Kurbanoglu (2011) yaptıkları çalışmada tavuk tüyü hidrolizatından mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek pepton üretmişler ve farklı mikroorganizmalar üzerinde besiyerlerine ilave etmek suretiyle denemişlerdir.

Teresa and Justyna (2011) yapmış oldukları çalışmalarında tüyler, boynuzlar, toynaklar ve tavuk tüyü gibi bazı keratince zengin ürünlerin hayvanlar için aminoasit bitkiler için azot ve kükürt kaynağı besinler olduğunu belirtmişlerdir. Atık keratin kaynaklarının gübre ve yemlerde kullanılmasının çevre ve insan sağlığına tehdit oluşturmayacağını ve bu atıkların keratinolitik mikroorganizmalarca biyoteknolojik metodlar kullanılarak sanayiye kazandırılabilceğini öne sürmüşlerdir.

Cui *et al.* (2010) yaptıkları çalışma ile, farklı konsantrasyonlarda azot kaynağının (NH_4^+ ve NO_3^-), *Hypericum perforatum* L'nin yabancı kök kültürlerinde biyolojik kütle ve sekonder metabolitlerin birikimi üzerine etkisini incelemişlerdir. 5:25 (mM) $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ile takviye edilen ortam, biyo kütle ve toplam fenollerin ve flavonoidlerin optimum birikimi ile sonuçlandığını ortaya koymuşlardır.

Al-Bahri *et al.* (2009) çalışmalarında, soya peptonu üretimi için papain enzimi yerine hidroklorik asit kullanarak soya proteini hidroliz işlemini yapmaya ve bu işlem için gerekli optimum koşulları elde etmeye çalışmışlardır.

Converti *et al.* (2009) Mikroalgler tarafından üretilen biyolojik materyalin biyodizel üretimi için muhtemel kaynak olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmalarında, *Nannochloropsis oculata* ve *Chlorella vulgaris*'in lipid içeriği üzerine sıcaklık ve azot konsantrasyonlarını biyodizel üretimi için yeni hammaddeler olarak olası kullanımları açısından incelenmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, sıcaklığın 20°C'den 25°C'ye yükselmesi *N. oculata*'nın lipid içeriğini iki katına (%7.90'dan %14.92'ye) çıkarırken, 25°C'den 30°C'ye bir artış *C. vulgaris*'in lipid içeriğini 14.71'den %5.90'a düşürmüştür. Öte yandan, ortamdaki azot konsantrasyonunun büyüme için en uygun değerlere göre %75 oranında azaltılması neticesi *N. oculata*'nın lipid fraksiyonlarını %7.90'dan %15.31'e, *C. vulgaris*'in lipid fraksiyonlarını %5.90'dan %16.41'e yükselttiğini gözlemlemişlerdir.

Patkowska-Sokoła *et al.* (2009) Polonya (polonya dağ koyunu), Yunanistan (Karagounico soyu) ve Suriye (Awassi soyu) menşeli koyunlardan elde edilen koyun yünlerini kimyasal olarak analiz etmişlerdir. Analiz neticesi yünlerin kimyasal bileşimlerinde makroelementler (Ca, P, Na, K, Mg, S), iz elementleri (Al, Ba, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Sr, Ti, Zn) ve ağır metaller (As, Cd Hg, Pb) tespit etmişlerdir. Bu elementlerin menşe aldıkları ülkelere göre yünlerdeki miktarsal farklılıkları incelemişlerdir.

Yuan *et al.* (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada, yüksek serbest yağ asit içeriğine sahip atık kolza yağını biyodizel üretmek için ham madde olarak kullanmışlardır.

Nustorova *et al.* (2006) gerçekleştirdikleri 9 aylık çalışma ile koyunyünü atığının alkalın hidrolizatının Bulgaristan/Sofya'daki bir park toprağına eklenmesi neticesinde toprağın kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine olan etkisini incelemişlerdir. Koyunyünü atığının %75-80 oranında çözülebilir materyallerden (peptidler, aminoasitler, boyalar, lipidler, bazı karbohidratlar ve potasyum iyonları) oluştuğunu bu nedenle tarımda zararsız ve değerlendirebilir bir gübre olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak alkalın yün hidrolizatının mikrobiyal popülasyonu ve bitki gelişmesini olumlu yönde etkilediğini söylemişlerdir.

Aspmo *et al.* (2005), çalışmalarında farklı enzimatik hidroliz işlemleri ile morina iç organlarından yapılmış üç hidrolizat, azot, aminoasitler ve mikrobiyal büyüme ortamındaki vitaminler için birleşik bir kaynak olarak test etmişlerdir. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus sakei*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger* mikroorganizmaları kullanılarak bu iç organ hidrolizatların performansı, otomatikleştirilmiş bir büyüme analizcisinde (Bioscreen C) yaygın ticari peptonların performansı ile karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar, genel olarak balık hidrolizatlarının, hali hazırda mevcut olan farklı kökenli azotlu kaynaklarının alternatifi olabileceği doğrultusunda umut verici olduğunu göstermektedir.

Ghorbel *et al.* (2005) çalışmalarında filamentöz bir fungus olan *Rhizopus oryzae*'nin ekstrasellüler lipaz üretimi için *Sardinella aurita* (sardalye) balığından elde edilmiş çeşitli protein hidrolizatları azot kaynağı olarak kullanmışlardır. En iyi sonucu yağsızlaştırılmış balık eti hidrolizatından elde etmişlerdir. Bu durum kültür ortamında bulunan yağ fraksiyonlarının lipaz üretimini baskıladığını göstermiştir. Ayrıca balık proteinlerinin kapsamlı hidrolizlerinin lipaz üretimini artırdığını ortaya koymuşlardır.

Mao *et al.* (2005) bir Çin geleneksel tıbbi mantarı olan *Cordyceps militaris*'in batık ekimi ile yararlı biyoaktif metabolit, cordycepin (3'-deoksiadenozin) üretimine çeşitli karbon kaynaklarının ve karbon / azot oranlarının etkilerini incelemişlerdir. İncelenen karbon kaynakları laktoz, sükroz, glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz ve ksiloz'du ve bunlar arsından glikozun cordycepin üretimi için en elverişli karbon kaynağı olduğunu bulmuşlardır, oysa *Cordyceps militaris* hücrelerinin galaktoz'lu ortamda en iyi gelişme gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar cordycepin üretimini daha da arttırmak için, karbon / azot oranlarının etkisini de incelemişlerdir. Karbon ve azot kaynaklarının optimum miktarlarında, yani 42 g glikoz / l ve 15,8 g pepton / l içeren ortamda günde 345,4±8,5 mg / l ve 19,2±0,5 mg / l'lik maksimum cordycepin üretimi ve verimliliği elde edildiğini göstermişlerdir.

Martone *et al.* (2005) balık atıklarından hazırladığı protein hidrolizatını arkebakteriler (*Halobacterium salinarum*) ve eubakteriler (*Escherichia coli*, *Bacillus*

subtilis ve *Staphylococcus epidermidis*) için katı ve sıvı besiyerinde substrat olarak kullanma yoluna gitmişlerdir.

Rozman *et al.* (2005) Soya fasulyesinden elde edilen Tip III ve Tip IV (Sigma) peptonları ile yaptıkları çalışmada bu peptonların *Claviceps fusiformis* küfünün üreme kapasitesini ve alkaloid verimini et peptonuna nazaran daha yüksek oranda arttırdığı belirlemişlerdir.

Angenenta *et al.* (2004) sürdürülebilir bir toplumun kurulması için fosil yakıtlara bağımlılığın azaltılması ve üretilen kirlilik miktarının düşürülmesinin gerekeceğini belirtmişlerdir. Atıksu arıtımı, bu iki hedefin aynı anda çözümlenebileceği bir alandır. Metanojenik anaerobik sindirim, biyolojik hidrojen üretimi, mikrobiyal yakıt hücreleri ve değerli ürünlerin üretimi için gerçekleştirilen fermantasyon gibi endüstriyel ve tarımsal atık suyun işlenmesinde biyoenerji veya biyokimyasal üreten çeşitli biyolojik işleme stratejilerini incelemişlerdir.

Kurbanoglu ve Kurbanoglu (2004) koçboynuzunun asit hidrolizi sonucu elde edilen peptonun *Aspergillus niger*'in besiyerinde kullanılması ile sitrik asit üretimi üzerine ki etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla koçboynuzu peptonu ile hazırlanan (çalışmalarında optimum miktarın %4 olduğunu bulmuşlardır) besiyerinin yanında bir de kontrol besiyeri hazırlamışlardır. Yaptıkları çalışmalar koçboynuzu peptonunun sitrik asit üretimini %35 oranında artırdığını gözlemlemişlerdir.

Gousterova *et al.* (2003) çalışmalarında KOH ile yüksek sıcaklık (120°C), basınç (2.03 atm) ve pH'da (pH:12) koyunyünü hidrolizatı elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Elde edilen bu hidrolizatın azot ve fosfor bakımından zengin olmasından dolayı gübre olarak kullanımının verimli olacağını belirtmişlerdir.

López *et al.* (2003) *Aspergillus terreus* ATCC 20542 tarafından lovastatin üretimi ve mikrobiyal biyokütle gelişimi üzerinde, karbon kaynağı (laktoz, gliserol ve fruktoz) ve kullanılan azot kaynağı (maya özütü, mısır sofrası sıvı ve soya fasulyesi unu) ve

C:N oranının etkisini incelemişlerdir. N-sınırlı koşullar altında ya soya fasulyesi unu ya da maya ekstraktı ile kombinasyon halinde yavaş metabolize edilen bir karbon kaynağı (laktoz) kullanımı, lovastatin'in en yüksek titreleri ve spesifik üretkenliği ($\sim 0.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) lovastatin verdiğini gözlemlemişlerdir. Laktoz / soya fasulyesi unu ve laktoz / maya ekstraktı maddesi kullanılarak biyokütle üzerindeki lovastatin verimi katsayısının maksimum değerini $\sim 30 \text{ mg g}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Lovastatin'in yüksek verimliliğini elde etmek için optimal başlangıç C: N kütle oranının ~ 40 olduğunu bulmuşlardır.

