

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***MORTIERELLA RAMANNIANA* KÜFÜNÜN β -KAROTEN ÜRETİMİNDE
KULLANILACAK BESİYERİ BİLEŞİMİNİN VE FERMENTASYON
PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU**

Hatice Kübra KIZILAY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***MORTIERELLA RAMANNIANA* KÜFÜNÜN β -KAROTEN ÜRETİMİNDE
KULLANILACAK BESİYERİ BİLEŞİMİNİN VE FERMENTASYON
PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU**

Hatice Kübra KIZILAY

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

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

***MORTIERELLA RAMANNIANA* KÜFÜNÜN β -KAROTEN ÜRETİMİNDE
KULLANILACAK BESİYERİ BİLEŞİMİNİN VE FERMENTASYON
PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU**

Hatice Kübra KIZILAY

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından FYL-2019-4826 nolu proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MORTIERELLA RAMANNIANA* KÜFÜNÜN β -KAROTEN ÜRETİMİNDE
KULLANILACAK BESİYERİ BİLEŞİMİNİN VE FERMENTASYON
PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU**

Hatice Kübra KIZILAY

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 07/09/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Muammer DEMİR (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖZET

***MORTIERELLA RAMANNIANA* KÜFÜNÜN β -KAROTEN ÜRETİMİNDE KULLANILACAK BESİYERİ BİLEŞİMİNİN VE FERMENTASYON PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU**

Hatice Kübra KIZILAY

Yüksek lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muammer DEMİR

Temmuz 2020; 83 sayfa

Karotenoidler yağda çözünen pigmentlerdir. Sarıdan kırmızıya değişen aralıkta renklere sahiptir. Temel yapısında konjuge çift bağ serisi bulunan tetraterpenden oluşur. Karotenoidler doğal boya özelliğine sahip olup gıda, farmasötik, kozmetik, yem sanayi gibi farklı alanlarda kullanımı oldukça geniştir. İnsan ve hayvan sağlığına olan yararlı etkilerinden dolayı son zamanlarda karotenoidlere olan ilgi artmıştır. Doğal yollardan karotenoid elde edilmesinde hayvansal ve bitkisel kaynaklardan faydalanılmaktadır. Ancak coğrafi, iklim, mevsim, çeşit vs gibi kısıtlayıcı sebeplerden dolayı oluşan kaynak kıtlığı, araştırmacıları karotenoidleri mikrobiyal yollardan üretime yönlendirmiştir. Özellikle son zamanlarda mikrobiyal yolla β -karoten ve okside olmuş türevlerinin üretimine odaklanılmıştır. Biyoteknolojik olarak üretilen β -karotein miktarının artırılması için kritik faktörlerin belirlenip çeşitli istatistik dizayn programları ile optimizasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sayede endüstriyel çapta yeterli miktarda üretimi yapılabilmekte, böylece gıda, yem ve farmasötik sanayi sahalarındaki yeri giderek genişlemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında Mortierellaceae ailesinin bir üyesi olan *Mortierella ramanniana* küfö kullanılarak β -karoten üretiminin optimizasyonu çalışılmıştır. Optimizasyonun ilk aşamasına geçmeden önce besiyerinin temel iki bileşeni olan karbon ve azot kaynağının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için karbon kaynağı olarak 9 farklı şeker (mannoz, laktoz, sukroz, ksiloz, maltoz, glukoz, galaktoz, arabinoz, fruktoz) kullanılmış, bunların arasından laktoz, maltoz ve glukoz seçilmiştir. Sonrasında seçilen bu şekerler ile 6 farklı azot ((NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, KNO₃, Üre, Glisin, Asparajin) kaynağı kullanılarak üretimler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre besiyeri optimizasyonu için karbon kaynağı olarak laktoz, azot kaynağı olarak ise KNO₃ seçilmiştir. Ardından Plackett-Burman tasarımı 8 faktörle (laktoz, KNO₃, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂.2H₂O, maya, mineraller) oluşturulmuştur. Deneysel veriler alındıktan sonra yapılan çoklu regresyon ve varyans analizi (ANOVA) sonuçları değerlendirildiğinde, azot kaynağı olan KNO₃ ve maya ekstraktının β -karoten üretiminde çok kritik olduğu belirlenmiştir.

Optimizasyonun ikinci aşamasında ise Plackett-Burman sonuçlarında etkili olan azot kaynağının, besiyerinde karbon kaynağı ile olan oranının (C:N), karbon kaynağı

olarak laktoz konsantrasyonunun ve fermentasyon koşullarından olan çalkalama hızının, β -karoten ve biyokütle üretimine olan etkileri Yanıt Yüzey Yöntemlerinden olan Box Behnken deneme deseni kullanılarak incelenmiştir. Tasarımın önerdiği deneyler sonucunda bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerine olan etkilerini ifade eden modeller oluşturulmuş olup modellerin uygunluğu varyasyon analizleri (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda optimum olarak belirlenen koşullar; laktoz konsantrasyonu, 32.42 g/L; C:N oranı 20:1, çalkalama hızı ise 130 rpm olarak tespit edilmiştir. Bu şartlar altında β -karoten üretimi 1.141 mg/L ve biyokütle üretimi ise 13.14 g/L olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçların, istenen hedefe ulaşma fonksiyonuna ait değeri 0.925 olarak bulunmuştur. Kontrol besiyeri ile karşılaştırıldığında, β -karoten üretimi 564.3 μ g/L'den 1141 μ g/L'e, biyokütle üretimi ise 10.01g/L'den 13.14 g/L'ye çıkarılmıştır. Optimizasyon çalışması sonucu β -karoten üretimi iki katına, biyokütle üretimi ise 1.3 katına çıkarılmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: β -karoten, Karbon:Azot oranı, *Mortierella ramanniana* Plackett-Burman, Yanıt yüzey metodu

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Muammer DEMİR (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF β -CAROTENE PRODUCTION AND FERMENTATION PARAMETERS OF *MORTIERELLA RAMANNIANA*

Hatice Kübra KIZILAY

MSc Thesis in, Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Muammer DEMİR

July 2020; 83 pages

Carotenoids are lipid soluble pigments that have yellow to red colour. Also They have conjugated double bond in their backbones forming tetraterpenes. Carotenoids are vital natural grade dyes that have wide range of areas used in as food, pharmaceuticals, cosmetics, feed industry. The undersatnding of having beneficial effects of carotenoids on human and animal health have caused growing attention on carotenoids recently. Most of the carotenoid productions are synthesized chemically but a few of them are synthesized by natural ways as plants. However, the source scarcity results from season, climate, location dependent plant growing leads reseachers to obtain carotenoids from other sources as biotechnologically. Especially last decade, researcher have focused on production of β -carotene and its oxidized derivatives. It can be done that critical factors are determined during optimization study to increase in production rate of β -carotene. Thus, β -carotene production can be produced suffient amount in terms of industrial scale. So the utility of the compound with incresing rate can be involved in food, feed and pharmaceutical areas of industry.

In this study, *Mortierella ramanniana*, one of a members of Mortierellacea family, is used in β -carotene production and optimization of the production is the main topic of this study. Prior to the first stage of optimization, two main compounds found in the medium were assessed. 9 different carbon sources and 6 different nitrogen sources were tried to produce maximum amount of β -carotene. First trial resulted in lactose, maltose and glucose selection as a best source of β -carotene production. After that six nitrogen sources were assayed with these three carbon sources. As a result of these trials lactose was selected as the best carbon source and KNO_3 as nitrogen source. In the first step of optimization Plackett-Burman design was used with 8 factors for optimizing the medium ingredients. Multiple regression and variance analysis of experimental data were assessed after Plackett-Burman runs had been done. As a result, It was determined that nitrogen sources KNO_3 and yeast extract were statistically important for *Mortierella ramanniana* while producing β -carotene.

In the second stage of optimization, Box-Behnken design was used which is one of the response surface methods. In this step, effects of C:N ratio, lactose concentration and agitation rate on β -caroten production and biomass accumulation were studied. Following the runs proposed by the Box Behnken design were done, the models which

are express that the effects of independent variable on response were acquired. The selected model sufficiency was controlled by checking variance analysis (ANOVA) and multiple regression analysis results. After optimization process, the optimum contition were determined as lactose concentration of 32.42 g/L, C:N 20:1 and agitation rate 130 rpm. Under these conditions, β -carotene production was 1141 μ g/L and biomass accumulation was 13.14 g/L. It is stated that β -carotene production was increased two times and biomass accumulation was increased 1.3 times as a compared to the control medium.

KEYWORDS: β -carotene, *Mortierella ramanniana*, Carbon:Nitrogen ratio, Plackett-Burman design, response surface methods.

COMMITTEE: Assist. Prof. Muammer DEMİR (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Assist. Prof. Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖNSÖZ

Tez çalışması kapsamında *Mortierella ramanniana* kullanılarak β -karoten üretilmesi ve kullanılan besiyeri bileşimi ile fermentasyon parametrelerinin optimizasyonu çalışılmıştır. Mikroorganizma kaynaklı ticari üretimi bitkisel kaynaklara göre oldukça verimli olan β -karotenin elde edilmesi, iklim ve coğrafi şartlardan bağımsız olduğu için gerekli biyoteknolojik prosesin de yönetilmesi oldukça kolaydır. Ayrıca, β -karotenin karotenoidler arasında farmakolojik olarak etkilerinin oldukça fazla olması dolayısıyla kolay ve yüksek miktarda elde edilmesi önem kazanmıştır.

Tez çalışmam sırasında değerli bilgilerini ve tecrübesini benimle paylaşarak destek olan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Muammer DEMİR'e, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Doç. Dr. İrfan TURHAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez süresi boyunca desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e ve Prof. Dr. Mehmet İNAN'a, değerli fikirleri ile tezime katkı sağlayarak bilgi birikimime birçok şey katan Dr. Öğr. Üyesi Firuze ERGİN'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Çalışmalarım boyunca laboratuvar ortamını paylaştığım arkadaşlarım Aysen Güher GÜNDEŞ, Merve AL ve Çiğdem HÖKELEKLİ'ye ve çalışmalarına laboratuvarında kolaylık sağlayan Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e ve Arş. Gör. Aybige ÇAKMAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmasını mali yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her anında olduğu gibi çalışmalarım sırasında da yanımda hissettiğim değerli ailem, arkadaşlarım ve sevgili yol arkadaşım Arş. Gör. Yunus Emre KISAÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. β -karoten Yapısı ve Farmakolojik Etkileri	5
2.1.1. β -karotenin antioksidan etkisi	6
2.1.2. β -karotenin antikanser etkisi	6
2.1.3. β -karotenin kardiyovasküler sistem üzerine etkisi	7
2.1.4. β -karotenin cilt koruyucu etkisi	7
2.1.5. β -karotenin gıda endüstrisindeki rolü	7
2.2. β -karoten Üretim Prosesleri	8
2.2.1. Yapay yollarla β -karoten üretimi	8
2.2.2. Doğal kaynaklardan β -karoten elde edilmesi	9
2.2.3. Biyoteknolojik yollarla β -karoten elde edilmesi	9
2.2.4. Küflere özgü karotenojenik mevalonat metabolik yolu	13
2.2.5. Mikrobiyal karotenoid üretiminde genel alt işlem basamaklar	14
2.3. β -karoten Üretimini Etkileyen Parametreler	15

2.3.1. Fermentasyon ortamı sıcaklığının etkisi	16
2.3.2. Işığın etkisi	16
2.3.3. Havalandırmanın etkisi	17
2.3.4. Çalkalama hızı	18
2.3.5. Karbon:Azot oranının (C:N) etkisi	18
2.3.6. Karbon katabolit represyonu.....	19
2.3.7. pH etkisi	19
2.3.8. Katkı maddelerinin etkisi.....	19
2.3.9. Mikrobiyal morfolojinin β -karoten üretimine etkisi.....	20
2.4. Optimizasyon	21
2.4.1. Plackett-Burman tasarımı	21
2.4.2. Yanıt yüzey yöntemi.....	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Araştırmada kullanılan mikroorganizma	27
3.1.2. Küf kültürünün gereksinimleri ve biyolojik aktivitesi.....	27
3.2. Misel Süspansiyonu Hazırlanması.....	28
3.3. Ön Kültür Hazırlanması.....	28
3.4. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması	28
3.5. Biyokütlenin besi ortamından ayrılması	29
3.6. Biyokütlenin Kurutulması.....	30
3.7. Biyokütleden Pigment Ekstraksiyonu.....	30
3.8. Besi Ortamında HPLC ile Şeker Analizi	30
3.9. Biyokütlerde β -karoten Miktarının Tayini	31
3.10. β -karoten Üretimi İçin Besiyeri Bileşenlerinin Plackett-Burman Tasarımı ile İncelenmesi	31

3.11. Fermentasyon Ortamını Etkileyen Koşulların Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile İncelenmesi.....	33
3.12. Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi.....	34
3.13. Optimizasyon	35
3.13.1.Optimum koşulları barındıran besiyerinde kinetik parametrelerin belirlenmesi	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının, <i>Mortierella ramanniana</i> ile β -karoten Üretiminde Etkilerinin İncelenmesi	38
4.2. Besiyeri Kompozisyonunun Plackett-Burman Tasarımı ile İncelenmesi.....	39
4.3. β -karoten Üretimi Amacıyla En Uygun Fermentasyon Ortamı Seçimi İçin Sonuçların Değerlendirilmesi	45
4.4. Araştırmada Seçilen Bağımsız Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi	45
4.5. <i>Mortierella ramanniana</i> ile Biyokütle ve β -karoten Üretiminde Kullanılan Besiyeri ve Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	59
5. SONUÇLAR.....	67
6. KAYNAKLAR.....	69
7. EKLER	77
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Mortierella ramanniana* Küfünün β -karoten Üretiminde Kullanılacak Besiyeri Bileşiminin ve Fermentasyon Parametrelerinin Optimizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih 09/07/2020

Hatice Kübra KIZILAY



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

E_d	: Etkisiz faktörlerin etkisi
F-testi	: Fisher testi
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
P	: Üretilen ürün miktarı
p	: p-değeri
pH	: Hidrojen gücü
ppm	: Milyonda bir kısım
R^2	: Regresyon katsayısı
R^2_{adj}	: Düzeltilmiş regresyon katsayısı
Rpm	: Dakikada devir sayısı (devir/dakika)
S	: Şeker tüketimi
T	: Student T- testi
V_{eff}	: Faktörlerin etkilerinin varyansı
V_{vm}	: Dakikadaki tank hacmi
X_0	: Fermentasyon başlangıcındaki hücre kütlesi
X_{max}	: Fermentasyonun son günündeki hücre kütlesi
X_t	: 't' inci bağımsız değişken
y (+)	: Faktörün maksimum değeri
y (-)	: Faktörün minimum değeri
$y'-y$	: Gözlenen ve tahminlenen değer arasındaki fark
Y_t	: 't' inci yanıt değişkeni
β_0	: Model sabiti
β_t	: Model katsayıları
ε	: Hata terimi

Kısaltmalar

%CV	: Yüzde varyasyon katsayısı
(NH ₄) ₂ HPO ₄	: Diamonyum fosfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Diamonyum sülfat
3D	: Üç boyutlu
ANOVA	: Varyans analizi
ARA	: Araşidonik asit
ATP	: Adenozintrifosfat
ATTC	: American type culture collection
BBD	: Box behnken deseni
C:N	: Moleküler karbon/ azot oranı
CCY	: The culture collection of yeasts
Co(NO ₃) ₂ .H ₂ O	: Kobalt (II) nitrat
CPTA	: 2-(4-klorofeniltio) trietilamin
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır (II) sülfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DoE	: Deney tasarımı
DSMZ	: Alman kültür koleksiyonu
E160a	: Katkı maddeleri listesindeki karoten kodu
FeCl ₃ .6H ₂ O	: Demir (III) Klorür
FİE	: Gıda ve İçecek katkıları platformu
GGDP	: Geranilgeranil difosfat
HMG-CoA	: Hidroksimetilglutaril-CoA.
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IUPAC	: Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği
KH ₂ PO ₄	: Mono potasyum fosfat

$K_{L\alpha}$	: Kütle transfer katsayısı
KNO_3	: Potasyum nitrat
KO	: Kareler ortalaması
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
Lux	: Aydınlanma şiddetidi
MEP	: Metil-deritriol-4-fosfat
$MnSO_4.5H_2O$	: Manganez (II) sülfat
MTCC	: Microbial type culture collection and gene bank
MVA	: Mevalonik asit
Na_2HPO_4	: Disodyum fosfat
NaCl	: Sodyum hidroksit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PBD	: Plackett-Burman deseni
pO_2	: Dihidrojenin kısmi basıncı
PPDP	: Prefitoen difosfat
PRESS	: Tahmini kalıntı hataların kareler toplamı
rDNA	: Ribozomal deoksiribonükleik asit
RID	: Refraktif indeks dedektörü
RSM	: Yanıt yüzey yöntemi
SD	: Serbestlik derecesi
UVA	: Görünür bölge (315–380 nm)
UVB	: Görünür bölge (280–315nm)
v/v	: Hacim/hacim
v/v/v	: Hacim/hacim/hacim
$ZnSO_4.7H_2O$	: Çinko Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. β -karotenin kimyasal yapısı (Borowitzka 1992)	5
Şekil 2.2. β -karotenin hücre içerisindeki yeri (Sorour vd. 2017)	13
Şekil 2.3. Karotenoid biyosentez izyolu (Cardoso vd. 2017).....	14
Şekil 2.4. Karotenoid üretiminin genel alt işlem basamakları (Cardoso vd. 2017.....	15
Şekil 2.5. Box-Behnken tasarımı.....	24
Şekil 2.6. Lineer (I), polinomiyal (II) ve kübik (III) modeller	25
Şekil 4.1. β -karoten üretimi üzerine pozitif ve negatif etkiye sahip besiyeri bileşenleri	42
Şekil 4.2. Besiyerindeki bileşenlerin β -karoten üretimine olan standartlaştırılmış etkilerinin yarı normal grafiği	43
Şekil 4.3. Besiyerindeki bileşenlerin β -karoten üretimine olan standartlaştırılmış etkilerinin pareto grafiği.....	43
Şekil 4.4. Besiyerindeki bileşenlerin β -karoten üretimine olan standartlaştırılmış etkilerinin normal grafiği.....	44
Şekil 4.5. β -karoten için modelden (Eşitlik 4.2) tahminlenen değerlere karşı deneysel veriler.....	50
Şekil 4.6. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve C:N oranının (X_2), üretilen maksimum β -karoten konsantrasyonu üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey, (b) kontur grafikleri ($X_3 = 180$ rpm).....	51
Şekil 4.7. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve çalkalama hızının (X_3), üretilen maksimum β -karoten miktarı üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (X_2 , C:N= 50:1).....	52
Şekil 4.8. C:N oranı (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum β -karoten üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($X_1 = 27.5$ g/L)	53
Şekil 4.9. Maksimum biyokütle üretimi için modelden (Eşitlik 4.3) tahminlenen değerlere karşı deneysel veriler	55
Şekil 4.10. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve C:N oranının (X_2) maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($X_3=180$ rpm)	56

Şekil 4.11. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (X_2 , C:N = 50:1).....	57
Şekil 4.12. C:N oranı (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($X_1 = 27.5\text{g/L}$)	58
Şekil 4.13. Box-Behnken tasarımında optimize edilen besiyerinde kalan laktoz ile üretilen β -karoten ve biyokütlenin zamana bağlı değişimi	60



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. β -karoten üretimi için kullanılan mikroorganizmalar (Azmi ve Thakur 2013)	11
Çizelge 3.1. Kontrol besiyeri bileşimi	29
Çizelge 3.2. Belirlenen karbon ve azot kaynakları	32
Çizelge 3.3. Plackett-Burman tasarımında kullanılan değişkenlerin düşük ve yüksek seviyedeki konsantrasyonları	32
Çizelge 3.4. Box Behnken deneme deseninde kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin seviyeleri	33
Çizelge 3.5. Bağımlı değişkenler ve sembolleri	34
Çizelge 3.6. Optimizasyon aşamasında yanıt için kullanılan hedefler ve değişkenlerin değerleri	35
Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynakları ile yapılan fermentasyonlar sonucu elde edilen β -karoten ve biyokütle değerleri	38
Çizelge 4.2. Farklı azot kaynakları ile yapılan fermentasyonlar sonucu elde edilen β -karoten ve biyokütle değerleri	39
Çizelge 4.3. PBD deseni ve fermentasyonlar sonucu elde edilen β -karoten miktarları	40
Çizelge 4.4. Üretilen β -karoten için hesaplanan etki değerleri ve katsayılar	41
Çizelge 4.5. Modelin varyans analiz (ANOVA) sonuçları	42
Çizelge 4.6. Box Behnken tasarımındaki bağımsız değişkenlerin değerleri	46
Çizelge 4.7. Yanıt değişkenlerinin deneysel ve tahminlenen değerleri	47
Çizelge 4.8. X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişkenlerinin β -karoten üretimi üzerine etkilerinin varyans analiz (ANOVA) sonuçları	48
Çizelge 4.9. Eşitlik 4.2'den elde edilen modelin çoklu regresyon istatistikleri	50
Çizelge 4.10. X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişkenlerinin biyokütle üretimi üzerine etkilerinin varyans analiz (ANOVA) sonuçları	54
Çizelge 4.11. Eşitlik 5.3'den elde edilen modelin çoklu regresyon istatistikleri	56
Çizelge 4.12. Box-Behnken tasarımında optimize edilen fermentasyon ortamının istenebilirlik fonksiyonu	59

Çizelge 4.13. Box-Behnken tasarımı ile optimize edilen besiyerinde gerçekleştirilen fer-entasyona ait gelişim ve üretimin kinetik parametreleri.....	61
Çizelge 4.14. Bağımlı değişkenlerin optimum koşullarda gerçekleştirilen deneysel verileri ile Eşitlik 4.5 ve 4.3 kullanılarak elde edilen teorik değerleri.....	62



1. GİRİŞ

Tek hücre yağı olarak da bilinen mikrobiyel yağların üretimi, yağlı olarak nitelendirilen mikroorganizmalar kullanılarak 1870'lerin ortalarından beri yapılabilmekle birlikte ticari olarak üretime başlaması son 30 seneyi bulmuştur (Ratlidge 2013). Tek hücre yağı üretimi ile önemli çoklu doymamış yağ asitleri içeren katma değeri yüksek yağlar elde etmek mümkün olabilmektedir (Ratlidge ve Wynn 2002). Sağlık için önemli olan bu yağ asitlerinin üretimi yanında, mikrobiyal yağ üretimi proseslerinin tarımsal ve endüstriyel atıkların substrat olarak değerlendirilmesi ile çevre kirliliği sorununu bir nebze olsun azaltmak ve biyodizel üretilerek katma değer kazandırmak gibi avantajları da vardır (Ochsenreither 2016). Bünyesinde kuru biyokütlesinin %20 sinden daha fazla lipid biriktirebilen mikroorganizmalara yağ veren türler denilmektedir. İntraselüler olarak üretilen yağ sadece mikrroorganizmanın açlık durumunda kullanılmayıp depo materyali olarak da değerlendirilmektedir (Shahidi 2005). Triasilgliseroller de içeren yağın depolanabilmesini tetikleyen etmenlerin arasında karbon kaynağı fazlalığı ve sınırlayıcı bir besinin gerekliliği vardır. Genel olarak sınırlayıcı besin azot olmaktadır. Mikrobiyal yağ üretimi çalışmalarında asıl amaç, fermentasyon sonucu elde edilen ürünün, insan gıdası olarak kullanılan bitkisel ve hayvansal yağların yerine kullanılabilecek nitelikte olmasıdır (Darcan ve Sarıgül 2016). Ayrıca tek hücre yağı üretiminin; yüksek biyokütle ve lipid verimi, mevsimsel ve iklime bağlı değişikliklere hassasiyet göstermemesi açısından bitki ve hayvanlardan elde edilen yağların üretimine göre oldukça avantajlıdır. Kültür koşullarının modifiye edilmesi ve optimizasyonu ile alınan yağ verimi de yükselebilmektedir. Bununla beraber genetik modifikasyon metotları kullanılarak da daha hızlı ve kolay üretim sağlanabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı mikrobiyal yağlar ve diğer tek hücre metabolitleri son zamanların oldukça ilgi çeken konulardandır (Saygün 2017).

Mikrobiyal yağ üretiminde bir diğer önemli nokta ise yağda çözünen fonksiyonel bileşiklerdir. Birçok küf ve fotosentetik olmayan bakteriler tarafından üretilen bu bileşiklerden bir kısmı da karotenoidlerdir. (Avalos ve Carmen Limón 2015). Karotenoidler, meyvelere ve çiçeklere parlak rengini veren önemli pigment gruplarını (konjuge çift bağ serisi) içerir (Papp 2015). Gıda endüstrisinde, farmasötik sanayinde ve kozmetik amaçlı olarak oldukça sık kullanılan karotenoidler, insan ve hayvan sağlığına olan önemli etkilerinden dolayı oldukça dikkat çekmektedir (Papp 2015). Karotenoidlerin A vitamininin öncü maddesi olmasının yanında, dejeneratif yönü olan kanser, kardiyovasküler hastalıklar, maküler dejenerasyon ve katarakt gibi hastalıkların riskini azaltan biyoaktif özellikleri de vardır (Mata-Gómez vd. 2014). Karotenoidler, DNA'ya zarar verdiği bilinen ve mutajenik olabilen tekli oksijenin enerjisini karotenoid zincirinin içerisine absorplama görevi görürler. Böylece karotenoid molekülü parçalanarak diğer moleküllerin hasardan korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca karotenoidler, çoklu doymamış yağ asitleri yıkımı üzerinden başlayan serbest radikal zincir reaksiyonunun başlamasına engel olabilmektedir. Bu da lipid membranlarının yapısının korunmasını sağlamaktadır. Bu şekilde yaşlanma sürecini yavaşatabilmektedir (Echavarri-Erasun ve Johnson 2001). Birçok hayvansal dokunun karotenoidleri üretilmediği, ancak onlara ihtiyaçlarının olduğu bilinmektedir (Hernández-Almanza vd. 2017). Bu nedenle dış kaynaklardan alınması zorunludur. İnsan ve hayvan beslenmesinde kullanılan karotenoidler, bitkisel kaynaklardan veya kimyasal sentez yolu ile elde edilmektedir. Karotenoidlerden; β -karoten, astaksanthin, lutein ve likopenin, lipid

fazında oldukça etkili antioksidan bileşiklerden oldukları bilinmektedir. Bu nedenle kullanım alanları da geniş olmaktadır. Gıda endüstrisinde; besin takviyesi, doğal gıda boyası, yem katkısı olarak kullanılmakla beraber farmasötik endüstrisinde; antioksidan, antikanserojen, immüno- modülatörler olarak ve kozmetik sanayinde de cilt koruyucu ürünlerde, tıraş sonrası losyonlarda, duş ürünlerinde, saç ürünlerinde, güneş koruyucularında kullanılmaktadır (Klein ve Buchholz 2013).

Küresel pazarda karotenoidlere olan talebin yıllık %3.5 oranında artış göstermesi ve 2014 senesinde 1.5 milyar dolar olan değerinin 2020 senesinde 1.8 milyar dolar olması beklenmektedir. Ayrıca karotenoid pazarında β -karoten için ayrılmış pay diğerlerine göre oldukça fazladır ve bu payın 2026 senesinde %4.2'lik artış göstermesi beklenmektedir (Anonymous 1). Nutrasötik bileşiklerden olan karotenoidlere talebin böylesi çok olması, karotenoidlerin ekonomik bir şekilde üretilmesi için yapılan çalışmaların artmasını sağlamıştır (Klein ve Buchholz 2013). Karotenoidlerin bir üyesi olan β -karotenin, 1980 yılından beri ticari olarak üretimi, Çin, Meksika, Amerika Birleşik Devletleri, İsrail gibi ülkelerde tek hücreli bir mikroalg olan *Dunaliella* kullanılarak yapılmaktadır. Bitkisel kaynaklara kıyasla mikroorganizmalardan ticari olarak oldukça verimli üretilen β -karotenin, iklim ve coğrafi şartlardan bağımsız olmasıyla biyoteknolojik prosesinin de yönetilmesi oldukça kolaylaşmaktadır (Dufossé vd. 2005). Ayrıca maliyeti düşük olan karbonhidrat kaynakları kullanıldığında mikrobiyal proses oldukça ekonomik avantaj sağlamaktadır (Abdelhafez vd. 2016). Literatür verilerine göre; bakteri ve bitkilerden elde edilen endüstriyel olarak önemli bazı karotenoidlerin (biksin ve onun türevi olan karotenoidler, lutein vb) küfler tarafından üretilmediği bilinmektedir. Ancak genetik çalışmalar sayesinde, küflerin heterolog konakçı olmasıyla bu karotenoidleri, bakteriler, arkeobakteriler ve bitkilere göre oldukça yüksek seviyede üretebildikleri bildirilmiştir (Echavarri-Erasun ve Johnson 2001). *Zygomycetes* küf alt sınıfı üyelerinin karotenoid üretimine bakıldığında, β -karoten üretiminin oldukça yaygın olduğu görülmektedir (Papp vd. 2015). Yapılan çalışmalara göre; *Phycomyces blakesleeanus* (Almeida ve Cerdá-Olmedo 2008), *Blakeslea trispora*, *Mucor circinelloides* (Avalos ve Carmen Limón 2015), *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* M29 (Attwood 1971) gibi küflerin β -karoten ürettiği ifade edilmektedir. Chlorophyceae sınıfı algler karotenoid üretimi açısından birincil derecede endüstriyel ilgi odağı olmaktadır. Bu sınıf içerisinde *Dunaliella*, *Chlorococcum* ve *Haematococcus*'un yüksek seviyede β -Karoten, kantaksantin ve astaksantin ürettiği tespit edilmiştir (Echavarri-Erasun ve Johnson 2001). Fungal türlerden elde edilen karotenoidlerin ikincil metabolizma ürünleri olduğu, bunların da mevalonate (MVA) metabolik yolu kullanılarak üretiminin gerçekleştirildiği bilinmektedir (Echavarri-Erasun ve Johnson 2001). β -karotenin, ekspanansiyel büyüme fazının sonlarına doğru üretildiği gözlemlenmiştir. β -karoten üretimi, besiyerinde azot kaynağının tükenmesi ile orantılı olarak başlamakta ve artmaktadır. (Attwood 1971)

Bu tez çalışması kapsamında, *Mortierella ramanniana* (DSM 62752) küfü β -karoten üretiminde kullanılmıştır. β -karoten üretiminin optimizasyonuna geçilmeden önce besiyerinin iki temel bileşeni olan karbon ve azot kaynaklarının tespit edilmesi amacıyla, öncelikle saf şekerler tercih edilmiş, ardından da seçilen karbon kaynakları ile azot kaynağının belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Üretilen biyokütle ve β -karoten miktarının arttırılması için iki basamaklı optimizasyon yapılmıştır. Bunun için ilk başta Plackett-Burman deneme deseni (PBD) kullanılmış olup desen Minitab® 16.0.0 deneme sürümü ile oluşturulmuştur. Ardından yanıt yüzey metotlarından olan Box-Behnken

denemesi Design Expert® 11.0.0 (Stat-Ease Inc., Mineapolis, ABD) kullanılarak oluşturulmuş ve optimizasyon tamamlanmıştır. Daha sonra doğrulama denemeleri ile β -karoten üretiminin ileride reaktörlerle daha büyük çapta üretimini sağlamak amacıyla kinetik parametreler hesaplanmıştır. Literatüre bakıldığında, β -karoten üretiminin optimizasyonu amacıyla yapılan birçok çalışma mevcut olmakla birlikte, yapılan bu araştırmada kullanılan mikroorganizma ile β -karoten üretiminin optimizasyonuna dair veriye ve herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan çalışma sayesinde ilgili mikroorganizmanın β -karoten üretim potansiyeli aydınlatılmış olmaktadır. Tezde kullanılan saf şekerler ile üretilen β -karoten maliyetinin düşürülmesi için ileriki aşamalarda bu şekerleri içeren çevresel atıklar kullanılarak yapılacak olan çalışmalar ile katma değeri yüksek ürün elde edilebileceği düşünülmektedir.



2. KAYNAK TARAMASI

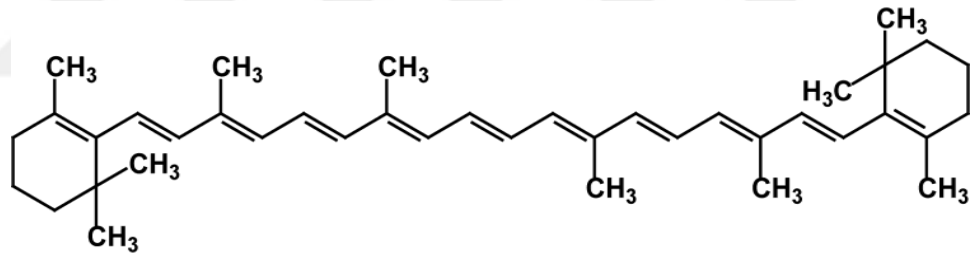
Karotenoidlerin ortaya çıkışı ilk olarak 1831 senesinde, Wackenroder'ın havuçtan turuncu pigment izole edip, Latince olan carota kelimesinden esinlenerek karoten ismini, bulduğu pigmente vermesine dayanmaktadır. Ardından Berzelius'un 1837 senesinde sonbahar yapraklarındaki sarı pigmentlere ksantofil ismini vermesi ile karotenoid çalışmalarına zemin hazırlanmıştır (Chidambara Murthy 2005). Karotenoid terimi, yapısal olarak yağda çözünen pigment grubunu temsil etmektedir. Özellikle, yapısında ışığı absorbe edebilen konjuge çift bağ bulunduran karakteristik polien zincirini içeren C₄₀ izoprenoid bileşiklerine karotenoid denilmektedir (Echavarri-Erasun ve Johnson 2001; Avalos ve Carmen Limón 2015). C₄₀ iskeletin biyosentezi iki ara molekül olan C₂₀ (geranilgeranil difosfat)'den gerçekleşirken, tüm karotenoidlerin öncül bileşiği olan fitoen bileşiği oluşur. Bu bileşik üzerinden seri halde desatürasyon reaksiyonları gerçekleştiği zaman, pigment yapısından sorumlu kromofor grupları (konjuge çift bağ serisi) oluşmakta ve ilerleyen siklizasyon, hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonları meydana gelerek karotenoid yapısı çeşitlenmektedir (Hurst 2007). Yapısal olarak karotenoidler asiklik olabileceği (örn; likopen) gibi, molekülün başında veya iki ucunda bulunabilen, 5-6 karbondan oluşan halkayı içeren bisiklik (örn; β -karoten) yapıda da olabilmektedir. Hidrokarbonlar (karotenler) ve bunların okside olmuş türevleri (ksantofiller) olmak üzere iki ana gruptan meydana gelen karotenoidler, 600'den fazla doğal bileşiği temsil etmektedir (Echavarri-Erasun ve Johnson 2001). Başka bir sınıflandırma şekli ise provitamin A aktivitesine sahip olan ve olmayan ayrımına dayanmaktadır. Bilindiği gibi yapısında β -iyonon halkası bulundurmeyen karotenoidler provitamin A aktivitesi göstermemektedir (Bogacz-Radomska ve Harasym 2018). Buna göre; provitamin A aktivitesine sahip karotenoidler olarak β -karoten, β -kriptoksantin ve mutatokrom gösterilebilir. Provitamin A aktivitesi olmayan, yani vücutta retinale dönüştürülemeyen karotenoidlere lutein ve likopen örnek verilebilir (Saini ve Keum 2018). Doğada bulunan karoten bileşiklerinin yarısından fazlasını β -karoten oluşturmaktadır (Chidambara Murthy 2005). β -karotenin, fitoen yapısından oluşması için 4 adet dehidrojenasyon sonrasında kırmızı likopene dönüşüp, ardından 2 adet β -siklizasyon reaksiyonu geçirmesi gerekmektedir (Avalos ve Carmen Limón 2015). Her karotenin yaklaşık olarak 282 adet geometrik izomeri vardır. Karotenoid bileşiği keşfedildikten sonra, ilk hangi kaynaktan bulundu ise, geleneksel olarak onu temsil edebilecek yerel isimler verilmektedir. Örnek olarak; mısırdaki (zea mays) elde edilen zeaksantin, domatesten (*Lycopersicon esculentum*) elde edilen likopen verilebilir. Bu sistem, bileşik hakkında yapısal olarak bilgi vermediği için, IUPAC tarafından da kabul edilen isimlendirme sistemi oluşturulmuştur. Karotenoidlerde bulunabilecek uç grubun adlandırılması yapılırken Yunan harfleri kullanılmaktadır. Uç grubu olmayan karotenoidler ise apokarotenoid olarak isimlendirilmektedir (Hurst 2007).

