



**MEYVE POSALARININ
BİYOENERJİ KAYNAĞI OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra AYDIN

Danışman

Doç. Dr. Ferruh AŞÇI

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

Kasım 2016

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEYVE POSALARININ BİYOENERJİ KAYNAĞI OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİ

Büşra AYDIN

Danışman

Doç. Dr. Ferruh AŞÇI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Kasım 2016

TEZ ONAY SAYFASI

Büşra AYDIN tarafından hazırlanan “Meyve Posalarının Biyoenerji Kaynağı Olarak Kullanılabilirliği” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 09/11/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ferruh AŞÇI

Başkan : Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN
Uşak Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksek Okulu

Üye : Doç. Dr. Ferruh AŞÇI
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Gülderen Uysal AKKUŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

16/11/2016

Büşra AYDIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEYVE POSALARININ BİYOENERJİ KAYNAĞI OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİ

Büşra AYDIN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ferruh AŞÇI

Bu araştırmada Biyodizelin üretim maliyetinin düşürülmesi adına son yıllarda dünyada pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaları mikrobiyal hücrelerde biriktirilen yağların biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımları ve kimyasal katalizörlerin yerine mikrobiyal lipazların kullanımları olmak üzere iki önemli başlık altında toplamak mümkündür.

Bu amaçla, gerçekleştirilen bu projede meyve posalarından izole edilen fungusların lipit birikimleri belirlenerek. Hücrelerden elde edilen lipitler alkali bir katalizörle transesterifikasyon reaksiyonuna uğratıldıktan sonra oluşan yağ asidi metil esterleri (biyodizel) Gaz Kromatografi cihazında belirlenmiştir.

2016, ix + 46 sayfa

Anahtar Kelimeler: Meyve posası, Biyodizel, Transesterifikasyon.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

USABILITY OF FRUIT PULPS AS A SOURCE OF BIOENERGY

Büşra AYDIN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Ferruh AŞÇI

There are a lot of studies to reduce the costs of biodiesel in the world. Some of the studies are about using microbial lipids as a raw materials for biodiesel production. The rest of the studies are about microbial lipase usage as a catalyst.

The goal of the project is to determine the fungal lipids which can isolated from Fungal lipid extraction from fruit pulp. Fungal biomass was achieved and the extracted lipids were used in biodiesel production. The obtained lipid was transesterified by a base catalyst. The methyl esters were analyzed by using gas chromatography.

2016, ix + 46 pages

Keywords: Fruit pulp, Biodiesel, Transesterification.

TEŞEKKÜR

Tezim boyunca bana hertürlü desteği gösteren, iyi niyet ve sabırla beni bu çalışmaya teşvik eden değerli hocam sayın Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN ve tez danışmanım Doç. Dr. Ferruh AŞCI'ya teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım boyunca fikir ve önerileri ile yardımcı olan ve laboratuvar çalışmalarında her türlü kolaylığı gösteren değerli hocalarım Sayın Yrd Doç. Dr. Feyza ERDOĞMUŞ, Doç. Dr. Gülderen UYSAL AKKUŞ ve Sayın Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteklerini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca hep yanımda olan bana her zamanınanan, güvenen, destek olan, varlığı ile daima güç veren eşim Uğur AYDIN ve aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Büşra AYDIN

AFYONKARAHİSAR, 2016

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Mikrobiyel Yağların Biyodizel Üretiminde Kullanımı.....	4
2.2. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	4
2.2.1 Bakteriler	6
2.2.2 Mikroalgler	6
2.2.3 Funguslar	7
2.3 Fungal Lipid Üretimi.....	12
2.4 Meyve ve Sebze İşleme Tesislerinden Çıkan Katı Artıklar.....	14
2.5 Türkiye'nin Meyve Suyu Sanayisi Atık Durumu ve Atık Potansiyeli.....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerler	17
3.1.2 Ayıraçlar	18
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 Çalışmada Kullanılacak Fungusların İzolasyonu	19
3.2.2 Saf Fungal Kültürlerin Tanımlamaları	19
3.2.3 Yüksek Kapasite ile Lipid Üreten Mikroorganizma Seçimi	22
3.2.4 İzolatların Gelişimine Sıcaklığın, Karbon ve Azot Kaynağının Etkisi	26
3.2.5 Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografi Cihazında Analizi	27
4. BULGULAR.....	28
4.1 Çalışmada Kullanılacak Fungusların İzolasyonu.....	28

4.2 Çalışmada Kullanılacak Fungusların Farklı Karbon Kaynakları ve Azot Kaynağı Olarak Amonyum Nitrat Kullanıldığındaki Gelişimleri.....	28
4.3 Saf Fungal kültürlerin tanımlamaları.....	30
4.3.1 PCR Amplifikasyon.....	30
4.4 Yüksek Kapasite ile Lipid Üreten Mikroorganizma Seçimi.....	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	46



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μL	Mikro litre
μm	Mikro metre
M	Molar
N	Normal
Ave β	alfa ve beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
KH_2PO_4	Potasyum di hidrojen fosfat
NaNO_3	Sodyum Nitrat
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum sülfat hepta hidrat
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Demir sülfat hepta hidrat

Kısaltmalar

PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimeraz Chain Reaction)
DNA	Deoksiribo nükleik asit
TAG	Triasilgliserol
P1	Portakal 1
P2	Portakal 2
E1	Elma 1
E2	Elma 2
E3	Elma 3
ÇE	Çilek
EPA	Eikosapentaenoik asit
DHA	Dokosaheksaenoik asit
pH	Hidrojenin gücü (Power of Hydrogen)
AMP	Adenosine monofosfat
ATP	Adenosine Trifosfat
CoA	Asetil koenzim A.
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1	Triaçil gliserol sentezi.....	8
Şekil 2.2	Yağlı mikroorganizmalarda lipid akümülayon koşulları.....	12
Şekil 3.1	Transesterifikasyon reaksiyon ve biyodizel üretim denklemleri.....	26
Şekil 4.1	Filogenetik ağaç.....	32
Şekil 4.2	Total yağ içeriğinin hesaplanmasında kullanılmak üzere çıkartılan standart eğri.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Bazı mikroorganizmaların yağ içerikleri.....	5
Çizelge 2.2 Mikro organizmaların biyodizel üretiminde birinci derecede önemli olan yağ asit kompozisyonları.....	5
Çizelge 2.3 Bazı meyve ve sebzelerden çıkan katı atık oranları.....	14
Çizelge 3.1 PCR reaksiyonu için ortam.....	20
Çizelge 3.2 Fungal izolatlardan hücrelerinden elde edilen lipitin transesterifikasyonu sonucu oluşan metil esterleri.....	27
Çizelge 4.1 Meyve posalarından izole edilen funguslar.....	28
Çizelge 4.2 İzolatların farklı karbon kaynakları ve azot kaynağı olarak amonyum nitrat kullanıldığındaki gelişimleri.....	29
Çizelge 4.3 Moleküler yöntemle identifikasyon sonuçları.....	31
Çizelge 4.4 Fungal izolatların içerdiği total yağ oranı verilmiştir.....	34

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1 Çalkalamalı etüvde üretilen fungal miseller.....	22
Resim 3.2 Fosfovanilin ayırıcı ilave edilmiş tüpler.....	23
Resim 3.3 530 nm’de absorbans artışı.....	24
Resim 3.4 Toz haline getirilmiş fungal miseller.....	25
Resim 4.1 Meyve posalarından izole edilen funguslar.....	28
Resim 4.2 İzolatların ITS bölgesi amplifikasyonuna ait jel görüntüsü.....	30

1. GİRİŞ

Enerji üretiminde kullanılan kaynaklar enerji kaynakları olarak adlandırılır. En yaygın kullanılan enerji kaynakları; fosil kökenli, klasik yenilenemeyen enerji kaynakları ve yenilenebilir alternatif temiz enerji kaynakları şeklinde sınıflandırılır. Petrol, kömür, doğal gaz gibi fosil kökenli kaynaklar dünya üzerinde sınırlı rezervlere sahiptirler. Güneş, rüzgar, hidro, jeotermal, biyokütle ve deniz kökenli yenilenebilir enerji kaynakları ise; klasik enerji kaynaklarına alternatif olup çevreye zarar vermeyen, doğada kendisini tekrar yenileyebilen ve giderek üretimi yaygınlaşan enerji türleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Petrolün her geçen gün azalması ve çevre bilincinin artması sonucunda yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Yeşil dizel ve dizel-bi adları ile de bilinen Biyodizel biyolojik kaynaklı yağlardan yenilenebilir kaynaklardan üretilen alternatif bir yakıttır. Avrupa Birliğinin 2003/30/EC Direktifi ile 2005 sonunda piyasaya arz edilen fosil yakıtlarına %2 oranında biyoyakıt eklenmesi zorunluluğu getirilmiştir.

Biyodizel (fatty acid methyl- yada ethyl-esters) bitkisel veya hayvansal yağların uzun zincirli yağ asitlerinin metil esterlerinden oluşturulan yakıt türü olup Knothe (2010)'e göre petrol dizellerle karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir. Biyolojik olarak parçalanabilir, zehirsizdir ve düşük emisyon profiline sahiptir. Ayrıca biyodizel kullanımı ekolojik açıdan önemli olup; tarım, ekonomik gelişme ve çevre arasında dengenin kurulmasını sağlamaktadır (Meher *et al.* 2006). Bitkisel yağların yakıt olarak ilk defa kullanımı Rudolf Diesel tarafından yer fıstığı yağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Panwar *et al.* 2010). Literatürde hayvansal yağların biyodizel üretiminde kullanımları ile ilgili yapılan çalışmaların başında kuyruk yağı ve tavuk artıklarından kalan yağların kullanımı gelmektedir (Bhatti *et al.* 2008). Günümüzde çalışmalar daha ziyade biyodizel üretiminde kızartma yağları gibi atık yağların kullanımı üzerinedir (Chung *et al.* 2009).

Mikrobiyel kaynaklı yağların (tek hücre yağları) birçok mikroorganizma tarafından üretildiği bilinmektedir. Bu yağlar biyodizel üretiminde hammadde olarak oldukça yüksek bir potansiyele sahiptir. Çünkü mikroorganizmalar değişen mevsim ve iklim

şartlarından etkilenmezler, hücrelerinde yüksek miktarda lipid içeriğine sahiptirler ve çok kısa sürede çok miktarda üretilmektedirler (Xue *et al.* 2006). 1980’li yıllardan bu yana funguslar ilgi çeken yağlı mikroorganizmalar olmuştur. *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Mucor* ve *Aspergillus* gibi mikroorganizmaların yüksek miktarda yağ içerdiği ve *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus albidun*, *Lipomyces lipofer*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* ve *Trichosporon pullulans*’ın benzer kültür koşullarında lipidleri akümüle edebildiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra *Aspergillus terreus*, *Claviceps purpurea*, *Tolyposporium*, *Mortierella alpina*, *Mortierella isabellina* gibi birçok maya türünde lipidleri akümüle edebilmektedir. Yağlı mayalar ve küfler çoklu doymamış yağ asitlerince zengin triaçilgliserol (TAG) biriktirmektedirler. Bu hücrelerde en fazla rastlanan yağ asitleri şunlardır C18:1, C18:2, C16:0, C16:1 gelmektedir. Bazı funguslar DHA, GLA, EPA ve ARA gibi özel lipidleride üretebilirler.

Funguslar biyodizel üretiminde bazı avantajlara sahiptir (Meng *et al.* 2009).

- a) Kısa yaşam döngüleri ile hızlı büyüyebilmeleri,
- b) Gelişimleri için ışığa ihtiyaç duymamaları,
- c) Oldukça fazla substratı karbon kaynağı olarak kullanabilmeleri,
- d) Tarım atıklarını gibi endüstriyel atıkları kullanabilmeleri,
- e) Gelişimlerinin mevsimsel periyotlardan bağımsız olması,

f) Gliserol, kanalizasyon, su, peynir altı suyu, pekmez ve mısır koçanı gibi birçok substratda gelişerek TAG biriktirmeleri Bu nedenlerle son yıllarda fungal lipidlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar araştırmacıların ilgisini çekmektedir

Kimyasal bileşimi bakımından oldukça zengin olan meyve posalarının hayvan beslenmesinde kullanılanlar hariç önemli bir kısmı, kurutma ve depolama maliyeti yüksek olduğundan atık olmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar meyve suyu atıklarından etanol üretimi üzerine olup substrat olarak bu atıkların kullanıldığı ve biyodizel üretiminin gerçekleştirildiğı çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada elma, çilek ve portakal posalarından izole edilen fungusların, ribozomal transkripsiyonu yapılmayan bölgelerin (ITS bölgesi) dizi analizi ile identifiye edilmesi, izolatların lipid üretimi spektrofotometrik olarak belirlenmesi ve elde edilen Mikrobiyellipidlerin transesterifikasyonu sonucu oluşan fungal yağ asidi metil esterlerinin Gaz Kromatografi cihazında belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Mikrobiyel Yağların Biyodizel Üretiminde Kullanımı

Biyodizel üretiminde kullanılan hammaddenin pahalı olması ve hammadde maliyetinin toplam üretim maliyetinin %70–75’ini oluşturması sebebiyle biyodizel kullanımı fosil yakıt kullanımına göre ekonomik değildir. Bu nedenle biyodizel günümüzde sıklıkla kullanılan bir yakıt olmayıp daha ucuz hammadde sağlanması ile maliyetin düşürülmesi gereklidir Bitkisel kaynaklı biyodizel kullanımı. Dünyada hızla artan insan nüfusu ile besin kaynaklarına olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Bu sorun bitkisel yağ fiyatlarındada artışa neden olmaktadır. Bu noktadan yola çıkılarak mikrobiyel lipidlerden üretilen biyodizelin diğer enerji formlarına alternatif bir enerji kaynağı olarak ön plana çıkması kaçınılmazdır (Ma and Hanna 1999).