Poernomo and Buckle (2002) yaptıkları çalışmada vatoz (*Trygon sephen*) balığının kuyruk kısmı artıklarına propionik asit ve formik asit karışımı uygulamış ve böylece ham sıvı pepton hazırlamıştır. Bu pepton mikrobiyal biyokütle oluşturma bakımından üç ticari pepton ile karşılaştırılmış ve *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* mikroorganizmaları üzerinde denenmiştir. Sonuç olarak vatoz balığından elde edilen peptonun biyokütle oluşturma açısından diğer peptonlarla yakın hatta bazılarında daha fazla biyokütle oluşturduğunu ortaya koymuşlardır.

Ellouz *et al.* (2001) gerçekleştirdikleri çalışmada *Sardinella aurita* (sardalye) kullanılarak elde edilen peptonun *Bacillus subtilis*'in proteaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda *Sardinella aurita*'nın içerdiği yüksek yağ oranı ve besleyici faktörlerden elde edilen balık peptonunun diğer ticari peptonlara nazaran proteaz üretiminde %100 artış sağladığını gözlemlemişlerdir.

Pedersen and Nielsen (2000) azot kaynağının, *Aspergillus oryzae*'nin α -amilaz üretkenliği üzerindeki etkisini sürekli kültürlerde incelemişlerdir. Çalışmada inorganik ve karmaşık azot kaynakları araştırılmış karbon ve enerji kaynağı olarak glikoz kullanmışlardır. Azot kaynağı olarak amonyak kullanılması sonucu üretilen α -amilaz miktarının nitrat kullanıldığında üretilenden daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Amonyak ve maya özütü veya kazein hidrolizatı gibi kompleks

nitrojen kaynakları karışımının kullanılmasının α -amilaz üretimini tek azot kaynağı olarak amonyak kullanılmasından daha olumlu etkilediğini göstermişlerdir.

Zong and Wang (1998) *Panax quinquefolium* Q91625 süspansiyon kültürlerinin büyümesi ile ginseng saponin (sekonder metabolit) ve polisakkarit (primer metabolit) üretimi üzerindeki nitratin ve amonyumun etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Bu çalışmada nitratin amonyuma oranla daha yüksek hızda hücresel gelişmeye ve daha yüksek bir son hücre ağırlığına neden olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında amonyumun metabolit oluşumu açısından da olumsuz sonuca neden olduğunu, saponin ve polisakkaritin maksimum üretiminin nitrat tek N kaynağı olarak kullanıldığında elde edildiğini göstermişlerdir.

Manginot *et al.* (1997) *Saccharomyces cerevisiae*'nin alkollü fermantasyonlarını, asimile edilebilir azot eklenmesini kontrol ederek fermantasyon sürecinin tamamında sabit bir oranda yürütmüşlerdir. Düzenleme periyodu boyunca, hücrelerin azot içeriğini ve spesifik aktivitelerini sabit tutmuşlardır. Bu fermantasyonlar sabit fazda farklı aminoasitler ilavelerinin etkinliğini karşılaştırmak için kullanılmışlar ve çalışma neticesi ilaveli fermantasyonlara kıyasla belirgin farklar bulmuşlardır.

Albers *et al.* (1996) gerçekleştirdikleri çalışmalarında anaerobik maya kültürleri tarafından etanol üretiminde hammadde kaybını önlemek için, gliserol oluşumu azaltılması gerektiğini belirtmişlerdir. Teorik olarak, bu mayaya aminoasitleri sağlayarak yapılabilir, çünkü glikoz ve amonyaktan gelen aminoasitlerin de novo hücre sentezi, gliserol oluşumu ile yeniden okside edilmesi gereken NADH fazlalığına neden olduğunu ortaya koymuşlardır. *Saccharomyces cerevisiae*'nin endüstriyel bir suşu, karbon ve enerji kaynağı olarak litre başına 20 g glikoz ile farklı azot kaynakları, yani amonyum tuzu, glutamik asit ve bir aminoasit karışımı ile toplu kültürlerde yetiştirmişlerdir. Azot kaynağının metabolit oluşumu, büyümesi ve hücre kompozisyonu üzerindeki etkilerini ölçmüşlerdir. Glutamik asit (0,17 mol / mol glikoz) ile veya azot kaynağı olarak aminoasitler (0,10 mol / mol) karışımı ile elde edilen gliserol verimleri, amonyumla yetiştirilen kültürler için olanlardan (0,21 mol /

mol) açıkça daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak, hem glutamik asit (%9) hem de aminoasitler karışımı (%14) üzerinde etanol verimi arttığını gözlemlemişlerdir. Glutamik asit ürün oluşumu üzerinde büyük bir etkiye sahiptir; Örneğin bir α -ketoglutarik asit, süksinik asit ve asetik asit üretimi, diğer azot kaynakları ile olan üretimlerine kıyasla artmıştır. Aminoasitler üzerinde yetiştirilen kültürler hem amonyum (0,45 h²¹) hem de glutamik asit (0,33 h²¹) hücrelerinin kültürlerinden daha yüksek bir spesifik büyüme hızına (0,52 h²¹) sahiptir. Ürün verimleri farklı olmasına rağmen, hücrelerin benzer bileşimleri elde edilmiştir. Aminoasit, RNA ve hücre dışı metabolit sentezlerinde üretilen NADH, ilgili gliserol oluşumu ile birlikte hesaplanmıştır. Teorik olarak hesaplanan gliserol veriminin daha düşük menzilli değerleri, deneysel verimlerle iyi bir şekilde uyumlu olduğu ve bununla, metabolizmanın düzenlenmesinin, redoks potansiyelinin en verimli balansında başarılı olduğunu gösterebileceğini belirtmişlerdir.

Buswell *et al.* (1995) çalışmalarında *Lentinula (Lentinus) edodes* LS4 manganeze bağımlı peroksidaz (MnP) ve lakkaz ürettiğini ancak tek karbon kaynağı olarak glikoz içeren tanımlanmış bir ortamda yetiştirildiğinde lignin peroksidazı üretmediğini belirtmişlerdir. Azot MnP üretimini bastırırken en yüksek lakkaz seviyeleri, mantar yüksek azot (26 mM) konsantrasyonu içeren şartlarda büyütüldüğünde gözlemlemişlerdir.

Six and de Baere (1992) yaptıkları çalışmada Dranco süreci katı organik atıkların (sebze, meyve, bahçe ve geri dönüştürülemez kağıt atığı gibi kaynaktan ayrılmış atıklar), özellikle de belediye katı atıklarının (MSW) organik fraksiyonunun enerji ve Humotex olarak adlandırılan humus benzeri bir son ürüne dönüştürülmesi için geliştirildiğini belirtmişlerdir.

Auer *et al.* (1990) *Aureobasidium pullulans* tarafından polisakkarit oluşumu ortamdaki azot kaynağından etkilendiğini ve polisakkarit üretimini destekleyen koşullar altında bile aşırı amonyum iyonları bulunduğu zaman verimin düştüğünü göstermişlerdir. Düşük pH'da (2,5) yüksek polisakkarit verimleri ve bazı azot

kaynakları ile yüksek pH'da (6,5) mikrobiyal büyüme elde etmek mümkündür. Ortaya koydukları çalışmalar sonucu kültürlerin morfolojisi ve polisakarit üreten kapasitesi arasında nedensel bir ilişki bulunmadığı görülmüştür.

Arad *et al.* (1988) ortaya koydukları çalışmalarında azot kaynağı olarak nitrat veya amonyum üzerinde yetiştirilen *Porfiridyum* kültürlerinin benzer büyüme modelleri ve hücre duvarı polisakkarit üretimini göstermişlerdir. Azotun büyüme ve hücre duvarı polisakarit üretimi üzerindeki etkisi, üç besleme modu uygulayarak incelemişlerdir bunlar: Parti modu (nitrat, deneyin başında verildi ve 6. günde tükendi), Sürekli nitrat eklendiği sürekli mod ve hücrelerin nitrat içermeyen bir ortamda kültürlendiği yetersiz mod. Parti ve sürekli mod kültürlerinde mikrobiyal büyümeyi yaklaşık olarak benzer olarak gözlemlemişlerdir ancak yetersiz mod kültüründe mikrobiyal gelişim tamamen engellendiğini rapor etmişlerdir. Polisakkarit içeriği (hacim başına) parti modlu kültürde en yüksek ve eksik mod kültüründe en düşüktür. Bununla birlikte, hücre başına polisakkarit üretiminin, sürekli ve yetersiz modlu kültürlerde benzerdi, en yüksek değer parti modu kültüründe olduğunu bulmuşlardır.

Kalnes and James (1988) çalışmalarında her yıl milyarlarca galon organik atık sıvı ortaya çıkarıldığı üzerinde durmuşlardır. Yakın zamanda uygulanan EPA (Environmental Protection Agency) düzenlemeleri sayesinde artık bu atıkların net üretimini en aza indirmek için ekonomik bir itici güç sağlamakta olduğunu belirtmişlerdir. Katalitik hidrojenasyon prosesini kullanan bir hidrokarbon arıtma işlemi ile arıtma yelpazesi mevcut petrol ve petrokimyasal uygulamalardan, tehlikeli organik atık akımlarının işlenmesi ve geri dönüşüme kadar genişletilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında tehlikeli organik atıkların üç sınıfı incelemiştir, bu üç sınıf şunlardır: PCB yalıtıcı sıvılar, halojenli petrokimyasal yan ürünler ve distile edilmiş yağ sülfürik asit arıtımı sonucu oluşan kalıntı. Pilot tesis verilerini, hidrojenasyonun ve yeniden kullanımın çevresel ve ekonomik avantajlarının değerlendirilmesi için temel olarak sunmaktadırlar.

