

PHYCOMYCES NITENS VE MUCOR MUCEDO'DAN FERMENTASYON YOLUYLA BETA KAROTEN ELDE EDİLMESİ

Mustafa KAHYAOĞLU* Merih KIVANÇ**

*Dicle Üniversitesi Siirt Eğitim Fakültesi/Siirt

**Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü /Eskişehir

ÖZET

Son zamanlarda biyoteknolojideki gelişmelere bağlı olarak fermantasyonla beta karoten üretimi üzerine çalışmalar artmıştır. Çalışmamızda şeker fabrikası atık maddesi olan melas ve şilempe ile süt fabrikasının atık maddesi olan peynir altı suyu ayrıca sentetik besiortamı olarak da malt ekstrakt broth ve YPK broth kullanılarak A vitaminin ön maddesi olan beta karotenin mikrobiyal yolla elde edilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmalarımızda *Phycomyces nitens* NRRL 2245 ve *Mucor mucedo* NRRL 3654 fungusları kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda beta karoten miktarı 3,3-30,7 mg/l arasında değiştiği görülmüştür. En yüksek beta karoten miktarı melas besi ortamında 5. günde *Phycomyces nitens* fungusunda elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Beta karoten, *Mucor mucedo*, *Phycomyces nitens*

BETA CAROTENE PRODUCTION BY MEANS OF FERMENTATION FROM *PHYCOMYCES NITENS* AND *MUCOR MUCEDO*

ABSTRACT

Nowadays, studies of beta carotene production by means of fermentation was increased depending on development in biotechnology. The aim of this study was use malt extract broth and YPK broth as substrate to produce beta carotene which is use as provitamin A in food and medicine industry.

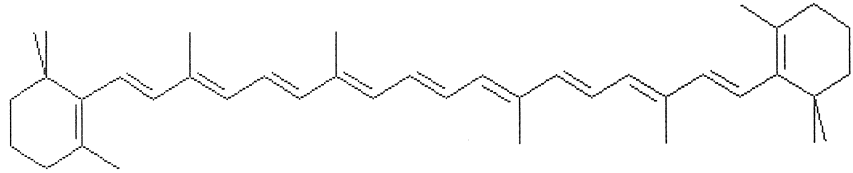
Microorganisms that were used for beta caroten production were *Phycomyces nitens* NRRL 2245 and *Mucor mucedo* NRRL 3654. In experiments the amount of obtained beta carotene is charged from 3,3- 30,7 mg/l. The highest production yield was the one produced by *Phycomyces nitens* in mollasses medium

Keywords: Beta carotene, *Mucor mucedo*, *Phycomyces nitens*

GİRİŞ

Son yıllarda çevre kirliliğini ortadan kaldıracak ve canlıların yaşamı için yararlı ürünler elde edilmesini sağlayacak araştırma alanları gelişmiştir. Bu araştırma alanı mikroorganizmalar yolu ile atık maddelerin transformasyonu ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır.

Yapısında beta karoten sentezleyen bir çok bakteri, alg, ipliksi fungus ve maya bulunmaktadır. Karotenoidlerin çoğu bitki ve hayvanların yapısında bulunsalar da sadece mikroorganizmaların ve bitkilerin sahip olduğu enzimler tarafından sentezlenmektedir. Beta karoten karotenoidler içerisinde yer alıp A vitaminin ön maddesidir. Havuç maddesi olarak da bilinmektedir. Moleküler yapısında iki ucunda iki çift sikloheksan halkası bulunmaktadır. Fotosentezin yardımcı pigment maddelerindendir. Fotokoruma aktivitesi, antioksidan, kansere karşı koruma, immün cevabı artırma ve muhtemelen tümör gelişimini inhibe özelliğide göstermektedir [1, 2, 3, 4].



Şekil 1. Beta karoten'nin moleküler yapısı

Phycomyces blakesleeanus ve *Blaesleea trispora* gibi ipliksi funguslarda beta karoten üretimi üzerine bir çok araştırma yapılmıştır. Bunun yanına *Ustilago violaceae*, *Neurospora crassa*, *Fusarium aquaedum*, *Penicillium sclerotium* gibi funguslarda ve *Rhodotorula* gibi mayaların da karotenoid oluşturduğu belirtilmiştir [5].