2.2 Biyodizel Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Hücrelerindeki lipid içerikleri %20’yi geçen mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu tip mikroorganizmalar Oleaginous mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır. Mikrobiyal lipidler kullanılarak Biyodizel üretimi tüm dünyada Tek Hücre Yağı (SCO) olarak adlandırılmaktadır. Bazı mikroorganizmaların yağ içerikleri Çizelge 2.1’de; mikroorganizmaların biyodizel üretiminde birinci derece önemli olan yağ asit kompozisyonları ise Çizelge 2.2’de görülmektedir.

Tek hücre yağı ilk ticari üretimi 1995 yılına kadar başlayamamıştır ve maliyeti fazla olduğu için 6 yıl önce bu üretim durdurulmuştur. Günümüzde birçok maya ve mikroalg türü bitkisel yağlara benzer nitelikte lipid üretebilmektedir. Ürettikleri bu lipidin miktarı ve içeriği sıcaklık, pH, inkübasyon süresi gibi geliştirildikleri ortam şartlarına göre değişmektedir (Meng *et al.* 2009).

Son yıllarda literatürde yapılan çalışmalarda fungus ve mikroalglerin biyodizel üretiminde yağ kaynağı olarak kullanımının avantajları önemle vurgulanmaktadır. Şüphesiz bu avantajların en başında kolay üretilibilmeleri, üretimleri sırasında çok

işleme gerek duyulmaması, besi yerlerinin ucuz olması ve insan tüketimi için uygun olmayan sularda (atıksular gibi) geliştirilebilmeleri gelmektedir (Mata *et al.* 2010).

Çizelge 2.1 Bazı mikroorganizmaların yağ içerikleri (Meng *et al.* 2009).

Mikroorganizma	Mikroorganizma türü	Yağ içeriği (% dry wt)
Mikroalgler	<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
	<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
Bakteriler	<i>Nitzschia sp.</i>	45–47
	<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
	<i>Arthrobacter sp</i>	>40
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38
Mayalar	<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24
	<i>Candida curvata</i>	58
	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
Funguslar	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
	<i>Mortierella isabellina</i>	86
	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Çizelge 2.2 Mikroorganizmaların biyodizel üretiminde birinci derecede önemli olan yağ asit kompozisyonları (Xue *et al.* 2006).

Yağ Asitleri						
	16:0 Palmitik asit	16:1 Palmiteloik Asit	18:0 Stearik asit	18:1 Oleik asit	18:2 Linoleik asit	18:3 Linolenik Asit
Mikroalg	18 – 21	55 – 57	1 – 2	58 – 60	4 – 20	14 – 30
Maya	11 – 37	1 – 6	1 – 10	28 – 66	3 – 24	1 – 3
Mantar	7 – 23	1 – 6	2 – 6	19 – 81	8 – 40	4 – 42
Bakteri	8 – 10	10 – 11	11 – 12 -	25 – 28	14 – 17	-

2.2.1 Bakteriler

Bakteriler genellikle triaçilgliserol üretmezler bunun yerine polibeta hidroksi bütirat ve alkanoat depo ederler. Bu yüzden yağ biriktirme özelliği sadece bazı maya, fungus ve alglerde görülmektedir (Ratledge *et al.* 2004). Actinomycetes grubu üyelerinin kısıtlı büyüme koşulları altında yüksek lipid verimliliği gösterdiği (% 70) ve TAG'leri hücrede biriktirdiği bildirilmiştir (Chisti *et al.* 2007). Bunun yanı sıra bir kaç bakteri kompleks bir lipid olan polihidroksi alkanoatları akümüle edebilir (Steinbu and Fu 1998). Her ne kadar mikroalgler hücrelerinde yüksek miktarda lipid biriktirebilse de, geliştirilmeleri bakterilere göre daha uzun zaman almakta ve büyük arazilere ihtiyaç duyulmaktadır. Genellikle bütün bakterilerin lipid içeriklerinin ortalama %20-40 olması nedeniyle mikroalglerden düşük olduğu bilinse de çok kısa sürede gelişebilmeleri bu mikroorganizmaları biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilirliğini akla getirmektedir. Fakat birçok bakteri genellikle lipid üreticisi değildir. Sadece birkaç bakteri türü hücrelerinde karışık lipoid yapılar (polihidroksialkanoat) biriktirebilmektedir. Bu yapılarda dış zarda olduğu için ekstrakte edilmeleri çok zordur. Bu sebeple yüksek lipid içeriğine sahip bakterilerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımının hiçbir ticari önemi yoktur (Meng *et al.* 2009).

2.2.2 Mikroalgler

Mikroalgler metan üretimi için parçalanabilir, fotosentetik olarak hidrojen üretebilirler veya bazı algler sıvı yakıt üretiminde yağ kaynağı olarak kullanılabilirler. Bu nedenle son yıllarda mikroalglerin enerji kaynağı olarak kullanımı revaçtadır. Mikroalglerin avantajları; fotosentetik olarak gelişebildikleri için karbon kaynağına ihtiyaç duymamaları ve daha önceki tüketimlerin ürünü olan karbondioksiti enerji kaynağı olarak kullanıp karbondioksit nötralizasyonunu sağlamalarıdır (Sawayama 1995, Hirano 1998, Lorenz and Cysewski 2000, Scragg *et al.* 2003)

Mata vd. (2010) mikroalglerin, tarımsal ürünlerle ve diğer sucul bitkilerle karşılaştırıldığında gelişme hızları çok büyük olduğunu bildirmişlerdir. Mikroalglerin biriktirdikleri lipidler genellikle (>%80) triaçilgliserol formunda olup 16 ve 18 numaralı

karbon atomlarınca zengin yağ asitleri içermektedir. Alg hücrelerinin ortalama lipid içeriği %1 ile %70 oranında değişse de, optimum koşullar sağlandığında %90 oranında lipid biriktirebilen mikroalgler de vardır (Meng *et al.* 2009). Birçok ototrofik mikroalgin yağ biriktirdiği belirlenmiştir. Bunlar arasında *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii*, *Navicula pelliculosa*, *Scenedsmus acutus*, *Cryptocodinium cohnii*, *Dunaliella primolecta*, *Monallanthus salina*, *Neochloris oleoabundans*, *Phaeodactylum tricornutum* ve *Tetraselmis sueica* sayılabilir (Li *et al.* 2007)

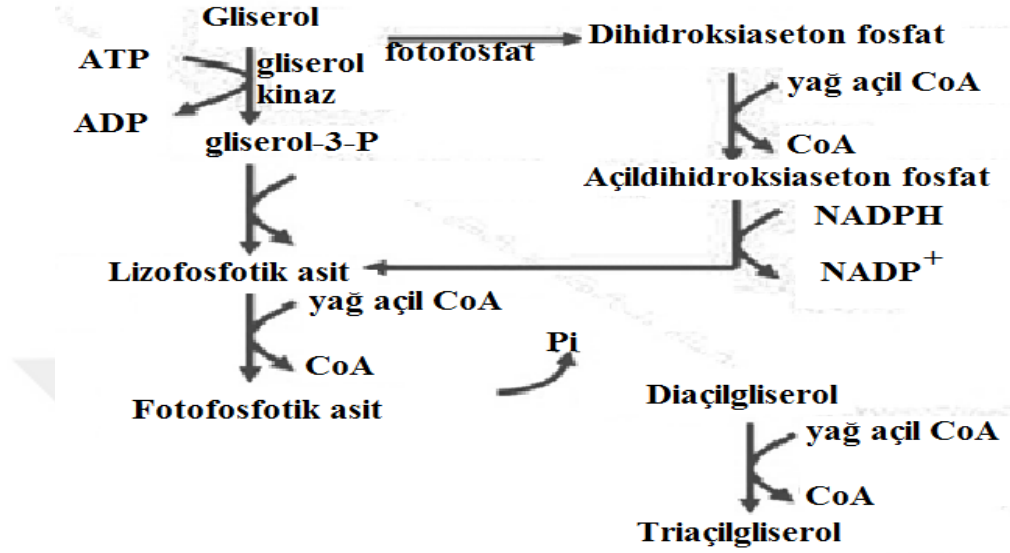
2.2.3 Funguslar

1980’li yıllardan bu yana funguslar (tek hücreli mayalar ve filamentli funguslar) ilgi çeken yağlı mikroorganizmalar olmuştur. *Rhodosporidium sp.*, *Rhodotorula sp.* ve *Lypomyces sp.* gibi bazı maya türleri hücrelerinde kuru ağırlıklarının %70’den fazla lipid biriktirebilme yeteneğine sahiptir. Yağlı maya *Rhodosporidium toruloides* Y4’da substrat besleme modları lipid verimliliği üzerinde belirgin etkisini göstermektedir (Zhao *et al.* 2011).

Yüksek lipid içeriğine sahip funguslara örnek olarak *Mortierella sp.* cinsine ait türler verilebilmektedir. Yağlı mayalar ve küfler çoklu doymamış yağ asitlerince zengin triaçilgliserol biriktirmektedirler. Bu hücrelerde en fazla rastlanan yağ asitleri arasında C18:1, C18:2, C16:0, C16:1 gelmektedir. Yağlı maya ve fungusların biyodizel üretimi için alternatif yağ kaynakları olduğu söylenebilmektedir (Meng *et al.* 2009). Triaçil gliserol sentezi Şekil 2.1’de verilmiştir.

Li vd. (2007) karbon kaynağı olarak glikoz kullanarak *Rhodosporidium toruloides* mayasının mikrobiyel lipid üretimini araştırmışlardır ve pH’ı 5,5 ve 12 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerinde maya hücrelerinin 150 g/L glikoz varlığında iyi gelişme gösterdikleri, glikoz konsantrasyon artışının hücre gelişimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. 25 gün süreyle inkübe edilen kesikli beslemeli kültürlerde ise kuru biyokütle ve hücresel lipid içeriği sırayla 151,5 g/L ve %48 olarak bulunmuştur. Hücre lipidlerinin 16 ve 18 karbon atomlarından oluşan uzun zincirli yağ asitlerinden oluştuğunu göstermişlerdir. Liu ve Zhao (2007) *Lypomyces starkeyi* ve *Rhodotorula*

toruloides maya hücrelerinin lipid üretimlerini pH'ı 6 olan, 70 g/L glikoz, 2,0 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerinde araştırmışlar ve lipid içeriklerini sırasıyla %50,2 ve %58,0 olarak bulmuşlardır.



Şekil 2.1 Triaçil gliserol sentezi.

Evans ve Ratledge (1983) tarafından gerçekleştirilen çalışmada; *Candida curvata* mayasından elde ettikleri lipidin başlıca bileşenleri olan C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 yağ asidi oranlarının azot sınırlı şartlarda kesikli ve sürekli sistemde değişken olduklarını bildirmişlerdir.

Peng ve Chen (2008); kızıl ötesi reflektans spektrofotometresi ile yağ biriktirme kapasitesine sahip fungusların hücre içi lipid miktarını belirlemeye yönelik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında izole ettikleri *Microsphaeropsis sp.*, *Phomopsis sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Sclerocystis sp.* ve *Nigrospora sp.* funguslarının yanı sıra diğer bir yağlı fungus olan *Mortierella ramanniana* fungusunu da kullanmışlardır. Bu fungusların lipid içerikleri %7,51, %5,12, %6,98, %5,90, %5,87, %6,95 olarak bulunmuştur.