Tsai *et al.* (1987) *Escherichia coli*'de rekombinant insan insülini benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gen ifadesi üzerindeki etkilerini incelemek üzere 2 farklı beslenme düzeneği hazırlanmışlardır. İki düzenden birine saatte 5 gram azot eklenirken diğerine saatte 50 gram eklemiştir. Sonuçta saatte 5 gram azot eklemesi yapılan düzende kuru ağırlığa oranla 3 mg IGF-1/g üretimi gerçekleşmişken, saatte 50 gram azot eklemesi yapılan düzende kuru ağırlığına oranla 30 mg IGF-1/g elde etmişlerdir.

Seviour and Kristiansen (1982) yaptıkları çalışmada 6 litrelik bir fermentörde *Aerobasidium pullulans*'ın polisakkarit üretimini incelemiştir. Toplu kültürde, biyokütle değil, polisakkarit üretiminde gecikme yaşandığını ve bu gecikmenin azot konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığını gözlemlemiştir. Polisakkarit üretiminin, sınırlı azot bulunan koşullarda başladığını ve yüksek azot seviyelerinde polisakaritlerin üretiminin önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir.

Asquith ve Garciaa-Dominguez (1968) alkali olarak hidroliz ettikleri yünün incelenmesi sırasında daha önce rapor edilmemiş olan β -aminoalanine aminoasidini keşfetmişlerdir. Ayrıca yünün fraksiyonlanması sırasında 2,4-Diaminobütirik asit oluştuğunu gözlemlemiştir.

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Yararlanılacak alet ve cihazlar

Sanrifüj: Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany

Spektrofotometre: Shimadzu UVmini-1240, Kyoto, Japan

pH metre: WTW unilab pH metre

Hassas terazi: Metler H 51 Gallenkamp

Buzdolabı: Vestel

Karıştırıcı: Vortex-Genie, Model K-55: GE, Sci, IND., Inc.

Manyetik karıştırıcı: Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HS31, Wendower, Buck, UK

Çalkalamalı inkübatör: ZHWY-200B, Zhicheng Analytical Co, Shanghai, China

Öğütücü: Wiley-mill, Arthur, Philadelphia, PA, USA

Blender: Waring products corp. New York City, USA

Otomatik pipetler: Nichipet EX ve Socorex

Otoklav: HVE-50; Hirayama corp., Tokyo, JAPAN

Homejenizatör: Ultra-Turrax T25 basic IKA-Werke, Germany

Kül fırını: Thermolyne 62700; Barnstead/Thermolyne Corp., USA

Fırın: Gallenkamp, Model OV-160, England

Su banyosu: CB2 5Q2, Grant Instruments Ltd., Barrington, Cambridge

3.1.2. Kimyasal maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup, MERCK, OXOID, DIFCO, RIEDEL, SIGMA ve FLUKA firmalarından temin edilmiştir. Mikroorganizmaların gelişimi için ticari besiyeri olarak trypticase soy agar (TSA), trypticase soy broth (TSB), potato dextrose agar (PDA) ve potato dextrose broth (PDB), test peptonları olarak da tryptone pepton (TP) ve fish pepton (FP) kullanılmıştır. 2.5 N L⁻¹ KOH hidroliz işlemi için hazırlanmıştır.

3.1.3. Koyunyünü

Bu çalışmada Erzurum ilinde günlük kullanım için satılan, herhangi bir deterjana maruz bırakılmamış, kuru ve beyaz koyunyünü kullanılmıştır.

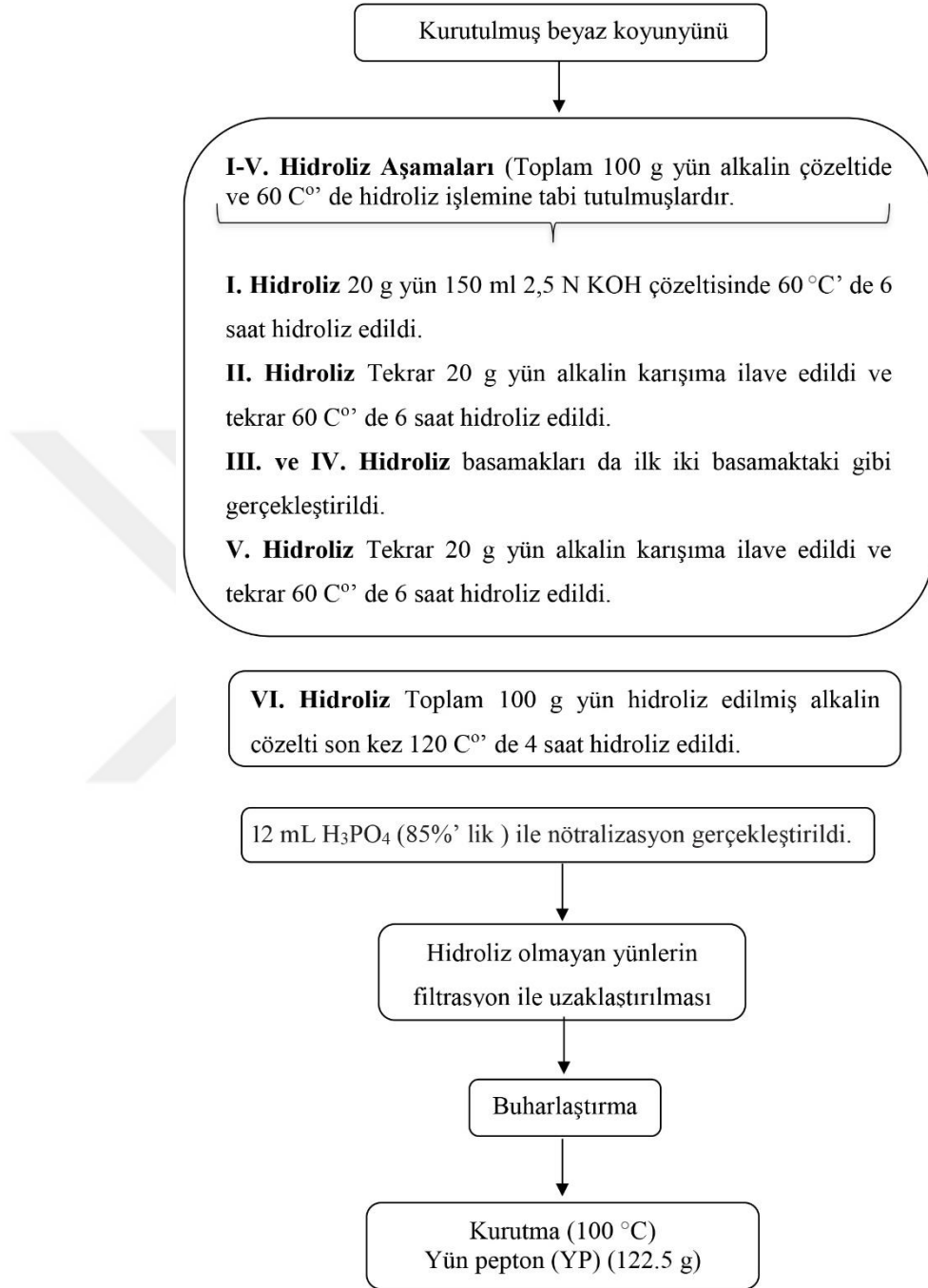
3.1.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Üç bakteri (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*), üç fungus (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* ve *Saccharomyces cerevisiae*) kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Koyunyünü peptonunun üretilmesi

Yün protein hidrolizatı alkalın hidroliz prosesi kullanılarak hazırlandı. Bunun için yünler deiyonize suyla yıkandı ve fırın içinde 100°C’de kurutuldu. Kurutulan yünler küçük küçük parçalandı. 2.5 N L⁻¹ KOH çözeltisinden 150 ml sıcaklığa dirençli bir şişeye alınarak 20 g yün bu çözeltide 60°C’de 6 saat hidroliz edildi. 6 saatin sonunda 20 g daha yün ilave edildi ve aynı sıcaklıkta aynı süre hidrolizin gerçekleşmesi beklendi. Eklenen toplam yün miktarı 100 g olana kadar bu basamaklar tekrar edildi. Son 20 g yün eklendikten sonra yani toplam 100 g yün eklendikten ve her 20 g eklenmesinin ardından 6 saat 60°C’de beklendikten sonra 120°C ve 4 saat süreyle son hidroliz aşaması gerçekleştirildi. Elde edilen alkalın hidrolizat sırasıyla nötralizasyon, filtrasyon, buharlaştırma ve kurutma süreçlerinden geçirildi. Nötralizasyon 12 ml fosforik asit (H₃PO₄ (85%) çözeltisi) alkalın hidrolizata eklenmesi suretiyle gerçekleştirildi. Filtrasyonla ile sıvı kısımdan çözünmemiş tortu malzemeleri uzaklaştırıldı. Sıvı kısım 100 C⁰’de bekletilmek suretiyle buharlaştırıldı. Kalan kısım 122,5 g yün pepton olup yün peptonun hazırlanmasının daha detaylı gösterimi Şekil 3.1’de ifade edildi.



Şekil 3.1. Koyunyünü peptonunun üretim aşamalarının şematik gösterimi



Şekil 3.2. 150 ml KOH ile hazırlanmış yün hidrolizatı



Şekil 3.3. Kurutulmuş ve öğütülmüş toz halinde yün pepton

3.2.2. Yün peptonun (YP) kimyasal bileşiminin belirlenmesi

3.2.2.a. YP'nin toplam şeker miktarının belirlenmesi

YP'nin toplam şeker içeriğini belirlemek için standart olarak glukozun kullanıldığı fenol-sülfürik asit metodu kullanıldı (Dubois *et al.* 1956).