Phycomyces türlerinde sporangia uzun, metalik parlak renkte, dik ve oksitlenmiş çelik teli gibi görülmektedir. *Phycomyces nitens*'in sporangioforları 20 cm'den daha uzundur. Yaşlı misellerde sporangia siyah renkte görülmektedir. Toprakta, gübre yığınlarında ve yağ varillerinde gelişmektedir. Sentetik besiyerlerinde gelişebilmesi için tiamine ihtiyaç duymaktadır. Sporangioforları fototropiktir [6, 7].

Mucor mucedo *Mucoraceae* ailesi içerisinde yer almaktadır. Miselleri pamuk gibi beyaz veya sarı renkte görünmektedir. Kolonileri hızlı büyür ve zygospor oluşturur. Toprak veya ölü organik artıklarda bulunmaktadır.

Bu çalışmamızda karbon kaynağı olarak YPK broth ve malt ekstrakt broth gibi sentetik besiortamları ile şeker ve süt fabrikası atık maddeleri olan melas, şilempe ve peyniraltı suyu kullanılarak *Phycomyces nitens* ve *Mucor mucedo* funguslarından mikrobiyal yolla besin ve ilaç endüstrisinde kullanılan ve A vitaminin ön maddesi olan beta karoten üretilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar; *Phycomyces nites* (NRRL 2245) ve *Mucor mucedo* (NRRL 3654) fungusları United States of Agriculture Research İllinois 61604 ABD'den temin edilmiştir.

Fermantasyonda Kullanılan Besiortamları

Sentetik besiortamı olarak malt ekstrakt broth ve 5 g/l pepton, 2 g/l yeast ekstrakt, 20 g/l glukoz, 5g/l KH_2PO_4 ve 1 mg/l tiamin'den oluşan YPK broth ve endüstriyel atık maddeler olarak şeker fabrikası atık maddeleri olan melas, şilempe ile süt fabrikası atık maddesi olan peyniraltı suyu kullanılmıştır. Melas ve şilempe Eskişehir şeker fabrikasından temin edilmiş ve içerdiği bazı koloidal bileşikler ve ağır metalleri (Cu,Fe, Pb vb.) uzaklaştırmak için ön işlemlerden geçirilmiştir.

Bunun için; 170 gr melas 300 ml distile su içinde çözündürüldükten sonra üzerine 50 ml distile suda çözünen 0,30 gr potasyum trisiyat çözeltisi ilave edilmiştir. Tüm çözelti distile suyla 500 ml'ye tamamlanmış ve 5 gr diotome toprağı ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bir gece + 4 °C'de bekletilen melas çözeltisi bu süre sonunda 0,2 µl'lik selluloz nitrat filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen melas çözeltisinin toplam şeker içeriğı yaklaşık %51 olup fermantasyon ortamı hazırlanırken %5'e seyreltilmiştir. Fermantasyon ortamlarının pH'sı 1 N NaOH ile pH 5.5'e ayarlanmıştır. Aynı işlemler şilempe içinde gerçekleştirilmiştir [5].

Peynir altı suyuda ön işlemlerden geçirilmiştir. Bunun için 15 dk 121°C'de 1,1 atm'de otoklavlanmış ve 5 gr diotome toprağı ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bir gece +4°C'de bekletilen peynir altı suyu bu süre sonunda 0,2 µl'lik selluloz nitrat filtre kağıdından süzölmüştür. Ayrıca beta karoten verimini artırmak için fermentasyon ortamlarına %2 oranında ayçiçek yağı ve soya yağı ilave edilmiştir. Bunun yanında Fermantasyon süresi boyunca besiortamlarına bir gün karanlık dört gün ışıklandırma uygulanmıştır.

Kullanılan Çözgenler: Fermantasyon sonunda fungusların oluşturduğu misellerin ekstraksiyonu için %99,8'lik metanol (merck) ve %99'luk hekzan (merck) kullanılmıştır.

İnokulum ve Fermantasyon: Patates Dekstroz Agar (PDA) üzerinde gelişen funguslar 0,9 cm çapındaki steril kokpor yardımıyla steril koşullarda iki adet agar diskler alınarak fermantasyon ortamlarına inokule edilmiş ve 27⁰C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde 3, 5 ve 8 gün süre ile fermantasyona bırakıldı.