Economou vd. (2010) sorgum pekmezi ile hazırladıkları yarı katı besiyerinde *Mortierella isabellina* fungusunu lipid biriktirme kapasitesini biyodizel üretiminde hammadde olması bakımından incelemişlerdir. Bu fungusta başlıca görülen yağ

asitlerinin palmitik ve oleik asit olduğunu bildirmişlerdir. Besiyerindeki su içeriği %88, %92 ve %98 olduğunda palmitik asit içeriği %27–34, % 24–35, %26–39; oleik asit içeriği ise %49–54, %49– 55 ve %37–53 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılara göre fungal lipid içersinde uzun alifatik zincirlerin bulunmuyor olması bu hammaddeden üretilcek biyodizelin yüksek kalitede olacağını göstermektedir.

İki endofitik fungus olan *Colletotrichum sp.* Ve *Alternaria*'nın optimim koşullarda ve besin stresi altında lipid akumulasyon yetenekleri Dey vd. (2011) tarafından araştırılmış ve lipid içeriğinin mikroorganizmanın doğası, sıcaklık, pH, kültüvasyon zamanı, gibi kültür koşulları ve substrata göre değiştiği bildirilmiştir (Alvarez and Steinbuchel 2002, Papanikolaou *et al.* 2004). Genetik mühendisliği yöntemleri ile modifiye edilebilir (Vicente *et al.* 2010).

Bazı funguslar, birçok farklı karbon kaynağını kullanarak kesikli sistemde geliştirildiklerinde kısa sürede çok miktarda biyokütle oluşturabilmektedirler. Hücrelerinde yüksek miktarlarda bitkisel yağlara benzer özellikler gösteren yüksek lipid Birikitirebilmektedirler (Vicente *et al.* 2009). Bu nedenle son yıllarda mikrobiyel lipidlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda fungal hücreler araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Li vd. (2007) yaptıkları çalışmada; karbon kaynağı olarak 10-400 g/L arasında değişen glukoz oranlarını kullandıkları çalışmada *Rhodospiridium toruloides* Y4 mayasının mikrobiyel lipid üretimini araştırmışlardır. Çalışmada pH'ı 5,5 ve 12 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerinde maya hücrelerinin ortamda 150 g/L glukoz varlığında en iyi gelişme gösterdikleri, artan glukoz konsantrasyonlarının hücre gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir. 25 gün süreyle inkübe edilen kesikli beslemeli kültürlerde ise kuru biyokütle ve hücresel lipid içeriği sırayla 151,5 g/L ve %48 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, kesikli beslemeli sistemde 134 saat süreyle geliştirdikleri *Rhodotorula toruloides* Y4 hücre lipidlerinin 16 ve 18 karbon atomlarından oluşan uzun zincirli yağ asitlerinden oluştuğunu göstermişlerdir. Gelişme periyodu boyunca miristik, palmitik, palmitoleik ve linolenik asidin başlıca sabit yağ asitleri olduğu bulunmuştur. İlerleyen inkübasyon süresinde, oleik asit içeriğinde azalma görülürken, stearik asit içeriğinde artış saptanmıştır. Gelişme sürecinin erken döneminde linoleik asit miktarında artış olurken, geç döneminde azalma

görülmüştür. Liu ve Zhao (2007) *Lypomyces starkeyi* ve *Rhodotorula toruloides* maya hücrelerinin lipid üretimlerini pH 6 da, 70 g/L glukoz, 2,0 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerinde sırasıyla %50,2 ve %58,0 olarak bulmuşlardır. *Lypomyces starkeyi* hücrelerinden elde ettikleri lipidin %0,4 miristik asit, %33,0 palmitik asit, %4,8 palmitoleik asit, %0,4 heptadekanoik asit, %4,7 stearik asit, %55,1 oleik asit, %1,6 linoleik asit; *Rhodotorula toruloides* hücrelerinden elde ettikleri lipidin ise %0,7 miristik asit, %24,3 palmitik asit, %1,1 palmitoleik asit, %0,6 heptadekanoik asit, %7,7 stearik asit, %54,6 oleik asit, %2,1 linoleik asit içerdiğini göstermişlerdir.

Hansson ve Dostálek (1986) gerçekleştirdikleri çalışmada; *Cryptococcus albidus* var. *albidus* mayasının nitrojen sınırlı ortamda (1 g/L) hücre gelişimine ve yağ asidi kompozisyonuna ksiloz, glukoz, maltoz, laktoz, nisasta, mannitol, gliserol ve etanol gibi farklı karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Çalışmada besiyerine nişasta 15 g/L ve etanol 10 g/L eklenirken, diğer karbon kaynaklarının besiyerindeki oranları 0,67 mol karbon/L olarak ayarlanmıştır. Maya hücreleri etanol dışında tüm karbon kaynaklarını kullanmış, etanol içeren ortamda gelişmemiştir. Çalışmada en fazla biyomasın glukoz varlığında olduğu gösterilmiştir. Gliserol içeren ortamda hücre gelişimi az olmasına rağmen en fazla lipid üretimi %43,8 olarak bu besiyerinde görülmüştür. Glukoz içeren ortamda lipid üretimi %40,1 olarak belirlenirken, en düşük lipid üretimi %26,3 olarak laktoz içeren besiyerinde gözlenmiştir. *Cryptococcus albidus* var. *albidus* mayasının yağ asidi dağılımını ortamda karbon kaynağı olarak 20 g/L glukoz kullanarak farklı azot kaynaklarının etkisini (NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, üre, L-glutaminat, -Larjinin, L-ornitin, L-prolin) araştırmışlardır.

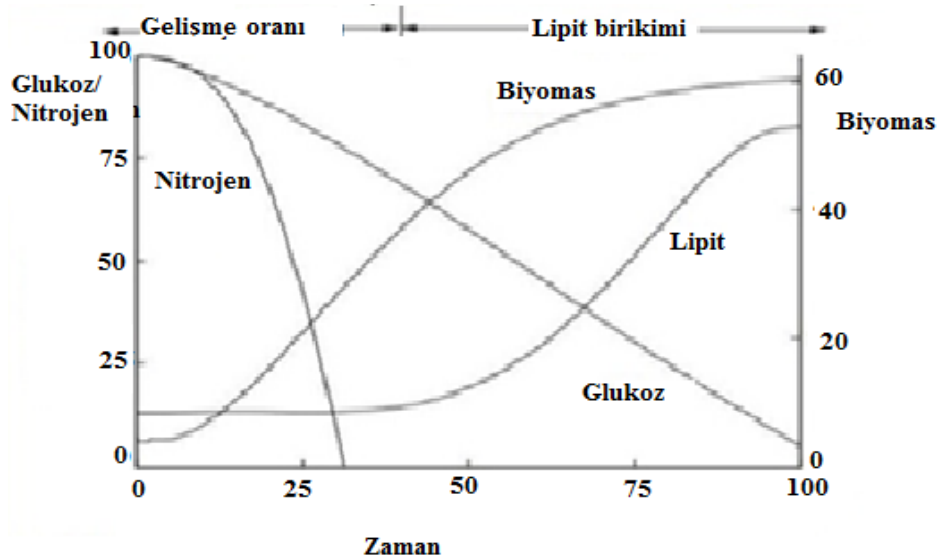
Hücreler organik azot kaynağında geliştirildikleri zaman C18:0 oranı %5,6 olarak bildirilmiştir. Besiyerinde L-arjinin veya L-ornitin kullanıldığında C16:0 miktarında düşme görülürken C18:2 miktarında artış olmuştur. Denenen tüm azot kaynaklarında yağ asitlerinin doymamışlık miktarı aynı bulunmuştur. Çalışmada maya hücrelerinden elde edilen lipidlerde görülen başlıca yağ asitleri C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 olarak belirlenmiştir. Kullanılan karbon kaynakları farklı olmasına rağmen, farklı besiyerlerinde geliştirilen hücrelerdeki yağ asidi dağılımları birbirine çok benzemektedir. Glukoz, sukroz, laktoz, ksiloz ve etanol gibi farklı karbon kaynaklarının

Candida curvata mayasının lipid biriktirme kapasitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Karbon kaynaklarını besiyerine 30 g/L olacak şekilde eklemişlerdir. Kesikli kültürde geliştirdikleri maya hücrelerinin yüksek karbon/azot oranında yüksek lipid biriktirebildiklerini görmüşlerdir. inkübasyon süresinin 30. saatinden sonra ortamdaki azotun bittiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda biyokütle üretiminde en etkili karbon kaynağının laktoz; lipid üretiminde en etkili karbon kaynağının ksiloz olduğu bildirilirken hem biyokütle hem de lipid üretiminin ortamda etanol varken en düşük miktarda olduğu bulunmuştur. Biyokütle üretimleri glukoz, sukroz, laktoz, ksiloz ve etanol içeren ortamda sırasıyla 10,2, 11,2, 12,5, 9,9, 8,5 g/L olarak bildirilirken, lipid üretimleri sırasıyla %33,2, %37,4, %39,2, %48,6 ve %30,1 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar, *Candida curvata* mayasından elde ettikleri lipidin başlıca bileşenlerinin C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 olduğunu ve yağ asidi oranlarının azot sınırlı şartlarda kesikli ve sürekli sistemde değiştiğini göstermişlerdir. Kesikli sistemde glukoz içeren besiyerinde bu yağ asitlerinin dağılımı sırasıyla %33,0, %12,0, %42,9, %7,3 iken, sukroz içeren besiyerinde %32,4, %11,3, %42,0, %6,7; laktoz içeren besiyerinde %32,5, %11, %49, %6; ksiloz içeren besiyerinde %41,2, %14, %43, %3,5; etanol içeren ortamda ise %26,5, %12,5, %49,0, %8,9 olarak bildirilmiştir. Fakat kemostat kültürde nitrojen sınırlı ortamda yağ asidi kompozisyonu sabittir. En fazla C18:0 yağ asidi ve en düşük C18:2 yağ asidi ksilozda geliştirilen hücrelerde sırasıyla %15 ve %4 olarak bulunmuştur. Etanol içeren besiyerinde geliştirilen hücrelerde %51 oranında C18:1 ve %25 oranında C16:0 görülmüştür.

Vicente vd. (2009) filamentli yapıya sahip *Mucor circinelloides* fungusunu biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımını gösterdikleri çalışmalarında üç farklı solvent sisteminin fungus hücrelerinden lipid ekstraksiyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada pH 4,5' te ve 10 g/L glukoz içeren minimal besiyerinde 3 gün süreyle geliştirilen hücrelerden kloroform:metanol, kloroform:metanol:su ve n-hekzan çözücülerini ile elde edilen lipid verimleri sırasıyla %19,9, %19 ve %15,3 olduğu belirlenmiştir. Fungal lipidi oluşturan başlıca yağ asitlerinin sırasıyla %37,1 oranında C18:1, %14,3 oranında C18:2 ve %18,5 oranında C18:3 olduğunusaptanmıştır.

2.3 Fungal Lipid Üretimi

Fungal lipid üretiminde iki faz gözlenmektedir. İlk faz dengeli bir gelişmenin gözlemlendiği fazdır ve bu fazda bütün besin elementleri ortamda yeterli miktarda bulunmaktadır. Besin maddelerinin azalması özellikle azot kısıtlamasının başladığı durumda ikinci faz olan lipogenik faz başlar. Bu faz ise lipid üretimi için gerekli olan tüm besin elementleri tükenene kadar devam eder. Lipid üretimi için gerekli besin elementlerinin ortama yeniden ilave edilmesi durumunda lipogenik faz yüksek düzeyde devam eder ve biyokütleden lipid üretimi açısından yüksek verim elde edilir (Keskin *et al.* 2005). Mikroorganizmaların yağ üretme kapasiteleri bazı sistem parametreleri tarafından sınırlanmaktadır. Lipid üretimi birincil besin maddelerinin varlığı ile doğrudan alakalıdır. Ortamdaki azot kaynağının azalması lipid üretimini indüklemektedir. Benzer şekilde karbon kaynağı miktarındaki artış da lipid üretimini arttırmaktadır. Azot kaynağındaki azalma, protein ve nükleik asit sentezinde yavaşlamaya neden olmaktadır. Bu metabolik yollarda azot esansiyel elementtir ve azotun azalmasına bağlı olarak protein ve nükleik asit metabolizmasının durması sonucu hücre gelişimini sınırlamaktadır. Bu durumda kullanılan karbon, lipid üretiminde ve depolanmasında kullanılmaktadır (Ratledge *et al.* 1978, Çiçek ve Yalçın, 2013). Şekil 2 de Yağlı mikroorganizmalarda lipid akümülyasyon koşulları verilmiştir



Şekil 2.2 Yağlı mikroorganizmalarda lipid akümülyasyon koşulları

Organizmalar lipid birikimini triaçilgliserol (TAG) depolayarak gerçekleştirmektedir. TAG'lar ökaryotlardan prokaryotlara kadar pek çok türde lipidin depo şeklidir. Mayalar ve küfler gibi pek çok fungal kütleler iyi birer TAG üreticisidir ve depolayıcısıdır. Lipid birikimi ve üretimi biyosentetik yolların düzenlenmesi ve öncü moleküllerin varlığı ile yakından ilişkilidir. Lipid üretiminde önemli olan öncü moleküllerden bazıları asetil CoA, malonil CoA, gliserol-3-fosfat, NADPH'tır. Lipid üretim basamağında sitozolik yağ asidi sentaz enzimi görev almaktadır. Bu enzim 6α ve 6β olmak üzere multimerik bir yapıya olup 48 aktif merkeze sahiptir. Yağ asidi sentezinde başlangıç reaksiyonları için sabit bir asetil CoA kaynağı ve uzama safhaları için malonil CoA gereklidir (Tehlivets *et al.* 2007, Çiçek ve Yalçın 2013). Azot kısıtlaması AMP-deaminaz enzimini aktive etmektedir. Bu aktivasyonla mitokondri AMP derişimini azalmakta ve buna bağılı olarak izositrat dehidrogenaz aktivitesi düşmektedir. İzositrat dehidrogenaz enzimi trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün kontrolünde önemli bir enzimdir ve bu enzimin azalması, izositrat birikime ve TCA siklusunun bloke olmasına neden olmaktadır. Aşırı biriken izositrat, sitrat şeklinde mitokondriden sitoplazmaya malat sitrat mekiğı ile taşınmaktadır. Sitozolik ATP-sitrat liyaz enzimi sitoplazmaya pompalanan sitratı okzoloasetat ve asetil CoA'ya dönüştürmektedir. Asetil CoA ise lipid sentezinde öncü molekül olarak kullanılmakta ve bu yolla lipid üretimi artmaktadır (Çiçek ve Yalçın 2013).

