

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**PEYNİRALTI SUYU KULLANILARAK *Mortierella isabellina* İLE
MİKROBİYEL YAĞ ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU**

Aysen Güher GÜNDEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**OCAK 2023
ANTALYA**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**PEYNİRALTI SUYU KULLANILARAK *Mortierella isabellina* İLE
MİKROBİYEL YAĞ ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU**

Aysen Güher GÜNDEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2023

ANTALYA

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

**PEYNİRALTI SUYU KULLANILARAK *Mortierella isabellina* İLE
MİKROBİYEL YAĞ ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU**

Aysen Güher GÜNDEŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından FDK-2019-4842 nolu proje ile desteklenmiştir.**

OCAK 2023

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

**PEYNİRALTI SUYU KULLANILARAK *Mortierella isabellina* İLE
MİKROBİYEL YAĞ ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU**

Aysen Güher GÜNDEŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 02/01/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Muammer DEMİR (Danışman)

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba AKTAR KÜÇÜKASLAN

Dr. Öğr.Üyesi Yaşar KARADUMAN

ÖZET

PEYNİRALTI SUYU KULLANILARAK *Mortierella isabellina* İLE MİKROBİYEL YAĞ ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

Aysen Güher GÜNDEŞ

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Muammer DEMİR

Ocak 2023; 99 sayfa

Esansiyel yağ asitlerinin doğru beslenmenin ayrılmaz bir parçası olduğu ve eksikliğinin bir dizi rahatsızlığa neden olabileceği birçok araştırmaya ile tespit edilmiştir. Omega-6 esansiyel yağ asitleri serisine dâhil olan γ -linolenik asitin (GLA) birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Romatoid artrit karşı etkili olması, kardiyovasküler risk faktörlerini azaltması, sinir iletim hızını normalleştirilmesi bilinen faydalarından sadece birkaçıdır. Bu nedenle son zamanlarda birçok gıda GLA ile zenginleştirilmekte ve bu ürünlere olan talep de hızlı bir artış görülmektedir. GLA, geleneksel olarak, çuha çiçeği tohumları, hodan ve frenk üzümü gibi bitki kaynaklarından üretilmektedir. Ancak artan talebi karşılamak adına mikrobiyal kaynaklardan üretimi için kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, peyniraltı suyu substrat olarak kullanılarak *Mortierella isabellina* DSM 1414 ile mikrobiyel yağ üretimleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen GLA miktarı üzerine fermantasyon koşullarından olan besi ortamı başlangıç şeker oranı ve pH değeri, çalkalama hızı, farklı azot kaynakları, sıcaklık ve aşılama miktarı etkileri araştırılmıştır. Fermantasyon şartlarının optimize edilmesinde ilk olarak seçilen herbir parametrenin GLA üretiminde etki ve önemini belirlemek için "her defada tek etken metodu (one factor at a time)" kullanılmıştır. Bu kapsamda her bir deneme için ön kültür şartları kullanılarak besi ortamı başlangıç pH değerleri, azot kaynakları ve inokülasyon oranları değiştirilerek en yüksek GLA üretiminin elde edildiği şartlar seçilip ikinci aşamaya geçilmiştir. İlk olarak besi ortamı başlangıç pH değerlerinin GLA üretim miktarı üzerine etkisi incelenmiş ve en yüksek GLA üretiminin pH 7'de 0.55 g/L olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir. Kullanılan azot kaynağının GLA üretimi üzerine etkisinin incelendiği fermantasyonlar sonucunda en yüksek GLA miktarının (0.70 g/L) maya özütü ile elde edildiği belirlenmiştir. Daha sonra inokülasyon oranının etkisinin incelendiği fermantasyonlardan yüksek GLA üretiminin (1.08 g/L) %9 inokülasyon oranına sahip fermantasyonlarda gerçekleştiği tespit edilmiş ve ikinci aşamaya geçilmiştir. Bu aşamada başlangıç şeker konsantrasyonu, çalkalama hızı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisi, Cevap Yüzey Metodu yöntemlerinden olan Box-Behnken Tasarımı kullanılarak oluşturulan deneme deseni ile incelenmiştir. Tasarımın önerdiği deneyler sonucunda bağımsız değişkenlerin yanıt (GLA miktarı) üzerine olan etkilerini ifade eden modeller oluşturulmuş, modellerin uygunluğu varyasyon analizleri (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda optimum değerler belirlenmiştir. Buna göre 81.87 g/L başlangıç şeker içeriği; 120 d/dk. çalkalama hızı ve 22°C fermantasyon

sıcaklığı ile doğrulama fermentasyonları gerçekleştirilmiş ve bu şartlar altında 1.15 g/L GLA elde edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen GLA üretim miktarı 2.1 katına çıkarılmıştır.

Beslenme ve sağlık açısından faydaları, yapılan birçok çalışma ile ispatlanmış çoklu doymamış yağ asitlerince zengin olan ve bu sebeple de dünya piyasasında gittikçe talebi artan mikrobiyel yağın ülkemizde de üretim potansiyelinin ortaya konulması ile ülke ekonomisine katkı sağlanacağı düşünülmektedir. Peynir üretim prosesi sırasında açığa çıkan peyniraltı suyunun substrat olarak kullanılması ile, hem değerli besin öğelerini içeren fakat atık durumundaki peyniraltı suyunun değerlendirileceği hem de bu atık maddenin çevreye vereceği zararın bertaraf edilebileceği ve aynı zamanda yüksek ekonomik değere sahip γ -linolenik asit (GLA) içeren mikrobiyel yağ üretimi gerçekleştirilerek katma değer sağlanabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: GLA, Mikrobiyal yağ, *Mortierella isabellina*, Peyniraltı suyu, Tek hücre yağı

JÜRİ: Doç. Dr. Muammer DEMİR

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba AKTAR KÜÇÜKASLAN

Dr. Öğr. Üyesi Yaşar KARADUMAN

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF MICROBIAL OIL PRODUCTION CONDITIONS WITH *Mortierella isabellina* USING WHEY

Aysen Güher GÜNDEŞ

PhD Thesis in Department of Food Engineering

Supervisor: Associate Professor Doctor Muammer DEMİR

January 2023; 99 pages

Research has shown that essential fatty acids are integral to proper nutrition. It has been found that EFA deficiency causes a host of ailments. In addition, research has also shown that γ -linolenic acid, (GLA) belongs to omega-6 PUFA series can reverse, as well as prevent, some human disorders and diseases. Being effective against rheumatoid arthritis, reducing cardiovascular risk factors, normalizing nerve conduction velocity are just a few of its known benefits. Lately, many food products are also being enriched with GLA, and there is rapid increase in its demand. Conventionally, it is produced from plant sources such as seeds of evening primrose, borage and blackcurrant. However, to meet the increasing demand, extensive research is being carried out for its production from microbial sources.

Microbial oil production was carried out with *Mortierella isabellina* (DSM 1414) in the study. The effects of fermentation parameters such as initial sugar content, initial pH value, shaking speed, different nitrogen sources, temperature, and the ratio of inoculation, on the GLA productions, were investigated. In the first step, "one factor at a time method" was used for the optimization of fermentation conditions. Firstly, effects of pH values of fermentation medium on GLA production were examined and maximum GLA production, 0.55 g/L, was obtained at pH 7. As for nitrogen sources (ammonium nitrate, beef extract, potassium nitrate, soya peptone, yeast extract), yeast extract was determined as the best nitrogen source with 0.70 g/L GLA production. The inoculum size for maximum GLA production (1.08 g/L) was obtained at %9 inoculum size. As the second step, the effects of initial substrat concentration, agitating speed and fermentation temperature on GLA production were investigated using Box-Behnken experimental design which is one of the response surface methods. As a result of the suggested experimental design, models, expressing the effects of independent variables on the response of (GLA) production, were obtained, and the suitability of the models was evaluated by analysis of variation (ANOVA). Optimum values were determined by the obtained data. Accordingly, confirmation of experiments was carried out and 1.15 g/L GLA was obtained with the initial sugar content of 81.87 g/L; a shaking speed of 120 rpm and a fermentation temperature of 22°C. As a result of optimization study, the amount of GLA production was increased by 2.1 times.

It is thought that the production of microbial oil, which has an increasing demand in the world market due to its rich content in polyunsaturated fatty acids with proven benefits in terms of nutrition and health, will contribute to the country's economy. It is

considered that, by using the whey, a by-product of the manufacturing of cheese, the damage to the environment will be eliminated and added value will also be provided by producing microbial oil, containing GLA, which has high economic value while a waste material is utilized.

KEYWORDS: GLA, Mikrobial oil, *Mortierella isabellina*, Single cell oil, Whey

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr Muammer DEMİR

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Asst. Prof. Dr. Tuğba AKTAR KÜÇÜKASLAN

Asst. Prof. Dr. Yaşar KARADUMAN

ÖNSÖZ

Hızla artan dünya nüfusuna karşın hammadde yetersizliği ve daha yüksek bir yaşam standardına yönelik taleplerin ortaya çıkması, alternatif gıda kaynakları bulmak için yapılan çalışmalarda artışa sebep olmuştur. Sanayileşme ile birlikte artan ürün çeşitliliği ve miktarı, tüketim miktarında da artışa neden olmuştur. Üretim ve tüketim sırasında açığa çıkan atıklar çevresel sorunlara neden olmaya başlamıştır.

Mikrobiyel biyokütle üretiminin amaçlarından biri artan gıda talebini karşılamak, bir diğeri de tarımsal ve endüstriyel atıkların substrat olarak kullanımını teşvik ederek çevre kirlenmesi sorununa çözüm getirmek ve ekonomik değeri olan bir ürün elde edebilmektir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı çoklu doymamış yağ asitlerini içeren yağlara alternatif olarak bu yağ asitlerini fazlaca içeren mikrobiyel yağ üretimine olan ilgi artmıştır. Mikrobiyel yağ üretiminin en önemli avantajlarından biri yapısında doğada sınırlı kaynaklarda bulunan uzun zincir yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini içermesidir.

Sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı çoklu doymamış yağ asitlerine, omega-3 (ω -3) ve omega-6 (ω -6) esansiyel yağ asitlerinin diyetel kaynaklarına olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bunlardan, ω -6 serisinden olan γ -linolenik asit'in (GLA) bazı cilt hastalıkları ve diyabet gibi hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca GLA'nın yüksek tansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, enflamatuvar hastalıklar, sikleroz, alerji, adet dönemi rahatsızlıklarında, osteoporoz ve şizofreni gibi birçok hastalık üzerinde etkili olduğu, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol ve serum trigliserid seviyesini düşürüp, HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) kolesterolü yükselttiği, damarlarda plak oluşumunu önlemede olumlu etkilerinin olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde biyoteknolojik açıdan çok fazla değerlendirme alanı olmayan, peynir üretim prosesinin atığı durumundaki peyniraltı suyu, mikrobiyel yağ üretimlerinde substrat olarak kullanılmış ve elde edilen yağlarda maksimum GLA üretimi için fermentasyon şartları optimize edilmiştir. Dünyada bazı büyük ticari firmalar tarafından üretilen söz konusu fermentasyon ürünleri saflaştırıldıktan sonra çok yüksek fiyatlarla satılmaktadır. Proje sonuçlarının endüstriye aktarılması sağlanabilirse, ithal ettiğimiz bu ürünlerin ülkemizde üretilmesiyle hem yerli ekonomiye katkı sağlanabileceği hem de üretici açısından yeni iş alanlarının ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

Bu konuyu araştırma olanağı sağlayan, bilgi ve tecrübesi ile bana destek veren danışman hocam Doç. Dr. Muammer DEMİR'e, çalışmam boyunca her türlü imkânı ve desteği sağlayan Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e ve araştırma sürecinde tavsiyelerini esirgemeyen Prof. Dr. Ayhan TOPUZ ve Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI'ye, tez sürecindeki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Tuğba AKTAR KÜÇÜKASLAN ve Dr. Öğr. Üyesi Yaşar KARADUMAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, çalışmalarım sırasındaki yardımları için Dr. Öğr. Üyesi Firuze ERGİN'e ve Öğr. Gör. Emrah EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Projeye verdikleri destek nedeniyle Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak, bana her zaman güvenen ve yanımda olan, Őu an bulunduğum noktada olmamda en büyük payın sahibi annem Züleyha GÜNDEŞ ve babam Zekeriya GÜNDEŞ'e ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen eŐim Erkan ÇAKICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	6
2.1. Fermantasyon Teknolojisi	6
2.2. Tek Hücre Yağ Üretimi	7
2.2.1. Tek hücre yağı üretiminde kullanılan substratlar	10
2.2.1.1. Glikoz ve ilgili substratlardan tek hücre yağ üretimi.....	10
2.2.1.2. Endüstri ve tarımsal endüstri atıklarında tek hücre yağ üretimi	13
2.2.2. γ -linolenik asit üretim prosesi.....	15
2.3. Tek Hücre Yağı Biyosentezi	17
2.3.1. Yağ asidi biyosentezi	17
2.3.2. Açılglicerol Biyosentezi.....	17
2.3.3. Çoklu doymamış yağ asitlerinin biyosentezi	18
2.4. Yağ Üreten Mikroorganizmalarda Lipit Birikimi	20
2.5. Mikrobiyal Biyokütle, Yağ ve Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Üretimini Etkileyen Faktörler	25
2.6. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri	28
2.7. Peyniraltı Suyu	31
3. MATERYAL VE METOT	34

3.1. Materyal.....	34
3.2. Mikroorganizma	34
3.3. Deproteinize Peynir Altı Suyunun Hazırlanması	34
3.4. Ön Kültürün Hazırlanması	35
3.4.1. Misel süspansiyonunun hazırlanması	35
3.4.2. Misel süspansiyonunun ön kültür besi ortamına aşılama.....	35
3.5. Fermantasyon Ortamının Hazırlanması.....	35
3.6. Hazırlanan Ön Kültürden Fermantasyon Ortamına Aşılama	35
3.7. Biyokütlenin Fermantasyon Besi Ortamından Ayrılması	36
3.8. Biyokütlenin Kurutulması	36
3.9. Biyokütleden Yağ Ekstraksiyonu	36
3.10. Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi	36
3.11. Besi Ortamında Yapılan Analizler	38
3.11.1. Toplam Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi	38
3.11.2. Azotlu madde miktarının belirlenmesi	39
3.12. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	39
3.13. Çalışmanın Deneme Deseni	40
3.13.1. Her defada tek etken metodu deneme deseni	40
3.13.2. Cevap yüzey metodu deneme deseni.....	41
3.14. İstatistiksel Analizler	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1. Her Defada Tek Etken Metodu ile GLA Üretimi İçin Optimum Fermantasyon Koşullarının Belirlenmesi.....	43
4.1.1. Besi ortamı başlangıç pH değerinin biyokütle, yağ ve GLA üretimi üzerine etkisi.....	43
4.1.2. Besi ortamında kullanılan farklı azot kaynaklarının biyokütle, yağ ve GLA üretimi üzerine etkisi	48

4.1.3. Farklı inokülayon oranlarının biyokütle, yağ ve GLA üretimi üzerine etkisi.....	53
4.2. Maksimum GLA Üretimi için Box-Behnken Tasarımı İle Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	57
4.3. <i>Mortierella isabellina</i> ile Maksimum GLA Üretimi İçin Fermantasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	66
4.4. Box-Behnken Cevap Yüzey Metodunun Sunduğu Optimum Koşullar İçin Doğrulama Fermantasyonu	66
5. SONUÇLAR	75
6. KAYNAKLAR	77
7. EKLER.....	97
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Peyniraltı Suyu Kullanılarak *Mortierella isabellina* ile Mikrobiyel Yağ Üretim Şartlarının 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.

02/01/2023

Aysen Güher GÜNDEŞ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
m	: Kütle (kg)
μ	: Mikroorganizma için spesifik gelişme hızı (zaman^{-1})
x	: Biyokütle miktarı (g)
dx/dt	: Birim zamanda biyokütle oluşumu
x_0	: Fermantasyon başlangıcındaki biyokütle miktarı (g)
$x_{\max}$	: Maksimum biyokütle miktarı (g)
pH	: Potansiyel hidrojen
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
mL	: Mililitre
g	: Gram
mg	: Miligram
sa	: Saat
s	: Saniye
dk	: Dakika

Kısaltmalar

ACC	: Asetil-CoA karboksilaz
ACP	: Açıl taşıyıcı protein
ACL	: ATP: sitrat liyaz
ADP	: Adenozin difosfat
ALA	: α -linolenik asit
ARA	: Araşidonik asit
ATTC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
CBS	: Kakao yağı ikamesi
CDP	: Sitidin difosfat
CTP	: Sitidin trifosfat
d/d	: devir/dakika
DAG	:Diaçilgliserol
DHA	: Dekozahekzaenoik asit
DHGLA	: Dihomo- γ -linolenik asit
DPA	: Dekosapentaenoik asit
EPA	: Eikosapentaenoik asit
EYA	: Esansiyel yağ asitleri
FAS	: Yağ asidi sentetaz
FFA	: Serbest yağ asidi
GLA	: γ -Linolenik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LA	: Linoleik asit
LT	: Lökotrien

LCPUFA	: Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri
MA	: Mead asit
MAG	: Monoaçilgliserol
MDH	: Malat dehidrogenaz
ME	: Malik enzim
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OFAT	: Her defada tek etken (one factor at a time)
OTA	: Oktadekatetraenoik asit
P	: Ürün
P_1	: Fermantasyon sonundaki ürün miktarı
P_0	: Fermantasyon başlangıcındaki ürün miktarı
PAS	: Peyniraltı suyu
PAST	: Peyniraltı suyu tozu
PC	: Fosfatidilkolin
PE	: Fosfatidiletanolamin
PG	: Prostaglandin
PI	: Fosfatidilinositol
PS	: Fosfatidilserin
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
SAS	: İstatistik Analiz Yazılımı (Statistical analysis software)
S	: Substrat
S_1	: Fermantasyon sonundaki substrat miktarı
S_0	: Fermantasyon başlangıcındaki substrat miktarı
T	: Sıcaklık
t_d	: Mikroorganizma miktarının iki katına çıkma süresi
TCA	: Trikarboksilik asit

THP : Tek hücre proteini

THY : Tek hücre yağ

UDP : Üridindifosfat

UTP : Üridintrifosfat

$Y_{GLA/S}$: GLA verimi (kullanılan birim substrat miktarına karşı üretilen GLA miktarı, %)

$Y_{L/S}$: Lipit verimi (kullanılan birim substrat miktarına karşı üretilen lipit miktarı, %)

$Y_{X/S}$: Biyokütle verim (kullanılan birim substrat miktarına karşılık gelişen mikroorganizma miktarı, %)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikroorganizmalarda doymamış yağ asitlerinin aerobik desatürasyon ile oluşumu.....	19
Şekil 2.2. Mikroorganizmalarda PUFA oluşum metabolik yolu.	20
Şekil 2.3. Asetil CoA'nın malonil CoA'ya dönüştürülme reaksiyonu	24
Şekil 2.4. Yağlı funguslarda lipit sentezinin metabolik yolu.....	25
Şekil 3.1. GLA standart eğrisi.....	37
Şekil 3.2. Glikoz çözeltisi standart eğrisi	38
Şekil 4.1. Besi ortamı farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermantasyonlarda elde edilen GLA ve lipit üretimi (g/L) ile GLA verimi (%) değerleri.....	46
Şekil 4.2. Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyonlara ait GLA ve lipit üretim değerleri (g/L) ve GLA verimi (%) sonuçları.....	50
Şekil 4.3. Farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermantasyonlara ait GLA ve lipit üretimi (g/L) ve GLA verimi (%) sonuçları.....	56
Şekil 4.4. GLA üretimi için Box-Behnken Tasarımının sunduğu fermantasyon sonucu elde edilen verilerle tahmin edilen sonuçların karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.5. Şeker miktarı ve çalkama hızının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği	62
Şekil 4.6. Şeker miktarı ve çalkama hızının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği.....	62
Şekil 4.7. Besi ortamı başlangıç şeker miktarı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği.....	64
Şekil 4.8. Şeker miktarı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği	64
Şekil 4.9. Çalkalama hızı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği	65
Şekil 4.10. Çalkalama hızı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği	65
Şekil 4.11. Doğrulama fermantasyonuna ait toplam şeker, biyokütle, yağ ve GLA miktarları	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. DP-PASP bileşimi	35
Çizelge 3.2. Fermantasyonların optimizasyonu için cevap yüzey metodunda kullanılan parametreler ve parametrelere ait değerler.....	41
Çizelge 3.3. Box- Behnken Tasarımının oluşturduğu fermantasyon şartları.....	42
Çizelge 4.1. Besi ortamı farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermantasyonlara ait biyokütle ve yağ üretim miktarları, şeker tüketim miktarları, biyokütle yağ içerikleri ve biyokütle verimlerine ait ortalama değerler ($X \pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	44
Çizelge 4.2. Besi ortamı farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermantasyonlarda elde edilen GLA miktarlarına ve yağ verimine ait ortalama değerleri ($X \pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	45
Çizelge 4.3. Farklı azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonlarda üretilen biyokütle ve yağ miktarları, şeker tüketim miktarları, biyokütle yağ içerikleri ve biyokütle verimlerine ($X \pm SE$) ait ortalama değerler ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	49
Çizelge 4.4. Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyonlarda üretilen GLA miktarlarına ve yağ verimine ($X \pm SE$) ait ortalama değerler ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	50
Çizelge 4.5. Farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda üretilen biyokütle ve yağ miktarları, şeker tüketim miktarları, biyokütle yağ içeriği ve biyokütle verimine ($X \pm SE$) ait değerler ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	54
Çizelge 4.6. Farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda üretilen GLA miktarlarına ve yağ verimine ait ortalama değerler ($X \pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	55
Çizelge 4.7. Box-Behnken deneme deseninde yer alan koşullarda gerçekleştirilen fermantasyonlara ait sonuçlar	59
Çizelge 4.8. Başlangıç şeker miktarı, çalkalama hızı ve sıcaklığın GLA üretimi üzerine etkilerinin varyans analiz sonuçları	60
Çizelge 4.9. Box-Behnken Cevap Yüzey Tasarımı ile oluşturulan optimum koşullar ve bu koşullarda gerçekleştirilen fermantasyona ait GLA üretim miktarının tahmini ve deneysel sonuçları	66
Çizelge 4.10. Doğrulama fermantasyonu sonunda üretilen biyokütle, yağ ve GLA miktarları ile besi ortamında kalan toplam şeker miktarlarına ait değerler ($X \pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	67

Çizelge 4.11. Doğrulama fermantasyonuna ait kinetik parametre değerleri	69
Çizelge 4.12. Optimum koşullarda elde edilen deneysel veriler ve tahmini değerler	69



1. GİRİŞ

Nüfus artışındaki hız dünyadaki gıda talebini artırmış, bu da talep ve arzdaki dengenin bozulmasına, yetersiz beslenen insan sayısının ve açlığın yükselmesine neden olmuştur. Bu durum araştırmacıları yenilikçi ve alternatif gıda kaynaklarına yöneltmiştir (Anupama ve Ravindra 2000). Bu nedenle organik materyali karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen ve inorganik azotu yüksek besin değeri olan proteinlere dönüştürebilen mikroorganizmaların kullanıldığı fermantasyon teknolojisine başvurulmuştur (Rehm vd. 1995).

İnsanoğlu mikroorganizmaları gıda kaynağı ve gıda bileşeni olarak eski çağlardan bu yana kullanmaktadır. Neredeyse medeniyetin başlangıcından beri bira ve şarap dahil olmak üzere birçok fermente içecek ve peynir, yoğurt, salam, lahana turşusu gibi çok sayıda fermente gıda tüketilmektedir. Birçok medeniyette gıdaların üretimi için mikroorganizmaların yaygın kullanımı mevcuttur ve mikroorganizmaların kendileriyle birlikte ürettikleri gıdaların güvenli tüketimi de günümüzde artık küresel olarak kabul görmektedir (Wynn ve Ratledge 2009; Demain 2013).

Gıdalarda mikrobiyel kültürlerden izole edilmiş bileşenlerin kullanımı da uzun bir geçmişe sahiptir. Bunlar sirkeden (diğer bir deyişle asetik asitten) sitrik asite, çok sayıda amino asit ve polisakkarit gamlara kadar uzanmaktadır. Tüm organizmanın (veya hemen hemen tamamının) tüketim materyali olarak kullanıldığı mikrobiyal protein kullanımı daha yakın zamanda ortaya çıkmıştır. Bu teknolojinin ilk kullanımları, 1940'larda ve 1950'lerde, Batı Hint Adaları'nda, fazla şeker ve melasın hayvan yemi takviyesi olarak kullanılabilecek biyokütleye dönüştürülmesinin bir yolu olan gıda mayası Torula prosesinin geliştirilmesi ile ortaya çıkmıştır. Torula işleminin orijinal konseptinin diğer mikroorganizmalar ve diğer substratlara uygulanabilmesi için geliştirilen çeşitli Tek hücre proteini (THP) işlemlerinin ortaya çıkması, gıda olarak mikroorganizmaların kullanımında büyük önem taşımaktaydı (Wynn ve Ratledge 2005; Adedayo vd. 2011).

Petrol endüstrisinde ham petrolün rafine edilmesi sırasında alkanlar büyük miktarlarda atık madde olarak açığa çıkmaktadır. Bu atık maddeyi değerlendirebilmek adına yapılan çalışmaların sonucunda, büyük miktarlarda THP üretmek için 1500 m³ hacme kadar fermentörler inşa edilmiştir. Bu da geniş ölçekli mikrobiyal üretim teknolojisinde büyük ilerlemeler sağlamıştır. Bu tür fermantasyon tesislerinin, yaklaşık üç veya dört futbol sahası büyüklüğünde bir yerleşkede, kolaylıkla yılda 5000 tona (kuru ağırlık) kadar biyokütle üretebildiği bildirilmektedir (Wynn ve Ratledge 2005).

Mikrobiyal biyokütlenin proteinli gıda olarak kullanılmasının yanı sıra daha sonraki yıllarda mikroorganizmaları kullanarak sıvı ve katı yağlar üretmeye yönelik düşünceler de ortaya çıkmıştır. Tek hücre yağı (THY) adı, THP kavramına uygun olarak ve bu ürünün ayırt edici özelliğini belirtmek için türetilmiştir. THY terimi, bir mikroorganizmadan ekstrakte edilebilen, bir hayvan veya bitki yağına benzeyen, gıdalarda veya normalde geleneksel kaynaklardan elde edilen sıvı ve katı yağların kullanıldığı diğer ürünlerde kullanımı uygun olan yağları ifade etmektedir (Mukherjee 1998; Wynn ve Ratledge 2005).

Bununla birlikte bitkisel yağlara alternatif olarak THY üretiminin yeni olmadığı ve uzun bir geçmişe sahip olduğu bildirilmektedir. Çeşitli maya ve küflerin potansiyel yağ kaynakları olarak kullanmasına yönelik ilk girişimler yirminci yüzyılın ilk yirmi yılında başlamıştır. 1930'lara gelindiğinde Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde THY üretimini geliştirmek için ciddi girişimlerde bulunduğu bildirilmiştir. İkinci Dünya Savaşı sırasında, endüstriyel ölçekte mikrobiyal yağlar üretmeye yönelik ilk girişimler, Almanya'da gerçekleştirilmiş ve büyük yağ üreticilerinden biri olan Henkel tarafından önemli teşviklerde bulunulmuştur (Lundin 1950; Woodbine 1959; Ratledge 1984).

Canlı tüm mikroorganizmalar yapısal lipitleri (örneğin membran lipitleri) sentezlemek zorundadır. Ancak sadece belirli sayıda mikroorganizma türü, kuru biyokütle ağırlığının %20'sinden daha fazlasına denk gelen oranlarda yağ biriktirebilmektedir. Yağ üretebilen ve bu yağı biyokütlelerinde depolayabilen mikroorganizmalara “yağlı” (oleaginous) mikroorganizma denilmektedir. Bir mikroorganizmanın “yağlı” olarak nitelendirilebilmesi için kuru biyokütlesinin en az %20 (w/w) oranında yağ içermesi gerekmektedir. Yağ üretebilen mikroorganizmalar, bitkiler gibi kuru biyokütlelerinin %70'ine kadar triaçilgliserollerini depolayabilmektedir. (Akpınar Bayazit ve Özcan Yılsay 2004). THY olarak da bilinen mikrobiyal yağlar, birçok ticari kullanım alanına sahiptir ve bunların mikrobiyal fermantasyon yoluyla üretimine dair araştırmalar halen yoğun şekilde devam etmektedir (Xing vd. 2012; Donot vd. 2014; Cao vd. 2021; Rasouli 2021).

Mikrobiyal yağ üretiminin tercih edilebilmesi için ekonomik olması gerekmektedir. Bunun için de elde edilecek olan yağın, tarımsal yöntemlerle kolayca üretilmiyor olması, değerli ve pahalı bir yağ olması gerekmektedir. Bu gereksinimler daha çok, uzun zincir yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleri (LCPUFA) üretimiyle sağlanabilmektedir (Certik ve Shimizu 1999; Papanikolaou vd. 2004a; Ratledge 2004). Bitkisel kaynaklardan elde edilemeyen LCPUFA THY üretim proseslerinin geliştirilmesinden önce sadece deniz kaynaklı hayvansal yağlardan elde edilebilmekteydi. Ancak, nüfusun artmasıyla PUFA içeren yeterli gıda kaynağı sağlanmasının zamanla sorun olacağı düşünülmüştür. Örneğin, omega-3 PUFA'lara (500mg/gün bazında) yönelik potansiyel talep 1.274 milyon ton iken balıkların arzı 0.84 milyon tondur, yani aradaki fark 0.434 milyon ton olmaktadır. THY üretim proseslerinin geliştirilmesi ile bu tür ürünler artık, bazı bakteriler, funguslar ve mikroalgler tarafından diğer yağlara alternatif olarak üretilabilmektedir (Alonso ve Maroto 2000; Ratledge 2004; Bélignon vd. 2016).

Esansiyel yağ asitleri (EYA), [linoleik asit (LA; 18:2 ω -6) ve α -linolenik asit (ALA; 18:3 ω -3) ve onların metabolitleri γ -linolenik asit (GLA; 18:3 ω -6), dihomo-GLA (DGLA; 20:3 ω -6), araşidonik asit (ARA; 20:4 ω -6), eikosapentaenoik asit (EPA; 20:5 ω -3) ve dekosaheksaenoik asit (DHA; 22:6 ω -3)] birçok biyolojik etkiye sahiptir. EYA enerji sağlamakta ve cilt yoluyla sıvı kaybını önlemekte olup GLA, DGLA, ARA, EPA ve DHA birçok hücresel süreç için gereklidir (Das vd. 1988; Das 1991). LCPUFA hücre zarlarının önemli bir bileşenini oluşturmakta ve bu nedenle zarlardaki içerikleri, zarların biyolojik özelliklerini ve hücrelerin çeşitli uyaranlara karşı tepki verme şeklini belirleyebilmektedir (Das ve Fams 2003). LCPUFA; protein kinaz C'nin aktivitesini değiştirebilmekte, büyüme faktörlerinin eylemlerine aracılık edebilmekte, bağışıklık tepkisini düzenleyebilmekte, serbest radikal oluşumunu ve endotelial nitrik oksit (eNO) sentezini etkileyebilmekte ve kanser hücresi büyümesini tahrif edebilmektedir (Das 2001).

LCPUFA serum kolesterol ve triaçilgliserol seviyelerini düşürmekte, ateroskleroza durdurmakta veya inhibe etmekte, koroner kalp hastalığını önlemekte olup, antiinflamatuvar etkiye sahiptir ve osteoporoz tedavisinde faydalıdır (Cornwell ve Panganalana 1981; Das 1994; Das ve Fams 2003). Ayrıca ALA, EPA, DHA başta olmak üzere ω -3 yağ asitleri kalp ve damar hastalıkları, romatoid artrit, kanser, astım, Alzheimer gibi birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde; ayrıca bebeklerde hem doğum öncesi hem de doğum sonrası dönemde retina ve santral sinir sisteminin gelişiminde etkin rol oynamaktadır (Akşit 2009). LCPUFA yeni doğmuş bebeklerin ve annelerinin beslenmesinde çok önemlidir, bu nedenle ticârî anlamda dünya çapında bir pazar imkânı bulabilmektedir (Ratledge 2004). Bazı sağlık kuruluşları ve uzmanlar tarafından bebek mamalarına anne sütünde bulunan seviyelerde ω -3 yağ asidi DHA ve ω -6 yağ asidi ARA eklenmesi önerilmiştir. Bununla birlikte bebek mamalarına eklenmek üzere uygun DHA ve ARA kaynaklarına gereksinim duyulmuştur. Bu yağ asitlerinin üretiminde algal ve fungal kaynakların son yıllarda yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu tek hücre yağları, yüksek konsantrasyonda DHA ve ARA içerdikleri ve aynı zamanda kontrollü fermantasyon koşullarında üretilibildikleri için daha fazla tercih edilir duruma gelmiştir (Wibert vd. 1997; Burns vd. 1999).

PUFA'lar yapısal ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle çeşitli biyomedikal ve nutrasötik alanlarda birçok kullanıma sahiptir. Aynı zamanda kritik biyolojik fonksiyonları düzenleyen geniş çeşitlilikteki metabolitlerin de (prostoglandinler, lökotrienler ve hidroksi-yag asitleri gibi) öncüsüdür. PUFA, organların fonksiyonlarını normal bir şekilde yerine getirmesinde görev almakta ve yağ asitlerine vücuttaki bütün organlarca gereksinim duyulmaktadır. Bu yüzden PUFA eksikliği; deri, sinir sistemi, bağışıklık ve inflamatuvar sistem, kardiyovasküler sistem, endokrin sistem, böbrekler, solunum ve üreme sisteminde anormalliklere neden olmaktadır. Memeliler PUFA sentezleyemedikleri için, bunları diyetle temin etmek zorundadır (Gill ve Valivety 1997; Certik ve Shimizu 1999; Certik vd. 2012).

THY'nin ticârî olarak üretiminin ilk hedeflerinden biri, yüksek fiyata sahip bir çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) olan ve kanser tedavisinde de kullanılan GLA'nın, doğadaki diğer ticari tek kaynağı olan çuha çiçeği (*Oenothera biennis*) bitkisinin tohum yağına alternatif olarak üretilmesidir. Bu amacı gerçekleştirebilmek için araştırmacılar, α -izomerinden ziyade GLA'yı ürettiği bilinen *Mucorale* sınıfına ait çok sayıda iplikli küflerde bir tarama gerçekleştirmiştir. Fazla miktarlarda yağ üreten birçok suş olmasına rağmen, bu suşların ürettiği yağların GLA içeriğinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Buna zıt olarak GLA miktarı yüksek olan yağ üreten suşların ise yağ veriminin düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacıların üzerinde çalıştığı küflerden sadece *Mucor circinelloides*'in kuru biyokütlesinde %4'e varan GLA içerdiği (%20 GLA içeren %20 yağ oranı) bildirilmiştir (Ratledge 1993; Fakas vd. 2009b). GLA tek hücre yağına olan ilgiler artarak devam etmektedir. Özellikle %90 saflıkta GLA üretimi için başlangıç materyali olarak mikrobiyel kaynaklı ürünler çok daha avantajlı olmaktadır (Ratledge 1993). Potansiyel GLA üreticisi olarak bilinen *Mortierella isabellina* da ayrıca oleik asit, palmitik asit, linoleik asit ve düşük miktarlarda stearik ve palmitoleik asit üretebilmektedir (Fakas vd. 2009b).

Peyniraltı suyu (PAS), peynir üretimi sırasında pıhtıdan ayrılan yeşilimsi sarı renkte ve protein, laktoz, mineral madde ve vitamin içeriği yüksek, besin değeri zengin bir sıvıdır. Ortalama olarak %6 kurumadde içeren, ucuz ve bol miktarda bulunan PAS

özellikle laktoz, protein ve mineral madde bileşimi ile fermantasyon endüstrisi için uygun bir hammaddedir. Fakat değerlendirilmeden su kaynaklarına atıldığında; akarsularda, göllerde ve hatta denizlerde ortamın oksijenini tükettiği için yaşamı olumsuz etkilemekte ve çevre kirliliğine yol açmaktadır. PAS'ın bir kısmının değerlendirilmeden atıldığı düşünüldüğünde hem çevre kirliliğine neden olduğu hem de böylesine besin değeri yüksek bir yan üründen faydalanılmamasının maddi kayıplara yol açtığı görülmektedir (Demir 2010). Dünya çapında yılda yaklaşık 165 milyon ton PAS üretildiği göz önüne alındığında, PAS'dan yararlanmak için yeni yöntemlerin araştırılmasına olumlu bakılmaktadır. PAS'ın Avrupa Birliği ülkelerinde %75'i ve dünyanın geri kalanında da muhtemelen %50'den azı kullanılmakta, sonuç olarak gıda ve yem potansiyeli yüksek değerli bir ürünün büyük bir kısmı israf edilmektedir (Macwan vd. 2016). Katma değerli ürünlerin üretimi, peynir atıksu yönetimi için faydalı bir seçenek olarak görülmektedir. PAS'ın değerli maddelerin üretimi için fermantasyon ortamında substrat olarak kullanılması biyokimyasal oksijen ihtiyacı değerini ve dolayısıyla bertaraf sorununu azaltmaya yardımcı olmaktadır (Chatterjee ve Guha 2014; Moreira vd. 2015). Peynir altı suyunun suya ek olarak ana bileşenleri laktoz (44–52 g/L), peynir altı suyu proteinleri (6–10 g/L) ve mineral maddelerdir. Ayrıca vitaminler, organik asitler ve lipitleri içermektedir (Panesar vd. 2007, Abd El-salam vd. 2009, Prazeres vd. 2012). Yapılan çalışmalar, PAS'ın karotenoid, polisakkaritler, etanol, laktik asit, THP ve THY gibi değerli mikrobiyal ürünlerin üretiminde substrat olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Roukas 1999; Fakas vd. 2008; Fakas vd. 2009b 2009c; Vamvakaki vd. 2010; Christensen vd. 2011; Nasrabadi ve Razavi 2011; Cui vd. 2012). Bununla birlikte, büyük miktarda PAS hâlâ kullanılmamakta ve bundan yeni değerli ürünler üretilmesi gerekmektedir (Chatterjee ve Guha 2014).

Sistemlerin performansını iyileştirmek ve maliyetleri yükseltmeden, süreçlerin verimini artırmak önemlidir ve bu amaçla kullanılan yöntemler de optimizasyon olarak adlandırılmaktadır. İstatistiksel deneysel tasarım teknikleri, deneyleri planlamak ve çıktıları nesnel sonuçlara varılabilecek şekilde analiz etmek için etkili bir prosedürdür. Bir deneyin amaçlarının belirlenmesi, deneysel tasarımın ilk adımıdır. Analiz edilecek parametreleri ve yanıtları seçmek, bir prosesteki önemli değişkenleri optimize etmenin ikinci önemli adımıdır (Baş ve Boyacı 2007; Gündoğdu vd. 2016). Optimizasyon için kullanılan klasik deney tasarımı yaklaşımlarından biri “her defada tek etken” (OFAT) yöntemidir. Bu süreçte biri hariç tüm değişkenler sabit tutulmakta ve bu değişken için optimum seviye belirlenmektedir. Bu optimum değer kullanılarak, ikinci değişkenin optimumu bulunmakta ve süreç bu şekilde devam ettirilmektedir (Geiger 1996; Akkuş ve Karabudak 2020). OFAT tasarımları tarafından sağlanan iyileştirmelerin çoğu, deneyin ilk yarısında gerçekleştirilmektedir (Frey vd. 2003). Bilimsel araştırmalarda en önemli faktörü belirlemede ve diğer faktörleri göz ardı ederek bu faktörün etkisini araştırmada yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır (Wu ve Hamada 2021). Fermantasyon koşullarının optimizasyonu, birçok biyoprosesin verimini ve üretkenliğini önemli ölçüde arttırmak için kullanılmaktadır. Geleneksel olarak, fermantasyonların proses parametreleri OFAT kullanılarak optimize edilmektedir (Grothe vd. 1999).

İstatistiksel temele dayanan kullanılabilir yöntemlerin başında, belirlenmek istenilen bir yanıtın çeşitli değişkenlerden (sıcaklık, çalkalma hızı, başlangıç substrat miktarı vb.) etkilendiği süreçlerin geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve optimize edilmesi için istatistiksel ve matematiksel tekniklerden yararlanılan “Cevap yüzey metodu” (CYM)

gelmektedir. Model regresyon analizi yardımıyla oluşturulan CYM’de, bir faktörün ana etkisinin veya diğer faktörlerle etkileşiminin cevap değişkeninin değerlerinde ne derece önemli bir etkiye sahip olduğu regresyon katsayıları yardımıyla belirlenmektedir. En çok kullanılan CYM; ‘Merkezi kompozit tasarımı’ ve ‘Box-Behnken tasarımı’dır (Erdoğan 2007). Box-Behnken tasarımlarında her bir etken üç düzeye sahiptir. Box-Behnken tasarımı, merkezi kompozit tasarımlarına kıyasla daha az laboratuvar çalışması gerektirdiğinden daha ekonomik bir tasarım olarak kabul edilmektedir (Yıldırım 2019; Köksoy 2001).

Bu çalışma ile peyniraltı suyu kullanılarak *M. isabellina* ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda GLA içeriği yüksek (g/L) mikrobiyal yağ üretimi için optimum besi ortamı ve fermentasyon koşulları belirlenerek birçok araştırmaya temel oluşturacak bulgular elde edilmiştir. Laboratuvar ölçeğinde mikrobiyal yağ üretiminin gerçekleştirildiği bu çalışmanın gelecekte yapılacak pilot ve endüstriyel ölçekli ve daha kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Ayrıca zengin besin içeriği ile fermentasyon besi ortamları için yüksek potansiyelli bir substrat olmasına karşın, hâlâ tam olarak değerlendirilemeyen peyniraltı suyunun yüksek değerli bir ürün olan GLA üretiminde kullanımının geliştirilmesine katkı sağlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Fermantasyon Teknolojisi

Hızlı üremeleri, genetik esneklik ve yönetilebilir çalışma sistemleri sağlamaları ile mikroorganizmalar biyoteknolojik olarak harika varlıklardır. Endüstriyel mikrobiyoloji uygulamalarının kökleri antik çağa kadar uzanmaktadır. Mikroorganizmalar keşfedilmelerinden çok önce, insanların istek ve ihtiyaçlarına hizmet etmek için kullanılmış, süt, meyve ve sebzeleri korumuş ve açığa çıkan içecek, peynir, ekmek, salamuralar ve sirke ile insanların yaşam kalitesini artırmıştır (McNeil vd. 2013).

Neolitik çağdan beri insanlar tarafından yiyecek ve içecek üretimi için kullanılan, Latince ateş (kaynama) fiilinden türetilen fermantasyon terimi, tüm biyoteknolojik süreçlerin en eskisidir. Antibiyotik, alkol, ekmek, sirke ve diğer gıda veya endüstriyel ürünlerin üretiminde kullanılan fermantasyon işlemi, elektron alıcı olarak moleküler oksijenden ziyade organik maddelerin kullanılmasıyla solunumdan farklıdır. Mikrobiyal hücreler ile başarılı mikrobiyal fermantasyon proseslerinin sonucunda, mikrobiyal enzimler, antibiyotikler, mikrobiyal metabolitler ve diğer fermente gıdalar da dahil olmak üzere, şu anda dünya çapında 3500'den fazla farklı fermente ürün insanlar tarafından tüketilmektedir (Lee 2022). Ayrıca proses mühendisliğindeki ilerlemeler sayesinde, fermantasyon ekipmanlarındaki gelişme ve değişiklikler, mikroorganizmaların ve metabolitlerinin üretiminin optimizasyonunu sağlamıştır (Rehm vd. 1995).

“Biyoteknoloji” terimi ilk kez 1919 yılında Karl Ereky tarafından kullanılmış olup mikroorganizma, hayvan ve bitki gibi canlı hücreleri yardımıyla hammaddelerden fermentörlerde veya biyoreaktörlerde proses optimizasyonu ile ürünlerin üretilmesi anlamına gelmektedir. Biyoteknoloji, insanların ihtiyaçlarını karşılamak ve geliştirmek için tüm canlı hücreleri veya bunun parçalarını kullanan geniş bir disiplindir. Fermantasyon teknolojisindeki endüstriyel biyoteknoloji deneyimi tek hücreli protein üretimi alanında başlamış ve daha sonra antibiyotikler, amino asitler, antitümör ajanlar, statinler, vitaminler, enzimler, steroidler ve fermente gıdaların çoğunu üreten fermantasyon teknolojilerindeki gelişmelere doğru ilerlemiştir. Mikrobiyal fermantasyon teknolojisi, reaksiyonun kolaylığı, yüksek özgülüğü, düşük maliyetleri ve uygulama esnekliği nedeniyle uzun süredir tercih edilen bir organik süreç olmuştur. Fermantasyon teknolojisi, çeşitli emtia kimyasalların (amonyak, asetik asit vb.), saf kimyasalların ve farmasötiklerin üretiminde giderek daha önemli bir hale gelmektedir. Fermentatif üretim süreçlerinde genellikle yüksek dönüşüm verimliliği elde edilmektedir. Bu nedenle, kimya endüstrileri, bileşiklerin kimyasal sentezi için daha ekonomik bir alternatif olarak biyoteknolojik araştırmalara yönelmiştir (Lee 2015, 2022).

Organik materyali karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen mikroorganizmaları üretmek ve inorganik azotu yüksek besin değeri olan proteinlere dönüştürmek için birçok proses geliştirilmiştir. Bu mikroorganizmalar ve /veya ürünleri, gıdalarda ya da hayvan yemlerinde, geleneksel bitki veya hayvan kaynaklarının yerine kullanılabilir. Algler, bakteriler, maya ve küfler gibi mikroorganizmalar protein kaynakları olarak değerlendirilebilmektedir. Besin değerleri için mikroorganizmaların kullanımı, Birinci Dünya Savaşı'nın sonunda başlamıştır. Alman bilim insanları hayvan ve insan diyetlerinde kullanılmak üzere maya kültürünü geliştirmiş ve “yem mayası (fodder yeast)” terimi türemiştir. İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra ABD'de sülfat

liköründeki pentozlar kullanılarak yem mayası üretimi geliştirilmiştir. Birleşik Krallık'ta ise substrat olarak melas, kahve küspesi ve palmyra palm tohum küspesi gibi karbon kaynaklarının kullanıldığı prosesler geliştirilmesi üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Gıda ve yem olarak mikrobiyal biyokütle üretimine olan ilgi 1950'lerden sonra yoğunlaşmış ve 1977'ye doğru zirveye ulaşarak ve “Tek hücre proteini (THP)” terimi türemiştir (Rehm vd. 1995).