Fungusların Ekstraksiyonu ve Beta karoten Miktarının Ölçülmesi: Fungusların 3, 5 ve 8 günlük fermantasyonları sonunda miseller fermantasyon ortamından kurutma kağıdı yardımıyla filtre edilerek ayrılmıştır. Ayrılan miseller hekzan:metanol (1:1) çözeltisi ile 55⁰C'de 2 saat ekstrakte edilmiş ve 446 nm'de spektrofotometrik ölçümler sonucunda beta karoten miktarı hesaplanmıştır [1, 8, 9].

Kuru Ağırlığının Saptanması: Ekstrakte edilen miseller 70⁰C'de 3 gün bekletilmiş ve miselerin kuru ağırlıkları saptanmıştır [5].

BULGULAR

Fungusların Sentetik Besiortamlarındaki Beta karoten Miktarları

Sentetik besiortamı olarak YPK broth ve malt ekstrakt broth ile yapılan çalışmalarda *Phycomyces nitens* YPK broth'ta elde edilen beta karoten miktarı 3,5-12,1 mg/lt, malt ekstrakt broht'ta ise 8,8-15,6 mg/lt arasında değişmiştir. Kuru misel ağırlığı ise YPK broth'ta 0,11-0,16 gr, malt ekstrakt broth'ta ise 0,15 - 0,30 gr arasında değişmiştir. Sonuçlar Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

Mucor mucedo fungusu ile yapılan denemelerde ise YPK broth'ta elde edilen beta karoten miktarı 2,8-4,3 mg/lt, malt ekstrak broht'ta ise 8,7-14 mg/lt arasında değişmiştir. Kuru misel ağırlığı ise YPK broth'ta 0,06-0,11 gr, malt ekstrak broth'ta ise 0,16-0,39 gr arasında değişmiştir.

Fungusların Çeşitli Atık Maddelerdeki Beta karoten Miktarları

Melas; şeker fabrikalarının atık maddesi olup koyu kahverenkli kolloidal bir bileşiktir. İçerisinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbonhidrat olmayan çeşitli bileşikler, azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, sitrik asit, formik asit, asetik asit gibi organik

bileşikler bulunmaktadır. Şilempe ise melas'tan fermantasyon yoluyla alkol üreten fabrikalarda ortaya çıkan kötü kokulu koyu kahverenkli sıvımsı bir atıktır. Üretilen her bir litre alkol'den on iki litre şilempe oluşmaktadır.

Peynir altı suyu ise süt fabrikalarında peynir imalatı sırasında süttten peynir mayası yardımıyla kazein'nin çöktürülmesi sonunda geride kalan yeşilimsi sarı renkte bir sıvıdır.

Melas ve şilempe ile süt fabrikasının atık maddesi olan peynir altı suyu kullanılarak yapılan fermantasyon denemelerinde *Phycomyces nitens* tarafından elde edilen beta karoten miktarı melas ortamında 11,1- 21,7 mg/lt, şilempe'de 4,1-4,2 mg/lt, peynir altı suyunda ise 4,8-11,1 mg/lt arasında değiştiği, kuru misel ağırlıklarına bakıldığında ise melas ortamında 0,20-0,23 gr, şilempe'de 0,05-0,19 gr, peynir altı suyunda 0,10-0,24 gr arasında değiştiği görülmüştür. *Mucor mucedo* kullanılarak yapılan denemelerde ise beta karoten miktarı melas ortamında 6,1- 16,7 mg/lt, şilempe'de 3,2-4,8 mg/lt, peyniraltı suyunda 4,6-10,4 mg/lt, arasında değişmiştir. Kuru misel ağırlıklarına bakıldığında ise melas ortamında 0,13-0,24 gr, şilempe'de 0,05-0,21 gr, peyniraltı suyunda 0,23-0,31gr arasında değiştiği görülmüştür.

Tablo.1. *Phycomyces nitens* ve *Mucor mucedo* funguslarında 3, 5 ve 8 günlük beta karoten miktarları

Besiyortamları	<i>Phycomyces nitens</i> Beta karoten miktarı (mg/lt)			<i>Mucor mucedo</i> Beta karoten miktarı (mg/lt)		
	3 gün	5 gün	8 gün	3 gün	5 gün	8 gün
YPK Broth	4,8	12,1	3,5	3,3	4,3	2,8
Malt Ekstakt	8,8	15,6	12	8,7	14	10,5
Melas	11,1	21,7	12,2	6,1	16,7	13,4
Şilempe	4,2	4,1	4,1	3,2	4,8	3,5
Peynir altı suyu	4,8	11,1	5,6	4,6	10,4	4,4