Yüksek kapasitede lipid biriktirebilme özelliğinde olan mikroorganizma şu kaskad reaksiyonları gerçekleştirmektedir (Ratledge *et al.* 2004).

1. Ortamdaki azot miktarı azalınca yağlı hücrede AMP deaminaz aktivitesi 5 kat artar.
2. Bu durum hücrenin ve mitokondrinin AMP içeriğini azaltır.
3. Mitokondride azalan AMP içeriğı yağlı hücrelerde bulunan ve AMP ye bağımlı izositrat dehidrogenaz enzimini durdurur.
4. izositrat metabolize edilemez ve biriktirilir. Akonitaz aracılığı ile sitrik aside dengelenir.
5. Bunun sonucunda mitokondride sitrat biriktirilir.
6. Sitrat malat ile değıştirilir.

7. Sitrat sitozole gelir ve ATP sitrat liyaz tarafından bağlanır, asetil CoA ve oksaloasetat oluşur.

8. Asetil CoA yağ asidi biyosentezi için kullanılır.

9. Oksaloasetat ise malat dehidrojenaz ile sitrat akış sisteminde kullanılacak malata dönüştürülür (Karatay 2010).

2.4 Meyve ve Sebze İşleme Tesislerinden Çıkan Katı Artıklar

Meyve ve sebze işleme tesislerinde hammadde olarak kullanılan birçok meyve sebzenin işlenmeleri sonrası açığa çıkan katı atık ve artıklar ya aynı fabrikada değerlendirilmekte ya da yarı mamül ürün olarak başka fabrikalara nakledilerek jelleştirici, boya, yağ ve benzeri maddeler elde edilmesinde kullanılmaktadır. Meyve suyu üretiminden çıkan posa oldukça değerlidir. Ancak Bu atıklar taze meyve ve sebze niteliklerini koruduklarından gıdaların bozunabilmeleri için gerekli olan koşullardan yüksek suya ve mikrobiyal yüke sahiptirler. Bu yüzden hızla bozulma eğilimi gösterirler. Bazı meyve ve sebzelerin işlenmesinden sonra ortaya çıkan katı atıklar Çizelge 2.3 de görülmektedir (Yurdagel *et al.* 1997).

Çizelge 2.3 Bazı meyve ve sebzelerden çıkan katı atık oranları

Ürün	% Atık
Bezelye yabancı çeşitler	38 – 45
Bezelye yerli çeşitler	57
Bakla uç atığı	4
Taze fasulye uç atığı	28
Kırmızı biber palper posası (0,72 mm)	28
Domates (kabuk, lif, çekirdek)	10,52 – 17,85
Domates palper posası (0,72 mm)	7
Mandalin (kabuk, posa)	48,4
Şeftali çekirdek	8,6
Şeftali palper posası (0,72 mm)	6,7
Çilek palper posası (0,72 mm)	19,5
Üzüm cibresi (çöpsüz)	30 – 36
Vişne çekirdek	13,2
Vişne çöp	5,8
Vişne palper posası (0,72 mm)	10

Kimyasal bileşimi bakımından oldukça zengin olan meyve posalarının hayvan beslenmesinde kullanılanlar hariç önemli bir kısmı, kurutma ve depolama maliyeti

yüksek olduğundan atık olmaktadır. Meyve suyu endüstrisi atıklarının biyoproseslerde substrat olarak kullanımı, atıklardan doğan kirlilik probleminin çözümü için önemli bir alternatiftir.

Meyve posalarının biyoetanol üretiminde kullanılmasıyla ilgili yapılan çalışmalar elma, üzüm ve portakal üzerine yoğunlaşmıştır (Cemeroğlu *et al.* 2004). Elma posası yüksek miktarda polisakkarit içermesinin yanında fruktoz, glukoz, sakkaroz gibi fermente edilebilir şekerleri de içerir (Gullin *et al.* 2007).

Hang vd. (1986) tarafından yapılan çalışmada elma posasına katı faz fermantasyonu uygulanarak etanol üretimi denenmiş ve etanol verimi ortalama 36 g etanol/kg atık olarak bulunmuştur. Üzüm posası ise üzüm suyu ve şarap üretiminin ilk basamağında elde edilen, kabuk, mayşe, çekirdek ve saptan oluşan bir atıktır. Selüloz, hemiselüloz, pektin gibi polisakkaritlerce zengindir ve bunlar ön işlemlerle fermente edilebilir şekerlere dönüştürülebilir (Zheng *et al.* 2012).

Katı faz fermantasyonu ile üzüm posasından etanol üretilen bir çalışmada verim 50 mg etanol/g atık olarak hesaplanmıştır (Pourbafrani *et al.* 2010). Sitrus meyvelerinin meyve suyuna işlenmesinden sonra ayrılan posanın büyük bir kısmını kabuk oluşturur. Selüloz ve pektince zengin olan kabuk ön işlemler yardımıyla biyoproseslerde kullanılabilir. Portakal posasının biyoetanol üretiminde kullanımında; öncelikle mayanın üremesini inhibe eden d-limonenin kabuktan uzaklaştırılması gerekmektedir (Wilkins *et al.* 2007). Bir ton sitrus meyve atığından 39,64 L (31,27 kg) etanol üretilmesi mümkündür (Pourbafrani *et al.* 2010). Kayısı ve şeftalinin meyve suyuna işlenmesinde çekirdek dışında %13-15 oranında posa ayrılmaktadır ve bu posa şeker, selüloz ve pektince zengin bir posadır (Ekşi ve Arık 1982). Nar suyu üretiminden ise %55 oranında posa ayrılır. Kabuk, nar çekirdekleri (arıl) ve bazı organik maddelerden oluşan nar posası diyet lifi bakımından oldukça zengindir (Viuda and Martos 2012). Vişne suyu üretiminden ayrılan vişne posasının ise büyük bir kısmı çekirdek olmak üzere mayve ve saptan oluşur ve şeker miktarı yüksektir.

2.5 Türkiye'nin Meyve Suyu Sanayisi Atık Durumu ve Atık Potansiyeli

Türkiye yılda 16,3 milyon ton meyve üretmekte ve dünya meyve üretiminde 6. sırayı alarak toplam üretimin %3'ünü karşılamaktadır. Meyve suyu sanayisinin işlediği başlıca 7 meyve elma, vişne, kayısı, şeftali, portakal, nar ve üzümdür. Bu meyvelerin 2010 yılı üretim miktarları toplam 9,9 milyon ton ve meyve suyuna işlenen miktarları yaklaşık 731 bin tondur (Akdağ *et al.* 2011). Meyve suyu sanayisine ek olarak ülkemizde üretilen üzümün %2'si şaraba işlenmektedir. Temelde şarap ve üzüm suyu üretiminden çıkan posa içeriği aynıdır (Zheng *et al.* 2012). Türkiye'de, meyve suyu sektöründe üretilen toplam posa miktarı, meyve suyu prosesi sırasındaki randımanlar kullanılarak ve şarap sanayinden çıkan üzüm posası miktarı (25,5 bin ton) da dâhil edilerek yaklaşık 210 bin ton olarak hesaplanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerler

Fungal Biyokütlenin Üretimi İçin Kullanılan Sıvı Besiyer

Glukoz	50 g/L
Maya ekstraktı	1 g/L
KH_2PO_4	5 g/L
NaNO_3	2 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/L

Besiyeri pH'ı 0,1 M HCl ile 7,0'a ayarlanmış ve 1,5 atm basınç altında 110 °C'de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. Bu besi yeri fungal kütleden yağ ekstrasyonunda fungal biyokütle üretimi için kullanılmıştır.

Malt Agar (MA)

Malt ekstrat	30,0
Pepton	5,0
Agar	15,0

37 °C de pH 7,6 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Malt Ekstrakt	20g
Pepton	1g
Glukoz	20g
Agar	20 g
Distile Su	1 L

Distile suda çözülüp 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Pitt 2000, Klich 2002).

Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck)

Potato Infusion	4 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g

39 gram tartılarak 1000mL distile su içerisinde çözündükten sonra otoklavlanarak kullanılmıştır.

3.1.2 Ayıraçlar

Fosfovanilin ayıracı: 0,6 g vanilin 10 mL etanol içerisinde çözünmüş ve 100 mL distile su ile seyreltilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Çalışmada Kullanılacak Fungusların İzolasyonu

Meyve suyu posa (çilek, portakal ve elma) örnekleri fungus izolasyonu için kullanılmıştır. Tüp dilüsyon metodu ile dilüğe edilen örneklerden MA ve PDA'ya dökme plak yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra plaklardaki fungal gelişim 27 ± 2 °C'de 7 gün boyunca gözlemlenmiştir. Stok fungus kültürleri haftada bir yatık taze besi ortamına transfer edilmiş, 27° C' de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. İzolatlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Saf Fungal Kültürlerin Tanımlamaları

3.2.2.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation (ROCHE) kiti kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için sıvı besi yerinde üretilen 7 günlük kültürler kullanılmıştır. 400 µL Lysis-buffer bulunan steril 1,5mL' lik ependorfa bir miktar kültürlerden alınmış, üzerine ependorfun 0,5 mL çizgisine kadar 0,4-0,6 µm büyüklüğündeki asitle yıkanmış cam boncuklar eklenmiştir ve 15 sn maximum hızda vortekslenmiştir. Üstteki fazın iyi ayrılması için 10 000 rpm (revolutions per minute= dakikadaki devir sayısı)' de 60 sn santrifüjlenip üstteki sıvı faz yeni ependorfa alınmıştır. Üzerine 400 µL binding buffer ilave edilerek tekrar 10 000 rpm de 1 dakika santrifüjlenip, üstteki sıvı faz yeni ependorfa alınmıştır. Yeni ependorfa alınan sıvı faz örneğinin, üzerine 500 µL Wash Buffer ilave edilip 30 sn 10 000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra tekrar 200 µL Wash Buffer ilave edilerek 30 sn 10 000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Üstteki sıvı faz yeni ependorf tüplere alınmıştır. Son olarak 30 µL distile suyu örneğin tam üzerine koyarak 30 sn 10 000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve üstteki filtreler atılıp alttaki faz +4 °C de beklemeye alınmıştır.

3.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kullanılan gen bölgesi ITS1F-ITS4R izole edilen total DNA'nın 5 µL'si 50 µL'lik PCR karışımına eklenerek polimeraz zincir reaksiyonu için hazırlanmıştır. PCR karışımı (Reaction Mix) aşağıdaki gibidir (Çizelge 3.1).

Fast start High Fidelity PCR System ve dNTPs (Roche) Pack kiti kullanılmıştır. Tek Reaksiyon (Hacim) Tek Reaksiyon (konst.)