Doğal renk maddesi olarak da bilinen karotenoidler, görünür spektrumda maksimum absorpsiyonu violet-yeşil bölgede vermektedir. Buna göre bu bileşikler bulunduğu ortama kendine has sarı, turuncu ve kırmızı renk vermeleri ile de bilinmektedir. Sarı renk oluşumunun gözlenmesi için yapısında en az 7 adet konjuge çift bağın bulunması gerekmektedir. Çift bağ sayısının artması da baskın absorpsiyon bandını daha yüksek dalga boylarına kaydırmaktadır (Sorour vd. 2017). Doğadaki tüm kaynaklarından üretilen toplam karotenoid miktarının senelik olarak 100 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir. Bitkiler aleminin birçok üyesinde, fotosentetik olan mantar, bakteri ve hayvan

dokularında bulunmaktadır. Bitkiler arasındaki karotenoid içeriği ve çeşit dağılımı, kloroplast varlığı ile yakından ilintilidir. Bitkilerde en baskın görülen çeşit β -karoten olmakla beraber, bunu sırasıyla ksantofil, lutein, vioksantin, neoksantin takip etmektedir. Zeaksantin, γ -karoten, β -kriptoksantin, anteraksantin ise çok az miktarlarda bulunmaktadır. Öte yandan meyvelerde ise ksantofiller oldukça fazla miktarlarda bulunmaktadır (Hurst 2007). Nergis, kaliforniya gelinciği gibi çiçekler ile ananas, domates citrus meyveleri ve mangoda yoğun olarak bulunmaktadır. (Chidambara Murthy 2005) Hayvanlarda ise karotenoidler beslenme yoluyla alınıp farklı dokularda depolanarak flemingo, somon balığı, kabuklu deniz canlıları gibi bazı türlerin spesifik renginden sorumlu olmaktadır. Karotenoid pigmentlerine bakteri, alg, maya ve küf türleri gibi oldukça çeşitli mikroorganizmalarda da rastlanılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı karotenoidlerin üretimi, bunların bitkilerden ekstraksiyon ile elde edilmesi ve kimyasal olarak sentezlenmesine kıyasla mevsimsel ve üretimde coğrafi çeşitliliğe bağlı olmaması nedeniyle daha avantajlı olabilmektedir (Cardoso vd. 2017).

2.1. β -karoten Yapısı ve Farmakolojik Etkileri

β -karoten, biyolojik aktivitesi ve en yaygın olarak üretilen karotenoid olması dolayısıyla oldukça önemli bir bileşendir. β -karoten doğal olarak all-*trans* β -karoten ve 9-*cis* β -karoten yapısında olmakla beraber az miktarda da olsa 13-*cis* β -karoten olarak da üretilmektedir (Chidambara Murthy 2005). İnsan plazmasında sirküle olan β -karotenin büyük bir kısmı all-*trans* β -karotendir. Ancak az da olsa kanda 13-*cis* ve 9-*cis* β -karoten formları da mevcuttur. (Perera ve Yen 2007)



Şekil 2.1. β -karotenin kimyasal yapısı (Borowitzka 1992)

Gün geçtikçe karotenoidlerin sağlık üzerine olan etkileri, yapılan çalışmalar ile açığa çıkmaktadır. Tanımlanan 600'den fazla karotenoid bileşiğinin yaklaşık 30-50 kadarının provitamin A aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. Karotenoidler, provitamin A ve provitamin A olmayan bileşiklerine dönüşebilmektedir. Diyetle alınan başlıca provitamin A karotenoidi β -karoten'dir. A vitamini; büyüme, embriyo gelişimi ve görme fonksiyonlarını düzenleme gibi birçok önemli aşamada rol almaktadır. Memelilerde A₁ vitamini (retinol), diyetle alınan β -karoten'in oksidatif metabolizması ile elde edilmektedir. β -karoten'in bölünmesi O₂'e bağlı dioksijenaz ile katalizlenmektedir. A₂ vitamini (dehidroretinol), sikloheksadien halka sistemi taşıyan ve retinole göre bir fazla çift bağı bulunan bir retinol analogudur. Retinol ve türevleri sadece hayvansal ürünlerde bulunmaktadır. Provitamin A aktivitesi, karotenoidlerin oldukça fazla çalışma ile kanıtlanmış bir fonksiyonudur. β -karoten, zeaksantin ve β -kriptoksantin gibi terminal β -halka grupları içeren kısıtlı sayıda karotenoid bu etkiden sorumlu olarak görülmektedir. Amerikan İlaç Endüstrisi'nin verilerine göre, β -karotenin retinol aktivitesi eşdeğerliğinin, enterositin kısıtlayıcı absorpsiyonundan dolayı, 12 μ g β -karotenin 1 μ g retinol

aktivitesine denk olduğu bildirilmiştir (Hurst 2007). Diğer provitamin A aktivitesi gösteren karotenoidler için ise bu oran 1:24 olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalara göre, bu bileşiklerin provitamin A aktivitesi göstermesinin yanında antioksidan fonksiyonu taşıması sebebiyle, başlama safhasında olan birçok hastalığı önleyebildiği bildirilmiştir (Barredo 2009).

A Vitamininin günlük olarak besinlerle birlikte alımı, yetişkin bireyler için 800 µg, çocuklar için 375-700 µg aralığında ve süt veren anneler için ise 1300 µg olarak önerilmiştir. β-karoten cinsinden günlük gereksinim ise yetişkinler için 4.8 mg, süt veren anneler için 7.8 mg ve çocuklar için 2.25-4.2 mg olarak belirlenmiştir. Günlük miktarın alınmasında gıdaların yetersiz kalması ile takviye edici olarak yeni ve sürdürülebilir kaynakların bulunması gerekmektedir (Chidambara Murthy 2005).

2.1.1. β-karotenin antioksidan etkisi

Karotenoidlerin belki de en çok tartışılan etkilerinden biri, oldukça zararlı olan zincir reaksiyonların başlamasına sebep olan serbest radikaller ile olan ilişkileridir (Edge vd.1997, Bast vd. 1998). Çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşan biyomembranların hidrofobik kısımları aktif oksijen türlerinin en çok saldırdığı kısımlardır. Lipid peroksidasyonu düşünüldüğünde, ortaya çıkan peroksil radikalleri ile karotenoidler tepkimeye girerek bu zincirleme reaksiyonun kırılmasına neden olmaktadır. Bu da karotenoidlerin antioksidan karakterlerinin en güçlü kanıtı olmaktadır (Certik vd. 2009)

Genel olarak, serbest radikallerin karotenoidler ile olan ilişkisi 3 mekanizma ile açıklanmaktadır. 1) ortama radikal ilavesi, 2) karotenoidlerden hidrojen ayrılması, 3) elektron transfer reaksiyonu. Karotenoidlerin antioksidan özelliğinden prooksidan özelliğine kaymasında etkili olan faktörler; dihidrojenin kısmi basıncı (pO₂) ve karotenoid konsantrasyonudur. Bazı çalışmalar karotenoidlerin prooksidan özelliklerinin varlığını göstermektedir. Buna göre β-karoten, lipid peroksidasyonu sürecinde yüksek karotenoid konsantrasyonu ve yüksek oksijen basıncında prooksidan gibi davranabilmektedir (Certik vd. 2009).

2.1.2. β-karotenin antikanser etkisi

In vitro hücre kültürü çalışmaları göstermektedir ki; karotenoidler, hücre proliferasyonunu, transformasyonunu ve mikro çekirdek oluşumunu inhibe etmektedir. Bu özellik karsinogeneze karşı koruyucu etkiden sorumlu olarak görülmektedir. Karsinogenезin en önemli nedenlerinden birinin gap bağlantı iletişimin azalması olduğu öngörülmektedir. Gap bağlantıları ile hücreler arası iletişimin artırılması, karotenoidler ve retinoidler sayesinde gerçekleşmektedir ve kimyasal olarak yapı değiştirmiş hücrelerin büyümesinin inhibisyonu söz konusudur. Karotenoid türevlerinin antikanser aktiviteleri retinoid reseptörlerin aktivasyonu ile de ilişkilidir. Aynı zamanda likopen ve β-karoten'in parçalanma ürünleri de bu aktiviteden sorumlu olarak görülmektedir. Likopen; meme, endometrial, akciğer ve diğer bazı kanser hücrelerinin proliferasyonunu çok kuvvetli bir şekilde inhibe etmektedir (Gökbulut ve Şarer 2008).

Karsinogenез çok fazlı bir sistem olup; başlangıç, gelişim ve ilerleme aşamasından oluşmaktadır. Normal bir hücrenin malin bir fenotipi olan bir hücreye dönüştürülmesine ilişkin mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Tümör başlangıcı spontan veya

kanserojen kaynaklı genetik hasar nedeniyle olmaktadır. Önemli kanser öncüleri arasında mutajenler, genotoksik prooksidanlar ve radyasyon bulunmaktadır. Bu aşamada, β -karoten, DNA ile reaksiyona giren aktif ara maddeleri detoksifiye ederek, söndürerek veya yakalayarak koruyucu etki gösterebilir (Perera ve Yen 2007)

Perera ve Yen (2007)'nin bildirdiğine göre, 160 meme kanseri hastası ve 226 sağlıklı kadın ile yapılan bir çalışmada, çeşitli antioksidanların kandaki yüksek seviyelerinin düşük meme kanseri riski ile güçlü bir ilişkiye sahip olduğu bulunmuştur. Menopoz öncesi dönem kadınlarında yüksek düzeyde β -karoten, lutein, zeaksantin ve A vitamini içeriği, meme kanseri riskinde sırasıyla %67, % 87 ve % 85 oranında azalma ile ilişkilendirilmiştir.

2.1.3. β -karotenin kardiyovasküler sistem üzerine etkisi

Koroner kalp hastalıkları yıllardır ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. Oksidatif olarak modifiye olmuş düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), ateroskleroza tetikleyici bir unsur olduğu kanıtlanmıştır. Serbest radikallerin LDL oksidasyonuna neden olması sonucu anormal hücre çoğalması da ateroskleroze sebebi olarak düşünülmektedir. Bu yüzden, antioksidanların LDL oksidasyonunu önleyici etkileri nedeniyle insan koroner kalp hastalıklarına karşı koruma sağlayacağı düşüncesi gündeme gelmiştir. LDL oksidasyonunun ve plak oluşumundaki oksidatif stresin engellenmesi antioksidanların en önemli etkinliği olarak görülmektedir. β -karoten ve likopen birincil olarak LDL'ye taşındıkları için; bu karotenoidler LDL'yi oksidasyondan koruyabilecek en önemli unsurlar olarak görülmektedir (Thakur ve Azmi 2013).

2.1.4. β -karotenin cilt koruyucu etkisi

Hayatın devamı için güneş, gerekli olan enerjiyi sağlamakta ve sağlanan enerjinin spektrumu içerisinde gama, x-ray, ultraviyole, görünür ışık, infrared ve mikrodalga ışıınımı yer almaktadır. Foto-oksidatif stresin oluşumu ve ışık maruziyeti ile oluşan hastalıkların sorumlusu UV (UVB, 280–315 nm; UVA, 315–380 nm) ve görünür (380–750 nm) radyasyondur. UV ışık, direkt olarak canlı organizmalara zarar vermektedir. Görünür ışık ise fotosentezi uyarmasının yanında fizikokimyasal proseslerin sonucu hasar oluşturmakta ve sonuç olarak ışığa maruz kalan dokularda aktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Biyolojik olarak önemli moleküllerin, foto-oksidatif reaksiyonlardaki modifikasyonu, ışığa maruz kalan dokuların çeşitli hastalıkların gelişimindeki patolojik süreçleri ile ilişkilendirilmiştir (Perera ve Yen 2007). Işığa maruziyet sonucu oluşan hasarlar, hücre lipidlerini, proteinlerini ve DNA'yı etkilemekle beraber; eritema, erken yaşlanma, fotodermatoz ve cilt kanseri gibi oluşumlara neden olmaktadır. Karotenoidlerin oksijeni iyi yakalayıcı türler oldukları bilinmektedir. Bazı hayvan deneylerinde karotenoidlerin tokoferollerle beraber UV ışıklardan kaynaklı cilt lezyonlarının oluşumunu engellediği ve kansere karşı koruyucu olduğunu göstermiştir. Koruyucu etkinin antioksidan özellikten ileri geldiği düşünülmektedir (Perera ve Yen 2007).

2.1.5. β -karotenin gıda endüstrisindeki rolü

Avrupa'nın mikrobiyal pigment üretimi konusunda başarılı olduğu alanlardan biri *Blakeslea* küfünden ticari olarak β -karoten üretmesidir. Bu yeni doğal kaynak ilk kez

1995’de Gıda ve İçecek katkıları (FIE) platformunda tanıtılmıştır. Avrupa Birliği Sağlık ve Tüketicuyu Koruma Dairesi, bu yolla elde edilen β -karoteni kimyasal yollarla üretilen versiyonuna eşdeğer kabul etmiş ve bu nedenle renklendirici olarak kullanımına izin vermiştir (Dufossé vd. 2005). Elde edilen β -karoten, Avrupa Birliği’nin gıdalarda kullanımına izin verdiği katkı maddeleri listesinde E160a resmi adıyla bulunmaktadır. Avrupa Birliği’nin renk katkı maddesi yönetmeliği, doğal ve yapay terimlerinin ayrımını açıklamamaktadır. Bu terimlerin gıda etiketlerinde bulunması da zorunlu tutulmamıştır (Carle ve Schweiggert 2016).

Gıdalarda ilk bakışta algılanan özellik renk olduğu için, pigmentler gıda endüstrisinde önemli olan yerini korumaktadır. Pigmentlerin doğal kaynaklardan elde edilmesinin ihtiyacı, sentetik olan boya ve renklendiricilerin toksik etkilerinin anlaşılması ile daha da artmıştır. Doğal kaynak olarak pigmentler; meyveler, sebzeler ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Yapılan bu teze de konu olan β -karotenin üretimi, endüstriyel olarak özellikle bir alg olan *Dunaliella salina* ve bir küf olan *Blakeslea trispora*’dan elde edilmektedir (Carle ve Schweiggert 2016). Dünyada gıda renklendiricisi olarak bu kadar ilgi gören β -karoten birçok üründe kullanım alanı bulmuştur. Margarin, peynir, meyve suları, fırınlanmış ürünler, süt ürünleri, konserveler, şekerlemeler ve soslarda kullanımı, ürünlerdeki görünümü geliştirdiği için tüketici talebini arttırmaktadır (Coma 1991). Yeni kullanım alanı olarak; işlenmiş et ürünleri, deniz ürünleri (balık ezmesi, surimi) ve ketçap olarak gösterilebilir (McNeil vd. 2013; Dufossé vd. 2005). Ayrıca, sütün içerisindeki provitamin A aktivitesinin artırılması için büyükbaş hayvanların yemlerine de β -karoten katıldığı bilinmektedir (Hurst 2007). Özellikle β -karoten, gıda renklendiricisi olarak 2-50 ppm konsantrasyon aralığında kullanılmaktadır. O nedenle ürüne katkısı sarı-turuncu arasında değişmektedir (Thakur ve Azmi 2013). İlk seçenek olarak vanilya içerikli ürünlerde kullanımı denenmiş, özellikle pigmentin ısıya karşı hassas olmasından dolayı dondurmada kullanımının uygun olacağı düşünülmüştür. Renk stabilitesinin sağlanması amacıyla ise antioksidan olarak tokoferol veya askorbil palmitatın uygun olacağı düşünülmektedir (Carle ve Schweiggert 2016).

Piyasada satılan, *Dunaliella*’dan üretilen β -karoten ürünlerini üç kategori altında toplamak doğru bir yaklaşım olacaktır. β -karoten ekstraktları, *Dunaliella* biyokütlesinin tozu ve yemler için kurutulmuş *Dunaliella*. β -karoten ekstraktları saflaştırılmış halde genel olarak yemeklik yağlar içerisinde oranı %1 ila %20 olacak şekilde satılmaktadır. Saflaştırılmış β -karoten içerisinde az da olsa (%15) diğer karotenoidlerden de bulunmaktadır. Bu nedenle piyasaya karotenoid karışımı olarak sürülmektedir (Dufossé vd. 2005). Karotenoidlerin elde edildiği mikroorganizmanın direkt olarak biyokütlesinin, saflaştırma yapılmadan kullanımı gıda güvenliği açısından bir sorun teşkil edip etmediği tartışılmaktadır. Ancak birçok araştırma *Dunaliella*’nın biyokütlesinin direkt olarak gıda formülasyonlarında kullanımının güvenli olduğu yönündedir (Dufossé vd. 2005).

2.2. β -karoten Üretim Prosesleri

2.2.1. Yapay yollarla β -karoten üretimi

Yapay olarak karotenoid sentezi 1950’lerden bu yana Karrer, Eugster, Inhoffen, ve Milas gibi araştırmacılar tarafından yapılmaktadır. Sentetik β -karotenin endüstriyel ölçekte üretimi, ise bu araştırmacılar tarafından beş sene sonra başlamıştır (Bogacz-Radomska

ve Harasym 2018). Roche (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) 1954 ve BASF (Badische Anilin- & Soda-Fabrik) 1960'dan itibaren sentetik β -karoten üretimine başlamıştır (Ribeiro vd. 2011). Ticari β -karotenin %85'inden fazlası yapay sentez yolu ile üretilmektedir (Azmi ve Thakur 2013). Bunun yanında 700'e yakın karotenoid içerisinde sadece birkaçının endüstriyel olarak üretimi yapılmıştır. Likopen, kantaksantin, astaksantin, β -karotenin, β -apo-8'-karotenal, β -apo-8'-karoten ve sitranaksantin endüstriyel ölçekte üretimi yapılabilen karotenoidlerdendir. Wittig kondensasyon veya Grignard reaksiyonları, karotenoid üretimi için uygulanan yöntemlerdendir (Bogacz-Radomska ve Harasym 2018). Sentetik β -karoten üretimi için her firma farklı metodlar kullanmaktadır. Ancak hepsi aynı hammaddeye yani β -iyonon bileşiğine ihtiyaç duymaktadır. β -iyonon, sitral ile asetonun kondensasyon reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Roche'nin yöntemi ile sentezlenen β -karoten verimi %65 iken, BASF ile verim %85'lere çıkmaktadır (Ribeiro vd. 2011).

2.2.2. Doğal kaynaklardan β -karoten elde edilmesi

Bitkilerden karotenoid elde etmenin en eski ve fizikokimyasal prosesler içeren yolu ekstraksiyondur. Karotenoidler bitkilerin yeşil kısımlarından, çiçeklerinden, meyvelerinden, tohumlarından ve köklerinden elde edilebilmektedir. Bitki hücresi içerisinde karotenoidler tilakoid membranlar olarak isimlendirilen kloroplastın organelleri içerisinde yer almaktadır (Bogacz-Radomska ve Harasym 2018).

β -karotenin en popüler kaynağı ise havuçtur. Ekstraksiyon prosesi havuç için farklı birkaç basamaktan oluşmaktadır (saflaştırma, materyal kesme, sıvı presleme, protein koagülasyonu, sedimentasyon, santrifüjleme, organik çözeltiler ile ekstraksiyon, filtrasyon, deodorizasyon, evaporasyon, kristalizasyon). Bazı durumlarda işlenmemiş havuç fermentasyona tabi tutulur, ardından ya direkt kurutulur ya da ekstraksiyonu kolaylaştırmak için boyut küçültmesi sağlanır. Bitkilerden karotenoid elde edilmesinin en büyük dezavantajı yüksek maliyet, coğrafi kısıtlama ve mevsime bağlı olmasıdır. Birkaç gram karotenoid üretebilmek için kilolarca bitki işlenmesi gerekmektedir. Yaklaşık 50 kg havuçtan sadece kristal formda 2 g α -karoten ve β -karoten elde edilebilmektedir. O nedenle karotenoid biyosentezi için oldukça fazla miktarda genetik ve biyoteknolojik çalışmalar yapılmaktadır (Bogacz-Radomska ve Harasym 2018).

2.2.3. Biyoteknolojik yollarla β -karoten elde edilmesi

β -karoten elde edilmesinde kullanılan metotlar arasında mikrobiyel biyosentez son zamanlarda ilgi odağı olmuştur. β -karoten içeren doğal pigmentlerin ticari olarak üretilme gereksinimi bu alanda çalışmaların hızlanmasına yol açmıştır. Çizelge 2.1'de β -karoten üretiminde kullanılan mikroorganizmaların gösterildiği çalışmalar yer almaktadır. (Bogacz-Radomska ve Harasym 2018). Biyoteknolojik olarak filamentli küfler, mayalar, bakteriler ve mikroalglerden elde edilen β -karoten de doğal yollarla elde edilmiş sayılmaktadır.

Mikroalgler, farklı pigmentleri de içeren birçok değerli bileşiğin en büyük kaynağı haline gelmiştir. Bu nedenle β -karoten üretiminde mikroalg biyoteknolojisi çalışmaları da önem kazanmıştır. *Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil*, *Dunaliella tertiolecta*, *Erythrotrichia carnea*, *Laurencia obtuse*, *Prochloron* sp. β -karoten ürettiği bilinen alglerdir (Bogacz-Radomska ve Harasym, 2018). Özellikle kuru kütlesinin %14'üne

kadar β -karoten üretebildiği bilinen *Dunaliella salina*, çalışmaların ilgi odağı haline gelmiştir. *Dunaliella*'nın ürettiği β -karoten kompozisyonunun %50'sinden fazlasını 9-cis- β -karoten oluşturmaktadır (Raja vd. 2007). Kloroplastlarında β -karoten depolayabilen *Dunaliella salina*'nın β -karoten üretebilmesi için kültür şartları arasında yüksek tuzluluk (%27'den fazla NaCl) gerekmektedir. Ayrıca ışıma stresinin de karoten üretimine etkisinin olduğu bilinmektedir. Işıma stresi, fotosentez için gerekli olan ışığın fazlasının gelmesi durumunda oluşmaktadır. *Dunaliella* ışıma stresine girdiği zaman ise daha fazla β -karoten üretmeye başlamaktadır (Raja vd. 2007).

Potansiyel β -karoten üreticisi olarak, bakteriler diğer mikroorganizmalara göre düşük üretim kapasitelerinden dolayı daha az ilgi çekmektedir. Ancak gen teknolojisi sayesinde rekombinant olan türlerin, karotenoid üretimini 3 kat arttırabildiği belirtilmiştir (Azmi ve Thakur 2013). Buna göre yapılan bir çalışmada Van Keulen vd. (2010) tarafından *Erwinia uredovora*, *Erwinia herbicola*, *Rhodocrobium vanniellai*, *Protaminobacter rubber*, halofilik bakteriler ve *Mycobacteria* türlerinin de karoten ürettiği bildirilmiştir. Bundan başka, *Flavobacterium*'da olduğu gibi, karoten üretebilmesi için merkezi metabolizmasının inorganik tuzlar veya üre ile inhibe edilmesi gerekmektedir. Yoon vd. (2009) yaptıkları çalışmalarında, *Streptococcus pneumoniae* ve *Enterococcus fecalis*'in genlerinin *E. coli*'ye aktarılması ve bu rekombinant bakterinin %2'lik gliserol içeren besiyeri ortamında inkübasyonu ile 120 saat sonunda 465 mg/L β -karoten üretilmiştir.

Wang vd. (2012) *Serratia marcescens* RB3'ü izole edip; fizyolojik, biyokimyasal testler ve 16S rDNA dizin analizinden geçirdikten sonra HPLC ile bu bakterinin ürettiği β -karotenin tanımlanması yapmışlardır. Ardından β -karoten üretimi için optimizasyon yapıp, %2.0 laktoz, %2.0 pepton, % 0.3 et ekstraktı, %1.0 NaCl, % 0.05 Fe^{2+} ile takviye edilmiş, pH 6.0 ve 30°C şartları altında optimum olarak 2.45 μ g/mL β -karoten üretimi gerçekleştirilmiştir.

Zhao vd. (2013) çalışmalarında, genetik mühendislik uygulamaları ile *E. coli*'nin β -karoten üretimini gerçekleştirmesini sağlamışlardır. Böylelikle β -karoten gibi terpenoid bileşiklerinin üretimi için gerekli iki önemli kofaktör olan ATP ve NADPH miktarının arttırılmasını sağlayan metabolizma düzenlenmiştir. B-karoten sentezi 5 modüle ayrılmıştır. 2-C-metil-derythritol-4-phosphate (MEP) yolunun genetik olarak işlenmesi ile β -karoten verimi 3.5 kat arttırılmıştır. ATP sentezi, pentoz fosfat, TCA modulünün tek genleri düzenlendiğinde β -karoten verimi sırasıyla %21, %17, %39 oranlarında arttırılmıştır.

β -karoten üretiminde biyosentez sonrasında uygulanacak alt işlem basamakları önemlidir. Uygun bir ekstraksiyon metodu seçimi, hücre membranının parçalandıktan sonra β -karotenin hücreler içerisinden elde edilmesi prosesin devamı için önemlidir (Kaiser 2009; Thakur ve Azmi 2013).

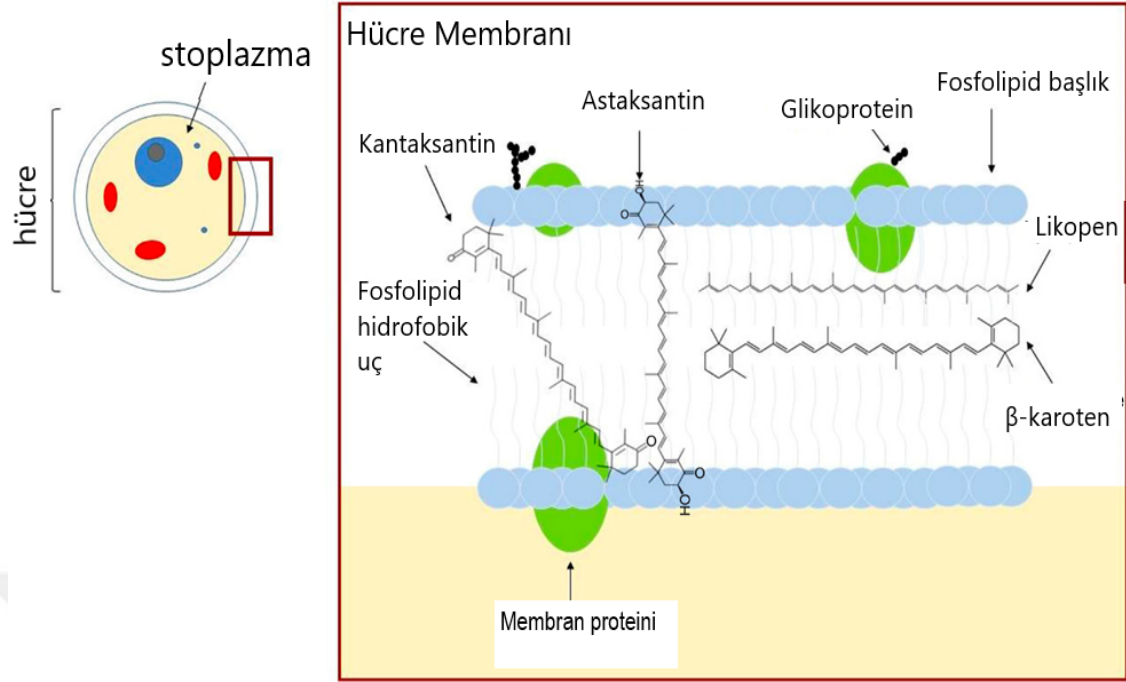
Çizelge 2.1. β -karoten üretimi için kullanılan mikroorganizmalar (Azmi ve Thakur 2013)

Mikroorganizma	Referanslar
Alg	
<i>Dunaliella salina</i>	Gercia-gonzalez vd. 2005; Venkatesh vd. 2005; Zhu ve Jian 2008, Ben Amotz 2004
<i>Dunaliella bardawil</i>	Mogedas vd. 2009
<i>Haematococcus</i> sp.	Lorenz ve Cysewsk 2000
<i>Murielopsis</i> sp.	DelCampo vd. 2007
Küf	
<i>Blakeslea trispora</i>	Ciegler vd. 1959; Jeong vd. 1999; Mantzouridou vd. 2002; Roukas vd. 2003; Goksungur vd. 2004; Xu vd. 2007; Chaudhary ve Singhal, 2008; Filotheou vd. 2010
<i>Phycomyces blakesleanus</i>	Mehta vd. 1997; Cerda-Olmedo 2001; Papp vd. 2009 Iturriaga
<i>Mucor circinelloides</i>	Iturriaga vd. 2005; Papp vd. 2009
<i>Neurospora crassa</i>	Hansmann ve Sandmann 2000
<i>Phycomyces nitens</i>	Kivanc ve Kahyaglu 2008
<i>Mortierella ramanniana</i> M29	Attwood 1971
Maya	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Roadjanakamolson ve Suntornsuk 2010; Bhosale ve Gadre 2001; Kim vd. 2004; Wang vd. 2008
<i>Rhodotorula glutinis</i> DBVPG 3853	Buzzini vd. 2000
<i>Rhodotorula glutinis</i> DM28	Malisorn ve Suntornsuk 2008; Malisorn ve Suntornsuk 2009
<i>Rhodotorula graminis</i>	Buzzini vd. 2005

(Devamı Arkada)

Çizelge 2.1.'in devamı

<i>Rhodotorula rubra</i>	Simova vd. 2003
<i>Xanthophyllomyces dendorhous</i>	An vd. 1991
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Juckyoung vd. 2009
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Maldonade vd. 2008
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	Sperstad vd. 2006
Bakteri	
<i>Sphingomonas jaspsi</i>	Asker vd. 2007; Silva vd. 2004
<i>Mycobacterium kansasii</i>	David 1974
<i>Flavobacterium multivorum</i>	Bhosale ve Bernstein 2004
<i>Flavobacterium</i> sp.	Krubasik ve Sandmann 2000
<i>Micrococcus</i> sp.	Salah ve Ibrahim 2008

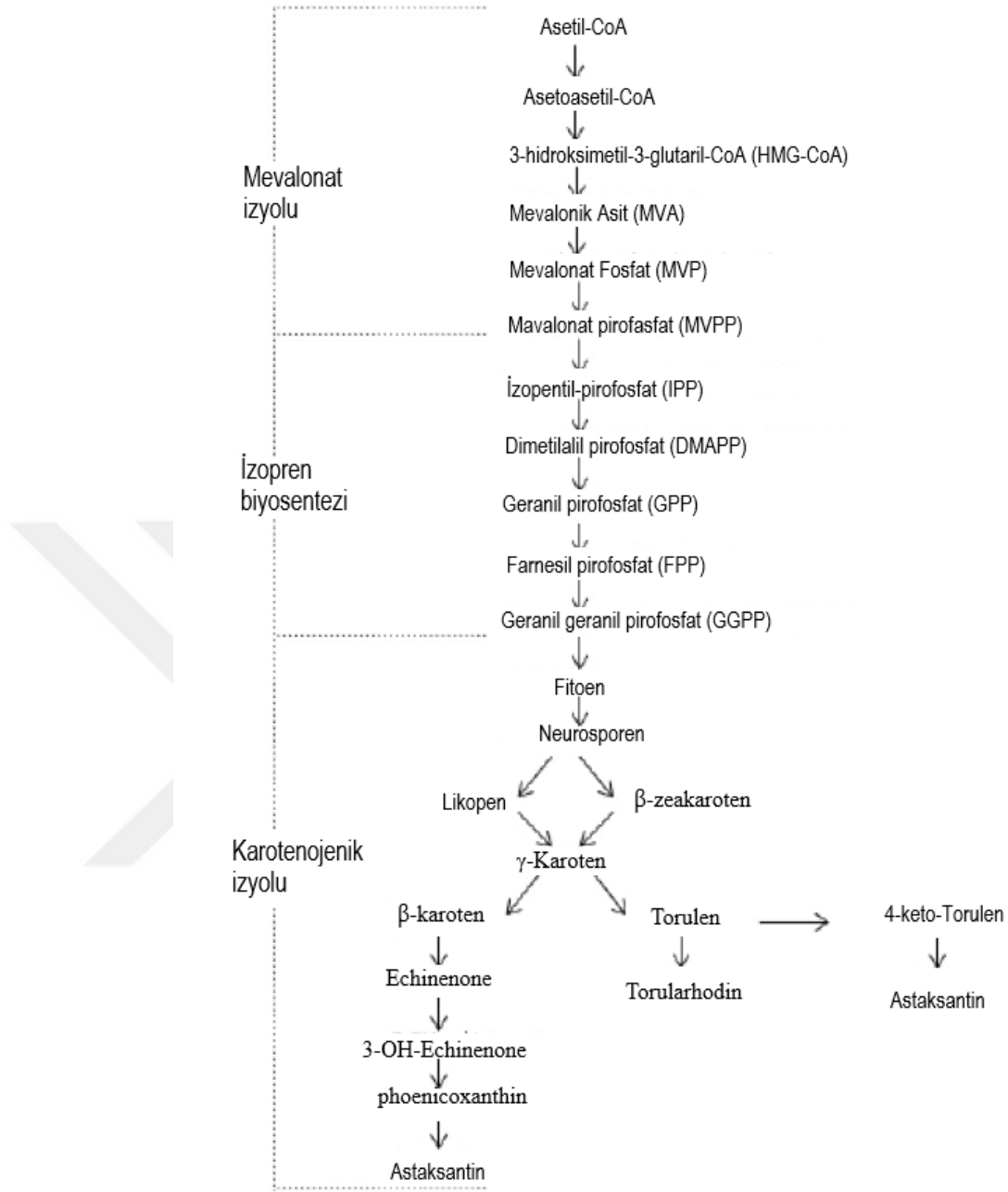


Şekil 2.2. β -karotenin hücre içerisindeki yeri (Sorour vd. 2017)

Karotenoidler hidrofobik moleküller olduğundan dolayı, hücre içerisindeki yerleri hidrofobik alanlara kısıtlanmış olup, hücre membranları içerisinde bulunmaktadır. Ancak protein ile kombinasyon halinde olanlar ise hücrede diğer sulu ortamlarda bulunabilmektedir (Butnariu 2016).

2.2.4. Küflere özgü karotenojenik mevalonat metabolik yolu

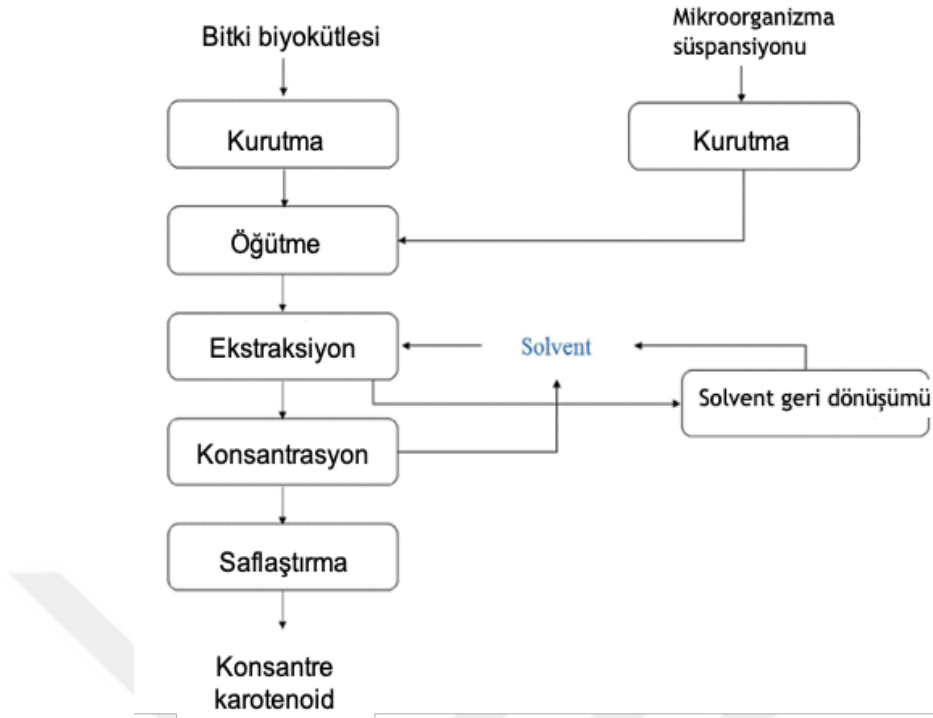
Diğer terpenoidler gibi küf karotenoidleri de mevalonik asit (MVA) biyosentetik metabolik yolu ile asetil-CoA ve hidroksimetilglutaril-CoA.z. (HMG-A)'den üretilmektedir (Bennett 2002). Tüm izoprenoid bileşiklerinde biyosentez iz yolunun ilk basamağında, iki molekül geranilgeranil difosfat (GGDP) molekülünden prefitoen difosfat (PPDP) aracılığıyla 40 karbonlu bir hidrokarbon olan fitoen oluşmaktadır. Üç konjuge çift bağ içeren ve renksiz olan fitoen, daha sonra her enzimatik basamakta moleküle yeni bir çift bağ eklenmek suretiyle bir dizi dehidrojenasyon reaksiyonu geçirdikten sonra 13 tane çift bağ içeren simetrik bir molekül olan likopen oluşmaktadır. Likopenin sonraki basamak ise, uç gruplarda halka oluşumudur (siklizasyon). Bunun sonucunda da monosiklik (γ -karoten, δ -karoten) ve bisiklik (α -karoten, β -karoten) yapıdaki karotenoidler oluşmaktadır. Ayrıca α -karoten ve β -karotenin hidroksilasyonu sonucunda da lutein ve zeaksantin gibi ksantofiller meydana gelmektedir (Ata 2013).