Tablo.2. *Phycomyces nitens* ve *Mucor mucedo* funguslarında 3, 5 ve 8 günlük kuru misel ağırlığı

Besiyortamları	<i>Phycomyces nitens</i> Kuru misel ağırlığı (gr)			<i>Mucor mucedo</i> Kuru misel ağırlığı (gr)		
	3 gün	5 gün	8 gün	3 gün	5 gün	8 gün
YPK Broth	0,15	0,16	0,11	0,06	0,11	0,09
Malt Ekstakt	0,17	0,30	0,15	0,16	0,39	0,32
Melas	0,20	0,23	0,20	0,13	0,24	0,20
Şilempe	0,05	0,19	0,16	0,05	0,21	0,18
Peynir altı suyu	0,10	0,24	0,15	0,23	0,31	0,20

Tablo.3. *Phycomyces nitens* ve *Mucor mucedo* funguslarında 5 günlük fermantasyonda ayçiçek, soya yağı ve ışıklandırmanın beta karoten miktarına etkisi

Besi ortamları	<i>Phycomyces nitens</i> Beta karoten miktarı (mg/lt)			<i>Mucor mucedo</i> Beta karoten miktarı (mg/lt)		
	Ayçiçek yağı	Soya yağı	Işık	Ayçiçek yağı	Soya yağı	Işık
Melas	17,3	16	30,7	8,3	13,8	1,6
Şilempe	5,5	8,1	18,3	7,5	4,0	2,5
Peyniraltı suyu	8,2	6,6	19,5	4,8	4,4	7,0

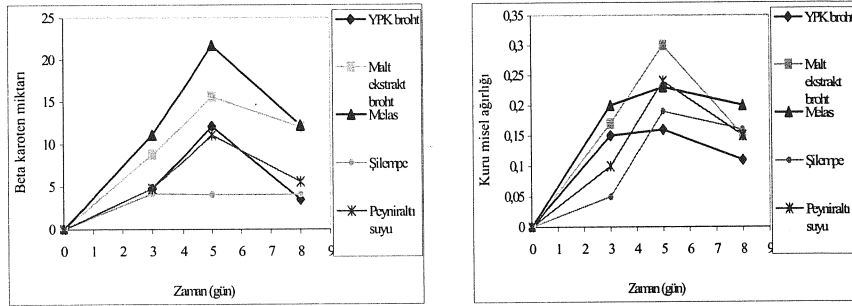
Karbon kaynağı olarak kullanılan atık maddelerde beta karoten miktarını artırmak için fermantasyon ortamlarına %2 oranında ayçiçek yağı, soya yağı ile ışıklandırma uygulandığında en yüksek beta karoten miktarı 30,7 mg/lt ile *P.nitens*'te melas ortamında olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmamızda hem endüstriyel atık maddelerin çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi hem de besin ve ilaç endüstrisinde provitamin A olarak kullanılan beta karoten'nin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için şeker fabrikasının atık maddesi olan melas, şilempe ve süt fabrikasının atık maddesi olan peynir altı suyu karbon kaynakları olarak kullanılmıştır. Sentetik besiyortamı olarak malt ekstrakt broth ve YPK broth'tan fermantasyon yoluyla beta karoten üretilmeye çalışılmıştır.

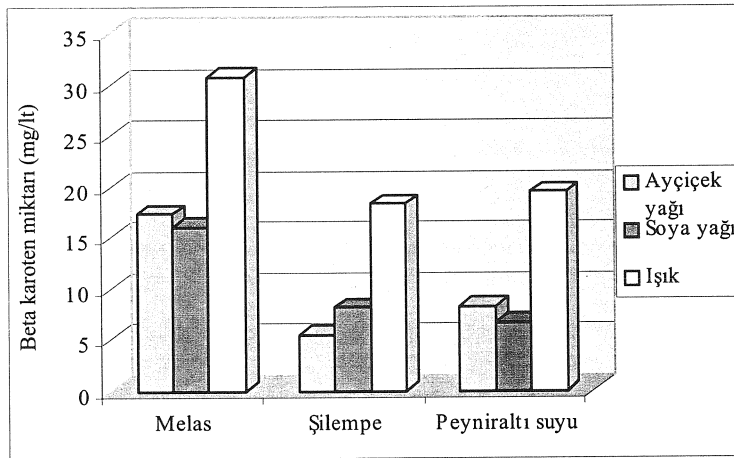
Yaptığımız çalışmalarda en yüksek beta karoten miktarı beşinci günde *P.nitens*'te melas ortamında elde edilmiştir. *Mucor mucedo* gerek malt ekstrakt broth'ta gerekse YPK broth'ta beta karoten miktarı *P.nitens*'e göre daha az olduğu görülmüştür. Sekizinci günde beta karoten miktarında bir azalmanın olduğu görülmüştür. Bunun sebebi beta karoten'nin oksidasyona uğraması olabilir. Pek çok araştırmacı ortama antioksidan maddelerin ilavesinin beta karoten miktarını artırdığını bildirmişlerdir [5].