Prokaryotik yapıdaki bakteriler, ökaryotik mayalar, küfler ve algler gibi bazı mikroorganizmalar biyokütlelerinde, bitki ve hayvanlara kıyasla daha geniş çeşitlilikte lipid üretebilmektedir. Mikrobiyel kaynaklardan elde edilen yağlar, mikrobiyel yağlar, tek hücreli yağlar veya tek hücre yağı (THY) olarak adlandırılmaktadır. THY terimi, mikrobiyal kökenli yağları belirtmek için Tek hücreli proteine (THP) paralel olarak kullanılmaktadır (Ratledge 1994; Mukherjee 1998; Fidler vd. 1999).

2.2. Tek Hücre Yağ Üretimi

Tek hücre yağı (THY); başlıca, mayalar, küfler ve algler olmak üzere tek hücreli mikroorganizmalardan elde edilen yenilebilir yağlar olarak tanımlanır (Ratledge 1976). Bakteriler de tek hücreli mikroorganizmalardır, ancak genellikle yenilebilir yağları depolayamaz, bunun yerine poli-beta-hidroksibutirat gibi başka depolama maddesi üretmeye eğilimlidir. Bununla birlikte, ticari olarak lipid üretmek için bakterilerin kullanımı mevcuttur, ancak bu kullanımlar tamamen biyoyakıt olarak değerlendirilecek lipidlerin üretimi içindir ve yenilebilir amaçlara uygun değildir (Cohen ve Ratledge 2010).

Mikrobiyel lipidlerin 20. yüzyılın ilk yıllarından itibaren insanların tüketimi için sıvı ve katı yağların alternatif kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Paul Lindner'in, o zamanlar *Endomyces vernalis*, günümüzde de *Trichosporon pullulans* olarak bilinen bir küf türünü kullanarak yağ üretiminde küçük ölçekli bir prosesi geliştiren ilk kişi olduğu bildirilmiştir (Ratledge ve Cohen 2010). THY'nin ticârî ilk üretimi ise 1985'te başlamış ve ekonomik anlamda başarılı olunmadığından uzun süre devam edemeden, başlangıcından sadece 6 yıl sonra son bulmuştur. Ticârî, bu mikrobiyel yağ üretimi denemesinde *Mucor circinelloides* kullanılmıştır. O dönemde *M. circinelloides* ile THY üretimi, GLA içeriği yüksek yağ üretimi için yetiştiriciliği yapılan ve pahalı olan çuha çiçeği bitkisinin yağına alternatif olarak yapılmaktaydı. Bu üretimin, küfün 220 m³ hacimli karıştırılmalı tank fermentörde geliştirilmesinden sonra biyokütlenin ayrılıp kurutulmasını takiben yağın ekstraksiyonu ve son olarak da rafinasyonu ve saflaştırılması işlemlerini içerdiği belirtilmiştir (Ratledge 2004).

Mikroorganizmaların sıvı ve katı yağ kaynağı olarak kullanımının geliştirilmesi için sadece lipid biyosentez prosesi değil, aynı zamanda birikimini etkileyen faktörler de araştırılmıştır. Bu mikroorganizmaların, karbon kaynağı olarak tarımsal ürünlerden elde edilen glikoz veya sakaroz içeren kültür ortamlarında geliştirilmesi gerektiğinden, şekerin maliyetinin, mısır yağı, soya fasulyesi yağı ve kolza yağı (kanola yağı) gibi çoğu emtia bitki yağının fiyatının yaklaşık dörtte birinden az olmadığı sürece bir tarımsal ürünü diğerine dönüştürmek hiçbir zaman ekonomik olarak uygulanabilir olmayacaktır. Mikroorganizmalar 1 ton yağ üretmek için yaklaşık 5 ton şeker ihtiyacı duydukları için verimli değildir (Ratledge 2010). Bu nedenle, THY'lerin ekonomik olarak uygulanabilir hale gelebilmesi için ya sıfır maliyetli bir karbon kaynağı bulunması ya da olağan emtia yağlarının fiyatlarını önemli ölçüde aşan yağların üretilebilmesi gerekmektedir. Mevcut

emtia bitki yağlarının tamamen tıpkıbasımlarını üreten THY prosesleri geliştirmenin hiçbir değeri yoktu. Bu açık ekonomik sınırlamalara rağmen, 1920'lerden 1950'lerin sonlarına kadar mikrobiyal yağların üretimi üzerine önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, mikroorganizmalarda lipit üretimini anlamak için temel oluşturdu. Çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler özetle şu şekildeydi;

- Biyokütle ağırlıklarının %20'sinden fazlasına denk gelen oranda yağ biriktirebilen mikroorganizmaların sayısı, toplam tür sayısı ile karşılaştırıldığında nispeten azdır.
- Yağ biriktiren mikroorganizmalar esas olarak maya ve küf türleridir, sadece birkaç bakteri ekstrakte edilebilir yenilebilir yağ üretebilmektedir
- Bazı alglerin oldukça yüksek miktarlarda lipit ürettiği, bu lipitlerin de bitkisel yağların yağ asidi içeriği ile aynı olduğu; ancak bazı PUFA içeriklerinin balık yağlarında bulunanlara benzer olduğu tespit edilmiştir.
- Yağ üretebilen mikroorganizmalarda yağ birikimi karbon dışında azot veya başka bir besin kaynağından yoksun bırakılmasıyla artırılabilir. Hücreler, besi ortamındaki azot yoksunluğuna, ortamda halen mevcut olan fazla karbonun tercihen depolama lipidine (triasilgliseroller) dönüştürüldüğü bir lipit depolama fazına girerek yanıt vermektedir (Ganuza vd. 2008; Ratledge 2010).

Almanya'da II. Dünya Savaşı sırasında geleneksel kaynaklardan (esas olarak hayvansal yağ ile az miktarda da bitkisel yağ) elde edilen yetersiz miktardaki yağ stokunu desteklemek için mikrobiyal yağ üretme girişimlerinde bulunulmasına rağmen, bu çabalar sınırlıydı. Bununla birlikte, yağ açısından zengin biyokütle üretimi funguslar ile sağlanmıştır. Funguslar başlıca *Oidium lactis* (şu an *Geotrichum candidum* olarak isimlendirilmektedir), atık laktoz (peynir üretimi) veya tarımsal atık maddeler kullanılarak geliştirilmiş ve ortaya çıkan hücreler, saman ve ot kullanılarak balya haline getirildikten sonra ordu atlarının beslenmesinde kullanılmıştır (Bunker 1945, 1946, 1963; Ledingham vd. 1945). Bazı biyoküteller insan tüketimi için çorbalara ve sosislere dahil edilmiş, ancak bunlar esas olarak bir yağ kaynağından ziyade protein takviyesi olarak kullanılmıştır. Yağ bakımından zengin fungusların ordu atlarını beslemek için kullanılması önemsiz gibi görünse de bu dönemde Alman ordusunun yaklaşık bir milyon ata sahip olduğu ve geleneksel olmayan yem kaynakları kullanılması kabul gördüğü bildirilmiştir (Ratledge 2010). Geniş ölçekli fermantasyon teknolojisinin yaygın hale gelmesi ile birlikte, 1960'ların ortalarında mikrobiyal yağların üretimine olan ilgi bir kez daha ortaya çıktı (Kessell 1968; Ratledge 1968). Ancak bitkisel kaynaklı yağların fiyatları ile yarışamadığı için bu durum çok uzun sürmemiştir (Shaw 1965, 1966a, b).

Bitkiler veya balıklar gibi diğer yağlı türle karşılaştırıldığında, mikrobiyal yağların çeşitli avantajları vardır. Mikroorganizmaların yetiştirilmesi, iklimsel veya coğrafi kısıtlamalar olmadan yapılır ve ekilebilir arazi kullanımını gerektirmez. Mikroorganizmaların bir başka avantajı da, endüstriyel atıklar dahil birçok substrat türlerinde yüksek oranda gelişme gösterebilmesi, düşük maliyetle ya da hiç masrafsız kullanabilmelerine olanak sağlamalarıdır (Certik ve Shimizu 1999; Ward ve Singh 2005; Bélignon vd. 2016). Mikrobiyal PUFA'lar, soya fasulyesi yağı, hurma yağı ve ayçiçek yağı gibi ticari olarak üretilen düşük fiyatlı yağlara kıyasla yüksek değerli yağ türleridir. Diğer PUFA kaynaklarına nazaran, mikrobiyal kaynaklar farmasötik saflıkta daha konsantre PUFA üretimi sağlar ve üretilen yağların kalitesinin kontrol edilebilmesine olanak tanımaktadır. Yağlı mikroorganizmalar çok sayıda dönüşüm (örn. oksidasyon,

desatürasyon ve hidrojenasyon) reaksiyonunu gerçekleştirebilme yetkinliğine sahiptir, böylece PUFA'ların yapıları geliştirilebilmekte, ipit ve diğer ürünlerin eşzamanlı olarak oluşturulmasına olanak tanımaktadır. Aynı zamanda spesifik enzimlerdeki (örn. desaturazlar) mutant değişimler sayesinde özel olarak üretilen yağların üretimini artırılabilir. Yağlı mikroorganizmaların bir diğer avantajı da diğer sıvı ya da katı yağ kaynaklarında hiç bulunmayan ve arzu edilen yağ asitlerinin üretimi için yabancı genlerin (bitki ya da hayvan) klonlanabildiği uygun konakçılar olarak görülmeleridir. Mikroorganizmalar, lipid biyokimyası, metabolik kontrol ve fonksiyon üzerinde çalışmak için kullanışlı modeller sunar çünkü hücrelerindeki az sayıdaki organel, önemli metabolik ve biyokimyasal sorulara diğer organizmaların karmaşık çoklu-hücreli sistemlerine göre daha basit ve daha hızlı yanıt verir. PUFA üretiminde mikroorganizmaların kullanılmasının başka bir avantajı da mikrobiyel metabolik sistemin basitliği sayesinde, yağ asidi oluşumunun temel adımlarını uyaran veya bastıran ve lipid verimi ve profilinin istenilen şekilde düzenlenmesini sağlayan besin yönetimi ile kontrollü koşullar altında kolayca geliştirilebilir olmasıdır. Ayrıca mikroorganizmalar protein, iz elementler, vitaminler, antioksidanlar vb. açısından zengindir, bu nedenle makro ve mikro besinler olarak kullanılabilirler (Certik ve Shimizu 1999).

Algler, funguslar ve mayalar lipid biriktirebilmektedir, ancak funguslar ve mayalar en çok çalışılanlardır. Bakterilerin PUFA üretiminde kullanılmaları ile ilgili sadece birkaç çalışma vardır. Bu çalışmalar, yalnızca birkaç bakterinin (laktik asit bakterileri veya rumen bakterileri) PUFA biriktirebildiğini ve biriken PUFA'ların sadece CLA (konjuge linolenik asit) olduğunu göstermektedir (Gorissen vd. 2012; Gurovic vd. 2014; Bélignon vd. 2016). *Mortierella isabellina*, *Mortierella alpina* veya *Cunninghamella* gibi bazı mantar ve küflerin iyi bir lipid biriktirme yeteneğine sahip olduğu ve çeşitli substratlar üzerinde GLA ve EPA gibi esansiyel yağ asitleri üretme eğiliminde oldukları saptanmıştır (Xing vd. 2012; Gao vd. 2013). Henüz 1985 yılında, *Mucor (javanicus) circinelloides*'in, yüksek miktarda GLA üretme kabiliyeti (%18-22) (çuha çiçeği yağının iki katından fazla miktarda) nedeniyle seçilmiş olması önemlidir. O zamandan bu yana funguslar tarafından GLA üretimi ile araştırmalar durmamış ve hâlâ devam etmektedir. Özellikle *Mortierella isabellina* ve *Cunninghamella echinulata* gibi suşlar GLA'nın mikrobiyal üretiminin geliştirilmesi için umut vaat eden yollar sunmaktadır. *Mortierella* cinsi aynı zamanda en önemli ARA üreticisidir ve yabani suşları toplam yağ asidinin yaklaşık %50'si kadar ARA içerebilmektedir. *Mortierella alpina* fungusu şu anda DSM tarafından ticari olarak ARA bakımından zenginleştirilmiş gıda takviyelerinin üretimi için kullanılmaktadır (Bélignon vd. 2016).

Mayalara baktığımızda, *Rhodosporidium*, *Lipomyces*, *Yarrowia* ve *Cryptococcus* cinsleri kuru kütlelerinin %60'ına kadar lipid birikebilmektedir (Cheirsilp ve Louhasakul 2013; Yang vd. 2015). Ancak mayalar tarafından üretilen yağ asitlerinin aralığı sınırlıdır: en sık bulunanlar, gıda takviyesi olarak kullanılamayan oleik, linoleik, palmitik ve palmitoleik asitlerdir. Ayrıca yağlı mayalarda, lipid üretiminin metabolik yolu artık iyi bilinmektedir (Li vd. 2013; Tai ve Stephanopoulos 2013). Bu sayede de metabolik mühendisliği kullanılarak mayalarla PUFA üretiminin geliştirilmesine olanak sağlanmıştır. Örneğin, *Yarrowia lipolytica*'da bazı genlerin yüksek düzeyde ifadesi ile %61.7'lik lipid verimine ulaşılabilmektedir (Tai ve Stephanopoulos 2013). Diğer araştırmacılar, β -oksidasyonu ifade eden genlerin silinmesine odaklanmış ve yabani suşlara kıyasla lipid içeriğinde dört kat artış sağlamışlardır (Beopoulos vd. 2008).

Bazı mikroalgler, literatürde PUFA üretmek için potansiyel üretici olarak kabul edilmektedir. Örneğin *Nannochloropsis oceanic* CY2, *Porphyriridium cruentum*, *Phaedactylum tricornutum* ve *Chaetoceros calcitrans* mikroalglerinin EPA üreticisi ve *Isochrysis galbana* ve *Cryptocodinium spp.* Mikroalglerinin ise DHA üreticisi bildirilmiştir (Chen vd. 2015; Guedes vd. 2011). *Chlamydomonas reinhardtii*, lipid metabolizmasını araştırmak için model olarak kabul edilmektedir (Guschina ve Harwood 2006). Mikroalglerin fotobiyoreaktörde yetiştirilmesindeki en yaygın sorun ise ışık penetrasyonunun etkinliğidir (Chen vd. 2015).

2.2.1. Tek hücre yağı üretiminde kullanılan substratlar

THY üretiminin ilk yıllarından itibaren, konuyla ilgili birçok araştırma, prosesin maliyetinin azaltılması üzerineydi. Yaklaşık beşte bir olan yağ veriminden dolayı, substratlar açık bir hedef olarak görüldüler. Bu nedenle; şeker ve lipitten, alkan ve alkole kadar birçok organik materyal (Ratledge 1988) ve bunlara ek olarak melas gibi yaygın atık maddeler (Johnson vd. 1995) veya kalamar (mürekkep balığı) bağırsağı gibi çok farklı materyaller de substrat olarak denenmiştir (Morita 2005). Genel olarak, atık maddeler çok düşük maliyetleri nedeniyle -aslında, bu maliyet sıfır veya hatta negatif olabilir- tercih edilen karbon kaynaklarıdır. Bununla birlikte, atıkların ulaşılabilirliği (yerel veya geçici olması) sınırlı olabileceğinden ve fermantasyon performansları seriden seriye değiştiğinden, atık kullanımı ciddi problemler ortaya çıkarmaktadır (Ratledge 1988). Ayrıca, atıklar asimile edilemeyen polisakkaritler içerebilecekleri için, enzimatik veya kimyasal olarak hidrolize edilerek kullanılabilir şekerlerin üretilmesi gerekebilir, ancak bu uygulamalar da fermantasyon maliyetlerini yükseltir (Fakas vd. 2008a; Peng ve Chen 2008). Tipik fermantasyon proseslerinde karbon kaynakları toplam üretim maliyetinin %60'ından fazlasını oluşturduğundan, düşük maliyetli karbon kaynakları bu nedenle dikkate alınmalıdır (Ward ve Singh 2005; Bélignon vd. 2016).

2.2.1.1. Glikoz ve ilgili substratlardan tek hücre yağ üretimi

Doğada yaygın bulunan şeker ve polisakkaritler yenilenebilir karbon kaynakları arasındadır. Genellikle THY üretimi için kullanılan şeker ve polisakkaritler, glikoz, früktoz, galaktoz, ksiloz, laktoz, maltoz, sukroz, nişasta ve pektindir (Fakas vd. 2009a). Glikoz, THY fermantasyonları da dâhil olmak üzere fermantasyonlarda kullanılan en yaygın substrattır ve genellikle diğer karbon substratlarının performansını değerlendirmek için bir karşılaştırma referansı olarak kullanılır. Bunun nedeni, hepsi olmasa da çoğu yağlı mikroorganizmanın glikozu kullanarak THY'e dönüştürebilmesidir. Yapılan bir çalışmada *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus* ve *Zygorhynchus* cinsine ait birkaç Zygomycetes, glikozda geliştirilmiş ve *Cunninghamella echinulata* ile *Mortierella isabellina*, GLA açısından zengin THY'nin en güçlü üreticileri olarak seçilmiştir (Kavadia vd. 2001). Başka bir çalışmada Papanikolaou vd. (2004b), *M. isabellina*'yı karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı ve yüksek C/N (> 100) oranına sahip besi ortamında geliştirmişler ve uzun bir fermantasyon süresinden (250 saat) sonra %50 lipid içeren 35.9 g/L biyokütle üretmişlerdir. Ancak üretilen yağın GLA içeriği %4'ün altında bulunmuş, dolayısıyla GLA üretiminin 801 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada, *C. echinulata*'nın çok yüksek C/N oranına (183) sahip bir glikoz besi ortamında geliştirilmesi sonucu *M. isabellina*'ya kıyasla daha az miktarda biyokütle (5.5 g/L) elde edilmiş, ancak *C. echinulata*'nın biyokütlesindeki lipid içeriğinin az çok *M. isabellina* ile aynı (%47) olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *C. echinulata* THY'nin

GLA içeriği %14 olarak bulunmuş dolayısıyla 720 mg/L GLA üretildiği saptanmıştır (Gema vd. 2002). Gerçekleştirilen bir başka çalışmada *Mortierella*'nın başka bir türü olan *M. alpina*, yarı kesikli fermantasyon sisteminde, araşidonik asit açısından zengin THY üretmek için kullanılmıştır. İlginç şekilde yarı-kesikli sistemde, NH_4OH (amonyum sülfat)'ın azot kaynağı olarak kullanımı ve pH kontrolü, biyokütle ve lipit üretimini teşvik etmiş ve oldukça yüksek bir araşidonik asit verimi (18.8 g/L) elde edilmiştir (Hwang vd. 2005). Mayalarla yapılan bir başka araştırmada ise, yarı-kesikli 15-litre biyoreaktörde, *Rhodospiridium toruloides*'in üretilmesi sonucu %67.5 (w/w) lipit içeren, çok yüksek miktarlarda (106.5 g/L) biyokütle verimi sağlamıştır. THY'nin elde edilmesi biyodizel üretiminde kullanılmaya yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. (Li vd. 2007). Genel olarak, glikoz muhtemelen THY üretiminde en uygun substrattır ve yağlı mikroorganizmaların performansının değerlendirilmesi için en uygun seçenektir (Fakas vd. 2009a).

THY üretiminde kullanılan diğer basit şekerler, früktoz, galaktoz ve ksilozdur. Ancak bu şekerler THY üretimi için nadiren kullanılmıştır. Hansson ve Dostalek (1988) *Mortierella ramanniana* ile SCO üretimi için çeşitli şekerleri substrat olarak kullanmış ve früktozun glikozdan kısmen daha iyi sonuç verdiğini tespit etmiştir. Ancak daha sonra, Dyal vd. (2005) *M. ramanniana*'nın başka bir suşunu kullanmışlar ve früktozdaki lipit veriminin glikozdaki lipit veriminden daha düşük olduğunu bildirmişlerdi. Bir diğer değerlendirme çalışması da *Candida curvata* mayasını kullanan Evans ve Ratledge (1983a) tarafından yapılmış ve lipit birikiminin neredeyse %50 (w/w) olması ksilozun bu maya için çok verimli bir substrat olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra, *M. ramanniana*'nın ksilozda geliştirilmesi sonucu glikoza göre çok daha az miktarda biyokütle ve THY verimi sağladığı tespit edilmiştir (Hansson ve Dostalek 1988). Bir başka araştırmada *C. echinulata* ve *M. isabellina* glikoz ve ksilozda geliştirilmiştir ve biyokütlelerinde %60 civarında lipit birikimi gerçekleşmiştir (Fakas vd. 2009b). Ksiloz örneği, her şekerin etkinliğinin büyük ölçüde kullanılan mikroorganizmaya ve kullanılan kültür koşullarına bağlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, lipit birikimi için uygun şeker substratlarının belirlenmesi, az ya da çok bir deneme yanılma yaklaşımına dayalı gibi görünmektedir (Fakas vd. 2009a).

Kompleks şekerler de THY üretiminde kullanılmış, ancak bu şekerlerin kullanımı oldukça sınırlı olmuştur. Yağ üreten mikroorganizmalar bu kompleks şekerleri hidrolize etmeye ihtiyaç duyar ve daha sonra ortaya çıkan mono- veya -di-sakkaritleri kullanır. Hidrolize olma hızı, şekerin substrat olarak kullanıma uygunluğunu büyük ölçüde belirler. Yani yüksek hidrolize olma hızı, hız kesmeden karbon kullanımının ilerlemesini sağlar. Bunun yanı sıra, düşük hidrolize olma hızı karbon kısıtlanmasına ve böylece lipit birikiminin azalmasına neden olabilir. Lipit üretimi için kullanılan kompleks şekerler arasında en yaygınları laktoz, maltoz, nişasta ve pektindir (Fakas vd. 2009a).

Laktoz, peynir üretiminin sıfır maliyetli yan ürünü olan peyniraltı suyunun başlıca şekeridir ve buna bağlı olarak THY üretiminde yüksek bir ilgiye sahiptir. Bununla birlikte, laktoz doğrudan kullanılamamakta ve glikoz ve galaktoza hidrolize edilebilmek için galaktosidaza gereksinim duyulmaktadır (Papanikolaou vd. 2007). Literatüre bakıldığında, laktozdan THY üretimi ile ilgili çalışmalar laktozun yetersiz bir substrat olduğunu bildirir de, bazı yağ üretebilen küflerin laktozu etkin bir şekilde lipite dönüştürebildikleri bilinmektedir. Örneğin, *M. isabellina* laktozda geliştirildiği zaman 9.5 g/L biyokütle ve 3.5 g/L THY üretimi gerçekleştirmiştir (Papanikolaou vd. 2007). Demir ve Gündeş (2020) *M. isabellina* ile yaptıkları çalışmada, laktoz içeren besi

ortamında %13.64 ($Y_{L/S}$) verimle, 3.96 g/L mikrobiyal yağ üretimi gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Yeteri kadar yüksek olmamasına karşın, yine de bu verimler laktozun THY üretiminde kullanılabileceğini göstermektedir. Daha önce Sajbidor vd. (1988), birkaç yağlı küfün laktoz üzerinde gelişme ve lipit üretimi yeteneğini değerlendirmişler ve laktozun verimli bir substrat olmadığı sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde yağlı bir küf olan *Mucor ruxii*, önemli miktarda lipit biriktirememiş, laktoz içerikli besi ortamında çok zayıf bir şekilde gelişme gösterebilmiştir (Somashekar vd. 2002). Bununla birlikte, mandıralardan izole edilen yağlı mayalar, laktozu THY'na çok verimli bir şekilde dönüştürebilir, *Candida curvata* da bu mayalardan biridir. Gerçekten de, *C. curvata* laktozda geliştirildiğinde yaklaşık %40 (w/w) lipit biriktirir, biyokütle üretimi 10 g/L'den fazladır (Evans and Ratledge 1983). Genel olarak laktozdan THY üretimine ilişkin bilgiler göz önüne alındığında, laktozun lipite dönüşme veriminin genellikle düşük olmasına rağmen, yağlı mikroorganizmalar arasında verimli laktoz kullanıcılarının olduğu görülmektedir (Fakas vd. 2009a).

Nişastanın hidrolizi sırasında açığa çıkan maltoz, THY üretiminde nadiren kullanılmıştır. Maltoz metabolizması laktozdan farklıdır, çünkü maltoz önce hücreye girer ve sonra maltaz tarafından parçalanarak iki glikoz molekülü verir (Novak vd. 2004). Sajbidor vd. (1988)'in yaptıkları ayrıntılı çalışma, yağlı *Zygomycetes*'in maltozu verimli bir şekilde THY'na dönüştürebildiğini, en verimli üreticinin ise *Mucor mucedo* suşu olduğunu göstermiştir. Bu türde, maltozun biyokütleye dönüşüm verimi %27.2 (w/w) iken, üretilen biyokütlenin %22.8 (w/w) lipit içerdiği tespit edilmiştir (Sajbidor vd. 1988). *M. isabellina* DSM 1414 suşunun saf maltoz şekeri kullanılarak hazırlanan besi ortamında geliştirilmesi ile %19.11 verimle ($Y_{L/S}$) 5.44 g/L mikrobiyal yağ elde edildiği, elde edilen bu yağın da %7.5 GLA içerdiği bildirilmiştir (Demir ve Gündeş 2020). Maltozda lipit birikimine ilişkin çalışmaların sınırlı olmasına karşın, elde edilen veriler THY üretimi için iyi bir substrat olduğunu göstermektedir (Fakas vd. 2009a).

Sakaroz, şeker endüstrisinin ana yan ürünü olan melasın başlıca şekeri olduğu için THY üretiminde maltozdan daha sık kullanılmıştır. Sakaroz, invertaz tarafından hücre dışında glikoz ve früktoza hidrolize edilir ve bu şekerler daha sonra metabolize edilmek üzere hücreye taşınır. *Mortierella ramanniana* tarafından THY üretimi için substrat olarak birkaç şekerin karşılaştırmasının yapıldığı bir araştırmada, sakaroz ve laktozun daha az verimli karbon kaynakları olduğu tespit edilmiştir (Hansson and Dostalek 1988). Buna karşılık başka bir çalışmada *M. ramanniana* var. *ramanniana*'nın sakarozu THY'na verimli bir şekilde dönüştürebildiğini ve bu suşun sakarozda geliştirildiğinde %20'den (w/w) fazla lipit biriktirdiği bildirilmiştir (Dyal vd. 2005). Bu çalışma ile uyumlu olarak, Somashekar vd. (2002) iki *Mucor* suşunda lipit birikimini artırmada, sakarozun glikozdan sonra ikinci olduğu sonucuna varmışlardır. Ahmed vd. (2006) ise başka bir *Mucor* suşu kullanarak aynı sonuca ulaşmışlardır. Bir başka çalışmada sakarozun kullanıldığı besi ortamında *Cunninghamella echinulata*'nın geliştirilmesi sonucu, glikoz üzerinde elde edilenlerden biraz daha az miktarda lipit elde edildiği saptanmıştır (Chen ve Chang 1996). Bununla birlikte Evans ve Ratledge (1983a) tarafından yapılan ayrıntılı araştırma, sakarozun lipite dönüşüm veriminin glikozunkinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu veriler birlikte ele alındığında, THY üretimi için sakarozun yüksek verimli bir substrat olduğu görülmektedir (Fakas vd. 2009a).

Suda çözünabilir formdaki nişasta, THY üretiminde oldukça sık kullanılmıştır. Nişastanın hidrolizi amilazlar tarafından gerçekleştirilmesi sonucu maltoz ve dekstrin

karışımına hidrolize olmaktadır (Fakas vd. 2009a). Sajbidor vd. (1988), çalışmalarında kullanılan *Mortierella ramanniana* ve *Rhizopus arrhizus* suşları için çözünür nişastanın mükemmel bir karbon kaynağı olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bu iki suşun biyokütlesindeki lipit içeriğinin, %16'yı (w/w) aşmadığı tespit edilmiştir. Somashekar vd. (2002) ve Ahmed vd. (2006) tarafından kullanılan *Mucor* türlerinin, biyokütlelerinde %20 (w/w) lipit biriktirdikleri için *M. ramanniana* ve *R. arrhizus* türlerinden daha iyi performans gösterdikleri gözlenmiştir. Ancak *Cunninghamella echinulata*'nın nişasta kullanılarak geliştirilmesi ile lipit birikiminin %25'e (w/w) ulaştığı ve bu verimin hem glikoz hem de sakaroz üzerinde elde edilen verimlerden çok daha iyi olduğu saptanmıştır (Chen ve Chang 1996). Bu sonuçlar, *C. echinulata* ve *Mortierella isabellina*'nın nişasta üzerinde çok iyi gelişebildiğini ve ikinci suşun biyokütlesinde %35'ten fazla lipit biriktirebildiğini gösteren Papanikolaou vd. (2007) çalışmasıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Nişastanın substrat olarak kullanımında lipit birikimi oldukça verimli olabilir, ancak nişastanın lipite dönüşüm verimi mikroorganizmalar arasında farklılık göstermektedir (Fakas vd. 2009a).

Pektinin THY üretimi için substrat olarak kullanımına dair çalışmalar sınırlıdır. Pektin mikroorganizmalar tarafından kullanılmadan önce pektinolitik enzimler tarafından hidrolize edilerek, kullanılabilir galakturonik asidin serbest bırakılması gerekmektedir. Papanikolaou vd. (2007)'nin karşılaştırmalı çalışması, pektinin lipite dönüşüm etkinliğinin muhtemelen suşa bağlı olduğunu göstermiştir. Gerçekten de *M. isabellina*'nın, pektin içeren besi ortamında geliştirilerek önemli miktarlarda biyokütle ve lipit ürettiği ve biyokütledeki lipit içeriğinin %24 (w/w) olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan, *C. echinulata*, *M. isabellina*'nın ürettiği biyokütle miktarının yarısını üretirken biyokütlesindeki lipit içeriğinin sadece %10 (w/w) olduğu rapor edilmiştir. Certik vd. (2005), Cd^{+2} iyonlarının varlığında glikoz ve pektin karışımları üzerinde gelişen *Aureobasidium pullulans*'ın lipit birikimini incelemişler ve bu fungusun biyokütlesinde yaklaşık %20 (w/w)'lik bir lipit depoladığını bildirmişlerdir (Fakas vd. 2009a).

2.2.1.2. Endüstri ve tarımsal endüstri atıklarında tek hücre yağ üretimi

Tarımsal endüstriler, THY üretiminde kullanılabilecek çok miktarda atık üretmektedir. Aslında, birçok tarımsal-endüstriyel atık, THY üretimi için sıvı veya katı kültürlerde substrat olarak kullanılmış ve değişken sonuçlar elde edilmiştir. Bu atıkların fermentasyon hammaddesi olarak kullanılmasıyla, endüstriyel proseslerin maliyetlerini önemli ölçüde artıran atık yönetim maliyetlerinin azaltılabileceği düşünülmektedir. Bu yaklaşım, şeker endüstrisinin yan ürünü olan melasta başarıyla uygulanmıştır (Fakas vd. 2009a).

Katı faz fermentasyonu, düşük maliyeti nedeniyle THY üretimi için kullanılmış olsa da nadiren tercih edilmiştir. Fungal biyokütlesini ve kalıntı substratı içeren nihai ürün, biyo-ürün olarak adlandırılmıştır (Emelyanova 1996). Bununla birlikte, bu fermentasyon sistemi saf PUFA'ların üretimi için uygun değildir. Çünkü üretilen THY ile birlikte ekstrakte edilen substrat lipitleri, nihai ürünün PUFA oranını azaltma eğilimindedir. Çeşitli tarımsal-endüstri atıkları, katı faz fermentasyon sistemlerinde ya olduğu gibi ya da bir tür ön işlemden sonra substrat olarak veya yardımcı substrat olarak kullanılmıştır. Bu substratlar, kaynaklarına göre tahıl ve meyve substratları olarak sınıflandırılabilir (Fakas vd. 2009a).

Tahıllar, yaygın olarak bulunabilmeleri nedeniyle katı faz fermantasyonunda THY üretimi için en çok kullanılan substratlar olmuştur. En yaygın kullanılan tahıllar arpa, buğday, darı ve pirinçtir. Tahıllar, nem içeriğini artırmak için fermantasyonda kullanılmadan önce genellikle suya batırılır (Stredanska vd. 1993; Emelyanova 1996). Stredanska vd. (1993) nemlendirilmiş arpa üzerinde *Mortierella alpina* küfünü geliştirerek %15 (w/w) lipit içeren bir biyo-ürün elde etmişler, üretilen lipitin ise araşidonik asit açısından zengin olduğunu saptamışlardır. Islatılmış pirinç üzerinde *Cunninghamella japonica*'nın geliştirilmesi ile yapılan çalışmada, son biyo-ürünün %37 (w/w) lipit içerdiği ve bu lipitin de %7.9 GLA'ya sahip olduğu bildirilmiştir (Emelyanova 1996). Stredansky vd. (2000b), katı faz fermantasyonunda *Pythium ultimum* ile PUFA üretimi için kültür koşullarını optimize etmişler ve bu küfün en iyi; arpa, kullanılmış malt taneleri, keten tohumu yağı, çeşitli mineraller ve maya özü içeren bir karışım üzerinde geliştiğini saptamışlardır. Bu substratta, *P. ultimum*'un ARA ve EPA açısından zengin ve %24 (w/w) lipit içeren bir biyo-ürün ürettiğini bildirilmişlerdir. Başka bir çalışmada *Thamnidium elegans*, GLA açısından zengin lipit üretmek için kavuzlu buğday lapası ve kullanılmış malt posası karışımı üzerinde geliştirilmiş, üretilen kuru biyo-ürünün substrat kg başına 7.2 g GLA içerdiği, ancak bunun, kütledeki lipit içeriğinin sadece %7.2'si (w/w) olduğu bildirilmiştir (Certik vd. 2006). Endofitik (bitki dokularında yaşayan) bir mantar olan *Microsphaeropsis* sp.'nin gelişmesi için buğday kepeği ile karıştırılmış, buğday samanı kullanılarak yeni bir substrat değerlendirme yöntemi denenmiştir. Bu mantarın, optimize edilmiş kültür koşulları altında ve substratın selüloz ile ön muamelesinden sonra, %10 (w/w) lipit içeren biyo-ürün ürettiği bildirilmiştir (Peng and Chen 2008). Yukarıda yer alan literatür bilgileri, yüksek ürün verimi sağlamak için bir tür ön-muamele gerekli görünse de, tahılların katı faz fermantasyonu ile THY üretimi için substrat olarak başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir (Fakas vd. 2009a).

Yüksek besin içeriğine rağmen, katı hal fermantasyonlarında THY üretimi için meyve artıklarının kullanımı sınırlıdır. Genellikle posa olarak adlandırılan meyve artıkları, meyve konservesi ve meyve suyu endüstrilerinde büyük miktarda açığa çıkmaktadır (Fakas vd. 2009a). Yapılan bir çalışmada kullanılmış malt posası ile takviye edilmiş elma posası, *Thamnidium elegans* tarafından GLA açısından zengin THY üretimi için substrat olarak kullanılmıştır. Kurutulmuş fermente kütledeki yağ içeriği %17 (w/w) iken, GLA veriminin kg kuru substrat başına 5.27 g olduğu bildirilmiştir (Stredansky vd. 2000a). Başka bir çalışmada da *Cunninghamella echinulata*'nın homojenize portakal kabuğu kullanılarak elde edilen besi ortamında geliştirilmesi sonucu nihai GLA veriminin, kuru kütlede kg başına 1.5 g olduğu belirtilmiştir. Ayrıca fermente portakal kabuğunun uygun organoleptik özelliklere sahip olduğu ve insan beslenmesi için doğrudan bile kullanılabileceği bildirilmiştir (Gema vd. 2002). Başka bir çalışmada armut posasının *Mortierella isabellina* ile fermantasyonu sonucu %12 (w/w) lipit içeren bir biyo-ürün verdiği saptanmıştır (Fakas vd. 2009c). Katı hal fermantasyonunda meyve posalarının kullanıma dair sınırlı sayıda araştırma, bu substratların belli bir ön işleme tabii tutulduktan sonra ya da ön işlem gerektirmeksizin THY üretimi için kullanılabileceğini göstermektedir (Fakas vd. 2009a).

Sıvı kültür fermantasyonlarına gelindiğinde, melasın derin kültür fermantasyonlarında THY üretimi için başarıyla kullanıldığı görülmektedir. Almazan vd. (1981)'nin yaptıkları çalışmada, melas üzerinde *Rhodotorula glutinis* kırmızı mayasını geliştirmişler ve son ürünün %28 lipit içerdiğini tespit ederek melasın THY üretmek için sürekli fermantasyonda substrat olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bununla

birlikte Misra vd. (1984), melas üzerinde *R. glutinis*'i geliştirerek çok daha yüksek bir lipit verimi (%54 lipit içeriği -w/w-) elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada glikoz, sakaroz ve melas, THY üretimi için kesikli beslemeli bir fermantasyon sisteminde kullanılmış ve elde edilen veriler, melasın diğerlerine göre daha az verimli bir substrat olduğunu göstermiştir (Johnson vd. 1995). Melas çok verimli bir substrat olmasına karşın, yüksek maliyeti büyük ölçekli THY prosesi geliştirilmesine izin vermemektedir. Atıklar, karbon ve enerji kaynağı olmalarının yanı sıra ürün verimini artırmak için de fermantasyonlarda kullanılabilir. Atıkların bu özelliği, substrata soya unu ilavesinin penisilin verimini arttırdığı, penisilin üretimi ile kanıtlanmıştır (Elandar 2003). Bu bağlamda, Fakas vd. (2008a) Cunninghamella echinulata kullanarak çeşitli tarımsal endüstriyel atıkların THY üretimini artırma yeteneğini test etmişler ve domates atığı hidrolizatının lipit birikimini önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır.

PAS, hayvancılığın geliştiği ülkelerde büyük miktarlarda üretilmektedir ve çevreye kontrolsüz bir şekilde atıldığı için de ciddi kirliliğe neden olmaktadır. THY gelişiminin ilk yıllarında, PAS THY üretimi için substrat olarak sıklıkla kullanılmıştır (Moon vd. 1978; Floetenmeyer vd. 1985). Yeni Zelanda gibi ülkelerde peynir altı suyu permeatı bol miktarda bulunmaktadır ve %4.5 ila %5 (w/w) laktoz içerdiğinden, potansiyel bir fermantasyon hammadde olarak kullanılmıştır (Floetenmeyer vd. 1985; Ykema vd. 1988). Melas ve peynir altı suyu kombinasyonu *Candida curvata* ile yağ biyosentezi araştırmalarında kullanılmıştır (Bednarski vd. 1986). THY üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, kaymaklardan izole edilen mayalardır. Çünkü bu mayalar, peynir altı suyunun ana şekeri olan laktozu kullanma yeteneğine sahiptir. Bu mayalar, belirli koşullar altında geliştirildiğinde, kakao yağına benzer bir bileşime sahip THY üretmiştir (Davies vd. 1990). 1980'lerde kakao yağı yüksek bir fiyata sahipti ve o zamanlar PAS'dan kakao yağ ikamesi üretimi ekonomik olarak olumlu görünüyordu. Bu nedenle araştırmacılar, PAS üreten birçok peynir endüstrisinin bulunduğu Zelanda'da PAS'dan kakao yağ ikamesi üretimi için büyük ölçekli bir süreç geliştirmeye çalıştılar (Davies 1988). Ancak doksanların başında, kakao yağı fiyatları önemli ölçüde düştü ve böylece mikrobiyal üretim prosesi ekonomik olmaktan çıktı.

Bir fermantasyon işlemi için hangi substrat kullanılırsa kullanılsın, dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Örneğin, kullanılacak olan substrat her yıl en az on ay ulaşılabilir olmalıdır. Fermantasyon için önerilen birçok olası atık madde mevsimseldir ve nispeten kısa bir süre için mevcuttur. Ayrıca hammadde stoğu depolanabilir olmalı ve mikroflora tarafından hızlı bozunmaya maruz kalmamalıdır (Ratledge 1994).

2.2.2. γ -linolenik asit üretim prosesi

1970'lerin ortalarında GLA'nın bilinen tek kaynağı, minör bir bileşeni olduğu (toplam yağ asitlerinin yaklaşık %9 kadarı) çuha çiçeği (*Oenothera biennis*) bitkisinin yağıydı. Bu yağın da GLA içeriğinden dolayı, multipl skleroz tedavisi de dahil birçok semptomu hafifletmede etkili olduğu düşünülmekteydi. O dönemlerde çuha çiçeği yağına, çoğu emtia bitki tohumu yağı bu fiyatın yüzde birinden daha azını alırken, kg başına 50\$'a yakın bir fiyat biçilmekteydi. Shaw'ın çalışmaları (1965, 1966a, b) Zygomycetes olarak bilinen bir alt fungus grubunda istikrarlı bir şekilde GLA oluşumunu belirlediğinden, ticarî olarak uygun bir THY üretimi beklentileri ortaya çıkmıştı. Pilot ölçekli derin fermantasyon teknolojisi kullanılarak aday mikroorganizmaların daha detaylı incelenmesi ile en uygun olanı belirlenmiş; işlemin ticarileştirilmesi 1985 yılında

üretile ilk yağ ile bu seçimi takip etmiştir (Ratledge 2006). Böylece ilk THY, *Mucor circinelloides* (şu an *Mucor javanicus* olarak bilinmekte) kullanılarak üretilmiştir. Birleşik Krallık'ın North Yorkshire bölgesinde yer alan Selby kentinde bulunan ve normalde başka bir fungus *Aspergillus niger*'den sitrik asit üretmek için kullanılan fermantasyon teknolojisindeki donanımları vasıtasıyla 220 m³'lük büyük ölçekli fermentörlerde J.&E. Sturge Ltd. Şirketi tarafından üretildi. Bu yağ, ticârî olarak “Javanicus Yağ” ve başka bir satıcı tarafından da “GLA-Forte” adı altında satılmıştır. Reçetesiz gıda takviyesi pazarına sınırlı bir nüfuz elde etmiştir. Bu süreç, esas olarak şirket sahipliğindeki bir değişiklikten dolayı, aynı zamanda çuha çiçeği yağı fiyatlarının düşmesi ve hodan yağının daha ucuz bir alternatif GLA kaynağı olarak ortaya çıkması nedeniyle 1990'da kapanmıştır. Bu zamana kadar yaklaşık 25-30 ton THY üretilmiştir. Herbir fermentör çalıştığında, yaklaşık 2 ila 2.5 ton yağın elde edilebildiği yaklaşık 10 ton biyokütle üretilmiştir (Ratledge 2006).

THY-GLA her bakımdan çuha çiçeği yağından daha üstün olmasına rağmen – (daha yüksek GLA içeriğine sahip olma, oksidasyona karşı daha yüksek stabilite, linoleik asit gibi yüksek düzeyde rekabet eden yağ asitlerinin yokluğu ve çok daha düşük miktarda herbisit, böcek ilacı ve pestisit kalıntıları içermeyen) çuha çiçeği yağının tercih eden bir halka THY'nın satılmasının zor olduğu bildirilmekteydi. Çuha çiçeği yağından daha üstün olmasına ve pazarlama tanıtımları sırasında mikrobiyal kökenlerinden bahsetmekten dikkatle kaçınılarak “Javanicus Yağı” olarak adlandırılmasına karşın halk tarafından kabul görmemiştir (Cohen ve Ratledge 2010).

Bu ilk THY üretimi, üreticiler için makul bir kâr getirmese de yine de THY'nın gelişiminde önemli bir kilometre taşı olmuştur. Ortaya çıkışı, diğer ülkelerdeki diğer şirketleri, sıvı ve katı yağ kaynakları olarak mikroorganizmaları kullanma olanaklarını keşfetmeye teşvik etmiştir. İngiltere'deki THY-GLA sürecine benzer bir proses Idemitsu Kosan Şirketi (Tokyo, Japonya) tarafından, üretim organizmaları olarak *Mortierella isabellina* ve *M. rammaniana* kullanılarak geliştirilmiştir (Nakahara vd. 1992). Bununla birlikte, üretilen yağlar *Mucor circinelloides* tarafından üretilen yağdan çok daha düşük bir GLA içeriğine sahipti, ancak her fungus *Mucor* hücrelerinin yağ içeriğinin yaklaşık iki katı kadar yağ içermekteydi. Bu yağların Japon iç pazarına satışı 1988'de başlamış, ancak kısa bir süre sonra durmuştur (Cohen ve Ratledge 2010).

Fungal GLA biyosentezini ticarileştirmeye yönelik başka bir girişim Slovakya'da geliştirilmiştir ve 30 mg GLA/g'a kadar misel oluşturan *Mucor mucedo* ve *Cunninghamella echinulata* suşları, potansiyel GLA üreticileri olarak kabul edilmiştir (Certik vd. 1993). Daha sonra dikkatler yağın izolasyonu, saflaştırılması ve insan ve hayvan için besin takviyesi olarak kullanılmasına odaklanmıştır. Mikrobiyal GLA biyosentezini endüstrileştirme çabaları, maksimum GLA üretimi için bir fungal modeli oluşturan ve bunu büyük ölçekli fermantasyonlara uygulayan Kennedy vd. (1993) tarafından da gerçekleştirilmiştir. Maliyeti azaltmak için, monokarboksilik asitler (petrokimyasal proseslerden atık madde olarak ortaya çıkan) ve mantarlarda GLA oluşumu arasındaki ilişki Güney Afrika'da incelenmiştir (Botha vd. 1997). İmmobilize edilmiş *Mucor ambiguus* kullanımına dayanan başka bir denemede, iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin mevcudiyetinin GLA üretkenliğini arttırdığı, GLA içeren lipitin hücre duvarı yüzeyinde bulunduğu ve sıvı kültür besi ortamına da salındığı tespit edilmiştir (Fukuda ve Morikawa 1987). Mikrobiyal GLA-yağlarının fiyatını düşürmek amacıyla, diğer faydalı metabolit(ler)le birlikte eş zamanlı üretimi, alternatif bir fungal

fermantasyon yöntemi olarak önerilmiştir. Örneğin, *Mucor circinelloides*'in önemli miktarlarda hem GLA hem de kakao yağı muadili (ikamesi) ürettiği bulunmuştur (Roux vd. 1994).