Şekil 2.3. Karotenoid biyosentez izyolu (Cardoso vd. 2017)

2.2.5. Mikrobiyal karotenoid üretiminde genel alt işlem basamakları

Apolar karakterli karotenoidler interselüler olarak bitkilerin dokularında ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır. O nedenle üretim aşaması hücrelerin ön işleme tabii tutulmasını gerektirmekte ve bu moleküllerin çözünürlüğünü hızlandırmak için ise düşük polaritede uygun bir çözücü ile liçing (ekstraksiyon, leaching) prosesi uygulanmaktadır.



Şekil 2.4. Karotenoid üretiminin genel alt işlem basamakları (Cardoso vd. 2017)

İlk aşamada ham biyokütle kurutulur, bu sayede biyokütleye çözücünün ulaşması daha kolay olmakta ve sudan kaynaklanacak çözme direnci engellenebilmektedir. Ardından öğütme işlemine geçilir. Bu işlem, biyokütle matriksinin yüzey alanını arttırarak çözücü ile temasın kolaylaşmasına yardımcı olmaktadır. Eğer hücre duvarı kalın mikroorganizma ile çalışılıyorsa mutlaka kimyasal ya da mekanik parçalama mekanizmaları kurutma öncesinde yapılmalıdır. Kurutulmuş biyokütle uygun bir apolar çözücü ile ekstrakte edilir. Çözücünün miktarı, çözme yeterliliğini etkilediğinden bu aşamada önem kazanmaktadır. Ekstraksiyon sonrasında, karotenoid içeren solüsyondan çözücü uzaklaştırılmalıdır. Konsantre edilen karotenoid eğer istenirse kullanıma bağlı olarak daha ileri bir işlem olan saflaştırma basamağına tabi tutulabilir (Cardoso vd. 2017).

2.3. β -karoten Üretimini Etkileyen Parametreler

Hücre tipi önemli olmaksızın, karotenoid sentezi hücre gelişmesini inhibe eden veya besin yetersizliği, yüksek ışık şiddeti, yüksek tuzluluk ortamı gibi stres yaratan koşullarda daha iyi gerçekleşmektedir (Guevara-González vd. 2010). Daha önce de bahsedildiği gibi yeşil mikroalgler, küfler, bakteriler gibi birçok mikroorganizma β -karoten üreticisidir. Bu mikroorganizmaların biyosentez etkinliğinin artırılması ile karotenoid üretiminin de arttığı bildirilmiştir (Sorour vd. 2017). Basit ve etkili karotenoid üretimi gerçekleştirmek için besiyeri ortamı ve kültür koşullarının aynı zamanda modifiye edilmesinin başarılı olduğu bildirilmektedir (Sorour vd. 2017).

2.3.1. Fermentasyon ortamı sıcaklığının etkisi

Sıcaklık mikroorganizmada karotenoid üretimini düzenleyen enzimlerin aktivitelerinin değişimini, bu enzimlerin konsantrasyonlarını ve mikroorganizma gelişimini kontrol etmektedir. (Certik vd. 2009; Sorour vd. 2017). Bunun yanı sıra, bilinen en önemli ticari β -karoten kaynağı olan mikroalg kaynaklarından *Dunaliella* sp. *halophile flagellate*, *Heamatococcus pluvialis* gibi mikroorganizmalar için sıcaklık, gelişimi kontrol ettiği için kritik bir etmen olarak kabul edilmektedir. Genel olarak alglerin 1000 $\mu\text{mol foton/m}^2\cdot\text{s}$ civarında ışık yayılımında ve düşük sıcaklıklarda β -karoten ürettiği bildirilmektedir. *Dunaliella*'nın β -karoten içeriğindeki değişiklikler, çeşitli çevresel faktörlere ve aynı zamanda hücre bölünmesi sürecinde maruz kalınan ışığın miktarına bağlı olmaktadır. Sabit ışık yayılımında ve düşük sıcaklıklarda bölünme yavaşlamakta ve bu da yüksek β -karoten üretimi ile sonuçlanmaktadır. Bu durumun *Dunaliella bardawil* mikroalgi için ışığa karşı olan korunma sistemi olarak değerlendirildiği bildirilmektedir. *Rhodotorula* cinsinde de düşük sıcaklıklarda β -karoten üretiminin yüksek olduğu, aksine yüksek sıcaklıklarda ise daha fazla torulen bileşiğinin üretildiği bildirilmiştir (Sorour vd. 2017).

Bir diğer çalışma ise γ -karotenin diğer karotenoidlerin üretiminde bir dallanma noktası olarak davrandığını ortaya konulmuştur. Bunu takip eden hidrojenasyon ve de karboksilasyon tepkimeleri ise torulen üretimi ile sonuçlanmaktadır. Bu durumun sıcaklığa bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir. Çünkü düşük sıcaklıklarda, torulen üretimini sağlayan enzimlerin aktivitelerinin β -karoten üretiminde etkili olan enzim aktivitelerinden düşük olduğu saptanmıştır. Bu bilgi *Rhodotorula glutinis* için geçerliliğini taşımaktadır. Çünkü bu çalışmaya göre hücrelerin 5°C'de 21 gün depolanması ile torulen ve torularhodin üretiminin baskılandığı ve β -karoten sintaz aktivitesinin ise arttığı belirlenmiştir (Sorour vd. 2017).

Ben-Amotz (1996), fermentasyon ortamı sıcaklığının 30°C'den 10°C'ye düşürüldüğünde 9-cis/all-trans- β -karoten oranının 4 kat arttığını gözlemlemiştir. Gomez ve Gonzale (2005)'e göre, sıcaklık 26°C'dan 15°C'ye düşürüldüğünde bu oranın değişmediği ancak düşük sıcaklıklardaki akümülyasyonun yüksek ışımadan (1.000 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$) etkilendiği belirtilmiştir (Sorour vd. 2017).

2.3.2. Işığın etkisi

Karotenoid sentezinin fotoregülasyonunun çoğu fotosentetik mikroorganizmalarda ve küflerde bulunduğu bildirilmiştir. Işığın; hücrede bulunan oksijen, ışığa hassas moleküllerden olan protoporfirin IX, hem ve diğer bileşikler ile interaksyonu ile reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Işık uyarısının karotegenesis üzerindeki regülasyonu, ortamda oluşan reaktif oksijen türlerinin aracılığı ile sağlanmaktadır (Guevara-González vd. 2010; McNeil vd. 2013).

Genel olarak, bakteri, küf, maya ve alg kaynaklı karotenoidler üretilirken beyaz ışık aydınlatması gerektiği bildirilmiştir. Ancak üretilen miktar, beyaz ışığın şiddeti ve mikroorganizma cinsine göre değişebilmektedir. Ek olarak, karotenoid pigmentlerinin profili, mikrobiyal yaşam döngüsü sırasında ışığa maruz kalma süresine bağlıdır (Certik vd. 2009). Bunların dışında ışık stimülasyonunun açıklanmasında iki teori geçerlidir. İlk olarak karotenoid miktarının, mikroorganizmanın optimum gelişimi ile direkt ilgili

olması, ikinci olarak da karotenoid birikiminin karotenogenezisi sağlayan enzimatik aktiviteyi arttırmasıyla açıklanmaktadır. Işık şiddetinin 50–1250 $\mu\text{mol photon/m}^2\cdot\text{s}$ olarak kademeli arttırılması β -karoten miktarını arttıracak bildirilmiştir (Mushir vd. 2014). Mutant *Rhodotorula glutinis*'in beyaz ışık altında gelişiminin eksponansiyel fazının sonunda β -karoten üretimini %58 arttırdığı belirlenmiş olup bu çalışma endüstriyel açıdan dikkat edilmesi gereken sonuçları ortaya koymaktadır (Chan vd. 2013).

Rhodotorula türleri ve suşları üzerinde yapılan çalışmalara göre ışık yoğunluğuna gösterilen direnç farklıdır. *Rhodotorula minuta*'nın 5000 lux'e kadar direnç gösterdiği gözlenmiştir (Yadav ve Prabha 2014). *Rhodotorula glutinis* 1000 lux'te zayıf bir büyüme göstermektedir (Chan vd. 2013). Yapılan bir çalışmada, *Rhodotorula minuta*'nın ışık altında karotenoid biyosentezinde aktif olan enzimlerin rolünü incelemek için HMG-CoA redüktazın güçlü bir rekabetçi inhibitörü olan mevinolinin bir kombinasyonunu kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre mevinolin kullanıldığında ışık ile karotenoid üretiminin uyarılması kontrol edilebilmektedir. Karotenoid üretimini durdurmak için inhibe edici konsantrasyona ulaşmak tamamen hücrelere yayılan ışığa bağlıdır. Işığın miktarı ve yoğunluğunun yanı sıra, mevinolin konsantrasyonu ve inhibisyon arasında önemli bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar HMG-CoA oluşumunda yer alan enzimlerin aktivitesinin ışıktan etkilenmeyebileceğini düşündürmektedir. Kültür ortamına yeterli miktarda mevalonat ilave edildiğinde, karotenoid miktarı mevinolin yokluğunda olduğu gibidir. Bu sonuç şunu gösterir: Mevalonatın karotenoid üretiminde HMG CoA redüktaz gibi ışık uyarma kapasitesine sahip enzimler bulunabilir.

Zigomiset aerobik miselyum vahşi türlerinden biri olan *Mucor rouxii* ile yapılan bir çalışmada, sürekli ışık altında gelişim safhasında iken karanlık ortama göre β -karoten birikiminin on kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu durumda β -karoten üretimi çoğunlukla direkt olarak hücreye gelen ışık miktarına bağlantılıdır. Ancak spesifik olarak aerobik olan misellerde üretimin gözlemlendiği, anaerobik olanlarda saptanmadığı da bildirilmektedir. Bu bulgu, *Mucor rouxii* için oksijenin de karotenoid üretimindeki rolünü göstermektedir (Sorour vd. 2017).

2.3.3. Havalandırmanın etkisi

Karotenoidler, ışığın zararlı etkilerini engellemesi ve fotokoruyucu işlevi nedeniyle fotosentetik organizmalar için oldukça kritiktir. Fotosentetik olmayan mikroorganizmalarda ise karotenoidler etkili birer reaktif oksijen yakalayıcı olarak görev almaktadır (Guevara-González vd. 2010). Tüm karotenojenik mikroorganizmalarda, oksijenin karotenoid biyosentezi için önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Çünkü moleküler oksijen, karotenoid biyosentezindeki desatürasyon mekanizmasında görev almaktadır (Certík vd. 2009). Oksijen kullanılabilirliğinin, üretilen pigment miktarında ve profilinde baskın bir etkiye sahip olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Küf kültürlerinde, çözünmüş oksijen stresinin %15-20 hava doygunluğunda olması kritik seviyedir ve etkili karotenoid sentezi için yeterli olmaktadır (Guevara-González vd. 2010). Ayrıca mikroorganizmaların morfolojik formları aerasyona bağlı olarak değişebilmektedir. *Blakeslea trispora*'nın zigospor formunun kritik oksijen seviyelerinde oluştuğu ve β -karoten üretiminden sorumlu olduğu bilinmektedir (Certík vd. 2009).

2.3.4. Çalkalama hızı

Çalkalama hızı, besi ortamının yeterli oranda karışması, kütle ve ısı transferinin gerçekleşmesi için önemlidir. Çalkalama sadece besi ortamında bulunan farklı fazlar arasındaki kütle transferini desteklemekle kalmaz, aynı zamanda kimyasal ve fiziksel koşulların homojen olması sürekli karıştırma ile sağlanmaktadır. Çalkalama, besi ortamında kayma kuvveti oluşturarak mikroorganizmaları birkaç yönde etkilemektedir. Bunlar arasında mikroorganizma morfolojisinde oluşan değişimler, gelişim ve ürün oluşturmada görülen değişimler, hücre yapısında oluşan hasar vardır. Hücre morfolojisi ürün oluşumu üzerinde oldukça etkili olduğundan dolayı besi ortamının reolojisi ve bunun vasıtasıyla besi ortamının kütle ve ısı transfer kapasitesi oldukça önem arz etmektedir (Mantzouridou vd. 2002; Borba vd. 2018).

2.3.5. Karbon:Azot oranının (C:N) etkisi

Karbon bilindiği üzere en önemli besiyeri bileşenidir. Mikroorganizmalara enerji kaynağı olmakla beraber, hem gelişim hem de primer ve sekonder metabolitlerin üretilmesinde önemli rol oynamaktadır (Singh vd. 2017). Karbon kaynağının sekonder metabolit olan pigmente çevrilmesi için verim artırma çabaları oldukça geniş bir yelpazede sürdürülmektedir. Çeşitli hekzoz ve pentoz kaynakları, çeşitli disakkaritler, gliserol, etanol, metanol, yağlar, n-alkanlar veya çeşitli tarımsal üretim atıkları (melas, muz, nişasta atıkları, şeker kamışı küspesi, peyniraltı suyu, torf ve odun parçaları, hindistan cevizi sütü, bitkisel yağları) potansiyel karbon kaynağı olarak görülmüş olup, biyoteknolojik karotenoid üretimi için kullanılmaktadır (Certik vd. 2009).

Üreme ortamındaki azotun kimyasal kompozisyonu ve konsantrasyonunun, pigmentin fizyolojik olarak kontrol edilmesinde ve metabolizmasının yönetiminde rolü büyüktür (Certik vd. 2009). Azot, bakteri ve küflerde kuru kütlenin %8-14 ünü oluşturur. Mikroorganizmalara gerekli azot, organik ve inorganik birçok bileşikten sağlanmaktadır. (Sorour vd. 2017).

Karotenoid bileşiklerinin hücre içinde depolanması, çoğu mikroorganizmada tipik olarak üremenin son safhalarında meydana gelmektedir. Büyümenin yavaşlaması ile beraber ortamda besin tükenmesi sonucunda karotenogenesis oluşumu gözlenmektedir. Yapılan bir çalışmada, ortamda azot kıtlığı durumunda, *X. dendrorhous*'un ürettiği toplam karotenoid ve astaksantin miktarında artış görüldüğü bildirilmiştir. Mikroorganizmada görülen düşük protein sentez hızı ve düşük gelişim hızı ise karotenogenesis ile ilişkilendirilmektedir. Azot kıtlığının çoğu diğer küf türlerinde de karotenoid sentezini arttırdığı bilinmektedir. Bu organizmalarda karotenoid sentezinin, azot kıtlığı oluştuğunda gelişim ve protein sentezi için kullanılamayan fazla karbon ve enerjinin kullanılması için mikroorganizmanın verdiği bir tepki olarak kabul edilebilir (McNeil vd. 2013).

Genelde kültür ortamlarında yüksek C:N oranının kullanılması karotenoid birikimi açısından önem arz etmektedir (Guevara-González vd. 2010). Bu hipotezi destekleyen birçok çalışma olmakla beraber, ancak bazı çalışmalara göre ortamda düşük C:N oranı bulunmasının, hücrenin lipid üretimini azaltarak metabolizmanın karotenoid üretimine doğru kaymasına neden olduğunu göstermektedir (Somashekar ve Joseph 2000; Elfeky vd. 2019).

2.3.6. Karbon katabolit represyonu

Enzim indüksiyonu gibi, besiyerinde karbon kaynağı yönetimi de diğer bir adıyla karbon katabolit baskılanması, mikroorganizmayı koruyucu bir mekanizma olmakla beraber hücrenin protein sentez sistemlerinin yönetilerek ziyan olmasını engellemektedir. Hücreler karbon kaynağının asimilasyonu için enzim üretirken diğer substratların yıkımı için gerekli olan enzim üretimi öncül substrat bitene kadar baskılanmaktadır. Baskılanan enzimler genel olarak uyarılabilmektedir (Sanchez 2007).

Mayalarda ve diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi mevalonat yolunun genel kontrolü, izoprenoid sentezinin ilk aşamalarında, özellikle mevalonat oluşumundan sorumlu enzim seviyesinde, hidroksimetilglutaril-CoA redüktazda gerçekleşir. Bu enzim katabolit represyonu ve çözünmüş oksijen stres mekanizması tarafından yönetilmektedir (McNeil vd. 2013).

2.3.7. pH etkisi

Araştırmacıların çalışmalarına göre mikroorganizmalar çoğunlukla en fazla karotenoid üretimini pH 6-7 aralığında gerçekleştirmektedir. pH değişimini asitten alkali ortama değiştirmek, kesikli besleme uygulanan metotlarda kültürü aktif etmek için kullanılmaktadır. Bu yöntem ile *X. dendrorhous* kültüründe en yüksek astaksantin 23.810 µg/L üretimi ve biyokütle gelişimi 39 g/L olarak sağlanmıştır. Bununla birlikte, deniz suyunda yaşayan *R. glutinis* tarafından β-karoten üretimi pH 6 civarında en yüksek, pH 10 civarında en düşük üretimini gerçekleştirmiştir. Damıtılmış suya kıyasla, optimum pH 6'da β-karoten içeriğinde 2 kat ve torulen üretiminde ise 2.3 kat artış gözlenmiştir (Sorour vd. 2017).

2.3.8. Katkı maddelerinin etkisi

Hızlı ve fazla karotenoid üretimi için çeşitli ajanlar kültür besiyerine eklenebilmektedir. Bu geliştiricilerin bir grubu, aerobik koşullar altında metabolik reaksiyonlarda önemli bir rol oynayan trikarboksilik asit döngüsünün ara maddeleridir. Bu maddeler karotenoid ve lipid biyosentezi için gerekli karbon iskeletini oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin kültür ortamına eklenme süresi de stimülasyon derecesini belirlemektedir. Ayrıca protein sentezinin azalması ile de pigment üretiminin artması paralellik göstermektedir. Çünkü protein üretiminin kısıtlanması, karbon akışının pigment biyosentezine kaydırılmasında önemli bir adımdır. Bunlara ek olarak, fazla solunum ve trikarboksilik asit döngüsü aktivitesinin, yüksek miktarda reaktif türün üretimi ile ilişkili olduğu ve bunların karotenoid üretimini arttırdığı bilinmektedir (Certik vd. 2009).

Birçok kimyasal ajanın karotenoid üreten mikroorganizmayı etkilediği bilinmektedir. Bu bileşiklerden terpenler, iyononlar, aminler, alkaloidler, antibiyotikler, izopropanol, etilen glikol, fenol, hidrojenperoksit, çığır ve organik asitlerin karotenoid üretimi üzerine etkileri çalışılmıştır (Avalos ve Carmen Limón 2015). Bu çalışmalardan birinde, 2-4-klorofeniltio trietilamin (CPTA) inhibitörünün likopen birikimini uyardığı ve beraberinde γ-karoten miktarında artışa neden olduğu bildirmektedir. Yüksek miktarda CPTA ile hücrelerin yıkanmasının; γ-karoten, likopen ve ayrıca β-karoten miktarında

eşzamanlı artışı sağladığı bildirilmiştir. 100 mg CPTA ile muamele edilen *P. blakesleanus* türünde β -karoten üretiminin %75 artış gösterdiği saptanmıştır.

Veratrol ve dimetilfitalat gibi fenol bileşiklerinin kimyasal stimulusya neden olan ve β -karoten üretimini arttıran kimyasal bileşiklerden olduğu bildirilmiştir. Bazı mikroorganizmaların ise fenolü metabolizmasında kullandığı bildirilmektedir. Buna göre *Rhodotorula* cinsi araştırıldığında, *R. rubra* türünün katekol (renksiz fenol bileşiği) oluşturmada önce fenolü hidroksillediği ve ardından okside ederek cis,cis-mukonik aside dönüştürdüğü bilinmektedir. Bu gözlenen fenol yıkımının *R. glutinis* ve *R. rubra* için aynı olduğu bildirilmiştir. *R. glutinis* gelişimi sırasında fenolün üretilen β -karoten oranı üzerinde uyarıcı etkileri gözlemlenmiştir. Ayrıca eklenen fenolün üretilen karotenoid bileşiğinin değişmesine neden olduğu bilinmektedir. 500 ppm fenolün kültüre katılması ile β -karoten miktarında %35 oranında artış olmuştur. N,N-dietilalkilaminin sıvı kültüre eklenmesi (1000 mg/L), likopen birikiminin artmasına; ancak düşük amin konsantrasyonu ise β -karotenin artışına neden olmaktadır. Buna göre; mikroorganizmalardaki karotenoid biyosentezi normalde β -karoten üretimini uyararak kimyasal inhibitörler ile gizlenmiştir. Bu önerinin kontrolü nihai ürün olan β -karoten vasıtası ile yapılır (Sorour vd. 2017).

Araştırmacılar karotenoid üretimini anlamak için kimyasal uyarıcıları, özellikle de aminleri incelemişlerdir. Bu kimyasalların çoğunun yapısının trisporik aside benzerliği ortaya çıkmıştır. Vitamin A, askorbik asit, β -iyonon, α -iyonon bileşiklerinin trimetilsiklohegzil halkasına sahip olduğu görülmüştür. Tüm bu faktörlerin küflerde karotenoid üretimini uyurabileceği bildirilmiştir (Sorour vd. 2017).

B. trispora'nın 24 saatlik gelişmiş kültürüne (1 mg/L) penisilin eklenmesinin, toplam proteini etkilemeden karotenoid üretimini %50 oranında arttırdığı gözlemlenmiştir. Uyarıcı faktör olarak penisilin, erken evrelerde izopren sentezine etki ettiği ve mevalonat kinaz aktivitesinin penisilin varlığında iki katına çıktığı tespit edilmiştir. *R. mucilaginosa* için ise kloramfenikol (1000 mg/L) antibiyotikinin toplam karotenoid üretimi üzerine pozitif etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Etanol, metanol ve etilen glikol gibi çözücülerin ortama eklenmesinin mikrobiyal karotenoid üretimini uyardığı bildirilmiştir. Ayrıca, etanol (%2, v/v) kullanılması *R. glutinis*'te β -karoten üretimini ve torulen oluşumunu uyardığı, ancak torularhordin oluşumunu durdurduğu bilinmektedir. Bu bağlamda %3.6 oranında etanol, ortamda karbon ve enerji kaynağı olarak görev almakta, ayrıca *R. glutinis* için β -karoten üretimi için destekleyici etki etmektedir. Etanolün torulen oksidasyonuna olan dolaylı inhibitör etkisine, karotenoid yapısının son halkasının metabolizmasında istenen değişimlerin oluşmasıyla β -karoten miktarındaki artışın eşlik ettiği bildirilmektedir. Diğer bir çalışmaya göre *X. dendrorhous* kültürüne %0.2 (v/v) etanol eklenmesiyle karoten üretiminin artacağı önerilmektedir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre; etanol, HMG-CoA redüktazı uyarıp, oksidasyon metabolizmasını aktive ederek karotenoid üretimini arttırmaktadır (Sorour vd. 2017).

2.3.9. Mikrobiyal morfolojinin β -karoten üretimine etkisi

Flamentli mikroorganizmaların metabolit üretiminde makromorfolojilerinin etkileri de atlanmamalıdır. Bilindiği üzere küflerin makromorfolojisi, sıvı kültür

içerisinde kültür koşulları ve fermentasyon koşullarına bağlı olarak pellet oluşumu ve dispers halde üreme şeklinde olmaktadır (Park vd. 2006). Gelişim sırasında morfolojinin besin tüketiminden, oksijen tüketim hızından, inokülasyon miktarı, inokülasyon yaşı, besiyeri viskozitesi, sıcaklık, basınç gibi etkenlerden etkilendiği bilinmektedir (Papagianni 2004). Ayrıca gelişim sırasında oluşan formların, besi ortamlarının reolojisini etkilediği bildirilmektedir. Dispers gelişim oldukça viskoz, non-newtonian akışa sahip sıvı besiyerlerinin oluşumuna neden olurken, bundan dolayı da kütle transferi, özellikle sıvı-gaz arası gerçekleşen kütle transferine direnç artmaktadır. Tam tersine pellet morfolojisi ise newtonian akış sağlamakla beraber, kolay karışma sağladığı için besiyerinde kütle transferini kolaylaştırmaktadır. Ancak, kritik çap değerini aşan pelletlerin yoğun çekirdek kısımlarında substrat kısıtlanması gerçekleşmesi nedeniyle gelişim de kısıtlanmaktadır. Hatta o kısımlarda otoliz bile olabilmektedir (Hamanaka vd. 2001; Papagianni 2004). Bu kısıtlanma sonucu gerçekleşen otoliz, hücrel metabolizmayı ve ürün oluşumunu etkilemektedir. Sıvı kültürün reolojisinin değiştirilmesi ile ısı ve kütle transferi değişiminin gerçekleşmesi sonucunda biyokütle sisteminin içerisindeki metabolizmanın da değiştiği düşünülmektedir. Pellet halinin oluşumunda ortaya çıkan besin kısıtlanması ile özellikle pellet çekirdeğinde olan hücrel değişimin biyokimyasal farklılaşmaları tetiklediği düşünülmektedir. Bu oluşan biyokimyasal farklılaşmanın genel metabolizmayı, sekonder metabolizmaya kaydıracağı düşünülmektedir. Buna göre pellet halinde gelişimin, metabolizmanın sekonder metabolizmaya kayması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cleirigh 2005). Bu sebeple gelişim sırasında küçük pelletlerin oluşumu, fungal fermentasyonlarda arzu edilen yapıdır (Papagianni 2004).

Pellet morfolojisinin getirdiği bir durum olarak pellet halinde gelişime neden olan kültür koşullarında, genelde durağan fazda üretilmesi beklenen sekonder metabolitlerden β -karotenin büyüme fazında bile üretimi olduğu bilinmektedir. Bunun sebebi olarak büyüme aşamasında morfolojinin pellet halinde gelişimi ile oksidatif strese karşı iyi bir savunma hali oluşurken, pelletin merkez kısımlarına besin gitmemesi ile besin yetersizliği oluşmakta, bunun sonucunda ise kitinaz enzimi tetiklenmekte ve artan kitinaz aktivitesi ile erken fazda, yani büyüme fazında bile bu kısımlarda otoliz başlamaktadır (Emri vd. 2004). Erken fazda otoliz olmaya başlayan hücrede ROS (reaktif oksijen türleri) birikimi olmakta ve bunun sonucunda oksidatif strese giren hücrenin savunma mekanizmalarından olan antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin artışıyla beraber eğer hücrenin karakteristiğinde varsa enzimatik olmayan diğer bir savunma mekanizması olan karotenoid üretiminin de arttığı bildirilmektedir (Bai vd. 2003; Nanou vd. 2007; Roukas 2016).

2.4. Optimizasyon

2.4.1. Plackett-Burman tasarımı

Mikrobiyel yolla ürün elde edilmesinde mikroorganizmanın gelişebilmesi ve istenilen ürünü maksimum verimlilikte üretebilmesi için bazı kültürasyon parametrelerinin ve fermentasyon koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir. Bir mikrobiyal ürünün üretiminin optimize edilebilmesi geleneksel veya istatistiksel yolla gerçekleştirilebilmektedir. Geleneksel yöntem araştırmanın her aşamasında sadece bir

faktörün değiştirilmesi ve diğer faktörlerin sabit bir değerde tutulması ile (her defasında bir faktör yöntemi) uygulanmaktadır. Bu da oldukça fazla sayıda deney yapılmasına neden olmaktadır. Buna karşın istatistiksel deney tasarımları çok sayıda faktörün aynı zamanda çalışılmasını mümkün kılmaktadır. Bu nedenle kısa zamanda ve daha güvenilir sonuç elde edebilme, ürün üzerine etki eden faktörlerin etkileşimini belirleyebilme, uygulanan deney sayısında azalma gibi avantajlara sahiptir. Bu nedenlerle, istatistiksel deney tasarım yöntemleri her yönden daha ekonomik olan yöntemlerdir. Yapılmış olan bu tez çalışmasında iki aşamalı optimizasyon gerçekleştirilmiştir. İlk olarak Plackett-Burman tasarımı kullanılarak besiyeri bileşiminde, β -karoten üretimi üzerine en etkili olan faktörlerin bulunması sağlanmıştır. Hadamard matris deseni olarak da bilinen Plackett-Burman tasarımı iki seviyeli kısmi faktöriyel deney tasarımıdır. Bu matrisin en önemli özelliklerinden biri -1 ve +1'lerden oluşan $n \times n$ boyutlarında kare matris olmasıdır (Seberry ve Yamada 1992). Bahsi geçen deneme tasarımı "n" sayıda değişkenin/faktörün ürün elde edilmesi üzerine etkisinin "n+1" sayıda deneme ile belirlenmesine olanak tanıyan bir deney tasarım yöntemidir. Ancak n+1 sayıdaki denemeler 4'ün katları olmak zorundadır. Bunu sağlayabilmek için ise dummy faktör olarak geçen, rastgele hatayı azaltan etkisiz faktörler eklenmektedir. Örnek vermek gerekirse, 4 faktörlü bir çalışmada 5 deneme olması beklenir, ancak 5, 4'ün katı olmadığı için 4 faktörlü çalışmaya 3 adet etkisiz faktör eklenerek faktör sayısı 7'ye çıkarılır. Böylece 4'ün katı olan 8 denemeye çıkarılarak PBD deseni için gereklilik sağlanmış olur (Briefs 2013).

Plackett-Burman deneme deseni iki seviyeli tam faktöriyelin (2^k) çözünürlük III tasarımı olduğu ve sadece doğrusal modeller üzerinde çalışılabildiği için 1. dereceden polinom modeli kullanılır:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (2.1)$$

Burada Y, bağımlı değişken olarak adlandırılır, β_0 model kesişim noktası, β_i lineer katsayı, X_i ise bağımsız değişken olarak ifade edilir. Bu model ikili faktörlerin etkileşimi hakkında bilgi vermemektedir. Sadece önemli faktörlerin ortaya çıkmasında ve cevap üzerinde oluşturabileceği etkinin hesaplanmasında kullanılır. Bulunan katsayıların negatif ya da pozitif olması etkinin yönünü belirler. Katsayının sıfıra yakın olması ile çok küçük veya hiç etkinin bulunmamasından söz edilebilir (Manowattana vd. 2012).

Daha önce de belirtildiği gibi burada etkili olan faktörlerin birbirleri ile olan ilişkilerinden ziyade sadece hedef üzerinde olan etkileri belirlenmektedir. Her bir faktörün etkisinin ($E(y)$) belirlenmesi aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$E(y) = 2[\sum(y+) - \sum(y-)]/N \quad (2.2)$$

Burada $y+$ ve $y-$ olarak belirtilen ifadeler, seçilen faktörün minimum ve maksimum değerleridir. N ise yapılan denemelerin sayısını ifade etmektedir. Her faktörün önem derecesinin bulunması için ise basit ANOVA yaklaşımı yapılarak, gerçek faktörlerin önemleri değerlendirilir.

Deneyisel hata, eklenen etkisiz faktörlerin varyanslarının aşağıdaki gibi hesaplanması ile bulunmaktadır.

$$V_{\text{eff}} = \Sigma(E_d)^2 / n \quad (2.3)$$

Burada V_{eff} faktörlerin etkilerinin varyansı, E_d etkisiz faktörlerin (dummy variable) etkisi, n ise etkisiz faktörlerin sayısıdır. Faktör etkilerinin standart hatası ise (SE) bir etkinin varyansının karekökünü alarak bulunabilir. Her bir etkinin önem seviyesi (p-değeri) ise T-testi uygulanarak bulunmaktadır (Joshi vd. 2007).

Deneme deseni sonuçlarının grafiksel olarak temsil edilmesi, sonuçları yorumlama noktasında daha elverişli olabilmektedir. Belirli bir sayıda faktör içeren herhangi bir modelin kabul edilmesinden önce, kalıntı değerleri (residual values), yani gözlenen ve tahminlenen değer arasındaki farkın ($y'-y$) dağılımı kontrol edilmelidir. Bunun için x ekseninde gerçek kalıntı değerlerini gösteren, y ekseninde ilgili değerler için beklenen normal değerleri gösteren grafik oluşturulmalıdır. Tüm değerler düz çizgi üzerinde düşerse, kalıntı değerlerinin normal dağıldığı söylenebilmektedir (Vanaja ve Rani 2007).

Plackett–Burman tasarımı, test sayısını azaltan ve objektif faktörlerin değerlendirilmesini sağlayan bir tarama metodudur. Yanıt üzerine olumlu etkileri olan etkili faktörler, optimizasyonun bir sonraki adımı için kullanılabilir ve daha az önemli olan ya da yanıt üzerinde olumsuz etkileri olan diğer faktörler bir sonraki testlerde atlanabilir. PBD metodu besiyeri optimizasyonunda veya çok kombinasyonlu formülasyonlarda bir basamak olarak kullanılabilir (Singh vd. 2017).

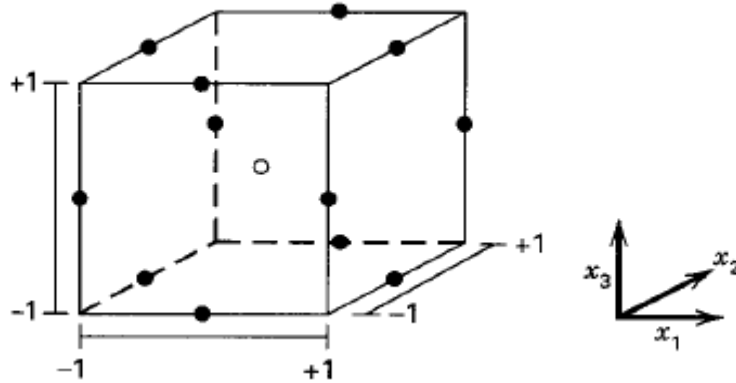
2.4.2. Yanıt yüzey yöntemi

Mikroorganizmalardan karotenoid üretimi, besiyeri bileşimi ve fermentasyon koşullarına ait birçok faktöre bağlıdır. İstatistiksel test desenleri ve veri analizlerinin kullanımı, önemli faktörleri saptamada ve faktör seviyelerini optimize etme açısından “her defasında bir faktör” yaklaşımından daha kullanışlı ve etkilidir (Sorour vd. 2017). Genel olarak, kültür şartları “her defasında bir faktör” yaklaşımı ile optimize edilebilir. Bu yaklaşımda, önemli bilinen faktörün seviyesi değiştirilerek diğer faktörler sabit tutulur. Metodun gayet açık ve basit olmasının yanında istatistiksel değerlendirmeye gerek kalmaz. Ancak yapılan test sayısının fazlalığı ve faktörler arasında etkileşimin göz ardı edilebilmesi, yöntemin dezavantajları arasındadır. Tam tersine; istatistiksel testler, desenlerin sonuçlarının açıklanması açısından oldukça etkilidir. Ayrıca bu testler ile farklı değişkenlerin arasındaki etkileşimlerin tahmin edilmesi olasıdır. Bu metotlar, besiyeri bileşimlerini ve fermentasyon koşullarını optimize etmek için çalışmalarda çokça kullanılmaktadır. Bu metotlardan biri olan yanıt yüzey metodu; testlerin tasarlanması, modellerin oluşturulması, faktör etkilerinin değerlendirilmesi ve istenen yanıtlar için optimum koşulların araştırılması için bir dizi spesifik istatistiksel yöntemdir (Malisorn ve Suntornsuk, 2008; Ravaghi vd. 2016). Bu nedenle yanıt yüzey metodu; besiyeri bileşiminin, fermentasyon koşullarının, son yıllarda da endüstriyel proseslerin optimize edilmesi için sıkça kullanılmaktadır (Sorour vd. 2017).