Çizelge 3.1 PCR reaksiyonu için ortam

Hacim	Reaksiyon Konsantrasyon	Bileşenler
35,5 µL	-	Su, PCR-grade
5 µL	1,8	Faststart High Fidelity Reaction buffer (10x)
2 µL	0,4µM	Forward primer (F)
		Ara stok 10µm
2 µL	0,4µM	Revers primer (R)
		Ara stok 10µm
0,5 µL	2,5 U/µL	Faststart high Fidelity enzim

ITS bölgesinin amplifikasyonları için reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

95 °C	2 dakika	1 Döngü
95 °C	30 saniye	35 Döngü
55 °C	30 saniye	35 Döngü
72 °C	50 saniye	35 Döngü
72 °C	7 dakika	1 Döngü
4 °C	Süresiz	

3.2.2.3 Amplifikasyon Ürünlerinin Saptanması

Amlifiye edilen PCR ürünleri agoroz jelde gözlemlenmiştir. PCR amplifikasyonunu takiben, PCR ürünlerinin saflık kontrolleri ve miktar tayinleri thermoscientific nanodrop 2000c cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. agaroz jel elektroforezleri 4µg/µL Gelred içeren %1,5 lik agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE tamponu kullanılarak 5µL DNA solusyonu 2µL yükleme solusyonu ile karıştırılarak 90 Volt 'da 45 dakika süre ile yürütülmüştür. Elektroforezde marker olarak fermentaz marker kullanılmıştır.

3.2.2.4 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Dizi Analizi

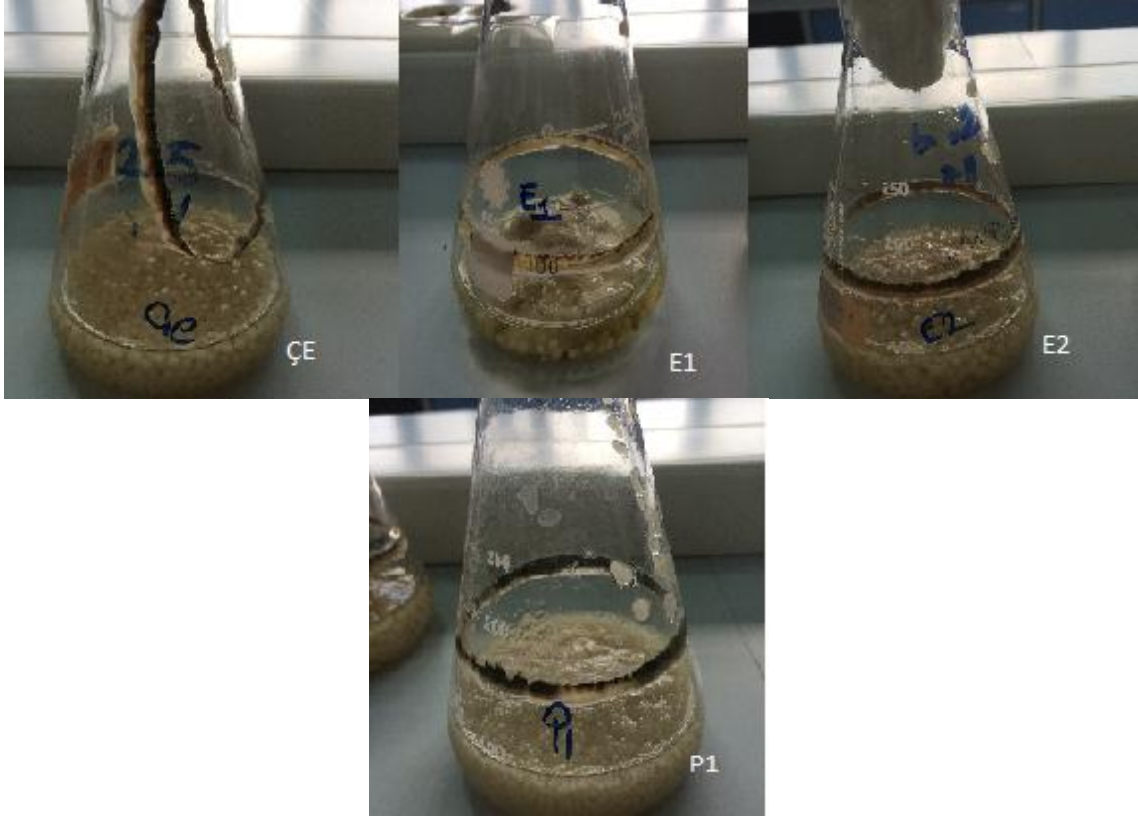
Jelden kesilen PCR ürünlerinin saflaştırılmasında, saflaştırma kiti (High pure PCR product purification kit (Roche)) kullanılmıştır. Bu kitin prosedürü modifiye edilerek şu şekilde uygulanmıştır.

Tüpteki PCR ürünü alınarak 150µL binding buffer ilave edilerek vorteksle karıştırılmıştır. Daha sonra 180µL PCR ürünümüz ve bunding buffer karışımından alınarak başka bir tüpe aktarılmıştır ve 30 saniye 10 000 rpm satrüfjlenmiştir daha sonra 150µl wash buffer eklenmiştir 30 saniye 10 000 rpm de santrifjlendikten sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Alttaki faz atılarak filtreler yeni ependorflara konulmuştur ve üzerine 30µl distile su ilave edilip 30 saniye 10 000 rpm de santrifjlenmiştir filtreler atılarak ependorf tüplere geçen DNA örneği +4 °C de dizi analizi yapmak için saklanmıştır.İki gen bölgesine ait elde edilen temiz PCR fragmentleri ABI 3100 cihazında dizi analizi gerçekleştirilmiştir Dizi analizi sonucu elde edilen veriler ışığında yapılacak flogenetik çeşitlilik analizleri ve flogenetik ağaç çizimi Geneius R9 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatların dizi analizi bilgileri NCBI “National Center for Biotechnology Information” (İnt.Kay.1) gen bankasındaki verilerle BLASTN (Basic Local Aligment Search Tool) programıyla dizilerin benzerleri elde edilmiştir. Ayrıca Chromas programıyla benzer dizilerle karşılaştırılmıştır.

3.2.3 Yüksek Kapasite ile Lipid Üreten Mikroorganizma Seçimi

3.2.3.1 Mikroorganizmaların Üretimi

Fungal biyokütlenin üretiminde kullanılan besiyerine meyve suyu posalarından izole edilen stok fungal kültürlerden 5 mL steril distile su içerisindeki miselyum süspansiyonundan steril koşullarda 100 mL besiyeri içeren erlenlere ekilmiştir. Kültürler 27 °C'de 150 rpm çalkalamada, 5-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir fungal kültürdeki lipid üretim düzeyi araştırılmıştır (Çiçek ve Yalçın 2013) (Resim 3.1).

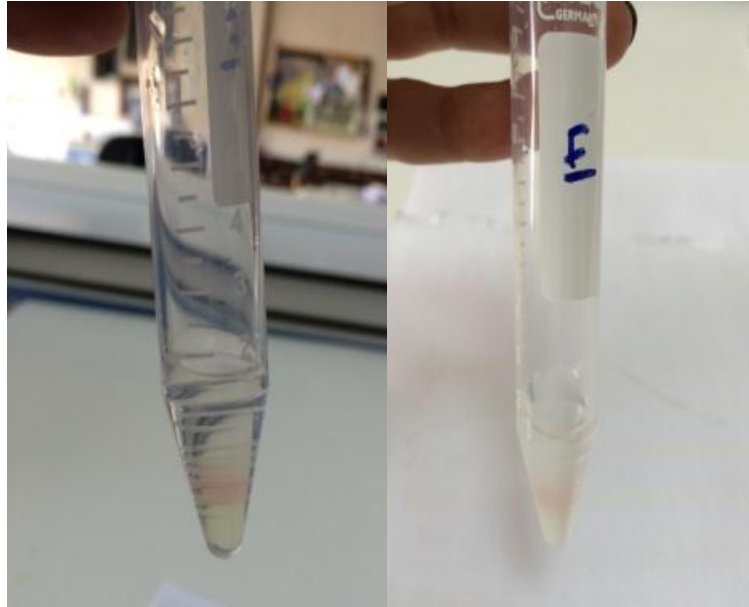


Resim 3.1 Çalkalamalı Etüvde Üretilen Fungal Miseller.

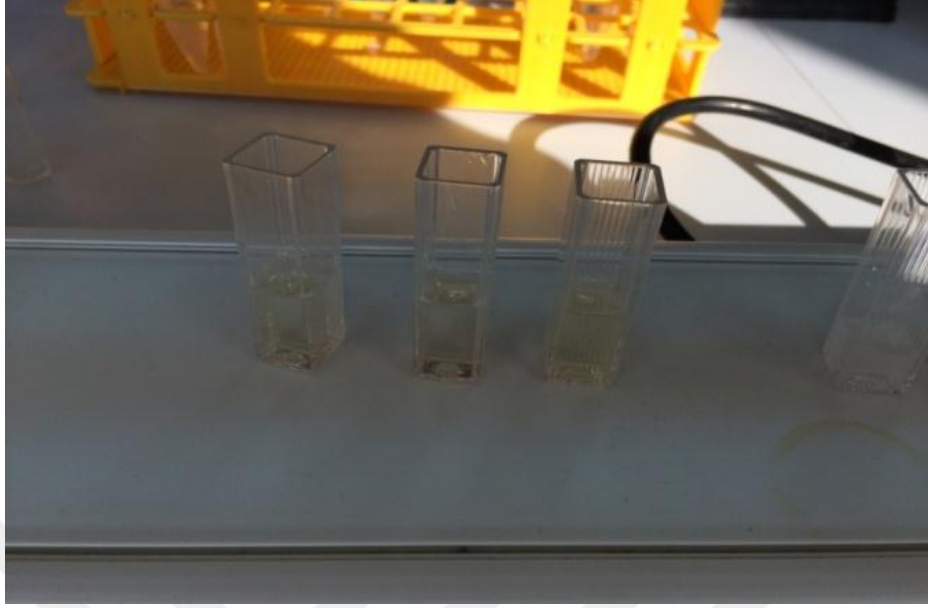
3.2.3.2 Total Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi

Total Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi Toplam lipid tayininde Klorometrik bir metot olan sülfö-fosfo-vanillin yöntemi uygulanmıştır. Sülfö-fosfo-vanillin yönteminde lipid sülfürik asit ile reaksiyona girmekte ve karbonyum iyonları oluşturmaktadır. Karbonyum iyonları ise vanillin fosfat esterleri ile reaksiyona girerek renkli kompleksler meydana getirir. Renk yoğunluğu takip edilerek ortamdaki toplam lipid miktarı ölçülebilmektedir (Tehlivets *et al.* 2007, Çiçek ve Yalçın 2013).

Lipid analizi amacı ile besiyerinden ayrılan fungal biyokütle 2/1 (V:V) kloroform-metanol karışımı ile ekstrakte edilmiş Çakmak vd. (2005) ve santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant lipid analizinde kullanılmıştır. Bu amaçla 0,010 mL süpernatant 1,0 ml H₂SO₄ içerisinde tamamen çözündürüldükten sonra karışım sıcak su banyosunda 10 dk süre ile inkube edildikten sonra tüpler hızlı bir şekilde soğutulurak içine 1,0 mL fosfovanilin ayıracı ve 1,0 mL distile su ilave edilmiştir (Resim 3.2). Standart olarak etanol içerisinde çözünmüş zeytinyağı kullanılmıştır. Standart ve örnek çözeltilerinin 530 nm'de absorbans artışı tayin edilmiş (Resim 3.3) ve total lipid miktarı; Total lipid derişimi (g/L) == Absorbans artışı (ΔA)/ Standart kalibrasyon grafiğinin eğimi Eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.



Resim 3.2 Fosfovanilin ayıracı ilave edilmiş tüpler.



Resim 3.3 530 nm’de absorbans artışı.