2.3. Tek Hücre Yağı Biyosentezi

2.3.1. Yağ asidi biyosentezi

Yağ asitleri tüm lipidlerin yapı taşıdır ve esas olarak trikarboksilik asit (TCA) döngüsünden üretilen asetil-CoA'dan sentezlenir. Sitrat, mitokondriden sitoplazmaya asetil-CoA'nın taşıyıcısıdır; burada asetil-CoA, asetil-CoA karboksilaz (ACC) tarafından karboksillenir ve geri dönüşü olmayan bir reaksiyonla malonil-CoA'ya dönüştürülür. Asetil- ve malonil-CoA daha sonra asetil- ve malonil-ACP verecek şekilde bir açıltaşıyıcı proteine (ACP) aktarılır. Ardından, yağ asidi sentetaz (FAS) kompleksi, on altı karbon atomlu bir zincir oluşana kadar malonil-ACP'ye sırayla asetil birimleri ekler. Bu zincir ya palmitik asit olarak ayrılır ya da palmitoil-CoA'yı vermek üzere CoA'ya aktarılır. Palmitoil-CoA genellikle, çoğu hücrede yağ asidi biyosentezinin ana ürünü olan stearoil-CoA'ya doğru uzar. Uzun zincirli açıl-CoA esterlerinin ACC'yi inhibe etmesine karşın, sitrik asit, ACC'nin bir aktivatörüdür. Bu esterler ayrıca ACC'e nispeten daha az derecede de olsa FAS'ı da inhibe eder (Gill ve Ratledge 1973; Fakas vd. 2009a).

2.3.2. Açılglicerol Biyosentezi

Mikrobiyal hücrelerde açılglicerollerin biyosentezi Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Fosfatidat; nötral lipidler, yani triaçılglicerol (TAG) ve diaçılgliceroller (DAG), glikolipitler (mono- ve di-glikozil-DAG) ve fosfolipitler (fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilkolin (PC) vb) olarak adlandırılan başlıca lipid fraksiyonlarının öncüsüdür. Glikolipitler, fosfolipitler ve sfingolipitler polar lipid kapsamındadır. Fosfatidat, CoA'nın yağ esterlerini taşıyan açıltransferazlar tarafından gliserol-3-fosfat ardışık açılasyonu ile üretilir (Fakas vd. 2009a).

Fosfatidat, fosfolipitlerin öncüsü olan sitidin trifosfat-diaçılglicerol (CTP-DAG) açığa çıkarmak üzere sitidin trifosfat (CTP) ile reaksiyona girebilir. Fosfolipitler ökaryotlardaki ana yapısal lipidlerdir ve bu nedenle bu lipidler hücre zarlarında bulunur. Genellikle fosfolipitler minör lipid bileşenidir (Latge ve De Bievre 1980; Tereshina vd. 2005). Funguslarda, ana fosfolipit sınıfları PC ve PE'dir, fosfatidil-inositol (PI) ve fosfatidil-serin (PS) ise daha az miktarlarda bulunur (Aki vd. 1998; Jackson vd. 1998; Fakas vd. 2006).

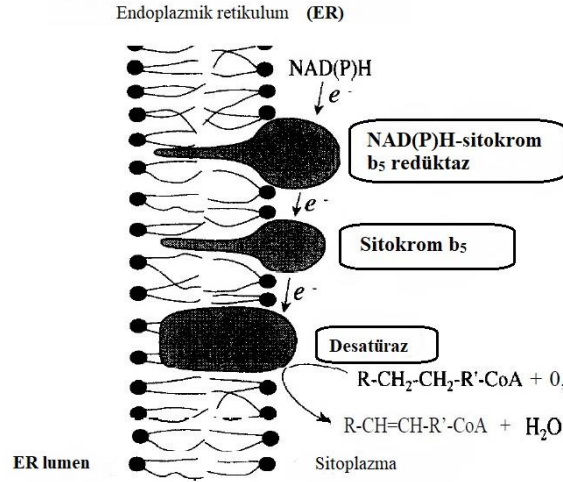
Fosfatidat, daha sonra TAG'a açıllebilen DAG verecek şekilde bir fosfataz tarafından hidrolize edilebilir. Yağlı mikroorganizmalarda TAG başlıca nötr lipid iken, DAG, monoaçılglicerol (MAG) ve bazen de serbest yağ asitleri (Free Fatty Acids-FFA) minör bileşenlerdir (Fakas vd. 2009a). Aslında, yüksek miktarlarda DAG, MAG ve FFA'nın varlığı, ekstraksiyon ve analiz sırasında istenmeyen lipaz etkisinden kaynaklanabilen lipid bozulmasının göstergesidir. TAG, fungus hücrelerindeki başlıca depolama lipididir ve lipid cisimciklerinde bulunur (Wagner ve Daum 2005). TAG'nin yağ asitleri gliserol omurgası üzerinde rastgele dağılmamaktadır; bunun yerine, stereospesifik olarak dağılırlar: doymuş yağ asitleri sn-1 pozisyonunda yer alırken, doymamış muadilleri merkezi (sn-2) pozisyonunda yer almaktadır (De Bell ve Jack 1975).

Birçok mikroorganizmada polar lipidlerin önemli bir kısmını glikolipitler oluşturmaktadır. Glikolipitler, DAG'ın glikozilasyonu ile üretilir ve bunun için genellikle galaktoz kullanılmasına karşın glikoz ve mannoz da kullanılabilmektedir. Kullanılan şeker ne olursa olsun, üridin trifosfat (UTP) tarafından aktive edilmesi gerekir, bu nedenle monoglikosilgliserol vermek üzere DAG ile UDP-şeker ara ürünü reaksiyona girer. DAG, di- ve tri-glikozillenmiş türevler üretmek için aynı veya farklı bir şeker tarafından art arda glikozile edilebilir; dört veya daha fazla şeker içeren glikolipitler mikroorganizmalarda nadiren bulunur. Glikolipitlerin fizyolojik rolü bilinmemektedir, ancak PUFA'ların biyosentezinde (fosfolipitlere benzer bir rol oynar) yer aldığı düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar bunların işlevlerinin depolama lipidleri olduğunu varsaymaktadır. Bu belirsizliğin nedeni, muhtemelen analizlerindeki zorluklar nedeniyle, mikrobiyal lipidler üzerine yapılan çoğu çalışmada glikolipitlerin gözden kaçırılmış olmasıdır (Fakas vd. 2009a).

2.3.3. Çoklu doymamış yağ asitlerinin biyosentezi

Mikrobiyal PUFA üretiminin etkinliğinin geliştirilmesi için, hücre içinde biyosentezlerinin gerçekleştiği mekanizmaların bilinmesi gerekmektedir. Bu mekanizmalar ana yönleriyle bilinmesine rağmen hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır. Bu biyosentetik sürece dâhil olabilecek birkaç farklı yol vardır. Bunlar; (i) glikozdan yağ asitlerinin yeni baştan sentezlenmesi; (ii) ekzojen yağ asitlerinin doğrudan lipid yapılarına dâhil edilmesi ve (iii) lipid kaynaklarının desatürasyonu ve uzatılmasıdır. Ayrıca yağ asidi biyohidrojenasyonu (doyurma) ve kısmi veya toplam bozunma (oksidasyon) da bu sürece katkıda bulunur (Certik ve Shimizu 1998).

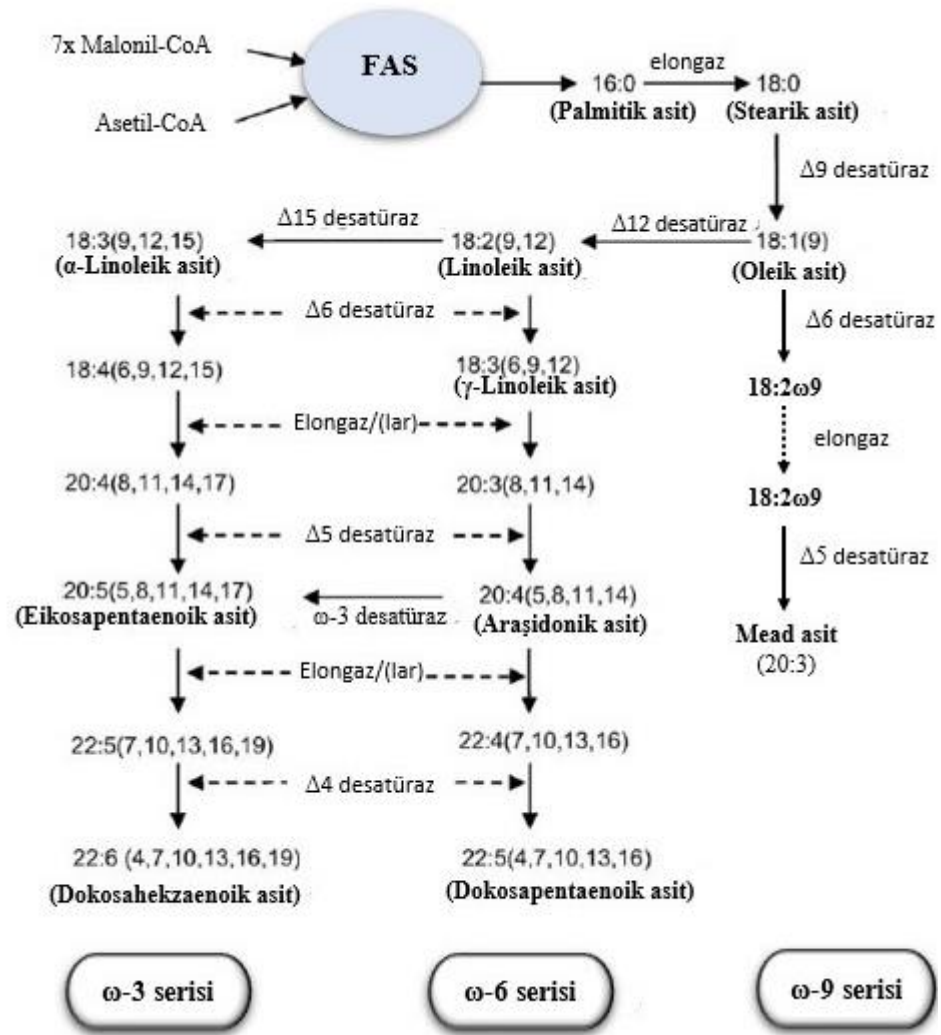
Doymamış yağ asitleri, aerobik veya anaerobik mekanizma ile sentezlenir. PUFA sentezi membrana bağlı enzimlerle ilişkilidir ve aerobik yolun desatürasyon sistemi NAD(P)H-sitokrom b₅ redüktaz, sitokrom b₅ ve terminal siyanüre duyarlı desatüراز olmak üzere üç proteinden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Üç tip desatüراز vardır: açıl-CoA desatüراز, açıl-ACP desatüراز ve açıl-lipit desatüراز. Genel olarak, stearoyl-CoA veya stearoyl-ACP, sırasıyla oleoyl-CoA veya oleoyl-ACP oluşturmak için ilk çift bağ girişinin substratıdır. Daha sonraki desatürasyon, tiyol CoA esterlerinden ziyade daha doymamış durumda olan fosfolipitlerin (özellikle fosfatidilkolin) yağ asitlerine bağlandığı endoplazmik retikulumda gerçekleşir (Kates vd. 1984; Jackson vd. 1998). Bununla birlikte, bu baskın desatürasyon yolunun yanı sıra, endoplazmik retikulumda yağlı açıl-CoA'nın karşılık gelen PUFA'ya doğrudan dönüşümü de bulunmaktadır (Kates vd. 1984).



Şekil 2.1. Mikroorganizmalarda doymamış yağ asitlerinin aerobik desatürasyon ile oluşumu (Certik ve Shimizu 1999).

PUFA'lar, palmitik (C16) ve stearik (C18) asitten sekizinci ve dokuzuncu karbon atomları arasına bir çift bağın eklenmesiyle, sırasıyla palmitoleik (C16, Δ^9) ve oleik (C18, Δ^9) aside dönüştürülerek sentezlenir (Ratledge ve Wynn 2002). Ökaryotik hücrelerde ve bazı bakterilerde baskın olan aerobik metabolik yoldaki ilk çift bağ her zaman doymuş yağ asitlerinin Δ^9 pozisyonuna dâhil edilir. Bu nedenle palmitoleik ve oleik asit mikroorganizmalarda en yaygın monoenlerdir. Oleik asit daha sonra, genellikle sonraki safhalarda Δ^{15} desatüraz tarafından ALA'e dönüştürülebilen linoleik asiti elde etmek için, Δ^{12} desatüraz tarafından desatüre edilir. Bu nedenle, bu üç yağ asidi ω -3, ω -6 ve ω -9 yağ asidi oluşum basamaklarının temel öncüleridir. PUFA üretimi için sonraki adımlar, uygun yağ asidi öncülerinin Δ^6 desatüraz tarafından desatürasyonu sonrası ardışık zincir uzatmalarını takip eden desaturasyonlarla C₂₀ ve C₂₂ PUFA'larının sırasıyla elde edilmesidir. PUFA'nın ω -9 ailesi, oleik asitten Δ^6 desatürazın ardışık olarak katılımı ile sentezlenir ve elongaz ve Δ^5 desatüraz ile de son olarak mead asit (Eikosatrienoik asit, 20: 3 (n-9)) üretilir. ω -6 yağ asitleri genellikle linoleik asitten, desatürasyon (Δ^6 , Δ^5 , Δ^4) ve linoleik asitten GLA'ya, oradan ARA'e ve adrenik asitten DPA (Dekosapentaenoik asit)'ya kadar ulaşan uzama basamakları yoluyla oluşturulur (Certik vd. 1998). Sıcaklıktan bağımsız olan birinci yolda ALA, ω -3 metabolik yoluyla EPA, DPA- ω 3 ve DHA'ya metabolize edilir. Sıcaklığa bağlı olan ikinci yolda ise ω -6 yağ asitleri Δ^{15} ve Δ^{17} desatürazlar (ω 3 desatürazlar), tarafından katalizlenmesiyle kendilerine karşılık gelen ω -3 PUFA'lerine dönüştürülmektedir (Certik ve Shimizu 1999).

Bununla birlikte, *M. ramanniana*'nın *in vivo* ve *in vitro* sistemleri arasında PUFA oluşumunda farklılıklar gözlemlenmiştir (Certik vd. 1996). Suşun sağlam hücreleri sırayla oleik ve linoleik asitleri GLA'ya desatüre ederken, serbest zara bağlı enzimlerin hidroksillenmiş yağ asitlerini oluşturduğu bildirilmiştir. Membran desatürazların hidroksilazlarla birçok yüzeysel benzerliği olmasına ve belirli desatürasyonların iki aşamada gerçekleşebilmesine rağmen, bu iki yol arasındaki ilişkiye daha fazla ışık tutmak için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. (Certik ve Shimizu 1999).



Şekil 2.2. Mikroorganizmalarda PUFA oluşum metabolik yolu (Ratledge 2004; Certik ve Shimizu 1999).

2.4.Yağ Üreten Mikroorganizmalarda Lipit Birikimi

Mikroorganizmaların yağ asitlerini nasıl sentezlediklerini ve bu kadar çok yağı nasıl biriktirebildiklerini anlamak THY üretim proseslerini geliştirebilmek için önemlidir. Bazı mikroorganizmaların yağ içeriği, biyokütlenin %70'ini geçebilmektedir. Ayrıca, biriken yağ neredeyse her zaman, bitkisel yağlarda oluşan formla tamamen aynı olan triaçilgliserol formundadır. Bu bilgilerden yola çıkarak, yağ asidi sentezine ve birikimine katkıda bulunan anahtar enzimleri kodlayan genler belirlenerek, mikroorganizmaların lipit seviyelerini ve/veya lipit içindeki önemli PUFA'ların içeriğini arttırmak mümkün olabilecektir (Ratledge 2004).

Tüm canlı organizmalar, zarları ve diğer yapısal ve işlevsel rolleri için asgari miktarda lipit sentezlemek zorunda olmalarına rağmen, yalnızca nispeten az sayıdaki mikroorganizma biyokütlesinin %20'sinin üzerinde lipit biriktirebilmektedir. Bakteriler genel olarak triaçilgliserol üretmezler, bunun yerine depolama polimerleri olarak poli-β-hidroksi-butiratlar ve -alkanaotlar üretmektedir. Bu nedenle yağ birikimi, yalnızca bazı

mayalar ve funguslarla birlikte daha az sayıdaki alglerde bulunur. Bunlara yağlı türler denir (Ratledge 2004).

Yağlı mikroorganizmalarda lipit birikiminin kültür ortamındaki bir besin dengesizliği tarafından tetiklendiği uzun zamandır bilinmektedir. Bir mikroorganizmada lipit birikimini sağlamak için, fazla karbon substratı ve sınırlı miktarda azot içeren bir ortamda geliştirilmesi gerekir (diğer besinler de sınırlayıcı olsa da bu bağlamda kullanılan sınırlayıcı genel olarak azottur). Bu nedenle organizma gelişirken azot kaynağını hızla tüketir, ancak karbon kaynağını (genellikle glikoz veya alternatif bir karbonhidrat) kullanmaya devam eder. Hücreler temel bir besin maddesini (genellikle azotu) tükettiğinde fazla karbon substratı hücreler tarafından özümsemeye ve depolama yağına dönüştürülmeye devam eder ve sonuçta hücre içinde yağ damlacıkları şeklinde triaçilgliseroller oluşur. Her yağlı türde olmasa da yağ birikimi, hücre biyokütlesinin %70'inden fazlasına ulaşabilmektedir. Yağ üreticisi olmayan mikroorganizmalar, lipit biriktirmez. Yağ üreticisi olmayan mikroorganizmalar, aynı şekilde azotun sınırlandırıldığı büyüme ortamında geliştirildiğinde ya daha fazla hücre çoğalmasını durdurma eğilimine girer ya da mevcut karbonhidrat substratını özümsemeye devam ederek çeşitli glukanlar, mannanlar ve glikojen dahil çeşitli polisakkaritlere dönüştürür. Çok küçük bir seviyenin ötesinde (genellikle biyokütlenin %10'undan az) yağ birikimi gerçekleşmez (Ratledge ve Wynn 2002; Ratledge 2004). Bir mikroorganizmanın yağ biriktirebilmesinin iki temel nedeni vardır:

- Yağ asidi sentetaz üretmek için gerekli bir prekürsor olan asetil-CoA'nın hücrenin stozolünde doğrudan ve sürekli üretiminin sağlanabilmesi,
- Yağ asidi biyosentezinde kullanılan temel indirgeyici olarak NADPH'nin yeterli üretiminin sağlanabilmesi yeteneği (Ratledge 2004).

ATP, ADP ve AMP'nin genel hücrel konsantrasyonlarının bulunduğu "enerji yükü" kavramı, hücrenin metabolik durumu için sayısal bir değer vermek üzere hesaplanmıştır. Bu enerji yükünü hesaplamak için hücredeki adenin nükleotitlerinin hücre içi konsantrasyonu ölçülmüş ve hesaplanan enerji yükü değerleri karşılaştırma yapılan iki maya arasında farklı olduğu tespit edilmiştir. Mayalar arasındaki en belirgin farkın, yağlı türde AMP içeriğinin N-sınırlı büyüme koşulları altında, C-sınırlı koşullar altındaki değerinin %5'inden daha azına düşmesi olduğu bildirilmiştir. Yağsız maya *C. utilis*' de ise AMP konsantrasyonundaki düşüşün çok az olduğu bildirilmiştir. (Botham ve Ratledge 1979; Ratledge ve Wynn 2002). Kısaca, yağlı mayalarda lipit birikim evresinde hücre içi AMP konsantrasyonunda büyük değişimler olduğu gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler daha sonra Boulton ve Ratledge (1983) tarafından, yağlı mayaların kemostat kültürleri kullanılarak, C-sınırlı gelişme ortamından (ortamda fazla N varlığı ile) N-sınırlı gelişme ortamına (ortamda fazla C varlığı ile) geçiş yapıldığı çalışma ile doğrulanmıştır. Hücrelerdeki AMP konsantrasyonunun, hücreler azot kaynağını tüketir tüketmez aniden düştüğü bildirilmiştir. Bu değişikliğin aslında lipit birikiminin fiili başlangıcından önce geldiği, N-sınırlamasının yağlı mikroorganizmalarda bir dizi biyokimyasal olayı başlattığı açıkça belirlenmiştir (Ratledge ve Wynn 2002). Aslında, azotun tükenmesiyle hücre içi AMP konsantrasyonunda hızlı bir azalmanın meydana gelmesinin sebebi, mikroorganizmanın yaşamını sürdürebilmesi için vazgeçilmez olan NH_4^+ iyonlarını kazanmak için mevcut AMP'yi parçalamasından kaynaklanmaktadır. (Athenaki vd. 2018)

AMP konsantrasyonundaki keskin düşüşe ADP veya ATP artışı eşlik etmemiş ve AMP deaminaz, bu değişikliğe neden olan enzim olarak tanımlanmıştır (Evans ve Ratledge 1985):



(Burada IMP, inosin monofosfattır.) AMP deaminazın yağlı mayadaki aktivitesi, ortamdaki mevcut azot hücreler tarafından tüketilir tüketilmez keskin bir artış göstermektedir. Bu durumun, ortamdaki azotun tükenmesinin başlangıcında NH_4^+ veya bazı anahtar amino asitlerin hücre içi konsantrasyonundaki değişikliğinin sonucu olarak enzimin transkripsiyon sonrası modifikasyonunu içeriyor olabileceği bildirilmiştir (Ratledge ve Wynn 2002). AMP deaminaz aktivitesinde benzer şekildeki keskin artış, *Mucor circinelloides*'te besi ortamında azotun tükendiği noktada ve lipit birikiminin başlangıcında kaydedilmiştir (Wynn vd. 2001).

Azot sınırlamasının başlangıcında, AMP konsantrasyonundaki hızlı azalmanın, yağlı maya içindeki izositrat dehidrogenazın (ICDH) (NAD^+ 'ya bağımlı) aktivitesini son derece etkilediği tespit edilmiştir (Botham ve Ratledge 1979). Bu enzimin katalizlediği reaksiyon,



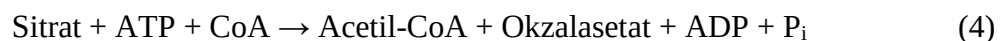
mitokondri içinde gerçekleşir ve yağlı maya ve küflerde etkinliği kesinlikle AMP'ye bağlıdır (Botham ve Ratledge 1979; Evans ve Ratledge 1985; Wynn vd. 2001).

Azot sınırlaması, AMP deaminaz aktivitesinde bir artışa yol açacaktır, bu daha sonra hücrelerde ve mitokondride hakim AMP konsantrasyonunu azaltacak ve bunun sonucunda ICDH aktivitesinde bir düşüş olacaktır. Artık trikarboksilik asit döngüsü yoluyla etkin bir şekilde metabolize edilmeyen izositrat, akonitazın etkisiyle sitrata dengelenir:



Akonitaz'ın hem karbon sınırlı hem de azot sınırlı büyüme koşulları altında eşit derecede aktif olduğu bulunmuştur (Evans ve Ratledge 1983a; Evans vd. 1983a, b).

Mitokondri içi sitrik asit konsantrasyonu kritik bir değere ulaştığında sitrat, malat ile değiştirilerek sitoplazmaya girer. Son olarak, sitrik asit, yağlı mikroorganizmalarda lipit birikim sürecinin enzim anahtarı olan ATP-sitrat liyaz (ACL) tarafından parçalanarak asetil-CoA ve oksaloasetat elde edilir. Bu nedenle sitrik asit, FA sentezinin meydana geldiği hücrenin sitozolünde hazır hale getirilmelidir. Yağlı mikroorganizmalara özgü olan ve sitrik asit birikimine izin veren özellik, TCA döngüsünün bir bileşeni olarak izositrat dehidrojenazın aktivitesinin AMP'nin varlığına bağlı olmasıdır; yağsız mikroorganizmalardaki enzim de böyle bir bağımlılık yoktur (Fakas vd. 2009a; Papanikolaou vd. Aggelis 2011a).



ATP-sitrat liyaz üzerine yapılan bir incelemede (Srere 1972), enzimin çoğu hayvan hücre sisteminde yaygın olarak bulunduğu, ancak , örneğin *Saccharomyces cerevisiae* gibi maya hücrelerinde bulunmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte,

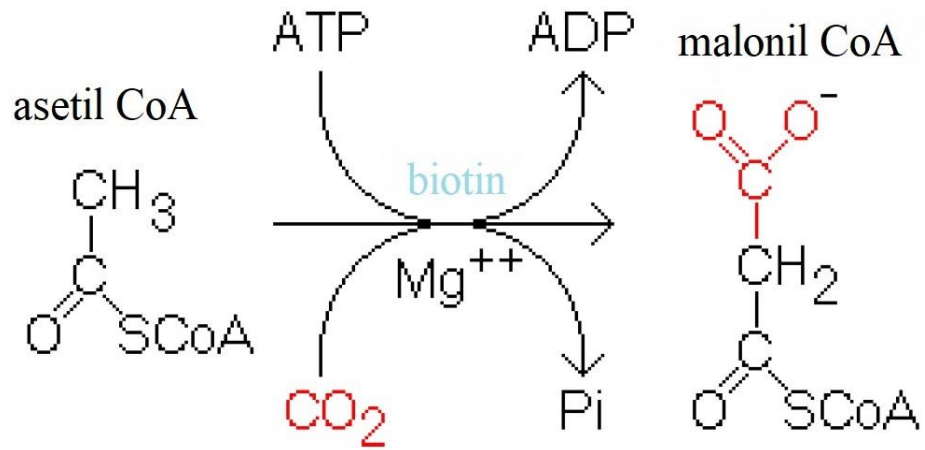
ATP:sitrat liyaz'ın yağlı mayada gerekli olduğu zamanlarda bulunmasına karşın, yağlı olmayan türlerde bulunmaması iki maya türü arasında tanımlanan ilk büyük biyokimyasal farklılıktır. Önemli miktarlarda triaçilgliserol lipidlerinin biriktirilebilmesi için, ATP:sitrat liyazın ökaryotik bir mikrobiyel hücrede bulunması gereken anahtar enzimlerden biri olduğu kanıtlanmıştır. Aynı büyüme koşulları altındaki yağsız mayalar, yağlı olanlara göre üç ilâ dört kat daha düşük intramitokondriyal sitrat seviyesi nedeniyle lipid biriktiremez. Ayrıca yağlı suşlarda, L-malat varlığında sitrat akış hızı, yağsız suşlara kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazladır (Ratledge ve Wynn 2002).

Mayalarda olduğu gibi fungus türlerinde de lipid birikim süreci, AMP deaminaz aktivitesinde hızlı bir artışa neden olan, besi ortamındaki kullanılabilir azotun bitmesiyle başlar. Bu da mitokondri içindeki ICDH aktivitesini etkiler ve kültür ortamlarında üretilen CO₂ çıkışı ile tespit edilebilen TCA döngü aktivitesinde bir düşüşe neden olur. Bununla birlikte lipid birikiminin başlamasının kilit noktasının, AMP konsantrasyonundaki azalmanın neden olduğu ICDH aktivitesinin önemli düzeyde sınırlandırılması olarak kabul edilmiştir (Wynn vd. 2001).

Sonuç olarak, asetil-CoA oluşumuna yol açan olaylar dizisi şu şekilde tarif edilmektedir:

- Azot tükenmesinin başlangıcında, yağlı hücreler N sınırlamasından önceki hücrelere göre beş kat daha fazla AMP deaminaz aktivitesi gösterir;
- AMP deaminazın artan aktivitesi, mitokondrideki içeriği de dahil olmak üzere hücrelerin AMP içeriğini azaltır;
- AMP'nin mitokondride indirgenmesi, izositrat dehidrogenazın işlevini değiştirir. Bu enzimin aktivitesi kesinlikle AMP'ye bağımlıdır;
- Sonuç olarak izositrat metabolize edilemez; bu nedenle birikir ve daha sonra sitrik asitle (akonitaz yoluyla) kolayca dengelenir;
- Sitrat mitokondride birikir;
- Sitratın mitokondriden dışarı çıkması için (malat karşılığında) mitokondriyal zarda etkili bir sitrat akış sistemi mevcuttur;
- Sitrat sitozole girer ve asetil-CoA ve oksaloasetatı vermek üzere ACL tarafından bölünür;
- Asetil-CoA, FA biyosentezi için kullanılır;
- Oksaloasetat, malat dehidrogenaz yoluyla malata dönüştürülür ve bu daha sonra sitrat akış sisteminde karşı iyon olarak kullanılır (Fakas vd. 2009a; Papanikolaou ve Aggelis 2011a).

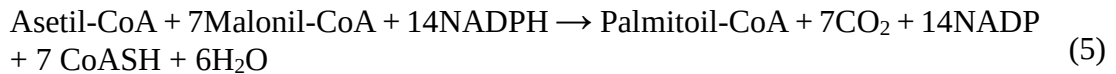
Sentezlenen asetil-CoA, asil-CoA esterlerinin ve ardından TAG'lerin biyosentezi için malonil-CoA substratını sağlamak üzere asetil-CoA karboksilaz (ACC) tarafından karboksillenir (Ratledge ve Wynn 2002; Beopoulos vd. 2009; Papanikolaou ve Aggelis 2011a). Asetil-CoA oluşumundan sonra FA biyosentezinin ilk reaksiyonu, biyotine bağımlı bir ACC tarafından katalize edilir (Ratledge 1988). Asetil-CoA, geri dönüşü olmayan bir reaksiyonda malonil-CoA verecek şekilde ACC tarafından karboksillenir (Şekil 2.3).



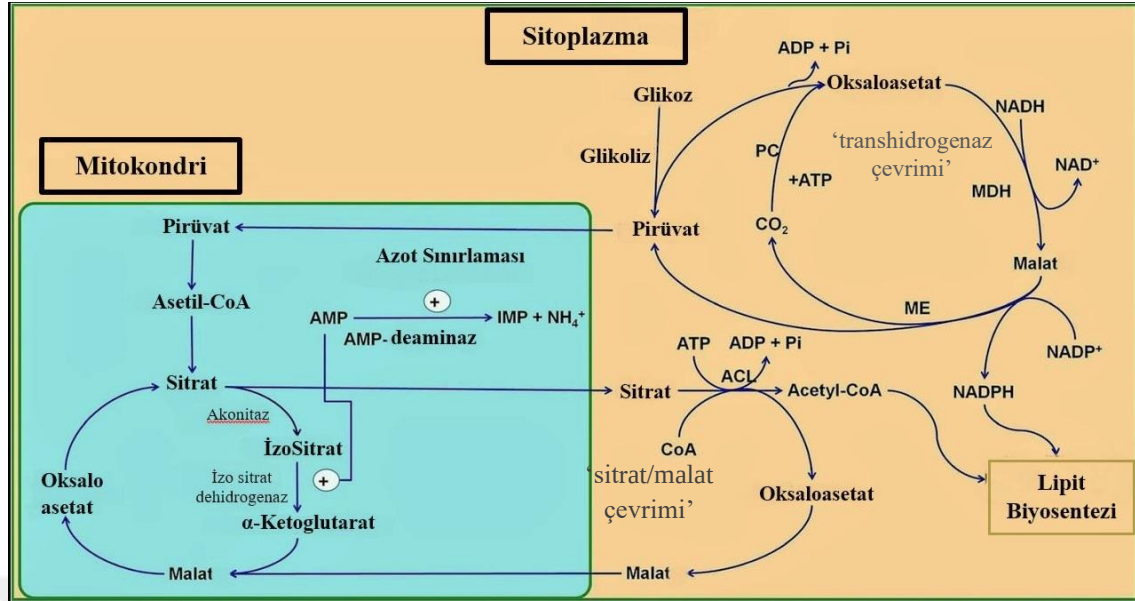
Şekil 2.3. Asetil CoA'nın malonil CoA'ya dönüştürülme reaksiyonu (Athenaki vd. 2018)

Bu reaksiyon, FA biyosentezi için kısıtlayıcı adım olarak kabul edilir. Asetil- ve malonil-CoA daha sonra asetil- ve malonil-ACP verecek şekilde bir açıl taşıyıcı proteine (ACP) aktarılır. Daha sonra yağ asidi sentetaz (FAS), 16 karbon atomlu bir alifatik zincir oluşana kadar malonil-ACP'ye sırayla asetil birimleri ekler. Bu zincir ya palmitik aside bölünür ya da palmitoil-CoA'yı vermek üzere CoA'ya aktarılır (Athenaki vd. 2018).

FAS ve ATP-CL'nin multienzimatik kompleksleri, ortam içinde bulunan ekzojen uzun alifatik zincirlerin (örneğin FA'lar, -alkanlar, vb.) varlığı ile inhibe edilir (Meyer ve Schweizer 1976). Bununla birlikte yeni araştırmalar, ortamda FA'larının varlığında asetil-CoA'dan bir miktar *de novo* lipid üretiminin yapılabileceğini göstermektedir (Aoki vd. 2002; Papanikolaou vd. 2002a, 2002b; Papanikolaou vd. 2003; Papanikolaou vd. 2006). Palmitoil-CoA sentezinin reaksiyon serileri reaksiyon 5'te özetlenmiştir (Papanikolaou ve Aggelis 2011a):



Hücre içi alifatik zincirlerin kökeni ne olursa olsun, yağ-CoA esterlerinin biyosentezinden sonra, depo lipidlerin TAG'ler şeklinde stoklanması için gliserol ile bir esterifikasyon gerçekleşir. Bu sentez esas olarak α -gliserol fosfat açılasyon metabolik yolu ile gerçekleştirilir (Papanikolaou ve Aggelis 2011a). Bu metabolik yolda, serbest yağ asitleri koenzim A'ya aktive edilir ve daha sonra TAG'leri sentezlemek için gliserol omurgasının açılasyonu için kullanılır.



Şekil 2.4. Yağlı funguslarda lipit sentezinin metabolik yolu (MDH: Malat dehidrogenaz; ME: Malik enzim; PC: Pirüvat karboksilaz) (Subhash ve Mohan 2015).

2.5. Mikrobiyal Biyokütle, Yağ ve Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Üretimini Etkileyen Faktörler

Mikroorganizmaların büyümesini ve hayatta kalmasını, besinlerin (substrat) varlığı ve sıcaklık, basınç, pH, tuzluluk ve oksijen mevcudiyeti gibi çeşitli çevresel koşullar etkilemektedir (Madigan vd. 1997). Ayrıca yağ asidi profili de büyüme koşullarına göre değişim göstermektedir (Sakarika ve Karnaros 2016).

Sıcaklık mikroorganizmaların gelişimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Genel olarak, enzimatik aktivitelerin reaksiyon hızı sıcaklık arttıkça artar, öyle ki mikroorganizmalar yüksek sıcaklıkta daha hızlı büyür. Bununla birlikte, mikroorganizmaların gelişimleri için önemli sıcaklık aralıkları vardır. Taşıma süreçleri çok yavaş olduğu için, daha düşük sıcaklıklarda büyüemeyecekleri bir minimum sıcaklık ve proteinin denatüre olduğu, mikroorganizmaların bu sıcaklığın üzerinde büyüemediği bir maksimum sıcaklık vardır. Optimum sıcaklık ise enzimatik reaksiyonun maksimum hızda olması nedeniyle mikroorganizmaların büyümesinin en hızlı olduğu sıcaklıktır. Gelişim sıcaklık aralığı her mikroorganizma için karakteristiktir ve türe göre farklılık gösterir. Optimum büyüme sıcaklığına göre, mikroorganizmalar birkaç gruba ayrılır: optimum sıcaklıkları düşük olan psikrofiller (genellikle 10 °C'nin altında); optimum sıcaklıkları orta olan mezofiller (genellikle 50 °C'nin altında); yüksek sıcaklık optimumlarına sahip termofiller (genellikle 70 °C'nin altında); ve son derece yüksek optimum sıcaklıklara (genellikle 70 °C'nin üzerinde) sahip hipertermofiller (Madigan vd. 1997; Lee vd. 2020).

Sıcaklığın mikroorganizmaların büyümesinde etkili olduğu gibi, pH da mikrobiyal büyümede önemli bir rol oynar. Sıcaklığa benzer şekilde, her mikroorganizmanın büyüebileceği spesifik bir pH aralığı vardır. pH 5.5-7.9 aralığında

optimum üreme hızına sahip olan mikroorganizmalar nötrofil olarak tanımlanır. Optimum gelişme hızına pH 5.5'in altında ulaşan mikroorganizmalara ise asidofiller denir. Alkalifiller, pH 8'in üzerinde optimal büyüme gösteren mikroorganizmaları ifade eder ve sıklıkla yüksek pH ortamlarında bulunurlar (Lee vd. 2020).

Birçok mikroorganizma oksijensiz ortamlarda büyüemediğinden, birçok mikroorganizma için oksijen (O_2), gerekli bir temel besindir. Aeroblar, solunum reaksiyonu için O_2 kullanarak O_2 varlığında büyüyen mikroorganizmaları ifade eder. Aeroblar arasında, mikroaerofiller O_2 'yi yalnızca oksijen seviyesi atmosferik konsantrasyondan düşük olduğunda (mikrooksik durum) kullanır, çünkü O_2 'ye duyarlı bileşenler (oksijene duyarlı enzimler gibi) içerirler. Bu arada, fakültatif aeroblar gelişimleri için oksijen gerektirmez; bu nedenle O_2 yokluğunda büyüebilirler. Zorunlu aeroblar ve mikroaerofilik aeroblar yalnızca aerobik solunum yoluyla metabolit oluştururken, fakültatif aeroblar aerobik solunum, anaerobik solunum ve fermantasyon süreçleri yoluyla metabolize olabilir. Oksijenli ortamda gelişemeyen mikroorganizmalara anaeroblar denir. Anaeroblar arasında, aerotolerant mikroorganizmalar, O_2 'li ortamda solunum yapmasalar bile O_2 'yi tolere edebilirler ve O_2 varlığında gelişebilirler. Buna karşılık, zorunlu anaeroblar oksijenli ortamda hayatta kalamazlar (Lee vd. 2020).

Alg, maya, bakteri ve mantar cinslerine ait bir dizi mikroorganizma, belirli yetiştirme koşulları altında lipid biriktirme yeteneğine sahiptir. C/N oranı, azot kaynağı, sıcaklık, pH, oksijen, iz elementlerin ve inorganik tuzun konsantrasyonu gibi gelişim koşullarının yağ birikimi üzerinde çeşitli etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Li vd. 2008). Genel olarak, besi ortamındaki azot miktarı arttıkça, hücrelerdeki yağ miktarı azalmaktadır. C/N oranı 25'ten 70'e çıkarıldığında yağ içeriğinin %18'den %46'ya çıktığı bildirilmiştir (Hassan vd. 1996). Farklı azot kaynakları da mikrobiyal yağ üretimi üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. İnorganik ve organik azot kaynakları, yağ birikimi üzerindeki farklı etkilere sahiptir. İnorganik azot kaynaklarının hücre büyümesini desteklediği ancak yağ üretimi için uygun olmadığı, pepton ve brot gibi organik azot kaynaklarının ise yağ üretimini teşvik ettiği ancak hücre büyümesi için uygun olmadığı bildirilmiştir (Li vd. 2008).

İnokülasyon oranı, penisilin ve proteaz üretimi gibi birçok fungus fermantasyonunda önemli rol oynamaktadır (Smith ve Calam 1980; Chen ve Liu 1997). Lipid üretimi için fermantasyon koşullarının geliştirilmesi, mikrobiyal büyümeyi artırmak ve lipid üretim aşamasını başlatmak için inokülasyon miktarının optimizasyonunu içermektedir. İnokülasyon miktarı, mikrobiyal büyüme çalışmalarında nadiren kullanılan bir geliştirme faktörü olmasına rağmen, çalışmalar mikrobiyal büyümeyi etkileyebileceğini göstermektedir. Bazı araştırmalar, mikrobiyal popülasyonun gelişmesini başlatma yeteneği üzerinde inokülasyon miktarının önemini göstermiştir. Bu nedenle, uygun inokülasyon miktarının saptanması, mikrobiyal büyümeyi desteklemekte ve aynı anda yüksek verimli lipid üretimini başlatabilmektedir (Lu vd. 2012; Heidari vd. 2016; Juanssilfero vd. 2018).

Tüm biyoteknolojik fermantasyonlarda olduğu gibi, SCO üretimi için de optimum verimi sağlayan bir ideal inkübasyon süresi mevcuttur. Optimum süreden önce veya sonra fermantasyon işlemlerinin sonlandırılmasının verimin düşmesine yol açabileceği bildirilmiştir (Asadi vd. 2015; Somacal vd. 2020).

Bazı yağlı küfler (filamentöz funguslar) biyokütlelerinin %80'e kadarını lipit olarak depolayabilmektedir. Fungulardaki lipitler sıvı besi ortamındaki azot kaynağı, karbon kaynağı, C/N oranı, sıcaklık, çalkalama hızı ve pH'dan etkilenmektedir. Diğer birçok mikroorganizmada olduğu gibi, hücrelerde lipit üretimi artan C/N oranı ile artar (Subramaniam vd. 2010). Ancak Rasheva vd. (1997), nötral lipit, fosfolipit ve glikolipit bileşimi üzerinde C/N oranının ve nitrojen kaynağının herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. Kullanılan karbon kaynakları, metabolizmalarındaki farklılıklar nedeniyle fungusların depoladıkları lipitlerdeki yağ asitlerinin üretimini ve bileşimini güçlü bir şekilde etkileyebilmektedir. Glikoz, laktoz, ksiloz, nişasta, yağ, mısır maserasyon sıvısı, peynir altı suyu ve tarımsal ürünler gibi birçok substrat funguslardan lipit üretimi için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır (Naim vd. 1985; Chen ve Liu 1996; Abu vd. 2000; Somashekar vd. 2002; Liu ve Jin 2008; Economou vd. 2010; Demir vd. 2013; Demir ve Gündeş 2020).

Yağlı mikroorganizmaların gelişme sıcaklığının, depolanan TAG'ların doymamışlık derecesini ve yağ asidi bileşimini etkilediği bildirilmiştir (Donot vd. 2014). Funguslar, lipit içeriğine bağlı olarak farklı büyüme sıcaklıklarına tepkilerinde farklılık gösterir. *Candida lipolytica* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi bazı mayaların ve maya benzeri fungusların lipit içeriği, optimum gelişme sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda daha yüksektir (Weete 1980). Buna karşın, *Rhodotorula gracilis*, 22 °C'de geliştirildiğinde, 28 °C'de geliştirildiğinde içerdiği lipitin yarısından daha azını içerir (Steinberg ve Ordal 1954). Büyüme sıcaklığındaki değişikliklerin lipitlerin doymamışlık derecesi üzerinde daha dikkat çekici ve tutarlı bir etkisi vardır, bu genellikle karmaşık lipitlerin açıl kısımlarındaki çift bağların sayısına yansır. Yüksek bitkiler, bazı hayvanlar (böcekler dahil) ve düşük sıcaklıklarda gelişen bazı mikroorganizmaların lipitlerinde, nispeten yüksek derecede doymamışlık bulunmuştur. Farklı büyüme sıcaklıklarına sahip fungusların lipitlerindeki doymamışlıktaki azalma sırası psikrofil > mezofil > termofil şeklinde olmalıdır. Ayrıca, bu organizmalar optimum sıcaklıklarının altında ya da üzerindeki sıcaklıklarda geliştirildiklerinde, doymamışlık dereceleri buna göre değişiklik gösterecektir (Weete 1980).

Desaturazın oksijene bağımlılığı nedeniyle, lipitin doymamışlık derecesi üzerindeki sıcaklık etkisi besi ortamındaki oksijenin çözünürlüğü üzerindeki etkisinden dolayı oluşabileceği bildirilmiştir. Hücresel yağ asidi bileşimi üzerindeki sıcaklığın etkilerinin, spesifik bir etkiden ziyade metabolik dengedeki değişikliklerden kaynaklanabileceği (Brown ve Rose 1969) veya belki de sıcaklığın etkisinin birincil olarak desaturazın sentezi üzerine olabileceği bildirilmiştir (Meyer ve Bloch 1963).

Fungusların lipit üretimi üzerinde etkili faktörlerin en önemlilerinden biri de azot kaynağıdır. Gelişim için en iyi azot kaynağı, mikroorganizma türüne bağlı olarak değişir, ancak inorganik azotun en indirgenmiş formu (NH_4^+), diğer formlara göre birçok mantar tarafından daha verimli kullanılır (Weete 1980). Bazı organik azot kaynakları, bazı fungus türlerinin büyümesi için etkin olmasına karşın lipit üretiminde verimli değildir. Bununla birlikte inorganik azot kaynakları ile karşılaştırıldığında, organik azot kaynağında daha çok lipit biriktirebilen istisna türler mevcuttur (Chesters ve Peberdy 1965; Naguib ve Saddık 1960).

Başlangıç pH'ı, hücre büyümesini ve ürün oluşumunu etkileyen en önemli parametrelerden biridir (Hong vd. 2006). Çoğu fungusun optimum gelişim pH derecesi

6.0 ile 7.0 arasındadır. Azot kaynağı olarak mineral asitlerin amonyum tuzları kullanıldığında, pH'daki düşüş esas olarak NH_4^+ iyonlarının fungus tarafından ortamdan uzaklaştırılmasından kaynaklanır (Weete 1980). Karbon kaynağının mikrobiyal kullanımı ortamın pH'ına bağlıdır. pH, hücre zarının yüzey özelliklerini etkiler ve böylece karbon kullanım sürecini etkiler (Caporusso 2021).

Bugüne kadar, çeşitli mikroorganizmaların bazı özel koşullar altında son derece yüksek miktarda PUFA ürettiği bulunmuştur. PUFA'ların mikroorganizma üretimi, genetik değişikliğe veya kapsamlı üreme çabalarına bağlı olmadan, sadece büyüme koşullarını değiştirilerek geliştirilebilir ve önemli ölçüde değiştirilebilir (Subramaniam vd. 2010; Sun vd. 2015). Örneğin, Abeln ve Chuck (2020), yağ asiti profilinin fermantasyon sıcaklığı ile ilişkili olduğunu, gelişme sıcaklığındaki 30°C'den 15°C'ye düşüşün, yağ asitlerinde daha yüksek derecede doymamışlığa neden olduğunu bildirdi.

2.6. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

Lipit, yağ asitlerini ve bunların türevlerini ve ayrıca bu bileşiklerden türetilen ilgili fonksiyonel veya biyosentetik maddeleri içermektedir. Lipitler, hem enerji (yağ asitlerinin beta oksidasyonu) hem de esansiyel yağ asitlerinin sağlanması açısından beslenmede vazgeçilmez unsurlardır (Zárate vd. 2017). Yağ asitlerinin kendileri yüksek miktarda enerji kaynağıdır. Plazmadaki serbest veya esterleşmemiş yağ asitleri, başta kalp, kas ve böbrek olmak üzere vücuttaki çeşitli dokular tarafından enerji için kullanılabilir. Bazı yağ asitleri de vücutta birçok işlevi olan eikosanoidlerin öncüleridir (Thomas ve Holub 1994).