3.2.2.b. YP'nin azot içeriğinin belirlenmesi

Azot içeriği, bir Micro-Kjeldahl cihazı (Labconco Corporation, Kansas City, MO, ABD) kullanılarak ölçüldü ve ham protein, azot içeriğinin 6,25 ile çarpılması sonucu hesaplandı. Aminoasit analizi, bir Varian CP-3800 gaz kromatografisi (Varian Inc., Palo Alto, California, ABD) üzerinde bir EZ: Hızlı aminoasit analiz kiti (Phenomenex Inc., Torrance, California, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.2.c. YP'nin toplam lipid içeriğinin belirlenmesi

Toplam lipid içeriği, çözücü olarak dietil eter kullanılarak bir Soxhlet cihazında Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile hesaplandı.

3.2.2.d. YP'nin kül içeriğinin belirlenmesi

Kül, kuru bir numunenin 550°C'de kül fırınında (Thermolyne 62 700, Barnstead / Thermolyne Corp., Dubuque, IA, ABD) 3 saat süreyle yakılmasıyla tespit edildi.

3.2.2.e. YP'nin makro ve mikro element içeriğinin belirlenmesi

Makro ve mikro element konsantrasyonları bir indüktif çift plazma spektrofotometre cihazı (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP / OES, Shelton, CT 06484-4794, ABD) ile tespit edildi (Mertens 2005).

3.2.3. Test mikroorganizmaları için besiyerlerinin hazırlanması ve biyokütle ölçümü

3.2.3.a. Test mikroorganizmaları için ön kültürün hazırlanması ve peptonlu besiyerine inokulasyon

Test mikrrorganizmalarının ön kültürleri, 250 ml'lik erlenlerde 100 ml mayalar için malt ekstraktı ve bakteriler için nutrient broth hazırlandı. Bu amaçla erlenler çalkalayıcı inkubatörde (ZHWHY 200B, Zhicheng Analytical Co., Shanghai, China) 200 rpm de inkübe edildi. Gelişme periyodunun sonunda (bu süre maya için 48 saat, bakteri için 24 saattir) ön kültürden 1 ml alınıp peptonlu besiyerine inoküle edildi. Filamentli fungus *A. niger* ve *P. chrysogenum* öncelikle 30°C'de yatık patates dekstroza agar (PDA) besiyerinde geliştirildi. 6 günün sonunda 10 ml steril fizyolojik su (%0,9 NaCl) her iki mikroorganizmanın bulunduğu yatık agara eklendi ve şiddetle vorteksenerek sporların fizyolojik suya geçmeleri sağlandı. Böylece fizyolojik suda ki spor konsantrasyonu her 1 ml için yaklaşık 10^6 spordu. Sporlar pipetle homojenize edildikten sonra 1ml alınarak peptonlu besiyerine inoküle edildi (Taşkın *et al.* 2013).

3.2.3.b. Test mikroorganizmaları için peptonlu besiyerinin hazırlanması

Sıvı kültür çalışmaları için 250 ml'lik şişeler içindeki pepton besiyeri (100 ml) yukarıda tarif edildiği gibi test mikroorganizmalarının ön kültürleri ile inoküle edildi. Pepton besiyeri pepton ve glukozdan (20 g L^{-1}) oluşmaktadır. Bu kültür ortamının pH'sı test fungusları için 5,6 iken test bakterileri için 7,2 olarak ayarlandı. İnoküle edilen besiyerleri 200 rpm'de 30°C sıcaklıkta çalkalayıcı inkubatörde inkübe edildi.

3.2.3.c. Biyokütle konsantrasyonunun ölçülmesi

Test mikroorganizmalarının sıvı kültürlerdeki gelişme derecesi biyokütle ağırlığı (g L^{-1}) ile ölçüldü. Bu amaçla gelişme periyodunun sonunda kültür sıvıları $3857 \times \text{g'de}$

10 dakika santrifüjlendi. Bu işlemi takiben elde edilen hücreler steril fizyolojik suyla yıkanıp ardından kuru ağırlığı elde etmek için 100°C’de kurutuldu.

3.2.3.d. İstatistiksel analiz

Amino asit ve elemental analizler haricindeki her deney, iki tekrarlama en az üç kez tekrarlandı (n=6). Tek yönlü varyans analizi, Windows için SPSS 13.0 (IBM SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı ve araçlar 0.05 güven seviyesinde Duncan testi ile karşılaştırıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. YP'nin Hazırlanışı ve Kimyasal Analizi

Hidroliz işlemlerinde her basamakta 20 gr olmak üzere beş basamakta toplam 100 gr koyunyünü kullanılmıştır. Hidroliz işlemi KOH ile, elde edilen hidrolizatın nötrleştirilmesi ise H_3PO_4 ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen final ürününün kimyasal analizi yapıldığında bu ürününün toplam azot ve dolayısıyla da protein içeriğinin son derece yüksek (100 gram peptonda $67,8 \pm 2,18$ gram) olduğu bulunmuştur. Peptonun düşük miktarda da olsa lipit (100 gram peptonda $0,2 \pm 0,06$ gram) içerdiği tespit edilmiştir. Protein içeriğini takiben ikinci en yüksek miktar kül için (100 gram $29,2 \pm 1,32$ gram) belirlenmiştir. Protein, kül ve lipit içeriğinin aksine peptonda şekere rastlanmamıştır (Çizelge 4.1).

Glutamik asit YP bileşiminde en bol bulunan aminoasittir, 100g YP içinde 8175 mg glutamik asit bulunur. İkinci en yüksek miktarda bulunan aminoasit ise 100g YP içinde 7250 mg bulunan serindir. Ayrıca YP'nin içeriğinde kükürt bulunduran bir aminoasit olan sistinden de fazlaca bulunduğu (5042 mg/100g YP) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Elde edilen yün peptonun element analizi yapıldığında ise peptonun başta P (100g peptonda 12859 mg) ve K (100g peptonda 5935 mg) olmak üzere mineral bakımından son derece zengin olduğu belirlenmiştir. P ve K'un ardından üçüncü ve dördüncü derecede en yüksek mineral içerikleri S (100g peptonda 2158 mg) ve Ca (100g peptonda 2014 mg) için ölçülmüştür (Çizelge 4.3).

4.2. Test Mikroorganizmaları İçin Optimum Yün Pepton (YP) Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Peptonun hazırlanmasından sonra belirlenen optimal kültür şartları altında her test

mikroorganizması için YP'nin farklı konsantrasyonları (1,2,3,4,5,6,7,8 g/l) test edilmiştir. Bakteriler için belirlenen 48 saat, küfler içinse 72 saatin sonunda küfler maya ve bakteriler santrifüj edilmiş küfler ise süzölmüştür biyokütle içerikleri bakımından analiz edilmiştir. Biyokütle ölçümleri sonuncunda test küfleri için 5 gr/l, test bakterileri içinse 6 gr/l optimal konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Test bakterileri arasında da en yüksek biyokütle miktarına *E.coli* (2,96 g/l) için ulaşılmıştır. Küflerde ise belirlenen optimal YP konsantrasyonunda maksimum biyokütle miktarı *A. niger* (8,17 g/l) için elde edilmiştir (Şekil 4.2).

4.3. Test Mikroorganizmalarının Gelişme Performansları Üzerinde YP ve Ticari Peptonların Etkileri

YP'nin test mikroorganizmalarının gelişimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için iki ticari pepton (FP; balık peptonu ve TP; tripton pepton) ile karşılaştırıldı. Bunu yapmak için, YP ve diğer ticari peptonların konsantrasyonu test fungusları için 5 g l⁻¹ ve bakteri için 6 g l⁻¹ olarak seçildi. *B. subtilis*'in (3,16 g l⁻¹) ve *S. aureus*'un (3,26 g l⁻¹) maksimum biyokütle konsantrasyonları FP ortamında ulaşmışlardır ancak *E. coli*'nin (3,12 g l⁻¹) maksimum biyokütle konsantrasyonu TP ortamında elde edilmiştir. Test edilen tüm pepton kaynakları arasından, *E. coli*'nin ikinci en yüksek biyokütle konsantrasyonu (2,96 g l⁻¹) YP kullanılan kültür ortamında elde edilmiştir. *Staphylococcus aureus*, YP kültüründe diğer pepton kültürleri ile karşılaştırıldığında çok düşük bir büyüme performansı göstermiştir. Örneğin *S. aureus*'un FP ortamı üzerindeki biyokütle konsantrasyonu 3,26 g l⁻¹ iken, aynı test bakterileri, YP medium'da sadece 1,26 g l⁻¹ hücre biyokütle üretmiştir (Çizelge 4.4). *B. subtilis*, *S. cerevisiae* ve *P. chrysogenum*'un biyokütle konsantrasyonları FP ve TP ortamlarında daha yüksek olmakla birlikte, YP ortamında bu mikroorganizmalar için orta düzeyde büyüme performansları tespit edilmiştir. Eldeki sonuçlar ayrıca, *A. niger*'in diğer iki pepton ortamında iyi bir büyüme sergilediğini ortaya koymuştur; Bununla birlikte, bu filamentli fungi için YP ortamında maksimum biyokütle konsantrasyonuna (8,17 g l⁻¹) ulaşılmıştır.

Çizelge 4.1. Yün peptonun ve diğer standart peptonların kimyasal bileşimleri

Bileşen	YP	FP	TP
Toplam protein	67.8±2.18	72.5	81.8
Toplam şeker	Belirlenmedi	1.3	2.9
Toplam lipit	0.2±0.06	0.5	0.6
Kül	29.2±1.32	6.2	6.5

(TP: tripton pepton, FP: fish pepton, YP için verilen tüm değerler, altı tespitin ortalaması ± standart hatasıdır, n=6)

Çizelge 4.2. Yün peptonun aminoasit içeriği

Aminoasitler	Konsantrasyonları (mg/100g pepton)
Alanin	3325
Arjinin	4312
Aspartik asit	4080
Sistin	5042
Glutamik asit	8175
Glisin	5565
Histidin	1225
İzolösin	1937
Lösin	4937
Lizin	1910
Metiyonin	375
Fenilalanin	2045
Prolin	3687
Serin	7250
Treonin	4125
Trozin	2532
Valin	3437

Deneyler iki kez yapılmış olup sonuçların ortalaması alınmıştır.