Yanıt yüzey yöntemi, “Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması” ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. İlk olarak kimya endüstrisine uygulanmıştır. Myers, Montgomery ve Anderson-Cook yanıt yüzey

yöntemini, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlamıştır. Yanıt yüzey yöntemi, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin yanıtı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir. Genel olarak yanıt yüzey yöntemi üç aşamadan (eleme denemeleri, bölge araştırması ve işlemin veya ürünün optimizasyonu) oluşmaktadır. Eleme denemeleri, daha az sayıda ve daha verimli esas denemelerin yapılmasına olanak sağlamaktadır. İkinci aşama olan bölge araştırmasında amaç, eleme denemeleri ile belirlenen bağımsız değişkenlerin, sistemin yanıtında oluşturdukları değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlemektir. Yanıt yüzey yönteminin üçüncü aşaması, işlem optimum noktaya yaklaşıldığında başlar. Gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller (genellikle ikinci dereceden polinomiyal modeller, üssel modeller veya eksponensiyel modeller) kullanılır. Uygun bir model elde edildikten sonra, bu model optimum noktanın araştırılmasında kullanılır.

En yaygın olarak kullanılan üç düzeyli faktörler içeren başlıca deneme düzenleri; Merkezi karma tasarım ve Box Behnken deneme düzenleridir (Tekindal 2009). Box ve Behnken tarafından 1960 yılında ortaya konan bu deneme düzenleri ikinci dereceden yanıt yüzeyleri modeli oluşturmak için etkili bir yöntemdir. Dengeli tamamlanmamış blok denemelerinin üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Modelde yer alacak faktörlerin en az üç düzeyli olması gerekir (Tekindal 2009).



Şekil 2.5. Box-Behnken tasarımı

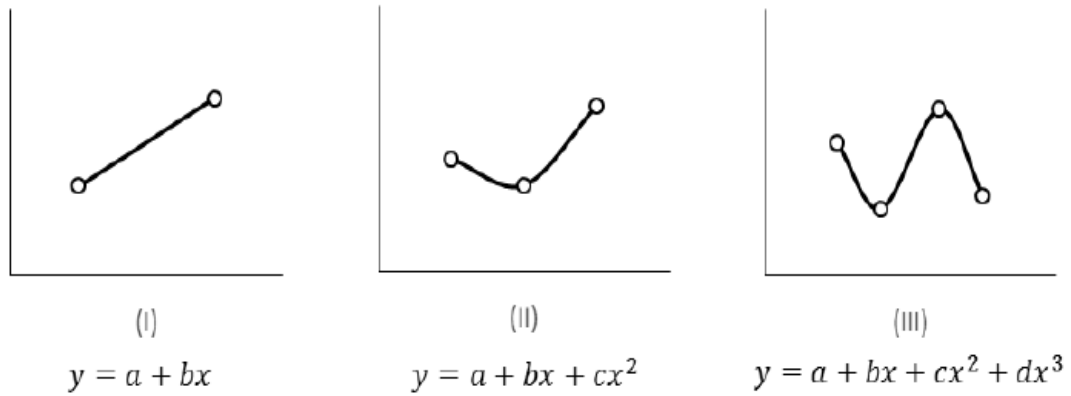
Şekil 2.5’de 3 değişkenli bir Box Behnken deseni görülmektedir. Bu desende tüm noktaların, yarıçapının $\sqrt{2}$ olan bir kürenin üzerine düştüğü unutulmamalıdır. Tüm değerlerin maksimum ve minimum noktaları kübik alanın dışına çıkmamaktadır (Myers, Montgomery ve Andersen-Cook 1997). Box-Behnken tasarımları, ikinci dereceden modellerin tahminine, ardışık (sequential) tasarımların kurulumuna, modelin güven eksikliğinin analizine ve bloklara izin verdiği için kullanılan bir yanıt yüzey tasarımıdır (Baş 2010).

Yanıt yüzey yönteminde elde edilen modeller çoklu lineer regresyon sonucu

oluşturulurlar. Elde edilen modellerde faktörlerin, yanıt üzerine etkileri aşağıdaki gibi bir denklem ile hesaplanmaktadır.

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum \sum_{i < j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte “y” yanıt değişkeni, “ β ” regresyon katsayıları, “x” bağımsız değişkenleri, “ ε ” ise hata terimini ifade etmektedir. İstatistiksel deney tasarımı etkileri incelenen faktörlerin yanıt değişkeni üzerine olan etkisi doğrusal olduğu zaman regresyon modeli 1. dereceden olacaktır (Şekil 2.6. (I)). Etkinin karesel olması (Şekil 2.6. (II)) için faktörlerin en az üç farklı seviyede deneylerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Faktör etkilerinin kübik (Şekil 2.6. (III)) olarak tanımlanması için ise faktörün en az 4 seviyede denenmiş olması gerekmektedir (Sağol 2015).



Şekil 2.6. Lineer (I), polinomiyal (II) ve kübik (III) modeller

“Model fitting” olarak da bilinen verileri eğriye uydurma ile elde edilen modellerin deneysel verileri ne ölçüde karşıladıklarının test edilmesine geçmeden önce, modelin gerçek değerlere daha uyumlu ve istatistik için gerekli olan yanıt değerlerinin normal dağılımlı olmasını sağlamak için yanıtların dönüşümü yapılması gerekiyorsa, onu sağlamak gerekmektedir. Yanıt değerlerinin en büyük değerinin en küçük değerine oranının 10’dan fazla olması durumunda dönüşüm uygulamak gerekmektedir. Dönüşüm, yanıt değişkenlerinin bir fonksiyon süzgecinden geçirilip, regresyonun elde edilen değerle yapılmasından ibarettir. Genellikle kuvvet fonksiyonu veya logaritma fonksiyonu kullanılmaktadır (Serdar ve Köro 2007). Ardından, oluşturulan modelin istatistiksel parametreleri olan regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı (R^2_{adj}), varyasyon katsayısı, regresyon için uygulanan varyans analizi (ANOVA), yani F-testleri ve model uygunsuzluğu testi (lack of fit) incelenmelidir. Bu sayede modelde bulunması gereken lineer, interaksiyon ve kuadratik etkilerin önemi belirlenmiş olur. Burada varyans analizi yapılırken elde edilen deneysel verilerin kurulan modele uygunluk seviyesi, belirli

güven aralıklarında belirlenmelidir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan güven aralıkları; 0.05 ve 0.01 olarak belirtilmektedir (Kavuncu 2010). Regresyon analizi sonucu bulunan R^2 değerlerinin -1 ile 1 arasında olduğuna dikkat edilmelidir. R^2 değerinin 0.9 dan büyük olması genel olarak istenmekte ve modelin deneysel veriler ile büyük ölçüde uyum sağladığını göstermektedir (Granato ve Ares 2013; Akdeniz 2019). R^2_{adj} değerinin de kontrol edilmesi gerekmektedir. Normalde seçilen modele terim eklendikçe R^2 değerinin artma eğilimi vardır ve bu modeli yorumlamak için yanıltıcı olabilir. R^2_{adj} için ise böyle bir değişim söz konusu değildir, o nedenle iki değer beraber yorumlanması gerekmektedir (Myers, Montgomery ve Andersen-Cook 1997). Uyum eksikliği testinde ise, modelin geçerli olabilmesi için kurulan hipotez testinin istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmesi gerekmektedir. Aksi halde model uyumsuz kabul edilmektedir (Myers, Montgomery ve Andersen-Cook 1997).

Önemli olan, yanıt yüzey modelinin belirlenmesinden sonra model parametreleri için varyans analizi sonuçları (ANOVA) ile modelin uygunluğu testi (lack of fit), PRESS (tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı ve %CV değerleri, R^2 , R^2_{adj} , tahminlenmiş R^2 , Adequate precision (kesinlik) değerleri kontrol edilmelidir. Burada model seçilimi gerçekleştikten sonra modele parametre ekleyip çıkartma işlemi yapılabilir. Ancak bu işlem yukarıda bahsedilen değerleri etkilemektedir. O nedenle modelin doğru bir şekilde tahmin edilmesi için bu değerlerin uygun aralıkta olması, modelin yeterliliği açısından önem arz etmektedir. Son olarak, tüm yukarıda bahsedilen aşamalar bittikten sonra deneysel verilere göre bağımsız değişkenlerin yanıt üzerine etkisini ifade eden bağıntı, empirik denklem ile ifade edilmelidir. Bunun için seçilen modelde terimlerin katsayıları en küçük kareler yöntemi kullanılarak belirlenmektedir (Myers, Montgomery ve Andersen-Cook 1997). Ayrıca, değişkenlerin yanıt üzerine etkilerinin görüldüğü kontur grafikleri ve 3D (3 boyutlu) yanıt yüzey grafikleri yorumlanarak yanıt değişkeninin hedef fonksiyonunun ne olması isteniyorsa ona göre koşullar tespit edilebilmektedir. Ayrıca DoE (design of experiment) yaklaşımını içeren popüler paket programlarında optimizasyon başlığı içerisinde, optimum koşulların belirlenmesi için istenen hedefe ulaşma fonksiyonu (desirability function) ile de yapılabilmektedir. Buna göre bu fonksiyonlar: maksimum, minimum, hedef değer atanması veya belli bir aralıkta olması gibi farklı istenebilirlik fonksiyonlarını kullanmaktadır. İstenen hedefe ulaşma fonksiyonu; 0 ile 1 arasında değişim göstermektedir. Özellikle istenebilirlik değerinin 0.70'in üzerinde olması gerekmektedir (Granato ve Ares 2013). Bu değer 1'e yaklaşmasının, belirlenen optimum koşullarda, istenilen hedefe ulaşıldığı anlamına geldiği de belirtilmektedir (Akdeniz 2019).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan *Mortierella ramanniana* (Möller) Linnemann (DSMZ 62752) küfö Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültür Koleksiyon Enstitüsü'nden temin edilmiştir. *Mortierella ramanniana*, Kavadia vd'in (2001) önerdiği şekilde patates dekstrozu agar besiyeri içeren (Merck, Darmstadt, Almanya) tüpler içindeki yatık agarlarda ikişer paralelli olarak 27°C'de 3 gün spor oluşturma kadar inkübe edildikten sonra, küfler kullanılıncaya kadar tüpler içindeki yatık agarlarda (slant agar), +4°C'de muhafaza edilmiştir (Papanikolaou vd. 2004). Her 10 günde bir +4°C'de muhafaza edilen küf kültürleri (stok kültür) petriden petriye ve tüpten tüpe aktarılıp aşılanaarak tazeliği korunmuştur.

Tez boyunca yapılan istatistiklerde, Plackett-Burman tasarımı için Minitab® 16.0.0 (Pennsylvania, ABD) versiyonunun deneme sürümü kullanılmıştır. Yanıt yüzey çalışmalarında ise Design Expert ® 11.0.0 deneme sürümü kullanılmıştır. Grafik çizimleri ise OriginPro® 2017 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programının deneme sürümü kullanılarak yapılmıştır.

3.1.1. Araştırmada kullanılan mikroorganizma

Mortierella cinsi küfler taksonomik sınıflandırmaya göre Zygomycota şubesi, Zygomycetes sınıfı, Mortierellales takımı, Mortierellaceae ailesinin bir üyesi olup filamentli funguslardandır (Renker vd. 2005)(Tanabe vd. 2004; White vd. 2006). Bu gruba giren funguslar zigospor oluşturarak hem eşeyli, hem de vejetatif sporlanma ile eşeysiz üreyerek karakteristik üreme döngüsünü göstermektedirler (Streekstra 2010).

Mortierella ramanniana türünün %2'lik malt ekstraktı ve %0.5 maya ekstraktı içeren Czapek-Dox besiyerine ekimi yapıldığında koloniler beyaza çalan kısımları olan şarap kırmızısı-kahverengi halinde görünür. Kadifemsi miselleri 2-3 mm boyutlarında olabilir. Sporangium küresi 18-29 µm çapında ve kolümellaya sahiptir. Sporangioforları 300-700 µm uzunluğunda olup düz veya bir ya da daha fazla dalla dallanmış olarak bulunmaktadır. Sporları pembe, oval veya elips şeklinde ve 1.5-3 x 2.5-5.5 (~2 x 4) µm büyüklüğündedir. Hif ve sporangiospor hiyalinleri, klamidospor ve büyük hücreler mevcuttur (Evans 1972).

3.1.2. Küf kültürünün gereksinimleri ve biyolojik aktivitesi

Küflerin çoğunda görülebildiği gibi, sıvı kültürde misellerin gelişiminin pellet şeklinde veya dispers olduğu bilinmektedir (Park vd. 2006). Pellet olarak üremiş kültürlerin vizkositesi istenilen şekilde düşüktür, ancak pelletin iç kısmına olan kütle transferi zorlaşmaktadır (Hamanaka vd. 2001). Besi ortamındaki karbon kaynağı konsantrasyonu ve spesifik amino asitlerin varlığı gibi çevresel koşullara bağlı olarak küflerin morfolojilerinin değiştiği bilinmektedir (Park vd. 2002; Park vd. 2006). Zigomisetes misellerinin bu doğası, küflerin fermentör içerisindeki kayma gerilimine karşı hassas olabileceği konusunda endişelere yol açmıştır. Hücre duvarına verilen hasar sitoplazma kaybına yol açabilmektedir. Bu da önemli bileşiklerin mikroorganizma içerisinde birikiminin azalmasına neden olmaktadır. Bu duruma örnek olarak, karışık bir

pellet / dispers *M. alpina* kültüründe, araşidonik asit (ARA) birikiminin çoğunun pellet fraksiyonunda meydana geldiği gösterilebilir (Higashiyama vd. 1999). Sonuç, miselyum parçalarının pelletlerden kayma gerilimi ile “traş edilmesi” ve işlem sırasında hasar görmesi şeklinde yorumlanmıştır (Higashiyama vd. 1999; Streekstra 2010).

3.2. Misel Süspansiyonu Hazırlanması

Misel süspansiyonları, Wynn ve Ratledge (2000)’nin önerdiği metot modifiye edilerek hazırlanmış olup, buna göre +4°C’de muhafaza edilen tüpler içindeki stok kültürün üzerine aseptik koşullar altında steril 10 adet cam boncuk (3 mm çapında) ile beraber 5 ml steril saf su ilave edildikten sonra bu tüplerin 2000 rpm’de 5 dakika vorteks ile karıştırılması ile misel süspansiyonu elde edilmiştir.

3.3. Ön Kültür Hazırlanması

Ön kültür hazırlanmasında kullanılan besi ortamı Kavadia vd. (2001)’nin belirttiği yöntem ile şu şekilde hazırlanmıştır; 5 g/L glukoz, 7 g/L KH₂PO₄, 2 g/L Na₂HPO₄, 1.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 0.1 g/L CaCl₂.2H₂O, 0.008 g/L FeCl₃.6H₂O, 0.001 g/L ZnSO₄.7H₂O, 0.0001 g/L CuSO₄.5H₂O, 0.0001 g/L Co(NO₃)₂.H₂O, 0.0001 g/L MnSO₄.5H₂O ve 0.5 g/L maya ekstraktı tartılıp saf su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra besi sıvısının pH’sı 6.0’a ayarlanıp, 121°C’de 20 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

Misel süspansiyonunun ön kültür besi ortamına aşılama işlemi, Dong ve Walker (2008) tarafından uygulanan yöntemler modifiye edilerek yapılmıştır. Buna göre 100 mL steril besi ortamına aseptik koşullar altında 1 mL misel süspansiyonu ile aşılama yapılmış olup, aşılama ön kültür besi ortamı çalkalamalı inkübatörde 28±1°C’de, 180 rpm’de, 2 gün süreyle ön fermentasyona tabi tutulmuştur.

3.4. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması

Sıvı besi ortamı Kavadia vd. (2001)’nin belirttiği yöntemine göre Çizelge 3.1’de gösterilen oranlarda hazırlanmıştır. Ardından saf su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra besi sıvısının pH’sı 6.0’a ayarlanmıştır. Farklı karbon kaynakları ile hazırlanan bu sıvı besi ortamlarından 95 ml’lik kısımlar ayrılıp, 250 ml’lik özel fermentasyon erlenleri (Sigma-Aldrich / CLS4444250 Pyrex baffled shaker flask) içerisine aktararak, ağzıları özel silikon sünger kapaklar (SIGMA-ALDRICH / C1046-10EA Silicone Sponge Closures, Size: 38mm) ile kapatıldıktan sonra sterilize edilip (121°C’de 20 dakika) ardından 28°C’ye soğutulmuştur. Daha önceden 2 gün süre ile ön fermentasyona bırakılarak elde edilmiş olan ön kültürden 5’er mL (%5) alınıp, 95 mL’lik besi ortamlarına aktararak aşılama gerçekleştirilmiştir. Yanıt yüzey optimizasyonu öncesinde yapılacak tüm fermentasyonlar, Kavadia vd. (2001)’nin kullandığı yöntemine göre 28±1°C’de, 170-180 rpm’de 10 gün çalkalamalı inkübatörde fermentasyona bırakılmıştır (Evans 1972).

Çizelge 3.1. Kontrol besiyeri bileşimi

	Adı	Miktar
1	Glukoz	30 g/L
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/L
3	KH ₂ PO ₄	7 g/L
4	Na ₂ HPO ₄ ,	2 g/L
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5 g/L
6	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1 g/L
7	FeCl ₃ .6H ₂ O	0.008 g/L
8	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.001 g/L
9	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0001 g/L
10	Co(NO ₃) ₂ .H ₂ O	0.0001 g/L
11	MnSO ₄ .5H ₂ O	0.0001 g/L
12	Maya ekstraktı	0.5 g/L

3.5. Biyokütlenin besi ortamından ayrılması

Optimizasyon aşamasının sonuna kadar yapılan fermentasyonlarda, inkübatörden alınan 100 mL'lik örnekler (besi ortamı + yaş biyokütle) Papanikolaou vd. (2004) 'nin belirttiği şekilde santrifüj tüplerine alınıp 22000 g'de, 4°C'de, 20 dakika süreyle santrifüj (VWR-Mega Star 3.0) edildikten sonra Wynn ve Ratledge (2000)'nin önerdiği gibi filtre kağıdından (Whatman no:1) süzölmüştür. Filtre kağıdı üzerindeki yaş biyokütle birkaç kez bol distile su ile yıkanıp, kurutma amacıyla ayrılmıştır.

Optimizasyonun doğrulama basamağında ise, günlük periyodik olarak inkübatörden alınan 100 mL'lik örnekler (besi ortamı + yaş biyokütle) Papanikolaou vd. (2004) 'nin belirttiği şekilde santrifüj tüplerine alınıp 22000 g'de, 4°C'de, 20 dakika süreyle santrifüj (VWR-Mega Star 3.0) edildikten sonra Wynn ve Ratledge (2000)'nin önerdiği gibi filtre kağıdından (whatman no:1) süzölmüştür. Filtreden geçirilen berrak süzöntü (kullanılmış besi ortamları) saklama tüplerine alınıp daha sonra HPLC'de şeker analizleri yapılmak üzere -20°C'de depolanmıştır. Filtre kâğıdının üstünde kalan yaş biyokütle ise birkaç kez (tamamen kullanılmış besi ortamından temizlenene kadar) bol distile su ile yıkanıp, filtrasyonda kullanılmış olan ve daha önceden kurutularak darası alınmış olan filtre kağıdı ile birlikte kurutma işlemi için ayrılmıştır (Wynn ve Ratledge 2000, Kavadia vd. 2001, Papanikolaou vd. 2004).

3.6. Biyokütlenin Kurutulması

Filtre kâğıdında kalan yaş biyokütle, Klempova vd. (2013)'nin önerdiği yöntemle göre 65°C'lik etüvde 1 gece bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulan biyoküteller filtre kâğıdı ile birlikte tartılıp önceden kaydedilmiş olan kuru filtre kâğıdı ağırlığı çıkarılarak kuru biyokütle miktarı hesaplanıp kayıt edilmiştir. Kuru biyoküteller, kuru ve temiz tüpler içine alınıp daha sonra biyokütleden pigment ekstraksiyonu yapılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7. Biyokütleden Pigment Ekstraksiyonu

Thakur ve Azmi (2013)'nin önerdikleri yöntemle göre; tüpler içindeki kuru biyoküteller, ilk önce etil asetat ve hekzan (1:1, v/v) konulmuş behere aktarılıp Ultraturraks (6×10^3 rpm) ile parçalanarak partikül boyutları küçültüldükten sonra, ultrasonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070, Berlin, Almanya) ile %50A, %90 atımlı koşullar altında 10 dakika boyunca ultrasonikasyon uygulanarak pigmentin dışarıya salınımı kolaylaştırılmıştır. Bu aşama sonrasında pigmentin ekstraksiyon basamağına geçilmiştir. Bunun için; 1:1 (v/v) oranında hekzan/etilasetat eklenmiş olan biyoküteller, 3000 g, 5°C'de, 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülen çözgen içinde çöktürülüp, süzöntü (supernatant) filtre kâğıdından süzülerek (Whatman no:1) ayrılmıştır. Çözgen ve hücre renksiz olana kadar ekstraksiyona devam edilmiştir. Daha sonra birleştirilen bütün süzöntüler, önceden iyice temizlenip kurutulmuş ve darası alınmış ağzı şilifli cam balonlara aktarılmış ve süzöntülerdeki çözgen vakum altında 40°C'de rotary evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra içerisinde β -karoten bulunan yağ elde edilmiştir. İçerisinde yağ bulunan balonların ağırlığı kayıt edildikten sonra, elde edilen yağ, hekzan-aseton-etanol (2:1:1, v/v/v) içerisinde hacmi 10 ml olacak şekilde çözündürülüp daha sonra spektrofotometrik yöntem ile kantitatif analizi yapılmıştır. Tüm işlemler β -karotenin hassasiyeti gereği karanlık ortamda yapılmıştır.

3.8. Besi Ortamında HPLC ile Şeker Analizi

Deneyin son aşamasında *Mortierella ramanniana* (Möller) Linnemann küfünün optimum besiyerinde karbon kaynağı kullanımı incelenmiştir. Bu nedenle fermentasyon sonrasında örneklerden hücrelerin ayrılmasıyla geriye kalan kullanılmış besi ortamlarındaki şeker miktarı HPLC cihazında belirlenmiştir. Bu amaçla; 1 ml örnek alınıp balon joje içerisine aktarıldıktan sonra saf su ile 20°C'de 100 ml'ye tamamlanmıştır. İyice çalkalanan balondan yeterli miktarda şırınga ile çekilen seyreltilmiş örnek 0.45 μ m ayırma sınırındaki membran filtreden süzöldükten sonra viallere doldulup HPLC cihazına (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) analiz edilmek üzere verilmiştir. Standart laktoz çözeltileri hazırlanıp elde edilen piklerden, örneklerdeki şeker düzeyleri belirlenmiştir.

HPLC' de analiz koşulları aşağıdaki gibi yürütülmüştür.

Hareketli faz : Milli-Q su, 0.6 mL/dakika

Analitik ve koruyucu kolon : Coregel- 87P (300x7.8 mm ID)

Enjeksiyon hacmi : 20 μ L

Kolon fırını sıcaklığı : 60°C

Dedektör : RID

3.9. Biyokütlede β -karoten Miktarının Tayini

β -karotenin farklı çözenler içerisinde çözündüğünde maksimum absorbanı verdiği dalga boyu değışiklik göstermekle beraber, bu çalışmada kullanılan çözendeki maksimum absorbanı dalgaboyu 450 nm olarak belirlenmiştir (Butnariu 2016). Bu nedenle ölçümler, spektrofotometre kullanılarak 450 nm’de yapılmıştır. β -karoten standardı (SIGMA,C-9750), hekzan-aseton-etanol (2:1:1;v/v/v) içerisinde çözdürölerek, artan konsantrasyonlar halinde hazırlanmıştır (0.5-2 mg/L). Kantitatif analiz için standart kalibrasyon eğrisi çizimi, standartların absorbanlarının ölçölmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinden, hekzan-aseton-etanol çözeltisi içerisinde çözünmüş standart β -karotene ait ekstinksiyon katsayısı $E_{cm}^{1\%1}$ bulunmuştur. Ekstrakte edilmiş örnekler, hacimleri hekzan-aseton-etanol (2:1:1, v/v/v) çözeltisi ile 10 mL’ye tamamlandıktan sonra absorbanı değerleri köre karşı ölçölür. Beer–Lambert yasası gereğı mg/L cinsinden konsantrasyonlar hesaplanır. Tüm analizler β -karotenin hassasiyeti gereğı karanlık ortamda yapılmıştır.

3.10. β -karoten Üretimi İçin Besiyeri Bileşenlerinin Plackett-Burman Tasarımı ile İncelenmesi

Optimizasyonun ilk aşaması olan besiyerinde istenilen yanıtı etkileyen, birbirinden bağımsız olan değışkenleri tespit etmek için uygulanan bir metot olan Plackett-Burman deneme deseni, 8 faktör içeren bir tasarımla denenmiştir. Bu tasarıma geçmeden önce besiyerinin temel iki bileşeni olan karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle ön aşama olarak bu iki bileşene karar vermek için Çizelge 3.2’de gösterildiğı gibi 9 farklı şeker kaynağı denenerek sonrasında seçilen en iyi üç şeker kaynağı ile birlikte 6 farklı azot kaynağı denenmiştir.

Azot kaynağı, bu üç şeker kullanılarak en çok β -karoten üretimini sağlayanlar arasından seçilmiştir. Ardından kontrol besiyerinde olan diğeri bileşenleri de içeren Plackett-Burman tasarımı, Minitab 16.0.0 istatistik programı kullanılarak 8 faktörle oluşturulmuş ve iki tekerrür olacak şekilde uygulanmıştır. Plackett-Burman tasarımı, iki seviyeli bir tasarım olduğı için en yüksek ve en düşük konsantrasyonlar literatürdeki değerlere göre belirlenmiştir. Çizelge 3.3’de tasarımın gereğı, en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar gösterilmektedir. Burada dikkat çekilmesi istenen bir nokta da mineral madde içeriğidir.

Çizelge 3.2. Belirlenen karbon ve azot kaynakları

	Şeker kaynakları	Azot kaynakları
1	Mannoz	(NH ₄) ₂ SO ₄
2	Laktoz	KNO ₃
3	Sukroz	Üre
4	Ksiloz	Glisin
5	Maltoz	Asparajin
6	Glukoz	(NH ₄) ₂ HPO ₄
7	Galaktoz	
8	Arabinoz	
9	Fruktoz	

Çizelge 3.3. Plackett-Burman tasarımında kullanılan değişkenlerin düşük ve yüksek seviyedeki konsantrasyonları

Sıra	Faktör	En düşük miktar (-)	En yüksek miktar (+)
1	Laktoz	20 g/L	40 g/L
2	KNO ₃	0 g/L	2.8 g/L
3	KH ₂ PO ₄	1.5g/L	12.5 g/L
4	Na ₂ HPO ₄ ,	1 g/L	4 g/L
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g/L	2.5 g/L
6	CaCl ₂ .2H ₂ O	0 g/L	0.15 g/L
7	Maya	0 g/L	1 g/L
8	Mineraller	-1	1

Kontrol besiyerinde olan ve çok seyreltik olan minerallerin miktarları literatüre göre düşük ve yüksek konsantrasyonları belirlenerek tek bir bileşenmiş gibi kabul edilmiştir. Bunun sebebi önceki çalışmalara göre, bileşenlerin çok seyreltik olmalarından

kaynaklı olarak sistem yanıtı üzerine yanıltıcı etkilerinin olmasından dolayıdır.

Programın önerdiği 12 deneme neticesinde ulaşılan sonuçlar, beklenen ve gözlenen miktar açısından karşılaştırılmıştır. Çoklu regresyon analizi sonrasında elde edilen verilerin varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına bakılarak istatistiksel olarak önemli olan faktörler belirlenmiştir. Bunun yanında, yanıtı β -karoten konsantrasyonu olan ve 8 adet besiyeri bileşimini içeren (faktörler) 1. dereceden denklemden oluşan model elde edilmiştir. Elde edilen modelin R^2 değerlerinin uygunluğu değerlendirilip modelin önem düzeyi için F-testi uygulanmıştır. Daha sonra ileri optimizasyon için ikinci aşama olan yanıt yüzey yöntemine geçilip optimizasyona devam edilmiştir.

3.11. Fermentasyon Ortamını Etkileyen Koşulların Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile İncelenmesi

Tezin bu kısmına kadar *Mortierella ramanniana*'nın β -karoten üretiminde etkili olan besiyeri bileşenlerinin önemi değerlendirilmiştir. Bu aşamada ise optimizasyonun yanıt yüzey yönteminin önemli araçlarından biri olan Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Çalışmada bağımsız değişkenler, önceki verilere göre seçildikten sonra, tasarım Design Expert 11® programı ile oluşturulup optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Box Behnken deneme deseninde kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin seviyeleri

Bağımsız değişken	Birim	Sembol	Seviye Kodları		
			-1	0	1
Laktoz	g/L	X_1	15	27.5	40
C:N oranı	-	X_2	20:1	50:1	80:1
Çalkalama hızı	rpm	X_3	130	180	230

Box-Behnken tasarımı, bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için sadece üç seviyede çalışan küresel bir tasarımdır. 3 seviyeli 3 bağımsız değişkenin, 2 bağımlı değişken üzerindeki etkileri, merkez noktada 5 tekrarlı olmak üzere 17 farklı deney kombinasyonu ile incelenmiştir. Bu tasarımda seçilen bağımsız değişkenler, ön çalışmalar ve Plackett-Burman tasarımı sonucunda elde edilen veriler ışığında seçilmiş olup, Çizelge 3.4'de Box-Behnken tasarımına göre değişkenler ve değişkenlerin çalışılan aralıkları gösterilmiştir. Burada C:N oranı belirlenirken, laktoz konsantrasyonunun %42'si C (teorik) olarak alınmıştır. KNO_3 'ün ise %14'ü N (teorik) olarak alınmıştır. Ayrıca kontrol besiyerinde maya ekstraktı da bulunduğu için bundan gelen %11,4'lük N miktarı da hesaba katılarak en son elde edilen C:N oranı ayarlanmıştır.

Yapılan denemeler sonrasında belirlenen bağımlı değişkenler ve sembolleri Çizelge 3.5’de belirtilmiştir

Çizelge 3.5. Bağımlı değişkenler ve sembolleri

Sembol	Bağımlı değişken
Y_1	β -karoten derişimi ($\mu\text{g/L}$)
Y_2	Biyokütle miktarı (g/L)

3.12. Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi

Design Expert® programı ile oluşturulan Box Behnken tasarımının önerdiği denemeler iki tekerrür olarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin bir modele uygunluğu belirlenmeden önce yanıtların normal dağılıma uygun olması gerekmektedir (Montgomery 1997). Bunu sağlamak için Box-cox dönüşümleri, programın izin verdiği ölçüde uygulanabilmektedir. Dönüşümün doğru yapıp yapılmadığı ise Box-cox grafiğinden bakılarak değerlendirilebilir. Dönüşüm uygulanıp uygulanmayacağına karar verildikten sonra yanıt yüzey yönteminde, yanıtlar ile değişkenler arasındaki ilişkiyi ifade eden modeller kendi aralarında çoklu lineer regresyon analizi yapılarak oluşturulur. Oluşturulan modellerin geçerliliğinin kontrolü için model uygunsuzluğu testi (lack of fit) değerleri, R^2 değerleri ve p-değerleri analiz edilmiştir.

Aşağıda verilen denklem, faktörlerin yanıt üzerine olan kuadratik etkilerini de içeren ikinci dereceden bir modeldir. Tezde, faktörlerin yanıtlar üzerine etkisi aşağıdaki gibi ikinci dereceden bir denklem ile açıklanabilmektedir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (3.1)$$

Eşitlikte Y , cevap değişkenini; X_1, X_2, X_3 faktörlerin ana etkilerini; $X_1 X_2, X_1 X_3, X_2 X_3$ faktörlerin etkileşim etkilerini; X_1^2, X_2^2, X_3^2 faktörlerin ikinci dereceden (*quadratic*) etkilerini, β_0 sabiti ve β_1 - β_3 faktörlerin katsayılarını göstermektedir (Yerlikaya 2013).

Bu denklemin, modeli yeteri kadar açıkladığından emin olmak için regresyon analizi sonuçları, varyans analizi sonuçları ve model uyumsuzluğu testleri (lack of fit) değerlendirilmiştir. Ardından modelde istatistiksel olarak önemli olan parametreler kalacak şekilde model indirgenmiş olup, en doğru denkleme ulaşılmıştır. En son elde edilen denklemi karşılayan kontur ve 3D grafikleri de incelenmiş ve yorumlanmıştır.

3.13. Optimizasyon

Yanıt ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi veren denklem elde edildikten sonra, optimizasyon aşamasında istenebilirlik fonksiyonu (desirability function) kullanılmıştır. Bu amaçla Design Expert® programının optimizasyon başlığı altındaki numerik optimizasyon kısmı kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında, biyokütle ve β -karoten üretiminin artırılmasına yönelik olduğu için, bu iki yanıt maksimum hedef olarak belirlenmiştir. Ayrıca iki hedef için de önem seviyeleri 5 yıldız olacak şekilde tutulmuştur. Bağımsız değişkenler ise maksimum ve minimum sınırlar arasında çalışılmıştır. Çizelge 3.6'da belirlenen hedefler ve bağımsız değişkenlerin çalışılan aralıkları gösterilmektedir. Hedefler bu şekilde belirlendikten sonra programın istenebilirlik fonksiyonun çözümleri arasında 1'e en yakın çözümü seçilerek bu kombinasyon ile doğrulama deneyleri yapılmıştır. Doğrulama deneyi yapılırken her gün alınmak üzere tek bir tekerrür için 10 adet erlen hazırlanmış olup, 10 günlük fermentasyona bırakılmıştır. Her gün bir erlen inkübatörden alınarak metot kısmında anlatılan işlemler uygulanıp, analiz safhasına geçilmeden, daha sonra analizleri yapılmak üzere -20°C'de depolanmıştır. Buna göre β -karoten üretimi, biyokütle üretimi ve karbon tüketimi zamana bağlı olarak optimum besiyerinde belirlenebilmiştir. Buradan kinetik parametreler hesaplanmıştır.

Çizelge 3.6. Optimizasyon aşamasında yanıt için kullanılan hedefler ve değişkenlerin değerleri

İsim	Birim	Hedef	Düşük sınır	Yüksek sınır
Laktoz	g/L	aralıkta	15	40
C:N	-	aralıkta	20	80
Çalkalama hızı	rpm	aralıkta	130	230
β -karoten	$\mu\text{g/L}$	maksimum	380.5	1192.7
Biyokütle	g/L	maksimum	3.6	16.1

3.13.1. Optimum koşulları barındıran besiyerinde kinetik parametrelerin belirlenmesi

Optimize edilen besiyerinde gelişen kültürün, gelişme eğrisinden yararlanılarak kinetik parametreler hesaplanmıştır. Her gün alınan erlenlerde şeker, biyokütle, β -karoten miktarları belirlendikten sonra, elde edilen veriler doğrultusunda zamana bağlı olarak biyokütle, β -karoten miktarı ve laktoz derişimini gösteren grafik çizilmiştir. Bu verilerle;

- Şeker tüketimi (g/L)
- β -karoten (mg/L)

- Verim (%)
- Maksimum tüketim oranı (g/L/gün)
- Maksimum üretim oranı (g/L/gün)
- Spesifik gelişim oranı (gün⁻¹)
- Canlı hücrelerin iki katına çıkma süresi (Doubling time) (gün)

belirlenmiştir.