PUFA'lar, birden fazla çift bağ içeren yağ asitleridir. Genellikle kısaltılmış biçimde X:YnZ olarak gösterilir, burada X, zincirin karbon atomu sayısı, Y çift bağ sayısı ve Z metil ucundan sayılan ilk çift bağın konumu belirtir (n sistemi numaralandırma). Kalan çift bağların konumları, her zaman 'metilen kesintili' olarak adlandırılan modeli izledikleri için kolayca çıkarılabilir. Örneğin, linoleik asit (LA), 18:2n6, 18 karbon atomuna ve iki çift bağa sahiptir ve metil ucundan sayılan ilk çift bağ, 6. karbondan ve ikincisi 9. karbondadır (Alonso ve Maroto 2000). İki PUFA ailesi, n-6 ve n-3 yağ asitleri, fizyolojik ve metabolik olarak farklıdır. Öncüleri olan linoleik asit (18:2n-6; LA) ve α -linolenik asit (18:3n-3; ALA), esansiyel yağ asitleridir (EYA), yani insan vücudunda sentezlenemez ve beslenme yolu ile alınmaları gerekmektedir. Böylece LA; γ -linolenik asit (18:3n-6) ve dihomo- γ -linolenik asit (20:3n-6; DGLA) aracılığıyla araşidonik aside (20:4n-6; ARA) dönüştürülebilmektedir (Ristić-Medić vd. 2013).

Çoklu doymamış yağ asitleri, insan sağlığı bakımında önemli oldukları için değerli ürünlerdir. Çeşitli PUFA'lar, beslenme ile ilgili hastalıkları önlemek için normal diyetle 'esansiyel yağ asitleri' olarak kabul edilmektedir (Gurr ve Harwood 1991). PUFA, özellikle belirli hastalıklarla ilgili olarak biyolojik rollerine ilişkin kanıtlar hızla arttığı için biyomedikal ve nutrasötik arenalara girmiştir. Potansiyel farmasötik uygulamalarına ek olarak, gıdalarda PUFA'ların bulunması, 'sağlıklı' gıdalara yönelik artan kamu bilinciyle birleştiğinde, bu bileşikler tüketicilerin dikkatini oldukça çekmeye başlamıştır. PUFA'lar birçok yapısal ve fonksiyonel rolü yerine getirmekte olup katıldıkları biyolojik olayların geniş etkilerinden dolayı yağ asitleri arasında benzersizdir (Gill ve Valivety 1997).

Linoleik ve linolenik asit vücut dokularındaki membran fosfolipitinin bileşenleridir. Desatürasyon ve uzama yoluyla uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerine, yani ARA, EPA ve DHA'ye dönüştürülür. EPA'nın dokulardaki miktarı az olmasına rağmen, ARA çoğu dokuda membran fosfolipitinin önemli bir bileşenidir. DHA ise retina ve beyinde bol miktarda bulunur. Linoleik asit mısır yağı, aspir yağı, yer fıstığı yağı ve ayçiçek yağında bol miktarda bulunur. Linolenik asit içeriği yüksek bitkisel yağlar, kanola yağı, soya fasulyesi yağı ve keten tohumu yağıdır. ARA, hayvan etlerinden ve kümes hayvanlarından diyetle alınabilirken, EPA ve DHA balık ve deniz ürünlerinde bol miktarda bulunur (Thomas ve Holub 1994). Linoleik ve linolenik asitler vücutta sentezlenemez. Toplam esansiyel yağ asidi eksikliği (hem ω -6 hem de ω -3 yağ asitleri) büyümenin azalmasına, üreme yetmezliğine ve dermatite neden olur (Burr ve Burr 1929, 1930).

Eksikliğinin olmadığı durumda, uzun zincirli ω -3 yağ asidi DHA, retina ve beyin fosfolipitlerinde bol miktarda bulunmaktadır (Neuringer ve Conner 1986). Ayrıca DHA'nın beyindeki miktarı, bebeklerde hamileliğin son üç ayında ve doğumdan sonraki dönemde belirgin şekilde yükselir. Hatta prematüre olarak dünyaya gelen bebeklerin beyin ve karaciğerlerindeki DHA miktarı yetersizdir (Simopoulos 1989). ω -3 yağ asidi eksikliği ile beyin ve retinada DHA seviyeleri düşer. Bu dokularda DHA, EPA asit gibi uzun zincirli ω -6 yağ asitleri ile değiştirilir (Neuringer ve Conner 1986). ω -3 yağ asitlerinin eksikliğinin, retina fonksiyonunu etkilediği tespit edilmiştir (Thomas ve Holub 1994).

Bang ve Dyerberg, antitrombotik etkileri, kanama süresini uzatması ve serum kolesterol konsantrasyonlarını düşürmedeki etkisi nedeniyle EPA'nın kalp krizini önlenmesindeki önemini vurgulamışlardır (Dyerberg 1978; Dyerberg ve Bang 1979). Diyetler ω -3 yağ asitleri ile desteklendiğinde, pratik olarak tüm hücrelerin zarlarındaki ω -6 yağ asitlerinin yerini alır. ω -3 yağ asitleri, prostaglandin metabolizmasını modüle eder ve kandaki trigliseritleri azaltır; ve yüksek dozlarda alınan ω -3 yağ asitleri kolesterolü düşürür ve antitrombotik ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Bugün ω -3 yağ asitlerinin normal büyüme ve gelişme için gerekli olduğu ve koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, artrit, diğer inflamatuvar ve otoimmün bozukluklar ve kanserin önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceği bilinmektedir (Simopoulos 1991). İnsanlar dahil, memelilerde serebral korteks, retina, testis ve sperm, DHA açısından zengindir. DHA, beyin yapısal lipidlerinin en bol bulunan bileşenlerinden biridir. DHA, EPA gibi yalnızca doğrudan alımdan veya diyet yoluyla alınan EPA veya ALA'dan sentez yoluyla elde edilebilir (O'Brien ve Sampson 1965; Anderson 1970; Poulos 1973). Yetişkin bir insan beyninin günde 17.8 mg ARA ve 4.6 mg DHA tükettiği; diyetle DHA alınamaması durumunda ise eğer ALA sağlanabilmişse, DHA ihtiyacının ALA'nın karaciğerde dönüştürülmesi ile karşılanabileceği bildirilmiştir (Rapoport vd. 2007). Beyindeki düşük serotonin seviyesi düşük DHA seviyesi ile bağlantılıdır, bu da yine artan depresyon, intihar ve şiddet eğilimiyle ilişkilendirilmiştir. Yüksek miktarda balık tüketiminin, yaşa bağlı hafıza kaybı ve bilişsel işlev bozukluğunda önemli bir azalmaya ve Alzheimer hastalığına yakalanma riskinin düşmesine neden olduğu düşünülmektedir (Larsen 2000).

Bağışıklık hücreleri, özellikle lenfositler, membran fosfolipitlerinde yüksek oranda PUFA'lar içerir. Birçok çalışma, beslenme ile alınan yağların, membran fosfolipitlerinin yağ asidi kompozisyonunu etkileyebileceğini göstermiştir. Bu yağ asidi

farklılıkları, membranların biyofiziksel özelliklerinin (membran akışkanlığı gibi) ve enzim aktivitesinin yanı sıra bağışıklık düzenleyici eikosanoidlerin yağ asidi öncülerinin mevcudiyetini etkileyerek, bağışıklık fonksiyonundaki değişikliklere katkıda bulunur. Son yıllarda ω -6, ω -3 PUFA'ların diyetle alımının artmasının, hayvanların ve insanların bağışıklık yanıtında nicel ve nitel değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Wu ve Meydani 1996).

Birçok çalışmada, romatoid artrit için potansiyel etkili bir tedavi olarak GLA'ya odaklanılmıştır. Romatoid artrit hastalarında 24 hafta boyunca günlük 1.4 g GLA (hodan tohumu yağı şeklinde) takviyesinden sonra, hastalık aktivitesinin belirti ve semptomlarında klinik olarak önemli azalmalar gözlemlenmiştir (Wu ve Meydani 1996). Atopik egzamalı hastaların daha yüksek LA seviyelerine ve GLA başta olmak üzere LA metabolitlerinin daha düşük seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir, bu da Δ 6-desatüraz aktivitesinin bozulduğunu göstermektedir. ω -3 EFA'ların da benzer şekilde etkilendiği, yine egzama hastalarında ALA'da bir yükselme gözlemlenirken, onun uzun zincirli metabolitlerinde de azalma tespit edildiği bildirilmiştir (Manku vd. 1984; Morse vd. 1989; Lindskou ve Hølmer 1992). Yapılan bir dizi klinik çalışma ile GLA takviyesinin kaşıntı ve antihistaminik kullanımında önemli bir iyileşmenin yanı sıra eritem, ekskoriasyonlar ve likenifikasyonda kademeli bir iyileşme sağladığı görülmüştür (Fiocchi vd. 1994; Moa vd. 1987; Wu ve Meydani 1996).

Multipl skleroz (MS) bilinen bir tedavisi olmayan, nörolojik olarak işlev bozukluğuna neden olan kronik bir hastalıktır. Çalışmalar, MS gelişiminde anormal EFA metabolizması ile değişmiş lenfosit fonksiyonu arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Horrobin 1979; Wu ve Meydani 1996). Bazı çalışmalarda, GLA takviyesinin MS hastalarında orta düzeyde klinik iyileşmeye neden olduğu gözlemlenmiştir (Mlyer-Rienecker vd. 1976; Field 1978; Field ve Joyce 1978).

GLA'nın anti-tümör özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Horrobin (1980), kanser ve GLA içeriği arasında olası bir bağlantı olduğunu öne süren ilk kişi olmuştur. Kötü huylu hücrelerin Δ 6 desatüraz ve dolayısıyla GLA bakımından yetersiz olduğu bulunmuştur. GLA'nın normal hücrelere zarar vermeden, birçok tümör hücrelerini inhibe ettiği veya öldürdüğü tespit edilmiştir (Dippenaar vd. 1982; Booyens 1984; Begin vd. 1985). GLA'nın, bağışıklık yanıtını düzenleyerek konağın kanser gelişimine direnme yeteneğini arttırdığı düşünülmektedir (Schlager vd. 1983).

Normal kan basıncına sahip erkek deneklerde 4 hafta boyunca yapılan araştırmada, hodan yağı takviyesi (%23 GLA içeren) alınmasının strese verilen kan basıncı ve kalp atış hızı tepkilerini sırasıyla %30 ve %33 oranında azalttığı rapor edilmiştir. Hem hayvanlarda hem de insanlarda yapılan çok sayıda çalışma, GLA'nın çeşitli endojen ve eksojen presörlere karşı kardiyovasküler tepkileri modüle etme kabiliyetine sahip olduğu kavramını desteklemektedir (Mills vd. 1996).

GLA aynı zamanda beynin gri dokusunda ve retinanın yapısında yer alan, bulundukları dokularda bu dokulara ait hücrelerin haberleşmesinde haberci olarak görev alan ARA'nın vücutta sentezinde kullanılmaktadır. ω -6 linoleik asit ve onun daha uzun zincirli türevi olan ARA eksikliğinde, deride doku bozukluğu veya gelişme bozuklukları görülebilmektedir (Wibert vd. 1997; Huang ve Ziboh 2001).

PUFA'lar şu anda yüksek bitkiler, hayvan iç organları ve yağlı balıklar dâhil olmak üzere birçok kaynaktan elde edilmektedir, ancak mevcut kaynaklardan PUFA üretiminin genişleyen PUFA pazarını karşılamada yetersiz olduğu ortaya çıkmıştır (Gill ve Valivety 1997). Bu duruma ek olarak mevcut kaynaklarda önemli sorunlar şunlardır: (i) mevsimsel ve iklimsel değişikliklerin, elde edilen yağın bileşim, miktar ve kalitesinde farklılıklara neden olabilmesi; (ii) yağ üretiminde kullanılan kültür bitkilerinin düşük verime sahip olması; (iii) kompleks ve pahalı alt akım prosesleri gerektirmeleri (Gill ve Valivety 1997; Alonso ve Maroto 2000). Bu dezavantajlardan dolayı, mevcut kaynaklarla maliyet açısından rekabet edebilecek yeni PUFA kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bakteriler, funguslar ve mikroalgler dâhil olmak üzere bazı mikroorganizmalar, PUFA'ların alternatif kaynakları olarak kabul edilmektedir.

2.7. Peyniraltı Suyu

Süt endüstrisi, gıda sektöründeki en büyük işleme endüstrilerinden biri olarak kabul edilir ve sonuç olarak da gıda atığı ve diğer endüstriyel atıkların en büyük üreticilerinden biridir (Demirel vd. 2005; Pesta vd. 2007). Peynir ve peynirle ilgili ürünlere olan ilginin artması ile beraber açığa çıkan atık (PAS ve peynir kalıntıları) miktarı da artmış, bu da peynir atıklarının bertarafıyla başa çıkma ihtiyacını doğurmuştur (Kosikowski 1979; Audic vd. 2003).

Peyniraltı suyu, kabaca süt proteinlerinin asit veya proteolitik enzimler tarafından pıhtılaşmasından kaynaklanan pıhtının ayrılmasından sonra kalan serum veya sulu kısım olarak tanımlanmaktadır. Peyniraltı suyunun türü ve bileşimi esas olarak kazeinin süttan ayrılması için kullanılan işleme tekniklerine bağlıdır (Macwan vd. 2016). Genellikle, %92-95 su ve yaklaşık %10-20'si protein, %60-80'i laktoz, geri kalanı vitamin, mineral, laktik asit, yağ ve iz elementler olan %5-8 kuru maddeden oluşmaktadır (González 1996; Koutinas 2009).

Açığa çıkan peyniraltı suyu, üretilen peynirin türüne bağlıdır. Ancak, peynir üretim prosesinin verimi yaklaşık %10'dur ve kalan yaklaşık %90'lık kısım peyniraltı suyu olarak ayrılmaktadır (Russ ve Schnappinger 2007). Dünya çapında yılda yaklaşık 165 milyon ton PAS üretildiği göz önüne alındığında, PAS'dan yararlanmak için yeni yöntemlerin araştırılmasına olumlu bakılmaktadır. PAS'ın Avrupa Birliği ülkelerinde %75'i ve dünyanın geri kalanında da muhtemelen %50'den azı kullanılmakta, sonuç olarak gıda ve yem potansiyeli yüksek değerli bir ürünün büyük bir kısmı israf edilmektedir. PAS, 30.000-50.000 mg/L'lik çok yüksek bir Biyolojik Oksijen İstemi (BOİ) yükü ve 60.000-80.000 mg/L kimyasal oksijen ihtiyacı nedeniyle tehlike arz eden bir kirleticidir. PAS'ın atılması aynı zamanda potansiyel besin ve enerjide önemli bir kayba neden olmakta ve yüksek kirletici etkisi nedeniyle çevreciler ve teknoloji uzmanları tarafından ciddi şekilde araştırılmaktadır. Ayrıca süt endüstrisi, PAS'ın uygun şekilde bertaraf edilmesi için çeşitli arıtma maliyetlerinden kaynaklanan ekonomik yükten dolayı zarar görmektedir (Macwan vd. 2016).

En sık karşılaşılan PAS türü; kazeinin, kimozen veya diğer kazein pıhtılaştırıcı enzimler içeren, endüstriyel kazein pıhtılaştırma preparatlarının kullanıldığı prosese dayanan, peynir veya belirli kazein ürünlerinin imalatı sırasında açığa çıkmaktadır (Fox vd. 2000). Rennet kaynaklı kazein pıhtılaşması yaklaşık olarak pH 6.5'te gerçekleşmekte ve açığa çıkan PAS, tatlı PAS olarak isimlendirilmektedir. İkinci PAS türü, asidik PAS

(pH<5), çoğu endüstriyel kazein veya taze peynir üretiminde olduğu gibi, kazeinin pıhtılaştırılması için organik veya mineral asitlerin ilavesi veya fermentasyonun kullanıldığı prosesler sonucu meydana gelmektedir (Jelen 2003).

PAS işleme endüstrisi, PAS tozu, laktoz, de-mineralize PAS, PAS proteini konsantresi, PAS karışımları ve diğer ürünlerin kullanımını geliştirmek için önemli çabalar harcamıştır. PAS, doğrudan farklı ürün formülasyonlarının bir bileşeni olarak veya dolaylı olarak, peyniraltı suyu proteini ve laktoz konsantreleri/izolatlarının fermentasyonlarda substrat olarak kullanılarak geri kazanımı yoluyla değerlendirilebilmektedir. Peyniraltı suyu tozu (PAST), peyniraltı suyu konsantresi, laktozu/ minerali azaltılmış peyniraltı suyu, peyniraltı suyu proteini konsantresi ve laktozun önemli bir kısmı gıda ürünü uygulamalarında kullanılırken, peyniraltı suyu karışımları ağırlıklı olarak hayvan yemi ürünlerinde kullanılmaktadır. PAS bazlı karışımlar, yağsız süt tozu bileşimine benzer bir bileşim sağlamak üzere formüle edilmektedir. İnsanların tüketiminde değerlendirilen PAS konsantresinin çoğu, süt ve unlu mamullerin üretiminde kullanılmaktadır (Morr 1984; Clark 1987; Galanakis vd. 2012; Mandal vd. 2013; Galanakis 2015).

PAS'ın doğrudan değerlendirilmesi, sıvı veya kurutulmuş biçimde kullanımını kapsamaktadır. İlk durumda, genellikle bileşiminde herhangi bir değişiklik olmaksızın kullanılmaktadır (Galanakis 2015). Bu durumda, doğal tatlı, seyreltilmiş veya asidik PAS'ın farklı katkı maddeleri ile karıştırılarak PAS bazlı yumuşak içecek üretimi gerçekleştirilmektedir. İkinci durumda ise meyveler (tropik meyveler, elmalar, armutlar, şeftaliler, çilekler veya kıvılcıklar), tahıllar ve tahıl bazlı ürünler, bitkisel protein izolatları, çikolata, kakao, vanilya özleri ve diğer lezzet maddelerini içermektedir (Beucler vd. 2005; Jeličić vd. 2008; Singh ve Singh 2012). Ayrıca probiyotik bakterilerle fermentasyon yoluyla elde edilen fonksiyonel PAS içeceklerinin geliştirildiği de bildirilmiştir (Magalhães vd. 2010; Shukla vd. 2013; Bulatović vd. 2014). PAS'ın kurutulmuş formda kullanılması, sprey kurutma teknolojisi, mekanik buhar rekompresyonu, ultrafiltrasyon ve ters ozmos gibi yoğunlaştırma tekniklerinin uygulanması gibi ön işlemler gerektirmektedir (Jeličić vd. 2008). Daha spesifik olarak, tatlı PAS tozu, süt ürünleri, fırıncılık ve şekerleme endüstrilerinin yanı sıra, bebek maması ve et endüstrileri tarafından kullanılabilir (Kosikowski 1979; Britz vd. 2006; Indrani ve Rao 2011). Asidik PAS tozunun, buruk-ekşimtrak tadı nedeniyle doğrudan uygulanması, tatlı PAS tozuna nazaran sınırlıdır. Peynir üretiminde yardımcı hammadde olarak kullanılabileceği gibi, peynir tozları, soslar, ezme, margarinler, ekmek, bisküvi, kraker ve atıştırmalık yiyeceklerin üretiminde de bileşen olarak kullanılabilmektedir (Kosikowski, 1979).

PAS'ın dolaylı kullanımı, proteinler ve karbonhidratlar gibi değerli besinlerin geri kazanılması için yeniden işlenmesi anlamına gelmektedir (Sherman 2007). PAS'ın ana bileşenlerinin (örneğin protein, laktoz ve laktozu alınmış permeat) ayrılması için uygulanan en yaygın teknikler, ultrafiltrasyon veya ters ozmos gibi membran teknikleridir (Pesta vd. 2007; Galanakis 2012; Galanakis vd. 2014). PAS proteinleri, son derece yüksek besin kalitesi, amino asit kompozisyonu ve fizyolojik işlevselliği ile karakterize edilmektedir. Ayrıca jelleşme, köpürme, su bağlama ve emülsifiye etme kapasitesi gibi benzersiz fiziksel fonksiyonel özelliklere de sahiptir ve bu özellikler göz önüne alındığında gıda ve ilgili endüstrilerde bileşen olarak değerlendirilmelerinin doğru bir karar olduğu görülmüştür (Smithers 2008).

PAS'tan yararlanmanın yollarından biri de hayvan yemi formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılmasıdır. Yeni Zelanda'daki 2.67 milyon ton PAS üretiminin yaklaşık %16'sı ve Avustralya'daki 1.65 milyon ton PAS üretiminin %28'i domuz yemi için kullanıldığı bildirilmiştir (Zadow 1987). Ayrıca, Avustralya'da toplam PAS üretiminin %5'i buzağı sütü ikame maddesi olarak kullanılmıştır. Hollanda'daki süt endüstrisi, buzağı sütü ikame maddesi üretimi için yaklaşık 15000 ton sıvı PAS ve 120000 ton laktozsuz PAS tozu kullanıldığı bildirilmiştir (Hoogstraten 1987).

PAS ayrıca, tarım arazilerinin sulanması için de kullanılabilir. Toprağa, hem bitki büyümesini teşvik edebilen besin, hem de su katkısı sağlamaktadır (Oborn ve Piggott 1968). 3.700 litre PAS 5.9 kg potasyum sülfat, 36 kg amonyum sülfat, 12 kg süperfosfat ve 6.8 kg kalsiyum karbonata eşdeğer mineral madde içermektedir (Macvan vd. 2016).

Deproteinize PAS permeatları, PAS, laktozu giderilmiş permeat veya bunların karışımları, akaryakıt veya saf alkol olarak kullanılmak üzere biyoetanol elde etmek amacıyla etanol fermantasyonu için hammadde olarak kullanılabilir (Dragone vd. 2008; Christensen vd. 2011; Wagner vd. 2014; Galanakis 2015). Ayrıca PAS birası ve PAS şarabı üretimi de mümkündür (Kosikowski 1979; Jeličić vd. 2008).

Deproteinize PAS permeatlarının fermantasyonundan başlayarak, organik asitlerin (asetik, laktik, sitrik), polisakkaritlerin (ksantan gam, pullulan), bazı vitaminlerin, amino asitlerin, tek hücre proteini ve tek hücre yağlarının üretimi de mümkündür (Audic vd. 2003; Ghaly vd. 2005; Pesta vd. 2007; Demir vd. 2013). PAS kurumaddesi ana bileşeninin laktoz olması ve buna ilaveten suda çözünen vitaminler, mineral maddeler ve proteinlerce zengin olması nedeniyle, peyniraltı suyunun laktik asit gibi endüstriyel öneme sahip faydalı ürünlerin üretiminde kullanılabilmesi için çok sayıda biyoteknolojik süreç geliştirilmiştir (Panesar vd. 2007). Demir vd'nin (2013) karbon kaynağı olarak peyniraltı suyu kullandıkları *Mortierella isabellina* ile mikrobiyel yağ üretiminde %4.5 laktoz içeren besi ortamında gerçekleşen fermantasyonda, biyokütle miktarının 7.99 g/L, yağ miktarının 3.44 g/L, olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırma kapsamında kullanılan demineralize peyniraltı suyu tozu ve peyniraltı suyunun mineral bakımından yeniden zenginleştirilmesi için de-mineralizasyon hattından temin edilen retantatlar Ekso Süt'ten (Ekiciler Süt Gıda Tar. Hay. ve Tic. A.Ş. Antalya, Türkiye) tedarik edilmiştir. Fermantasyon besi ortamlarının hazırlanmasında kullanılan azot kaynaklarından; et özütü, soya peptonu ve maya ekstraktı Condalab (Madrid, İspanya); amonyum sülfat Isolab (Wertheim, Almanya); potasyum nitrat ise Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Mikroorganizma

Araştırmada kullanılan *Mortirella isabellina* (DSM 1414) küf kültürü daha önceden Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyon Enstitüsü'nden (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) temin edilmiş olan stok kültürlerden hazırlanmıştır. Stok kültürlerin hazırlanarak mikroorganizmanın geliştirilmesinde Kavadia vd. (2001)'in önerdiği şekilde patates dekstroza agar (PDA) kullanılmıştır. Hazırlanan PDA besi ortamı, 121°C'de 20 dk. ısı işlem uygulanarak sterilize edilmiştir. Aşılama işlemleri aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Tüpten tüpe küf kültürünün aktarılması işleminde; stok kültür üzerine on adet steril cam boncuk (3 mm çapında) ve 5mL steril saf su ilave edilmiş, 5 dk. süreyle 2000 d/dk.'de vorteks ile karıştırılmıştır. Elde edilen misel süspansiyonundan yeni steril yatık agarlara 1 mL aşılama yapılmıştır. Aşılama yapılmış yatık agarlar 27°C'de 3 gün süre ile inkübe edilmiş ve küf gelişimi sağlanmıştır. Daha sonra bu tüpler +4°C'de muhafaza edilmiştir. Aynı işlemler mikroorganizmaların yenilenmesi için her ay periyodik olarak tekrarlanmıştır.

3.3. Deproteinize Peynir Altı Suyunun Hazırlanması

Fermantasyonlarda substrat olarak kullanılan de-proteinize peyniraltı suyunun (DP-PAS) hazırlanması için ilk olarak %24 kurumadde içerecek şekilde deiyonize su ile PAST kullanılarak rekonstitüe peyniraltı suyu hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu rekonstitüe peyniraltı suyu, Sienkiewicz ve Riedel (1990)'in belirttiği şekilde otoklavda 121°C'de 10 dk. tutularak proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. Bu şekilde ısı işlemine tabi tutulan rekonstitüe peyniraltı suyu önce kaba filtre kâğıdından daha sonra Rimada ve Abraham (2001)'in belirttiği gibi Whatmann no:1 filtre kâğıdından geçirilerek denatüre proteinler uzaklaştırılmıştır. Filtrasyon işlemleri laktoz kristalizasyonunu önlemek amacıyla 85-90°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Laktoz kristalizasyonunun önlenmesi hem substrat laktoz içeriği bakımından hem de filtrasyon işlemlerinin tıkanma olmadan sağlıklı bir şekilde yapılabilmesi için önemlidir. Kullanılan peyniraltı suyu tozu de-mineralize olduğu ve tam bir peyniraltı suyu içeriğine sahip olmadığı için de-mineralizasyon işleminin gerçekleştirildiği filtrasyon hattından alınan retantatlar konsantre edilmiş ve kuru madde kütle dengliği hesaplanarak tam bir peyniraltı suyu oluşturacak şekilde hazırlanan DP-PAS'lara ilave edilmiştir. Elde edilen yüksek kurumadde içeriğine sahip deproteinize peyniraltı suyu permeatı (DP-PASP) daha sonra uygun oranlarda seyreltilerek substrat olarak kullanılmak üzere -20°C'de depolanmıştır. DP-PASP'de yapılan analizlerde elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. DP-PASP bileşimi

°Bx	26.43
Kurumadde	%26.79
Kül miktarı	%2.45
Toplam karbonhidrat içeriği	%23.56
Azot miktarı	%0.30

3.4. Ön Kültürün Hazırlanması

Kavadia vd. (2001)'in belirttiği şekilde ön kültür besi ortamı hazırlanmıştır. Bunun için 5 g/L glikoz, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L Na_2HPO_4 , 1.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.008 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0001 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0001 g/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0001 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5 g/L maya ekstraktı tartılıp saf su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra besi sıvısının pH değeri 6.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 20 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

3.4.1. Misel süspansiyonunun hazırlanması

+4°C'de muhafaza edilen stok kültürün bulunduğu tüp alınıp üzerine aseptik koşullar altında steril 10 adet cam boncuk (3 mm çapında) ve 5 mL steril saf su ilave edildikten sonra bu tüpün 2000 d/dk.'de 5 dakika vorteks ile karıştırılması ile misel süspansiyonu elde edilmiştir.

3.4.2. Misel süspansiyonunun ön kültür besi ortamına aşılması

Hazırlanıp steril edildikten sonra oda sıcaklığına soğutulan 100 mL ön kültür besi ortamına, aseptik koşullar altında 1 mL misel süspansiyonu aşılacaktır. Aşılana ön kültür besi ortamı çalkalamalı inkübatörde 28±1 °C'de, 180 d/dk.'de, 2 gün süreyle inkübe edilmiştir (Hsiao vd. 1994; Hiruta vd. 1996a; Papanikolaou vd. 2004; Dong ve Walker 2008).

3.5. Fermantasyon Ortamının Hazırlanması

Toplam karbonhidrat içerikleri belirlendikten sonra -20°C'de depolanan önceden hazırlanmış DP-PASP'ları, deneme şartlarındaki başlangıç substrat içeriğini sağlayacak şekilde de-mineralize su ile seyreltilerek ayarlanmıştır. Daha sonra azot kaynağı ilave edilerek fermentasyonun gerçekleştirileceği erlenlere alınıp ağzları silikon sünger kapakla kapatıldıktan sonra 121°C'de 20 dk. süre ile sterilize edilmiştir.

3.6. Hazırlanan Ön Kültürden Fermantasyon Ortamına Aşılama

Sterilize edilen fermentasyon besi ortamları oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, daha önceden iki gün süre ile ön fermentasyona bırakılarak elde edilen ön kültürden gerekli miktarlarda aşılama yapılarak 100'er mL'lik fermentasyon besi ortamları elde edilmiştir.

3.7. Biyokütlenin Fermantasyon Besi Ortamından Ayrılması

Periyodik olarak inkübatörden alınan 250 mL'lik erlenler içindeki 100 mL'lik fermente besi ortamları (besi ortamı + yaş biyokütle) santrifüj tüplerine alınıp Papanikolaou vd. (2004b)'nin belirttiği yöntemle dayanarak 14000 d/dk.'de, oda sıcaklığında, 10 dakika süreyle santrifüj (Herolab UniGen MR, Wiesloch, Almanya) edilmiştir (bahsi geçen yöntemde +4 °C'de santrifüj edilen örnekler sonraki aşamada filtre kağıdından süzülürken sorun oluşturmuş ve bu sorun santrifüj işlemi oda sıcaklığında gerçekleştirilerek aşılmıştır). Daha sonra Wynn ve Ratledge (2000)'in önerdiği şekilde filtreden süzölmüştür (Whatmann no:1). Filtreden geçirilen berrak süzöntü (kullanılmış besi ortamı) saklama tüplerine alınarak daha sonra şeker analizleri yapılmak üzere depolanmıştır. Filtre kâğıdının üstünde kalan yaş biyokütle, kullanılmış besi ortamından tamamen temizlenene kadar bol distile su ile yıkanmıştır.

3.8. Biyokütlenin Kurutulması

Filtre kâğıdının üstünde kalan yaş biyokütle, filtrasyonda kullanılan ve daha önceden kurutulmuş darası alınmış olan filtre kâğıdı ile birlikte 70°C'lik etüvde 1 gece bekletilerek kurutulmuştur (Dong ve Walker 2008). Kurutulan biyokütle filtre kâğıdı ile birlikte tartılıp, toplam ağırlıktan önceden kaydedilmiş olan kuru filtre kâğıdı ağırlığı çıkarılarak kuru biyokütle miktarı hesaplanmıştır. Bu şekilde elde edilen kuru biyoküteller tüpler içine alınıp üzerlerine azot gazı basılarak kapakları sıkıca kapatılmış ve yağ analizlerinin (yağ oranı ve yağ asitlerinin belirlenmesi) yapılacağı zamana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.9. Biyokütleden Yağ Ekstraksiyonu

Kurutulmuş biyoküteller santrifüj tüplerine alınıp, üzerlerine 20 mL hekzan ilave edilmiştir. Hekzan ile muamele edilen kuru biyoküteller homojenizer (IKA LABORTECHNIK-T25 Basic Ultra Turrax, Staufen, Almanya) ile 5 dk homojenize (24000 d/dk.) edildikten sonra sıcak su banyosunda 55°C'de 10 dk. tutulmuştur. Daha sonra 3000 d/dk.'de oda sıcaklığında 10 dk. santrifüj (Herolab UniGen MR, Wiesloch, Almanya) edilerek çökeltiler çözgen içinde çöktürölüp, süzöntü filtre kağıdı (Whatmann no: 1) kullanılarak ayrılmıştır. Hekzanda içerisinde çözünmüş mikrobiyal yağ içeren süzöntü darası alınmış ağız şilifli cam balonda toplanmıştır. Ekstraksiyon işlemi 10 mL hekzan kullanılarak iki kez daha tekrarlanmıştır. Süzöntülerdeki çözgen vakum altında (mbar) 50°C'de döner (rotary) evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Şilifli cam balonlar bir gece 70°C'de tutulduktan sonra gravimetrik olarak yağ miktarları hesaplanmıştır (Dong ve Walker 2008).

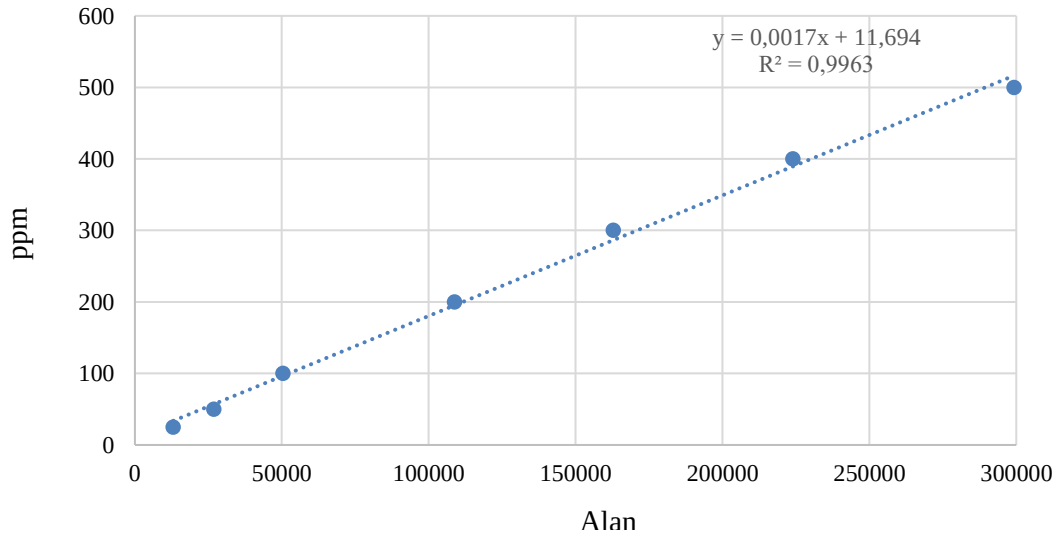
3.10. Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi

Yağ asidi kompozisyonunun belirlenebilmesi için, elde edilen lipidler önce metil esterlerine dönüştürme reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bunun için deney tüplerinin içerisine yaklaşık 0.01 g ekstrakte edilen lipid örneklerinden tartılıp, üzerlerine 2 mL %10'luk metanolik HCl (10 mL HCl, metanol ile 100 mL'ye tamamlanır) ve 1 mL metilen klorit eklenmiştir. Tüplerin ağızları (vidalı kapaklar ile) sıkıca kapatılarak 60°C sıcak su banyosunda 3 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve üzerlerine 4 mL doymuş NaCl ve 2 mL hekzan eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Tüplerin ağızları kapatılıp 2 dk. süreyle 2000 d/dk.'de vorteksle karıştırılmış, bir süre bekletilerek

faz ayrılması sağlanmıştır (Kimura vd. 2004). Üstte biriken yağ asidi metil esterlerini içeren hekzan fazı viallere doldurularak GC-MS’de analiz edilmiştir. Kromatogram üzerinde yağ asitleri metil esterlerine ait olan piklerin tanımlanması için aynı analiz koşullarında GC-MS’e enjekte edilen FAME C₈-C₂₄ karışım standardı (Supelco 37 component FAME mix, Sigma-Aldrich, Laramie, ABD) kullanılmıştır.

Kolon	: 100m x 0.25mm x 0.20µm (TR-CN100)
Fırın sıcaklık programı	: 140°C (6 dk), sonrasında 3°C/dk artışla 240°C’ye yükselme ve bu sıcaklıkta 14 dk bekleme
Dedektör sıcaklığı (Interface)	: 260°C
Taşıyıcı gaz	: He,
Taşıyıcı gaz akışı	: 30.0 mL/dk.
Enjeksiyon bloğu sıcaklığı	: 260°C
Split oranı	: 1
Enjeksiyon modu	: splitless
İyonlaştırıcı kaynak	: FID1
Tarama hızı	: 40 kütle/s
Yanma Gazı	: H ₂
H ₂ Akışı	: 40.0 mL/dk.
Hava akışı	: 400.0 mL/dk

GLA miktarının belirlenmesi için standart kullanılarak farklı konsantrasyonlara karşılık gelen piklerin alanları ile standart eğri oluşturulmuştur.

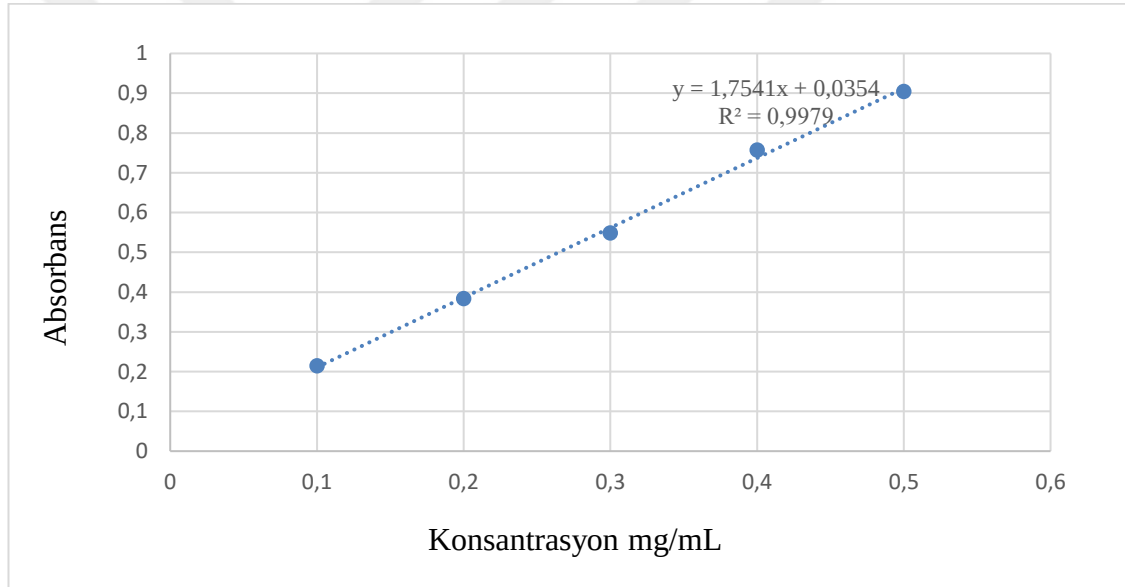


Şekil 3.1. GLA standart eğrisi

3.11. Besi Ortamında Yapılan Analizler

3.11.1. Toplam Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

Fermantasyon işlemlerinden sonra yaş biyokütlenin ayrılmasıyla geriye kalan kullanılmış besi ortamlarındaki şeker miktarlarının, besi ortamı başlangıç şeker miktarlarının ve DP-PASP şeker miktarlarının belirlenmesinde Dubois (fenol-sülfürik asit) yöntemi kullanılmıştır (Hounsell vd. 1997). Toplam karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi için öncelikle glikoz çözeltisi standart eğrisi hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Bunun için hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyonundaki çözeltiden farklı miktarlarda (10, 20, 30, 40, 50 μ L) alınarak tüplere aktarılmış ve saf su ile hacimleri 0.1 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüplere 250 μ L %4'lük fenol çözeltisi ilave edilip 5 dakika beklendikten sonra 2 mL derişik sülfürik asit ilave edilmiştir. Aynı işlemler 100 μ L saf su kullanılarak şahit numune için de gerçekleştirilmiştir. Absorbans ölçümleri UV-Visible spektrofotometre (Thermo Scientific, Evolution Array, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak 492 nm'de gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilerle glikoz çözeltisi standart eğrisi hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. Glikoz çözeltisi standart eğrisi

Besi ortamlarının başlangıç şeker miktarının belirlenmesinde öncelikle DP-PASP'ından gelebilecek olan protein fraksiyonlarının ayrılması için örnekler üzerine kimyasal reaktif (Biggs-Szjarto çözeltisi) ilave edilmiştir. 25 g çinko asetat dihidrat ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) ve 12.5 g fosfotungstik asit monohidrat ($W_{12}O_{36} \cdot H_3PO_4 \cdot 2H_2O$) 200 mL'lik balonjojeye alınıp 100 mL saf suda çözündürülmüş ve üzerine 20 mL asetik asit ilave edildikten sonra saf su ile 200 mL'ye tamamlanarak Biggs-Szjarto çözeltisi hazırlanmıştır. Başlangıç besi ortamı örneklerinden 3'er mL santrifüj tüplerine alınıp üzerlerine hazırlanan çözeltiden 1.2 mL ilave edilerek beş defa çalkalanmış ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu işlem iki kez daha tekrar edildikten sonra tüpler santrifüj edilmiştir. Ayrılan üst fazdan örnek alınıp yeterli oranda seyreltildikten sonra tüplere 0.1 g örnek tartılmış, üzerlerine 250 μ L %4'lük fenol çözeltisi ilave edilip 5 dk. beklenmiş ve daha sonra 2 mL derişik H_2SO_4 ilave edilmiştir. Absorbans ölçümleri UV-Visible

spektrofotometre (Thermo Scientific, Evolution Array, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak 492 nm’de gerçekleştirilmiştir. Laktoz, süt şekeri, PAS kurumaddesinin yaklaşık %75’ini oluşturmaktadır ve sudan sonraki ana bileşenidir (Kosikowski 1979; Macwan vd. 2016). Çalışma boyunca toplam karbonhidrat analizi ile besiyeri içeriğindeki şeker miktarları belirlenmiştir ve tezin devamında da “toplam karbonhidrat” miktarından bahsedilirken “şeker” terimi kullanılacaktır.

3.11.2. Azotlu madde miktarının belirlenmesi

DP-PASP’leri ve fermentasyon besi ortamlarının başlangıç azot miktarı Kjeldahl yöntemine göre belirlenmiştir. Bunun için Kjeldahl tüplerine yeterli miktarda örnek tartılmış, üzerlerine katalizör (kjeldahl tableti) (Merck, Darmstadt, Almanya) konulduktan sonra 10 mL derişik sülfirik asit ilave edilmiştir. Daha sonra kjeldahl tüpleri yakma ocağına yerleştirilerek, kademeli sıcaklık artışı ile 400°C’de yakma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yanma işleminden sonra oda sıcaklığına soğutulan kjeldahl tüpleri distilasyon ünitesine yerleştirilmiş ve %40 NaOH çözeltisi ile distile edilmiş, destilat içerisinde 30 mL %4 borik asit çözeltisi ve indikatör bulunan 250 mL erlende toplanmıştır. Destilat 0.1 N HCl ile titre edilmiştir (Anonim 2000).

$$\text{Örnekte azot miktarı, \%} = \frac{(\text{mL } 0.1 \text{ N HCl})(0.14) \cdot F}{\text{örnek miktarı, g}}$$

(F: Kullanılan HCl asit çözeltisi için hesaplanan faktör değerini ifade etmektedir)

3.12. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Erlenlerden alınan örneklerde şeker, kuru biyokütle, yağ miktarları belirlendikten sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- Şeker tüketimi (g/L) = $\Delta S = S_0 - S_s$
- Biyokütle üretimi (g/L) = $X = X_s - X_0$
- Yağ üretimi (g/L) = P_L
- GLA üretimi (g/L) = P_{GLA}
- Biyokütle yağ içeriği (%) = $(P_L / X) \times 100$
- GLA/Yağ oranı (%) = $(P_{GLA} / P_L) \times 100$
- GLA/Biyokütle oranı (%) = $(P_{GLA} / X) \times 100$
- Verim (%)
 - Biyokütle verimi ($Y_{X/S}$) = $(X / \Delta S) \times 100$
 - Yağ verimi ($Y_{L/S}$) = $(P_L / \Delta S) \times 100$
 - GLA verimi ($Y_{GLA/S}$) = $(P_{GLA} / \Delta S) \times 100$
- Maksimum tüketim oranı (g/L/gün)
- Maksimum hacimsel verimlilik (g/L/gün)
- Spesifik üreme hızı (1/gün)
- Canlı hücrelerin iki katına çıkma süresi (Doubling time) (gün) belirlenmiştir.

Maksimum hacimsel verimlilik, maksimum tüketim ve spesifik gelişme oranı da;

- Üreme Hızı (g/L/gün) = Biyokütle kurvesinin en dik kısmının eğimi,
- Maksimum hacimsel verimlilik (g/L/gün) = Yağ kurvesinin en dik kısmının eğimi,

- Tüketim oranı (g/L/gün) = Şeker kurvesinin en dik kısmının eğimi,
- Spesifik üreme hızı (gün⁻¹) = $\ln x$ 'e karşı zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi 2008).
- S_0 : Başlangıç subtrat konsantrasyonu (g/L)
- S_s : Fermentasyon sonunda besi ortamındaki subtrat konsantrasyonu (g/L)
- X_0 : Fermentasyon başlangıcında ortama inoküle edilen biyokütle miktarı (g/L)
- X_{10} : Fermentasyon sonunda elde edilen biyokütle miktarı (g/L)

3.13. Çalışmanın Deneme Deseni

Substrat olarak DP-PASP'ın kullanıldığı ve *Mortirella isabellina* DSM 1414 ile GLA içeriği bakımından zengin mikrobiyal yağ üretimi için fermentasyon koşullarının optimize edildiği bu tez çalışmasında ilk etapta "her defada tek etken metodu (one factor at a time)" ile fermentasyon başlangıç pH değeri, azot kaynağı ve aşılama oranı belirlenmiştir. En yüksek GLA üretiminin elde edildiği şartlar seçilerek ikinci aşamaya geçilmiştir. İkinci aşamada; fermentasyona ait başlangıç şeker miktarı, karıştırma hızı ve sıcaklık, "cevap yüzey metodu (response surface methodology)" ile optimize edilmiştir. Her defada tek etken metodu ile 15, cevap yüzey metodu ile 15 olmak üzere farklı fermentasyonlar gerçekleştirilmiş, cevap yüzey metodu verileri doğrultusunda elde edilen optimum koşullarla yapılan doğrulama denemesi ile birlikte toplamda 31 deneme gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışma boyunca fermentasyon belirlenen koşullar altında 10 gün boyunca sürdürülmüştür (Fakas vd. 2009d).