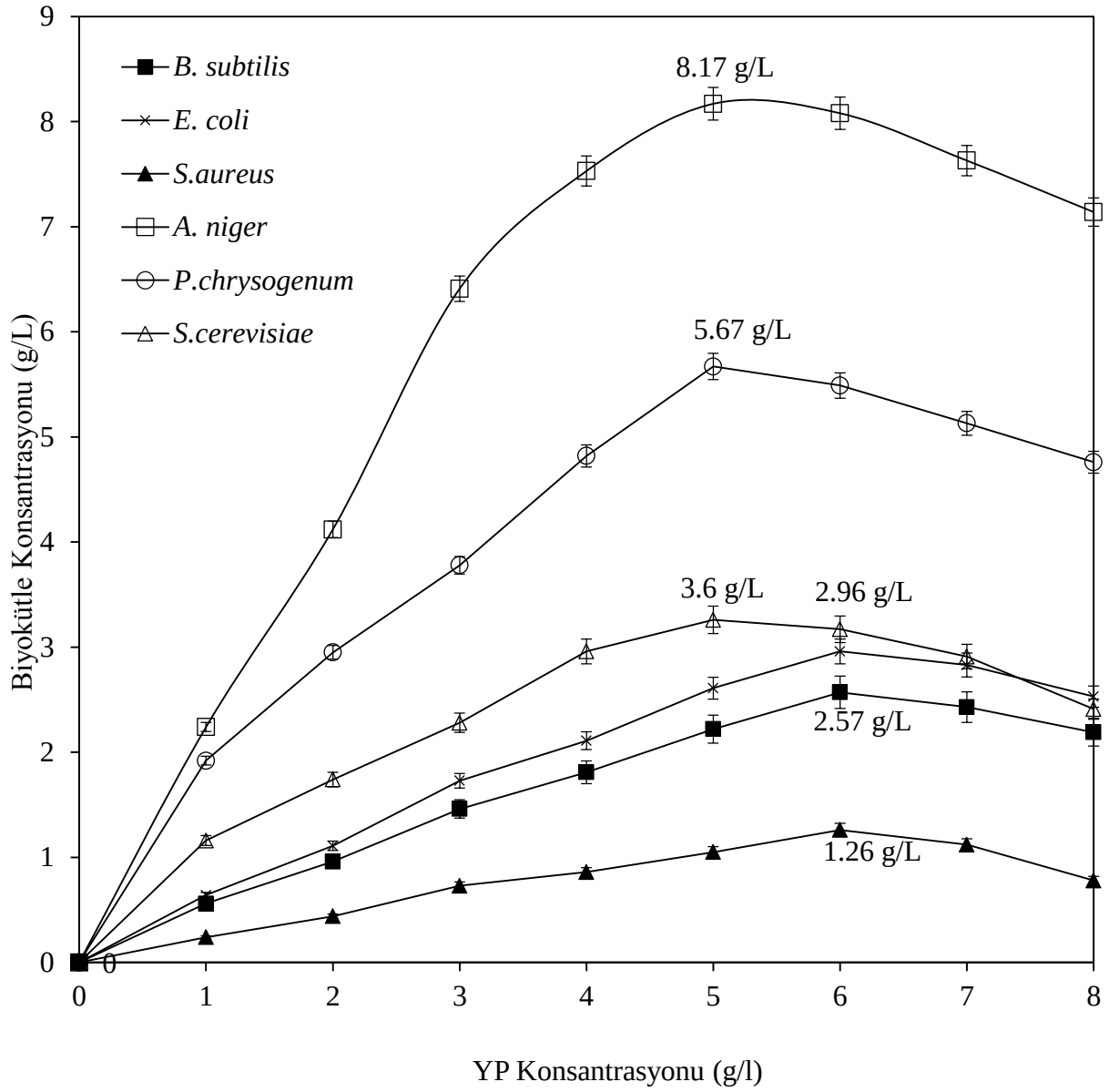
Çizelge 4.3. YP’de ki makro ve mikro elementlerin konsantrasyonları

Elementler	Konsantrasyonları (mg/100g pepton)
K	12859
P	5935
S	2158
Na	1680
Ca	2014
Mg	680
Fe	6,1
Al	5,4
Mn	3,2
Zn	7,6
Cu	2,5

Deneyler iki kez yapılmış olup sonuçların ortalaması alınmıştır

Çizelge 4.4. Test mikroorganizmalarının gelişme performansları üzerinde YP ve standart olarak kullanılan ticari peptonların etkileri (g/l)

Test mikroorganizmaları	YP	FP	TP
<i>B. subtilis</i>	2.57±0.13c	3.16±0.10a	2.92±0.10b
<i>E. coli</i>	2.96±0.10a	2.68±0.12b	3.12±0.11a
<i>S. aureus</i>	1.26±0.25c	3.26±0.20a	2.67±0.15b
<i>S. cerevisiae</i>	3.26±0.06c	5.12±0.17a	4.61±0.09b
<i>A. niger</i>	8.17±0.22a	7.21±0.30b	6.57±0.17c
<i>P. chrysogenum</i>	5.67±0.17c	7.11±0.11a	6.38±0.10b



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda yün peptonun test mikroorganizmalarının hücre büyüme performansı üzerine etkisi

*Kültür koşulları: çalkalama hızı:200 rpm; Sıcaklık: 30 ° C; Test bakterileri için başlangıç pH:7,2 ve test mantarları için 5,6; inkubasyon süresi: sırasıyla test bakterileri, maya ve filamentli funguslar için 24, 48 ve 96 saat.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Keratinli proteinlerden protein hidrolizatı hazırlamak, kimyasal (asidik veya alkalın) ve/veya enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilir (Nustorova *et al.* 2006; Mokrejs *et al.* 2011). Keratinli proteinlerin asit hidrolizi H_2SO_4 ve HCl kullanılarak gerçekleştirilir (Taşkın ve Kurbanoglu 2011). Alkalın hidrolizde en çok $NaOH$, $Ca(OH)_2$ ve KOH kullanılır (Mokrejs *et al.* 2011). Keratinin alkalın hidrolizinde en iyi kimyasalın KOH olduğu rapor edilmiştir (Gousterova *et al.* 2003; Mokrejs *et al.* 2011). Bu nedenden ötürü çalışmamızda koyunyünün hidroliz etmek için KOH seçilmiştir. Diğer yandan çeşitli enzimlerin potasyuma ihtiyaç duyduğu ve potasyumun tüm canlılar için gerekli olduğu için pepton üretiminde tercih edilir olduğunu da göz önünde bulundurduk. Buna karşılık sodyum (Na) bazı canlılar için gerekliyse de hepsi için gerekli değildir (Brock *et al.* 1994) ayrıca koyunyünü yeterince Na içerirken düşük miktarda potasyum (K) içermektedir (Patkowska-Sokola *et al.* 2009). Bu yüzden biz de hidrolizde KOH kullanarak YP'nin potasyum içeriğini artırmayı amaçladık. Benzer şekilde koyun yünü S , Na ve Ca bakımından zengin ancak P bakımından fakir olduğu için elde edilen alkalın hidrolizatın nötralizasyon işlemi H_3PO_4 ile gerçekleştirilerek YP'nin fosfor (P) içeriğinin artmasını sağladık. Birçok kofaktörün ve bazı proteinlerin yanı sıra nükleik asitler, fosfolipidler ve adenosin trifosfatın (ATP) yapısına katıldığından, fosforun tüm canlı organizmalar için gerekli olduğu bildirilmektedir (Prescott *et al.* 2002; Taşkın 2013).

Diğer yandan yapılan güncel çalışmalar YP'nin kül içeriğini azaltmaya yoğunlaşmıştır. Çünkü kül içeriğinin artması proteinler ve karbohidratlar gibi besleyici bileşenlerin oranlarını azaltmaktadır (Taşkın 2013). Kül içeriğini azaltmak için bu çalışmada yapılan deneylerde KOH 'ın hacmi az (150 ml), yün miktarı fazla (100 g) tutulmuştur. Yani hidroliz işlemi için yüksek bir solid (yün)/likit (KOH) oranı tercih edilmiştir. Fakat solid/likit oranının yükselmesi hidrolizin verimini azaltmaktadır. Örneğin, ön hidroliz deneyleri 100 g yünün şişenin içinde çok fazla yer kapladığını ve alkali çözeltinin bu nedenle yün lifleri arasında yaygın olarak yayılmadığını veya verimli bir şekilde ulaşamadığını göstermiştir. Sonuç olarak, 100

g yünün tamamı 150 ml KOH solüsyonunda hidroliz işlemine maruz bırakıldığında yünün önemli bir miktarının parçalanmadığı gözlemlenmiştir. Bu sorunun çözümü için 100 g yün, 150 ml KOH çözeltisine 5 aşamada 20'şer gram olarak ilave edilmiştir. Bu eklenen ilk 20 gram yün tamamen çözüldükten sonra ikinci 20 gram yün eklenir. 20'şer gram eklenerek 5 adımda 100 gram yün çözülmüştür. Bu beş adımdan sonra yün ilavesi yapılmaksızın eklenen 100 g yünün tamamen parçalanması için son hidroliz aşaması (120°C'de 4 saat daha bekletilir) gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda hidroliz işleminde ilave edilen 100 g yünün %91'inin parçalandığı görülmüştür. Bu alkalın karışımına sırasıyla nötralizasyon, filtrasyon, buharlaştırma ve kurutma işlemleri uygulanmıştır. Bu prosedürlerin sonucunda 122,5 g YP üretilmiştir (Şekil 4.1).