3.2.3.3 Lipid Ekstraksiyonu

Fungus hücrelerinin lipid analizleri Zhu vd. (2002) yöntemine göre yapılmıştır. Fungus hücrelerinden lipid elde edilmesi için iki kez aktifleştirilmiş kültürler 250 mL hacmindeki erlenlerde 100 mL olarak hazırlanmış sıvı besiyerlerine ekilmiştir

Mikrobiyel lipid eldesi için 6 adet farklı fungus hücrelerinin gelişimlerinin 10. gününde örnekler $10\,000 \times g$ ’de 30 dakika santrifüj yapılarak çökelti alınmış ve $70\,^{\circ}\text{C}$ ’de bir gece boyunca kurutulmuştur. Kurutulan fungal hücreler toz haline getirilmiştir (Resim 3.4). Toz halindeki bu hücrelerden 50 mg alınarak 2:1 oranında karıştırılan kloroform:metanol karışımı ile 1 saat boyunca muamele edilmiştir. $10\,000 \times g$ ’de 5 dakika santrifüj yapılarak toz haldeki hücre solventten ayrılmıştır. Kloroform:metanol karışımı darası alınmış tüpe aktarılmış, $50\,^{\circ}\text{C}$ ’de solventin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

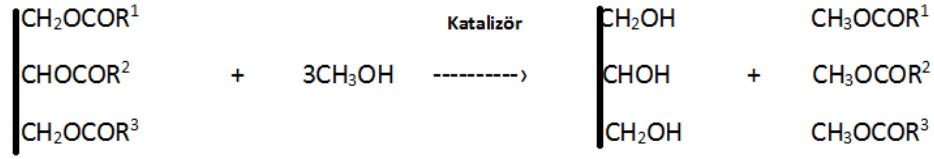


Resim 3.4 Toz Haline Getrilmiş Fungal Miseller

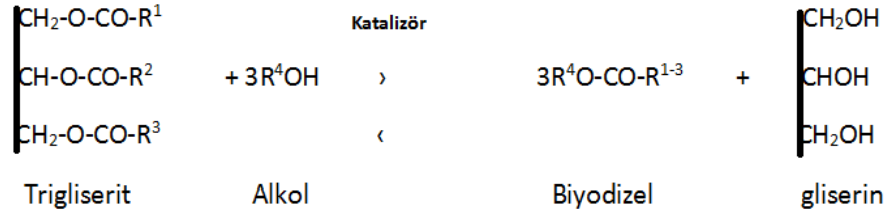
3.2.3.4 Mikrobiyel Lipitlerin Transesterifikasyonu

Triaçilgliserollerin dizel yakıtların yerine kullanılabilmesi için gereken kimyasal modifikasyonlar arasında en çok tercih edilen anahtar basamak niteliğindeki yöntem transesterifikasyondur. Transesterifikasyon, triaçilgliserollerin viskozitesinin düşürülmesinde ve böylelikle yenilenebilen yakıtların makine performansını arttırmada fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Fukuda 2001, Karatay *et al.* 2010).

Transesterifikasyon reaksiyonu üç tane ardışık tersinir reaksiyondan oluşmaktadır. Bu süreçte, triaçilgliserol; her bir basamakta 1 mol alkil esterinin oluştuğu adım adım diaçilgliserol, monoaçilgliserol ve son olarak gliserole dönüştürülür (Helwani 2009, Karatay *et al.* 2010). Diğer bir tanımla lipitlerde bulunan gliseritlerin bir katalizör varlığında bir alkol ile reaksiyona girerek ester ve gliserol oluşturmasıdır.



Transesterifikasyon Reaksiyon Denklemi



Biyodizel Üretim Denklemi

Şekil 3.1 Transesterifikasyon reaksiyon ve biyodizel üretim denklemi.

Geliştirilen funguslardan elde edilen lipitler, ISO-5509,2000 yöntemine göre aşağıda belirtilen şekilde transesterifikasyon reaksiyonuna uğratılmıştır. Bunun için öncelikle 15-32 mg örnek alınarak ependorf tüpüne alınarak üzerine 1 mL n-hekzan eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra 100µL 2N metanollü KOH çözeltisi eklenerek tekrar vortekslenerek 300rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Üzerine 0,08 mg Na₂SO₄ ilave edildi. 10 000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen organik üst faz viallere alındı. Üst fazdan 1 µL örnek gaz kromatografi cihazına enjekte edilmiştir (Karatay 2010).

3.2.4 İzolatların Gelişimine Sıcaklığın, Karbon ve Azot Kaynağının Etkisi

Lipit sentezine karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla agar besiyerlerine karbon kaynağı olarak sukroz ve laktoz kaynağı (%1 oranında), azot kaynağı olarak amonyum nitrat (% 0,2 oranında) kullanılmıştır. Bu amaçla besiyerine nokta ekim yapılarak üç farklı sıcaklıkta (40, 35 ve 25 °C) 7 gün süre ile inkübe edilmiş ve oluşan kolonilerin çapı milimetrik olarak ölçülmüştür.

3.2.5 Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografi Cihazında Analizi

Mikrobiyel lipidlerin transesterifikasyon reaksiyonu sonucu oluşan metil esterleri Gaz Kromatografi cihazı ile belirlenmiştir. Transesterifikasyon reaksiyonundan sonra, üst fazdan 1 µL örnek alınmış ve metillenmiş bu yağ asitleri GC-2010 Gaz Kromatografi (Shimadzu Japan) ile analiz edilmiştir. Gaz Kromatografi cihazında sıcaklığı 240 °C olan Alev İyonlaştırmalı Dedektör (FID) ve TR-CN100, 60 m x 0,25 mm x 0,20 mm (Teknokroma) kolonu ve taşıyıcı gaz olarak N₂ kullanılmıştır. Yağ asidi pikleri karışık yağ asidi metil esteri standardına göre belirlenmiştir (37 Comp. FAME Mix 10 mg/mL in CH₂CL₂; Supelco, USA). Fungal izolatların hücrelerinden elde edilen lipitin transesterifikasyonu sonucu oluşan metil esterleri Çizelge 3.2’de verilmiştir

Çizelge 3.2 Fungal izolatlardan hücrelerinden elde edilen lipitin transesterifikasyonu sonucu oluşan metil esterleri.

İzolat No	Yağ asidi	Miktar (%)
P1	Siklopentan metil	19,445
	Hekzadekonoik asit, metil ester	1,005
	Pentadekonoik asit,14-metil-,metil ester	17,368
	Benzenepropanoik asit,3,5-bis(1,1-dimetiletıl)-4-hidroksi-, metil ester	1,157
	siklopropaneoktanoik, 2-hekzil-, metil ester	1,424
	Heptadekanoik asit, metil ester	1,464
	8,11-oktadekadienoik asit, metil ester	32,745
	7- oktadekadienoik asit, metil ester	12,680
	oktadekadienoik asit, metil ester	9,228
P2	Cyclopentane methyl	19,337
	Hekzadekonoik asit, metil ester	16,232
	siklopropaneoktanoik, 2-hekzil-, metil ester	2,563
	Heptadekanoik asit, metil ester	2,416
	8,11- oktadekadienoik asit, metil ester	30,675
	9- oktadekadienoik asit, metil ester	13,294
	oktadekadienoik asit, metil ester	7,810

4. BULGULAR

4.1 Çalışmada Kullanılacak Fungusların İzolasyonu

Meyve posalarından altı fungus izole edilmiştir (Çizelge 4.1, Resim4.1)

Çizelge 4.1 Meyve posalarından izole edilen funguslar

Kaynak	İzolat
Elma	E1,E2,E3
Çilek	ÇE
Portakal	P1, P2
Toplam (n)	6

E; Elma, ÇE; Çilek, P; Portakal



Resim 4.1 Meyve posalarından izole edilen funguslar

4.2 Çalışmada Kullanılacak Fungusların Farklı Karbon Kaynakları ve Azot Kaynağı Olarak Amonyum Nitrat Kullanıldığındaki Gelişimleri

İzolatların farklı karbon kaynakları ve azot kaynağı olarak Amonyum nitrat kullanıldığındaki gelişimleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Karbon kaynağı sukrozda E1 ve E2 izolatları en iyi üremeyi 35 °C’de (3,7 mm ve 4,2 mm) göstermişlerdir E3 izolatı ise en iyi üremeyi 40 °C’ de 4mm olduğu saptanmıştır. P1 izolatı en iyi üremeyi 40 °C’de 4 mm ile yaparken P2 izolatı 25 °C’de 2,5 mm ile yapmıştır. ÇE izolatı 40 °C

ve 25 °C de en iyi üremeyi 4,5mm ile göstermiştir. Karbon kaynağı laktozda E1 40 °C'de 2 mm ,E2 25 °C'de 5mm , E3 40°C ve 25 °C'de 1,5mm üreme olduğu belirlenmiştir. P1 ve P2 izolatları en iyi üremeyi 25 °C'de sırasıyla 5,5 mm ve 1,3 mm olarak göstermişlerdir. ÇE izolatı 25 °C'de 5mm üreme göstermiştir. Azot kaynağı amonyum nitratda E1 izolatı 35°C'de 3.8 mm E2 izolatı 40 °C'de 5 mm, E3 izolatı ise 35°C'de 5.3 mm üreme yapmışlardır. P1 izolatı 35°C'de 4.5mm P2 izolatı 25 °C'de 4,5 mm olduğu görülmüştür. ÇE izolatı 35 °C ve 25 °C benzer olarak en iyi üremeyi göstermiştir (3,5 mm).

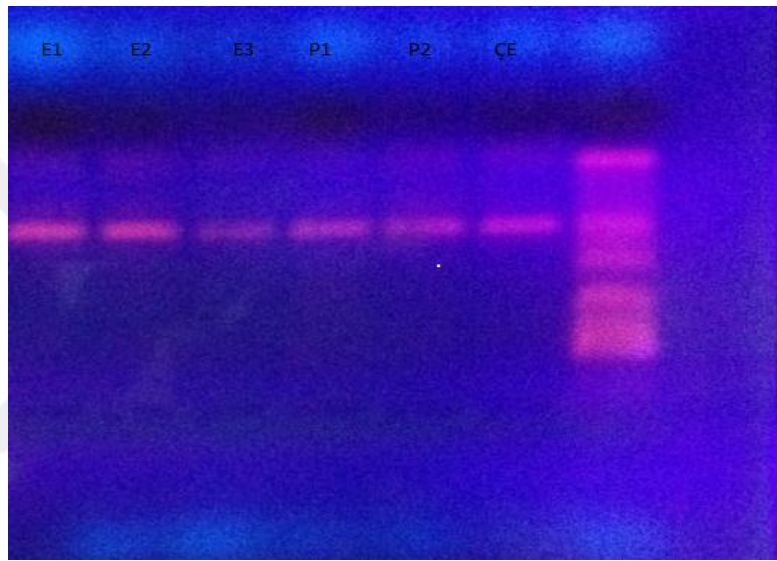
Çizelge 4.2 İzolatların farklı karbon kaynakları ve azot kaynağı olarak Amonyum nitrat kullanıldığındaki gelişimleri

İzolatların zon çapı (mm)							
	°C	E1	E2	E3	P1	P2	ÇE
Karbon Kaynağı							
Sukroz	40°C	3,5	4	4	4	0,5	4,5
	35°C	3,7	4,2	3,9	1,5	0,2	4
	25°C	3	2	1,7	2	2,5	4,5
Laktoz	40°C	2	1	1,5	1	0,3	1
	35°C	1,1	0,7	1	0,5	0,5	1,1
	25°C	1	5	1,5	5,5	1,3	5
Azot Kaynağı							
Amonyum nitrat	40°C	1,5	5	5,2	1,2	3,7	2,9
	35°C	3,8	4,4	5,3	4,5	3,8	3,5
	25°C	2,7	1,7	3	3,1	4,5	3,5

4.3 Saf Fungal kültürlerin tanımlamaları

4.3.1 PCR Amplifikasyon

Meyve posasından izole edilen 6 fungal izolatların DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar NanoDrop'ta analiz edildikten sonra PCR'da amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Ürün UV transilluminatörde incelenmiş ve görüntülenmiştir.



Resim 4.2 İzolatların ITS bölgesi amplifikasyonuna ait jel görüntüsü.

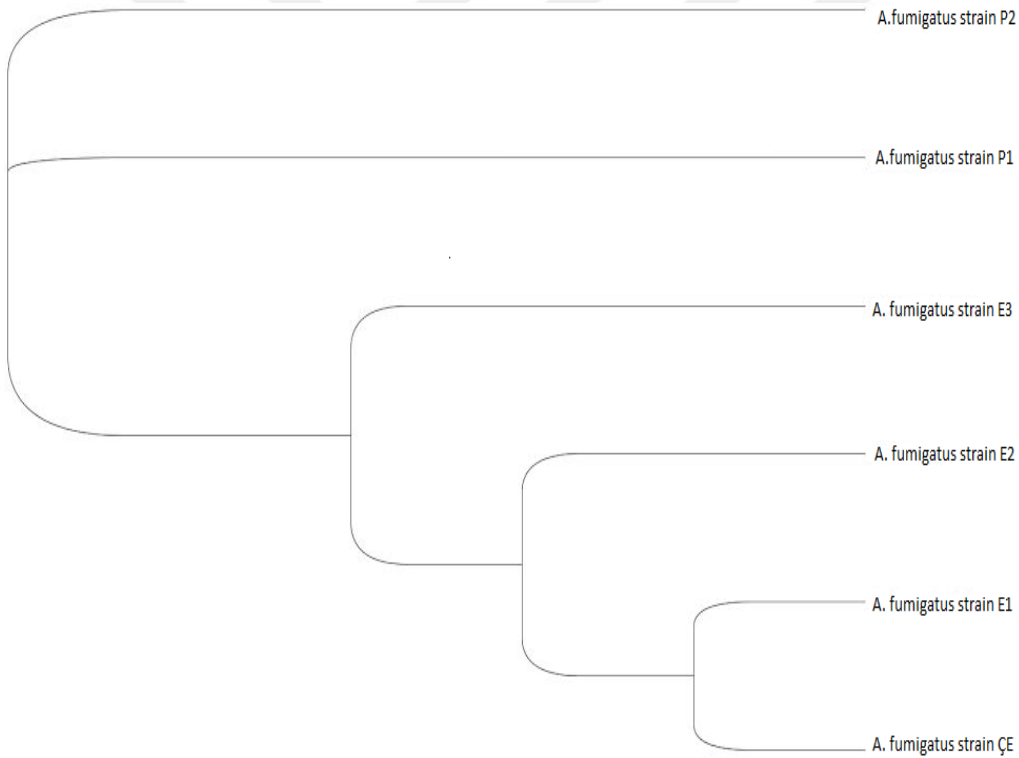
DNA dizi analizinde kullanmak için; görüntülenen her bir PCR ürünü jelden kesilerek tüpte toplanıp, kit yardımıyla saflaştırma yapılmıştır.