3.13.1. Her defada tek etken metodu deneme deseni

Her defada tek etken metodu ile parametrelerin optimize edildiği fermentasyon işlemleri, 28 ± 1 °C sıcaklıkta ve 180 d/dk. çalkalama hızında, besi ortamı başlangıç şeker miktarı 30 g/L olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Kavadia vd. 2001). Bu aşamada ilk olarak besi ortamı başlangıç pH değerinin optimize edilmesi sağlanmıştır. Bu fermentasyonlar esnasında kullanılan besi ortamı, şeker miktarı 30 g/L olacak şekilde konsantre DP-PASP seyreltilerek hazırlanmıştır. Yine DP-PASP'e 1 g/L düzeyinde amonyum sülfat ve 0.5 g/L maya özütü ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamından 95'er mL alınarak 250 mL hacimli dalgakıranlı erlenlere aktarılmış, ağzları özel silikon sünger kapaklar ile kapatıldıktan sonra 121°C'de 15dk. sterilize edilmiştir. Ardından oda sıcaklığına soğutulan besi ortamlarına daha önceden hazırlanan ön kültürden 5'er mL (%5) aşılama yapılarak 100'er mL'lik fermentasyon ortamları elde edilmiştir. Farklı substratlarlar kullanılarak *M. isabellina* ile GLA üretimi için pH optimizasyonu yapılan önceki çalışmalarda pH 5 ile 9 aralığında denemeler yapılmış ve pH değerinin 8'in üzerine çıkması ile GLA üretiminin azaldığı bildirilmiştir (Xian vd. 2001, 2002, 2003). Bu veriler dikkate alınarak elde edilen besi ortamlarının pH değerleri, daha önceden hazırlanıp sterilize edilen 1M NaOH ve 1M HCl kullanılarak, aseptik koşullar altında pH 4, 5, 6, 7 ve 8 olacak şekilde ayarlanmış ve fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamalarına, elde edilen GLA miktarının en yüksek olduğu belirlenen besi ortamı başlangıç pH değeri ile devam edilmiştir.

İkinci aşamada yine diğer tüm fermentasyon koşulları sabit tutularak sadece azot kaynağı çeşidinin GLA üretimi üzerine etkisi tespit edilmiştir. Bu maksatla her bir azot kaynağı için farklı fermentasyonlar gerçekleştirilmiş, her fermentasyon için ayrı ayrı olmak üzere kullanılan besi ortamına 1.5 g/L düzeyinde amonyum sülfat, et özütü, maya

özütü, potasyum nitrat ve soya peptonu ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamları sterilize edildikten sonra ilk aşamada belirlenen fermantasyon besi ortamı başlangıç pH değeri optimum düzeyine ayarlanarak, %5 inokülasyonlar yapılmıştır. Fermantasyonlar sonunda en yüksek GLA üretiminin gerçekleştiği azot kaynağı seçilmiş, sonraki tüm fermantasyonlarda besi ortamlarının hazırlanmasında belirlenen bu azot kaynağı kullanılmıştır.

Her defada tek etken metodu ile fermantasyon koşullarının saptandığı son aşamada optimum aşılama oranı belirlenmiştir. DP-PASP ve 2. aşamada belirlenen azot kaynağı kullanılarak hazırlanan besi ortamlarından sırayla 91, 93, 95, 97 ve 99 mL alınarak ayrı ayrı 250 mL hacimli dalgakranlı erlenlere aktarılıp sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına soğuyan besi ortamlarına 9, 7, 5, 3 ve 1 mL ön kültür ilave edilerek besi ortamları 100'er mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra besi ortamları başlangıç pH değerleri ilk aşamada belirlenen optimum düzeyine ayarlanarak fermantasyonlar başlatılmış, 10 gün süre sonunda GLA üretiminin en yüksek olduğu aşılama oranı seçilmiştir. Çalışmanın devamına, her seferde tek etken metodu ile belirlenen fermantasyon besi ortamı başlangıç pH değeri, azot kaynağı çeşidi ve aşılama oranı ile devam edilmiştir.

3.13.2. Cevap yüzey metodu deneme deseni

Çalışmanın ikinci aşamasında; en yüksek düzeyde GLA üretimi için fermantasyonlarda kullanılan besi ortamı başlangıç şeker miktarı, fermantasyonlar sırasında uygulanan karıştırma hızı ve sıcaklık parametreleri, "cevap yüzey metodu (response surface methodology)" ile optimize edilmiştir. Besi ortamı başlangıç şeker miktarının, sıcaklık ve karıştırma hızının etkisini belirlemek amacıyla Box-Behnken tasarımıyla kullanılan maksimum ve minimum parametreler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Fermantasyonların optimizasyonu için cevap yüzey metodunda kullanılan parametreler ve parametrelere ait değerler

Değişken	Minimum	Orta Nokta	Maksimum	Referans
Başlangıç şeker konsantrasyonu (g/L)	30	80	130	Kavadia vd. 2001; Dyal vd. 2005; Xing vd. 2012
Çalkalama hızı (d/dk.)	120	180	240	Kavadia vd. 2001; Gu vd. 2018
Sıcaklık (°C)	22	28	34	Kavadia vd. 2001; Hansson ve Dostalek 1988; Gu vd. 2018

Araştırmada farklı başlangıç şeker içeriklerine sahip DP-PAS'da, farklı karıştırma hızları ve sıcaklık değerlerinde fermantasyonlar gerçekleştirilmiş ve bu 3 parametre cevap yüzey metodu ile optimize edilmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri deseni çizelgede ayrıntılı olarak verilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Box- Behnken Tasarımının oluşturduğu fermantasyon şartları

Sıra	Başlangıç şeker miktarı (g/L)	Çalkalama hızı (d/dk.)	Sıcaklık (°C)
1	30	120	28
2	30	180	22
3	30	180	34
4	30	240	28
5	80	120	22
6	80	120	34
7	80	180	28
8	80	180	28
9	80	180	28
10	80	240	22
11	80	240	34
12	130	120	28
13	130	180	22
14	130	180	34
15	130	240	28

3.14. İstatistiksel Analizler

Denemenin ilk aşaması “her defada tek etken (one factor at a time) metodu”na göre kurulmuş ve ikinci aşaması da cevap yüzey metodu ile optimize edilmiştir. Bütün örneklerde analizler iki paralelli yapılmış, denemeler üç tekerrürlü yürütülmüştür. Denemede elde edilen sonuçlara varyans analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır (Düzgüneş vd. 1987). İkinci aşamada optimizasyon için yanıt olarak GLA üretim miktarı seçilmiş ve optimizasyon işlemine ait verilerin istatistiksel analizinde Design Expert (Version 10.0.1; Minneapolis, MN) yazılımı kullanılmıştır. Optimizasyon işlemi için oluşturulan modelin ve faktörlerin varyans analizi (ANOVA) %95 güven seviyesinde belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Her Defada Tek Etken Metodu ile GLA Üretimi İçin Optimum Fermantasyon Koşullarının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında her seferde tek etken metodu ile bazı fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Bu kapsamda ilk olarak besi ortamı başlangıç pH değerleri optimize edilmiş, daha sonra en yüksek GLA üretiminin gerçekleştiği başlangıç pH değeri ile azot kaynağı ve inokülasyon oranları çalışılmıştır. Üretilen mikrobiyal yağlardan en yüksek GLA miktarının elde edildiği şartlar tespit edilerek bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

4.1.1. Besi ortamı başlangıç pH değerinin biyokütle, yağ ve GLA üretimi üzerine etkisi

Çalışmanın başlangıcında besi ortamı pH değerleri sterilizasyon öncesi ayarlanmış ancak sterilizasyon sonrası pH değerlerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca ön kültür inokülasyonunun da besi ortamı pH değerini değiştirebildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle tüm tez çalışması boyunca besi ortamları sterilizasyon sonrası ön kültür ilavesinin ardından steril NaOH ve HCl kullanılarak istenilen pH değerlerine ayarlanmıştır.

Başlangıç substrat içeriği 30 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/L ve maya özütü 0.5 g/L olacak şekilde besi ortamları hazırlanmıştır. Besi ortamı başlangıç pH değerinin optimize edilmesi kapsamında fermantasyon besi ortamları ayrı ayrı olmak üzere 4, 5, 6, 7 ve 8 pH değerlerine ayarlanarak 28 °C 180 d/dk. çalkalama hızında 10 günlük fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Başlangıç pH değerinin 4 olduğu besi ortamında yapılan fermantasyonlara ait analizlerde, azot miktarı 0.92 g/L; şeker miktarı 30.15 g/L; kül içeriği %0.19 olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 4.28 olduğu, 11.41 g/L biyokütle, 3.35 g/L mikrobiyal yağ ve 0.43 g/L GLA üretiminin gerçekleştiği saptanmıştır. Elde edilen biyokütlelerin yağ içeriğinin %29.32 (g mikrobiyal yağ/g kuru biyokütle) olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon süresince besi ortamındaki şekerin tamamı kullanılmıştır. Biyokütle ($Y_{X/S}$), yağ ($Y_{L/S}$) ve GLA ($Y_{GLA/S}$), verimlerinin sırasıyla %37.88, %11.12 ve %1.42 olduğu bulunmuştur.

Besi ortamı başlangıç pH değerinin 5 olduğu fermantasyonlara ait analizlerde; azot miktarının 0.90 g/L, şeker miktarının 28.5 g/L ve kül içeriğinin ise %0.20 olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 5.59'a yükseldiği ve az miktarda şekerin (0.26 g/L) tüketilmeden besi ortamında kaldığı, 10.32 g/L biyokütle, 2.74 g/L mikrobiyal yağ ve 0.35 g/L GLA üretiminin gerçekleştiği saptanmıştır. Biyokütle ($Y_{X/S}$), yağ ($Y_{L/S}$) ve GLA verimlerinin ($Y_{GLA/S}$) ise sırasıyla %36.58, %9.72, %1.24 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen biyokütlelerin yağ içeriği %26.55 iken, mikrobiyal yağdaki GLA içeriğinin %12.71 olduğu saptanmıştır.

Başlangıç pH değerinin 6 olduğu besi ortamında yapılan analizlerde; azot miktarı 0.92 g/L, şeker miktarı 31.15 g/L ve kül içeriği %0.20 olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin neredeyse hiç değişmediği (pH 6.06) ve 2.42 g/L şekerin ortamda kullanılmadan kaldığı, 10.04 g/L biyokütle, 3.23 g/L mikrobiyal yağ ve 0.48 g/L GLA üretiminin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Biyokütle ($Y_{X/S}$), yağ ($Y_{L/S}$) ve GLA ($Y_{GLA/S}$) verimlerinin sırasıyla %35.04, %11.27 ve %1.68 olduğu belirlenmiştir.

Başlangıç pH değerinin 7 olduğu besi ortamlarında yapılan analizlerde; azot ve şeker miktarı ile kül içeriklerinin sırasıyla 0.91 g/L, 30.00 g/L ve %0.20 olduğu saptanmıştır. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 6.10'a düştüğü ve 3.37 g/L şekerin ortamda harcanmadan kaldığı, 10 gün sonunda 9.02 g/L biyokütle, 2.88 g/L mikrobiyal yağ ve 0.55 g/L GLA üretiminin gerçekleştiği bulunmuştur. Biyokütle ($Y_{X/S}$), yağ ($Y_{L/S}$) ve GLA ($Y_{GLA/S}$) verimlerinin sırasıyla %34.94, %11.14 ve %2.07 olduğu tespit edilmiştir.

Besi ortamı başlangıç pH değerinin 8 olduğu örneklerde yapılan analizlerde; azot ve şeker miktarının sırasıyla 1.0 g/L ve 30.84 g/L, kül içeriğinin ise %0.21 olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 5.56'ya düştüğü ve 7.62 g/L şekerin ortamda kullanılmadan kaldığı, 7.64 g/L biyokütle, 2.59 g/L mikrobiyal yağ ve 0.42 g/L GLA üretiminin gerçekleştiği saptanmıştır. Biyokütle ($Y_{X/S}$), yağ ($Y_{L/S}$) ve GLA ($Y_{GLA/S}$), verimlerinin ise sırasıyla %33.00, %11.17, %1.80 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen biyokütlerin yağ içeriği %33.75 iken, mikrobiyal yağdaki GLA içeriğinin %16.25 olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.1'de fermantasyonlar sonucunda üretilen biyokütle ve yağ miktarları ile şeker tüketimi ve bunlardan elde edilen verilerin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları verilmiştir. Her bir deneme için biyokütle ve yağ üretimi (g/L), kuru biyokütle yağ içeriği (yağ miktarı g/kuru biyokütle g, %) ve şeker tüketimi (g/L) arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Biyokütle verimine ($Y_{X/S}$) dair veriler karşılaştırıldığında ise sadece pH 4 ve pH 8'den elde edilen değerlerdeki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.05$) tespit edilmiştir. En yüksek biyokütle ve yağ üretimine (sırasıyla, 11.41 g/L ve 3.35 g/L) besi ortamı başlangıç pH değerinin 4 olduğu fermantasyonlarda ulaşılmıştır.

Çizelge 4.1. Besi ortamı farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermantasyonlara ait biyokütle ve yağ üretim miktarları, şeker tüketim miktarları, biyokütle yağ içerikleri ve biyokütle verimlerine ait ortalama değerler ($X \pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Başlangıç pH Değeri	Kuru Biyokütle (g/L)	Yağ (g/L)	Biyokütle Yağ İçeriği (% g/g)	Şeker Tüketimi (g/L)	Biyokütle verimi (% g/g)
pH 4	11.41 ^a ±0.26	3.35 ^a ±0.14	29.32 ^{bc} ±1.09	30.15 ^a ±0.62	37.88 ^a ±0.89
pH 5	10.32 ^b ±0.33	2.74 ^c ±0.17	26.55 ^c ±1.32	28.24 ^b ±0.28	36.58 ^{ab} ±1.24
pH 6	10.04 ^b ±0.36	3.23 ^{ab} ±0.10	32.22 ^{ba} ±0.99	28.67 ^b ±0.36	35.04 ^{ab} ±1.45
pH 7	9.02 ^c ±0.15	2.88 ^{bc} ±0.04	31.89 ^{ba} ±0.50	26.63 ^c ±0.26	34.93 ^{ab} ±0.60
pH 8	7.64 ^d ±0.31	2.59 ^c ±0.19	33.75 ^a ±1.06	23.23 ^d ±0.24	33.00 ^b ±1.49

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$)

$X \pm SE$: Ortalama±standart hata

Çizelge 4.2'de besi ortamı farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermantasyonlardan elde edilen GLA miktarı, GLA verimi, yağ verimi, GLA/Yağ oranı ve GLA/Biyokütle oranı değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları verilmiştir. GLA üretimine ait değerler incelendiğinde; en düşük GLA üretim ve veriminin besi ortamı başlangıç pH değerinin 5 olduğu (0.35 g/L; %1.24), en yüksek GLA

üretim ve veriminin (0.55 g/L, %2.07) ise besi ortamı başlangıç pH değerinin 7 olduğu fermentasyon sonucu elde edildiği görülmektedir. Yağ verimlerine ait değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı ($P>0.05$) belirlenmiştir. GLA verimi (%), GLA/Yağ (%) ve GLA/Biyokütle (%) oranları arasındaki fark ise istatistiksel olarak ($P<0.05$) anlamlı bulunmuştur.

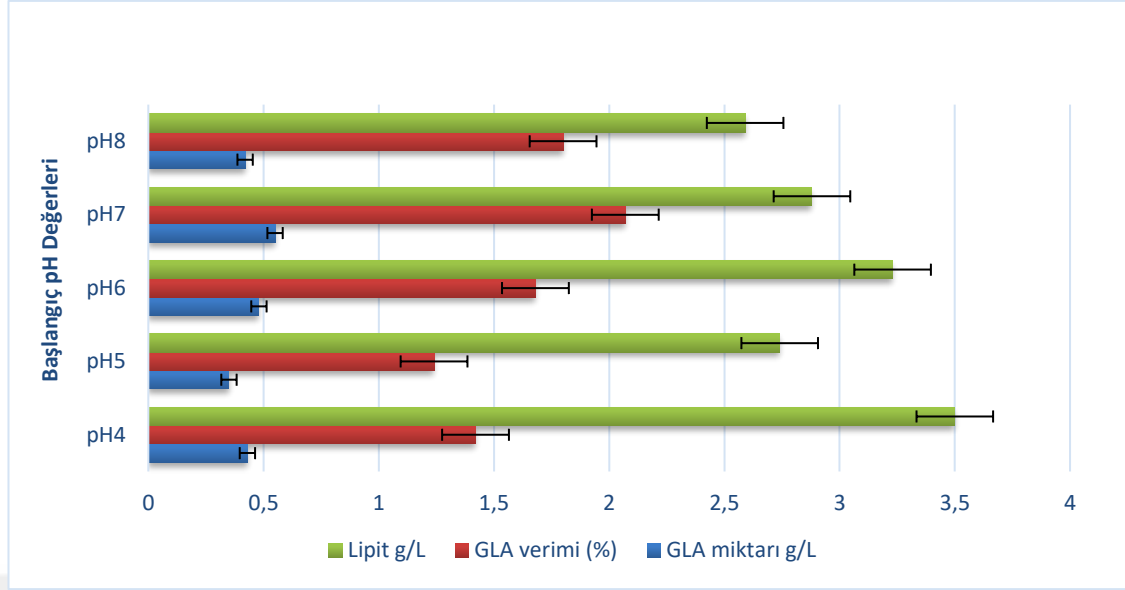
Çizelge 4.2. Besi ortamı farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermentasyonlarda elde edilen GLA miktarlarına ve yağ verimine ait ortalama değerleri ($X\pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Başlangıç pH Değeri	GLA (g/L)	GLA Verimi (% g/g)	Yağ verimi (% g/g)	GLA/Yağ (% g/g)	GLA/Biyokütle (% g/g)
pH 4	0.43 ^{bc} $\pm$ 0.03	1.42 ^{cd} $\pm$ 0.09	11.12 $\pm$ 0.59	12.77 ^c $\pm$ 0.34	3.75 ^c $\pm$ 0.21
pH 5	0.35 ^c $\pm$ 0.03	1.24 ^d $\pm$ 0.10	9.72 $\pm$ 0.65	12.71 ^c $\pm$ 0.20	3.38 ^c $\pm$ 0.21
pH 6	0.48 ^{ba} $\pm$ 0.03	1.68 ^{bc} $\pm$ 0.13	11.27 $\pm$ 0.44	14.87 ^b $\pm$ 0.73	4.78 ^b $\pm$ 0.20
pH 7	0.55 ^a $\pm$ 0.02	2.07 ^a $\pm$ 0.09	11.14 $\pm$ 0.26	18.52 ^a $\pm$ 0.42	5.91 ^a $\pm$ 0.17
pH 8	0.42 ^{bc} $\pm$ 0.02	1.80 ^{ab} $\pm$ 0.08	11.17 $\pm$ 0.83	16.25 ^b $\pm$ 0.50	5.48 ^a $\pm$ 0.02

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$ düzeyinde önemli)

$X\pm SE$: Ortalama $\pm$ standart hata

Veriler karşılaştırıldığında; en yüksek biyokütle ve mikrobiyal yağ üretiminin, besi ortamı başlangıç pH değerinin 4 olduğu fermentasyonlar sonucu elde edildiği, pH değerinin yükselmesiyle biyokütle ve yağ üretiminin azalma gösterdiği belirlenmiştir. Kuru biyokütle yağ içerikleri bütün fermentasyonlarda birbirine yakın değerler verirken, en yüksek biyokütle üretiminin, besi ortamı başlangıç pH değerinin 4 olduğu fermentasyonda gerçekleşmesi, elde edilen mikrobiyal yağ miktarının da bu fermentasyonda yüksek olması ile sonuçlanmıştır. Başlangıç pH değerinin biyokütle yağ içeriği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. En yüksek GLA üretimi ve verimi başlangıç pH değerinin 7 olduğu fermentasyonlarda görülmüştür (Şekil 4.1). Bu nedenle çalışmanın devamında, besi ortamı başlangıç pH değeri, en yüksek GLA üretiminin (g/L) gerçekleştiği değer olan 7'ye ayarlanarak fermentasyonlar başlatılmıştır.



Şekil 4.1. Besi ortamı farklı başlangıç pH değerlerine sahip fermantasyonlarda elde edilen GLA ve lipit üretimi (g/L) ile GLA verimi (%) değerleri

Besiyeri bileşenlerinin ve kültür koşullarının *Trichosporon fermentan*'ın biyokütle ve lipit üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada 160 d/dk. çalkalama hızında, 25°C'de, 100 g/L glikoz içeren besiyerlerinde yedi gün süresince fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Başlangıç pH değerinin etkisi 4-10 aralığında incelenmiş, pH 4'den pH 6.5 değerine artış ile biyokütle ve lipit üretimi ile biyokütle lipit içeriğinde doğrusal artış gözlemlenmiştir. Biyokütle ve lipit üretimi ile biyokütle lipit içeriği pH 6.5'de en yüksek seviyeye ulaşmış (sırasıyla 28.1 g/L, 17.5 g/L ve %62.4), pH değeri 7'ye yükseltildiğinde ise bu değerlerde küçük bir miktar azalma olmuştur (27.9 g/L, 17.3 g/L ve %61.9). Bu noktadan sonra pH değeri yükseldikçe biyokütle ve lipit üretimi ile biyokütle lipit içeriği azalmaya devam etmiştir (Zhu vd. 2008). Yapılan bu tez çalışmasında ise başlangıç pH değeri yükseldikçe biyokütle üretimi azalmıştır. Yağ üretimi ve biyokütle yağ içeriği de başlangıç pH değerine bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

Mortierella ramanniana var. *ramanniana*'nın kullanıldığı, GLA üretimini azami seviyeye ulaştırmak için yapılan bir çalışmada, fermantasyon başlangıç pH değeri olarak 1.00-14.00 aralığındaki değerler seçilmiş ve en yüksek verime (yağ miktarı/g kuru biyokütle, %) fermantasyon başlangıç pH değerinin 5 olduğu üretimde ulaşıldığı bildirilmiştir (Dyal vd. 2005). Leman ve Brakoniecka-Sikorska (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, gelişme şartlarının yağ biyosentezi üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* IFO 8187 kullanılarak pH, sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkisi araştırılmış, yağdaki en yüksek GLA miktarına 30°C'de, pH 5'de gerçekleştirilen fermantasyon koşullarında 48 saatlik inkübasyon sonucu ulaşıldığı bildirilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen yağdaki GLA oranı %8.2 iken bahsi geçen önceki çalışmada elde edilen yağdaki en yüksek GLA oranı %18.52 bulunmuştur.

Biyodizel üretimi için *Lipomyces starkeyi* kullanarak arıtma çamurunun lipite dönüştürülmesi için yapılan bir çalışmada 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0 başlangıç pH değerleri

seçilmiş, en yüksek biyokütle lipit içeriğinin (%56) pH 5’de, en yüksek lipit üretiminin (7.7 g/L) ise pH 6.5’de gerçekleştiği bildirilmiştir (Angerbauer vd. 2008).

Heterotrofik koşullar altında mikroalg gelişimi için en uygun pH'nın belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, *Chlorella vulgaris* kullanılarak pH'nın hücre içi lipit birikimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kükürt sınırlaması altında geliştirilen hücreler için en yüksek biyokütle üretimi ve lipit birikimi optimal olarak pH 7.5’de tespit edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda yağ asidi bileşiminin pH ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Sakarika ve Kornaros 2016).

Mortierella alpina CBS 343.66 suşunun kullanıldığı bir çalışmada, yüksek PUFA içeren biyokütle ve lipit üretimi için kültür koşullarını optimize etmek amacıyla farklı pH, sıcaklık ve karbon kaynakları denenmiştir. Çalışmada 5.5, 6.5, 7.5 ve 8.5 pH denemeleri 25°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. En yüksek lipit üretimi (2.6 g/L) pH 6.5’de 65 saatlik inkübasyon sonucu gerçekleşmiş ve lipitteki GLA oranı %7 (w/w) olarak tespit edilmiştir. Lipitteki en yüksek GLA oranına (%16) ise pH 7.5’de 65 saatlik inkübasyon sonucu ulaşılmış, ancak bu pH değerindeki lipit üretimi 1.1 g/L olarak gerçekleşmiştir (Lindberg ve Molin 1993).

Derin kültür fermantasyonunun çeşitli proses parametrelerinin GLA üretimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, *Mucor* sp. RRL001 kullanılarak pH 4.0 ile 8.0 değerleri arasında denemeler gerçekleştirilmiştir. Araştırmada lipitteki en yüksek GLA oranı (%8.3) pH 5.0’de, en yüksek GLA üretimi (0.64 g/L) ise pH 6.5’de yürütülen denemelerden elde edilmiştir (Ahmed vd. 2006).

Mortierella isabellina ile yapılan çalışmalara gelindiğinde; hegzadekanolün substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada, kültür şartlarının GLA üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. *Mortierella isabellina* XM-3 suşunun kullanıldığı belirtilen çalışmada, 28°C’de beş gün süren fermantasyonlarda, pH 5 ile 9 değerleri arasında denemeler gerçekleştirilmiştir. En yüksek GLA miktarının (0.32 mg/mL, 24.6 mg/g kuru biyokütle) pH 6’daki denemelerden elde edildiği bildirilmiştir (Xian vd. 2001). Başka bir çalışmada *M. isabellina*, %1 maya özütü %2 oktadekanol ve %0.1 Tween 80 içeren bir ortamda 28°C’de beş gün boyunca inkübe edilmiş, GLA miktarı (g/L) ve içeriğinin (%) bu koşullar altında, pH değerinin 5’den pH 7’ye çıkarılmasıyla yükseldiği ve pH 7’de maksimuma ulaştığı, ardından da hafif alkali koşullar altında (pH 8’den 9’a) azalmaya başladığı tespit edilmiştir (Xian vd. 2002).

Parçalanmış *M. isabellina* miselleri kullanılarak GLA üretimini optimize etmek için yapılan başka bir çalışmada, %2 hegzadekanol (w/v) ve %1 maya özütü ile hazırlanmış besi ortamında 28°C’de beş gün boyunca 5.0 ila 9.0 arasında değişen pH değerlerinde inkübe edilmiştir. GLA üretiminin, pH değeri yükseldikçe arttığı ve pH 7’de en yüksek değerine (78.6 mg/g kuru biyokütle) ulaştığı saptanmıştır (Xian vd. 2003). Sonuçlar karşılaştırıldığında, elde edilen bu GLA miktarının, tez çalışmamızdan elde edilen biyokütlerdeki GLA içeriğinden (% g/g kuru biyokütle) %5.91 (59.1 mg/g kuru biyokütle) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin de bahsi geçen çalışmada kullanılan 16 karbonlu uzun zincirli yağ alkolü olan hegzadekanolün, mikroorganizmalar tarafından daha etkili bir şekilde uzun zincirli yağ asitlerine dönüştürülebilmesinden ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Fermantasyon başlangıç pH değerinin genel olarak mikroorganizmaların biyokütle ve yağ üretimi üzerinde etkili olduğu gibi, GLA üretimi üzerinde de etkili olduğu görülmektedir. Lipit, biyokütle ve GLA üretimi için optimum pH değerinin mikroorganizmaya göre değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Ayrıca önceki çalışmalarda, aynı mikroorganizmanın farklı substrat üzerinde geliştirilmesinin de GLA üretimi için optimum pH değerini etkileyebileceği görülmüştür (Xian vd. 2001; Xian vd. 2002). Bu tez çalışmasının sonucunda, peyniraltı suyu kullanılarak *Mortierella isabellina* ile GLA üretimi için optimum fermantasyon başlangıç değeri pH 7 olarak belirlenmiştir.

4.1.2. Besi ortamında kullanılan farklı azot kaynaklarının biyokütle, yağ ve GLA üretimi üzerine etkisi

Azot kaynaklarının GLA üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan fermantasyonlarda amonyum sülfat, et özütü, maya özütü, potasyum nitrat ve soya peptonu kullanılmıştır. Her bir besi ortamının pH değeri fermantasyonlar başlatılmadan önce pH 7 olarak ayarlanmıştır.

Azot kaynağı olarak amonyum sülfatın kullanıldığı besi ortamlarında yapılan analizlerde azot miktarı 0.91 g/L, şeker miktarı ise 27.60 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 4.77'ye düştüğü ve 0.31 g/L şekerin ortamda kullanılmadan kaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen biyokütle miktarının 9.67 g/L, lipit miktarının ise 3.27 g/L olduğu saptanmıştır. Biyokütle yağ içeriği ise %33.44 olarak bulunmuştur. Fermantasyonlar sonucu %1.45 verim ($Y_{GLA/S}$) ile 0.39 g/L GLA üretimi gerçekleşmiştir.

Azot kaynağı olarak et özütünün kullanıldığı besi ortamlarında yapılan analizlerde azot miktarı 0.64 g/L, şeker miktarı 30.11 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinde çok az bir azalma olduğu (pH 6.88) ve 8.44 g/L şekerin ortamda kullanılmadan kaldığı tespit edilmiştir. Sonuçta 7.36 g/L biyokütle ve 4.06 g/L mikrobiyal yağ üretimi gerçekleşmiştir. Üretilen GLA miktarının 0.63 g/L olduğu saptanmış ve GLA verimi %2.92 olarak hesaplanmıştır.

Maya özütünün azot kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamlarında yapılan analizlerde azot miktarı 0.66 g/L, şeker miktarı ise 28.57 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinde nerede ise bir değişiklik olmadığı (6.99) ve ortamda 6.74 g/L şekerin kullanılmadan kaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen biyokütle miktarı 7.92 g/L iken mikrobiyal yağ miktarı 4.38 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda %3.20 verimle 0.70 g/L GLA üretimi gerçekleşmiştir.

Azot kaynağı olarak potasyum nitratın kullanıldığı besi ortamlarında yapılan analizlerde azot miktarının 0.61 g/L, şeker miktarının ise 32.69 g/L olduğu saptanmıştır. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinde nerede ise değişmeden aynı kaldığı (7.05) ve 10.98 g/L şekerin ortamda harcanmadan kaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen biyokütle miktarının 3.00 g/L, mikrobiyal yağ miktarının ise 1.93 g/L olduğu saptanmıştır. Fermantasyonlar sonucu %1.45 verim ile 0.39 g/L GLA üretimi gerçekleşmiştir.

Soya peptonunun azot kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamlarında yapılan analizlerde azot miktarı 0.68 g/L, şeker miktarı 29.59 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin bir miktar yükselerek 7.13 değerine

ulaştığı ve ortamda 3.29 g/L şekerin kullanılmadan kaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen biyokütle miktarı 6.55 g/L, mikrobiyal yağ miktarı 3.52 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda %1.16 verimle 0.26 g/L GLA üretimi gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.3’de farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan fermantasyonlar sonucunda elde edilen biyokütle ve yağ miktarları, biyokütle yağ içeriği, şeker tüketimi ve biyokütle verimi değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları verilmiştir. Biyokütle üretimin en yüksek olduğu fermantasyon, amonyum sülfat kullanılan besi ortamında, en düşük olduğu fermantasyon ise potasyum nitrat ile hazırlanan besi ortamlarında gerçekleşmiştir. Veriler karşılaştırıldığında her bir denemeden elde edilen biyokütle (g/L) ve yağ üretimleri (g/L) arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). En yüksek biyokütle verimi ($Y_{X/S}$) ve yağ üretimi (g/L) maya özütünün kullanıldığı fermantasyonlardan elde edilmiştir. Biyokütle üretim miktarının en yüksek ve biyokütle yağ içeriğinin en düşük olduğu fermantasyon ise amonyum sülfatın kullanıldığı fermantasyondur. Buna, amonyum sülfat ile hazırlanan besi ortamındaki azot miktarının yüksek olmasından dolayı, mikroorganizmanın hücresel olarak gelişmeye devam ederek lipid birikimine geç başlamasının sebep olduğu düşünülmektedir. Zira mikrobiyal hücrelerde lipid birikim prosesi, ortamdaki azotun tükenmesi ile başlamaktadır. Biyokütlerdeki yağ oranının en yüksek olduğu (%64.39) potasyum nitrat ile gerçekleştirilen fermantasyondan elde edilen sonuçlar da buna ispat olarak gösterilebilir. Çünkü potasyum nitrat ile durum aynı iddiayı desteklemektedir. Başlangıç azot miktarı düşük olan potasyum nitrat içeren besi ortamında gerçekleştirilen fermantasyonlarda biyokütle üretimi düşükken, elde edilen biyokütlerdeki yağ oranı ise oldukça yüksektir.

Çizelge 4.3. Farklı azot kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonlarda üretilen biyokütle ve yağ miktarları, şeker tüketim miktarları, biyokütle yağ içerikleri ve biyokütle verimlerine ($X \pm SE$) ait ortalama değerler ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Azot Kaynağı	Kuru Biyokütle (g/L)	Yağ (g/L)	Biyokütle Yağ İçeriği (% g/g)	Şeker Tüketimi (g/L)	Biyokütle Verimi (% g/g)
Amonyum sülfat	9.67 ^a ±0.26	3.27 ^c ±0.12	33.44 ^c ±0.88	27.29 ^a ±0.13	35.43 ^a ±0.90
Et Özütü	7.36 ^c ±0.16	4.06 ^b ±0.09	55.11 ^b ±0.42	21.67 ^b ±0.75	32.85 ^a ±1.67
Maya Özütü	7.92 ^b ±0.09	4.38 ^a ±0.11	55.41 ^b ±1.46	21.82 ^b ±0.40	36.33 ^a ±0.70
Potasyum Nitrat	3.00 ^e ±0.04	1.93 ^d ±0.06	64.39 ^a ±2.31	22.51 ^b ±0.41	13.37 ^c ±0.27
Soya Peptonu	6.55 ^d ±0.13	3.52 ^c ±0.13	53.85 ^b ±1.97	26.31 ^a ±1.74	25.63 ^b ±2.27

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir $P<0.05$

$X \pm SE$: Ortalama±standart hata

Çizelge 4.4’de farklı azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyonlarda elde edilen GLA miktarı, GLA verimi, yağ verimi, GLA/lipit oranı ve GLA/biyokütle oranı değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları verilmiştir. Veriler incelendiğinde GLA üretimleri ve GLA verimleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) olduğu görülmektedir. Mikrobiyal yağlardaki GLA oranları karşılaştırıldığında, et özütü, maya özütü ve soya peptonundan elde edilen verilerin birbirine çok yakın olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın olmadığı ($P>0.05$) görülmektedir.

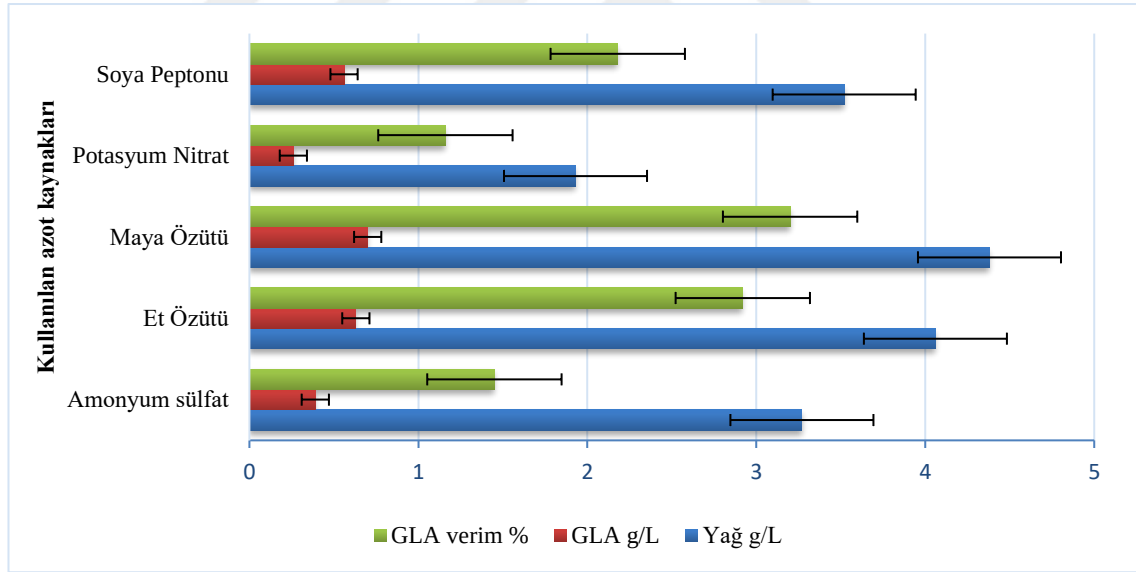
Çizelge 4.4. Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyonlarda üretilen GLA miktarlarına ve yağ verimine ($X \pm SE$) ait ortalama değerler ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Azot Kaynağı	GLA (g/L)	GLA verim (% g/g)	Yağ verimi (% g/g)	GLA/Yağ (% g/g)	GLA/Biyokütle (% g/g)
Amonyum sülfat	0.39 ^d ±0.02	1.45 ^c ±0.08	12.04 ^b ±0.42	12.03 ^c ±0.40	4.03 ^b ±0.19
Et özütü	0.63 ^b ±0.01	2.92 ^a ±0.10	18.87 ^a ±0.93	15.54 ^a ±0.34	8.56 ^a ±0.18
Maya özütü	0.70 ^a ±0.020	3.20 ^a ±0.13	20.15 ^a ±0.78	15.87 ^a ±0.34	8.79 ^a ±0.25
Potasyum Nitrat	0.26 ^e ±0.008	1.16 ^c ±0.022	8.59 ^c ±0.24	13.63 ^b ±0.41	8.74 ^a ±0.25
Soya Peptonu	0.56 ^c ±0.033	2.18 ^b ±0.191	13.70 ^b ±1.06	15.91 ^a ±0.75	8.58 ^a ±0.54

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir $P < 0.05$

$X \pm SE$: Ortalama±standart hata

Şekil 4.2’de farklı azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyonlara ait GLA ve yağ üretimleri (g/L) ile GLA verimi (%) değerleri verilmiştir. Şekil incelendiğinde, en yüksek yağ ve GLA üretimi ile en yüksek GLA veriminin maya özütünün azot kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyonlar sonucu elde edildiği görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda çalışmanın devamında azot kaynağı olarak maya özütü kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyonlara ait GLA ve lipid üretim değerleri (g/L) ve GLA verimi (%) sonuçları

Yapılan bir çalışmada yağlı mayalarda farklı azot kaynaklarının lipid birikimine etkisinin 17 farklı maya türü ve suşu üzerinde incelendiği bir çalışma yapılmıştır. elde edilen veriler doğrultusunda çalışmaya *Rhodospiridium toruloides* ile devam edilmiştir. Çalışmada ilk aşamada NH_4Cl , asparjin ve glutamat azot kaynağı olarak incelenmiştir. Organik azot kaynaklarının, *Rhodospiridium toruloides* suşunda önemli ölçüde lipid içeriğini yükselttiği bildirilmiştir. Azot kaynağı olarak NH_4Cl kullanıldığında Rs.

toruloides CBS 14 suşunda %18 olan lipit birikiminin, glutamat, üre veya arginin kullanıldığında %50'nin üzerine çıktığı tespit edilmiştir (Evans ve Ratledge 1984).

Cryptococcus albidus var. *albidus* mayası ile yapılan bir çalışmada kültür şartlarının üretilen lipitteki yağ asidi bileşimine etkisi incelenmiş, bu kapsamda farklı karbon ve azot kaynakları ile sıcaklığın etkisi belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, üre, L-glutaminat, L-arjinin, L-ornitin, L-prolin kullanılmış; en yüksek biyokütle üretimi (10.0 g/L) L-glutaminatın kullanıldığı besi ortamından, en yüksek yağ oranının (%42.0 w/w biyokütle) NH_4Cl 'nin kullanıldığı besi ortamından elde edildiği bildirilmiştir (Hansson ve Dostalek 1986).

Kültür şartlarının misel gelişimi ve GLA üretimi üzerine etkisinin incelendiği başka bir araştırmada öncelikle dört farklı *Mortierella* suşu çalışılmıştır, en iyi GLA üretimini gerçekleştiren *M. ramnanniana* CBS 112.08 suşu ile çalışmalara devam edilmiştir. Azot kaynağı olarak KNO_3 , NH_4Cl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır. Azot kaynağı denemesinin ilk aşaması 50 g/L glikoz ile hazırlanan, C/N oranının 20 olduğu besi ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfatla çalışılan fermantasyonlarda yağ üretimi gerçekleşmezken, en iyi yağ üretiminin (%15.7 lipit/biyokütle) KNO_3 'ün kullanıldığı fermantasyonlardan elde edildiği bildirilmiştir. Sonraki aşamada 1.0 g/L KNO_3 (C/N=86) ve 0.5 g/L KNO_3 (C/N=173) olacak şekilde potasyum nitrat oranları çalışılmıştır. En yüksek GLA üretim oranının (%16.9 w/w lipit) 1.0 g/L KNO_3 içeren besi ortamları ile gerçekleştirilen fermantasyonlardan edildiği ve bu fermantasyonlarda 10.8 g/L biyokütle üretimi gerçekleştiği, bu biyokütlelerin lipit içeriğinin de %23 olduğu belirtilmiştir (Hansson ve Dostalek, 1988). Yapılan bu tez çalışmasında ise potasyum nitratın kullanıldığı besi ortamlarında gerçekleştirilen fermantasyonlarda %64.39 oranında lipit içeriğine sahip biyokütleler elde edilmiş, ancak yağdaki GLA oranı %13.63'de kalmıştır.

Mortierella cinsine ait küfler kullanılarak EPA üretiminin geliştirilmesi için yapılan bir çalışmada genel olarak biyokütle verimlerinin, tripton, kazamino asit, et özü, vb. gibi organik azot kaynaklarının eklenmesiyle önemli ölçüde arttığı, ancak iki küfün EPA içeriğinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte EPA üretimi için en iyi azot kaynağının maya özütü ve en iyi maya özütü konsantrasyonunun da %1 (%2 sabit glikoz konsantrasyonunda) olduğu bildirilmiştir (Shimizui vd. 1988).

Shinmen vd. (1989) yaptıkları çalışmada karbon kaynağı ve azot kaynağının, *M. alpina* 1S-4 suşunun misel gelişimi ve ARA içeriği üzerindeki etkilerini sistematik olarak incelemişlerdir. *M. alpina* 1S-4 ile ARA üretimi üzerine azot kaynağının etkileri, çeşitli organik veya inorganik azot kaynaklarının (%1 nihai konsantrasyon), %2 glikoz ve %0.05 maya özü içeren besi ortamına eklenmesiyle incelenmiştir. Maya özütü, soya fasulyesi küspesi ve mısır maserasyon sıvısının ARA üretimi için uygun azot kaynakları olduğu bulunmuştur. Maya özütü için optimum konsantrasyonun %1 olduğu saptanmıştır. Maya özütü konsantrasyonundaki artışın misel verimlerini arttırdığı (%1 maya özütüne kıyasla) ancak ARA üretiminde belirgin bir azalışa neden olduğu bildirilmiştir (veriler gösterilmemiştir).

Stredanska ve Sajbodor (1993) *M. alpina* CCF 185 kullanarak benzer bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, üre, L-lisin, kazein hidrolizatu, pepton, NaNO_3 ve maya özütü kullanılmıştır. Hem lipit (%47.1 kuru biyoküttele) hem de

ARA (1.0 g/L) üretimi için en iyi azot kaynağının maya özütü olduğu bulunmuştur. Ayrıca kazein hidrolizati ve peptonun kullanıldığı besiortamlarında gelişen biyokütlelerden elde edilen mikrobiyal lipitlerin benzer yağ asidi bileşimine sahip oldukları ve her iki lipitin de %5 civarında (toplam yağ asitleri) GLA içerdikleri bildirilmiştir.

Araşidonik asit üretimi için *Mortierella alpina* LPM 301 ile yapılan başka bir çalışmada, 66 g/L glikoz içeren besi ortamında potasyum nitrat (6.0 g/L) ve üre (1.5 g/L) azot kaynağı olarak kullanılarak fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Azot kaynağı olarak ürenin kullanıldığı besi ortamlarında ARA üretimi kuru biyokütlenin %16.4'üne (4.2 g/L ARA) ve potasyum nitrat içeren besi ortamında ise %18.8'ine (4.5 g/L ARA) ulaştığı bildirilmiştir (Eroshin vd. 2000).

Mortierella ramanniana var. *ramanniana* kullanılarak GLA üretiminin optimize edilmesi için yapılan bir çalışmada fermentasyon koşulları ve besi ortamı bileşiminin etkisi incelenmiş, bu kapsamda farklı azot kaynakları kullanılmıştır. Ayrıca her bir azot kaynağının farklı konsantrasyonlarının (%0.25, %0.50, %1.00) etkileri de belirlenmiştir. Üretimlerde; kazein, maya özütü, pepton, KNO₃ ve lizin azot kaynağı olarak kullanılmış ve besi ortamları %5 dekstroz içerecek şekilde hazırlanmıştır. Araştırmanın sonucunda en yüksek biyokütle üretiminin (3.79±0.27 g/100 mL) %0.5 oranında maya özütü içeren besi ortamında elde edildiği bildirilmiştir. En iyi yağ verimi de yine maya özütü içeren besiyerlerinden elde edilmiştir. KNO₃ ve lizin kullanıldığı örneklerde düşük yağ veriminden dolayı yağ asidi profili incelenememiştir. Peptonun besi ortamındaki konsantrasyonunun artmasıyla yağ asidi veriminin düştüğü, maya özütünün konsantrasyonunun artmasıyla ise arttığı saptanmıştır. Sonuç olarak en yüksek GLA veriminin (0.0226±0.0052 g/g biyokütle) %1 maya özütü içeren besi ortamından elde edildiği bildirilmiştir (Dyal vd. 2005). Yapılan bu tez çalışmasında da en iyi GLA verimi yine maya özütünün kullanıldığı denemelerden elde edilmiş olup, bahsi geçen çalışmaya kıyasla daha yüksek GLA verimi elde edilmiştir.

Derin kültür fermentasyonunun çeşitli proses parametrelerinin GLA üretimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, maya özütü, mısır maserasyon sıvısı, pepton, ekmek mayası ve mısır maserasyon sıvısı ile ekmek mayası karışımı (1:1) %1 oranında kullanılarak fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Maya özütü ve peptonun kullanıldığı besi ortamlarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda %8.4 GLA içeriğine sahip biyokütleler elde edilmiştir. Bununla birlikte, maya özütü içeren besi ortamında elde edilen toplam lipid içeriği, pepton içeren besi ortamından elde edilenden daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, maya özütünde geliştirilen kültürdeki toplam GLA veriminin maksimum olduğu bildirilmiştir (Ahmed vd. 2006).

M.isabellina M2 suşu ile yapılan bir araştırmada, farklı azot kaynaklarının lipid birikimine etkileri NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃ ve ürenin tekli azot kaynağı olarak kullanılmasıyla incelenmiştir. Denemeler 28°C'de, 80 d/dk. çalkalama hızında, 60 g/L şeker konsantrasyonuna sahip, başlangıç pH değeri 6 olan besi ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Azot kaynaklarının besi ortamına 0.42 g/L azot içerecek şekilde ilave edildiği bildirilmiştir. Farklı azot kaynaklarında gelişmenin, biyokütle ve yağ üretimi üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. Mikrobiyal yağ üretiminin en yüksek seviyeye (8.30 g/L) azot kaynağı olarak amonyum sülfatın kullanıldığı denemede ulaşıldığı saptanmıştır (Xing vd. 2012). Bahsi geçen çalışmadaki ulaşılan en yüksek yağ üretiminin, tez

çalışmamızdan elde edilen en yüksek yağ üretiminden (4.38 g/L) oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bahsi geçen çalışmada başlangıç substrat konsantrasyonu 60 g/L iken çalışmamızda ise 30 g/L olması daha düşük miktarda yağ üretimine neden olduğu düşünülmektedir.