Statik bir kültürde belli bir miktarda substrat (S) kullanılarak inokülasyon ile besiyerine dahil olan X_0 hücre kütlesi gelişmenin sonunda (durma fazında) en yüksek değer olan X_{max} hücre kütlesine, bununda yanında başlangıçtaki substrat miktarı en düşük değere ve mikroorganizma faaliyeti ile üretilen ürün (P) en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bu bilgilere göre;

$X = X_{max} - X_0$, popülasyonun kütlesi g/L olarak hesaplanmıştır. (X_{max} : fermentasyonun son günündeki hücre kütlesi X_0 : fermentasyon başlangıcındaki hücre kütlesi)

$S = S_1 - S_0$, şeker tüketimi gelişim sonunda g/L olarak hesaplanmıştır. (S_1 : fermentasyonun son günündeki substrat konsantrasyonu, S_0 : fermentasyon başlangıcındaki substrat konsantrasyonu)

$P = P_1 - P_0$, ürün miktarı gelişim sonunda µg/L olarak hesaplanmıştır. (P_1 : fermentasyonun son günündeki ürün konsantrasyonu, P_0 : fermentasyon başlangıcındaki ürün konsantrasyonu)

Bunun yanında mikroorganizma kütle verimi ve ürün verimi;

$$\text{Verim (Y}_{P/S}\text{) (\%)} = [\beta\text{-karoten miktarı (}\mu\text{g /L) / Toplam şeker tüketimi (g/L)] * 100$$

$$\text{Verim (Y}_{X/S}\text{) (\%)} = [\text{Biyokütle miktarı (g/L) / Toplam şeker tüketimi (g/L)] * 100$$

eşitlikleri ile hesaplanmıştır.

Ayrıca maksimum üretim, maksimum tüketim, spesifik gelişme ve gelişme oranı da;

$$\text{Gelişme oranı (g/L/gün)} = \text{Biyokütle eğrisinin en dik kısmının eğimi,}$$

$$\text{Üretim oranı (g/L/gün)} = \beta\text{-karoten eğrisinin en dik kısmının eğimi,}$$

$$\text{Tüketme oranı (g/L/gün)} = \text{Şeker eğrisinin en dik kısmının eğimi,}$$

Spesifik gelişme oranı (gün⁻¹) = $\ln x$ 'e karşı zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır.

Mikroorganizmanın biyokütlesinin gelişim hızı ve ikiye katlanma süresi ise;

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (3.2)$$

Eşitliğinden hesaplanmıştır.

μ : gelişme hızı katsayısı

x : hücre kütlesi olarak ifade edilmektedir.

Besiyeri ortamındaki mikroorganizma miktarına ait değerlerin (X) doğal logaritması alındıktan sonra zamana karşı grafik oluşturulduğunda elde edilen denklemin eğimi mikroorganizmanın spesifik gelişme hızının hesaplanmasını sağlamaktadır (Demir 2010).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının, *Mortierella ramanniana* ile β -karoten Üretiminde Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışmasının amacı, *Mortierella ramanniana* kullanılarak besiyeri bileşenlerinin ve fermentasyon parametrelerinin optimize edilip, β -karoten üretiminin artırılmasıdır. İleriki aşamalarda, endüstriyel atıkların değerlendirilerek β -karoten üretiminde kullanılmasına yönelik verilerin elde edilmesi amacıyla çalışmada öncelikle saf şekerler kullanılmıştır. Yapılan tez çalışmasının ilk aşamasını oluşturan ve β -karoten gibi sekonder metabolitlerin üretimi açısından kritik olan karbon ve azot kaynağı seçimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 9 farklı karbon kaynağı kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde diğer bileşenler sabit tutulmuştur. İlk olarak farklı şekerler ile hazırlanan besiyerleri çalkalamalı inkübatörlerde 10 günlük fermentasyona bırakılmış ve alınan sonuçlara göre aralarından seçilen 3 farklı şeker ile 6 farklı azot kaynağı sonraki aşamadaki üretimlerde denenmiştir. Karbon kaynağı seçimi için yapılan fermentasyonlar sonucu elde edilen veriler sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı karbon kaynakları ile yapılan fermentasyonlar sonucu elde edilen β -karoten ve biyokütle değerleri

Şeker	β -karoten $\mu\text{g/L}$	Biyokütle g/L	β -karoten $\mu\text{g/g}$ biyokütle
Maltoz	720.0	9.4	76.4
Laktoz	690.0	9.2	75.0
Glukoz	564.3	10.1	60.2
Mannoz	512.6	9.6	53.4
Sukroz	505.6	10.6	47.7
Galaktoz	464.5	9.4	49.6
Ksiloz	305.2	8.6	35.6
Fruktoz	226.2	9.8	23.0
Arabinoz	140.0	5.3	26.6

Sonuçlar incelendiğinde, mikroorganizmanın en fazla β -karoten ürettiği besi ortamları laktoz, maltoz ve glukoz içeren besi ortamları olup, sırasıyla 690 $\mu\text{g/L}$, 720 $\mu\text{g/L}$ ve 564.3 $\mu\text{g/L}$ olarak tespit edilmiştir. En düşük β -karoten üretimi arabinozun kullanıldığı besiyerinde gözlenmiş olup 140 $\mu\text{g/L}$ olarak belirlenmiştir. Buna göre azot kaynağı seçimi için laktoz, maltoz ve glukoz karbon kaynakları olarak seçilmiştir. Bu

şekerleri içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Her bir şeker için 5 farklı azot içeren, 5 farklı besiyeri hazırlandıktan sonra bunlar 10 gün boyunca çalkalamalı inkübatörlerde fermentasyona bırakılmıştır. Azot kaynağı seçimi için yapılan fermentasyonlardan alınan sonuçlar Çizelge 4.2 'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. Farklı azot kaynakları ile yapılan fermentasyonlar sonucu elde edilen β -karoten ve biyokütle değerleri

Azot kaynağı	Maltoz		Laktoz		Glukoz	
	β -karoten $\mu\text{g/L}$	Biyokütle (g)	β -karoten $\mu\text{g/L}$	Biyokütle (g)	β -karoten $\mu\text{g/L}$	Biyokütle (g)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	555.3	0.86	483.5	0.6	411.7	1.01
KNO_3	286.2	0.67	815.5	0.5	537.4	1.07
Üre	358.0	0.99	465.6	1.06	429.7	1.0
Glisin	340.0	0.92	609.1	1.07	447.6	0.99
Asparajin	430.0	0.93	743.7	1.02	492.5	1.05

Sonuçlara göre, laktoz içerikli besiyerlerinde en fazla β -karoten üretiminin, azot kaynağı olarak KNO_3 kullanıldığında, 815.5 $\mu\text{g/L}$ olarak tespit edilmiştir. Maltoz içerikli besiyerlerinde en düşük β -karoten üretimi, azot kaynağı olarak KNO_3 kullanıldığında, 286.2 $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Maltoz içerikli besiyerlerinde en fazla β -karoten üretiminin ise azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ kullanıldığında, 555.3 $\mu\text{g/L}$ olduğu tespit edilmiştir. Maltoz içerikli besiyerlerinde en düşük β -karoten üretiminin, azot kaynağı olarak üre kullanıldığında, 465.6 $\mu\text{g/L}$ olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlara dayanarak, Plackett–Burman deneme deseni kullanılarak yapılan besiyeri optimizasyonu için, karbon kaynağı olarak laktoz, azot kaynağı olarak ise KNO_3 seçilmiştir. Kontrol besiyerinde olan diğer tüm bileşenler Plackett–Burman deneme deseninde yer almaktadır. Ancak çok seyreltik olan bileşenlerin, yani besiyerinde bulunan iz minerallerin, daha önce yapılan çalışmalara göre sonuçları oldukça saptırmasından dolayı tek bir bileşen olarak yer almasına karar verilmiştir. Bunu için mineral karışımında bileşenlerin minimum olduğu değerleri; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.004g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00005g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.000075 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00007g/L olarak, maksimum değerleri ise; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0012g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0015g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00015g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.000225 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00021g/L olarak belirlenmiştir.

4.2. Besiyeri Kompozisyonunun Plackett-Burman Tasarımı ile İncelenmesi

İlk iki aşamadan alınan sonuçlara göre, Minitab® 16.0.0 programı kullanılarak iki seviyeli deneme deseninde veriler oluşturulmuştur. Çizelge 3.3'de programa girilecek

veriler listelenmiştir. Çizelge 4.3’de ise programın önerdiği deneme deseni verilmiştir. 8 faktörden oluşan 12 farklı formülasyona sahip besiyeri bileşenlerinin β -karoten üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla deneme fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Programa göre hazırlanan besiyerleri 180 rpm’de, $28\pm 1^\circ\text{C}$ ’de ve 10 gün süreyle fermentasyona bırakılmıştır. Bölüm 3.2’de anlatılan protokol izlenerek 10 günün sonunda alınan erlenler içerisindeki örneklerin β -karoten miktarları saptanmıştır.

Çizelge 4.3. PBD deseni ve fermentasyonlar sonucu elde edilen β -karoten miktarları

Besiyeri	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y ₁
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	86.1
2	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	206.6
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	203.4
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	6.68
5	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	136.4
6	1	1	1	-1	1	1	1	-1	985.7
7	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	806.5
8	-1	1	1	1	-1	1	-1	1	76.8
9	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	513.2
10	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	235.5
11	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	91.9
12	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	791.3

X₁: Laktoz, X₂: KNO₃, X₃: KH₂PO₄, X₄: Na₂HPO₄, X₅: MgSO₄.7H₂O, X₆: CaCl₂.2H₂O, X₇: Maya, X₈: Mineral, Y₁: β -karoten

Çizelge 4.3’de PBD deseni uygulanan besiyerlerinde üretilen β -karoten miktarları gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek β -karoten üretiminin, 6 numaralı besiyerinde gerçekleştiği ve β -karoten miktarının 985.7 $\mu\text{g/L}$ olduğu tespit edilmiştir. En düşük β -karoten üretiminin ise 6.68 $\mu\text{g/L}$ ile 4 numaralı besiyerinde olduğu saptanmıştır.

Yapılan denemeler sonucunda, bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişken olan β -karoten üretimi üzerine etkisinin anlaşılması ve onu temsil eden denklemin oluşturulması için çoklu lineer regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bilindiği üzere PBD deseni ile sadece 1. dereceden denklemler elde edilmekte ve faktörlerin kendi aralarında olan etkileşimleri belirlenmemektedir. Her faktörün etkisi Bölüm 2.4.1’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Ardından her bir faktörün önem seviyesinin ölçülmesi için varyans analizi

(ANOVA) yapılmıştır. Çizelge 4.4’de her bir faktörün β -karoten üretimi için hesaplanan etki değerleri ve katsayıları gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre; X_3 , X_4 , X_8 (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , mineraller) bileşenlerinin β -karoten üretimi üzerine negatif etkiye sahip oldukları ve bu bileşenler arasından yalnızca X_8 ’in (mineraller) istatistiksel öneme sahip olduğu ($p<0.05$) PBD deseni ile tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, X_1 , X_2 , X_5 , X_6 , X_7 bileşenlerinin β -karoten üretimi üzerine pozitif etkiye sahip oldukları ve aralarından X_2 (KNO_3), X_7 (Maya ekstraktı) bileşenlerinin β -karoten üretimi üzerine istatistiksel olarak önemli oldukları ($p<0.01$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Üretilen β -karoten için hesaplanan etki değerleri ve katsayılar

Faktör	Etki	Katsayılar	T	p
Sabit		+345.01	13.73	0.0010**
X_1	64.21	+32.11	1.28	0.291
X_2	295.19	+147.59	5.87	0.010**
X_3	-118.45	-59.23	-2.36	0.100
X_4	-122.79	-61.39	-2.44	0.092
X_5	22.39	+11.19	0.45	0.686
X_6	146.68	+73.34	2.92	0.062
X_7	489.59	+244.79	9.74	0.002**
X_8	-177.2	+88.6	-3.53	0.039*

X_1 : Laktoz, X_2 : KNO_3 , X_3 : KH_2PO_4 , X_4 : Na_2HPO_4 , X_5 : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, X_6 : $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, X_7 : maya, X_8 : Mineral, Y_1 : β -karoten, R^2 : 0.98, Düzeltilmiş R^2 : 0.93, Tahinlenmiş R^2 : 0.71, ** $p<0.01$, * $p<0.05$, önemli parametrelerin temsili

PB desenine göre yapılan çoklu regresyon sonunda elde edilen ve faktörlerin β -karoten üretimi üzerine etkilerini ifade eden 1. dereceden denklem Eşitlik 4.1’de verilmiştir.

$$\beta\text{-karoten üretimi } (\mu\text{g/L}) = -56.1 + 3.2 X_1 + 105.4 X_2 - 10.7 X_3 - 40.9 X_4 + 11.2 X_5 + 977.8 X_6 + 489.6 X_7 - 88.6 X_8 \quad (4.1)$$

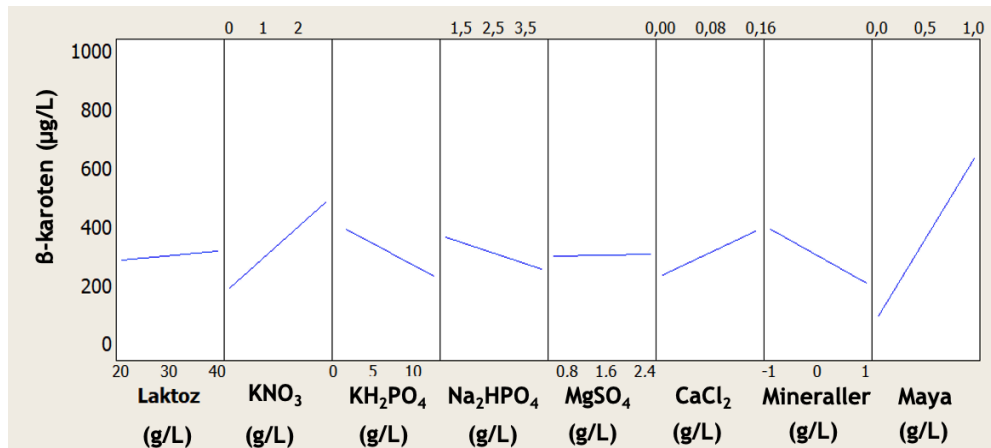
Mortierella ramanniana’nın β -karoten üretiminde, PBD deseni uygulanarak elde edilen denklemin regresyon sonuçları incelendiğinde, R^2 değerinin 0.98 olduğu görülmektedir. Bu da; elde edilen modelin, sistemi %98 oranında açıklayabildiğini göstermektedir. Diğer bir deyişle, deneysel veriler ile Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanan verilerin birbirlerine çok yaklaştığı görülmektedir.

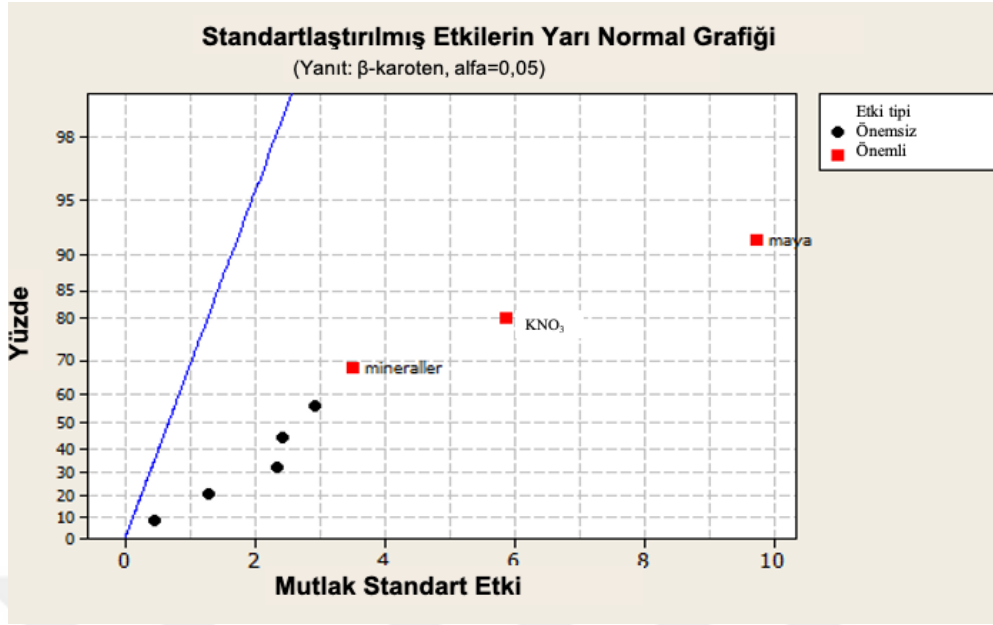
Çizelge 4.5. Modelin varyans analiz (ANOVA) sonuçları

Kaynak	SD	KT	Düz. KT	Düz. KO	F	P
Ana etkenler	8	1240411	1240411	155051	20.46	0.015*
Artık Hata	3	22733	22733	7578		
Saf hata	3	22733	22733	7578		
Toplam	11	1263143				

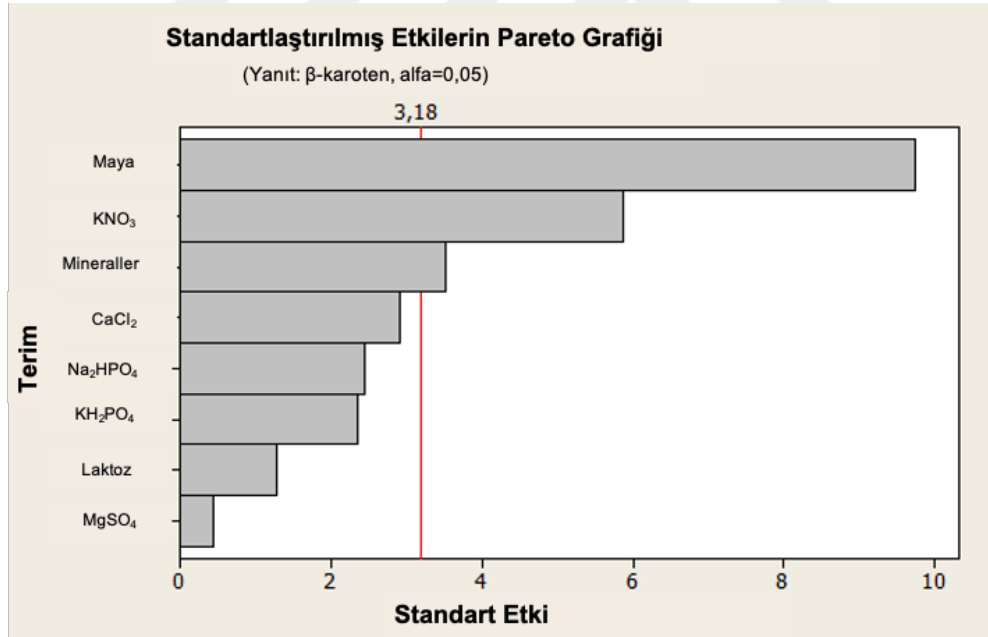
R^2 : 0.98, Düzeltilmiş R^2 : 0.93, tahminlenmiş R^2 : 0.71, SD: serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı; Düz. KT: Düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: Düzeltilmiş kareler ortalaması, * $p < 0.05$, Güven seviyesi %95 dir.

Yukarıda gösterilen Çizelge 4.5’de, elde edilen modelin varyans analiz (ANOVA) sonuçları yer almaktadır. Bu sonuçlara bakılarak modelin istatistiksel olarak %95 seviyesinde önemli ($p=0.015 < 0.05$) olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçların yanında, β -karoten üretimi üzerine pozitif ve negatif etkiye sahip olan besiyeri bileşenlerinin ana etkilerini ifade eden grafikler Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Grafiklerden görüldüğü gibi, besiyeri bileşimlerinden laktoz, KNO_3 , MgSO_4 , CaCl_2 ve maya ekstraktı konsantrasyonlarının artışının β -karoten üretimi üzerine pozitif etkilerinin olduğu anlaşılmaktadır. KNO_3 ve maya ekstraktının etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup ($p < 0.01$), bileşenlerin eğimlerinin diğerlerine göre oldukça dik olduğu dikkat çekmektedir. Besiyerinde bu bileşenlerin konsantrasyonlarının artmasıyla β -karoten üretiminin arttığı belirlenmiştir. Geriye kalan KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 ve mineral konsantrasyonlarının β -karoten üretimi üzerine olan etkilerinin negatif olduğu görülebilmektedir. Bunların arasında sadece minerallerin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır. Besiyerinde iz minerallerin konsantrasyonunun artırılması ile β -karoten üretiminin azaldığı gözlenmektedir.

Şekil 4.1. β -karoten üretimi üzerine pozitif ve negatif etkiye sahip besiyeri bileşenleri



Şekil 4.2. Besiyerindeki bileşenlerin β -karoten üretimine olan standartlaştırılmış etkilerinin yarı normal grafiği

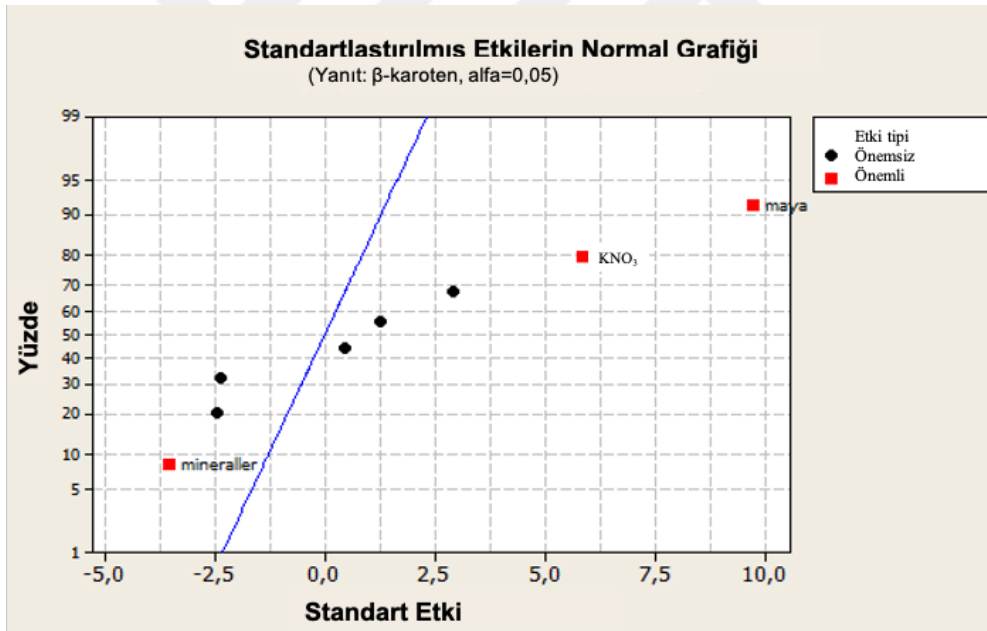


Şekil 4.3. Besiyerindeki bileşenlerin β -karoten üretimine olan standartlaştırılmış etkilerinin pareto grafiği

Şekil 4.2’de bileşenlerin standartlaştırılmış etkilerine ait olan yarı normal grafiği gösterilmektedir. Bu grafiğe bakılarak istatistiksel olarak önemli etkileri bulunan bileşenlerin görsel olarak tespit imkânı sağlanmaktadır. Grafikte bulunan hataların normal dağılım çizgisine en uzak olan faktörlerin yalnızca istatistiksel olarak en önemli faktörler olduğu bilinmektedir. Buna göre grafikten bakıldığında varyans analizini

(ANOVA) sonuçlarını da haklı çıkaran bilgileri görmek mümkündür. Maya ekstraktı, KNO_3 ve minerallerin, β -karoten üretimi üzerine istatistiksel olarak önemli etkileri olan bileşenler olduğu görülmektedir.

Şekil 4.3’de ise, besiyerindeki bileşenlerin β -karoten üretimine olan standartlaştırılmış etkilerinin Pareto grafiği gösterilmektedir. Burada varyans analizinde belirlenen Bonferonni limitinin üstünde kalan bileşenlerin istatistiksel olarak öneme sahip oldukları bilinmektedir. Buna göre standartlaştırılmış etkileri, 3.18 olan limit değerinin üstünde olan bileşenler; Maya ekstraktı, KNO_3 ve mineral konsantrasyonlarının istatistiksel olarak öneme sahip ($p<0.05$) oldukları belirlenmiştir. Ancak bu iki grafik ile buradan etkinin olumlu olup olmadığı bilgisine ulaşmak mümkün değildir. Etkilerin olumlu ya da olumsuz olduğunun anlaşılması için ise standartlaştırılmış etkilerin normal grafiklerini incelemek gerekmektedir. Şekil 4.4’de gösterilen standartlaştırılmış etkilerin normal grafiği görülmektedir. Grafiğe bakıldığında, Normal Skor Noktası olarak kabul edilen sıfır değerinin üzerinde olan KNO_3 ve maya ekstraktı konsantrasyonlarının artışının, β -karoten üretimini olumlu yönde etkilediği anlaşılmaktadır. Mineral konsantrasyonunun artışının ise normal skor değeri olan sıfırın altında yer almasından olayı negatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Besiyerindeki bileşenlerin β -karoten üretimine olan standartlaştırılmış etkilerinin normal grafiği

β -karoten üretimini arttırmaya yönelik literatüre bakıldığında yapılan bir optimizasyon çalışmasında, *Rhodotorula graminis* RC04 mayası kullanılmıştır (Ferrao and Garg 2012). Çalışmada besiyeri bileşenlerinin, β -karoten üretimi üzerine olan etkileri ve bileşenlerin kendi aralarında interaksyonu araştırılmıştır. Kritik faktörlerin belirlenmesi için Plackett-Burman deseni ve yanıt yüzey yöntemlerinden merkezi kompozit tasarımı kombine olarak kullanılmıştır. Besiyeri bileşenlerinden mannitol, KNO_3 , maya ekstraktı, KH_2PO_4 ve MgSO_4 , PB deseni ile kritik faktörlerin belirlenmesi

için taranmıştır. Besiyeri başlangıç pH'sının 5.5 olması, β -karoten üretimi için optimum pH olarak bulunmuştur. PBD sonuçlarına göre, mannitol, maya ekstraktı, KNO_3 ve MgSO_4 'ün yüksek miktarlarının hem biyokütle hem de β -karoten üretimi üzerine pozitif etkilerinin olduğu saptanmıştır. Maya ekstraktının ise hem biyokütle hemde β -karoten üretimi için kritik olduğu belirlenmiştir. Ardından etkili bulunan mannitol ve maya ekstraktının biyokütle ve β -karoten üretimi üzerine olan etkilerinin ve birbirleri ile olan ilişkisinin belirlenmesi için merkezi kompozit deseni kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde β -karoten üretimi için maya ekstraktının daha önemli olduğu saptanmıştır. Optimize edilen besiyerinde mannitol miktarının 10-20 g/L aralığında ve maya ekstraktının ise 9.5-10 g/L aralığında olması halinde elde edilen optimum biyokütlenin 3.8-4.3 g/L ve optimum β -karoten içeriğinin 190-220 $\mu\text{g/L}$ aralıklarında olduğu bildirilmiştir. Tezin bu aşamasında alınan sonuçlar bahsedilen çalışma ile uyum göstermektedir.

4.3. β -karoten Üretimi Amacıyla En Uygun Fermentasyon Ortamı Seçimi İçin Sonuçların Değerlendirilmesi

PB deneme deseninden alınan sonuçlara göre, besiyeri bileşenlerinden maya ekstraktı ve KNO_3 azot kaynaklarının β -karoten üretimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Besiyeri ortamında karbon ile azot kaynağı oranının, sekonder metabolitlerin üretimini etkilediği bazı çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Braunwald vd. 2013; Tkáčová vd. 2017; Shariati vd. 2019). Ayrıca karbon konsantrasyonu da hem mikroorganizma gelişimi açısından hem de sekonder metabolitlerin üretimini karbon represyonuna uğratma olasılığı göz önüne alındığında, diğer bir önemli bileşen haline gelmektedir. Bu sebeple yanıt yüzey metodu ile laktoz konsantrasyonu ve besiyerinde belli C:N oranının, β -karoten üretimi üzerine olan etkileri araştırılmak istenmiştir. Bunların dışında fermentasyon ortamında çalkalama hızının, mikroorganizmalar üzerinde stres faktörü olduğu ve sekonder metabolitlerin üretimini tetiklediği bilinmektedir. Bu da önemli bir parametre olduğu için, yanıt yüzey yönteminde diğer bir bağımsız değişken olarak seçilip optimizasyona devam edilmesi uygun görülmüştür (Mantzouridou vd. 2002).

4.4. Araştırmada Seçilen Bağımsız Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi

Tez çalışması kapsamında buraya kadar PBD ile besiyeri ortamında önemli bileşenler saptanmıştır. Bu aşamada ise Bölüm 3.11'de bahsedilen bağımsız değişkenler, yanıt yüzey metodu kullanılarak β -karoten üretiminin artırılması için seçilmiştir. Bu sebeple seçilen parametreler ile optimizasyon yapmak için Design Expert® 11.0.0 programı kullanılmıştır. Program çerçevesinde yanıt yüzey metotlarından olan Box Behnken tasarımı kullanılarak deney tasarımı oluşturulmuştur. Deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin aralıkları tez kapsamında daha önce yapılan ön deneme çalışmaları çerçevesinde ve literatüre uyumlu olarak seçilmiştir. Bu tasarıma göre merkezi noktada 5 tekrarlı olarak çalışılmış olup, toplam 17 deneme içermektedir. Denemeler 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Bağımlı değişkenler olarak üretilen β -karoten

ve biyokütle miktarı sistem yanıtı olarak seçilmiştir. Box Behnken tasarımı üç seviyeli tasarım olduğu için, bağımsız değişkenler üç seviyede çalışılmıştır. Çizelge 4.6'da Box-Behnken tasarımıdaki bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.6. Box Behnken tasarımıdaki bağımsız değişkenlerin değerleri

Standart Sıra	Deney sırası	X ₁ (g/L)	X ₂	X ₃ (rpm)
1	7	15	20	180
2	16	40	20	180
3	17	15	80	180
4	13	40	80	180
5	5	15	50	130
6	10	40	50	130
7	1	15	50	230
8	11	40	50	230
9	14	27.5	20	130
10	3	27.5	80	130
11	12	27.5	20	230
12	2	27.5	80	230
13*	9	27.5	50	180
14*	4	27.5	50	180
15*	8	27.5	50	180
16*	6	27.5	50	180
17*	15	27.5	50	180

X₁: Laktoz konsantrasyonu (g/L) , X₂: C:N oranı, X₃: Çalkalama hızı (rpm) * Merkezi noktaları ifade etmektedir.

Yapılan denemeler sonucunda alınan veriler, Çizelge 4.7'de yanıt değişkenlerinin deneysel ve tahminlenen değerleri şeklinde gösterilmektedir. Deneysel verilere bakıldığında, β -karoten üretiminin 380.5 μ g/L ile 1192.7 μ g/L aralığında, biyokütle miktarının ise 3.6 g/L ile 16.1 g/L aralığında değiştiği gözlenmiştir. Bağımsız

değişkenlerin yanıtlar üzerinde etkilerinin anlaşılması için kullanılan modellerin türetilmesi amacıyla Design Expert® 11.0.0.0 programı kullanılarak çoklu regresyon her bir yanıt için uygulanmıştır.

Çizelge 4.7. Yanıt değişkenlerinin deneysel ve tahminlenen değerleri

Sıra	Deneysel		Tahminlenen	
	Yanıt 1	Yanıt 2	Yanıt 1	Yanıt 2
	Y ₁ (µg/L)	Y ₂ (g/L)	Y ₁ (µg/L)	Y ₂ (g/L)
1	463.3	6.1	530.7	6.5
2	718.5	14.1	676.5	14.2
3	400.9	3.6	415.1	3.3
4	638.3	10.7	560.9	10.9
5	951.6	6.2	894.9	6.0
6	1035.7	16.1	1040.8	15.7
7	380.5	4.6	355.8	4.7
8	387.3	10.2	501.6	10.2
9	1192.7	12.5	1199.4	12.5
10	1038.8	9.0	1083.8	9.2
11	730.0	9.5	660.2	9.0
12	564.2	5.9	544.6	5.8
13	607.3*	9.4*	719.5	9.6
14	732.0*	9.8*	719.5	9.6
15	750.6*	9.4*	719.5	9.6
16	787.9*	9.3*	719.5	9.6
17	681.8*	9.6*	719.5	9.6

Y₁: β-karoten miktarı (µg/L), Y₂: Biyokütle (g/L), * Merkezi noktalarda yapılan deneme sonuçları

. Çoklu regresyon sonucunda β-karoten için %99 ($p=0.007<0.01$), biyokütle için %95 ($p=0.018<0.05$) seviyesinde önemli olan kuadratik denklemlerin kullanılmasının

uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Daha sonra kullanılan bu ikinci dereceden denklemler için varyans analizleri (ANOVA) uygulanmış olup, hem β -karoten hem de biyokütle için sonuçlar sırası ile Çizelge 4.8’de ve Çizelge 4.10’da verilmiştir. Her bir bağımsız değişkenin yanıtlar üzerine olan lineer, interaksyon ve karesel etkilerinin istatistiksel olarak önem seviyeleri de söz konusu çizelgelerde mevcuttur. Burada etki bileşenlerinin p -değerlerine bakılarak modelde kalıp kalmamasına karar verilmiştir. p -değeri 0.05’den büyük olan etkilerin istatistiksel olarak bir önemleri olmadığı için model hiyerarşisine uygun olarak modelden çıkartılmıştır.

Çizelge 4.8. X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişkenlerinin β -karoten üretimi üzerine etkilerinin varyans analiz (ANOVA) sonuçları

Varyans kaynağı	KT	SD	KO	F-değeri	p -değeri
Model	8.675E+05	9	96392.79	12.60	0,0015*
X_1	42544.54	1	42544.54	5.56	0,0505
X_2	26711.70	1	26711.70	3.49	0.1039
X_3	5.815E+05	1	5.815E+05	75.99	<0.0001**
$X_1 X_2$	80.31	1	80.31	0.0105	0.9213
$X_1 X_3$	1496.40	1	1496.40	0.1956	0.6717
$X_2 X_3$	35.20	1	35.20	0.0046	0.9478
X_1^2	1.284E+05	1	1.284E+05	16.79	0.0046**
X_2^2	1365.35	1	1365.35	0.1784	0.6854
X_3^2	96681.27	1	96681.27	12.63	0.0093**
Artık hata	53563.12	7	7651.87		
Uyum eksikliği	34041.51	3	11347.17	2.33	0.2164
Saf hata	19521.61	4	4880.40		
Toplam	9.211E+05	16			

X_1 : Laktoz konsantrasyonu (g/L) , X_2 : C:N oranı, X_3 : Çalkalama hızı (rpm), KT: Kareler ortalaması, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, ** p <0.01, * p <0.05 istatistiksel olarak önemlidir.