Kimyasal analizler, YP' nin mikrobiyal aktiviteler için gerekli olan bazı besleyici maddeleri içerdiğini göstermiştir. Örneğin, YP'nin yüksek protein (w/w, %67,8) ve kül (w/w, %29,2) içeriğine sahip olduğu ölçülmüştür. Diğer standart peptonlarla (fish pepton (FP) ve tripton pepton (TP)) karşılaştırıldığında protein içeriği daha düşük olabilir (Çizelge 4.1). Ancak YP'nin protein içeriği kimyasal metodla üretilen bazı peptonlardan daha yüksektir. Örneğin koçboynuzundan elde edilen bir peptonun protein içeriği sadece 100 g peptonda 50 g iken (Kurbanoğlu ve Kurbanoğlu, 2004), tavuk tüyünden elde edilen bir başka peptonun protein içeriği 100 g peptonda 55,8 g'dir (Taşkın ve Kurbanoğlu 2011). Yeni bir yaklaşımla tavuk tüyünün kimyasal hidrolizi sonucu elde edilen peptonun protein içeriği 100 g peptonda 61,1 grama yükseltilmiştir (Taşkın 2013).

Çizelge 4.l'de sunulan verilere göre, YP'de, FP ve TP'nin aksine şeker tespit edilmemiştir. Bu durumun sebebi yüksek hidroliz sıcaklığı ve/veya yüksek alkalinite sonucu YP içindeki şekerin parçalanması olabilir.

Deneyler YP'nin bileşiminde mikrobiyal gelişim için gerekli olan aminoasitlerin bulunduğunu göstermiştir. YP'nin özellikle glutamik, serin ve glisin gibi aminoasitler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, YP'nin içeriğinde

kükürt bulunduran bir aminoasit olan sistinden de fazlaca bulunduğu (5042 mg/100g YP) belirlenmiştir. Elde edilen mevcut sonuçlar YP'nin aminoasit içeriğinin önceki yün hidrolizi çalışmalarında elde edilen verilere benzerlik taşıdığını göstermektedir (Gousterova *et al.* 2003; Nustorova *et al.* 2006; Wang *et al.* 2015).

Çizelge 4.3'te özetlenen veriler, YP'nin test peptonları arasında en yüksek kül içeriğine sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Kimyasal hidroliz yöntemleri, nihai üründe yüksek kül içeriğine yol açtığından, bu beklenen bir sonuçtur (Taşkın 2013). Külün örneklerdeki mineral elementlerin bir sonucu olduğu ve bu nedenle mikrobiyal aktiviteler için gerekli olan mineral elementlerin ana kaynağı olduğu bilinmektedir (Taşkın ve Kurbanoglu 2011). Örneğin, K ve P'nin yüksek içerikleri test mikroorganizmalarının büyümesi için bir avantaj olabilir, çünkü mikroorganizmaların genellikle yüksek miktarda K ve P'yi gereksindikleri bilinmektedir. Bu elementleri mikroorganizmalara vermek için, yüksek miktarda K_2HPO_4 ve / veya KH_2PO_4 tuzları kültür ortamına eklenmektedir. Kül ayrıca mikrobiyal aktivite için gerekli olan bazı makro elementleri (S, Na, Mg, Ca ve Fe) ve mikro elementleri (Zn, Al, Mn ve Cu) de ihtiva etmektedir. Dolayısıyla, YP'nin yüksek kül içeriğinin bir dezavantajdan ziyade test mikroorganizmaları için bir avantaj olabileceği sonucuna varılabilir.

5.1. Test Bakterilerinin ve Test Küflerinin Maksimum Gelişimi İçin Gerekli Yün Pepton (YP) Konsantrasyonunun Tespit edilmesi

Organik azot kaynakları mikrobiyal araştırmalarda etkin bir şekilde kullanılsa da, aşırı konsantrasyonları, hücre büyümesinde ve / veya mikroorganizmaların ürün veriminde önemli düşüslere neden olabileceği pek çok çalışmada bildirilmiştir (Li *et al.* 2000; Kurbanoglu ve Kurbanoglu 2004; Mierau *et al.* 2005; Taşkın *et al.* 2012; Taşkın 2013). Bu nedenle bu çalışmada öncelikle test mikroorganizmaları için optimum YP konsantrasyonunun belirlenmesine odaklanıldı. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi optimal YP konsantrasyonları test fungusları ve bakterileri için sırasıyla 5 ve 6 gl^{-1} 'dir. Bu sonuçlar, test mantarlarıyla karşılaştırıldığında test bakterilerinin optimal

hücre büyümesi için daha fazla azot kaynağına ihtiyaç duyabileceğini göstermektedir. Bu durum, bakterilerin mantarlardan daha yüksek bir protein içeriğine sahip olması gerçeği ile açıklanabilir (Nasseri *et al.* 2011). Şekil 4.1 ayrıca aşırı konsantrasyonlarda YP'nin tüm test mikroorganizmalarının biyokütle konsantrasyonlarını kademeli olarak düşürdüğünü göstermektedir. Örneğin, test bakterilerinin optimum gelişme konsantrasyonları litrede 6 gram YP iken test küflerinin optimum gelişme konsantrasyonu litrede 5 gram YP olarak ölçülmüştür. Bu konsantrasyonlardan sonra artırılan YP miktarının mikroorganizma gelişimini inhibe ettiği gözlenmiştir.

Literatürde, yüksek Na ve Cl konsantrasyonlarının genellikle mikrobiyal büyümeyi inhibe ettiği veya durdurduğu bildirilmektedir (Wu *et al.* 2014). Bu yüzden, yüksek YP konsantrasyonlarındaki mikrobiyal büyümenin inhibisyonu başlangıçta YP'nin yüksek Na ve/veya Cl içeriğinden dolayı ortaya çıktığı düşünülmüştür. Ancak, mevcut deneyler, YP'nin Na içeriğinin test mikroorganizmalarının büyümesini engelleyecek kadar aşırı olmadığını göstermiştir. Ayrıca, YP'nin Cl içermediği saptanmıştır. Bu nedenle, yüksek kül içeriğinin (özellikle NaCl) mikrobiyal büyümede önleyici etkinin başlıca nedeni olmadığı düşünülmüştür. Engelleyici etkinin en muhtemel nedeni, hidroliz işlemi sırasında yün proteinlerinden, karbonhidratlar ve lipidlerden salınan bazı ürünlerin varlığıydı. Çünkü, önceki çalışmalarda, alkali hidrolizin bazı aminoasitleri parçalayabildiği veya değiştirebildiği bildirilmektedir (Asquith and Garcia-Dominguez 1968; Liardon and Hurrell 1983; Fountoulakis and Lahm 1998). Aynı şekilde, araştırmacılar, güçlü alkalilerin ve/veya yüksek sıcaklıkların, glikoz, maltoz ve sükroz gibi bazı şekerlerden istenmeyen yan ürünler ürettiğini göstermiştir (Yang and Montgomery 1996; Woo *et al.* 2015). Sonuç olarak, bu ürünler, yüksek YP konsantrasyonlarında mikrobiyal büyüme üzerinde bir önleyici etki göstermiş olabilir.

5.2. Test Bakterilerinin ve Test Küflerinin Gelişmeleri Üzerinde YP ve Standart Olarak Kullanılan Ticari Peptonların Etkilerinin Karşılaştırılması

YP'nin test mikroorganizmalarının gelişimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için iki ticari pepton (FP; balık peptonu ve TP; tripton pepton) ile karşılaştırıldı. Bunu yapmak için, YP ve diğer ticari peptonların konsantrasyonu test fungusları için 5 g l^{-1} ve bakteri için 6 g l^{-1} olarak seçildi. Elde edilen sonuçlar, önceki araştırmalarda bildirildiği üzere, her test mikroorganizmasının büyüme performansının bir peptondan diğerine değişebileceğini göstermiştir (Dufosse *et al.* 1997; Taşkın ve Kurbanoglu 2011; Aspino *et al.* 2005). Örneğin, *B. subtilis*'in (3.16 g l^{-1}) ve *S. aureus*'un (3.26 g l^{-1}) maksimum biyokütle konsantrasyonları FP ortamında ulaşmışlardır ancak *E. coli*'nin (3.12 g l^{-1}) maksimum biyokütle konsantrasyonu TP ortamında elde edilmiştir.

Kısacası, mevcut sonuçlar, YP'nin bazı test mikroorganizmaları için, özellikle *A. niger* ve *E. coli* için iyi bir besinsel substrat olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu çok önemlidir, çünkü her iki mikroorganizma da klinik, endüstriyel ve biyoteknolojik amaçlar için caziptir. Örneğin, *E. coli*, genetik kodu tanımlamak ve bakterilerde transkripsiyon, translasyon, kısıtlama ve kopyalama gibi mekanizmaları aydınlatmak için kullanılan birincil model organizma olarak kabul edilir. *Escherichia coli*, rekombinant proteinlerin ve antibiyotiklerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *E. coli*, klinik mikrobiyolojide önemli bir role sahiptir, çünkü insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olur (Jones and Fayerman 1987; Kolisnychenko *et al.* 2002; Huang *et al.* 2002; Taşkın ve Kurbanoglu 2011). Benzer şekilde, *A. niger*'in organik asitler, tek hücreli protein ve enzimler gibi değerli maddeleri ürettiği bildirilmiştir (Zayed and Mostafa 1992; Mertens 2005; Mandal and Banerjee 2005; Kango 2008; Colin *et al.* 2010). Bu nedenle, YP'yi klinik ve / veya biyoteknolojik amaçlı *A. niger* ve *E. coli* kültür ortamlarında bir bileşen olarak kullanmak mümkündür.