Bir diğer çalışmada, azot kaynağı ve konsantrasyonu, ksiloz konsantrasyonu ve inokülasyon miktarı dâhil olmak üzere kültür koşullarının hücre gelişimi ve lipid üretimi üzerine etkisi *M. isabellina* kullanılarak değerlendirilmiştir. *M. isabellina*, 30 g/L ksiloz ve 7.58 mM azot içeren besi ortamında, 160 d/dk. çalkalama hızı, 28°C sıcaklıkta altı gün boyunca geliştirilmiştir. Öncelikle maya özütü, üre, pepton, glisin, KNO₃, NH₄NO₃ ve (NH₄)₂SO₄ dâhil olmak üzere farklı organik ve inorganik azot kaynakları tek azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, KNO₃ dışındaki tüm azot kaynaklarının hücre gelişimini destekleyebildiğini göstermiştir. Farklı azot kaynakları, farklı miktarlarda biyokütle ve lipid üretimine neden olmuştur. Kullanılan organik azot kaynakları içinde, 5.6 g/L ile en yüksek biyokütle ve 4.3 g/L ile lipid üretimi tek azot kaynağı olarak maya özütünün kullanıldığı üretimden elde edildiği bildirilmiştir. İnorganik azot kaynakları arasında (NH₄)₂SO₄, sırasıyla 5.3 ve 3.9 g/L ile en yüksek biyokütle ve lipid üretimini vermiştir (Gao vd. 2013). Çalışmamızda da en düşük biyokütle ve yağ üretimi KNO₃ kullanılan üretimlerden elde edilmiştir. En iyi mikrobiyal yağ üretimi 4.38 g/L ile yine maya özütünden elde edilmiş, en iyi biyokütle gelişimi ise 9.67 g/L ile (NH₄)₂SO₄ kullanılan besi ortamında gerçekleşmiştir.

Bu çalışmalar, karbon ve azot kaynaklarının farklı fungus türleri tarafından farklı şekilde kullanıldığını göstermektedir. Bir fungus türü için optimum karbon ve/veya azot kaynağı ve konsantrasyonu, kendi cinsi ve hatta türü içindeki diğer türlere genelleştirilememektedir. Buna rağmen maya özütünün çalışılan tüm küf türleri tarafından her zaman verimli bir şekilde kullanıldığı da görülmektedir.

4.1.3. Farklı inokülasyon oranlarının biyokütle, yağ ve GLA üretimi üzerine etkisi

Her defada tek etken metodunun önceki aşamalarında elde edilen veriler doğrultusunda, 30 g/L şeker içerecek şekilde DP-PASP ve 1.5 g/L maya özütü kullanılarak hazırlanan besi ortamlarına, %1, %3, %5, %7 ve %9 oranlarında inokülasyonlar yapıldıktan sonra besi ortamı pH değerleri daha önceki fermentasyonlarda en yüksek GLA üretiminin gerçekleştiği pH 7.0'a ayarlanarak, fermentasyonlar başlatılmıştır.

İnokülasyon oranının %1 olduğu besi ortamında fermentasyon başlangıcında yapılan analizlerde; azot miktarının 0.87 g/L, şeker içeriğinin 33.41 g/L ve besi ortamına inoküle edilen ön kültür miktarının 0.02 g/L olduğu tespit edilmiştir. Fermentasyon sonunda 10.41 g/L biyokütle ve 5.82 g/L yağ üretimi gerçekleştirmiştir. Besi ortamı pH değeri 6.57'e düşerken, ortamda 6.0 g/L şeker harcanmadan kalmıştır. Elde edilen biyokütlelerin yağ içeriğinin %55.87 olduğu saptanmıştır. Fermentasyonda 0.71 g/L GLA üretimi gerçekleşmiş olup, GLA veriminin %2.60 olduğu tespit edilmiştir.

İnokülasyon oranının %3 olduğu fermentasyon başlangıcında besi ortamlarında yapılan analizlerde azot miktarının 0.84 g/L, şeker miktarının 32.20 g/L ve besi ortamına inoküle edilen ön kültür miktarının 0.06 g/L olduğu saptanmıştır. Fermentasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 6.71'e düştüğü ve ortamda 4.69 g/L şekerin kullanılmadan kaldığı tespit edilmiştir. Üretim sonucu elde edilen biyokütle miktarı 9.90 g/L, mikrobiyal

yağ miktarı 5.93 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon sonunda %2.46 verimle 0.68 g/L GLA üretimi gerçekleşmiştir.

İnokülasyon oranının %5 olduğu besi ortamında gerçekleştirilen fermantasyon başlangıcında yapılan analizlerde azot miktarının 0.83 g/L, şeker miktarının ise 30.30 g/L olduğu tespit edilmiştir. Besi ortamına aşılana ön kültür miktarının 0.11 g/L olduğu bulunmuştur. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 6.71'e düştüğü ve ortamda 5.75 g/L şekerin harcanmadan kaldığı tespit edilmiştir. Üretimden elde edilen biyokütle miktarı 9.42 g/L iken mikrobiyal yağ miktarı 5.62 g/L olarak bulunmuştur. Elde edilen biyokütlelerdeki yağ içeriğinin %59.66 olduğu saptanmıştır. Fermantasyon sonunda %3.25 verimle 0.79 g/L GLA üretimi gerçekleşmiştir.

İnokülasyon oranının %7 olduğu fermantasyonun başında besi ortamlarında yapılan analizlerde azot miktarının 0.81 g/L, şeker miktarının ise 30.54 g/L olduğu saptanmıştır. Besi ortamına inoküle edilen ön kültür miktarının 0.14 g/L olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon sonunda besi ortamı pH değerinin 6.77'e düştüğü ve 5.40 g/L şekerin ortamda harcanmadan kaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen biyokütle miktarının 9.17 g/L, mikrobiyal yağ miktarının ise 5.42 g/L olduğu saptanmıştır. Fermantasyonlar sonucu %2.50 verim ile 0.64 g/L GLA üretimi gerçekleşmiştir.

İnokülasyon oranının %9 olduğu besi ortamında fermantasyon başlangıcında yapılan analizlerde, azot miktarının 0.78 g/L, şeker içeriğinin 29.82 g/L ve besi ortamına inoküle edilen ön kültür miktarının 0.19 g/L olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon sonunda 9.24 g/L biyokütle ve 5.64 g/L yağ üretimi gerçekleşmiştir. Besi ortamı pH değeri 6.81'e düşerken, ortamda 4.35 g/L şeker kullanılmadan kalmıştır. Fermantasyon sonucunda 1.08 g/L GLA üretimi gerçekleşmiş olup, GLA veriminin %4.25 olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5'de farklı inokülasyon oranlarının, elde edilen biyokütle ve yağ miktarları, biyokütle yağ içeriği, şeker tüketimi ve biyokütle verimine ait değerlerin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda üretilen biyokütle ve yağ miktarları, şeker tüketim miktarları, biyokütle yağ içeriği ve biyokütle verimine ($X \pm SE$) ait değerler ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

İnokülasyon Oranı	Kuru Biyokütle (g/L)	Yağ (g/L)	Biyokütle Yağ İçeriği (% g/g)	Şeker Tüketimi (g/L)	Biyokütle Verimi (% g/g)
%1	10.41 ^a ±0.24	5.82 ^a ±0.18	55.87 ^b ±0.54	27.41 ^a ±0.34	37.98 ^{ba} ±0.55
%3	9.90 ^{ba} ±0.19	5.93 ^a ±0.09	59.97 ^a ±1.17	27.51 ^a ±0.30	36.01 ^b ±0.74
%5	9.42 ^{bc} ±0.17	5.62 ^{ab} ±0.15	59.66 ^a ±1.24	24.56 ^b ±0.45	38.41 ^a ±1.08
%7	9.17 ^c ±0.19	5.42 ^b ±0.11	59.13 ^a ±0.94	25.49 ^b ±0.28	35.96 ^b ±0.67
%9	9.24 ^c ±0.15	5.64 ^{ab} ±0.06	61.04 ^a ±0.77	25.47 ^b ±0.20	36.28 ^{ba} ±0.51

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir $P < 0.05$

$X \pm SE$: Ortalama±standart hata

En yüksek biyokütle üretiminin (10.41 g/L) %1 inokülasyon oranına sahip fermantasyondan elde edilmesine karşın, en yüksek biyokütle verimi (%38.41) %5 inokülasyon oranına sahip fermantasyondan elde edilmiştir. Üretilen yağ miktarları birbirine çok yakın bulunmuş ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) tespit edilmiştir. En yüksek biyokütle yağ içeriği (%61.04) %9 inokülasyon oranına sahip üretimlerden, en düşük yağ içeriği ise (%55.87) %1 inokülasyon oranına sahip üretimlerden elde edilmiştir.

Çizelge 4.6’da farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermantasyonlardan elde edilen GLA miktarı, GLA verimi, yağ verimi, GLA/Lipit oranı ve GLA/Biyokütle oranı değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları verilmiştir. Farklı inokülasyon oranlarında gerçekleşen fermantasyonlardan elde edilen GLA üretimleri, GLA ve yağ verimleri, GLA/Yağ ve GLA/Biyokütle (%) oranı verileri her bir deneme için birbirleri ile karşılaştırıldığında, farkın istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) olduğu görülmektedir. En yüksek GLA üretimi (1.08 g/L) ve veriminin (%4.25) %9 inokülasyon oranına sahip fermantasyondan elde edildiği belirlenmiştir. İnokülasyon miktarı veya inokülasyon hacmi, gelişme ortamında başlangıç ön kültürü olarak THY üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Optimum inokülasyon miktarı, maksimum biyokütle ve dolayısıyla daha yüksek yağ üretimi için gereklidir. Düşük inokülasyon miktarı, uzun gecikme fazına neden olabildiği bildirilmiştir (Jiru vd. 2017).

Çizelge 4.6. Farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda üretilen GLA miktarlarına ve yağ verimine ait ortalama değerler ($X \pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

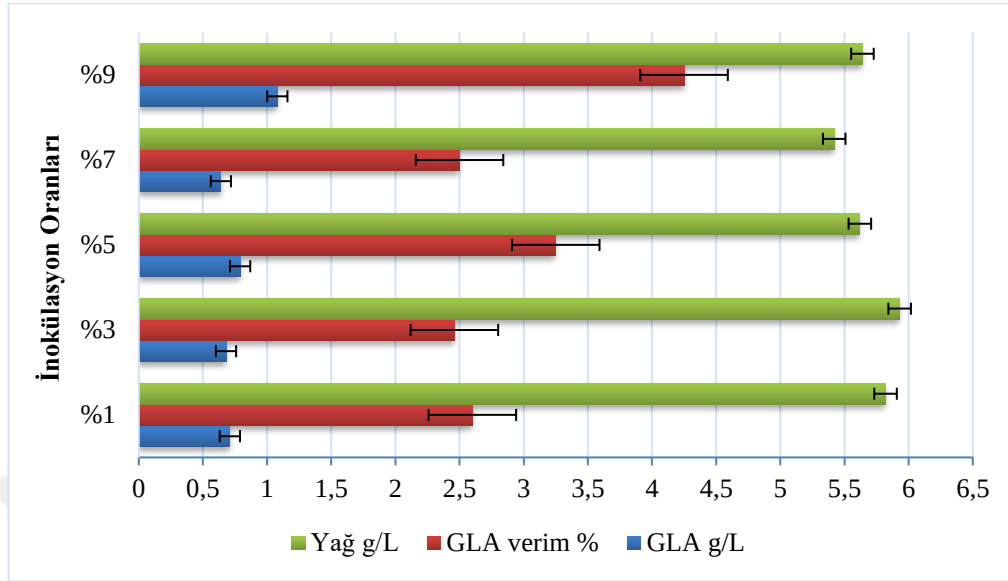
Aşılama Oranı	GLA (g/L)	GLA Verimi (% g/g)	Yağ Verimi (% g/g)	GLA/Yağ (% g/g)	GLA/Biyokütle (% g/g)
%1	0.71 ^c ±0.01	2.60 ^c ±0.06	21.23 ^b ±0.47	12.28 ^c ±0.51	6.85 ^c ±0.23
%3	0.68 ^{cd} ±0.02	2.46 ^c ±0.10	21.55 ^b ±0.17	11.41 ^c ±0.52	6.85 ^c ±0.36
%5	0.79 ^b ±0.01	3.25 ^b ±0.10	22.87 ^a ±0.50	14.22 ^b ±0.50	8.46 ^b ±0.19
%7	0.64 ^d ±0.01	2.50 ^c ±0.06	21.25 ^b ±0.44	11.80 ^c ±0.43	6.97 ^c ±0.23
%9	1.08 ^a ±0.02	4.25 ^a ±0.11	22.14 ^{ba} ±0.30	19.21 ^a ±0.44	11.73 ^a ±0.34

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir $P<0.05$

$X \pm SE$: Ortalama±standart hata

Şekil 4.3’de farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermantasyonlara ait GLA ve yağ üretimleri (g/L) ve GLA verimi (%) değerleri verilmiştir. Burada en yüksek GLA verimi (%) ve en yüksek GLA üretiminin %9 inokülasyon oranına sahip

üretimlerden elde edildiği görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak çalışmanın devamına %9 inokülasyon oranı ile devam edilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı inokülasyon oranları ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait GLA ve lipit üretimi (g/L) ve GLA verimi (%) sonuçları

Yapılan bir çalışmada parçalanmış miseller kullanılarak, *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840 ile lipit ve GLA üretimi üzerinde inokülasyon miktarının etkileri incelenmiştir. Miseller cam boncuk kullanılarak farklı sürelerle (30, 60, 120, 180 ve 240 saniye) vorteksle karıştırılarak parçalanmıştır. Farklı sürelerle parçalanmış olan miseller 0.2, 0.4 ve 1.0 g olacak şekilde 25 mL besi ortamına inoküle edilmiş, 25°C sıcaklık, 200 d/dk. çalkalama hızında beş gün süre ile inkübe edilmiştir. En yüksek vorteks süresi (4 dk) ve misel ağırlığı (1.0 g) kullanılan koşulda elde edilen maksimum GLA veriminin (860 mg/L), daha düşük vorteks süreleri ve miselyum ağırlıkları kullanılan koşullarda elde edilen verimin iki katından fazla olduğu bildirilmiştir (Chen ve Liu 1997). En yüksek GLA miktarının en yüksek inokülasyon miktarından elde edilmiş olması bu tez çalışmasında elde edilen sonuçları doğrulamaktadır.

Trichosporon fermentans ile pirinç samanı asit hidrolizati üzerinde mikrobiyal yağ üretimi gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon oranının mikrobiyal yağ üretimine etkisinin incelendiği çalışmada toplam şeker konsantrasyonunun 100 g/L'den fazla olduğu, pepton konsantrasyonunun 0.6 g/L, sıcaklığın 25°C, başlangıç pH değerinin 7.0, fermentasyon süresinin 10 gün olduğu fermentasyon koşullarında gerçekleştirilmiş, %2.5, 5, 10, 15 ve 20 inokülasyon oranlarında çalışılmıştır. En iyi lipit üretimi ve biyokütle lipit içeriği (12.1 g/L ve %39.0) %10 aşılama oranına sahip fermentasyon çalışmalarından elde edilmiştir. İnokülasyon miktarı %10'dan fazla olduğunda, *T. fermentans*'ın biyokütle miktarı biraz artmasına rağmen, lipit içeriği azalmıştır. Ayrıca inokülasyon oranının, *T. fermentans*'ın lipit bileşimini çok az etkilediği tespit edilmiştir (Huang vd. 2014). Bahse konu çalışmanın aksine bu tez çalışmasında inokülasyon oranı biyokütle ve yağ üretim miktarlarını önemli düzeyde etkilememiştir. Ancak inokülasyon oranının üretilen GLA miktarı bakımından önemli olduğu tespit edilmiştir.

Konu ile ilgili bir araştırmada *Yarrowia lipolytica* B9 mayası kullanılarak deproteinize peynir altı suyundan mikrobiyal yağ üretimi yapılmış ve yağ üretiminin optimizasyonu için inokülasyon miktarı, başlangıç pH değeri ve sıcaklığın etkileri belirlenmiştir. Çalışmalar 250 mL erlenlerde 100 mL deproteinize peyniraltı suyu içecek şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada 1-6 mL/100 mL olacak şekilde inokülasyon miktarlarının etkisi belirlenmiştir. Araştırmanın sonucunda en yüksek biyokütle üretiminin (5.2 g/L) inokülasyon miktarının 5 mL olduğu çalışma sonucu elde edildiği bildirilmiştir. En yüksek yağ içeriğinin (1.34 g/L) inokülasyon miktarının 3 mL olduğu fermentasyon sonucu elde edildiği bildirilmiştir (Taşkın vd. 2015). Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında inokülasyon oranının yağ üretimi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek yağ üretimi (5.93 g/L) %3 inokülasyon oranından elde edilmiş olmasına karşın, en iyi biyokütle üretimi (10.41 g/L) %1 inokülasyon oranında gerçekleşmiştir.

Yağlı bir maya olan *Lipomyces starkeyi* kullanılarak glikoz ve ksilozdan tek hücre yağı üretimine inokulum boyutunun etkisinin incelendiği bir çalışmada, fermentasyon 30°C'de, 190 d/dk. çalkalama hızında iki gün süre ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek inokülasyon oranının, biyokütle üretkenliğini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca inokülasyon oranının daha yüksek bir seviyeye çıkarıldığında biyokütle ve lipit içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir (Juanssilfero vd. 2018).

Yapılan bir çalışmada biyodizel üretimi için, *Yarrowia lipolytica* MTCC 9520 ile mezbaha lipit atıkları kullanılarak tek hücre yağı sentezinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon parametreleri olarak fermentasyon süresi, pH, substrat konsantrasyonu, inokülasyon miktarı ve C/N oranının etkisi incelenmiştir. İnokülasyon çalışmaları %2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. En yüksek yağ üretimi 2.35 g/L ve en yüksek biyokütle üretimi 3.5 g/L inokülasyon miktarının %5 olduğu fermentasyon süreçlerinden elde edildiği bildirilmiştir (Radha vd. 2020).

Bu sonuçlar, inokülasyon oranının lipit biyosentezi ve hücre kütle konsantrasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Genel olarak her yağlı mikroorganizmanın THY üretimi için optimum aşılama miktarına sahip olduğu bilinmektedir ve mikroorganizma ve fermentasyon koşullarına göre değişkenlik göstermektedir (Cao vd. 2021). Çalışmamızın sonucunda peyniraltı suyunda geliştirilen *M. isabellina* için bu değerin %9 olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Maksimum GLA Üretimi için Box-Behnken Tasarımı İle Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Çalışmanın ikinci aşamasında, birinci aşamada her defada tek etken metodu ile optimize edilen parametreler kullanılarak; besi ortamı başlangıç şeker miktarı (g/L), çalkalama hızı (d/dk.) ve fermentasyon sıcaklığı (°C) Box-Behnken Tasarımı ile maksimum GLA üretimi için optimize edilmiştir. Box-Behnken Tasarımı ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait parametreler Çizelge 4.7'de verilmiştir. En yüksek biyokütle üretimi (18.76 g/L), 12. denemede (130 g/L başlangıç şeker içeriği, 120 d/dk. çalkalama hızı, 28°C sıcaklık) gerçekleşmiştir. Yağ üretiminin (7.05 g/L) 14. denemede (130 g/L başlangıç şeker içeriği, 180 d/dk. çalkalama hızı, 34 °C sıcaklık) en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte yağ içeriği en yüksek olan biyoküteller (%50.90) 1. denemeden elde edilmiştir. En yüksek biyokütle ve yağ verimleri (sırasıyla

%44.93 ve %20.80) 5. denemedeki fermantasyon şartlarında elde edilirken, en yüksek GLA verimi (%3.63) 2. denemede gerçekleştirilen fermantasyonlardan elde edilmiştir. En yüksek GLA üretimi (1.10 g/L), şeker konsantrasyonunun 80 g/L, çalkalama hızının 120 d/dk. ve fermantasyon sıcaklığının 22°C olduğu deneme 5’de gerçekleşmiştir. En düşük GLA üretimi ise çalkalama hızının 180 d/dk., şeker konsantrasyonunun 30 g/L, fermantasyon sıcaklığının 34°C olduğu deneme 3’de 0.02 g/L olarak belirlenmiştir.

Besi ortamı başlangıç şeker miktarı (g/L), çalkalama hızı (d/dk.) ve fermantasyon sıcaklık (°C) parametrelerinin Box-Behnken yöntemiyle optimizasyonu için yanıt yüzeyi olarak üretilen GLA miktarı kullanılmıştır. Her bir fermantasyonda elde edilen GLA miktarı o denemeye ait yanıt yüzeyi olarak seçilmiştir. Bu doğrultuda Design Expert 10.0.0 programı aracılığıyla optimizasyon işlemi ve elde edilen verilerin varyans (ANOVA) analizleri gerçekleştirilmiştir.

Design Expert (Version 10.0.1) programının önerdiği 2 faktörlü modele göre gerçekleştirilen varyans analizi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Her bir bağımsız değişkenin yanıt üzerine olan lineer, interaksiyon ve karesel etkilerinin istatistiksel olarak önem seviyeleri de söz konusu çizelgelerde mevcuttur. Sonuçlar incelendiğinde modelin istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.0001$) ve uyum eksikliği testinin (lack of fit) istatistiksel olarak önemsiz ($P > 0.05$) olduğu saptanmıştır. Modelin fermantasyon denemelerinde elde edilen sonuçları %99.6 oranında (R^2 , 0.996) temsil ettiği görülmektedir. Ayrıca bağımsız değişkenler B (çalkalama hızı), C (sıcaklık), tüm bağımsız değişkenlerin birbirleri ile interaksiyonlarının ($A \times B$, $A \times C$, $B \times C$), A ve B değişkenlerinin ise karesel etkilerinin GLA üretimi üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.7. Box-Behnken deneme deseninde yer alan koşullarda gerçekleştirilen fermantasyonlara ait sonuçlar

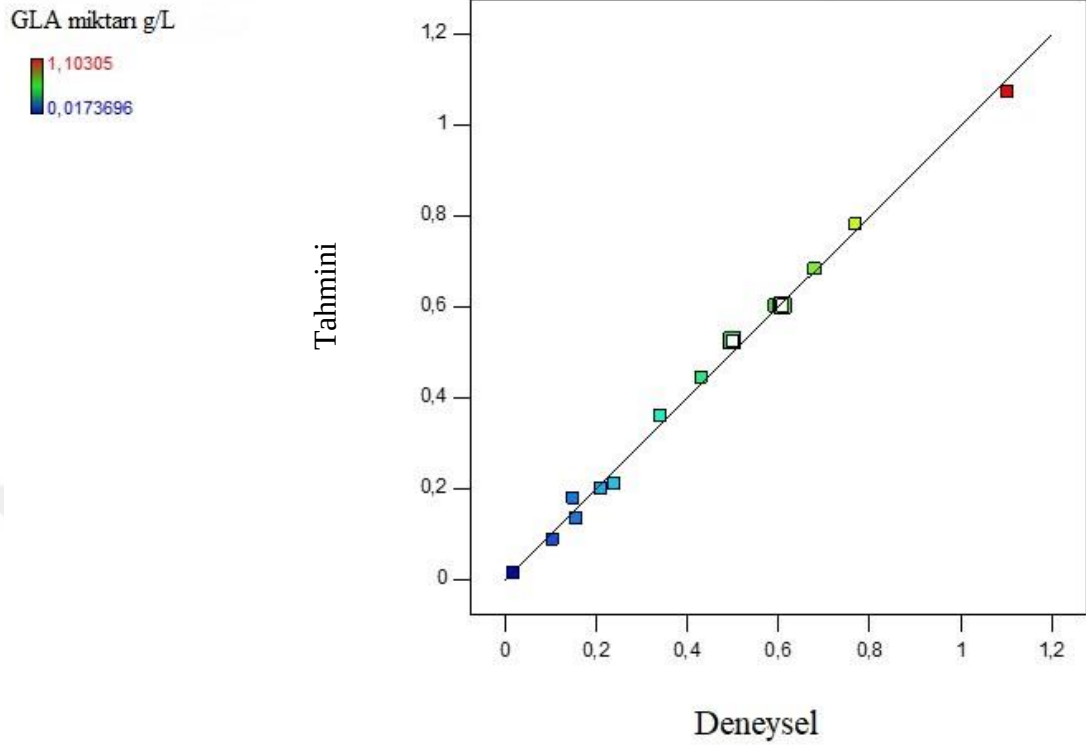
Denemeler	GLA üretimi (g/L)	Biyokütle Üretimi (g/L)	Yağ Üretimi (g/L)	Biyokütle Yağ içeriği (%, g/g)	Şeker Tüketimi (g/L)	GLA verimi (%, g/g)	Yağ verimi (%, g/g)	Biyokütle Verimi (%, g/g)	GLA/Lipit (%, g/g)	GLA/Biyokütle (%, g/g)
1	0.34±0.02	10.21±0.41	5.20±0.24	50.90±0.93	27.33±0.72	1.22±0.10	19.00±0.54	37.33±0.66	6.41±0.43	3.27±0.25
2	0.77±0.06	6.83±0.30	2.58±0.19	37.83±2.56	21.27±0.46	3.63±0.28	12.13±0.73	32.12±1.53	29.91±1.10	11.30±0.81
3	0.02±0.00	4.17±0.25	0.46±0.10	11.02±2.34	13.50±0.89	0.13±0.02	3.48±0.99	31.07±2.90	4.00±0.25	0.42±0.08
4	0.24±0.01	7.15±0.19	3.16±0.10	44.19±0.67	24.14±0.36	0.99±0.03	13.09±0.36	29.62±0.63	7.54±0.39	3.33±0.15
5	1.10±0.08	13.92±0.31	6.45±0.15	46.29±0.54	31.06±1.43	3.57±0.37	20.80±1.08	44.93±2.19	17.11±1.05	7.92±0.56
6	0.10±0.01	4.43±0.43	1.66±0.11	40.22±2.22	22.96±0.88	0.45±0.05	7.22±0.61	18.04±2.00	6.26±0.40	2.51±0.14
7	0.59±0.02	11.97±0.41	6.01±0.19	50.26±1.55	36.87±1.37	1.61±0.08	16.86±0.78	32.49±1.55	9.55±0.17	4.95±0.10
8	0.60±0.08	11.60±0.61	5.60±0.35	48.29±1.90	36.64±1.82	1.64±0.16	15.29±0.81	31.66±1.05	10.76±0.98	5.20±0.52
9	0.61±0.09	11.95±0.98	5.71±0.77	48.85±1.67	36.80±1.95	1.66±0.18	15.47±1.57	32.45±1.77	10.71±0.50	5.10±0.41
10	0.43±0.00	8.33±0.31	2.66±0.10	32.00±1.54	34.14±1.01	1.26±0.07	7.80±0.29	24.39±0.44	16.18±0.47	5.18±0.30
11	0.15±0.01	9.18±0.42	3.55±0.14	38.67±0.72	37.54±0.46	0.41±0.02	9.45±0.42	24.46±1.28	4.33±0.30	1.68±0.12
12	0.50±0.01	18.76±0.63	5.86±0.29	31.20±0.54	67.54±1.98	0.74±0.02	8.67±0.21	27.78±0.27	8.53±0.39	2.66±0.08
13	0.68±0.07	11.67±1.33	5.39±0.61	46.20±1.73	42.18±2.25	1.62±0.23	12.85±1.94	27.58±1.73	12.65±0.24	5.96±1.21
14	0.21±0.03	14.42±0.76	7.05±0.63	48.83±2.20	58.33±1.97	0.36±0.05	12.09±1.02	24.73±1.31	3.02±0.58	1.46±0.23
15	0.15±0.00	7.68±0.36	1.57±0.03	20.50±0.80	33.74±0.082	0.45±0.01	4.64±0.15	22.67±1.50	9.82±0.40	2.01±0.14

Çizelge 4.8. Başlangıç şeker miktarı, çalkalama hızı ve sıcaklığın GLA üretimi üzerine etkilerinin varyans analiz sonuçları

Varyans Kaynağı	KT	SD	KO	F-değeri	P-değeri
Model	1.25	9	0.14	151.50	< 0.0001*
A-şeker	0.0039	1	0.0039	4.28	0.0935
B-Çalkalama Hızı	0.14	1	0.14	158.53	< 0.0001*
C-Sıcaklık	0.78	1	0.78	857.25	< 0.0001*
AxB	0.015	1	0.015	16.00	0.0103***
AxC	0.020	1	0.020	21.96	0.0054**
BxC	0.13	1	0.13	141.68	< 0.0001*
A²	0.095	1	0.095	104.24	0.0002*
B²	0.066	1	0.066	71.94	0.0004*
C²	0.0018	1	0.0018	1.98	0.2184
Artık Hata	0.0046	5	0.0009		
Uyum eksikliği	0.0044	3	0.0015	18.76	0.0510
Saf hata	0.0002	2	0.0001		
Toplam	1.25	14			
R²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini R ²	CV%	Yeterli hassasiyet	
0.996	0.989	0.943	6.97	42.96	

KT: kareler toplamı; KO: kareler ortalaması; SD: Serbestlik Derecesi; düzeltilmiş *P < 0.001, **P < 0.01, ***P < 0.05 istatistiksel olarak önemli.

Elde edilen modelin deneysel verileri ile tahmini verilerinin uyum içerisinde oldukları hem Şekil 4.4, hem de Çizelge 4.8'den anlaşılabilmektedir. Tahmini R² ve düzeltilmiş R² değerlerinin birbirine yakın olması (farkın 0.2'den az olması) istenmektedir. Bu durum modelin tahminleme yeteneğinin güçlü olduğunu göstermektedir. Ayrıca R² ve düzeltilmiş R² değerlerinin birbirine yakın olmasını bu modelin deneysel verileri temsil etmede başarılı olduğunu anlamına gelmektedir. Yeterli hassasiyet sinyal gürültü oranını ölçer ve 4'ten büyük olması (>4) istenmektedir. Yeterli hassasiyet değerinin 4'ten büyük olması yeterli bir sinyalin olduğunu gösterir. Modelin yeterli hassasiyet (adequate precision) değerinin 42.96 (>4) olması modelin gürültüden etkilenmediğini göstermektedir. Varyasyon katsayısının (CV) (%6.97) %10'un altında olması ise mükemmel bir uyum olduğunu işaret etmektedir (Granato ve Ares 2013).



Şekil 4.4. GLA üretimi için Box-Behnken Tasarımının sunduğu fermantasyon sonucu elde edilen verilerle tahmin edilen sonuçların karşılaştırılması

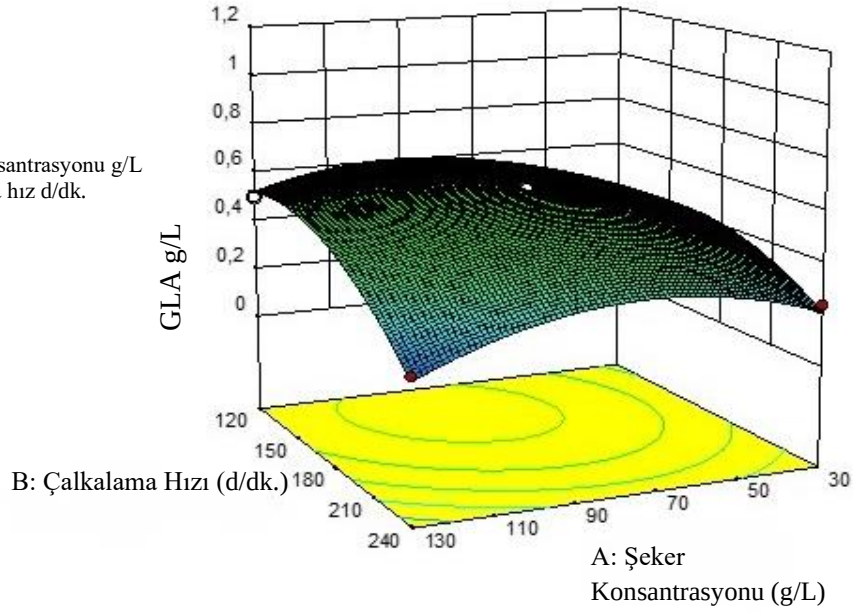
Fermantasyon ortamında bulunan şeker konsantrasyonu (A) ve çalkalama hızının (B), maksimum GLA üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.5 ve 4.6'da sunulmuştur. Grafikler oluşturulurken, üçüncü bileşen olan sıcaklık (C) 28°C'de sabit tutulmuştur. Grafiklerde de görüldüğü üzere en yüksek GLA üretimi (0.60 g/L), şeker konsantrasyonu 80 g/L ve çalkalama hızı 180 d/dk. olduğunda gerçekleşmiştir. En düşük GLA üretimi (0.15 g/L), 240 d/dk. ve 130 g/L şeker konsantrasyonundaki deneme 15'de gerçekleşmiştir. Sıcaklık sabitken (28°C) çalkalama hızı ve şeker konsantrasyonundaki artışların belli bir noktaya kadar (80 g/L şeker, 180 d/dk.) GLA üretimine pozitif etkisi olduğu, bu değeri aştıktan sonraki artışların ise GLA üretimini negatif yönde etkilediği görülmektedir. 28°C, 30 g/L şeker konsantrasyonlarındaki 120 d/dk.'de gerçekleşen 1. denemede GLA üretimi 0.34 g/L iken, 240 d/dk.'de gerçekleşen 4. denemede GLA üretimi 0.24 g/L olarak gerçekleşmiştir. Yine aynı şekilde 28°C, 130 g/L şeker konsantrasyonunda, 120 d/dk.'de gerçekleşen 12. denemede GLA üretimi 0.50 g/L iken, 240 d/dk.'de gerçekleşen 15. denemede GLA üretiminin 0.15 g/L'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Sıcaklık sabitken (28°C) 240 d/dk.'de, 30 g/L şeker konsantrasyonu ile gerçekleştirilen 4. denemede 0.24 g/L olan GLA üretimi, şeker konsantrasyonunun 130 g/L'ye çıkmasıyla 0.15 g/L'ye düşmüştür.

GLA miktarı g/L



X1= A: Şeker konsantrasyonu g/L
X2= B: Çalkalama hızı d/dk.

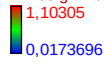
C: Sıcaklık 28°C



Şekil 4.5. Şeker miktarı ve çalkama hızının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği

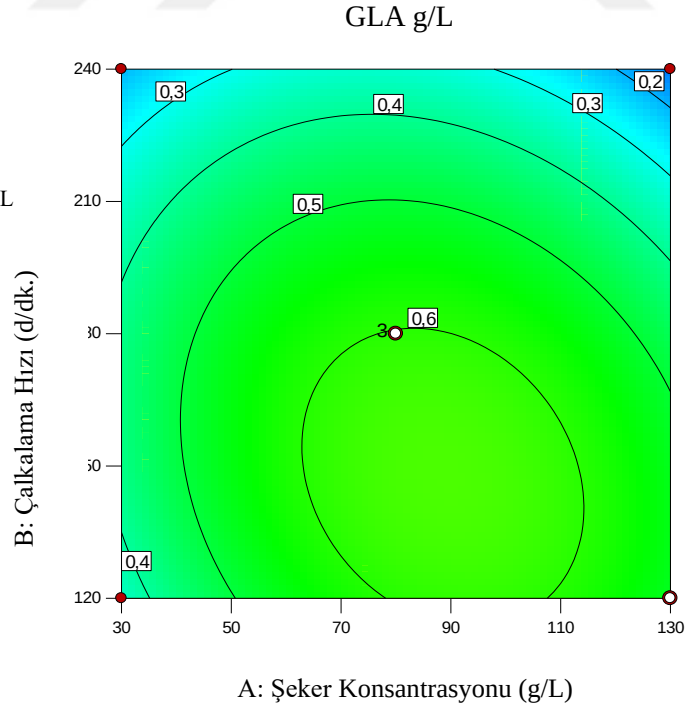
GLA miktarı g/L

Tasarım noktaları



X1= A: Şeker konsantrasyonu g/L
X2= B: Çalkalama hızı d/dk.

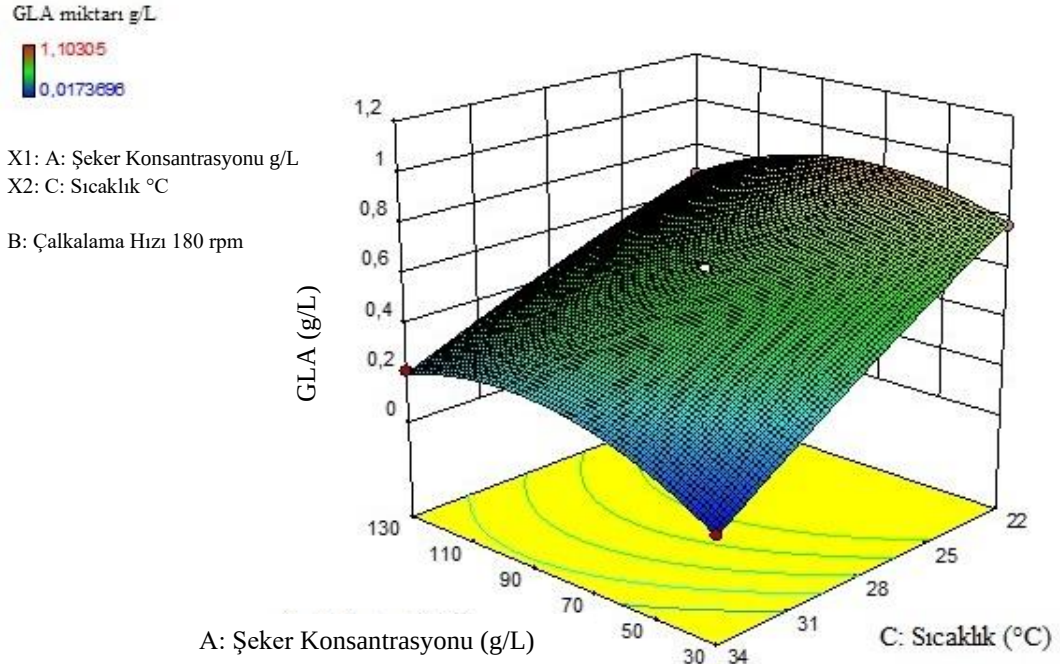
C: Sıcaklık 28°C



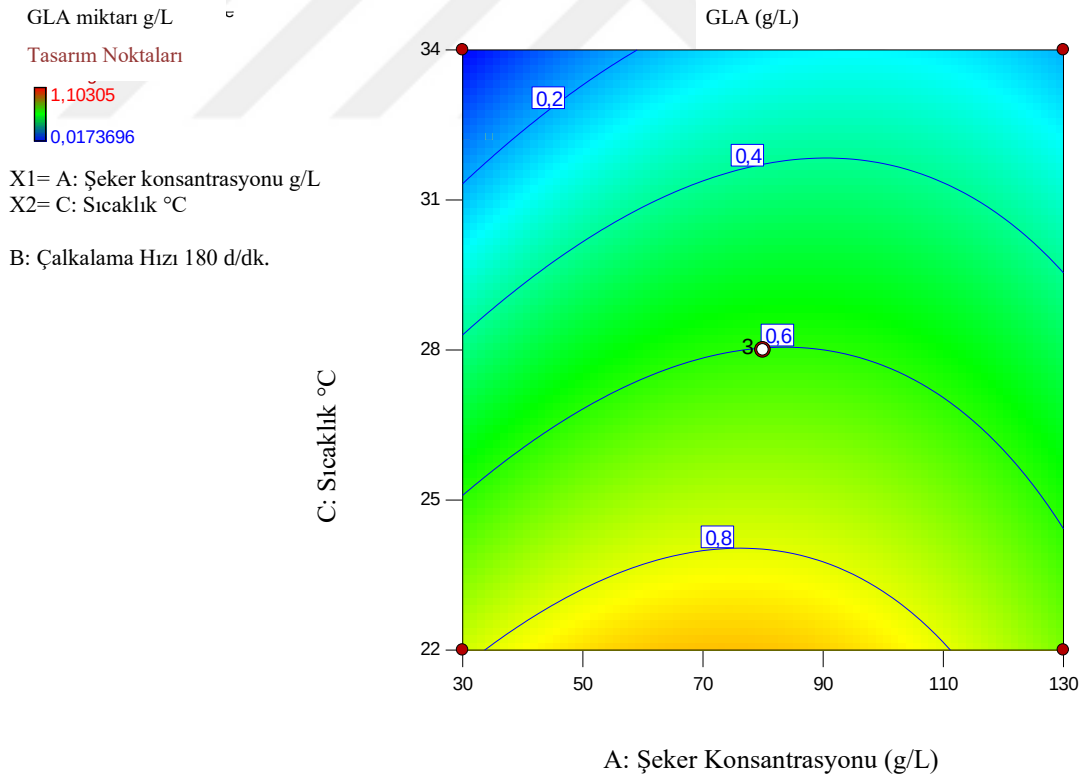
Şekil 4.6. Şeker miktarı ve çalkama hızının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği

Besi ortamında bulunan şeker konsantrasyonu (A) ve fermantasyon sıcaklığının (C), GLA üretimi üzerine olan etkilerinin gösterildiği yanıt yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 4.7 ve 4.8'de verilmiştir. Grafikler oluşturulurken, üçüncü bileşen olan çalkalama hızı (B) 180 d/dk.'de sabit tutulmuştur. Şeker konsantrasyonu 30 g/L'de sabit tutulduğunda, 22°C'de 0.77 g/L olarak gerçekleşen GLA üretiminin (2. deneme) fermantasyon sıcaklığının 34°C'ye çıkarılması ile (3. deneme) 0.02 g/L'ye düştüğü gözlenmiştir. Şeker konsantrasyonu 130 g/L'de sabit tutulduğunda, 22°C'de 0.68 g/L olan GLA üretiminin (13. deneme), fermantasyon sıcaklığının 34°C'ye çıkarılması ile (14. deneme) 0.21 g/L'ye düştüğü gözlenmiştir. Elde edilen bu verilere dayanarak çalkalama hızı sabitken fermantasyon sıcaklığının düşmesi ile GLA üretiminin arttığı görülmüştür. Fermantasyon sıcaklığı 22°C'de sabit tutulduğunda, 30 g/L substrat konsantrasyonunda 0.77 g/L olan GLA üretiminin substrat konsantrasyonu 130 g/L'ye çıkartıldığında 0.68 g/L'ye düştüğü; buna karşın sıcaklık 34°C'de sabit tutulduğunda 30 g/L'de 0.02 g/L olarak gerçekleşen GLA üretiminin (3. deneme) substrat konsantrasyonu 130 g/L'ye çıkarıldığında 0.21 g/L'ye yükseldiği (14. deneme) gözlenmiştir.

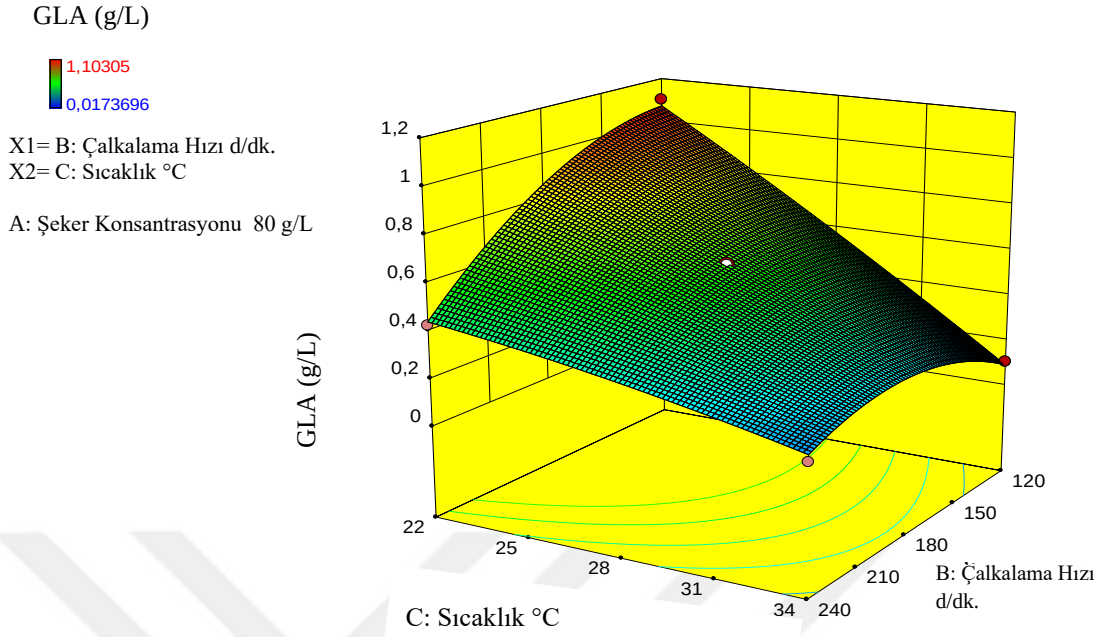
Çalkalama hızı (B) ve fermantasyon sıcaklığının (C) GLA üretimi üzerine etkisi Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Grafikler oluşturulurken şeker konsantrasyonu (A) 80 g/L'de sabit tutulmuştur. Bu şartlarda en yüksek GLA üretiminin 1.10 g/L ile 120 d/dk. çalkalama hızı ve 22°C sıcaklıkta gerçekleştirilen (5. deneme) denemeden elde edildiği, grafikler incelendiğinde de görülmektedir. Çalkalama hızı 120 d/dk.'de sabit tutulup fermantasyon sıcaklığı 34°C'ye yükseltildiğinde GLA miktarının 0.10 g/L'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Çalkalama hızı 240 d/dk.'de sabitlendiğinde, üretilen GLA miktarının, sıcaklığın 22°C'den 34°C'ye yükseltilmesi ile 0.43 g/L'den 0.15 g/L'ye düştüğü saptanmıştır. Fermantasyon sıcaklığı 22°C'ye sabitlendiğinde çalkalama hızının 120 d/dk.'den 240 d/dk.'e yükseltilmesi ile GLA üretimi 1.10 g/L'den 0.43 g/L'ye düştüğü tespit edilmiştir. Ancak fermantasyon sıcaklığı 34°C'de sabit tutulduğunda çalkalama hızının 120 d/dk.'den (deneme 6) 240 d/dk.'e çıkarılması ile (11. deneme) üretilen GLA bir miktar artış göstermiş, 0.10 g/L'den 0.15 g/L'ye yükselmiştir. Fakat burada biyokütledeki yağ içeriğinin %40.22'den (deneme 6) %38.67'ye (deneme 11); lipitteki GLA oranının da %6.26'dan (6. deneme) %4.33'e (11. deneme) düştüğü görülmektedir.