Etkilerin elenmesi yapılırken elde edilen modellerin, regresyon modeli için önemli (p <0.05) ve model uyumsuzluk (lack of fit) değerinin (p >0.05) istatistiksel olarak önemsiz olması durumuna dikkat edilmiştir. Ayrıca ilgili modele ait regresyon katsayısının (R^2) 0.9’un üzerinde olması durumu dikkate alınarak karar verilmiştir. Bir

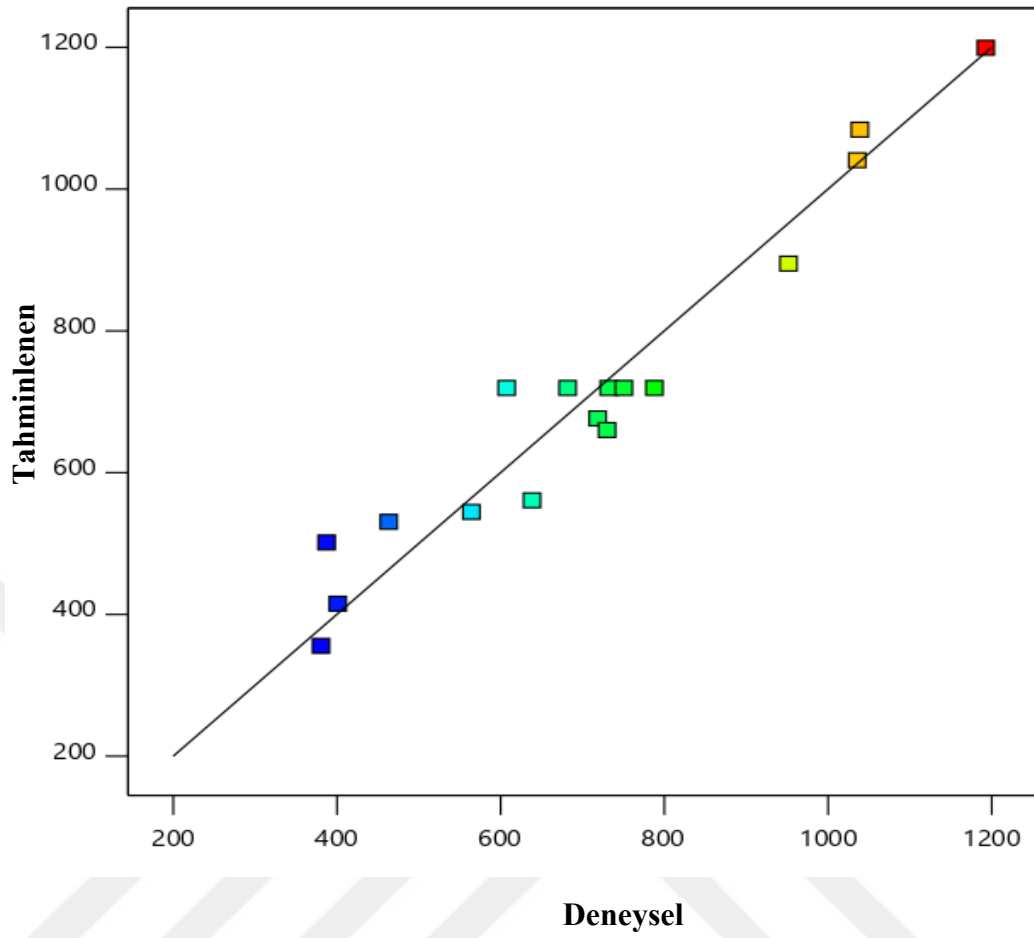
diğer parametre olarak R^2_{adj} ve varyasyon katsayısı da kontrol edilmiştir. R^2 ve R^2_{adj} değerlerinin birbirlerine yakın olması modellerin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini göstermektedir (Koç 2009). Son olarak modellerin yeterli hassasiyet (Adeq. Precision) değerleri (>4 olmalı) de gözden geçirilmiştir. Bu parametre, modellerin ortamdaki gürültüden etkilenip etkilenmediği hakkında fikir vermektedir. Daha önce bahsedilen istatistiksel verilere bakılarak en doğru modelin belirlenmesinden sonra elde edilen model denklemlerine deneysel veriler konularak hesaplama yapılmış olup, tahmini veriler elde edilmiştir. Bu verilere bakılarak deneysel verilere karşılık, tahmini verilerin regresyon grafikleri çıkarılarak modelin uygunluğu test edilmiştir. Model parametreleri ise en küçük kareler yöntemi kullanılarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8’de X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişkenlerinin β -karoten üretimi üzerine etkilerinin varyans analiz (ANOVA) sonuçları gösterilmektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde modelin önemli olduğu ($p<0.05$), uyum eksikliği testinin (lack of fit) istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) olduğu saptanmıştır. Ayrıca bir bağımsız değişkenin (X_3), X_1 ve X_3 değişkenlerinin ise karesel etkilerinin β -karoten üretimi üzerine istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır.

Fermentasyon ortamında bulunan laktoz konsantrasyonu (X_1), C:N oramı (X_2) ve fermentasyon koşullarından çalkalama hızının (X_3), β -karotenin yüksek konsantrasyonda üretimi üzerinde etkilerini gösteren ikinci dereceden denklem Eşitlik 4.2’de verilmiştir.

$$Y_1 = +2761.4 + 70X_1 - 1.92X_2 - 27.3X_3 - 1,11X_1^2 + 0.06X_3^2 \quad (4.2)$$

Eşitlik 4.2’de gösterilen modelden elde edilen regresyon istatistikleri Çizelge 4.9’da verilmiştir. Elde edilen modelin deneysel verileri ile tahmini verilerinin uyum içerisinde oldukları hem Şekil 4.5’de, hem de Çizelge 4.9’dan anlaşılabilmektedir. R^2 değerinin 1’e yakın olması, modelin büyük ölçüde sistemi temsil ettiğini göstermektedir. Ayrıca R^2_{adj} (Düz. R^2) ve R^2_{pre} (Tah. R^2) değerlerinin birbirine yakın olması istenmektedir (farkın 0.2’den az olması), bu modelin tahminleme yapılması açısından güçlü olduğunu göstermektedir. Diğer bir nokta da R^2 ve Düz. R^2 değerlerinin birbirine çok yakın olması modelde herhangi bir gereksiz terimin olmadığını göstermektedir. Yeterli hassasiyet değeri elde edilen bu model için 19.8 (>4) çıkmıştır. Bu da ilgili modelin gürültüden etkilenmediğini göstermektedir. Varyasyon katsayısının %20’ye kadar kabul edilebilirliği vardır ve %10’un altında ise mükemmel bir uyum olduğu söylenebilir (Granato and Ares 2013). %CV’nin %10’a çok yakın olması, modelin kabul edilebilirliğini göstermektedir.

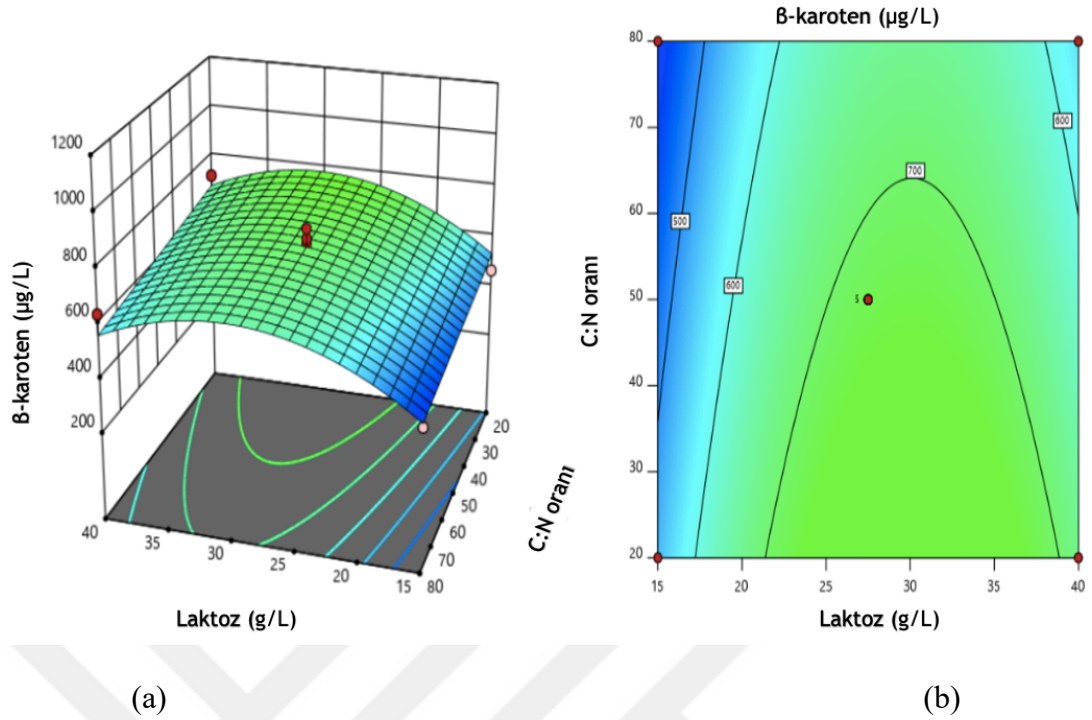


Şekil 4.5. β -karoten için modelden (Eşitlik 4.2) tahminlenen değerlere karşı deneysel veriler

Çizelge 4.9. Eşitlik 4.2'den elde edilen modelin çoklu regresyon istatistikleri

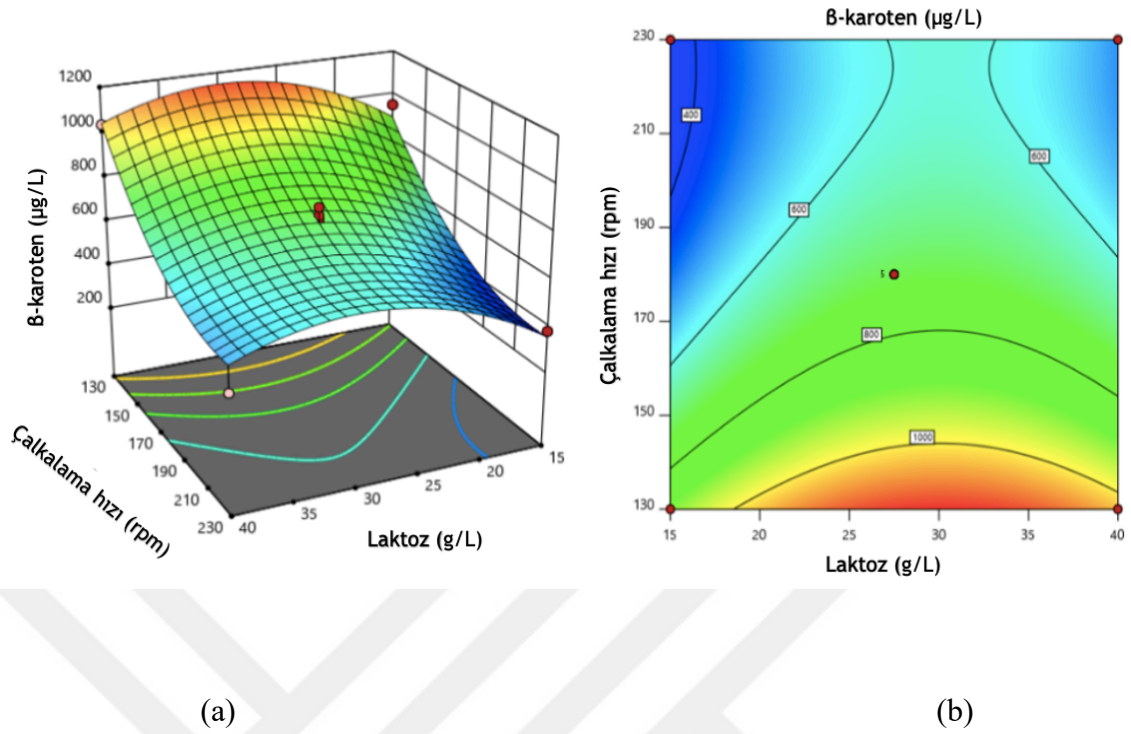
R^2	0.9386
Düz. R^2	0.9107
Tah. R^2	0.8451
Yeterli hassasiyet	19.8069
%CV	10.10

Düz R^2 : Düzeltilmiş R^2 , Tah. R^2 : Tahminlenmiş R^2



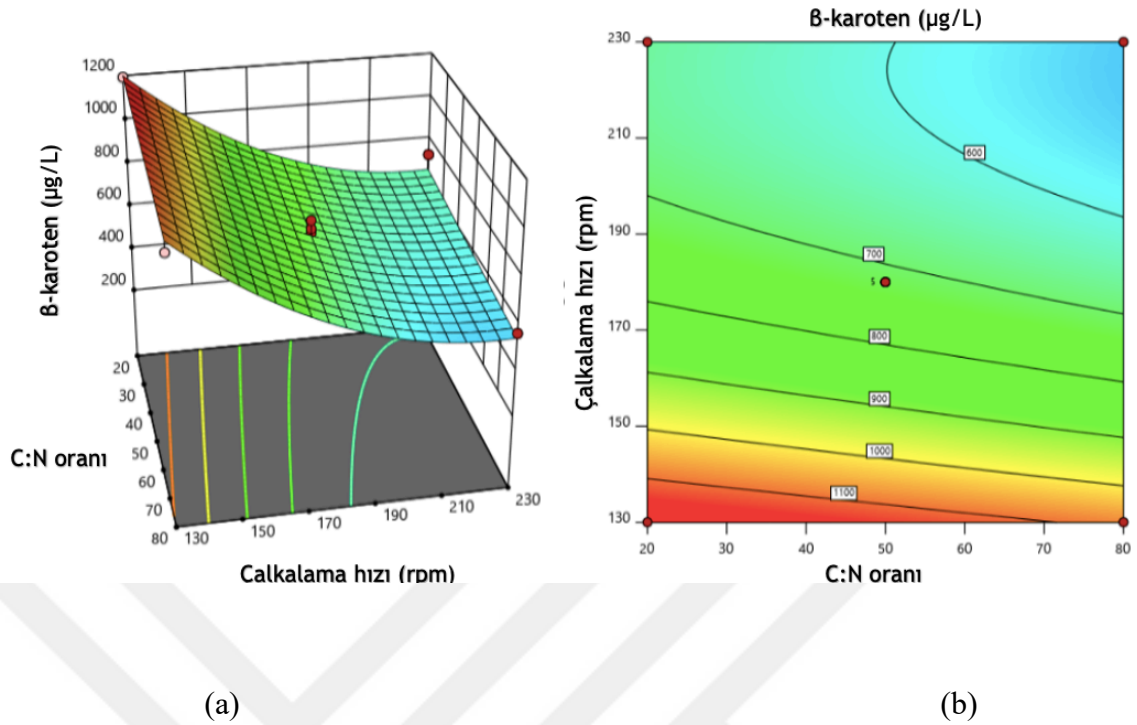
Şekil 4.6. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve C:N oranının (X_2), üretilen maksimum β -karoten konsantrasyonu üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey, (b) kontur grafikleri ($X_3 = 180$ rpm)

Fermentasyon ortamında bulunan laktoz konsantrasyonu (X_1) ve C:N oranının (X_2), maksimum β -karoten üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.6'da sunulmuştur. Şekil 4.6'deki grafikler incelendiğinde, X_3 bileşeninin 180 rpm'de sabit tutulduğu göz önünde bulundurularak, laktoz konsantrasyonunun 30 g/L'de sabitlenmesi ve C:N oranının 20 seviyelerinde tutulmasıyla, β -karoten konsantrasyonu maksimum 781.2 µg/L değerine ulaşmıştır. Laktoz oranının 30 g/L'de sabit olduğu noktada C:N oranının değiştirilmesi ile elde edilen β -karoten konsantrasyonunun 665.4 µg/L ile 781.2 µg/L değerleri arasında değiştiği görülmüştür. Ancak, laktoz konsantrasyonunun 25 g/L ile 35 g/L aralığında ve C:N oranının özellikle 50:1 ile 20:1 aralığında olması durumunda bundan β -karoten üretiminin çok az etkilendiği saptanmıştır. Ayrıca C:N oranı 50:1'de sabit tutulduğunda, laktoz konsantrasyonunun 30 g/L'den düşük olduğu durumlarda, β -karoten üretimi bariz bir şekilde düşmekte ve konsantrasyonu 463.3 µg/L ile 727.7 µg/L aralığında değişmektedir. Aynı şekilde laktoz konsantrasyonunun 30 g/L'den daha yüksek değerlerde olması durumunda, β -karoten konsantrasyonunda yine bir düşme meydana gelmekte ve üretimi 727.7 µg/L ile 718.6 µg/L aralığında değişmektedir. Ancak Şekil 4.6. (b)'den anlaşılabacağı gibi bu azalma, fermentasyon ortamında 30 g/L'den daha düşük laktoz konsantrasyonu olduğu durumdaki azalmadan daha fazla değildir. Grafiklerden anlaşılabacağı üzere, laktoz konsantrasyonunun 25-35 g/L arasında seçilmesi ve C:N oranının olduğunca düşük tutulması ile yüksek miktarda β -karoten elde edilebileceği saptanmıştır.



Şekil 4.7. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve çalkalama hızının (X_3), üretilen maksimum β -karoten miktarı üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (X_2 , C:N= 50:1)

Fermentasyon ortamında bulunan laktoz konsantrasyonu (X_1) ve fermentasyon koşullarından, çalkalama hızının (X_3), maksimum β -karoten üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.7’de sunulmuştur. Grafiklerde üçüncü bileşen olan C:N (X_3) oranı 50:1’de sabit tutulmuştur. Laktoz konsantrasyonunun 30 g/L’de sabitlenip, çalkalama hızının 130 rpm’de tutulması ile en yüksek β -karoten miktarı olan 1144 $\mu\text{g/L}$ değeri elde edilmiştir. Laktoz konsantrasyonun sabit olduğu noktada çalkalama hızının artırılması ile β -karoten konsantrasyonunda önemli azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Laktoz konsantrasyonu 30 g/L’de sabit tutulup, çalkalama hızının 130 rpm’den 230 rpm’e çıkarılması durumunda, β -karoten miktarında 1144 $\mu\text{g/L}$ ’den 605.1 $\mu\text{g/L}$ ’ye azalma görülmüştür. Ayrıca Şekil 4.6 (b)’deki kontur grafiği incelendiğinde; çalkalama hızının 190 rpm’den yukarı olması ve şeker konsantrasyonunun da düşük olması durumunda üretilen β -karoten miktarının hızlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Çalkalama hızı sabit tutulduğunda ortamdaki laktoz konsantrasyonu 15 g/L’den 30 g/L’ye arttırıldığı zaman β -karoten miktarı artmakta fakat laktoz miktarı 30 g/L’den 40 g/L’ye arttırıldığında ise üretilen β -karoten miktarında azalma olduğu saptanmıştır. Örnek olarak; çalkalama hızı 180 rpm’de sabitlenip, laktoz konsantrasyonu 15 g/L ile 30 g/L değerleri arasında değiştirilirken, buna karşılık üretilen β -karoten miktarının 471.4 $\mu\text{g/L}$ ile 734.2 $\mu\text{g/L}$ arasında değiştiği, laktoz miktarının 30 g/L ile 40 g/L arasında değiştirilmesi durumunda ise üretilen β -karoten miktarının 734.2 $\mu\text{g/L}$ ile 642.2 $\mu\text{g/L}$ değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu grafiklerden anlaşılacağı üzere, laktoz konsantrasyonunun 25-35 g/L aralığında tutulması ve çalkalama hızının da düşük olması durumunda yüksek miktarda β -karoten üretiminin sağlanacağı görülmektedir.



Şekil 4.8. C:N oranı (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum β -karoten üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($X_1 = 27.5\text{g/L}$)

Şekil 4.8’de ise fermentasyon ortamında bulunan C:N oranı (X_2) ve çalkalama hızının (X_3), maksimum β -karoten üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir. Bu grafiklerde laktoz miktarı 27.5 g/L ’de sabit tutulmuştur. Grafiğe bakıldığında, çalkalama hızının artması ile üretilen β -karoten miktarının azaldığı gözlenmektedir. C:N oranı 50:1’de sabit tutularak çalkalama hızının 130 rpm’den 230 rpm’e yükseltilmesi durumunda β -karoten üretiminin $1140\text{ }\mu\text{g/L}$ ile $600\text{ }\mu\text{g/L}$ aralığında değiştiği anlaşılmaktadır. Maksimum β -karoten üretiminin ($1192\text{ }\mu\text{g/L}$) elde edildiği koşullarda çalkalama hızı 130 rpm ve C:N oranı ise 20:1’dir. Düşük çalkalama hızlarında C:N oranının değiştirilmesinin, β -karoten üretimi üzerine çok büyük etkisinin olmadığı, bununla beraber yüksek çalkalama hızlarında ise, C:N oranının artırılması ile özellikle 190 rpm’den sonra β -karoten konsantrasyonunda belirgin azalmalar gözlenmiştir. Örneğin, çalkalama hızı 130 rpm’de sabit tutulup, C:N oranının 20:1’den 80:1’e artırılması durumunda üretilen β -karoten miktarındaki değişim $1192\text{ }\mu\text{g/L}$ ile $1082\text{ }\mu\text{g/L}$ arasında gerçekleşmektedir. Çalkalama hızı 230 rpm’de sabit tutulduğunda ise C:N oranının 20:1’den 80:1’e artırılması ile üretilen β -karoten miktarının $658.6\text{ }\mu\text{g/L}$ ile $547.7\text{ }\mu\text{g/L}$ arasında değiştiği saptanmıştır. Grafiklerden anlaşılabacağı üzere, düşük çalkalama hızlarında ve düşük C:N oranı bulunan besiyerlerinde maksimum β -karoten miktarının elde edileceği görülmektedir.

Diğer bir yanıt değişkeni olan biyokütle miktarının optimizasyonu için regresyon analizi yapılmıştır. Çizelge 4.10’da X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişkenlerinin biyokütle miktarı üzerine etkilerinin varyans analiz (ANOVA) sonuçları verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde modelin ($p < 0.01$) istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Modelin uyum eksikliği testine bakıldığında (lack of fit), bu değer istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p > 0.05$) tespit edilmiştir. Tablo değerlendirildiğinde; X_1 , X_2 , X_3 (laktoz konsantrasyonu, C:N oranı ve çalkalama hızı) bağımsız değişkenlerinin, X_1 , X_3

değerlerinin ikili etkileri ve X_1 ile X_2 değişkenlerinin ise karesel etkilerinin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir.

Fermentasyon ortamında bulunan laktoz konsantrasyonu (X_1), C:N oranı (X_2) ve çalkalama hızının (X_3), maksimum biyokütle üretimi üzerine etkilerini gösteren ikinci dereceden denklem, Eşitlik 4.3'de gösterilmiştir. Eşitlik 4.3'de gösterilen modelden elde edilen regresyon katsayıları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Elde edilen modelin deneysel verileri ile tahmini verilerinin uyum içerisinde oldukları hem Şekil 4.9'den hem de Çizelge 4.11'den anlaşılabilmektedir.

$$Y_2 = -1.166 + 0.75X_1 - 0.0043X_2 + 0.013X_3 - 0.0017X_1X_3 - 0.0026X_1^2 - 0.00049X_2^2 \quad (4.3)$$

Eşitlik 4.3'den elde edilen modelin regresyon parametrelerine bakıldığında R^2 , Düz. R^2 , Tah. R^2 ve hassasiyet değerleri sırası ile 0.99, 0.99, 0.97 ve 62.2 olarak belirlenmiştir. Modelin R^2 değeri örnek varyasyonunu %99 oranında açıkladığını göstermektedir. Düz. R^2 , değerinin bu değere yakın olması ise modelde gereksiz terimlerin olmadığını göstermektedir. Yeterli hassasiyet değerinin 62 olması (>4) ise modelin tahminleme gücünün gürültüden etkilenmediğini göstermektedir. %CV'nin 3.40 olması modelin kabul edilebilirliğini ve mükemmeliyetini göstermektedir.

Çizelge 4.10. X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişkenlerinin biyokütle üretimi üzerine etkilerinin varyans analiz (ANOVA) sonuçları

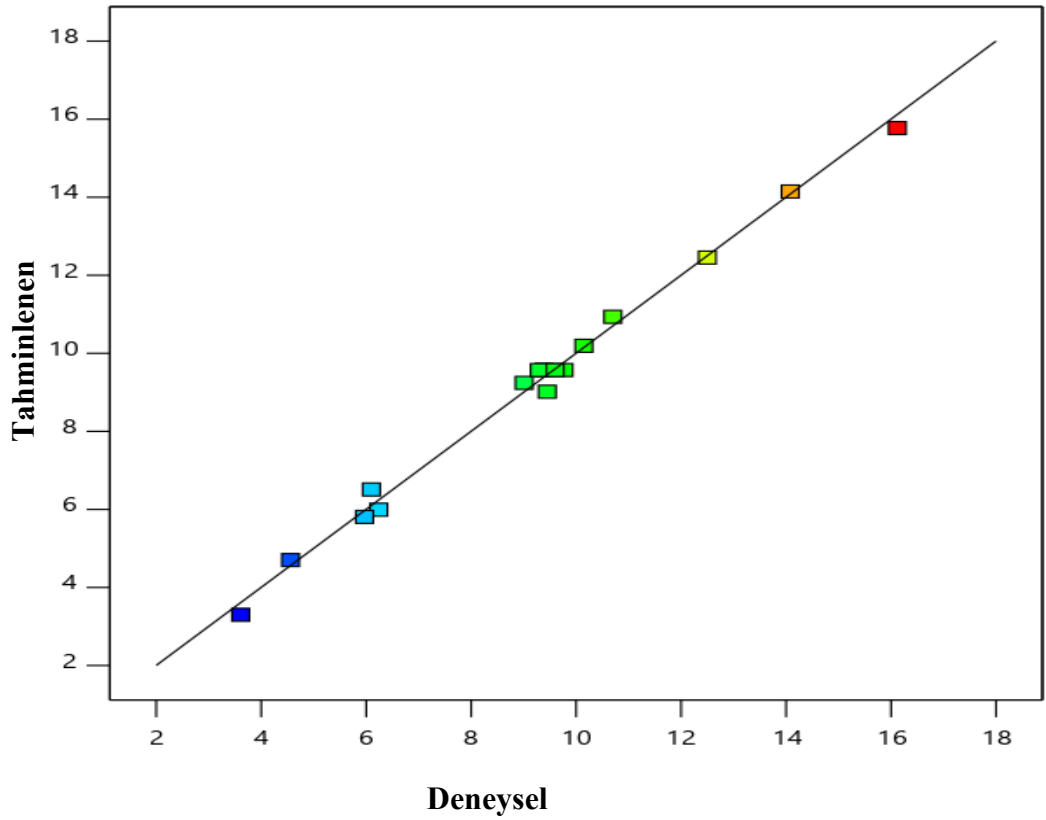
Varyans kaynağı	KT	SD	KO	F değeri	p-değeri
Model	167.36	9	18.60	209.91	<0.0001**
X_1	116.59	1	116.59	1316.02	< 0.0001**
X_2	20.61	1	20.61	232.62	< 0.0001**
X_3	23.60	1	23.60	266.38	<0.0001**
$X_1 X_2$	0.1980	1	0.1980	2.24	0.1785
$X_1 X_3$	4.60	1	4.60	51.94	0.0002**
$X_2 X_3$	0.0000	1	0.0000	0.0003	0.9871
X_1^2	0.7330	1	0.7330	8.27	0.0238*
X_2^2	0.8612	1	0.8612	9.72	0.0169*

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.10.'un devamı

X_3^2	0.1564	1	0.1564	1.77	0.2256
Artık hata	0.6201	7	0.0886		
Uyum eksikliği	0.4755	3	0.1585	4.38	0.0937
Saf hata	0.1447	4	0.0362		
Toplam	167.98	16			

X_1 : Laktoz konsantrasyonu (g/L) , X_2 : C:N oranı, X_3 : Çalkalama hızı (rpm), KT: Kareler ortalaması, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, $**p<0.01$, $*p<0.05$ istatistiksel olarak önemlidir.



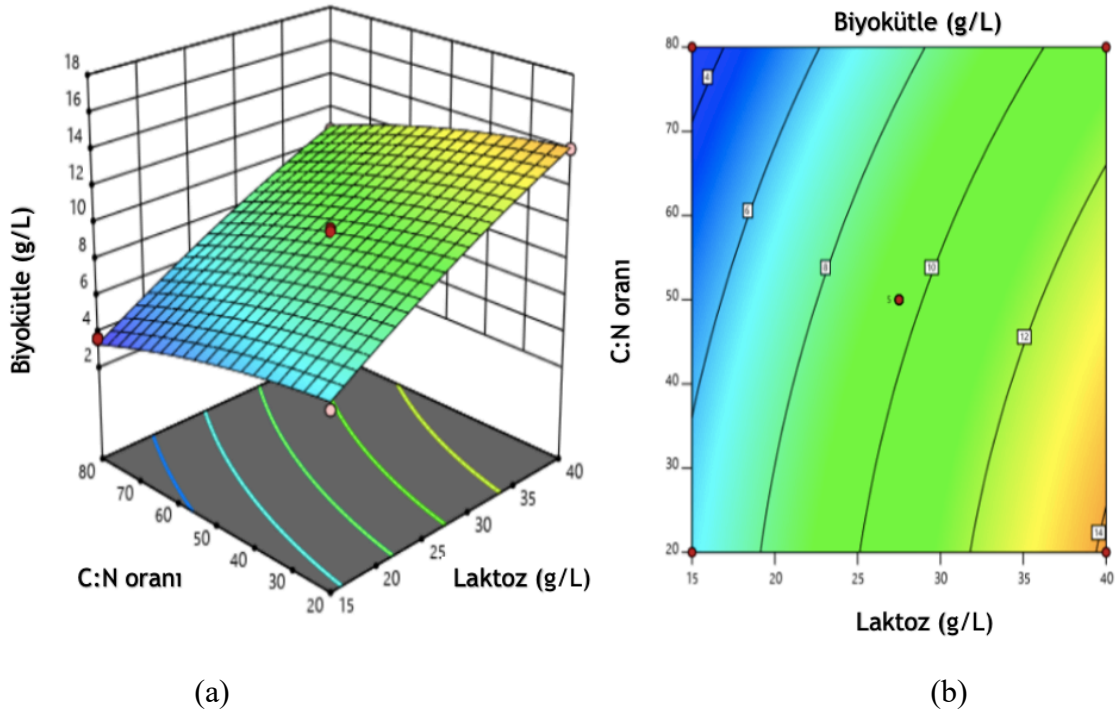
Şekil 4.9. Maksimum biyokütle üretimi için modelden (Eşitlik 4.3) tahminlenen değerlere karşı deneysel veriler

Çizelge 4.11. Eşitlik 5.3’den elde edilen modelin çoklu regresyon istatistikleri

R²	0.9942
Düz. R²	0.9907
Tah. R²	0.9753
Yeterli hassasiyet	62.2586
%CV	3.40

Düz R²: Düzeltilmiş R², Tah. R²: Tahminlenmiş R², Yeterli hassasiyet: Adequate precision

Fermentasyon ortamında bulunan laktoz konsantrasyonu (X_1) ve C:N oranının (X_2), maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.10’da sunulmuştur. Grafikler oluşturulurken, üçüncü bileşen olan çalkalama hızı (X_3) 180 rpm’de sabit tutulmuştur.

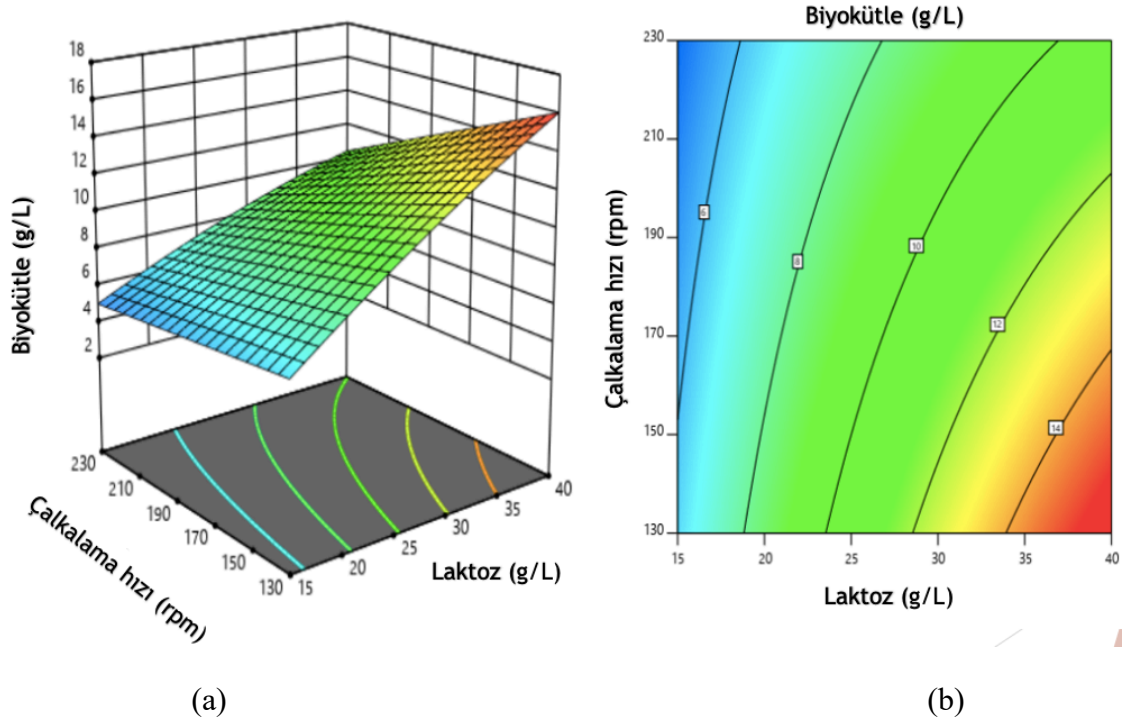


Şekil 4.10. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve C:N oranının (X_2) maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($X_3=180$ rpm)

Laktoz konsantrasyonu 40 g/L ve C:N oranı 20:1 olarak ayarlandığında, elde edilen maksimum biyokütle miktarı 14.08 g/L olmuştur. Grafik incelendiğinde, ortamda yüksek şeker konsantrasyonu ve düşük C:N oranı varken, yüksek miktarda biyokütle elde edilebildiği görülmektedir. Şekil 4.10 (b)’deki kontur grafiği incelendiğinde de, laktoz konsantrasyonunun 25-30 g/L arasında ayarlanması durumunda C:N oranı değişiminin,

maksimum biyokütle üretimi üzerine çok etkili olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak laktozun 25 g/L'den düşük konsantrasyonlarında ise, C:N oranının artırılması ile biyokütle üretimi oldukça düşmektedir. Biyokütle üretimindeki bu düşme miktarı, 8.14 g/L'den 3.61 g/L'ye kadar olabilmektedir. C:N oranının 20:1'de sabit tutulması ve laktoz konsantrasyonunun 15-40 g/L değerleri arasında artırılmasıyla, biyokütle üretimindeki artışın 6.57 g/L ile 14.08 g/L değerleri arasında değiştiği anlaşılmaktadır. C:N oranının 80:1'de sabit tutulup, laktoz konsantrasyonunun 15 g/L'den 40 g/L'ye artırılması durumunda ise üretilen biyokütle miktarının 3.61 g/L ile 10.7 g/L arasında değiştiği görülmektedir. Buna göre düşük C:N oranlarında laktoz konsantrasyonunun artırılmasının maksimum biyokütle elde edilmesi için önemli olduğu anlaşılmaktadır.

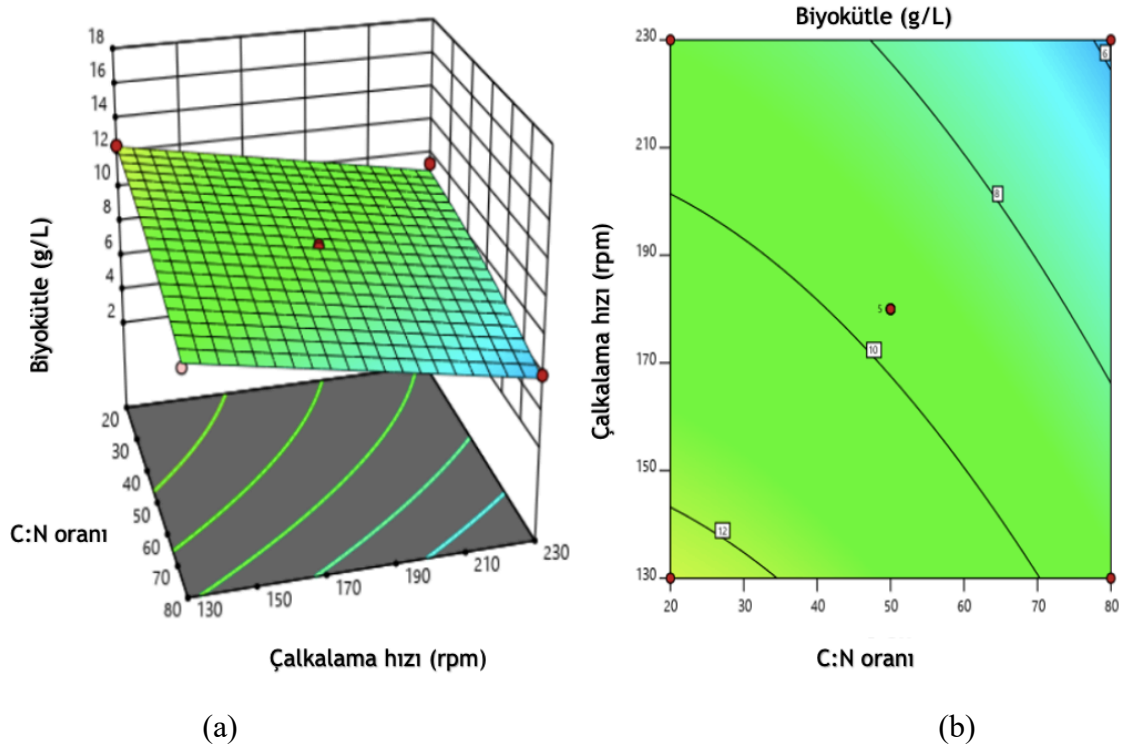
Fermentasyon ortamında bulunan laktoz konsantrasyonu (X_1) ve çalkalama hızının (X_3), maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.11'de sunulmuştur. Grafiklerin oluşturulmasında, üçüncü bileşen olan C:N (X_2) oranı 50:1'de sabit tutulmuştur. Kontur grafiği incelendiğinde, en yüksek biyokütle miktarının, 40 g/L laktoz konsantrasyonu ve 130 rpm çalkalama hızında, 16.12 g/L olarak elde edildiği anlaşılmaktadır. Sonuç olarak; düşük çalkalama hızlarında biyokütle üretiminin oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. Laktoz konsantrasyonu (g/L) (X_1) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (X_2 , C:N = 50:1)

Laktoz konsantrasyonu 15 g/L'de sabit tutulduğunda, çalkalama hızının 230 rpm'den 130 rpm'e düşürülmesi ile biyokütle miktarındaki artışın 4.56-6.24 g/L değerleri arasında olduğu saptanmıştır. Laktoz konsantrasyonu 40 g/L'de sabit tutulduğunda ise,

çalkalama hızının 230 rpm'den 130 rpm'e düşürülmesi durumunda biyokütle miktarındaki artışın 10.15-16.12 g/L değerleri arasında olduğu belirlenmiştir. Buna göre yüksek şeker konsantrasyonlarında çalkalama hızı, biyokütle miktarındaki artış açısından daha önemlidir. Ayrıca kontur grafiği incelendiğinde, düşük çalkalama hızlarında (130 rpm) laktoz konsantrasyonunun arttırılmasıyla elde edilen biyokütle miktarındaki değişimin 6.24 g/L ile 16.12 g/L değerleri arasında olduğu anlaşılmaktadır. Yüksek çalkalama hızlarında ise (230 rpm) söz konusu değerlerin 4.56 g/L ile 10.15 g/L arasında değiştiği görülmektedir.