Sentetik besiortamı olarak kullanılan YPK broth ve malt ekstrakt broth ile yapılan denemelerde beta karoten miktarı 2,8- 15,6 mg/lt arasında değişmiştir. Melas şilempe ve peynir altı suyu kullanılarak yapılan denemelerde beta karoten miktarı 3,2 – 21,7 mg/lt arasında değişmiştir. Melas şilempe ve peynir altı suyu gibi besiortamları içinde en iyi fermentasyon ortamının melas olduğu saptanmıştır. Melas kullanılarak yapılan çalışmalarda *P.nitens*'te en fazla ürün elde edilmiştir. En düşük beta karoten miktarı *Mucor mucedo* fungusunda YPK broth'ta elde edilmiştir.



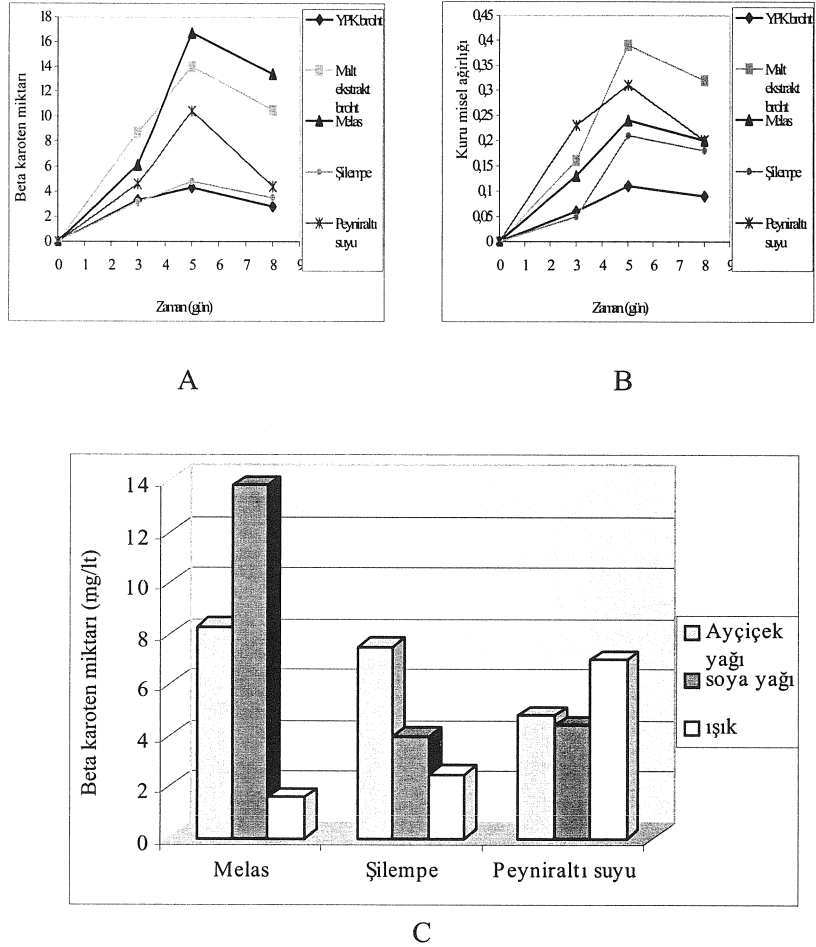
A

B



C

Şekil 2. *Phycomyces nitens* (NRRL 2245) fungusunda A: beta karoten miktarı, B: kuru misel ağırlığı, C: ayçiçek yağı, soya yağı ve ışığın beta karoten miktarına etkisi.