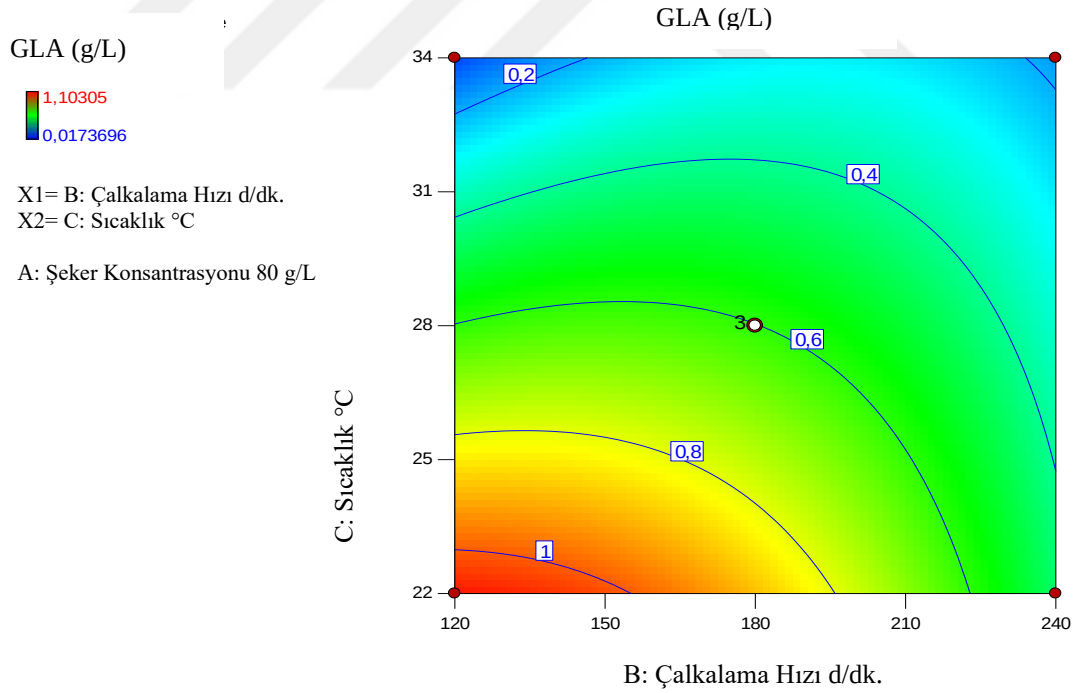
Şekil 4.7. Besi ortamı başlangıç şeker miktarı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği



Şekil 4.8. Şeker miktarı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği



Şekil 4.9. Çalkalama hızı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği



Şekil 4.10. Çalkalama hızı ve fermantasyon sıcaklığının GLA üretimi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği

4.3. *Mortierella isabellina* ile Maksimum GLA Üretimi İçin Fermantasyon Koşullarının Optimizasyonu

Box-Behnken cevap yüzey yöntemiyle oluşturulan deneme desenine göre ortaya çıkan parametre koşullarında 15 farklı fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen fermantasyonlar sonucunda tespit edilen GLA miktarları her bir deneme için yanıt yüzeyi olarak kullanılmıştır. Bu doğrultuda Design-Expert programı kullanılarak GLA üretiminin en yüksek miktarda gerçekleştirilebileceği optimum şartlar oluşturulmuştur. Programın oluşturduğu çözümler arasından seçilen optimum koşullar Çizelge 4.9’da gösterilmektedir. Bu çözümün istenebilirlik (desirability) fonksiyonunun değerinin 0.973 olduğu tespit edilmiştir. İstenebilirlik fonksiyonu (D) 0 ile 1 arasında değer almakta ve D değeri 1’e yaklaştıkça istenilen cevaba yaklaşılmaktadır (Derringer ve Suich 1980). Çizelge 4.9’da gösterilen koşullar altında fermantasyon gerçekleştirildiğinde, GLA üretiminin 1.07 (g/L) olacağı öngörülmüştür.

Çizelge 4.9. Box-Behnken Cevap Yüzey Tasarımı ile oluşturulan optimum koşullar ve bu koşullarda gerçekleştirilen fermantasyona ait GLA üretim miktarının tahmini ve deneysel sonuçları

Bağımsız Değişken	Alt Sınır	Üst Sınır	Optimum Değer	İstenebilirlik Fonksiyonu	Tahmin Edilen GLA miktarı (g/L)
Şeker içeriği (g/L)	30	130	81.87		
Çalkalama Hızı (d/dk.)	120	240	120	0.973	1.074
Sıcaklık (°C)	22	34	22		

Elde edilen tüm bu veriler doğrultusunda, 81.87 g/L şeker ihtiva edecek oranda DP-PASP, 1.5 g/L maya özütü içerecek şekilde hazırlanan besi ortamlarına %9 oranında ön kültür inokülasyonu yapılmış, besi ortamı pH değerleri 7’ye ayarlanmış ve 22°C sıcaklık 120 d/dk. çalkalama hızında (optimum koşullar altında) 10 gün süren fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süresince her gün alınan örneklerde üretilen biyokütle, mikrobiyal yağ, GLA ve besiyerinde kalan şeker miktarları belirlenmiş ve bu veriler doğrultusunda kinetik parametreler hesaplanmıştır.

4.4. Box-Behnken Cevap Yüzey Metodunun Sunduğu Optimum Koşullar İçin Doğrulama Fermantasyonu

Doğrulama fermantasyonu için kullanılacak besi ortamında başlangıçta yapılan analizlerde şeker miktarının 82.67 g/L, azot miktarının 1.62 g/L ve kül içeriğinin ise %0.93 olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon süresince elde edilen verilerin Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.10’da verilmiştir. Buna göre fermantasyon süresince üretilen biyokütle, yağ, GLA ve tüketilen şeker miktarı ile biyokütle yağ içeriği değerlerindeki değişiminin istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0.001$). Fermantasyon sonunda 14.15 g/L biyokütle, 6.31 g/L mikrobiyal yağ ve 1.15 g/L GLA

üretimi gerçekleşmiştir. Elde edilen biyokütlelerde en yüksek yağ içeriğine (%44.60) 10. günde ulaşılmıştır.

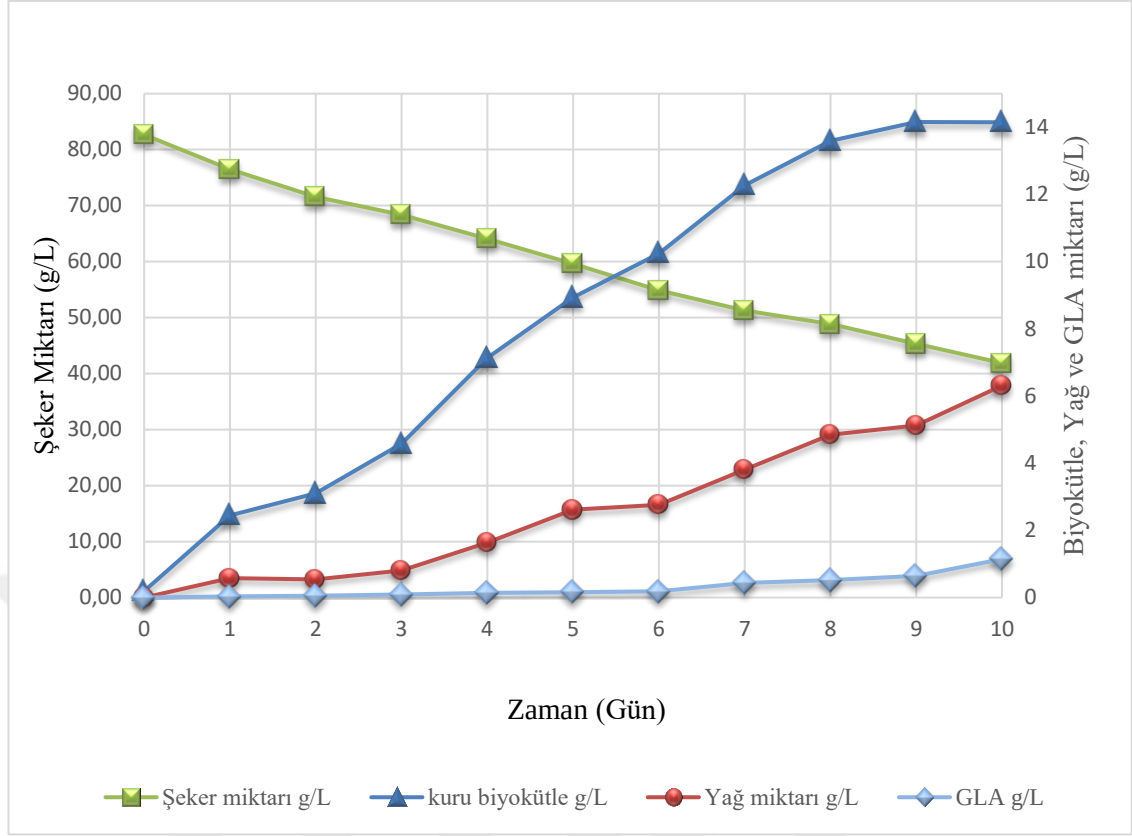
Çizelge 4.10. Doğrulama fermentasyonu sonunda üretilen biyokütle, yağ ve GLA miktarları ile besi ortamında kalan toplam şeker miktarlarına ait değerler ($X \pm SE$) ve bu değerlere ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Süre (Gün)	Kuru biyokütle (g/L)	Yağ miktarı (g/L)	GLA miktarı (g/L)	Biyokütle Yağ içeriği (%)	Şeker Tüketimi (g/L)
0	0.19 ^h ±0.01	0.00 ⁱ ±0.00	0.00 ^h ±0.00	0.00 ^g ±0.00	82.67 ^a ±0.36
1	2.78 ^g ±0.05	0.65 ^{gh} ±0.00	0.03 ^{gh} ±0.02	23.54 ^e ±0.50	76.45 ^b ±0.15
2	3.10 ^g ±0.09	0.54 ^h ±0.03	0.05 ^{gh} ±0.01	17.28 ^f ±0.60	71.58 ^c ±0.02
3	4.58 ^f ±0.24	0.81 ^g ±0.04	0.09 ^{gf} ±0.01	17.60 ^f ±0.33	68.38 ^d ±0.31
4	7.14 ^e ±0.31	1.64 ^f ±0.11	0.14 ^{ef} ±0.00	22.97 ^e ±1.40	64.08 ^e ±0.31
5	8.933 ^d ±0.27	2.61 ^e ±0.08	0.16 ^e ±0.01	29.26 ^c ±0.33	59.62 ^f ±0.31
6	10.24 ^c ±0.31	2.76 ^e ±0.09	0.19 ^e ±0.01	26.99 ^d ±0.55	54.87 ^g ±0.36
7	12.27 ^b ±0.28	3.81 ^d ±0.07	0.44 ^d ±0.02	31.06 ^c ±0.79	51.26±0.44
8	13.59 ^a ±0.24	4.85 ^c ±0.15	0.52 ^c ±0.03	35.68 ^b ±0.86	48.86±0.45
9	14.16 ^a ±0.42	5.12 ^b ±0.12	0.65 ^b ±0.01	36.18 ^b ±0.55	45.30±0.30
10	14.15 ^a ±0.20	6.31 ^a ±0.10	1.15 ^a ±0.06	44.60 ^a ±0.18	41.88 ^k ±0.39

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark $P < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

$X \pm SE$: Ortalama±standart hata

Şekil 4.11’de, optimize edilen şartlarda gerçekleştirilen fermentasyon sürecinin besi ortamlarında kalan şeker miktarları (g/L) ile üretilen GLA (g/L), yağ (g/L) ve biyokütle (g/L) miktarlarının 10 gün boyunca zamana bağlı olarak değişimi verilmiştir. Besi ortamındaki şeker, fermentasyon süresince kullanılmış fakat 10. günün sonunda ortamda 41.88 g/L düzeyinde kullanılmadan kalmıştır. Biyokütle miktarındaki değişim incelendiğinde, biyokütle miktarının fermentasyonun ilk günü hızlı bir artış gösterdiği, fermentasyonun 9. günde maksimum seviyeye ulaştığı ve burada biyokütle gelişiminin yavaşladığı görülmektedir. Yağ miktarındaki değişimin fermentasyonun ilk 3 günü çok yavaş olduğu ve 3. günden sonra hızlı bir şekilde artmaya başladığı tespit edilmiştir. Bunun sebebinin azotun hücreler tarafından kullanılması ile besi ortamında bulunan miktarının sınırlanacağı, bu durumun da hücrelerin lipid birikim fazına geçmesini tetikleyerek lipid üretim hızında artışa neden olacağı değerlendirilmektedir. Yağ miktarı fermentasyon süresince artış göstermiş ve fermentasyonun 10. gününde maksimum seviyeye ulaşmıştır. GLA üretiminin 7. günden itibaren belirgin bir şekilde artmaya başladığı ve fermentasyonun 10. gününde maksimum seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Grafik incelendiğinde, 7. günde biyokütle üretim hızının yavaşlamaya başlaması ile GLA üretim hızının artmaya başladığı görülmektedir. Ayrıca biyokütle üretim hızının durduğu 10. günde yağ ve GLA üretim hızlarının belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. Doğrulama fermentasyonuna ait toplam şeker, biyokütle, yağ ve GLA miktarları

Çizelge 4.11’de, maksimum GLA üretimi için optimize edilen şartlarda gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametreler verilmiştir. Fermentasyon sonunda mikroorganizmaların şeker tüketiminin 40.78 g/L, şeker kullanım oranının %49.33 olduğu tespit edilmiştir. Biyokütle üretiminin 13.96 g/L, yağ üretiminin 6.31 g/L, GLA üretiminin ise 1.15 g/L olduğu saptanmıştır. Tüketilen şekere karşı üretilen biyokütle, yağ ve GLA verimlerinin sırasıyla %34.22, %15.47 ve %2.81 olduğu belirlenmiştir. Maksimum şeker tüketim hızı 6.21 g/L/gün, maksimum yağ üretim hızı 1.19 g/L/gün ve maksimum GLA üretim hızı 0.50 g/L/gün olarak hesaplanmıştır. Maksimum GLA üretimi için optimize edilen bu fermentasyon koşullarında *Mortierella isabellina*’nın maksimum gelişme hızının 1.45 g/L/gün, spesifik gelişme hızının 1.39 gün⁻¹ ve ikiye katlanma süresinin 0.50 gün olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.11. Doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametre değerleri

Kinetik Parametreler	
Şeker tüketimi (g/L)	40.78
Yağ üretimi (g/L)	6.31
Biyokütle üretimi (g/L)	13.96
GLA üretimi (g/L)	1.15
Verim ($Y_{GLA/s}$) (%)	2.81
Verim (Y_L/s) (%)	15.47
Verim (Y_X/s) (%)	34.22
Maks. tüketim hızı ($-ds/dt$)maks (g/L/gün)	6.21
Maks. üretim hızı (d_{GLA}/dt)maks (g/L/gün)	0.50
Maks. üretim hızı (d_L/dt)maks (g/L/gün)	1.19
Maks. gelişme hızı (dx/dt)maks (g/L/gün)	1.45
Spesifik gelişme hızı (μ) ($gün^{-1}$)	1.39
İkiye katlanma süresi (td) (gün)	0.50
Şeker kullanım oranı (%)	49.33

Optimum koşullarda yapılan üretimlerin sonucunda bağımlı değişken değeri Design Expert® programı analiz sonrası doğrulama fonksiyonu kullanılarak sonuçlar %95 güven seviyesinde değerlendirilmiştir. Buna göre Çizelge 4.12’de elde edilen deneysel verilerin, tabloda bahsedilen maksimum ve minimum değerlerin arasında yer aldığı görülmektedir.

Çizelge 4.12. Optimum koşullarda elde edilen deneysel veriler ve tahmini değerler

Bağımlı Değişken (Yanıt)	Tahmin edilen değer	Deneysel Değer	Minimum Değer	Maksimum Değer
GLA miktarı (g/L)	1.07	1.15	0.97	1.18

Mikroorganizmaların, hücre zarı akışkanlığını korumak için düşük sıcaklıktaki ortamlarda PUFA ürettikleri bildirilmektedir (Yano vd. 1994; Dyal vd. 2005). Mucorales takımına dâhil psikrofilik, termotolerant ve termofilik funguslarla yapılan bir çalışmada ise gelişme sıcaklığının fungusların yağ asidi kompozisyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Suşların düşük sıcaklıklarda geliştirilmesinin genel olarak mikrobiyal lipitteki doymamış yağ asitleri oranını arttığı gözlemlenmiştir (Sumner vd. 1968). Bu bilgiler doğrultusunda optimizasyon sonucu elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde, en yüksek GLA miktarı için optimum sıcaklığın ($22^{\circ}C$) çalışılan en düşük sıcaklık olmasının nedeni açıklanabilmektedir.

Sıcaklık ve hücre yaşının, *Mucor rouxii* fungusunun yağ asidi bileşimi doymamışlık derecesi üzerine etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada üç farklı sıcaklık denenmiştir. $35^{\circ}C$ ’de geliştirilen hücrelerin toplam FA’deki GLA oranı 96 saat sonra maksimuma (%7.9) ulaşmıştır. Hücrelerin $25^{\circ}C$ ’de geliştirilmesi ile toplam FA’deki GLA oranı artmış, 72 saat gelişen hücrelerde %13’e çıkmıştır. $15^{\circ}C$ geliştirilen hücrelerde ise toplam FA’deki GLA oranının %20.1’e çıktığı bildirilmiştir. Ayrıca

gelişme sıcaklığındaki düşüşle birlikte doymamışlık derecesinin de arttığı gözlemlenmiştir (Safe 1974). Sıcaklığın düşmesi ile GLA oranının artmış olması yapılan bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir.

M. ramanniana CBS 112.08 suşu kullanılarak 28.7 g/L başlangıç glikoz miktarına sahip 400 mL hacimli kültür ortamlarında yapılan çalışmada sıcaklığın GLA üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve bu kapsamda 20, 25 ve 30°C’lerde fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. En yüksek biyokütle miktarına (10.2 g/L) 25°C’de gerçekleştirilen fermentasyonun 6. gününde ulaşılmıştır. Bu biyokütledeki yağ oranı %15.9 (w/w) iken, elde edilen yağdaki GLA oranı %17.2 (w/w) olarak bulunmuştur (üretilen GLA miktarı 0.28 g/L). Biyokütledeki en yüksek yağ içeriği (%25.1) 30°C’de 6 gün gelişen hücrelerden elde edilmiştir. Ancak bu çalışmadaki en düşük biyokütle miktarı (5.9 g/L) ve lipitteki en düşük GLA içeriği (%14.6 w/w) yine bu denemeden elde edilmiştir. Lipitteki GLA oranı ise 20°C’de fermentasyonun 3. gününde en yüksek noktaya (%21 w/w) ulaşmıştır. En yüksek GLA üretimi (0.32 g/L) 20°C’de gerçekleştirilen fermentasyonun 6. gününde elde edilmiştir. Fermentasyon sıcaklığı düştükçe lipitin doymamışlık derecesinin ve üretilen GLA miktarının arttığı tespit edilmiştir (Hansson ve Dostálek 1988).

Mortierella alpina ATCC 32222’nin kullanıldığı bir çalışmada ARA ve diğer yağ asitlerinin üretimini etkileyen faktörler araştırılmıştır. 25°C’de 6 gün süren fermentasyon sonunda 17.50 g/L biyokütle ve 1.68 g/L ARA elde edilmiş, elde edilen biyokütledeki yağ oranının %17.78 olduğu tespit edilmiştir. İz miktarda GLA üretimi gerçekleşmiştir. 11°C’de on gün süren fermentasyon sonunda 15.15 g/L biyokütle elde edilmiş, elde edilen biyokütlelerdeki yağ oranının %22.25 olduğu tespit edilmiştir. ARA üretim miktarının 1.40 g/L ve GLA’nın toplam yağ asitlerindeki oranının %0.62 olduğu belirlenmiştir. Düşük sıcaklıkta inkübasyonla biyokütledeki lipitlerin yüzdesi artarken, daha yüksek sıcaklıkta inkübasyonla karşılaştırıldığında, ARA üretimi ve lipitteki ARA oranının (%w/w) sırasıyla %17 ve %24 oranında azaldığı bildirilmiştir. Daha sonra ortamdaki glikoz miktarının biyokütle ve lipit üretimi üzerindeki etkisini araştırmak için aynı besi ortamı içeriğinde başlangıç glikoz konsantrasyonu 30-150 g/L aralığında değiştirilmiştir. Biyokütle miktarı, glikoz konsantrasyonuna paralel bir şekilde artmış ve 150 g/L glikoz içeren besi ortamında maksimum (33.23 g/L) düzeyine ulaşılmıştır. Biyokütledeki en yüksek yağ oranına (%30.19), 80 g/L glikoz konsantrasyonuna sahip besi ortamında ulaşılmıştır. En yüksek ARA üretiminin (2.27 g/L), 100 g/L glikoz konsantrasyonunda gerçekleştiği gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca başlangıç pH değerinin (otoklavlamadan sonra) *M. alpina* ATCC 32222 tarafından ARA üretimi üzerindeki etkisi incelenmiş (pH 3.8-9.0 aralığında), başlangıç pH değerinin biyokütle üretimi üzerinde nispeten küçük bir etkisinin olduğu bildirilmiştir. Lipit ve ARA üretimi için optimum başlangıç pH aralığının 6.0-6.7 olduğu tespit edilmiştir (Bajpai vd. 1991). Bu tez çalışmasından elde edilen verilerle kıyasladığımızda her iki çalışmada da sıcaklık düştükçe GLA miktarının arttığı görülmektedir. Kullanılan şekerler farklı olsa da her iki çalışmada da besi ortamlarındaki konsantrasyon artışı biyokütle üretimini arttırmıştır. Hedef PUFA’lara olan etkisine bakıldığında ise her iki çalışmada da belli bir konsantrasyona kadar şeker artışı hedef PUFA üretimini arttırmış, daha yüksek konsantrasyona çıkılması ise üretilen PUFA miktarında azalmaya sebep olmuştur.

Lindberg ve Molin (1993), *Mortierella alpina* CBS 343.66 fungusunu kullanarak sıcaklığın PUFA üretimi üzerine etkini incelemişlerdir. Fermentasyon süresinin 166 saat

olduğu üretimler 18°C ve 12°C’de gerçekleştirilmiş ve sıcaklığın düşmesi ile GLA’nın toplam yağ asitlerindeki oranının iki kat arttığı tespit edilmiştir (18°C’de %5 GLA (w/w); 12 °C’de %10 (w/w)).

M. isabellina kullanılarak yapılan bir çalışmada azot içeriği kısıtlanmış besi ortamında geliştirilmiş ve sonuçta kayda değer miktarda (35.9 g/L’ye kadar) biyokütle gelişimi gözlenmiştir. Besi ortamının başlangıç şeker (glikoz) konsantrasyonunun yüksek olması durumunda bile (örneğin 100 g/L) büyük oranda glikoz kullanımının gerçekleştiği belirlenmiştir. Ortamdaki azotun azalmasıyla birlikte fungal miseller içinde önemli düzeyde yağ birikiminin (%50-55, w/w kuru biyokütle) olduğu ve önemli miktarda (18.1 g/L) tek hücre yağı üretildiği ifade edilmiştir. Toplam kuru biyokütle ve lipid verimlerinin oldukça yüksek değerler (sırasıyla tüketilen g glikoza karşı 0.34 ve 0.17 g) olduğu belirtilmiştir. Üretilen mikrobiyel lipitte 3.5 ± 1.0 (w/w) GLA düzeyine ulaşıldığı, bunun da kuru mikrobiyel kütlenin gramı başına 16-19 mg GLA’ya karşılık geldiği belirtilmiştir. Maksimum konsantrasyon olarak kültür ortamının litresinde 0.801 g GLA üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir (Papanikolaou vd. 2004).

Aidil vd. (2005), dört farklı yağlı fungus kullanarak (*Cunninghamella* sp. 2A1, *Absidia* sp. DR, *Bortrytis* sp. K3 ve *Geotrichum* sp. SK22), substrattaki C/N (karbon/azot) oranının ve üretim sıcaklığının lipid üretimi ve GLA içeriği üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bütün izolatlarda, besi ortamındaki C/N oranının artışıyla birlikte lipid oranları da iki kata kadar artış göstermiştir. Fakat lipid oranındaki artış, GLA içeriğinde (% toplam yağ asitleri) azalma ile sonuçlanmıştır. *Absidia* sp. DR için GLA içeriği, besi ortamındaki C/N oranı 40/1 olduğunda %18 iken, C/N oranı 133/1 düzeyine çıkarıldığında %5’e düşmüş; fakat buna karşılık lipid oranında %17’den (g/g kuru biyokütle) %32’ye artış olmuştur. Bu lipid ve GLA içeriklerindeki ters ilişki diğer üç fungusta da gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada *Cunninghamella* sp. 2A1, *Absidia* sp. DR, *Bortrytis* sp. K3’ün farklı sıcaklıklarda (15°C, 20°C, 25°C ve 30°C) geliştirilmesi durumunda, tüm yağlı fungusların 25°C ve 30°C’lerde maksimum lipid üretimi gerçekleştirdiği, bununla birlikte farklı gelişme sıcaklıklarının GLA içeriklerinde önemli bir değişime sebep olmadığı ortaya konulmuştur (Aidil vd. 2005).

Başka bir çalışmada *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana*’nın endüstriyel olarak GLA üretim potansiyeli araştırılmıştır. Üretim parametreleri (pH, sıcaklık, karbon kaynağı, azot kaynağı ve metal iyonları ile yağ ilavesi) sistematik olarak ayarlanmıştır. Çalışma sonuçları bu suş için %5 dekstrozu ve %1 maya ekstraktı içeren temel gelişme ortamına, 5 mg/L Mn^{2+} ilave edilerek 20°C’de inkübasyon ile GLA üretiminin yükseltilebileceğini göstermiştir. Optimum gelişme koşullarında lipid veriminin toplam kuru biyoküttele %54.2, elde edilen lipitteki doymamış yağ asitleri içeriğinin ise %84.3 olduğu belirlenmiştir. Gram kuru biyokütle başına GLA verimi, %13.3 olarak tespit edilmiş ve bu özelliği ile tipik çuha çiçeği yağının GLA içeriğinden biraz fazla olduğu gösterilmiştir (Dyal vd. 2005).

Diğer bir çalışmada *Mortierella* cinsine ait küfler kullanılarak çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) üretimini geliştirmek için kültür ortamı ve koşulların etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 11 farklı mikroorganizma test edilmiş ve *M. alpina* ATCC 32222 suşu seçilerek çalışmaya bu suşla devam edilmiştir. Sıcaklığın etkisini belirlemek için bazal besi ortamında 7 gün boyunca 12–28°C’de 200 d/dk. çalkalama hızında fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. En yüksek biyokütle üretimi (7.2 g/L) 20°C’de

gerçekleşmiş, bunu 15°C ve 12°C'ler izlemiş (sırasıyla 6.3 g/L, 6.2 g/L) ve en az biyokütle üretimi (6.0 g/L) 25°C'de gerçekleşmiştir. Düşük sıcaklığın ARA, EPA, LA ve GLA gibi yüksek doymamış yağ asitlerinin üretimini teşvik ettiği saptanmıştır. Toplam PUFA'lar 12°C ve 15°C'lerde yüksek verime sahipken, inkübasyon sıcaklığı 20°C'nin üzerine çıktığında azalmıştır. *M. alpina* ATCC 32222 ile yapılan çalışmada 12°C, 15°C, 20°C ve 25°C'de gerçekleştirilen fermentasyonlarda sırasıyla 164.9 mg/L, 161.0 mg/L, 96.3 mg/L ve 62.2 mg/L GLA üretimi gerçekleştiği bildirilmiştir (Jang vd. 2005). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da sıcaklığın azalmasıyla birlikte elde edilen GLA miktarının arttığı tespit edilmiş ve 22°C'de gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda 1.15 g/L GLA üretim miktarına ulaşılmıştır.

Mucorales takımına ait yedi farklı suş kullanılarak GLA'nın fermentatif olarak üretimi üzerine yapılan bir çalışmada, *Mucor* sp. RRL001 suşu seçilmiş ve başlangıç glikoz konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve kullanılan azot kaynağının; biyokütle, yağ ve GLA üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Başlangıç şeker içeriği olarak 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 g/L konsantrasyonları seçilmiş, şeker konsantrasyonu ile biyokütle ve lipid artışının 100 g/L konsantrasyona kadar paralel olduğu tespit edilmiştir. 100 g/L şeker konsantrasyonunda maksimum seviyeye ulaşan kuru biyokütle ve yağ miktarının (sırasıyla 35.46 g/L, 6.3 g/L) bu konsantrasyonun üzerindeki seviyelerde azalışa geçtiği bildirilmiştir. En yüksek GLA içeriğinin ise (%8.8 w/w biyokütle) başlangıç şeker içeriği 25 g/L olan denemeden elde edildiği saptanmıştır (Ahmed vd. 2006). Çalışmamızdan elde edilen verilerle karşılaştırıldığında, biyokütledeki en yüksek GLA içeriğinin (%11.30) 30 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda elde edilmiş olmasına karşın, başlangıç şeker konsantrasyonunun tek başına etkili faktör olmadığı görülmüştür. Sıcaklığın GLA üretimi üzerine etkisi 20-35°C aralığında araştırılmış ve biyokütledeki en yüksek GLA oranı (%8.2) 20°C'de gelişen hücrelerden elde edilmiş, sıcaklıktaki artışın GLA oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Ahmed vd. 2006). Çalışmamızda sıcaklığın GLA üretimi üzerine etkisi 22, 28 ve 34°C'lerde araştırılmış ve en yüksek GLA oranı 22°C'de elde edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında elde edilen verilerin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir.

M. isabellina ATHUM 2935 ve *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411'nin biyokimyasal davranışlarını (biyokütle üretimi, toplam yağ birikimi, substrat kullanımı, fungal yağın yağ asidi kompozisyonu) belirlemek üzere başka bir çalışma yapılmıştır (Fakas vd. 2009b). Çalışmalar çalkalamalı inkübatörde 28°C, 180 d/dk.'de gerçekleştirilmiş ve fermentasyon başlangıç pH değerleri 6'ya ayarlanmıştır. Söz konusu mikroorganizmalar sınırlanmış azot şartlarında ksiloz, ham gliserol ve glikoz içeren besi ortamlarında geliştirilmiş ve her iki mikroorganizmada da kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak lipid birikim proseslerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bahsi geçen farklılıklar, substratların kullanımı ile ilgili metabolik yolların farklılıklarına bağlanmıştır. Bu yüzden farklı karbon kaynakları kullanılmasının depolanan lipid miktarını etkilediği ve hatta lipid olmayan biyokütle oluşumuna sebep olabileceği bildirilmiştir. Glikoz içeren besi ortamlarının, misel biyokütlesi üretiminde avantajlı olmasına rağmen (*C. echinulata* 15 g/L toplam biyokütle ve *M. isabellina* 27 g/L toplam biyokütle), *C. echinulata* kuru biyokütlesinde lipid birikimi %46.0 ve *M. isabellina* kuru biyokütlesindeki %44.6 düzeyinde kalmıştır. Lipid birikimi ksiloz içeren besi ortamında artış göstermiş, *M. isabellina* kuru misel kütlesinde %65.5 w/w, *C. echinulata* kuru biyokütlesinde ise %57.7 w/w seviyelerinde gerçekleşmiştir. Bu şartlarda *C. echinulata* lipidlerinin, yüksek düzeylerde GLA içerdiği belirtilmiştir. *C. echinulata* ksilozda

geliştirildiğinde 6.7 g/L lipit ve 1119 mg/L GLA (besi ortamının litresine karşılık) üretmiştir (Fakas vd. 2009b).

Atık gliserolün *A. niger* NRRL 364 suşu kullanılarak katma değerli bileşiklere (biyokütle, tek hücre yağı ve oksalik asit) dönüştürülmesi için yapılan bir çalışmada çalkalama hızının biyokütle üretimine etkisi incelenmiş ve 180, 60 ve 0 çalkalama hızları test edilmiştir. En yüksek biyokütle üretiminin (1.2 g/L) 60 d/dk.'de fermentasyonun 12. gününde gerçekleştiği bildirilmiştir (André vd. 2010).

Rodotorula 110'dan mikrobiyal yağ üretiminin optimizasyonu için yapılan çalışmada 150 d/dk.'de 7.34 g/L yağ, 13.04 g/L biyokütle; 200 d/dk.'de ise 6.83 g/L yağ ve 12.64 g/L biyokütle üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir. Düşük çalkalama hızının yağ ve biyokütle üretimini arttığı gözlemlenmiştir (Enshaeieh vd. 2012). Bu çıkarım, gerçekleştirilen çalışmamızdaki optimizasyon fermentasyonlarından elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir.

Başka bir çalışmada *Yarrowia lipolytica* M7 ve *Candida gali* mayaları kullanılarak fermentasyona ait fiziksel parametrelerin lipit üretimine etkisi incelenmiştir. Fermentasyon parametrelerinden; besi ortamı pH değeri (pH 4-7 aralığı), çalkalama hızı (100, 150, 200 d/dk.), sıcaklık (15, 25, 35 ve 45°C) ve inkübasyon süresinin (24, 48, 72 ve 96 saat) lipit üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Öncelikle, diğer parametreler sabit tutularak besi ortamı pH değeri sırayla 4, 5, 6 ve 7'ye ayarlanarak en uygun pH değeri tespit edilmiştir. Benzer şekilde diğer tüm parametrelerin optimizasyonu için aynı yöntem uygulanmıştır. *Candida gali* mayası için en yüksek lipit ve biyokütle üretimi (sırasıyla 3.73 g/L, 16.78 g/L) başlangıç pH değeri 6 olan besi ortamlarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda sağlanmıştır. En yüksek biyokütle lipit içeriğine ise (%23.21) pH değerinin 7 olduğu fermentasyonlarda ulaşılmıştır. Çalkalama hızının etkisinin incelendiği fermentasyonlarda en yüksek lipit ve biyokütle üretimi ile en yüksek biyokütle lipit içeriğine (sırasıyla 4.15 g/L, 17.11 g/L ve %24.25) 200 d/dk. çalkalama hızında ulaşıldığı tespit edilmiştir. Sıcaklığın etkisinin belirlendiği fermentasyonlarda ise en yüksek lipit ve biyokütle üretimi ile biyokütlerdeki en yüksek lipit oranının (sırasıyla 4.25 g/L, 16.89 g/L ve %25.16) 25°C'de gerçekleştirilen üretimlerde elde edildiği saptanmıştır. *Yarrowia lipolytica* M7 en yüksek lipit (4.78 g/L) ve biyokütle üretimini (18.52 g/L) besi ortamı başlangıç pH değerinin 5 olduğu fermentasyonlarda gerçekleştirmiş, biyokütlerdeki en yüksek yağ içeriğine (%25.95) pH değerinin 6 olduğu üretimlerde ulaşılmıştır. Sonraki aşamada en yüksek lipit ve biyokütle üretimi ile en yüksek biyokütle lipit oranına (sırasıyla 5.25 g/L, 19.23 g/L ve %27.30) 200 d/dk. çalkalama hızında ulaşılmıştır. Sıcaklığın etkisinin incelendiği fermentasyonlarda, en yüksek lipit üretimi ve biyokütle lipit oranına (5.59 g/L, %28.15) 25°C'de ulaşılırken, en yüksek biyokütle üretiminin (19.54 g/L) 35°C'de gerçekleştiği görülmüştür. Her iki mikroorganizmada da fermentasyon sıcaklığı 15°C'den 25°C'ye çıkarılınca lipit üretimi ve biyokütlerdeki lipit içeriği artmış, 25°C'den daha yüksek sıcaklıklarda ise azalma gözlemlenmiştir (Enshaeieh vd. 2013).

Bir diğer çalışmada *Mortierella alpina* LPM-301 gliserol içeren besi ortamında geliştirilmiş, besi ortamı pH değerinin ve fermentasyon sıcaklığının lipit ve ARA sentezi üzerindeki etkileri incelenmiştir. En yüksek biyokütle üretiminin (21.2 g/L), besi ortamı başlangıç pH değerinin 8 olduğu, en yüksek lipit üretiminin (6.9 g/L) ise söz konusu pH değerinin 7 olduğu fermentasyonlarda gerçekleştiği bildirilmiştir. Yağ asitleri

kompozisyonu üzerine besi ortamı başlangıç pH değerinin etkisi incelendiğinde, söz konusu pH değerinin 3 olduğu üretimlerde GLA tespit edilemediği, pH değerinin 6 olduğu fermentasyonlarda ise lipitteki GLA oranının en yüksek seviye (%3.1) ulaştığı görülmüştür. Sıcaklığın etkisi incelendiğinde; en yüksek biyokütle ve lipit üretiminin (sırasıyla 17.4 g/L, 1.9 g/L) 26 °C'de gerçekleştiği, lipitteki en yüksek GLA oranına (%4.8) ise 28 °C'de ulaşıldığı belirlenmiştir (Dedyukhina vd. 2015).

Derin kültür fermentasyon ile AA, DHA ve EPA yağ asidi üretimi için *Aspergillus oryzae*'nin geliştirilmesinde uygun fermentasyon koşulları araştırılmıştır. *A.oryzae*, karbon kaynağı olarak glikoz ve azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve maya özütü kullanılan besiyerinde altı gün süreyle geliştirilmiştir. *A.oryzae*'nin doymamış yağ asiti üretimi için optimum çalkalama hızının 120 d/dk sıcaklığın ise 25°C olduğu tespit edilmiştir (Miranti vd. 2018).

Bir diğer çalışmada, fermentasyon parametrelerinden sıcaklığın ve çalkalama hızının *Mortierella alpina*'nın hücre gelişimi ve üretilen lipitin yağ asidi kompozisyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Küf, sıvı besiyerinde 6 farklı sıcaklıkta (10, 15, 20, 25, 30 ve 35°C) ve 7 farklı çalkalama hızında (100, 125, 150, 175, 200, 225 ve 250 d/dk.) 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Sonuçlar, fermentasyon sıcaklığı ve çalkalama hızının küf gelişimini ve yağ asidi kompozisyonunu önemli ölçüde etkilediğini ortaya koymuştur. Biyokütle üretimi, toplam yağ asidi birikimi ve PUFA birikimi için en uygun sıcaklığın 20°C, en uygun çalkalama hızının 175 d/dk. olduğu tespit edilmiştir. 30°C sıcaklık veya 250 d/dk. karıştırma hızına çıkıldığında hücre gelişiminin durduğu bildirilmiştir (Gu vd. 2018).

Her mikroorganizmanın âzamî gelişim, lipit ve GLA üretimi için gereksinim duyduğu optimum fermentasyon koşullarının farklı olduğu görülmektedir. Peyniraltı suyunun substrat olarak kullanıldığı bu çalışma sonucunda, *Mortierella isabellina* ile en yüksek miktarda GLA üretimi için optimum fermentasyon koşulları şu şekilde belirlenmiştir:

- Besi ortamı başlangıç pH değeri 7,
- Azot kaynağı olarak maya eksrakı,
- %9 inokülasyon oranı,
- 22°C fermentasyon sıcaklığı,
- 120 d/dk. çalkalama hızı ve
- 81.87 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu.

5. SONUÇLAR

İnsan sağlığına birçok olumlu etkileri sebebiyle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) değerli bileşenlerdir. Çoğu PUFA'lara yönelik pazar talebi sürekli olarak artmakta ve mevcut kaynakların bu talebi karşılamak için yetersiz olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle PUFA'lar için alternatif kaynak arayışları sürmekte ve yağlı mikroorganizmalar olarak adlandırılan birçok küf ve maya PUFA'ların alternatif kaynakları olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada *M. isabellina* DSM 1414 küfü ile önemli bir PUFA olan GLA üretimini en yüksek düzeye çıkarmak için besi ortamı bileşimi ve fermentasyon parametreleri optimize edilmiştir. Bu amaçla deiyonize su ile demineralize peyniraltı suyu tozu (PAST) kullanılarak hazırlanan rekonstitüe peyniraltı suyu deproteinize edilerek (DP-PAS) substrat olarak kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında “her defada tek etken metodu” kullanılarak fermentasyonlar gerçekleştirilmiş ve bu kapsamda, besi ortamı başlangıç pH değeri (4, 5, 6, 7, 8), azot kaynağı (amonyum sülfat, et özütü, maya özütü, potasyum nitrat, soya peptonu) ve inokülasyon oranının (%1, %3, %5, %7, %9) en yüksek miktarda GLA üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu üretimler boyunca başlangıç şeker miktarı (30 g/L), çalkalama hızı (180 d/dk.) ve fermentasyon sıcaklığı (28°C) sabit tutulmuş ve her seferde tek parametre değiştirilerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak besi ortamlarının farklı başlangıç pH değerlerinde üretimler yapılmıştır. En yüksek GLA miktarı (0.55 g/L), besi ortamı başlangıç pH değeri 7 olan fermentasyonlardan elde edilmiştir ($P<0.05$). Bu veriler doğrultusunda, çalışmanın devamındaki tüm fermentasyonlarda besi ortamı başlangıç pH değerleri 7'ye ayarlanarak üretimler yapılmıştır. Besi ortamında kullanılan azot kaynağının, GLA üretimi üzerine etkisinin incelendiği fermentasyonların sonunda, en yüksek GLA üretimine (0.70 g/L) maya özütünün kullanıldığı fermentasyonlarda ulaşılmıştır ($P<0.05$). İnokülasyon oranının incelendiği fermentasyonlar sonucu en yüksek GLA üretiminin (1.08 g/L) %9 aşılama oranı ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda elde edildiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). Her defada tek etken metodu ile GLA üretimi için optimize edilen fermentasyon şartları (pH değeri 7; 1.5 g/L düzeyinde maya özütü azot kaynağı olarak; %9 inokülasyon oranı) kullanılarak ikinci aşamaya geçilmiştir.

Besi ortamı başlangıç şeker konsantrasyonu (g/L), çalkalama hızı (d/dk.) ve fermentasyon sıcaklığı'nın (°C) en yüksek miktarda GLA üretimi üzerine etkisi, Cevap yüzey metodu yöntemlerinden olan Box-Behnken tasarımı kullanılarak oluşturulan deneme deseni ile incelenmiştir. Seçilen bu 3 faktör için 3 seviyeli 3 orta noktalı 15 deneme içeren tasarım oluşturulmuştur.

Cevap yüzey metodu sonuçlarına göre; maksimum GLA üretimi için kuadratik etkileri içeren model denklemleri elde edilmiştir ($R^2=0.996$). Elde edilen sonuçlar yardımıyla model ve faktörler için varyans (ANOVA) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, modelin istatistiksel olarak önemli ($P<0.0001$) olduğu ve modelin elde edilen sonuçları %99.6 oranında temsil ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca modelin uyumluluğu (0.051, $P>0.05$) doğrulanmıştır. Bağımsız değişkenlerden şeker konsantrasyonu ve çalkalama hızı ($P<0.05$); şeker konsantrasyonu ve sıcaklık ($P<0.01$); çalkalama hızı ve sıcaklık ($P<0.001$) arasındaki etkileşimlerin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Faktörler ayrı ayrı incelendiğinde şeker konsantrasyonundaki değişimin ise tek başına istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Modelin varyans (ANOVA) analiz sonuçları ve kontur grafikleri incelendiğinde; fermentasyon sıcaklığının ve çalkalama hızının düşük tutulmasının GLA üretimini arttırdığı saptanmıştır. Besi ortamı başlangıç şeker konsantrasyonunun ise 72-87 g/L aralığında seçilmesinin GLA üretimini arttırdığı belirlenmiştir. Buna karşın ortamda yüksek miktarlarda (g/L) şekerin tüketilmeden kaldığı görülmüştür. Her bir fermentasyonda azot miktarının sabit tutulduğu göz önünde bulundurulduğunda, şeker miktarındaki artışın C/N oranını arttırdığı, bu durumun da hücrelerdeki lipid birikimini arttırdığı düşünülmektedir. Bu sonuca dayanarak, sonraki çalışmalarda C/N oranı yüksek tutularak (bu tez çalışmasında elde edilen optimum koşullardaki C/N oranına bağlı olarak), daha düşük başlangıç şeker konsantrasyonu ve azot miktarı ile çalışılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca on günlük fermentasyon sonunda mikrobiyal lipid ve GLA miktarlarındaki artışın devam etmesi ve hâlâ besi ortamında kullanılmamış şeker bulunması fermentasyon süresinin uzatılarak çalışmalar yapılabileceğini göstermektedir.

Gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda tespit edilen GLA miktarları cevap yüzeyi olarak kullanılmış, Design-Expert programı ile GLA üretiminin en yüksek miktarda gerçekleştirilebileceği optimum şartlar oluşturulmuştur. Optimum koşullar; 81.87 g/L besi ortamı şeker konsantrasyonu, 120 d/dk. çalkalama hızı ve 22°C fermentasyon sıcaklığı olarak belirlenmiş ve istenebilirlik fonksiyonunun değerinin 0.973 olduğu saptanmıştır. Optimum koşullar altında gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonu sonucunda 1.15 g/L GLA ve 6.31 g/L mikrobiyal yağ üretimi sağlanmış, GLA veriminin %2.81 ($Y_{GLA/S}$) ve lipid veriminin ise %15.47 ($Y_{L/S}$) olduğu belirlenmiştir.