Şekil 4.12. C:N oranı (X₂) ve çalkalama hızının (X₃) maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (X₁ = 27.5g/L)

Şekil 4.12'de ise fermentasyon ortamında bulunan C:N oranı (X₂) ve çalkalama hızının (X₃), maksimum biyokütle üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir. Üçüncü bileşen olan laktoz konsantrasyonu 27.5 g/L'de sabit tutulmuştur. Grafiğe bakıldığında en yüksek biyokütle üretiminin, 20:1 olan C:N oranı ve 130 rpm çalkalama hızında 12.5 g/L olduğu görülmektedir. Çalkalama hızının 230 rpm'de sabit tutulması ve C:N oranının 20:1'den 80:1'e arttırılması durumunda biyokütle miktarındaki azalmanın 9.45 g/L ile 5.97 g/L arasında değiştiği saptanmıştır. Çalkalama hızının 130 rpm'de sabit tutulması ve C:N oranının 20:1'den 80:1'e arttırılması durumunda ise biyokütle miktarındaki azalmanın 12.15 g/L ile 9.01 g/L değerleri arasında olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, yüksek çalkalama hızlarında, C:N oranındaki değişimin biyokütle üretimi üzerine daha etkili olduğu görülmektedir. C:N oranının 20:1'de sabit tutulması ve çalkalama hızının 130 rpm'den 230 rpm'e arttırılması durumunda biyokütle miktarındaki azalma 12.5 g/L ile 9.45 g/L değerleri

arasında olmaktadır. C:N oranının 80:1’de sabit tutulması ve çalkalama hızının 130 rpm’den 230 rpm’e artırılması durumunda ise biyokütle miktarındaki azalmanın 9.01 g/L ile 5.97 g/L değerleri arasında değiştiği görülmektedir. Buna göre, besi ortamında yüksek C:N oranının bulunması durumunda, çalkalama hızının biyokütle üretimi üzerine daha çok etkili olduğu anlaşılmaktadır. Kontur grafiği incelendiğinde, büyük bir yanıt alanının aynı renkte olduğu görülmektedir. Bu da, C:N oranının 40:1-65:1 ve çalkalama hızının 160 - 190 rpm aralığına tekabül etmektedir. Buna göre, bu bölgeler arasındaki değerler dikkate alınarak üretilen biyokütle miktarının iki bileşenden de aynı oranda etkilendiği anlaşılmaktadır

4.5. *Mortierella ramanniana* ile Biyokütle ve β -karoten Üretiminde Kullanılan Besiyeri ve Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu

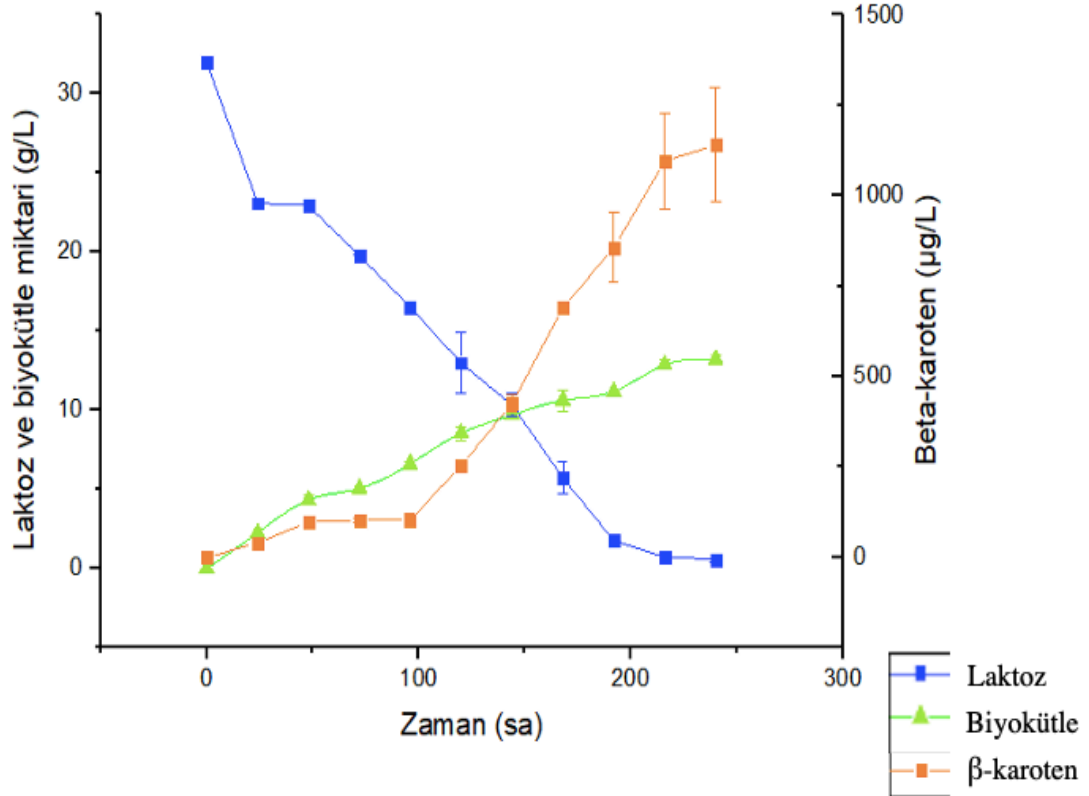
Tez çalışması kapsamında *Mortierella ramanniana*’dan, biyokütle ve β -karotenin maksimum üretimini sağlamak için, besiyeri bileşimi ve fermentasyon koşullarının optimizasyonu yapılırken, Design Expert® programının nümerik optimizasyon sekmesinde bulunan, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılmıştır. Bunun için bağımsız değişkenler olarak; laktoz konsantrasyonu (X_1), C:N oranı (X_2) ve çalkalama hızı (X_3) seçilmiştir. Bağımlı değişkenler olarak ise β -karoten (Y_1) ve biyokütle (Y_2) üretimi seçilmiştir. Programın oluşturduğu 44 çözüm arasından seçilen optimum koşullar Çizelge 4.12’de gösterilmektedir. Buna göre, yanıtlar için optimum koşulların olduğu çözümlere bakılarak, aralarında β -karoten miktarının en yüksek olduğu durum öncelikli olarak tercih edilmiştir. Bu çözümün istenebilirlik fonksiyonunun değeri 0.925’dir. Çizelge 4.12’de gösterilen koşullar altında fermentasyon gerçekleştirildiğinde, β -karoten üretiminin 1192.5 μ g/L ve biyokütle üretiminin ise 14.3 g/L olacağı öngörülmüştür. Optimizasyon çalışması yapmak için seçilen bu koşullar altında gerçekleştirilen fermentasyonlar 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Besiyerleri, Çizelge 4.12’deki koşullar altında hazırlanmış olup, kinetik parametrelerinin hesaplanabilmesi amacıyla inkübatörden her gün bir erlen alınarak besiyeri içerisinde laktoz miktarı ve üretilen β -karoten ile biyokütle miktarları tayin edilmiştir

Çizelge 4.12. Box-Behnken tasarımıyla optimize edilen fermentasyon ortamının istenebilirlik fonksiyonu

Değişkenler	Laktoz (g/L)	C:N	Çalkalama Rpm	β - karoten μ g/L	Biyokütle üretim miktarı g/L	İstenebilirlik
Değerler	32.42	20	130	1192.5	14.3	0.925

Buna göre 10 günlük fermentasyon boyunca her gün üretilen β -karoten ve biyokütle miktarı ile tüketilen laktoz miktarı saptanmıştır. Şekil 4.13’de, optimize edilen besiyerinde kalan laktoz miktarları (g/L) ile üretilen β -karoten (μ g/L) ve biyokütle (g/L)

miktarlarının 10 gün süreyle zamana bağlı olarak değişimi verilmiştir.



Şekil 4.13. Box-Behnken tasarımıyla optimize edilen besiyerinde kalan laktoz ile üretilen β-karoten ve biyokütlenin zamana bağlı değişimi

Optimum koşullarda gerçekleştirilen denemelerde, fermentasyon ortamında bulunan laktozun ilk günden itibaren 10 gün boyunca kullanıldığı ve 10. günün sonunda ortamda 0.59 g/L laktoz kaldığı saptanmıştır. β-karoten üretiminin 96. saatten sonra artmaya başladığı ve 216. saatten sonra da üretim hızının yavaşladığı saptanmıştır. Grafiğe göre, biyokütle üretim hızının ise 120. saatten sonra yavaşladığı belirlenmiştir. Şekil 4.13'e bakıldığında, gelişim hızı yavaşladığı zaman β-karoten üretim hızının arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13'de, optimize edilen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre, fermentasyon sonunda mikroorganizmanın laktoz tüketimi 31.41 g/L olarak, β-karoten üretimi ise 1.14 mg/L olarak saptanmıştır. Kullanılan şeker miktarına karşı üretilen β-karoten veriminin %0.0036 olduğu belirlenmiştir. β-karotenin ikincil bir metabolit olması ve hücre üremesi için gerekli ihtiyaçların giderilmesi öncelikli olduğundan dolayı bu bileşiklerin üretimi ikincil tercih olmaktadır. Bu nedenle verim, sekonder metabolitlerin üretiminde oldukça düşük çıkmaktadır.

Çizelge 4.13. Box-Behnken tasarımı ile optimize edilen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait gelişim ve üretimin kinetik parametreleri

Parametre	Değer
Şeker tüketimi, (g/L)	31.41
β -karoten üretimi, (mg/L)	1.14
Verim ($Y_{p/s}$), (%)	0.0036
Maksimum laktoz tüketim hızı, (-g/L/sa)	0.14
Maksimum β -karoten üretim hızı, (μ g/L/sa)	0.118
Maksimum gelişme hızı, $(dx/dt)_{max}$ (g/L/sa)	16.5
Spesifik gelişim hızı (sa^{-1})	122.5
İkiye katlanma hızı (t_d) (sa)	0.0056

Bunun yanında maksimum laktoz tüketim hızı 0.14 g/L/sa ve maksimum β -karoten üretim hızı ise 0.118 μ g/L/sa olarak saptanmıştır. *Mortierella rammanniana*'nın maksimum gelişme hızı 16.5 g/L/sa, spesifik gelişim hızı 122.5 sa^{-1} ve ikiye katlanma hızı ise 0.0056 sa olarak belirlenmiştir. Bu verilerin, ileride β -karoten üretiminin daha büyük ölçeklerde çalışılmasını kolaylaştıracağı düşünülmektedir.

Bağımlı değişkenlerin optimum koşullarda gerçekleştirilen denemelerden elde edilen verileri ile Eşitlik 4.5 ve 4.3 kullanılarak elde edilen teorik değerleri Çizelge 4.14'de gösterilmektedir. Optimum koşullarda yapılan denemelerin sonucunda bağımlı değişkenlerin değerleri Design Expert® programının analiz sonrası başlığı altında doğrulama bölümü kullanılarak %95 güven seviyesinde değerlendirilmiştir. Buna göre Çizelge 4.14'de elde edilen deneysel verilerin, tabloda bahsedilen eşitliklerden hesaplanan maksimum ve minimum değerlerin arasında yer aldığı görülmektedir. Verilerin sonuçlarına göre doğrulama %95 güven aralığında tamamlanmıştır

Çizelge 4.14. Bağımlı değişkenlerin optimum koşullarda gerçekleştirilen deneysel verileri ile Eşitlik 4.5 ve 4.3 kullanılarak elde edilen teorik değerleri

Bağımlı değişken	Sembol	Teorik değer	Deneysel değer	Minimum değer	Maksimum değer
β-karoten konsantrasyonu ($\mu\text{g/L}$)	Y_1	1192.7	1141	1005.3	1380.24
Biyokütle miktarı (g/L)	Y_2	14.3	13.14	13.4	15.1

Literatüre bakıldığında, β -karoten üretimi ile ilgili olarak farklı mikroorganizmaların kullanıldığı, besiyeri ortamı ve fermentasyon koşullarının optimize edildiği çalışmalar bulunmaktadır. Ahuja vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada; β -karoten ve önemli yağ asitlerini ürettiği bilinen bir halotolerant mikroalg olan *Dunaliella salina* kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın odağında, Box Behnken deseni ile besiyeri bileşiminin modifiye edilerek, β -karoten, biyokütle ve yağ üretimi veriminin artırılması vardır. Bu amaçla kontrol besiyerinde bulunan glukoz, KNO_3 , NaCl derişimleri için üç seviyede Box Behnken deneme deseni kullanılarak optimize edilmiş, diğer bileşenler sabit tutulmuştur. Buna göre, optimum besiyeri koşulları: 13.23 g/L glukoz, 3.145 g/L KNO_3 ve 35.6 g/L NaCl olarak belirlenmiştir. Kontrol besiyerindeki yanıtlar; 0.571 g/L biyokütle, 4.18 mg/g β -karoten ve 13.2 mg/L/gün yağ miktarı olarak bilinmektedir. Optimize edilen besiyerinde ise; 1.24 g/L biyokütle, 6.07 mg/g β -karoten ve 20 mg/L/gün yağ miktarı olarak belirtilmiştir. Buna göre; biyokütle miktarında 2.17 kat artış, β -karoten miktarında 1.45 ve yağ miktarında 1.56 kat artış olduğu bildirilmiştir.

Abdelhafez vd. (2016) yaptıkları optimizasyon çalışmasında, tarım sınai ve yan ürünlerini bileşen olarak seçip PB deseni ve yanıt yüzey metodunun kombine kullanılmasıyla β -karoten üretiminin artırılmasını sağlamışlardır. İlk olarak, *Serratia marcescens* ATTC 27117 suşunun, bu yan ürünlerin β -karoten üretimi için kullanılabilirliğinin sınanmasını içermektedir. Pirinç kepeği, şeker kamışı küspesi ve melas, β -karoten üretimi açısından test edilmiştir. Karanlık ortamda 30°C 'de 150 rpm'de 2 günlük inkübasyon sonrasında; melas, β -karoten üretimi için en etkili kaynak olarak belirlenmiştir. Ardından, süktroz, laktoz, pepton, et ekstraktı, NaCl , MgSO_4 , KH_2PO_4 , pH, inokülasyon miktarı, çalkalama hızı PBD deseninde melas substrat olacak şekilde denenmiştir. Sonuç olarak; süktroz, pepton, pH, β -karoten üretimi üzerine istatistiksel olarak pozitif etki göstermiştir. İstatistiksel olarak önemli bulunan üç bileşen 5 seviyeli merkezi kompozit tasarımı ile ileri optimizasyona tabi tutulmuştur. Optimum üretim için besiyeri 2.5 g/L süktroz, 7.8 g/L pepton ve 6.7 pH olarak optimize edilip 2.24 mg/L β -karoten üretimi gözlemiştir.

β -karoten üretiminde yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı bir diğer çalışma ise Thakur ve Azmi (2014) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya göre *Mucor azygosporus* MTCC 414 kullanılarak β -karoten üretimi gerçekleştirilmiş, öncelikle gelişim için gerekli fiziko kimyasal parametreler belirlendikten sonra, 'her defasında bir faktör' yaklaşımı ile karbon ve azot kaynakları seçilmiştir. Ardından merkezi kompozit tasarımı kullanılarak inkübasyon sıcaklığı, pH, nişasta konsantrasyonu, malt ekstraktı konsantrasyonu ve tripton konsantrasyonu β -karoten üretimi için optimize edilmiştir. Buna göre 25°C'de, pH 6'da, 7.5 g/L nişasta, 7.5 g/L malt ekstraktı ve 7.5 g/L tripton konsantrasyonunda optimum noktaya ulaşılmıştır. Maksimum β -karoten miktarı bu koşullarda 3.4 mg/L olarak elde edilmiştir.

β -karoten üretimi için *Blakeslea trispora* kullanılarak besiyeri optimizasyonu yapılan bir çalışmaya göre (Choudhari ve Singhal 2008), çalkalamalı inkübatörler kullanılarak karbon, azot, sülfat gibi besiyeri bileşenlerinin ve proses değişkenlerinden pH ve inokülasyon miktarının β -karoten üretimi üzerine olan etkileri 'her defasında bir faktör' yöntemi ile araştırılmıştır. Ardından proses değişkenlerinin optimum değerleri maksimum β -karoten üretimi için yanıt yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 'Her defasında bir faktör' yöntemi denemeleri sonucunda maksimum β -karoten üretimini sağlayan değişkenlerden, karbon kaynağı olarak glukoz, azot kaynağı olarak maya ekstraktı, alkali pH (6-7) ve inokülasyon miktarı olarak 10^6 spor/mL (5% v/v) optimum koşullar olarak seçilmiştir. Ardından glukoz, maya ekstraktı, asparajin, KH_2PO_4 ve MgSO_4 miktarlarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarımı kullanılmıştır. Bu bağımsız değişkenler için optimum bulunan konsantrasyonlar sırası ile 59.4 g/L, 1.42 g/L, 2.12 g/L, 1.26 g/L ve 0.4 g/L'dir. Üretilen maksimum β -karoten miktarı ise 139 mg/L'dir.

Özdal vd. (2017)'nin çalışmalarına göre, ucuz karbon kaynağı kullanılarak *Arthrobacter agilis* A17 tarafından β -karoten üretiminin optimizasyonu çalışılmıştır. Yanıt yüzey yöntemlerinden Box Behnken deseni tek başına kullanılarak üç bağımsız değişken olarak melas, maya ekstraktı ve KH_2PO_4 seçilip, optimum seviyeleri ve birbirleri ile olan etkileşimleri incelenmiştir. İstatistiksel analizler sonucu optimize edilen besiyeri bileşimi 70 g/L melas, 25 g/L maya ekstraktı ve 0.96 g/L KH_2PO_4 olarak belirlenmiştir. Bu besiyerinde üretilen β -karoten miktarının kontrol besiyerine göre 2.5 kat arttırılabildiği ve bu miktarın yaklaşık 100 mg/L olduğu bildirilmiştir. Kullanılan istatistiksel optimizasyon ile ucuz bir karbon kaynağından önemli miktarda β -karoten üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir.

Mantzouridou vd. (2002)'nin yaptıkları bir çalışmada, oksijenlenme hızı ve çalkalama hızının *Blakeslea trispora*'nın karıştırmalı tank reaktörde β -karoten üretimi ve mikroorganizmanın morfolojisi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Zigospor formunun daha yüksek β -karoten üretimi için gerekli form olduğu bildirilmiştir. Hem oksijenlenme hızı hem de çalkalama hızının β -karoten konsantrasyonu, hücre gelişimi, biyokütle üretimi ve kütle transferi açısından etkileri tartışılmıştır. Deney planlaması, merkezi karma tasarıma göre yapılmış, çalkalama hızı ve oksijenlenme hızı gibi önemli parametrelerin proses üzerine olan etkileri açıklanmaya çalışılmıştır. En yüksek β -karoten konsantrasyonu (1.5 kg/m^3) ve en yüksek β -karoten üretim hızının ($0.08 \text{ kg/m}^3\text{gün}$), düşük çalkalama (150 rpm) ve yüksek oksijenlenme hızında (1.5 vvm) olduğu bildirilmiştir. Bunların yanında, maksimum β -karoten üretim hızı ($0.008 \text{ kg/m}^3\text{gün}$) ve elde edilen kuru biyokütle ağırlığının (26.4 kg/m^3), yüksek çalkalama (500 rpm) ve ortalama oksijenleme hızında (1.0 vvm) elde edildiği bildirilmiştir. Tam tersine, en

yüksek kütle transfer katsayısı $K_L\alpha$ (0.33 s^{-1}), yüksek çalkalama ve yüksek oksijenlenme hızında (1.5 vvm) elde edilmiştir. Kütle transferi katsayısı üzerine olan etkinin yüksek çalkalama hızından kaynaklandığı, oksijenlenme hızının etkisinin ise çok az olduğu saptanmıştır.

Mucor azygosporus kullanılarak peyniraltı suyu filtrat atıklarından karıştırmalı tank reaktörde β -karoten üretimi yapılarak, çalkalama ve oksijenlenme hızının etkileşimli olarak β -karoten üretimi üzerine olan etkileri araştırılmıştır (Azmi vd. 2015). Maksimum β -karoten üretimi ($1045 \mu\text{g}$ kuru biyokütle), 72 saat inkübasyon sonrası düşük çalkalama hızı (150 rpm) ve ortalama oksijenlenme hızında (1.0 vvm) bulunmuştur. Çalkalama hızının ve oksijenlenmenin kültür ortamında homojenliği iyi sağlayarak, besin ve oksijen kullanılabilirliğinin artması ile β -karoten üretimini daha önceki yapılan çalışmalara göre üretilen β -karoten miktarından 2.8 kat daha arttırdığı saptanmıştır. Bahsedilen çalışmalar ile bu tez kapsamında çalkalama hızının β -karoten üretimi üzerine olan etkileri kıyaslandığında, *Mortierella ramanniana*'nın düşük çalkalama hızlarında (130 rpm) daha fazla β -karoten ürettiği tespit edilmiş ve bu çalışmalar ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Yüksek çalkalama hızlarında besi ortamında oluşan kayma geriliminin küf hücrelerine zarar vererek intraselüler olan β -karotenin kaybına neden olduğu düşünülmekte ve yüksek hızdan dolayı küfün gelişen morfolojisinin β -karoten üretimini desteklemediği, bu nedenle yüksek hızlarda üretimin daha düşük olduğu değerlendirilmektedir.

Yapılan bir çalışmada *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 kırmızı mayası kullanılarak, hücre gelişimi, lipid ve β -karoten üretiminin kinetik parametreleri belirlenmiştir (Tkáčová vd. 2017). Çalışmada kullanılan mikroorganizmanın iyi bir lipid ve β -karoten üreticisi olduğu bilinmektedir. Çalışma, 4 farklı C:N oranı bulunan (20:1, 50:1, 70:1, 100:1) besiyerlerinde gelişen mayanın lipogenesis ve karotenoid pigmenti üretimine odaklanmıştır. Hücreler içerisinde toplam yağ asidi üretimi maksimum %48 oranında ve 8.9 g yağ asidi/L olarak besiyerinde 70:1 C:N oranı şartlarında gerçekleşmiştir. Tam tersine, en fazla pigment birikimi ise ($1268 \mu\text{g/g}$ hücre), C:N oranının 20:1 olduğu besiyerinde elde edilmiştir. En fazla karotenoid verimi (çoğunlukla β -karoten) 12.7 mg/L olarak C:N oranının 50:1 olduğu besiyerinde elde edilmiştir. Çalışmaya göre, besiyerinde düşük C:N oranlarında 5 g/L 'den az glukoz kaldığında, β -karoten üretimi tetiklenerek, üretimin hızlandığı bildirilmiştir. Metabolitlerin kinetik parametrelerinin hesaplanması ile glukoz tüketiminin, lipogenesisin ve karotenoid biyosentezinin aralarındaki korelasyon anlaşılmıştır. Buna göre, ortamda glukoz tükenmesi ile hücre gelişiminde ve lipid üretiminde azalma meydana geldiği görülmüştür. Ardından yağ asitlerinin, özellikle palmitik ve oleik asitin hücrelerde depolanması ile yağ asitlerinin β -oksidasyonuna uğramaya başlamasıyla ortamda asetil-CoA oluşumu meydana gelmektedir ki β -karoten biyosentezi düşünüldüğünde bu bileşen başlangıç ürünü olarak kullanılmaktadır. Böylece yağ yıkım prosesinin, karotenoid biyosentezini arttırdığı düşünülmektedir. Çalışmanın sonucuna göre, glukozun tükenmesi ile palmitik ve oleik asitlerin yıkımı sonucu elde edilen asetil-CoA, metabolizmayı karotenoid üretimine yöneltmektedir.

Rhodotorula gracilis mayasının besiyerinde farklı C:N oranları kullanılarak karotenoid üretimi ve lipid birikimi ilişkisinin incelendiği bir çalışmaya göre en fazla karotenoid üretimi 26 mg/L ile 10:1 C:N içeren besiyerinde olmuştur. Bu miktar, 160:1 oranında C:N içeren besiyerinden elde edilen miktara göre 15 kat daha fazladır. Buna göre; bu yüksek C:N oranında maya %55 oranında lipid biriktirebilirken, düşük C:N

oranında %20'ye kadar lipid biriktirebilmektedir. Bunlar ile beraber karotenoid ve lipid üretiminin hücre gelişimi ile ilgili olmadığı tespit edilmiştir (Somashekar ve Joseph 2000). Bu sonuçlar ile tez kapsamında alınan sonuçlar karşılaştırıldığında *Mortierella ramanniana* küfünün iyi bir yağ üreticisi olduğu bilinmekle beraber düşük C:N oranlarında (20:1) daha fazla β -karoten ürettiği tespit edilmiş olup, sonuçlar bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Çalışmaların çoğunda, yağlı (Oleaginous) mikroorganizmaların genel olarak kültür koşulları değiştiğinde tepki olarak onların da kendi metabolizmalarını değiştirme yoluna gidebildiği bildirilmiştir (Somashekar and Joseph 2000). Örneğin, azot kıtlığında kendi biyokütlelerinin %65'ini yağ ile depolamaları kültür koşullarına olan bir tepkidir. Bilindiği üzere lipid depolayan mikroorganizmaların bazıları karotenoid de üretebilmektedir. Ve bu iki biyokimyasal proses aynı anda hücrede gerçekleşebilmektedir ve aynı öncül bileşen olan asetil-CoA kullanılmaktadır. Ancak kültür koşullarından C:N oranının etkisi bu iki prosesi farklı etkilemektedir. Yüksek C:N oranlarında ortamda yeterli asetil-CoA yokluğundan lipid üretim prosesi karotenoid üretiminin önüne geçerek karotenoid üretiminin düşmesine neden olmaktadır (Tkáčová vd. 2017). Ayrıca yüksek C:N oranlarında yine lipid üretimi yanında karotenoid üretimi de olmakta, ancak baskın olarak üretilen karotenoidin torulene yöneldiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Han vd. 2016). Düşük C:N oranlarında ise ortamda karbon kaynağı erken tükendiği için, mikroorganizma kendi depoladığı lipidleri ikincil karbon kaynağı olarak kullanmaya başladığından dolayı, metabolizmanın mevalonat izyoluna yönelmesi ile karotenoid üretimi tetiklenmekte ve daha fazla karotenoid üretiminin sağlandığı bildirilmektedir (Somashekar ve Joseph 2000; Han vd. 2016; Tkáčová vd. 2017). Bu çalışmalar, Ruiz vd. (2010)'nın "ortamda kolay asimile edilen karbon kaynağı bittiğinde ve ikincil karbon kaynağı kullanılmaya başlandığında genellikle sekonder metabolit üretimi gerçekleşmeye başlamaktadır" savını desteklemektedir. Düşük C:N oranının β -karoten üzerine olan pozitif etkisinin bir diğer sebebi ise, karbon katabolit represyonunun etkisinin erken ortadan kalkması ile sekonder metabolit üretim yolunun açılması olabileceği değerlendirilmektedir. Önceki çalışmalar çalışmalar ile karşılaştırıldığında, yapılan bu tez çalışmasında da düşük C:N oranlarında daha fazla β -karoten üretiminin elde edildiği göz önünde bulundurularak, erken karbon kıtlığı sebebiyle mikroorganizmanın depoladığı lipidlerin oksidasyonu sonucu açığa çıkan asetil-CoA'nın kullanılarak metabolizmanın β -karoten üretimine yöneldiği savı desteklenmektedir.

Çoğu çalışmada farklı mikroorganizmaların karotenoid ve lipid üretiminde yüksek C:N oranının etkili olduğu bulunmuştur (Braunwald vd. 2013; Shariati vd. 2019). Bu iki mekanizmanın paralel olarak yürüdüğü düşünülmekle beraber, düşük C:N oranının da karotenoid üretimini artırmak için kullanılabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Uzun zamandır bilindiği gibi besin limitasyonu, özellikle azot ve sülfürün kısıtlanması lipid üretimini arttırmaktadır. Ancak bunun tersine, yüksek miktarda karotenoid üretimi için düşük C:N oranlarının etkili olduğu çalışmalar da bulunmaktadır. Karotenogenesis ve lipogenesis, bu iki mekanizma aynı öncül bileşiği (asetil CoA) kullansa da son zamanlarda aralarında ters ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Somashekar ve Joseph 2000; Tkáčová vd. 2017; Elfeky vd. 2019)(Alakraa 2014).

Çalkalama hızının β -karoten üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda da düşük çalkalama hızlarında β -karoten üretiminin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebinin, çalkalamanın küf gelişimi sırasında morfolojik yapısının etkilenecek β -karoten oluşturmaya elverişli duruma getirmesi ile değerlendirilmektedir. Bunun yanında, diğer bir görüş ise çalkalama hızının yüksek olmasının, besiyeri ortamında bir kayma gerilimi oluşturmaya ile bu kuvvetin hücrelere zarar vererek β -karotenin dışarı salınması ve pigmentin okside olması şeklindedir (Mantzouridou vd. 2002; Yan vd. 2013; Azmi vd. 2015). Ayrıca burada, şeker konsantrasyonunun belli bir miktarın üzerine çıkması ile β -karoten üretiminin düşmesine neden olan etkinin de, karbon katabolit baskılanması sonucu olabileceği değerlendirilmektedir (Ruiz vd. 2010; Chandi ve Gill 2011; Shariati vd. 2019). Ortamda yüksek miktarda karbon bulunması, solunumu ve mitokondriyal aktiviteleri baskıladığı için, gelişim sırasında ATP miktarı düşmekte ve dolaylı olarak bu olay sekonder metabolitlerin üretimi için gerekli olan enzimlerin üretilmesini baskıladığı için belli karbon konsantrasyonunun üzerinde çalışmanın β -karoten üretimini için gerekli olmadığı düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Karotenoidlerin insan sağlığına olan etkilerinin önemi uzun zamandır bilinmekle beraber birçok endüstri tarafından teknolojik olarak kullanılması da, tüm bu alanlara yetecek kadar karotenoid üretim kapasitesinin olması için birçok kaynaktan yararlanılmasını gerekli kılmaktadır. Yapay olarak sentezlenen karotenoidlerin son zamanlarda toksik etkilerinin anlaşılmasıyla doğal yollardan elde edilmesine olan yönelim ile birlikte araştırmacıların ilgisi de karotenoidlerin biyoteknolojik olarak üretimine yönelmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında da *Mortierella ramanniana* kullanılarak β -karoten üretimi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz yöntemleri yardımıyla da β -karoten üretiminin artırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda izlenen yol, öncelikle iki temel besiyeri bileşeni olan karbon ve azot kaynağının belirlenmesi olmuştur. Bunun ardından, Plackett-Burman tasarımı kullanılarak diğer besiyeri bileşenleri ile beraber karbon ve azot konsantrasyonlarının β -karoten üretimine olan etkileri belirlenmiştir. Ardından, Plackett-Burman tasarımına göre istatistiksel olarak en etkili olduğu sonucuna varılan besiyeri bileşeni ve çalkalama hızının β -karoten üretimi üzerine etkileri diğer bir aşama olan yanıt yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Birinci aşamadan elde edilen sonuçlara göre, besiyerinde β -karoten üretimini teşvik eden önemli karbon kaynakları olarak; laktoz, maltoz ve glukoz tespit edilmiş, bunları içeren besi ortamlarından sırasıyla 690 $\mu\text{g/L}$, 720 $\mu\text{g/L}$ ve 564.3 $\mu\text{g/L}$ miktarlarında β -karoten üretimi sağlanmıştır. β -karoten üretimi için en iyi azot kaynağının tespit edilmesi amacıyla yapılan denemeler sonucunda, laktoz kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde en fazla β -karoten üretiminin KNO_3 'ı içeren besiyerinde 815.5 $\mu\text{g/L}$ olduğu tespit edilmiştir. Buna göre ileride optimizasyon için laktoz ve KNO_3 kombinasyonu temel bileşenler olarak seçilmiştir.

Diğer bir aşamada; laktoz, KNO_3 ve diğer besiyeri bileşenlerinin, Plackett-Burman tasarımı kullanılarak β -karoten üretimi üzerine olan etkileri izlenmiştir. Bunun sonuçlarına bakıldığında, KNO_3 ve maya ekstraktının β -karoten üretimi üzerine olumlu ve istatistiksel olarak önemli ($p<0.01$) etkilerinin olduğu görülmüştür. Minerallerin, β -karoten üretimi üzerine negatif ve istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Son aşamada ise; yanıt yüzey yöntemi kullanılarak laktoz konsantrasyonu, C:N oranı ve çalkalama hızının, biyokütle ve β -karoten üretimi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bu parametreler, sekonder metabolit üretimi üzerine olan etkilerinin oldukça kritik olduğu bilindiğinden dolayı biyokütle ve β -karoten üretimini hangi yönde etkilediklerini görmek amacıyla tez kapsamına dahil edilmiştir. Yanıt yüzey sonuçlarına göre; biyokütle ve β -karotenin maksimum üretimi için kuadratik etkileri içeren model denklemleri elde edilmiştir ($R^2=0.938$, $R^2=0.994$). Modellerin varyans (ANOVA) analiz sonuçları ve kontur grafikleri incelendiğinde; laktoz konsantrasyonunun 25-35 g/L arasında seçilmesi ve C:N oranının olduğunca düşük tutulması (20:1) ile yüksek miktarda β -karoten elde edilebileceği saptanmıştır. Çalışmadan çıkarılan diğer bir sonuç ise, düşük çalkalama hızlarında ve düşük C:N oranı bulunan besiyerlerinde β -karoten üretiminin maksimum değere ulaşabileceğinin mümkün olduğudur. Üretilen biyokütle miktarının maksimum değere ulaşabilmesi için yapılan denemeler sonucunda ise; laktoz konsantrasyonunun 25-30 g/L aralığında seçilmesinin etkili olduğu fakat bu aralıkta C:N oranının değişmesinin biyokütle üretimi üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir. Ancak

laktozun 25 g/L'den düşük konsantrasyonlarında ise C:N oranının arttırılmasının biyokütle üretimini oldukça düşürdüğü gözlenmiştir. Kontur grafikleri incelendiğinde, düşük çalkalama hızlarında biyokütle üretiminin oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar neticesinde, optimizasyon için Design Expert® programının nümerik optimizasyon sekmesinde bulunan, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılmıştır. Optimum koşullar; 32.42 g/L oranında laktoz, 20:1 C:N oranı ve 130 rpm çalkalama hızı olarak belirlenmiş ve istenebilirlik fonksiyonu değeri de 0.925 olarak saptanmıştır. Optimum koşullar altında gerçekleştirilen doğrulama denemeleri sonucunda, 13.14 g/L biyokütle ve 1.14 mg/L β -karoten üretimi sağlanmıştır. Fermentasyon süresine bağlı olarak biyokütle ve β -karoten üretimine ait kinetik parametrelere bakıldığında, β -karoten veriminin %0.0036 olduğu görülmüştür. β -karotenin ikincil bir metabolit olması ve hücre üremesi için gerekli ihtiyaçların giderilmesinin öncelikli amaç olmasından dolayı bu bileşiklerin üretimi ikincil tercih olmaktadır. O nedenle verim, sekonder metabolitlerin üretiminde oldukça düşük çıkmaktadır. Bunun yanında maksimum laktoz tüketim hızı 0.14 g/L/sa ve maksimum β -karoten üretim hızı da 0.118 μ g/L/sa olarak saptanmıştır.