Çizelge 4.3 Moleküler yöntemle identifikasyon sonuçları.

izolatlar		ITS bölgesi	E value
ÇE	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%100 <i>Aspergillus fumigatus</i>	0,0
		%100 <i>Eurotiomycetes sp.</i>	0,0
		%100 <i>Fungal sp.</i>	0,0
		%100 <i>Aspergillus sp.</i>	0,0
E1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%99 <i>Aspergillus sp.</i>	0,0
		%99 <i>Aspergillus fumigatus</i>	0,0
		%99 <i>Aspergillus aculeatus</i>	0,0
		%99 <i>Aspergillus sp.</i>	0,0
E2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%96 <i>Spiribacter salinus</i>	3,2
		%93 <i>Schistosoma mansoni</i>	3,2
		%93 <i>Ceanorhabditis briggsae</i>	3,2
		%85 <i>Candida dupliniensis</i>	3,2
E3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%100 <i>Aspergillus fumigatus</i>	0,0
		%100 <i>Eurotium sp.</i>	0,0
		%100 <i>Fungal sp.</i>	0,0
		%100 <i>Aspergillus sp.</i>	0,0
P1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%99 <i>Aspergillus fumigatus</i>	0,0
		%99 <i>Eurotiomycetes sp.</i>	0,0
		%99 <i>Fungal endophyte</i>	0,0
		%99 <i>Aspergillus sp.</i>	0,0
P2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%99 <i>Aspergillus fumigatus</i>	0,0
		%98 <i>Eurotium sp.</i>	0,0
		%99 <i>Fungal endophyte</i>	0,0
		%98 <i>Aspergillus sp.</i>	0,0

ÇE fungal izolatu ITS dizi analizi sonuçlarına göre *Aspergillus fumigatus* ve *Eurotiomyces sp*'ye %100 benzerlik göstermiştir. E1 izolatının ise %99 *Aspergillus sp* (*Aspergillus fumigatus*) olduğu saptanmıştır. E2 izolatı ise ITS dizi analizi sonucunda %96 *Spiribacter salinus* ve %93 *Schistosoma mansoni* ile benzerlik göstermiştir. E3 izolatı ise *Aspergillus fumigatus* ve *Eurotium sp*'ye %100 benzerlik göstermiştir. P1 ve P2 ise dizi analizi sonucunda *Aspergillus fumigatus* olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.1 de izolatların neighbor-joining metot kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç verilmektedir. Portakaldan izole edilen P1 ve P2 izolatları ile elmadan izole edilen E1,E2 ve E3 izolatları birbirine filogenetik olarak daha yakın olduğu saptanmıştır. Çilekten elde edilen izolat ÇE izolatı ise E1 izolatına yakın bulunmuştur.



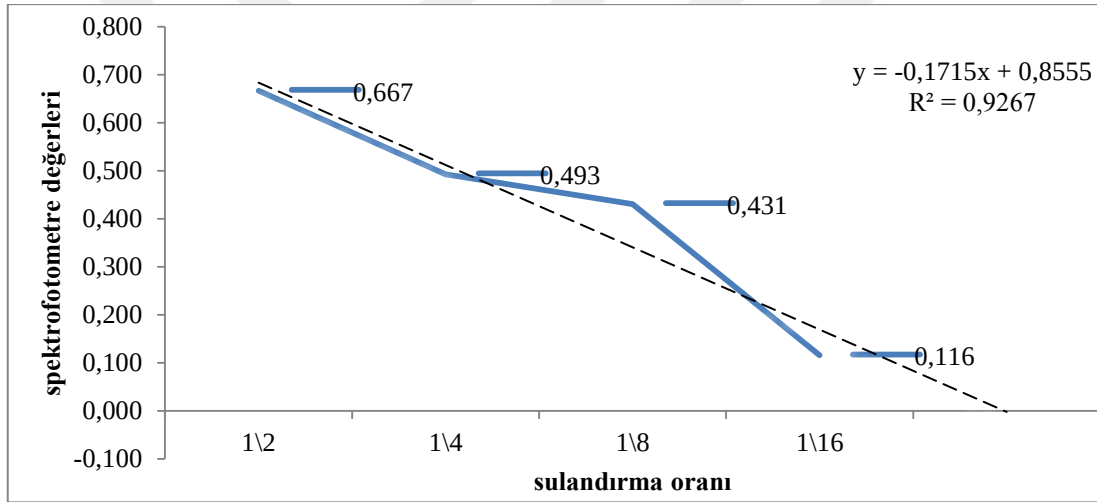
Şekil 4.1 Filogenetik ağaç.

4.4 Yüksek Kapasite ile Lipid Üreten Mikroorganizma Seçimi

Zeytin yağının dilüsyonlarının spektrofotometrik ölçümlerine dayanarak izolatlardaki total yağ oranının belirlenmesinde kullanılacak eğri Şekil 4.2 de verilmektedir. Bu eğriye göre fungal izolatlardan yağ ekstraksiyonu yapıldıktan sonra spektrofotometrede yapılan ölçümler dikkate alınarak yağ miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$y = -0.17x + 0.855$$

Çizelge 4.4' de bu formüle göre fungal izolatların içerdiği total yağ oranı verilmiştir.



Şekil 4.2 Total yağ içeriğinin hesaplanmasında kullanılmak üzere çıkartılan standart eğri.

Posalardan alınan (P1,P2,E1,E2,E3,Ç) örneklerden elde edilen fungusların üretmiş olduğu yağ miktarlarının sonuçlarını elimizde bulunan standartlarla (STD1,STD2,STD3,STD4,STD5) karşılaştırdığımızda elde ettiğimiz sonuçlar şu şekildedir; Ç ve E2 örneklerinin sonuçları (Ç=2,22 ve E2=2,257) STD2'ye (SDT2=211) yakın olduğu görülmüştür. E1,E3,P1,P2 örneklerinin (E1=2,456 E3=2,620 P1=2,649 P2=2,760) STD3'e (2,47) yakın olduğu görülmüştür. Elde edilen verilere göre spektrofotometre sonuçları arttıkça yağ üretiminin azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre en fazla yağ üretimi P2 de görülmüştür P1 örneğindeki yağ üretimi P2'yi takip etmektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Fungal izolatların içerdiği total yağ oranı verilmiştir.

Örnek	Spektro ölçüm(OD)	Ortalama OD	50 mg fungal kütledeki yağ miktarı
Std1(1/2sulandırılmış)	0,678 0,675 0,679	0,667	1,099
Std2(1/4sulandırılmış)	0,491 0,492 0,495	0,493	2,11
Std3(1/8sulandırılmış)	0,400 0,395 0,397	0,431	2,47
Std4(1/16 sulandırılmış)	0,112 0,117 0,120	0,116	4,32
Std5(1/32 sulandırılmış)	0,114 0,113 0,115	0,113	4,33
P1	0,318 0,425 0,463	0,402	2,649
E1	0,350 0,462 0,489	0,435	2,456
Ç	0,478 0,464 0,483	0,475	2,222
P2	0,455 0,355 0,340	0,383	2,760
E2	0,510 0,453 0,445	0,469	2,257
E3	0,429 0,395 0,395	0,406	2,620

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enerji kaynaklarının artan enerji ihtiyacına rağmen gün geçtikçe azalması ve sera etkisini azaltıcı alternatif enerji kaynakları arayışı biyodizel üretimi üzerine yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur. Bu çalışmada elma, çilek ve portakal posalarından izole edilen funguslar moleküler metodlarla identifiye edilerek, izolatların lipid üretimi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Candida, *Rhodotorula*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *hormoconis*, *Penicillium* ve *Alternaria*'ın biyodizel üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmada meyve posasından altı izolat elde edilmiştir. ITS dizi analizi sonuçlarına göre ÇE fungal izolatu *Aspergillus fumigatus*'a %100 benzerlik göstermiştir. E1 izolatının ise %99 *Aspergillus sp (Aspergillus fumigatus)* olduğu saptanmıştır. E2 izolatu ise ITS dizi analizi sonucunda %96 *Spiribacter salinus* ve %93 *Schistosoma mansoni* ile benzerlik göstermiştir. E3 izolatu ise *Aspergillus fumigatus* %100 benzerlik göstermiştir. P1 ve P2 ise dizi analizi sonucunda *Aspergillus fumigatus* olarak tespit edilmiştir. Filogenetik ağaca bakıldığında portakaldan izole edilen P1 ve P2 izolatları ile elmadan izole edilen E1, E2 ve E3 izolatları birbirine filogenetik olarak daha yakın olduğu saptanmıştır. Çilekten elde edilen izolat ÇE izolatu ise E1 izolatına yakın bulunmuştur.

Li vd. (2007) karbon kaynağı olarak glikoz kullanarak *Rhodospiridium toruloides* mayasının mikrobiyel lipid üretimini araştırmışlardır ve pH'ı 5,5 ve 12 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerinde maya hücrelerinin 150 g/L glikoz varlığında iyi gelişme gösterdikleri, glikoz konsantrasyon artışının hücre gelişimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. 25 gün süreyle inkübe edilen kesikli beslemeli kültürlerde ise kuru biyokütle ve hücresel lipid içeriği sırayla 151,5 g/L ve %48 olarak bulunmuştur. Hücre lipidlerinin 16 ve 18 karbon atomlarından oluşan uzun zincirli yağ asitlerinden oluştuğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda Karbon kaynağı sukrozda E1 ve E2 izolatları en iyi üremeyi 35°C'de (3,7 mm ve 4,2 mm) göstermişlerdir E3 izolatu ise en iyi üremeyi 40°C' de 4mm olduğu

saptanmıştır. P1 izolatu en iyi üremeyi 40°C’de 4mm ile yaparken P2 izolatu 25°C’de 2,5mm ile yapmıştır. ÇE izolatu 40°C ve 25°C de en iyi üremeyi 4,5mm ile göstermiştir. Karbon kaynağı laktozda E1 40°C’de 2mm, E2 25°C’de 5mm, E3 40°C ve 25°C’de 1,5mm üreme olduğu belirlenmiştir. P1 ve P2 izolatları en iyi üremeyi 25°’de sırasıyla 5,5mm ve 1,3mm olarak göstermişlerdir. ÇE izolatu 25°’de 5mm üreme göstermiştir. Azot kaynağı amonyum nitratda E1 izolatu 35°C’de 3,8mm E2 izolatu 40°C’de 5mm, E3 izolatu ise 35°C’de 5,3mm üreme yapmışlardır. P1 izolatu 35°C’de 4.5mm P2 izolatu 25°C’de 4.5mm olduğu görülmüştür. ÇE izolatu 35°C ve 25°C benzer olarak en iyi üremeyi göstermiştir (3,5mm). Genel olarak elma posasından izole edilen fungal izolatların Sukrozlu besiyerinde, portakal ve çilek posasından izole edilen izolatların ise Laktozlu besiyerinde daha iyi üreyebildikleri saptanmıştır.

Vicente vd. (2009) *Mucor circinelloides* fungusundan biyodizel üretimi ile ilgili yaptığı çalışmada üç farklı solvent sisteminin (kloroform:metanol, kloroform:metanol:su ve n-hekzan) fungus hücrelerinden lipit ekstraksiyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. En etkili ekstraksiyonun kloroform:metanol ile gerçekleştiğı saptanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda kloroform metanol kullanılarak yağ asitlerinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Peng ve Chen (2008) kızıl ötesi reflektans spektrofotometresi ile yağ biriktirme kapasitesine sahip fungusların hücre içi lipit miktarını belirlemeye yönelik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında izole ettikleri *Microsphaeropsis* sp. *Phomopsis* sp., *Cephalosporium* sp., *Sclerocystis* sp. ve *Nigrospora* sp. funguslarının yanı sıra diğeri bir yağlı fungus olan *Mortierella ramanniana* fungusunu da kullanmışlardır. Bu fungusların lipit içerikleri belirtilen yöntemle sırasıyla %7,51, %5,12, %6,98, %5,90, %5,87, %6,95 olarak bulunmuştur.