Bu araştırmanın sonuçları, fermentasyon parametrelerinin optimizasyonu ile GLA üretiminde artış sağlanabileceğini göstermiştir. *Mortierella isabellina* DSM 1414 kullanılarak, peynir sanayiinin atığı olan PAS'dan yaklaşık %20 oranında GLA içeren mikrobiyal yağ üretilmiştir. Sıfır maliyetli bir substrat, insan sağlığı üzerine faydaları bilinen, farmasötik olarak kullanımı yaygın ve değerli bir ürün olan GLA'ya dönüştürülmüştür. Üretilen GLA miktarını arttırmak için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları ile ileride yapılacak olan diğer benzer çalışmalara ışık tutacak verilerin elde edildiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S. and Salem, A. 2009. Factors affecting the functional properties of whey protein products: A review. *Food Reviews International*, 25(3), 251-270.
- Abeln, F. and Chuck, C.J. 2020. The role of temperature, pH and nutrition in process development of the unique oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95: 1163-1172.
- Abu, O. A., Tewe, O. O., Losel, D. M. and Onifade, A. A. 2000. Changes in lipid, fatty acids and protein composition of sweet potato (*Ipomoea batatas*) after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology*, 72(2), 189-192.
- Adedayo, M. R., Ajiboye, E. A., Akintunde, J. K. and Odaibo, A. 2011. Single cell proteins: as nutritional enhancer. *Advances in Applied Science Research*, 2(5), 396-409.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. 2010. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 407-416.
- Anonim 2000: Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edition. AOAC International 481 N. Frederick Ave., Suite 500 Gaithersburg, MD 20877-2417.
- Ahmed, S. U., Singh, S. K., Pandey, A., Kanjilal, S., and Prasad, R. B. 2006. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 283-287.
- Aidil, A. H., Rosli, M. I., Wan-Mohtar, W. Y. 2005. "The Effect of Carbon and Nitrogen Ratios and Temperature on Lipid and γ -linolenic Acid (GLA) Yield in Four Fungal Isolates", *Malaysian Society of Applied Biology*, 34(1),15-19.
- Aki, T., Matsumoto, Y., Morinaga, T., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. and Suzuki, O.1998. Lipid composition of a newly isolated polyunsaturated fatty acid-producing fungus, *Achlya* sp. ma-2801. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86: 504-507.
- Akkuş, M. S. ve Karabudak, S. 2020. Biyoproses Çalışmalarında Deneysel Tasarım Yönteminin Uygulanması. *İleri Mühendislik Çalışmaları ve Teknolojileri Dergisi*, 1(2), 188-197.
- Akpınar Bayizit, A. ve Özcan Yılsay, T. 2004. Peyniraltı suyundan mikrobiyel yağ üretimi. *Akademik Gıda*, 10: 15-17.
- Akşit, S. 2009. Çocuk Beslenmesinde Omega-3 Yağ Asitleri. 45. Türk Pediatri Kongresi 16-21 Haziran 2009, Kapadokya.
- Almazan, O., Klibansky, M. and Otero, M. A. (1981). Microbial fat synthesis by *Rhodotorula glutinis* from blackstrap molasses in continuous culture. *Biotechnology Letters*, 3(11), 663-666.
- Alonso, D., L. and Maroto, F.,G. 2000. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 18 (6): 481-497.

- Anderson, R. E. 1970. Lipids of ocular tissues: IV. A comparison of the phospholipids from the retina of six mammalian species. *Experimental Eye Research*, 10(2), 339-3.
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., and Guebitz, G. M. 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 99(8), 3051-3056.
- Anupama and Ravindra, P. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, 18(6), 459-479.
- Aoki, H., Miyamoto, N., Furuya, Y., Mankura, M., Endo, Y., and Fujimoto, K. 2002. Incorporation and accumulation of docosahexaenoic acid from the medium by *Pichia methanolica* HA-32. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(12), 2632-2638.
- Asadi, S. Z., Khosravi-Darani, K., Nikoopour, H., & Bakhoda, H. 2015. Evaluation of the effect of process variables on the fatty acid profile of single cell oil produced by *Mortierella* using solid-state fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), 94-102.
- Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S. S., Sarris, D., Philippoussis, A. and Papanikolaou, S. 2018. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 336-367.
- Audic, J.L., Chaufer, B., Daufin, G. 2003. Non-food applications of milk components and dairy co-products: a review. *Lait* 83, 417-438.
- Bajpai, P. K., Bajpai, P. and Ward, O. P. 1991. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Journal of Industrial Microbiology And Biotechnology*, 8(3), 179-185.
- Baş, D. and Boyacı, I. H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of food engineering*, 78(3), 836-845.
- Bednarski, W., Leman, J. and Tomasik, J. 1986. Utilization of beet molasses and whey for fat biosynthesis by a yeast. *Agricultural Wastes*, 18(1), 19-26.
- Begin, M. E., Das, U. N., Ells, G. and Horrobin, D. F. 1985. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 19(2), 177-186.
- Bélignon, V., Christophe, G., Fontanille, P. and Larroche, C. 2016. Microbial lipids as potential source to food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 35-42.
- Beopoulos, A., et al. 2008. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7779-7789.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribe-larrea, J.L., Molina-Jouve, C. and Nicaud, J.M. 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research* 48, 375-387.

- Beucler, J., Drake, M., Foegeding, E. 2005. Design of a beverage from whey permeate. *Journal of Food Sci.* 70, S277–S285.
- Booyens, J., Dippenaar, N., Fabbri, D., Engelbrecht, P. and Katzeff, I. 1984. The effect of gamma-linolenic acid on the growth of human osteogenic sarcoma and oesophageal carcinoma cells in culture. *South African Medical Journal*, 65(7), 240-242.
- Botha, A., Strauss, T., Kock, J. L. F., Pohl, C. H. and Coetzee, D. J. 1997. Carbon source utilization and γ -linolenic acid production by Mucoralean fungi. *Systematic and applied microbiology*, 20(1), 165-170
- Botham, P. A. and Ratledge, C. 1979. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *Microbiology*, 114(2), 361-375.
- Boulton, C. A. and Ratledge, C. 1983. Use of transition studies in continuous cultures of *Lipomyces starkeyi*, an oleaginous yeast, to investigate the physiology of lipid accumulation. *Microbiology*, 129(9), 2871-2876.
- Brown, C. M. and Rose, A. H. 1969. Fatty-acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved-oxygen tension. *Journal of Bacteriology*, 99(2), 371-378.
- Bunker, H.J. 1945. Fodder yeast plants at I.G. Farbenindustrie, Wolfen. C.I.O.S. Report Item 22, File 29-4. HMSO: London.
- Bunker, H. J. (1946, November). The wartime production of food yeast in Germany. In *Proceedings of the Society for Applied Bacteriology* (Vol. 9, No. 1, pp. 10-14). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Bunker, H.J. Microbial food. Biochemistry of Industrial Micro-organisms; Rainbow, C.; A.H. Rose, Eds.; Academic Press: London, 1963; pp 34–67.
- Burns, R. A., Wibert, G., J., Diersen-Schade, D. A. and Kelly, C. M. 1999. Evaluation of single-cell sources of docosahexaenoic acid and arachidonic acid: 3-month rat oral safety study with an in utero phase. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 23-36.
- Burr, G. O. and Burr, M. M. 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry*, 82(2), 345-367.
- Burr, G. O. and Burr, M. M. 1930. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *Journal of Biological Chemistry*, 86(2), 587-621
- Cao, X., Pan, Y., Wei, W., Yuan, T., Wang, S., Xiang, L. and Yuan, Y. 2021. Single cell oil production by *Trichosporon* sp.: Effects of fermentation conditions on fatty acid composition and applications in synthesis of structured triacylglycerols. *LWT*, 148, 111691.
- Caporusso, A., Capece, A., & De Bari, I. 2021. Oleaginous yeasts as cell factories for the sustainable production of microbial lipids by the valorization of agri-food wastes. *Fermentation*, 7(2), 50.

- Čertík, M., Berhan, S. S. and Šajbidor, J. 1993. Lipit production and fatty acid composition of selected strains belonging to Mucorales. *Acta biotechnologica*, 13(2), 193-196.
- Certik, M., Nakahara, T. and Karnisaka, Y. 1996. Oleate 6-hydroxylase activity in the membrane fraction from an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispota*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1304(1), 56-64.
- Certik, M., Sakuradani, E. and Shimizu, S. 1998. Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids. *Trends in Biotechnology*, 16(12), 500-505.
- Certik, M. and Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87 (1): 1-14.
- Čertík, M., Breierová, E. and Juršíková, P. 2005. Effect of cadmium on lipit composition of *Aureobasidium pullulans* grown with added extracellular polysaccharides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55(3), 195-202.
- Certik, M., Slavikova, L., Masrnova, S. and Sajbidor, J. 2006. Enhancement of Nutritional Value of Cereals with gamma-Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations State Fermentations. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 75-82.
- Certik, M., Adamechoova, Z., Laoteng, K. 2012. Microbial Production of γ -Linolenic Acid: Submerged versus Solid-state Fermentations. *Food Science Biotechnology*. 21(4): 921-926.
- Chatterjee, S. and Guha, A. K. 2014. A study on biochemical changes during cultivation of *Rhizopus oryzae* in deproteinized whey medium in relation to chitosan production. *Letters in Applied Microbiology*, 59(2), 155-160.
- Chen, H. C. and Chang, C. C. 1996. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnology Progress*, 12(3), 338-341.
- Chen, H. C. and Liu, T. M. 1997. Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme and microbial technology*, 21(2), 137-142.
- Chen, B. Y., Lee, C. H., Chang, J. S. and Hsueh, C. C. 2015. Impedance fingerprint selection of DHA-producing photoautotrophic microalgae. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 57, 36-41.
- Cheirsilp, B. and Louhasakul, Y. 2013. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipit and direct transesterification of the lipit into biodiesel. *Bioresource Technology*, 142, 329-337.
- Chesters, C. G. C. and Peberdy, J. F. 1965. Nutritional factors in relation to growth and fat synthesis in *Mortierella vinacea*. *Microbiology*, 41(1), 127-134.
- Christensen, A.D., Kádár, Z., Oleskiewicz-Popiel, P., Thomsen, M.H. 2011. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38, 283–290.

- Clark, W.S. 1987. Status of whey and whey products in the USA today. *Bulletin of the International Dairy Federation.*, 212: 6-11.
- Cornwell, D.G, and Panganalana, R.V. 1981. Atherosclerosis. An intracellular deficiency of essential fatty acids. *Progress in Lipid Research* 20:365.
- Cui, F., Wan, C., Li, Y., Liu, Z. and Rajashekara, G. 2012. Co-production of lactic acid and *Lactobacillus rhamnosus* cells from whey permeate with nutrient supplements. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1278-1286.
- Das, U.N., Horrobin, D.F, Begin, M.E., Cunnane, S.1988. Clinical significance of essential fatty acids. *Nutrition*, 4:337.
- Das, U.N.1991. Essential fatty acids: biology and their clinical implications. *Asia Pacific Journal of Pharmacology*, 6:317.
- Das, U. N. 1994. Beneficial effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the management of systemic lupus erythematosus and its relationship to the cytokine network. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 51:207.
- Das, U.N. 2001. The brain–lipid–heart connection. *Nutrition*, 17:260.
- Das, U. N. and Fams, M. D. 2003. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the growth and development of the brain and memory. *Nutrition*, 19(1), 62–65.
- Davies, R. J. 1988. Yeast oil from cheese whey-process development. In Single cell oil, Moreton, R. S., Ed. Harlow, Longmans: 99-146.
- Davies, R. J., Holdsworth, J. E. and Reader, S. L. 1990. The effect of low oxygen uptake rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 569-573.
- DeBell, R. M. and Jack, R. C. (1975). Stereospecific analysis of major glycerolipids of *Phycomyces blakesleeanus* sporangioophores and mycelium. *Journal of Bacteriology*, 124(1), 220-224.
- de Bièvre, C. and Latgé, J. P. 1980. Lipid composition of *Entomophthora obscura* Hall & Dunn. *Microbiology*, 121(1), 151-158.
- Dedyukhina, E. G., Chistyakova, T. I., Mironov, A. A., Kamzolova, S. V., Minkevich, I. G. and Vainshtein, M. B. 2015. The effect of pH, aeration, and temperature on arachidonic acid synthesis by *Mortierella alpina*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 242-248.
- Demir, M., 2010. Peyniraltı Suyundan Mikrobiyel Yağ Üretimi ve Üretilen Yağların Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Demir, M., Turhan, I., Kucukcetin, A. and AlpKent, Z. 2013. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase. *Bioresource technology*, 128, 365-369.
- Demir, M., and Gündes, A. G. 2020. Single-cell oil production by *Mortierella isabellina* DSM 1414 using different sugars as carbon source. *Biotechnology Progress*,

36(6), e3050.

- Demirel, B., Yenigun, O., Onay, T.T. 2005. Anaerobic treatment of dairy waste waters: a review. *Process Biochemistry*.40, 2583–2595
- Denli, Y. ve Tekin, A. 2000. Yağ üretimi ve mikroorganizmalar. *Gıda*, 25 (4) : 265-270.
- Derringer, G. and Suich, R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219.
- Dippenaar, N., Booyens, J., Fabbri, D., Engelbrecht, P. and Katzeff, I. 1982. The reversibility of cancer: evidence that malignancy in human hepatoma cells is gamma-linolenic acid deficiency-dependent. *South African Medical Journal*, 62(19), 683-685.
- Dong, M. and Walker, T., H. 2008. Addition of polyunsaturated fatty acids to canola oil by fungal conversion *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 514-520.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Strub, C. and Schorr-Galindo, S. 2014. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*, 68(04), 135–150.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A. 2008. Alcoholic beverage from cheese whey: identification of volatile compounds. Bioenergy: challenges and opportunities, International Conference and Exhibition on Bioenergy: April 6th–9th. Universidade do Minho. Guimarães, Portugal.
- Dyal, S. D., Bouzidi, L. and Narine, S. S. 2005. Maximizing the production of [gamma]-linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. *Food Research International*. 38: 815-829.
- Dyerberg, J. H. E. S. J., Bang, H. O., Stoffersen, E., Moncada, S., and Vane, J. R. 1978. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?. *The Lancet*, 312(8081).
- Dyerberg, J. H. E. S. J., and Bang, H. O. 1979. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *The Lancet*, 314(8140), 433-435
- Economou, C. N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S. and Vayenas, D. V. 2010. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Technology*, 101(4), 1385-1388.
- Elander, R. P. 2003. Industrial production of β -lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5), 385-392.
- Emelyanova, E. 1996. γ -linolenic acid production by *Cunninghamella japonica* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 31: 431-434.
- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I. and Madani, M. 2012. Selection and optimization of single cell oil production from *Rodotorula* 110 using environmental waste as substrate. *Journal of Cell and Molecular Research*, 4(2), 68-75.

- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I. and Madani, M. 2013. Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Candida gali* and *Yarrowia lipolytica* M7. *Journal of Cell And Molecular Research*, 5(1), 17-23.
- Erdoğan, F. 2007. Yükseltilmiş d-optimal dizayn yöntemi kullanılarak mühendislik dizaynlarında etkinliğin geliştirilmesi: ‘sentetik jet’ dizayn optimizasyon çalışması. *Journal of Aeronautics and Space Technologies*, 3, 1, 51-63.
- Eroshin, V. K., Satroutdinov, A. D., Dedyukhina, E. G. and Chistyakova, T. I. 2000. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis. *Process Biochemistry*, 35(10), 1171-1175.
- Evans, C. T. and Ratledge, C. 1983a. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* 18: 623-629.
- Evans, C. T. and Ratledge, C. 1983b. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. *Lipids*, 18(9), 630-635.
- Evans, C. T. and Ratledge, C. 1984. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microbiology*, 130(7), 1693-1704.
- Evans, C. T., Scragg, A. H. and Ratledge, C. 1983a. A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts. *European Journal of Biochemistry*, 130(1), 195-204.
- Evans, C. T., Scragg, A. H. and Ratledge, C. 1983b. Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts by long-chain fatty acyl-CoA esters. *European Journal of Biochemistry*, 132(3), 617-622.
- Evans, C. T., Ratledge, C. 1985. Possible regulatory roles of ATP: citrate lyase, malic enzyme, and AMP deaminase in lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(11), 1000-1005.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2006. Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 676-683.
- Fakas, S., M. Certik, S. Papanikolaou, G. Aggelis, M. Komaitis and M. Galiotou-Panayotou. 2008. [gamma]-Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology*. 99: 5986–5990.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2009a. Biochemistry and Biotechnology of Single Cell Oil. in: Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C. R., Dussard, C. G. (Eds.), *New Horizons in Biotechnology*, AsiaTech Publishers Inc., New Delhi (India).
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A. and Aggelis, G. 2009b. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass*

- & *Bioenergy*, 33 (4): 573-580.
- Fakas, S., Bellou, S., Makri, A. and Aggelis, G. 2009c. Single cell oil and gamma-linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol. *Microbial Conversions of Raw Glycerol*, 85-99.
- Fakas, S., Makri, A., Mavromati, M., Tselepi, M. and Aggelis, G. 2009d. Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(23), 6118-6120.
- Fidler, N., Koletzko, B. and Sauerwald, T. U. 1999. Single cell oils production and application. *Pregledni znanstveni prispevek*, 74(2), 37-45.
- Field, E. J. 1978. γ -Linolenate In Multiple Sclerosis. *The Lancet*, 311(8067), 780.
- Field, E. J. and Joyce, G. 1978. Effect of prolonged ingestion of γ -linolenate by MS patients. *European Neurology*, 17(2), 67-76.
- Fiocchi, A., Sala, M., Signoroni, P., Banderali, G., Agostoni, C. and Riva, E. 1994. The efficacy and safety of γ -linolenic acid in the treatment of infantile atopic dermatitis. *Journal of International Medical Research*, 22(1), 24-32.
- Floetenmeyer, M. D., Glatz, B. A. and Hammond, E. G. 1985. Continuous culture fermentation of whey permeate to produce microbial oil. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 633-637.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. and McSweeney, P.L.H. 2000. Fundamentals of Cheese Science, Aspen Publishers, Gaithersburg.
- Frey, D. D., Engelhardt, F. and Greitzer, E. M. 2003. A role for "one-factor-at-a-time" experimentation in parameter design. *Research in Engineering design*, 14(2), 65-74.
- Fukuda, H. and Morikawa, H. 1987. Enhancement of γ -linolenic acid production by *Mucor ambiguus* with nonionic surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 15-20.
- Galanakis, C.M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology* 26, 68–87.
- Galanakis, C.M., Fountoulis, G., Gekas, V. 2012. Nanofiltration of brackish groundwater by using a polypiperazine membrane. *Desalination* 286: 277–284.
- Galanakis, C.M., Chasiotis, S., Botsaris, G., Gekas, V. 2014. Separation and recovery of proteins and sugars from Halloumi cheese whey. *Food Research International*. 65: 477-483.
- Galanakis, C.M. 2015. Food Waste Recovery. Academic Press is an Imprint of Elsevier. United States of America. pp:42-44.
- Ganuza, E., Anderson, A.J. C. Ratledge. 2008. High-cell-density cultivation of

- Schizochytrium sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system. *Biotechnology Letters* 30: 1559–1564.
- Gao, D., Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X. and Chen, S. 2013. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresource Technology*, 133, 315-321.
- Geiger, E. O. 1996. Statistical methods for fermentation optimization. In *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook* (pp. 161-180). William Andrew Publishing.
- Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2002. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 303-307.
- Gill, C. O., and Ratledge, C. 1973. Regulation of de novo fatty acid biosynthesis in the n-alkane-utilizing yeast, *Candida* 107. *Microbiology*, 78(2), 337-347.
- Gill, I. and Valivety, R. 1997. Polyunsaturated fatty acids. I. Occurrence, biological activities, and applications. *Trends Biotechnology*. 15 (10): 401- 409.
- González, M. I .1996 The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57: 1–11.
- Gorissen, L., De Vuyst, L., Raes, K., De Smet, S. and Leroy, F. 2012. Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among strains. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 234-240.
- 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.
- Grothe, E., Moo-Young, M. and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1-2), 132-141.
- Gu, X., Fu, X. and Li, L. 2018. Effect of Temperature and Agitation Speed on Fatty Acid Accumulation in *Mortierella alpina*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(10), 2319-2324.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D. and Malcata, F. X. 2011. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International*, 44(9), 2721-2729.
- Gurovic, M. S. V., Gentili, A. R., Olivera, N. L. and Rodríguez, M. S. 2014. Lactic acid bacteria isolated from fish gut produce conjugated linoleic acid without the addition of exogenous substrate. *Process Biochemistry*, 49(7), 1071-1077.
- Guschina, I. A. and Harwood, J. L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160-186.
- Hansson, L. and Dostálek, M. 1986. Effect of culture conditions on fatty acid composition in lipids produced by the yeast *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Journal of the*

- American Oil Chemists' Society*, 63(9), 1179-1184.
- Hansson, L. and Dostálek, M. 1988. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28 (3): 240-246.
- Hassan, M., Blanc, P. J., Granger, L. M., Pareilleux, A. and Goma, G. 1996. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 31(4), 355-361.
- Heidari, M., Kariminia, H. R. and Shayegan, J. 2016. Effect of culture age and initial inoculum size on lipid accumulation and productivity in a hybrid cultivation system of *Chlorella vulgaris*. *Process Safety and Environmental Protection*, 104, 111-122.
- Hiruta, O., Kamisaka, Y., Yokochi, T., Futamura, T., Takebe, H., Satoh, A., Nakahara, T. and Suzuki, O. 1996. γ -Linolenic acid production by a low temperature-resistant mutant of *Mortierella ramanniana*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), 119-123.
- Hoogstraten, J. J. 1987. Trends in whey utilization. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 17, 212-215.
- Horrobin, D. F. 1979. Multiple sclerosis: the rational basis for treatment with colchicine and evening primrose oil. *Medical hypotheses*, 5(3), 365-378.
- Horrobin, D. F. 1980. The reversibility of cancer: the relevance of cyclic AMP, calcium, essential fatty acids and prostaglandin E1. *Medical Hypotheses*, 6(5), 469-486.
- Hsiao, T. -Y, Glatz, C. E., Glatz, B. A. 1994. Broth recycle in a yeast fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(10), 1228-1234.
- Huang, Y. S. and Ziboh, V. A. 2001. Gamma linolenic acid: recent advances in biotechnology and clinical applications. The American Oil Chemists Society s.1-5.
- Huang, C., Cui, X. X., Wu, H., Lou, W. Y. and Zong, M. H. 2014. The effect of different factors on microbial oil production by *Trichosporon fermentans* on rice straw acid hydrolysate. *International Journal of Green Energy*, 11(8), 787-795.
- Hwang, B.H., Kim, J.W., Park, C.Y., Park, C.S., Kim, Y.S. and Ryu, Y.W. 2005. High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH₄OH as a nitrogen source and pH control. *Biotechnology Letters*. 27: 731-735.
- Jackson, F. M., Fraser, T. C., Smith, M. A., Lazarus, C., Stobart, A. K., and Griffiths, G. 1998. Biosynthesis of C18 polyunsaturated fatty acids in microsomal membrane preparations from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry*, 252(3), 513-519.
- Jang, H. D., Lin, Y. Y. and Yang, S. S. 2005. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*, 96(15), 1633-1644.
- Jelen, P. 2002. Whey processing: Utilization and Products. In: Encyclopedia of Dairy

- Sciences , Roginski H., Fuquay J.W. & Fox P.F. (eds), 4: 2739–2751.
- Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, L.J. 2008. Whey-based beverages – a new generation of dairy products. *Mljekarstvo* 58, 257–274.
- Jiru, T. M., Groenewald, M., Pohl, C., Steyn, L., Kiggundu, N. and Abate, D. 2017. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. 3 *Biotech*, 7(2), 1-11.
- Johnson, V. W., M. Singh, V. S. Saini, D. K. Adhikari, V. Sista and N. K. Yadav. 1995. Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14: 1-4.
- Juanssilfero, A. B. et. al. 2018. Effect of inoculum size on single-cell oil production from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(6), 695-702.
- Kates, M., Pugh, E. L. and Ferrante, G. 1984. Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. In *Membrane fluidity* (pp. 379-395). Springer, Boston, MA.
- 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. In *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 78(4), pp. 341–346.
- Kennedy, M. J., Reader, S. L. and Davies, R. J. 1993. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(5), 625-634.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E. S. and Azbar, N. 2016. Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 368-388.
- Kessell, R.H.J. 1968. Fatty acids of *Rhodotorula gracilis*: fat production in submerged culture and the particular effect of pH value. *Journal of Applied Bacteriology* 31:220–231.
- Kosikowski, F.V. 1979. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science* 62: 1149–1160
- Koutinas, A.A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A., Bosnea, L. A. 2009. Whey valorisation: a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*. 100:3734–3739.
- Köksoy, O. 2001. Taguchi ve cevap yüzey felsefelerinin birleştirilmesi: problem ve çözüm stratejileri, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ledingham, G.A., Clayson D.H.F., Balls, A.K. 1945. Production of *Oidium lactis* on waste sulphite liquor. B.I.O.S. Final Report. 236, Report III, 31–44. His Majesty's

Stationery Office: London.

- Lee, B. H. 2015. Fundamentals of Food Biotechnology. Second edition, Wiley-Blackwell, p. 518.
- Lee, K. S., Kwon, T. H., Park, T. and Jeong, M. S. 2020. Microbiology and Microbial products for Enhanced Oil Recovery. In: Theory And Practice in Microbial Enhanced Oil Recovery. Gulf Professional Publishing, 27-65.
- Lee, B. H. 2022. *Advanced Fermentation and Cell Technology* (Byong H. Lee (ed.); First). Wiley Blackwell.
- Leman, J. and Brakoniecka-Sikorska, A. 1996. Effect of growth conditions on biosynthesis of oil by *Mortierella ramanniana*. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 5/46, 111–120.
- Li, Y. H., Zhao, Z. B. and Bai, F. W. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 312-317.
- Li, Q., Du, W. and Liu, D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 749-756.
- Li, Y., Han, D., Yoon, K., Zhu, S., Sommerfeld, M. and Hu, Q. 2013. Molecular and cellular mechanisms for lipid synthesis and accumulation in microalgae: biotechnological implications. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 545-565.
- Lindberg, A. M. and Molin, G. 1993. Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus *Mortierella alpina* CBS 343.66 in fermentor cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 450-455.
- Lindner, P. 1922. Das Problem der Biologischen Fettbildung und Fettgewinnung. *Z. Angewandte Chemie*. 35, 110–114.
- Lindskou, R., and Højlmer, G. 1992. Polyunsaturated fatty acids in plasma, red blood cells and mononuclear cell phospholipids of patients with atopic dermatitis. *Allergy*, 47(5), 517-521.
- Liu, G. Q. and Jin, X. C. 2008. Screening and optimization of microbial lipid production by *Thamnidium* sp., a novel oleaginous fungus isolated from forest soil. *Journal of Biotechnology*, (136), S434.
- Lu, S., Wang, J., Niu, Y., Yang, J., Zhou, J. and Yuan, Y. 2012. Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7), 1651-1662.
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., Aparnathi, K. D. 2016. Whey and its Utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 5(8): 134-155.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. Prentice hall, Upper Saddle River, NJ.
- Mandal, S., Puniya, M., Sangu, K.P.S., Dagar, S.S., Singh, R.A., Puniya, A.K. 2013. Dairy by-products: Wastes or resources? The shifting perception after valorization. In: Chandrasekaran, M. (Ed.), Valorization of Food Processing By-Products. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 617–648.
- Manku, M. S., Horrobin, D. F., Morse, N. L., Wright, S. and Burton, J. L. 1984. Essential fatty acids in the plasma phospholipids of patients with atopic eczema. *British Journal of Dermatology*, 110(6), 643-648.
- Marwaha, S. S. and Kennedy, J. F. 1988. Review: Whey pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science & Technology*. 23: 323–336.
- McNeil, B., Archer, D., Giavasis, I., Harvey, L. 2013. Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals. In I. G. and L. H. Brian McNeil, David Archer (Ed.), *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited.
- Meyer, F. and Bloch, K. 1963. Effect of temperature on the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Torulopsis utilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77, 671-673.
- Meyer, K.H. and Schweizer, E. 1976. Control of fatty-acid synthetase levels by exogenous long-chain fatty acids in the yeasts *Candida lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 65, 317–324.
- Mills, D., E., Huang, Y., S. and Poisson, J., P. 1996. γ -Linolenic Acid Attenuates Blood Pressure Responses to Environmental Stimuli: Implications for Human Essential Hypertension. In: Mills, D. E (Ed.) *Gamma-linolenic acid: Metabolism and its roles in nutrition and medicine*. AOCS Publishing, USA, pp:197-207.
- Miranti, A., Arbiyanti, R. and Utami, T. S. 2018. Effect of pH, temperature and medium agitation rate in production of AA, DHA, EPA from *Aspergillus oryzae* with submerged fermentation. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 105, No. 1, p. 012113). IOP Publishing.
- Misra, S., Ghosh, A. and Dutta, J. 1984. Production and composition of microbial fat from *Rhodotorula glutinis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(1), 59-65.
- Mlyer-Rienecker, H. J., Jenssin, H. L., Köhler, H., Field, E. J. and Shenion, B. K. 1976. Effect of γ -linolenate in multiple sclerosis. *The Lancet*, 308(7992), 966.
- Moa, S.-K, Mattila, L., Jansen, C. T. and Uotila, P. 1987. Evening primrose oil in the treatment of atopic eczema: effect on clinical status, plasma phospholipid fatty acids and circulating blood prostaglandins. *British Journal of Dermatology*, 117(1), 11-19.
- Moon, N. J., Hammond, E. G., and Glatz, B. A. 1978. Conversion of cheese whey and

- whey permeate to oil and single-cell protein. *Journal of Dairy Science*, 61(11), 1537-1547.
- Morita, N., N. Ichise, I. Yumoto, Y. Yano, S. Ohgiya and H. Okuyama. 2005. Cultivation of microorganisms in the cultural medium made from squid internal organs and accumulation of polyunsaturated fatty acids in the cells. *Biotechnology Letters* 27: 933-941.
- Morr, C. V. 1984. Production and use of milk proteins in food. *Food Technology*. 38:39-48.
- Morse, P. F. et. al. 1989. Meta-analysis of placebo-controlled studies of the efficacy of Epogam in the treatment of atopic eczema. Relationship between plasma essential fatty acid changes and clinical response. *British Journal of Dermatology*, 121(1), 75-90.
- Mukherjee, K. D. 1998. Lipid Biotechnology. In: Akoh, C. C., Min D. B. (Ed.) *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp. 589-640
- Naguib, K. and Saddik, K. (1960). Growth and metabolism of *Aspergillus nidulans* Eidam on different nitrogen sources in synthetic media conducive to fat formation. *Canadian Journal of Botany*, 38(4), 613-622.
- Naim, N., Saad, R. R. and Naim, M. S. 1985. Production of lipids and sterols by *Fusarium oxysporum* (Schlecht). Utilization of some agro-industrial by-products as additives and basal medium. *Agricultural Wastes*, 14(3), 207-220.
- Nakahara, T., T. Yokocki, Kamisaka, Y., Suzuki, O. 1992. Gamma-Linolenic acid from genus *Mortierella*. *Industrial Applications of Single Cell Oils*; Kyle, D.J.; C. Ratledge, Eds.; AOCS: Champaign, IL, pp 61-97.
- Nasrabadi, M. R. N. and Razavi, S. H. 2011. Optimization of β -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Science and Biotechnology*, 20(2), 445-454.
- Neuringer, M., and Connor, W. E. 1986. n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality. *Nutrition Reviews*, 44(9), 285-294.
- Novak, S., Zechner-Krpan, V. and Marić, V. (2004). Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 42(3), 213-218.
- O'Brien, J. S., and Sampson, E. L. 1965. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *Journal of Lipid Research*, 6(4), 545-551
- Oborn, R. and Piggott, K. L. 1968. A review of methods available for whey utilization in Australia. *Australian Journal of Dairy Technology*. 23: 131.
- Panesar, P.S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. and Bunko, K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105: 1-14.

- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. and Marc, I. 2002a. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 737-744.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. 2002b. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 308–312.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. and Marc, I. (2003) Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Current Microbiology* 46, 124–130.
- Papanikolaou, S., Sarantou, S., Komaitis, M., and Aggelis, G. 2004a. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 867–875.
- Papanikolaou, S., M. Komaitis and G. Aggelis. 2004b. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*. 95: 287-291.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. 2006. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology* 52, 134–142.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2007. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109: 1060-1070.
- Papanikolaou, S., and Aggelis, G. 2011a. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051.
- Peng, X. W. and H. Z. Chen. 2008. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresource Technology*. 99: 3885-3889.
- Pesta, G., Meyer-Pittroff, R., Russ, W. 2007. Utilization of whey. In: Oreopoulou, V., Russ, W. (Eds.), *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Springer Science+Business Media LLC, New York, pp. 193–207.
- Poulos, A., Darin-Bennett, A. and White, I. G. 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative biochemistry and physiology Part B: Comparative biochemistry*, 46(3), 541-549.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F. and Rivas, J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Radha, P., Narayanan, S., Chaudhuri, A., Anjum, S., Thomas, D. L., Pandey, R. and Ramani, K. 2020. Synthesis of single-cell oil by *Yarrowia lipolytica* MTCC 9520

- utilizing slaughterhouse lipid waste for biodiesel production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12.
- Rapoport, S. I., Rao, J. S. and Igarashi, M. 2007. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. Prostaglandins, *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(5-6), 251-261
- Rasheva, T., Kujumdzieva, A. and Hallet, J. N. 1997. Lipid production by *Monascus purpureus* albino strain. *Journal of Biotechnology*, 56(3), 217-224
- Ratledge, C. 1968. Growth of moulds on a fraction of n-alkanes predominant in tridecane. *Journal Of Applied Bacteriology*. 31, 232–240.
- Ratledge, C. 1976. Microbial production of oils and fats. Food from Waste; G.G. Birch; K.J. Parker; J.T. Worgan, Eds.; Applied Science Publishers: UK, pp 98–113.
- Ratledge, C. 1988. Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics. In Single cell oil, Moreton, R. S., Ed. Harlow, Longmans: 33-70.
- Ratledge, C. 1993. Single cell oils—have they a biotechnological future? *Trends in Biotechnology*, 11 (7): 278-284.
- Ratledge, C. 1994. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In Technological advances in improved and alternative sources of lipids (pp. 235-291). Springer, Boston, M.
- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86 (11): 807-815.
- Ratledge, C. 2006. Microbial production of γ -linolenic acid. Handbook of Functional Lipids; Akoh, C., Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, pp 19–45.
- Ratledge, C. 2010. Single Cell Oils for The 21st Century. In: Cohen, Z., & Ratledge, C. (Eds.) Single Cell Oils: Microbial and Algal Oils. AOCS Press, United States of America, pp. 3-26
- Ratledge, C. and J. Wynn. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 51: 1-51.
- Rehm, H., Reed, G., Puhler, A. and Stadler, P. 1995. Biotechnology: Enzymes, biomass. *Food and Feed, VCH Cambridge*, 170-171, 702-705.
- Ristić-Medić, D. K., Vučić, V. M., Takić, M. M., Karadžić, I. and Glibetić, M. D. 2013. Polyunsaturated fatty acids in health and disease. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(9), 1269-1289.
- Roukas, T. 1999. Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 617-621.
- Roux, M. P., Kock, J. L. F., Botha, A., Du Preez, J. C., Wells, G. V. and Botes, P. J. (1994). *Mucor*—a source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. *World Journal*

- of Microbiology and Biotechnology*, 10(4), 417-422.
- Russ, W., Schnappinger, M. 2007. Waste related to the food industry: a challenge in material loops. In: Oreopoulou, V., Russ, W. (Eds.), *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Springer Science+Business Media LLC, New York, pp. 1–13
- Safe, S. 1974. Lipit and alkali extractable fatty acids from *Mucor rouxii*: Effect of thermal changes in growth environment and age of cells. *Lipids*, 9(12), 952-956.
- Sajbidor, J., Certik, M. and Dobronova, S. 1988. Influence of different carbon sources on growth, lipit content and fatty acid composition in four strains belonging to mucorales. *Biotechnology Letters*. 10: 347-350.
- Sakarika, M. and Kornaros, M. 2016. Effect of pH on growth and lipit accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*, 219, 694-701.
- Schlager, S. I., Madden, L. D., Meltzer, M. S., Bara, S. and Mamula, M. J. 1983. Role of macrophage lipits in regulating tumoricidal activity. *Cellular immunology*, 77(1), 52-68.
- Singh, A.K., Singh, K. 2012. Utilization of whey for the production of instant energy beverage by using response surface methodology. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 4, 103–111.
- Shaw, R. 1965. The occurrence of gamma-linolenic acid in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta*, 98, 230–237.
- Shaw, R. 1966a. The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. *Advances in Lipit Research*. 4, 107–174.
- Shaw, R. 1966b. The fatty acids of phycomycete fungi, and the significance of the γ -linolenic acid component,. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 18, 325–331.
- Shimizui, S., Kawashima, H., Shinmen, Y., Akimoto, K. and Yamada, H. 1988. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(9), 1455-1459.
- Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H. and Yamada, H. 1989. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 11-16.
- Shuler, M.L. And Kargi, F. 2008. *Bioprocess Engineering, Basic Concepts*. Prentice Hall PTR, New Jersey, pp 535.
- Simopoulos, A. P. 1989. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary ω 3 and ω 6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality. *The Journal of nutrition*, 119(4), 521-528.
- Smith, G. M. and Calam, C. T. 1980. Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnology Letters*, 2(6), 261-266.

- Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins – From “gutter-to-gold”. *International Dairy Journal*. 18, 695–704.
- Somacal, S. et. al. 2020. Maximization of microbial oil containing polyunsaturated fatty acid production by *Umbelopsis (Mortierella) isabellina*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101831.
- Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Sambaiah, K. and Lokesh, B. R. 2002. Effect of culture conditions on lipit and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochemistry*. 38: 1719-1724.
- Srere, P. A. 1972. The citrate enzymes: their structures, mechanisms, and biological functions. *Current topics in cellular regulation*, 5, 229-283.
- Steinberg, M. P. and Ordal, Z. J. 1954. Microbiological fat production. Effect of fermentation variables on rate of fat formation by *Rhodotorula gracilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2, 873-877.
- Stredanska, S. and Šajbidor, J. 1993. Influence of carbon and nitrogen sources on the lipit accumulation and arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Acta Biotechnologica*, 13(2), 185-191.
- Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S. and Zanetti, F. 2000a. [gamma]-Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Bioresource Technology*. 73: 41-45.
- Stredansky, M., Conti, E. and Salaris, A. 2000b. Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 304-307
- Subhash, G. V. and Mohan, S. V. 2015. Sustainable biodiesel production through bioconversion of lignocellulosic wastewater by oleaginous fungi. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 5(2), 215-226.
- Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M. and Bajpai, R. 2010. Microbial lipits from renewable resources: production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(12), 1271-1287.
- Sumner, J. L., Morgan, E. D. and Evans, H. C. 1969. The effect of growth temperature on the fatty acid composition of fungi in the order Mucorales. *Canadian Journal of Microbiology*, 15(6), 515-520.
- Sun, D., Zhou, C., Zhu, C. and Sun, Y. 2015. Effects of culture medium on PUFAs production by *Mortierella isabellinas*. In *Advances in Applied Biotechnology* (pp. 219-228). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tai, M., & Stephanopoulos, G. 2013. Engineering the push and pull of lipit biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, 1-9.
- Taskin, M., Saghafian, A., Aydogan, M. N. and Arslan, N. P. 2015. Microbial lipit production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile

- whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), 595-605.
- Tereshina, V. M., Memorskaya, A. S. and Feofilova, E. P. 2005. Lipit composition of cells of heterothallic strains in the developmental cycle of *Blakeslea trispora*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 394-398.
- Thomas, L. M. and Holub, B. J. 1994. Nutritional aspects of fats and oils. In *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids* (pp. 16-49). Springer, Boston, MA.
- Vamvakaki, A. N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. 2010. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Engineering in Life Sciences*, 10(4), 348-360.
- Wagner, A. and Daum, G. 2005. Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions*, 33(5), 1174-1177.
- Wagner, C., Benecke, C., Buchholz, H., Beutel, S. 2014. Enhancing bioethanol production from delactosed whey permeate by upstream desalination techniques. *Engineering in Life Sciences*. 14:520-529.
- Ward, O. P., & Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627-3652
- Weete, J. D. 1980. Fungal lipids. In *Lipid Biochemistry of Fungi And Other Organisms* (pp. 9-48). Springer, Boston, MA.
- Wibert, G., Burns, R., Diersen-Schade, D. and Kelly, C. 1997. Evaluation of single cell sources of docosahexaenoic acid and arachidonic acid: a 4-week oral safety study in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35 (10-11): 967-974.
- Woodbine, M. 1959. Microbial fat: microorganisms as potential fat producers. *Progress in Industrial Microbiology*. 1:179-245.
- Wu, D. and Meydani, S., N. 1996. γ -Linolenic Acid and Immune Function In: Mills, D. E (Ed.) Gamma-linolenic acid: Metabolism and its roles in nutrition and medicine. AOCS Publishing, USA, pp:114-125.
- Wu, C.F.J. and Hamada M. 2021. Experiments: planning, design, and parameter optimization. Wiley, New York, 169 p.
- Wynn, J. P., Hamid, A. A., Li, Y. and Ratledge, C. 2001. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 147(10), 2857-2864.
- Wynn, J. P. and Ratledge, C. 2005. Microbial Production of Oils and Fats. In: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R. E. (Eds.), *Food Biotechnology* (pp. 443-473). CRC Press.
- Xian, M., Yan, J., Kang, Y., Liu, J., Bi, Y. and Zhen, K. 2001. Production of γ -linolenic acid by *Mortierella isabellina* grown on hexadecanol. *Letters in applied microbiology*, 33(5), 367-370.

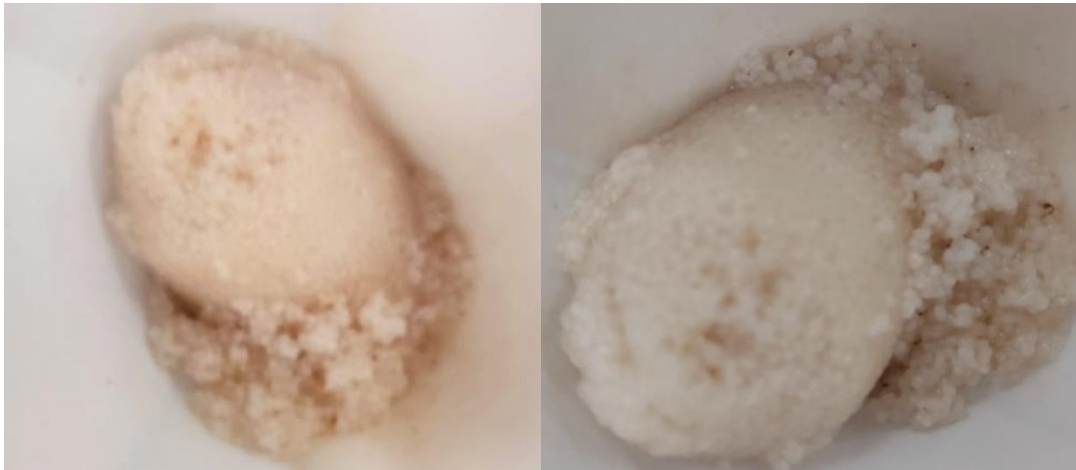
- Xian, M., Kang, Y., Yan, J., Liu, J., Bi, Y. and Zhen, K. 2002a. Production of linolenic acid by *Mortierella isabellina* grown on octadecanol. *Current microbiology*, 44(2), 141-144.
- Xian, M., Nie, J., Meng, Q., Liu, J., Zhou, C., Kang, Y. and Zhen, K. 2003. Production of γ -linolenic acid by disrupted mycelia of *Mortierella isabellina*. *Letters in applied microbiology*, 36(3), 182-185.
- Xing, D., Wang, H., Pan, A., Wang, J. and Xue, D. 2012. Assimilation of corn fiber hydrolysates and lipid accumulation by *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy* 39: 494-501.
- Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., Bai, F. and Zhao, Z. K. 2015. Recycling microbial lipid production wastes to cultivate oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, 175, 91-96.
- Yano, Y., Nakayama, A., Saito, H. and Ishihara, K. (1994). Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. *Lipids*, 29(7), 527-528
- Yıldırım, Z. B. 2019. Asfalt betonunda atık lastik ve cam elyaf ilavesinin optimizasyonunda Box-Behnken tasarımı ve merkezi kompozit tasarımların karşılaştırılması. Çukurova 3. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi, ss.94-103, 3-6 Ekim, Adana.
- Ykema, A., Verbree, E. C., Kater, M. M. and Smit, H. 1988. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in whey permeate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 211-218.
- Yong-Hong, L. I., Bo, L. I. U., Zong-Bao, Z. H. A. O. and Feng-Wu, B. A. I. 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(4), 650-656.
- Zadow, J.G. 1987. Whey production and utilization in Oceania. *Bulletin of the International Dairy Federation.*, 212:12-6.
- Zhu, L. Y., Zong, M. H. and Wu, H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99(16), 7881-7885.

7. EKLER

Ek.1. Biyokütlelerin besi ortamından ayrılması



Ek.2. 120 d/dk. çalkalama hızında gelişen biyokütleler

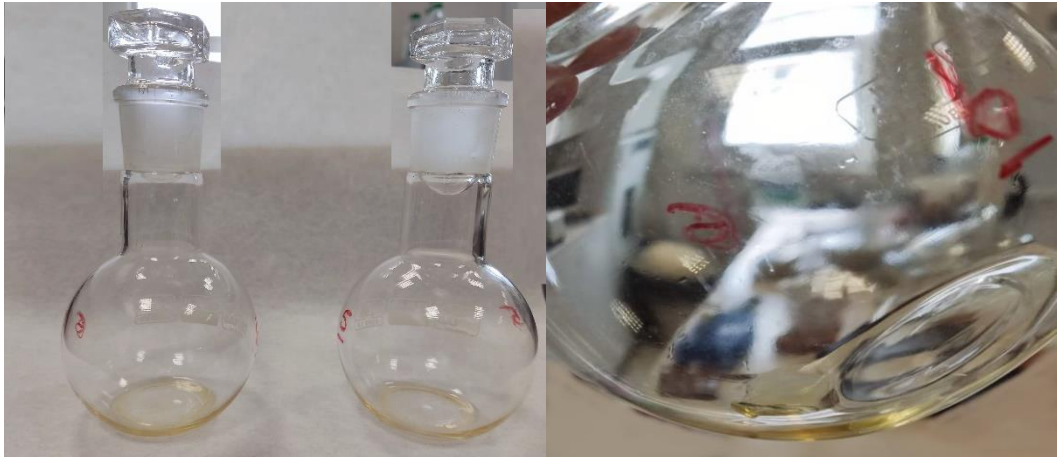


Ek.3. 180 d/dk. çalkalama hızında gelişen biyokütleler



Ek.4. 240 d/dk. çalkalama hızında gelişen biyokütleler



Ek.5. Biyokütlelerin parçalanması ve yağ ekstraksiyonu**Ek.6.** Elde edilen mikrobiyel yağlar

ÖZGEÇMİŞ

Aysen Güher GÜNDEŞ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2014-2023	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D, Antalya
Yüksek Lisans 2011-2014	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği A.B.D, Antalya
Lisans 2005-2010	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Single-cell oil production by *Mortierella isabellina* DSM1414 using different sugars as carbon source (Biotechnology Progress, cilt.36, sa.6, 2020)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

2. Tatlı Asidofiluslu Süt (Süt Endüstrisinde Yenilikçi Yaklaşımlar Sempozyumu, Denizli, Türkiye, 15 - 16 Kasım 2012, ss.60-61)