Bu çalışma, YP'nin test mikroorganizmalarının büyümesi sırasında organik azot (aminoasitler) kadar makro ve mikro element kaynağı olarak da rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Altı test mikroorganizmasının beş tanesi (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *A. niger* ve *P. chrysogenum*) vitaminler, nükleotidler veya yağ asitleri gibi büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadığı ve bu nedenle de azotlu, fosforlu ve az miktarda metal kaynağı olan, karbon kaynağı ve tuz içeren minimal bir ortamda büyüebildiği rapor edilmiştir (Andrews 1991; Narendranath *et al.* 2001; Walker and White 2005; Ghribi and Ellouze-Chaabouni 2011). Böylece, eğer uygun tuzlar ve glikoz gibi bir enerji kaynağı sağlanırsa, bu mikroorganizmalar büyümeleri ve metabolizmaları için gerekli kendi aminoasitlerini, vitaminlerini, nükleotidlerini ve yağ asitlerini sentezleyebilirler. Dolayısıyla, yukarda isimleri de yazılı olan beş test mikroorganizmasının YP ortamı üzerinde iyi veya orta derecede büyüme performansı gösterdiği, beslenme gereksinimleri basit olduğu ve YP ortamının bu besleyici bileşenleri sağladığı sonucuna varılabilir. Bu bağlamda, çok hassas olmayan mikroorganizmalar büyüebilir ve kendi büyüme faktörlerini mineral tuzlar ve glikoz bulunan ortamda üretebiliyorsa, onların kültür ortamlarına neden pepton koyalım? Her büyüme faktörünün sentezinin çok fazla enerji tüketimi gerektireceği iyi bilinen bir gerçektir. Bu yüzden Pepton ve maya ekstraktı gibi kompleks substratları kullanarak aminoasitleri bu mikroorganizmalara tedarik etmek avantajı sağlamaktadır. Aminoasitler pepton kullanılarak sağlandığından, beş test mikroorganizması daha iyi büyüebilir ve daha fazla biyokütle üretebilir. Dahası, pepton ve maya ekstraktı gibi organik azot kaynaklarının genellikle mikrobiyal büyüme ve / veya ürün sentezi için amonyum sülfat ve amonyum klorür gibi inorganik olanlarla karşılaştırıldığında daha elverişli olduğu bildirilmiştir (Albers *et al.* 1996; Li *et al.* 2000; Costa *et al.* 2002; Hwang *et al.* 2003; Kodam *et al.* 2005; Annuar *et al.* 2008).

Diğer beş test mikroorganizmasının aksine, *S. aureus*'un arginin, sistein, histidin, lösin, metionin ve valin gibi büyüme için bazı özel aminoasitlere ihtiyacı olduğu bildirilmektedir (Stringfellow *et al.* 1991). YP, bu aminoasitleri içerdiğinden *S. aureus* YP ortamı üzerinde bir dereceye kadar büyüebilmektedir. Buna rağmen, bu

bakterinin YP ortamında büyüme potansiyeli, diğer pepton ortamına göre zayıftır. Bu durum YP'de nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve tiamin gibi bazı bileşiklerin yokluğuna veya eksikliğine bağlanabilir. Bu varsayım çok şaşırtıcı olmamalıdır çünkü bu bileşikler *S. aureus*'un maksimum gelişimi için gereklidir (Stringfellow *et al.* 1991; Zhang and Greasham 1999). Sonuç olarak YP *S. aureus* kültür ortamında kullanılıyorsa, bu bileşiklerin bulunduğu maya özütü ile desteklenmesi önerilir.

5.3. Sonuç

Koyunyünü geleneksel olarak tekstil endüstrisinde yünlü ürünlerin üretimi için kullanılmaktadır. Öte yandan, yünün sahip olduğu peptidler ve aminoasitler de dahil olmak üzere yüksek protein içeriğinden ötürü yün hidrolizatları hayvan yemi ve bitki gübresi olarak kullanılır. Bu çalışma, koyunyünün yeni bir uygulama alanı bulabileceğini göstermiştir. Yani, koyunyünü, klinik ve biyoteknolojik araştırmalarda kullanılmak üzere mikrobiyal bir peptona dönüştürülebilmektedir. Buna ek olarak, pepton için yüksek protein içeriği sağlayan yeni bir proses tasarlanmıştır. Yün peptonun, bazı test mikroorganizmaları, özellikle *A. niger* ve *E. coli* için iyi bir büyüme substratı olduğu ispatlanmıştır. Tekstil endüstrisindeki atık yünler yün pepton üretiminde hammadde olarak kullanılabilir. Bu yaklaşım, hem mikrobiyal kültür ortamının maliyetini düşürebilir hem de çevresel sorunların çözümüne yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Akşit F., Akgün Y., Kiraz N. ve Serter N., 1996. Mikrobiyoloji. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 490; Açıköğretim Fakültesi Yayınları No: 219, s.277, Eskişehir.
- Al-Bahri M.B.A.G., Al-Naimi S.A., Ahammed S.H., 2009. The optimum conditions for production of soya peptone by acidic hydrolysis of soya proteins. *Al-Khwarizmi Engineering Journal*, 5, 1-19.
- Albers E., Larsson C., Liden G., Niklasson C. ve Gustafsson L., 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 9, 3187–3195.
- Andrews J.H., 1991. *Comparative Ecology of Microorganisms and Macroorganisms*. Springer-Verlag, New York.
- Angenenta L.T., Karima K., Al-Dahhana M.H., Wrenn B.A. ve Espinosad R.D., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22(9), 477–485.
- Annur M.S.M., Tan I.K.P. ve Ramachandran K.B., 2008. Evaluation of nitrogen sources for growth and production of polyhydroxyalkanoates from palm kernel oil by *Pseudomonas putida*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 16, 11-15 (2008).
- Arad S., Friedman O. ve Rotem A., 1988. Effect of Nitrogen on Polysaccharide Production in a *Porphyridium sp.*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2411-2414.
- Arda M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayıncılık Serisi no 46, s 548, Dışkapı- Ankara
- Aspmo S.I., Horn S.J. ve Eijssink V.G.H., 2005. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochemistry*, 40,3714–3722.
- Asquith R.S. ve Garciaa-Dominguez J.J., 1968. New Amino Acids in Alkali-treated Wool. *Coloration Technology*, 84(3), 155-158.
- Asquith R.S. ve Garcia-Dominguez J.J., 1968. New amino acids in alkali treated wool. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 84, 155–158.
- Auer D.P.F. ve Seviour R.J., Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 637–644.
- Beuchat L.R., Scouten A.J. ve Jablonska J., 2002. Influence of composition of diluent on populations of yeasts and moulds recovered from raw fruits. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 399–402.
- Bilgehan H., 2002. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, (1. Baskı), s 706, Bornova-İzmir.
- Bridson E.Y. ve Brecker A., 1970. Design and formulation of microbial culture media. Academic Press, New York, N.Y., sayfa 230.
- Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M. ve Parker J., 1994. *Biology of Microorganisms*. 7. baskı, sayfa 122. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.

- Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M. ve Parker J., 2010. Mikroorganizmaların Biyolojisi. 11. Baskı, Çeviri Editörü: Cumhur Çökmüş, sayfa 102-105. Palme Yayınevi, Ankara.
- Buswell J.A., Cai Y. ve Chang S.T., 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiology Letters, 128(1), 81 – 87.
- Cengiz A.T., Aydın M., Mısırlıgil A. ve Durmaz B., 2004. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi Ltd. Şti., s 1239, Ankara.
- Cherry J.P., Young C.T. ve Shewfelt A.L., 1975. Characterization of protein isolates from keratinous material of poultry feathers. Journal of Food Science, 40, 331–335.
- Cho, E.J., Oha, J.Y., Chang, H.Y. and Yun, J.W., 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella*
- Colin V.L., Baigori M.D. ve Pera L.M., Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. Journal of Basic Microbiology, 50, 52–58.
- Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P. ve Del Borghi M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Process Intensification, 48(6), 1146–1151.
- Costa E., Teixido N., Usall J., Atares E. ve Vinas I., 2002. The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. Letters in Applied Microbiology, 35, 117–120.
- Cui X.H., Murthy, H.N., Wu, C.H. ve Paek K.Y., 2010. Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 46(5), 437–444.
- Çetin E.T., 1983. Endüstriyel Mikrobiyoloji. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Vakfı-Bayda Yayın No:2, s 410, Çağaloğlu- İstanbul.
- değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Dubois M., Giles U.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. ve Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28, 350–356.
- Dufosse L., De La Broisse D. ve Guerard F., 1997. Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite production. Recent Research Developments in Microbiology 1, 365–381.
- Ellouz Y., Bayoudh A., Kammoun S., Gharsallah N. ve Nasri M., 2001. Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. Bioresource Technology, 80(1), 49-51.
- Erdal S. ve Taskin M., 2010. Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. Romanian Biotechnological Letters, 15, 5342-5350.
- Erzurum.

- Fountoulakis M. ve Lahm H.W., 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826, 109–134.
- fractionation and amino acid composition. *Biochem. J.*, 92, 8–18.
- fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, 127, 129–140.
- Ghorbel S., Souissi N., Triki-Ellouz Y., Dufosse L., Guerard F. ve Nasri M., 2005. Preparation and testing of *Sardinella* protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 33–38.
- Ghribi D. ve Ellouze-Chaabouni S., 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-6.
- Giese H., Sondergaard T.E. ve Sørensen J.L., 2013. The AreA transcription factor in *Fusarium graminearum* regulates the use of some nonpreferred nitrogen sources and secondary metabolite production. *Fungal Biology*, 117(11-12), 814–821.
- Gousterova A., Nustorova M., Goshev I., Christov P., Braikova D., Tishinov K., Haertle T. ve Nedkov P., 2003. Alkaline hydrolysate of waste sheep wool aimed as fertilizer. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 17, 140–145.
- Halkman A.K., 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti, s 358, Ankara.
- Harrap B.S. ve Woods E.F., 1964. Soluble derivatives of feather keratin. Isolation, Hasenekoğlu İ., 2002. Mikrobiyoloji, Erzurum.
- Huang Y.S., Wang S.M., Liu C.C. ve Yang Y.J., 2002. Invasive *Escherichia coli* infection in infancy: clinical manifestation, outcome, and antimicrobial susceptibility. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 35, 103–108.
- Hwang H.J., Kim S.W., Choi J.W. ve Yun J.W., 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 309–319.
- Jones M.D. ve Fayerman J.T., 1987. Industrial applications of recombinant DNA technology. *Journal of Chemical Education*, 64, 337–339.
- Kalnes T.N. ve James R.B., 1988. Hydrogenation and recycle of organic waste streams. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 7(3), 185–191.
- Kango N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *Journal of Food Engineering*, 85, 473–478.
- Kodam K.M., Soojhawon I., Lokhande P.D. ve Gawai K.R., 2005. Microbial decolorization of reactive azo dyes under aerobic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 367–370.
- Kolisnychenko V., Plunkett G., Herring C.D., Feher T., Posfai J., Blattner F.R. ve Posfai G., 2002. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Research*, 12, 640–647.
- Korniłowicz-Kowalska T. ve Bohacz J., 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*, 31, 1689–1701.