Economou vd. (2010) sorgum pekmezi ile hazırladıkları besiyerinde *Mortierella isabellina* fungusunu lipit biriktirme kapasitesine ve biyodizel üretimine azalan azot kaynağının olumlu yönde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar palmitik ve oleik asitin başlıca görülen yağ asitleri olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılara göre

fungall lipit içersinde uzun alifatik zincirlerin bulunmuyor olması bu hammaddeden üretilcek biyodizelin yüksek kalitede olacağını göstermektedir.

Çalışmamızda meyve posalarından alınan (P1, P2, E1, E2, E3, ) rneklerden elde edilen fungusların üretmiş olduğu yağ miktarının sonuçlarını elimizde bulunan standartlarla (STD1, STD2, STD3, STD4, STD5) karşılaştırıldığında elde ettiğimiz sonuçlar şu şekildedir;  ve E2 rneklerinin sonuçları (=2,22 ve E2=2,257) STD2'ye (SDT2=2,11) yakın olduğu görülmüştür. E1, E3, P1, P2 rneklerinde (E1=2,456 E3=2,620 P1=2,649 P2=2,760) STD3'e (2,47) yakın olduğu görülmüştür. Elde edilen verilere göre spektrofotometre sonuçları arttıķķa yağ üretiminin azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre en fazla yağ retimi P2 de görülmüştür. P1 örneğindeki yağ retimi P2'yi takip etmektedir (izelge 4.4).

Liu ve Zhao (2007) *Lypomyces starkeyi* ve *Rhodotorula toruloides* maya hücrelerinin lipid üretimlerini pH'ı 6 olan, 70 g/L glikoz, 2,0 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerinde araştırmışlar ve lipid içeriklerini sırasıyla %50,2 ve %58,0 olarak bulmuşlardır. *Rhodospordium sp.*, *Rhodotorula sp.* ve *Lypomyces sp.* gibi bazı maya türleri hücrelerinde kuru ağırlıklarının %70'den fazla lipid biriktirebilme yeteneğine sahiptir. (Zhao *et al.* 2011). Bunun yanı sıra yüksek lipid içeriğine sahip funguslara örnek olarak *Mortierella sp.* cinsine ait türler verilebilmektedir. iek vd. (2013) yaptıkları çalışma sonucunda maksimum fungal lipid retimi *Fusarium proliferatum* ile 24,96 g/L olarak bulmuşlardır. Mahmood ve Tajammul (2009) kullanılmış çay üzerinde gelişen *Aspergillus niger* den %57,49 verimle biyoetanol üretmiştir. Bu alışma raporunda kullanılmış çayın (katı atık) sadece biyodizel ve biyoetanol değil ayrıca hidrokarbon yakıt gazlarının üretimi içinde kullanılabilir olduğu gibi ilginç bulgulara ulaşmışlardır.

Vicente vd. (2009) *Mucor circinelloides* Fungal lipit oluşturan baslıķa yağ asitlerinin sırasıyla %37,1 oranında C18:1, %14,3 oranında C18:2 ve %18,5 oranında C18:3 olduğunu belirlemişlerdir. Yağlı mayalar ve küfler çoklu doymamış yağ asitlerince zengin triaçilgliserol biriktirmektedirler. Bu hücrelerde en fazla rastlanan yağ asitleri arasında C18:1, C18:2, C16:0, C16:1 gelmektedir. Yağlı maya ve fungusların biyodizel üretimi için alternatif yağ kaynakları olduğu söylenebilmektedir (Meng *et al.* 2009).

Triasilgliserollerden (TAG'ler) türetilen Yağ asidi metil esterleri (FAME) biyodizel hazırlanması için kullanılan en yaygın bileşendir. Şu anda TAG elde etmek için bitkisel ve hayvansal yağlar kaynak olarak kullanılmaktadır ancak bu kaynaklardan biyodizel üretiminde yağlı tohumların elde edilebilmesi ve gıda rekabeti gibi bazı sınırlamaları vardır. Oysa biodizel üretiminde mikrobiyal yağların (Tek hücre yağı, SCO) kullanımında bu tür sınırlamaların olmaması dikkat çekicidir. Bu amaçla oleaginous (yağlı mikroorganizmalar (bakteriler, algler ve funguslar)) kullanılabilir. Tek hücre yağı (THY) olarak bilinen mikrobiyal yağlar yağlı mikroorganizmalar tarafından üretilir. Yağlı mikroorganizmaların bazıları kuru biyokütle ağırlığı %80 w/w yağ içerir bu nedenle biyodizel üretiminde hammadde olarak ümit vericidir. Ayrıca mikroorganizmalar atık substratlar üzerinde geliştirilebilir. Bu hem bioremediasyon prosesleri için fayda sağlar hemde ekonomik önemi olan ürünler mikroorganizmalardan elde edilir. Kimyasal bileşimi bakımından oldukça zengin olan meyve posalarının hayvan beslenmesinde kullanılanlar hariç önemli bir kısmı, kurutma ve depolama maliyeti yüksek olduğundan atık olmaktadır. Meyve suyu endüstrisi atıklarının biyoproseslerde substrat olarak kullanımı, atıklardan doğan kirlilik probleminin çözümü için önemli bir alternatiftir. Çalışmamızda atık meyve posalarının substrat olarak kullanılabilecek fungal izolatlar elde edilerek, biyodizel üretiminde verimleri araştırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler *Aspergillus fumigatus* izolatlarının biyodizel üretiminde kullanılabileceğini göstermektedir. Bundan sonraki çalışmalar. Meyve posalarından hazırlanacak besiyerlerinde maksimum biyodizel üretiminin sağlandığı optimum koşulların belirlenmesi üzerine olmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Akdağ, E. (2011). Türkiye Meyve Suyu vb. Ürünler Sanayi MEYED Raporu, Türkiye.
- Alvarez, H., M. and Steinbuchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*, **60**: 367–376.
- Bhatti, H., N., Hanif, M., A., Qasim, M. and Rehman, A. (2008). Biodiesel production 3 from waste tallow. *Fuel*, **87**: 2961-2966. *Bioresource technology*, **102(10)**: 5815–5823.
- Cemeroğlu, B. (2004). Meyve ve Sebze flleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, Türkiye, 670 s. Türkiye Meyve Suyu v.b. Ürünler Sanayi MEYED Raporu, Türkiye.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**: 294–306.
- Chung, K., H., Kim, J. and Lee K., Y. (2009). Biodiesel production by transesterification of duck tallow with methanol on alkali catalysts. *Biomass and Bioenergy*, **33**: 155-158.
- Çakmak, Ö., Başhan, M. ve Bolu, H. (2005). *Monosteira lobulifera* Reut. (Heteroptera: Tingidae)’nın Fosfolipid ve Triasilgliserol Fraksiyonundaki Yağ Asidi Bileşimi. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **17(4)**: 637-643.
- Çiçek, F. ve Yalçın, E. (2013). Fungal lipid production and usage in biodiesel production. *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry)*, **38(2)**: 193–199.
- Dey, P., Banerjee, J. and Maiti, M., K., (2011). Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates – *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*. **102**:5815–5823.

- Economou, C. N., Marki, A., Aggelis, G., Pavlou, S. and Vayenas, D. V. (2010). Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Technology*, **101**: 1385–1388.
- Ekşi A, Arık N. (1982). Kayısı ve şeftali palper posası ile atılan besin ögesi miktarı. *GIDA*, **3**: 99-102
- Evans, C. T. and Ratledge, C. (1983). A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids*, **18**: 623-629.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**: 405–416.
- Gullin. B., Falqué, E., Alonso, J. L., Paraj, J. C. (2007). Evaluation of apple pomace as a raw material for alternative applications in food industries. *Food Technology and Biotechnology*, **45 (4)**: 426-433.
- Hansson, L. and Dostálek, M. (1986). Effect of culture conditions on fatty acid composition in lipids produced by the yeast *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **63**: 1179-1184.
- Helwani, Z., Othman, M. R., Aziz, N., Fernveo, W. J. N. and Kim, J. (2009). Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. *Fuel Processing Technology*, **90**: 1502-1504.
- Hirano, A., Hon-Nami, K., Kunito, S., Hada, M. and Ogushi, Y. (1998). Temperature effect on continuous gasification of microalgal biomass: theoretical yield of methanol production and its energy balance. *Catalysis Today*, **45**: 399-404

- Karatay, S. E. (2010). Mikrobiyel Lipitlerin Biyodizel Üretiminde Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Keskin A. (2005). Tall Yağı Esaslı Biyodizel ve Yakıt Katkı Maddesi Üretimi ve Bunların Dizel Motor Performansı Üzerindeki Etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Knothe, G. (2010). Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, **36**: 364-373.
- Li, Y., Zhao, Z. K. and Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microbiology Technology*, **41**: 312-317.
- Liu, B., Zhao and Z. K., (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, **82**: 775-780.
- Lorenz, R. T. and Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, **18**: 160-167.
- Ma, F. and Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, **70**: 1-15.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano and N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 217-232.

- Meher, L. C., Sagar, V. D., Naik and S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **10**: 248-268.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. and Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, **34**: 1-5.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. and Xian, M. (2009). Oleaginous fungus, *Biochemical Engineering Journal*, **48**: , 22–27.
- Panwar, N. L., Hemant, Y., Shrirame, N. S., Jindal, R. S. and Kurchania, A. K. (2010). Performance evaluation of a diesel engine fueled with methyl ester of castor seed oil. *Applied Thermal Engineering*, **30**: 245–249.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, and G., (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, **95**: 287–291.
- Peng X, Chen H. (2008). Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresource Technology*, **99**: 3885-9.
- Peng, X., Chen and H. (2008). Rapid estimation of single cell oil content of solid-state fermented mass using near-infrared spectroscopy, *Bioresource Technology*, **99**: 8869–8872.
- Pourbafrani, M., Forgács, G., Horváth, I. S., Niklasson, C. and Taherzadeh, M. J. (2010). Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*, **101(11)**: 4246-4250.
- Qiang L., Wei, D. and Dehua, L., (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, **80**: 749–756.

- Ratledge C. (1978). Lipids and fatty acids. *Economic Microbiology*, **2**: 263-302.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimistry*, **86**: 807–815.
- Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y. and Yokoyama, S. Y. (1995). CO₂ fixation and oil production through microalga. *Energy Conversion and Management*, **36**: 729–731.
- Scragg, A. H., Morrison, J. and Shales, S. W. (2003). The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**: 884–889.
- Steinbu, C. A. and Fu, C. B.. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnology*, **16**: 419–427.
- Tariq, M. and Syed, T. H. (2009). Nanobiotechnology for the production of biofuels from spent tea. Nano Science and Catalysis Division, National Centre for Physics, Quaid-i-Azam University campus, Shahdrah valley road, Islamabad, Pakistan.
- Tehlivets O, Scheuringer K. and Kohlwein, S D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1171(83)**: 255-270.
- Vicente, G., Bautista, L. F., Gutierrez, F. J., Rodriguez, R., Martinez, V., Rodriguez-Frometa, R. A., RuizVazquez, R. M., Martinez, S. T. and Garre, V. (2010). Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. *Energy Fuels*, **24**: 3173–3178.
- Vicente, G., Bautista, L. F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F. J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S. and Garre, V. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus, *Biochemical Engineering Journal*, **48**: 22–27.

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Martín-Sánchez, A., Sánchez-Zapata E., Fernández-L., Pez, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C. and Pérez-Ivarez, J. A. (2012). Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses powder co-product. *Journal of Food Engineering*, **110**(2): 220-224.
- Wilkins, M. R., Widmer W. W. and Grohmann, K. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, **42**: 1614-1619.
- Xue, F., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemical*, **41**: 1699-1702.
- Yurdagel, Ü., Yaman, Ü. R., Baysal, T. (1997). Meyve Sebze İşleme Sanayinde Atık Su Arıtılması, Artık ve Atıkların Değerlendirilmesi, Ege Üniveristesi Basımevi, Bornova-İzmir.
- Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H. and Zhao, Z. K. (2011). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **38**: 627–632.
- Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y. S., Simmons, C. W., Zhang, R., Jenkins, B., M. and VanderGheynst, J. S. (2012). Ensilage and Bioconversion of Grape Pomace into Fuel Ethanol. *Journal of agricultural and food chemistry*, **60**(44): 11128-11134.

İnternet Kaynakları

- 1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 02.03.2016



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Büşra AYDIN
Doğum Yeri ve Tarihi : MANİSA-Salihli / 12.12.1987
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0 554 483 97 03 / canky21@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Uşak Lisesi (2002-2005)
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü (2009-2013)
Yüksek Lisans :

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uşak Uğur Dershanesi (2013-2014)
Şehit Sadık Kozak Anadolu Lisesi (2014-2015)