Alınan sonuçlara göre; *Mortierella ramanniana*'nın β -karoten üretim potansiyeli belirlenmiş olup, ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacak veriler elde edilmiştir. Özellikle, C:N oranının β -karoten üretimi üzerine olan tartışmalı etkisinin aydınlatılmaya çalışıldığı bu tez çalışmasında, üretime ait kinetik parametreler belirlenmiştir. Bu sayede üretimlerin reaktör ölçeklerine yükseltilebilmesi için değerli verilerin ortaya konulduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelhafez, A.A., Hussein, S.M., Abdel-Aziz Ali, A., Sanad, H.M. 2016. Optimization of β -carotene production from agro-industrial by-products by *Serratia marcescens* ATCC 27117 using Plackett–Burman design and central composite design. *Annals of Agricultural Sciences*, 61 (1): 87–96.
- Ahuja, S., Roy, A., Kumar, L., Bharadvaja, N. 2019. Media optimization using Box Behnken design for enhanced production of biomass, beta-carotene and lipid from *Dunaliella salina*. *Vegetos* 33(1): 31–39.
- Anonymous 1 : <https://www.reportsanddata.com/report-detail/carotenoids-market>. [Son erişim tarihi: 27.07.2020].
- Akdeniz, B. 2019. Çeşitli Doğal Substratların Yerel Bir *Aureobasidium Pullulans* Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 197 s.
- Alakraa, F. 2014. Production and Optimization of Carotenoids and Lipids from Oleaginous Red Yeast *Rhodospiridium Toruloides* Y27012. Yüksek lisans tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 68 s.
- Almeida, E.R.A., Cerdá-Olmedo, E. 2008. Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Current Genetics*, 53 (3): 129–137.
- Ata, M.Y. 2013. Mikroorganizmalarda Pigment Üretimi Ve Eczacılıkta Kullanımı. Bitirme ödevi. Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 60 s.
- Attwood, M.M. 1971. The production of β -carotene in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* M29: the effect of changes in the environment upon growth and pigmentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37 (1): 369–378.
- Avalos, J. and Carmen Limón, M. 2015. Biological roles of fungal carotenoids. *Current Genetics*, 61 (3): 309–324.
- Azmi, W. and Thakur, M. 2013. Extraction and purification of β -carotene from filamentous fungus *Mucor azygosporus*. *Annals of Phytomedicine: An International Journal* 2 (2): 79–84.
- Azmi, W., Thakur, M., Javed, A. and Thakur, N. 2015. Interactive Effect of Agitation Speed and Aeration Rate on Heat Stable β -carotene Production from *Mucor azygosporus* Using Deproteinized Waste Whey Filtrate in Stirred Tank Reactor. *Current Biochemical Engineering*, 2 (1): 65–72.
- Bai, Z., Harvey, L.M. and McNeil, B. 2003. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23 (4): 267–302.
- Bast, A., Haenen, G.R.M., Van den Berg, R. and Van den Berg, H. 1998. Antioxidant effects of carotenoids. *Int. J. Vitamin Nutri. Res.*, 68 (6): 3999–4003.
- Barredo, J.L. 2009. *Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols*. Humana Press. Totowa, New Jersey. 531 pages.
- Baş, C. 2010. Cevap Yüzey Tasarımları ve Sinir Ağları Yaklaşımı. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 152 s.
- Bennett, J.W., E.K. 2002. The Mycota: Industrial Applications. 12. In: An Z. (Ed.),

- Fungal Carotenoids*. Marcel Dekker, New York. pp. 247–262. .
- Ben-Amotz A. 1996. Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 32 (2):272–275.
- Bogacz-Radomska, L., Harasym, J. 2018. β -Carotene properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2 (2): 69–74.
- Borowitzka L.J. 1992. Beta-Carotene production using algal biotechnology. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), 38 (Issue special): 248–250.
- Borba, C.M., Tavares, N., Costa, C. 2018. Carotenoid Production By *Sporidiobolus Pararoseus* In Agroindustrial Medium: Optimization of Culture Conditions In Shake Flasks And Scale-Up In A Stirred Tank Fermenter. 35 (02): 509–520.
- Braunwald, T., Schwemmlin, L., Graeff-Hönniger, S., French, W.T., Hernandez, R., Holmes, W.E. and Claupein, W. 2013. Effect of different C:N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (14): 6581–6588.
- Briefs, A.M.C.T. 2013. Experimental design and optimisation (4): Plackett-Burman designs. *Analytical Methods*, 5 (8): 1901–1903.
- Butnariu, M. 2016. Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products. *Journal of Ecosystem & Ecography*, 6 (2): 193.
- Cardoso, L.A.C., Karp, S.G., Vendruscolo, F., Kanno, K.Y.F., Zoz, L.I.C. and Carvalho, J.C. 2017. Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. *Carotenoids*.
- Carle, R. and Schweiggert, R.M. 2016. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*. Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge. pp.538.
- Certík, M., Márová, I., Hanusová, V., Rapta, P. and Breierová, E. 2009. Biotechnological Production and Properties of Carotenoid Pigments. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 355–375.
- Chan, G.M., Chan, M.M., Gellermann, W., Ermakov, I., Ermakova, M., Bhosale, P., Bernstein, P. and Rau, C. 2013. Resonance Raman Spectroscopy and the Preterm Infant Carotenoid Status. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56 (5): 556–559.
- Chandi, G.K. and Gill, B.S. 2011. Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: A review. *International Journal of Food Properties*, 14 (3): 503–513.
- Chidambara Murthy, K.N. 2005. Production of β -carotene from cultured *Dunaliella* sp. and evaluation of biological activities. PhD Thesis, Central Food Technological Research Institute, Mysore, India. pp. 215.
- Choudhari, S. and Singhal, R. 2008. Media optimization for the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach. *Bioresource Technology*, 99 (4): 722–730.

- Cleirigh, C.O. 2005. Quantification and regulation of pellet morphology in streptomyces hygroscopicus var. geldanus cultures. PhD Thesis, Dublin City University, Dublin, Ireland, 203 p.
- Coma, j. 1991. Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom. Report of the panel on dietary reference values. Committee on Medical Aspects of Food and Nutrition Policy, HMSO, London.
- Darcan, S., Sarıgül, N. 2016. Single Cell oil Production from Microorganisms. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45 (2): 55–67.
- Demir M. Peyniraltı Suyundan Mikrobiyel Yağ Üretimi ve Üretilen Yağların Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Antalya, sayfa.
- Dong, M., Walker, T.H., 2008. Addition of polyunsaturated fatty acids to canola oil by fungal conversion. *Enzyme Microb. Technol.* 42 (6): 514–520.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G.A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science and Technology*, 16 (9): 389–406.
- Echavarri-Erasun C. and Johnson, A.E. 2001. Fungal Carotenoids. In: Khachatourians G.G., Arora, D.K. (Ed), *Applied Mycology and Biotechnology Volume 2 Agriculture and Food Production*. Elsevier, Amsterdam, pp. 45-87.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. 1997. The Carotenoids as Antioxidants: A Review. *J. Photochem. Photobiol. B. Biology*, 41(3): 189–200.
- Elfeky, N., Elmahmoudy, M., Zhang, Y., Guo, J.L. and Bao, Y. 2019. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* with a combined cultivation mode of nitrogen, sulfur, and aluminium stress. *Applied Sciences (Switzerland)* 9 (12): 2444.
- Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. 2004. Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiologica*, 49 (3): 277–284.
- Evans, E.H. 1972. Studies on *Mortierella ramanniana*. *Transactions of the British Mycological Society*, 58 (2): 197–203.
- Ferrao, M. and Garg, S. 2012. Shake flask optimization of β -carotene production in *Rhodotorula graminis* RC04, 11 (52): 11431–11437.
- Gökbulut, A. ve Şarer, E. 2008. Karotenoitler ve Sağlık. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 37 (2): 123 - 144.
- Granato, D. and Ares, G. 2013. *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology*. John Wiley & Sons Inc., New York, United States, 536 p.
- Guevara-González, R.G., Torres-Pacheco, I., Rico-García, E., Ocampo-Velázquez, R.V., Mercado-Luna, A., Castañeda-Miranda, R., Solís-Sánchez, L.O., Alaniz-Lumbreras, D., Gómez-Loenzo, R., Herrera-Ruiz, G. and Soto-Zarazúa, G.M. 2010. β -Carotene Production Under Greenhouse Conditions. *Nutrition and Diet Research Progress*, pp. 59-91.

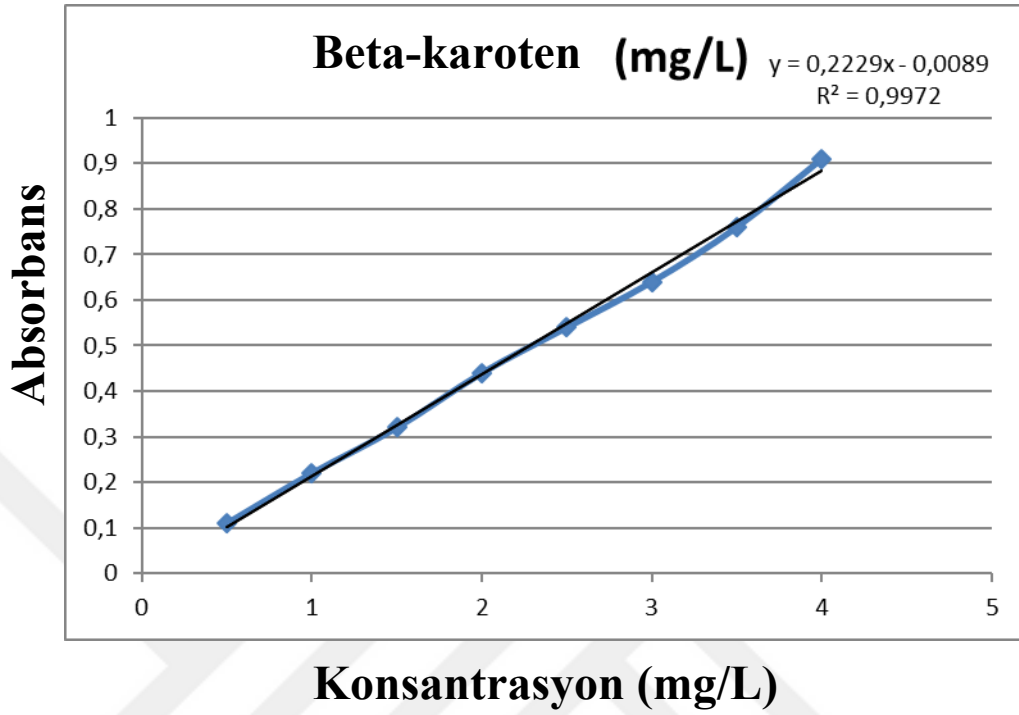
- Hamanaka, T., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Park, E.Y. 2001. Mycelial pellet intrastucture and visualization of mycelia and intracellular lipid in a culture of *Mortierella alpina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (1–2): 233–238.
- Han, M., Xu, Z. yuan, Du, C., Qian, H. and Zhang, W.G. 2016. Effects of nitrogen on the lipid and carotenoid accumulation of oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (9): 1425–1433.
- Hernández-Almanza, A., Muñiz-Márquez, D.B., Rosa O., Navarro, V., Martínez-Medina G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. 2017. Microbial Production of Bioactive Pigments, Oligosaccharides, and Peptides. In: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Ed.), *Food Biosynthesis*. Elsevier, London, pp. 95-134.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E.Y., Okabe, M. 1999. Image analysis of morphological change during arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *J Biosci Bioeng* 87 (4): 489–494.
- Hurst, W.J. 2007. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. CRC press, Boca Raton, Florida, 544 p.
- Joshi, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A.J. 2007. Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 (2): 313–319.
- Kaiser P. 2009. Entwicklung, Optimierung und Anwendung einer effizienten analytischen Methode zur Bestimmung von carotinen aus Bakterien und Hefen. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I. and Aggelis, G. 2001. Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of zygomycetes growing on glucose. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (4): 341–346.
- Kavuncu, N. 2010. Soya Yağından Konjuge Linoleik Asit Konsantrasyonunun Eldeşi: Tepki Yüzey Metodolojisi ile Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 89 sayfa.
- Klein, B. and Buchholz, R. 2013. Microalgae as sources of food ingredients and nutraceuticals. In: McNeil B., Archer D., Giavasis I. (ed), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing, Sawston, United Kingdom, pp. 559-570.
- Klempova, T., Basil, E., Kubatova, A. and Certik, M. 2013. Biosynthesis of gamma-linolenic acid and beta-carotene by *Zygomycetes* fungi. *Biotechnology Journal*, 8 (7): 794–800.
- Koç M. 2009. Pastörize Sivi Yumurtanın Püskürtmeli Kurutma Yöntemi ile Optimum Kurutma Koşullarının Belirlenmesi ve Mikroenkapsülasyonu. Yüksek Lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 229 sayfa.
- Malisorn, C. and Suntornsuk, W. 2008. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 99 (7): 2281–2287.
- Manowattana, A., Seesuriyachan, P., Techapun, C. and Chaiyaso, T. 2012. Optimization of Carotenoids Production by Red Yeast *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213 Using Waste Glycerol as the Sole Carbon Source, 17 (4): 607–621.

- Mantzouridou, F., Roukas, T. and Kotzekidou, P. 2002. Effect of the aeration rate and agitation speed on β -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor : mathematical modeling, 10 (2): 123–135.
- Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A. and Aguilar, C.N. 2014. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. *Microbial Cell Factories*, 13 (1): 1–11.
- McNeil, B., Archer, D., Giavasis, I. and Harvey, L. 2013. Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals. Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom, 610 p.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., and Anderson-Cook, C. M. 1997. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments Third Edition, A John Wiley & Sons, New Jersey, pp 104-115.
- Mushir, S., Deep, S., Fatma, T., 2014. Screening of cyanobacterial strains for UV screening compound scytonemin-environmental perspectives. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.*, 3 (2), 12–20.
- Nanou, K., Roukas, T. and Kotzekidou, P. 2007. Role of hydrolytic enzymes and oxidative stress in autolysis and morphology of *Blakeslea trispora* during β -carotene production in submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (2): 447–453.
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L. and Syltatk, C. 2016. Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1539.
- Özdal, M., Özdal, Ö.G., Gürkök, S. 2017. Statistical Optimization of Beta-Carotene Production by *Arthrobacter agilis* A17 Using Response Surface Methodology and Box-Behnken Design. II. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences AIP Conf. Proc. 1833, 020101, 1-5.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, 95 (3): 287–291.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22 (3): 189–259.
- Papp, T. 2015. Beta-Carotene Production by Mucoralean Fungi. *Journal of Engineering Animals* (December 2015): 2–6.
- Park, E.Y., Hamanaka, T., Higashiyama, K. and Fujikawa, S. 2002. Monitoring of morphological development of the arachidonic-acid-producing filamentous microorganism *Mortierella alpina*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (6): 706–712.
- Park, E.Y., Koizumi, K. and Higashiyama, K. 2006. Analysis of morphological relationship between micro- and macromorphology of *Mortierella* species using a flow-through chamber coupled with image analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 (3): 199–203.
- Perera, C.O. and Yen, G.M. 2007. Functional properties of carotenoids in human health. *International Journal of Food Properties*, 10 (2): 201–230.

- Raja, R., Hemaiswarya, S. and Rengasamy, R. 2007. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (3): 517–52.
- Ratledge, C. 2013. Micro-organismes producteurs de lipides Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. *Ocl* 20 (6): D602.
- Ratledge, C. and Wynn, J.P. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51(1-44): 1–52.
- Ravaghi, M., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sinico, C., Fadda, A.M. 2016. Stabilization of natural canthaxanthin produced by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 by encapsulation in niosomes. *Food Science and Technology*, 73:498-504.
- Renker, C., Otto, P., Schneider, K., Zimdars, B., Maraun, M. and Buscot, F. 2005. Oribatid mites as potential vectors for soil microfungi: Study of mite-associated fungal species. *Microbial Ecology*, 50 (4): 518–528.
- Ribeiro, B.D., Barreto, D.W. and Coelho, M.A.Z. 2011. Technological Aspects of β -Carotene Production. *Food and Bioprocess Technology*, 4 (5): 693–701.
- Roukas, T. 2016. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (3): 424–433.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Snchez, M., Rocha, D., Snchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. and Langley, E. 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36 (2): 146–167.
- Sağol, E. 2015. İstatistiksel Deney Tasarımının Çayırhan Bölgesi Linyitlerinin Flotasyonunda Uygulanması. Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 79 s.
- Saini, R.K. and Keum, Y.S. 2018. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240 (July 2017): 90–103.
- Sanchez, A.L.D. and S. 2007. Microbial Synthesis of Primary Metabolites: Current Trends and Future Prospects In: El-Mansi, E.M.T., Bryce, C.F.A., Dahhou, B., Sanchez, S., Demain, A.L., Allman, A.R., *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. CRC press, Boca Raton, Florida. pp 77-101.
- Saygün, A. 2017. Optimization of Production Parameters for Single Cell Oil and Metabolites from *Yarrowia Lipolytica* Strains. Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 86 pp.
- Seberry, J. and Yamada, M. 1992. Hadamard matrices, Sequences, and Block Designs, Contemporary Design Theory – A Collection of Surveys, (D. J. Stinson and J. Dinitz, Eds.), John Wiley and Sons, (1992), 431-560.
- Serdar, M. and Köro, A. 2007. Yapay Sinir Ağlarının Gemi Yapı Problemlerine Uygulanması. Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul 48 s.
- Shahidi, F. 2005. *Bailey's Industrial Oil and Fat Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons Inc. New York, United States, 496 p.
- Shariati, S., Zare, D. and Mirdamadi, S. 2019. Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakeslea trispora*.

- Food Science and Biotechnology*, 28 (2): 469–479.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M. and Tripathi, C.K.M. 2017. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology* 7 (Jan): 2087.
- Somashekar, D. and Joseph, R. 2000. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C:N ratio of the growth medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (5): 491–493.
- Sorour, N.M., Tayel, A.A., Abbas, R.N. and Abonama, O.M. 2017. Microbial Biosynthesis of Health-Promoting Food Ingredients In: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Ed), Food biosynthesis: Handbook of Food Bioengineering, Volume 1. Academic press, London, UK, pp. 55-95.
- Streekstra, H. 2010. Arachidonic Acid: Fermentative Production by *Mortierella* Fungi, In: Ratledge, C., Cohen, Z. (Ed), Single cell oil: Microbial and Algal oils. AOCS Press, United States, 516 p.
- Tanabe, Y., Saikawa, M., Watanabe, M.M., and Sugiyama, J. 2004. Molecular Phylogeny of Zygomycota Based on EF-1 α and RPB1 Sequences: Limitations and Utility of Alternative Markers to rDNA, *Mol. Phylogenet. Evol*, 30 (2) :438–449.
- Tekindal, M.A. 2009. Yanit Yüzeyi Metodu Ve Bir Uygulama. Yüksek Lisans tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 105 sayfa.
- Thakur, M. and Azmi, W. 2013. Nutraceutical β -arotene from natural non-conventional sources and its applications. *Annals of Phytomedicine*, 2 (1): 59–73.
- Thakur, M. and Azmi, W. 2014. Production of β -carotene by filamentous fungus *Mucor azygosporus* MTCC 414 in synthetic medium by applying response surface methodology, 3 (2): 93–100.
- Tkáčová, J., Klempová, T. and Čertík, M. 2017. Kinetic study of growth, lipid and carotenoid formation in β -carotene producing *rhodotorula glutinis*. *Chemical Papers*, 72 (5): 1193–1203.
- Vanaja, K. and Rani, R.H.S. 2007. Design of experiments: Concept and applications of plackett burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24 (1): 1–23.
- Van Keulen, F., Carolas, A.L. Brito, M.L. and Ferreira, B.S. 2010. Production of high-purity carotenoids by fermenting selected bacterial strains. US Patent. 2010/0145116 A1.
- Wang, B., Lin, L., Lu, L. and Chen, W. 2012. Optimization of β -carotene production by a newly isolated *Serratia marcescens* strain. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (6).
- White, M.M., T.Y. James, K. O'Donnell, M.J. Cafaro, Y. Tanabe, J. Sugiyama. 2006. Phylogeny of the Zygomycota Based on Nuclear Ribosomal Sequence Data. *Mycologia*, 98 (6): 872–884.
- Wynn J., P., Ratledge, C. 2000. The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. In: Allen I. Laskin, Joan W. Bennett, Geoffrey M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, Volume 51:1-52.

- Yadav, K., Shivalkar, Prabha, R., 2014. Extraction of pigments from *Rhodotorula* species of dairy environment. *Indian J. Sci. Technol*, 7 (12): 1973–1977.
- Yan, Z., Wang, C., Lin, J. and Cai, J. 2013. Medium optimization using mathematical statistics for production of β -Carotene by *Blakeslea trispora* and fermenting process regulation. *Food Science and Biotechnology*, 22 (6): 1667–1673.
- Yerlikaya, F. 2013. Paklitaksel nanopartiküllerinin kalite tasarımı ile geliştirilmesi ve değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, 92 s.
- Yoon, S.H., Lee, S.H., Das, A., Ryu, H.K., Jang, H.J., Kim, J.Y., Oh, D.K., Keasling, J.D. and Kim, S.W. 2009. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli*. *Journal of Biotechnology*, 140 (3–4): 218–226.
- Zhao, J., Li, Q., Sun, T., Zhu, X., Xu, H., Tang, J., Zhang, X., & Ma, Y. (2013). Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metabolic Engineering*, 17: 42–50.

7. EKLER**Ek.1.** β -karoten analizinde kullanılan standart β -karoten grafiği

Ek.2. Çizelge (1) a β -karoten Üretimine Ait Varyans Analiz Tablosu**Çizelge (1) a 1. β -karoten Üretimine Ait Ardışık Model Kareler Toplamı**

Varyasyon kaynağı	Kareler Toplamı	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Ortalama	8.559E+06	1	8.559E+06		
Lineer	6.508E+05	3	2.169E+05	10.43	0.0009
2FI	1611.90	3	537.30	0.0200	0.9959
Kuadratik	2.152E+05	3	71723.74	9.37	0.0076
Kübik	34041.51	3	11347.17	2.33	0.2164
Kalıntı	19521.61	4	4880.40		
Toplam	9.480E+06	17	5.576E+05		

Çizelge (1) a 2. β -karoten Üretimine Ait Model Uygunsuzluğu Testi

Varyasyon kaynağı	Kareler Toplamı	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Lineer	2.508E+05	9	27869.40	5.71	0.0544
2FI	2.492E+05	6	41535.45	8.51	0.0287
Kuadratik	34041.51	3	11347.17	2.33	0.2164
Saf Hata	19521.61	4	4880.40		

Çizelge (1) a 3. β -karoten Üretimine Ait Model İstatistikleri

Varyasyon Kaynağı	Standart hata	R ²	Adj. R ²	Pred. R ²	PRESS
Lineer	144.21	0.7065	0.6388	0.4061	5.470E+05
2FI	163.93	0.7082	0.5332	-0.4139	1.302E+06
Kuadratik	87.47	0.9418	0.8671	0.3756	5.752E+05

Ek.3. Çizelge (1) b Biyokütle üretimine ait Varyans Analiz tablosu

Çizelge (1) b 1. Biyokütle üretimine ait Ardışık Model Kareler Toplamı

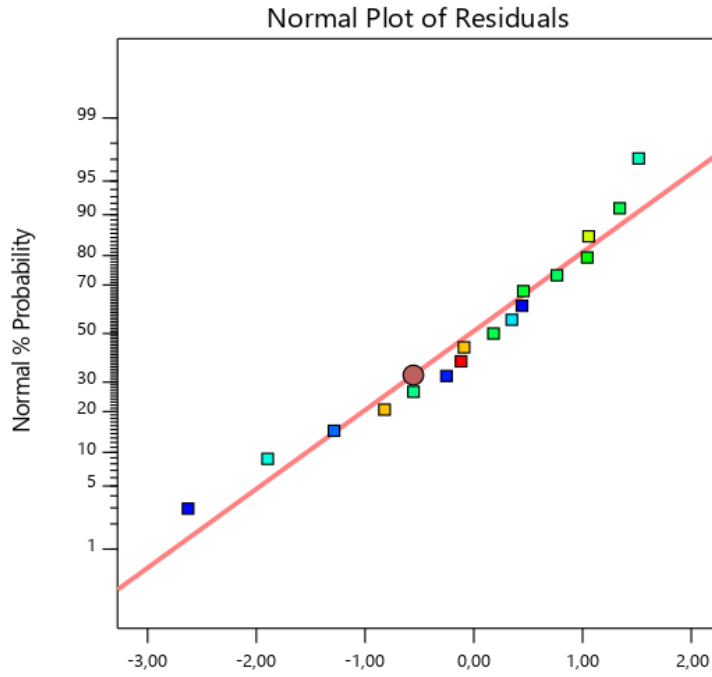
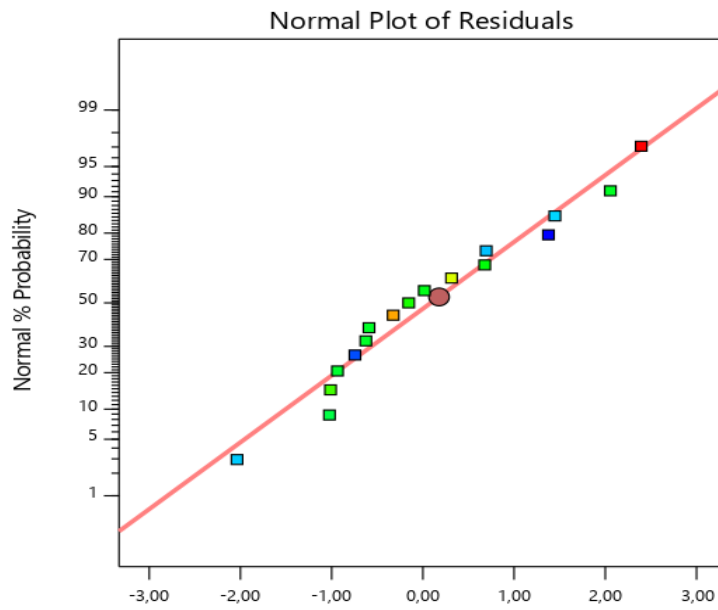
Varyasyon kaynağı	Kareler Toplamı	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Ortalama	14.32	1	14.32		
Lineer	1.61	3	0.5370	97.17	< 0.0001
2FI	0.0481	3	0.0160	6.75	0.0091
Kuadratik	0.0177	3	0.0059	6.80	0.0176
Kübik	0.0047	3	0.0016	4.38	0.0937
Kalıntı	0.0014	4	0.0004		
Toplam	16.00	17	0.9412		

Çizelge (1) b. 2. Biyokütle üretimine ait Model Uygunsuzluğu Testi

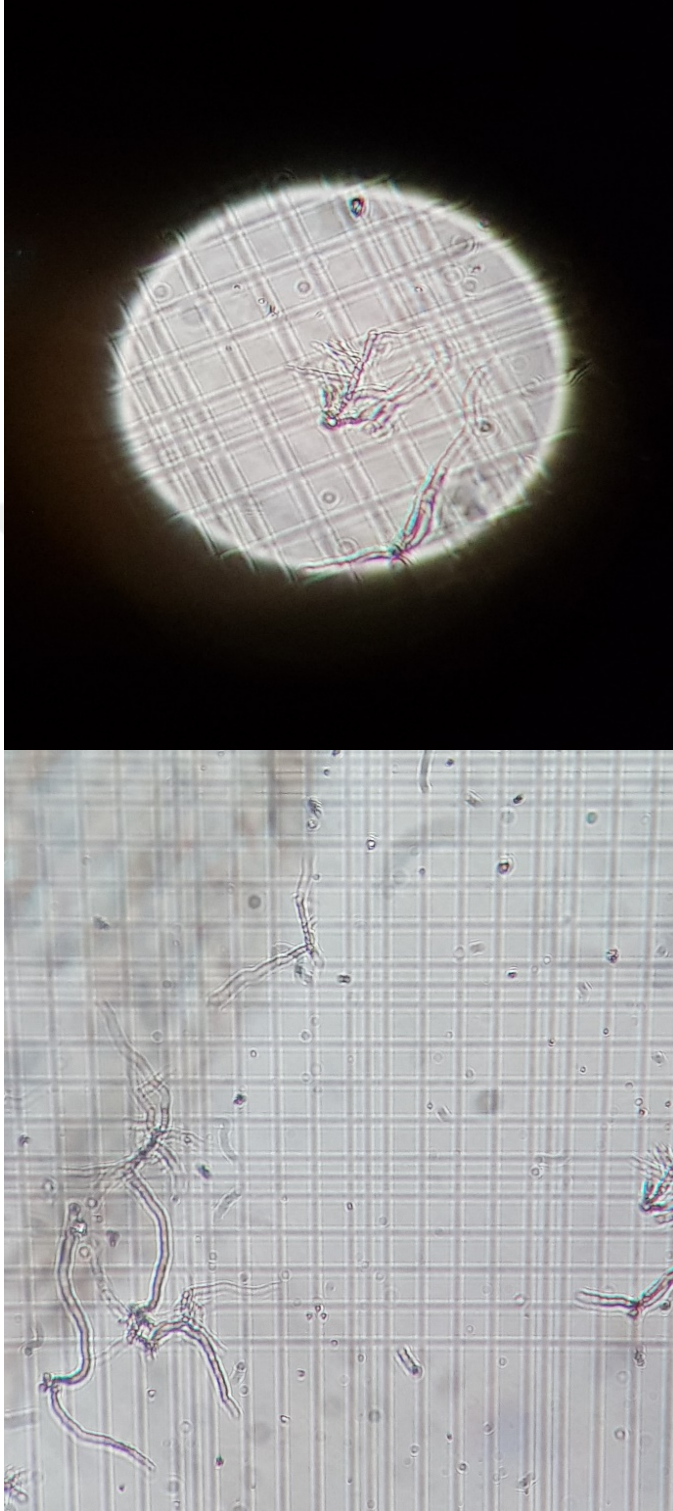
Varyasyon kaynağı	Kareler Toplamı	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Lineer	0.0704	9	0.0078	22.10	0.0046
2FI	0.0223	6	0.0037	10.52	0.0197
Kuadratik	0.0047	3	0.0016	4.38	0.0937
Saf Hata	0.0014	4	0.0004		

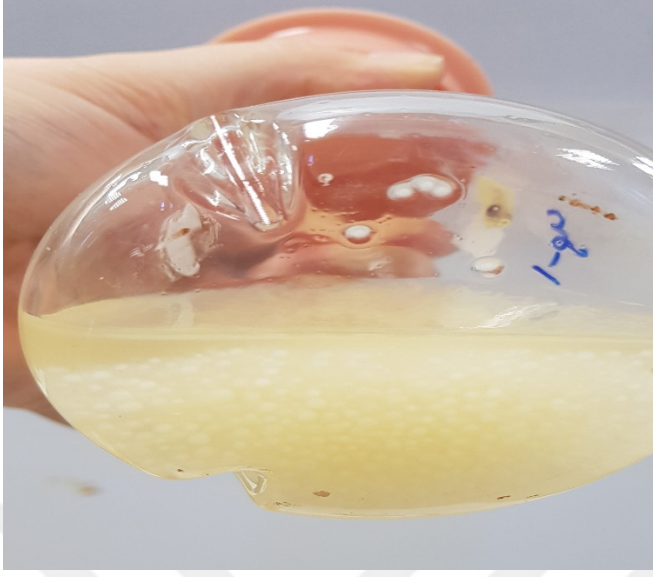
Çizelge (1) b. 3 Biyokütle üretimine ait Model İstatistikleri

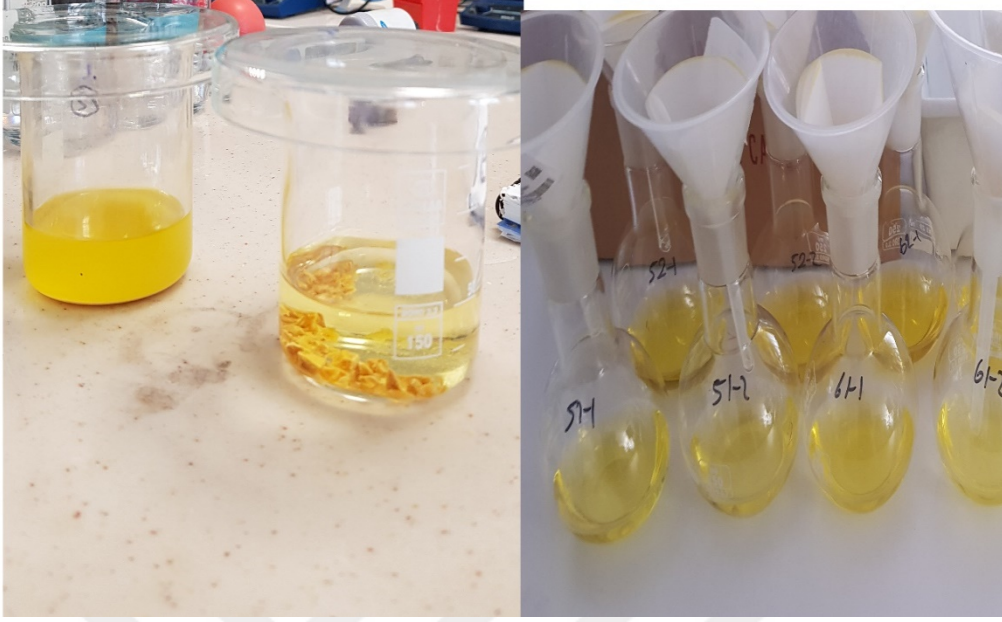
Varyasyon Kaynağı	Standart hata	R ²	Adj. R ²	Pred. R ²	PRESS
Lineer	0.0743	0.9573	0.9475	0.9142	0.1443
2FI	0.0487	0.9859	0.9774	0.9425	0.0968
Kuadratik	0.0295	0.9964	0.9918	0.9544	0.0767

Ek.4. β -karoten üretimine ait % normal olasılık grafiği**Ek.5.** Biyokütle üretimine ait % normal olasılık grafiği

Ek.6. *Mortierella ramanniana*'nın mikroskop görüntüsü



Ek.7. Küf gelişimi**Ek.8. Biyokütlenin toplanması, santrifüjlenmesi**

Ek.9. Hücre parçalama ve β -karoten elde edilmesi**Ek.10.** Elde edilen mikrobiyal β -karoten

ÖZGEÇMİŞ

HATİCE KÜBRA KIZILAY

kizilaykubra@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans 2010-2015	Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2017- devam ediyor	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
---	---

ESERLER

Kızılay H.K., Ergin F., Demir M., Küçükçetin A., "Süt Endüstrisinde Kullanılan Isı Değiştiricilerde Kalıntı Oluşumu", Akademik Gıda, cilt.16, ss.450-457, 2018

Ergin F., Kızılay H.K., Demir M., Küçükçetin A., "Biofouling Problem In Dairy Processing Industry ", International Congress on Food Technology , NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 10-12 Ekim 2018, pp.227-227

Kızılay H.K., Sarıca E., Demir M., "Determination of Some Physicochemical, Microbiological And Sensorial Properties of the Concentrated Acidophilus Milk Produced From Cow's Milk And Goat's Milk With Different Production Methods ",

International Conference of Food Physicists, ANTALYA, TÜRKIYE, 23-25 Ekim 2018,
no.34, pp.79-79

Kizilay H.K., Demir M., "Non-destructive Analysis of Edible Oil Oxidation ",
International Conference of Food Physicists, ANTALYA, TÜRKIYE, 23-25 Ekim 2018,
no.17, pp.117-117