- Kunamneni A., Permaul K. ve Singh S., 2005. Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 168-171.
- Kurbanoglu, E. B ve Kurbanoglu N. I., 2002. A new process for utilization as of ram horn waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94,202-206.
- Kurbanoğlu E.B. ve Kurbanoğlu N.I., 2004. Ram horn peptone as a source of citric acid production by *Aspergillus niger*, with a process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 289–294.
- Kurbanoğlu, E. B. , 1999. Boynuz hidrolizatının bakteriler için besiyeri olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Laskri N., Hamdaoui O. ve Nedjah N, 2015. Anaerobic Digestion of Waste Organic Matter and Biogas Production. *Journal of Clean Energy Technologies*, 3(3), 181-184.
- Latshaw J.D., Musharaf N. ve Retrum R., 1994. Processing of feather meal to maximize its nutritional value for poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 47, 179-188.
- Li Y., Chen J., Liang D.F. ve Lun S.Y., 2000. Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *Journal of Biotechnology*, 81, 27–34.
- Liardon R. ve Hurrell R.F., 1983. Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 432–437.
- López J.L.C., Pérez J.A.S., Sevilla J.M.F., Fernández F.G.A., Grima E.M. ve Chisti Y., 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(2-3), 270–277.
- Luong V.B. ve Payne C.G., 1977. Hydrolysed feather protein as a source of amino
- Maciel J.L., Werlang P.O., Daroit D.J. ve Brandelli A., 2016. Characterization of Protein-Rich Hydrolysates Produced Through Microbial Conversion of Waste Feathers. *Waste and Biomass Valorization*, 1-10.
- Mandal S.K. ve Banerjee P.C., 2005. Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 40, 1605–1610.
- Manginot C., Sablayrolles J.M., Roustan J.L. ve Barre P., 1997. Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(5), 373-380.
- Mao X.B., Eksriwong T., Chauvatcharin S. ve Zhong J.J., 2005. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1667–1672.
- Martone C.B., Borla O.P. ve Sanchez J.J., 2005. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology*, 96, 383–387.

- Mc Feters G.A., Cameron S.C. ve Lechevailer M.V., 1982. Influence of Diluents, Media and Membrane Filters on Detection of injured Waterborne Coliform Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 97-103.
- Mertens D., 2005. AOAC Official Method 922.02. Plants Preparation of Laboratory Sample. *Official Methods of Analysis*, Chapter 3, 18th edn, pp1-2. ed. Horwitz, W. and Latimer, G.W. Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, MD 20877-2417, USA: AOAC-International.
- Mertens D., 2005. AOAC Official Method 975.03. Metal in Plants and Pet Foods. *Official Methods of Analysis*, Chapter 3, 18th edn. ed. Horwitz, W. and Latimer, G.W. pp. 3–4. Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, MD 20877-2417, USA: AOAC-International.
- Mian M.A., Fleet G.H. ve Hocking A.D., 1997. Effect of diluent type on viability of yeasts enumerated from foods or pure culture. *Contributions to Methods in Food Mycology*, 35, 103-107.
- Mierau I., Olieman K., Mond J. ve Smid E.Y., 2005. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microbial Cell Factories*, 4, 1-16.
- Mokrejs P., Krejci O. ve Svoboda P., 2011. Producing Keratin Hydrolysates from Sheep Wool. *Oriental Journal of Chemistry*, 27, 1303-1309.
- Mokrejs P., Svoboda P., Hrnčirik J., Janacova D. ve Vasek V., 2011. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Management & Research*, 29, 260–267.
- Nasseri A.T., Rasoul-Amini S., Morowwat M.H. ve Ghasemi Y., 2011. Single cell protein: Production and process. *American Journal of Food Technology*, 6, 103-116.
- Nustorova M., Braikova D., Gousterova A., Vasileva-Tonkova E. ve Nedkov P., 2006. Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep's wool waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 383–390.
- Papadopoulos M.C., El Boushy A.R. ve Roodbeen A.E., 1985. The effect of varying autoclaving conditions and added sodium hydroxide on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 36, 1219–1226.
- Parrado J., Millan F., Pinzon H.I., Bautista J. and Machado A., 1993. Sunflower peptones use as nitrogen source for the formulation of fermentation media. *Process Biochemistry*, 28 (2), 109-113.
- Patkowska-Sokola B., Dobrzanski Z., Osman K., Bodkowski R. ve Zygodlik K., 2009. The content of chosen chemical elements in wool of sheep of different origins and breeds. *Archives Animal Breeding / Archiv Tierzucht*, 52, 410-418.
- Pedersen H. ve Nielsen J., 2000. The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(3), 278–281.
- Poernomo A. ve Buckle K.A., 2002. Crude peptones from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 333–340.

- Prescott L.M., Harley J.P. ve Klein D.A., 2002. Microbiology. 5. Baskı, sayfa 96-98. McGraw-Hill, New York, NY.
- Rale B.R., 1984. SCP from pineapple (*Ananas sativa* schut.). Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 301-303.
- Rippon J.A., 1992. The structure of wool. In Wool Dyeing; Lewis, D.M., Ed.; Society of Dyers and Colourists: Bradford, UK.
- Rozman D., Pertot E., Beli I. ve Komel R., 2005. Soybean peptones as nutrients in the fermentative production of eline ergot alkaloids with *Claviceps fusiformis*. Biotechnology Letters, 7, 563-566.
- Sert S., 1988. Genel Mikrobiyoloji Ders Notları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü, s. 107, Erzurum.
- Seviour R. J. ve Kristiansen B., 1982. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. European journal of applied microbiology and biotechnology, 17(3), 178–181.
- Six, W. and de Baere, L., 1992. Dry anaerobic conversion of municipal solid waste by means of the DRANCO process. Water Science & Technology, 25(7), 295–300.
- Stringfellow W.T., Dassy B., Lieb M. and Fournier J.M., 1991. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. Applied and Environmental Microbiology, 57, 618–621.
- Taşkın M. ve Kurbanoglu E.B., 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. Journal of Applied Microbiology, 111, 826-834.
- Taşkın M., 2011. Tavuk Tüyü Atığından Elde Edilen Peptonun Mikroorganizmaların Üretiminde Kullanımı. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taşkın M., 2013. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine- and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93, 535-541.
- Taşkın M., Özkan B., Atıcı O. ve Aydoğan M.N., 2012. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*. International Journal of Food Science and Nutrition, 20, 597-602.
- Taşkın M., Taşar G.E. ve İncekara Ü., 2013. Citric acid production from *Aspergillus niger* MT-4 using hydrolysate extract of the insect *Locusta migratoria*. Toxicology and Industrial Health, 29, 426-434.
- Taşkın M., Ünver Y., Fırat A., Örtücü S. ve Yıldız M., 2016. Sheep wool protein hydrolysate: a new peptone source for microorganisms. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 91, 1675–1680.
- Tsai, L.B., Mann, M., Morris, F., Rotgers C. ve Fenton D., 1987. The effect of organic nitrogen and glucose on the production of recombinant human insulin-like growth factor in high cell density *Escherichia coli* fermentations. Journal of Industrial Microbiology, 2(3), 181–186.
- Uzeh R.E., Akinola S.O., ve Olatope S.O. A., 2006. Production of peptone from soya beans (*Glycine max* L merr) and African locust beans (*Parkia biglobosa*). African Journal of Biotechnology, 5 (18), 1684-1686.

- Vazquez J.A. ve Murado M.A., 2008. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 66-72.
- Villa A.L.V, Aragão M.R.S, dos Santos E.P., Mazotto A.M., Zingali R.B., de Souza E.P. ve Vermelho A.B., 2013. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnology*, 1, 13-15.
- Walker G.M. ve White N.A., 2005. Introduction to fungal physiology. *Fungi: Biology and applications*, sayfa 1–34, West Sussex, England: Wiley.
- Wang K., Li R., Ma J.H., Jian Y.K. ve Che J.N., 2015. Extracting keratin from wool by using L-cysteine. *Green Chemistry*, 18, 476-481.
- Woo K.S., Kim H.Y., Hwang I.G., Lee S.H. ve Jeong H.S., 2015. Characteristics of the Thermal Degradation of Glucose and Maltose Solutions. *Preventive Nutrition and Food Science* 20, 102-109.
- Wu X., Altman R., Eiteman M.A. ve Altman E., 2014. Adaptation of *Escherichia coli* to Elevated Sodium Concentrations Increases Cation Tolerance and Enables Greater Lactic Acid Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2880–2888.
- Yang B.Y. ve Montgomery R., 1996. Alkaline degradation of glucose: Effect of initial concentration of reactants. *Carbohydrate Research*, 280, 27–45.
- Yuan X., Liu J., Zeng G., Shi J., Tong J. ve Huang G., Optimization of conversion of waste rapeseed oil with high FFA to biodiesel using response surface methodology. *Renewable Energy*, 33(7), 1678–1684.
- Zayed G. ve Mostafa N., 1992. Studies on the production and kinetic aspects of single cell protein from sugarcane bagasse saccharified with *Aspergillus niger*. *Biomass & Bioenergy*, 3, 363-367.
- Zhang J., Greasham R., 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 407-421.
- Zong J.J. ve Wang S.J., 1998. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process Biochemistry*, 33(6), 671-675.

ÖZGEÇMİŞ

Liseyi 2009 yılında Erzincan’da Özel Otlukbeli Hacı Ali Akın Lisesinde bitirdi. 2010 yılında başladığı Lisans eğitimini Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde tamamladı ve 06.20.2014 tarihinde mezun olup, aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim dalında tezli yüksek lisans eğitimine başladı.