Şekil 3. *Mucor mucedo* (NRRL 3654) fungusunda A: beta karoten miktarı, B: kuru misel ağırlığı, C: ayçiçek yağı, soya yağı ve ışığın beta karoten miktarına etkisi.

Ekmekçi S., tarafından *Blakesleea trispora* fungusunda mikrobiyal yolla beta karoten üretimi üzerine yaptığı bir çalışmada; malt ekstrakt broth'ta 3,6-8 $\mu\text{gr/l}$ t, peynir altı suyunda ise 136,4-165,5 $\mu\text{gr/l}$ t arasında değiştiğini bildirmiştir [5].

Çalışmamızda melas şilempe ve peynir altı suyunda bet karoten verimini artırmak için besiyortamına ayçiçek yağı, soya yağı ilavesinde beta karoten miktarı 4,0 –17,3 mg/l arasında değişmiştir. En yüksek beta karoten verimi *P.nitens* fungusunda olduğu görülmüştür. Yapılan benzer çalışmalarda

soya yağının fermentasyon ortamına ilavesinin beta karoten verimini artırdığını bildirmişlerdir [5, 11].

Işıklandırma uygulanılarak yapılan denemelerde ise beta karoten miktarı *P.nitens*'te melas ortamında 30,7 mg/lit en yüksek olmuştur.

Margaliht P., ve ark; *Aspergillus* sp. metabolitlerinin beta karoten verimini artırdığını bildirmişlerdir. Seon-Won K. ve ark tarafından yapılan çalışmalarda iyonik olmayan span 20 gibi sürfaktanların beta karoten verimini 10 kat artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çeşitli araştırmaların ışığın beta karoten miktarını artırdığını bildirilmiştir [8, 9, 10, 12]. Sonuç olarak melas, şilempe ve peynir altı suyu gibi endüstriyel atık maddelerin *P.nitens* ve *M.mucedo* gibi funguslar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılarak beta karoten üretilebileceği görülmüştür. Fakat endüstriyel çapta beta karoten üretimini yapmak için ilave çalışmalara gereksinim vardır. beta karoten verimini etkileyen faktörler araştırılarak en uygun fermentasyon koşulları ve mikroorganizmalara saptanmalıdır. Bunun yanında diğer endüstriyel atık maddelerde denenmeli ve en ekonomik kaynaklar tesbit edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Shlomain P., Ben Amotz., Margalith P., The Effect of Veratrole on Carotenoid Biosynthesis by *phycomyces blakesleeanus*, Journal Applied Bacteriology, 70:166-168, (1991).
2. Bingöl G., Biyokimya. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara (1989).
3. Misawa N., Yamano S., Ikenaga H., Production of beta carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of Biosynthesis Genes from *Erwinia uredovora*. Applied Enviromental Microbiology, 57 (6): 1847-1849, (1991).
4. Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Fraser, P, and Misawa, N., Production of the Carotenoids Lycopene, β -carotene, and Astaxanhin in the Food Yeast *Candida utilis*. Applied and Environmental Microbiology 64, 1226-1229, (1998).
5. Ekmekçi S., Mikrobiyal Yöntemler ile Beta karoten Üretimi ve Verimliliğin Artırılması, İzmir, (1987).
6. Bejerano R.E., Avalos, J., Lipson D.E., and Celda-Olmedo, E., Photoinduced Accumulation of Carotene in Phycomyces. Planta, 183: 1-9. (1990).
7. Cerda-Olmedo, E. and Avalos, J., Oleaginous Fungi: Carotene-Rich Oil From Phycomyces, Prog. Lipid 33: 185-192 1994.
8. Margarith, P.Z., Pigment Microbiology, Chapman Hall, London, (1992).

9. Margalith, P., Shlomai, P., Ben-Amotz, A., The Effect of Veratrole on Carotenoid Biosynthesis by *Phycomyces blakesleeanus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 166-168, (1991).
10. Margalith, P., Enhancement of Carotenoid Synthesis by Fungal Metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38:664-666. 1993.
11. Pekin B., *Biyokimya Mühendisliği*, Ege Üniversitesi, İzmir, (1983).
12. Seon-Won, K., Weon-T.S., and Young-Hoon P., Enhanced Synthesis of Trisporic acid and β -Carotene Production in *Blakesleeanus trispora* by addition of a Non-Ionic Surfactant, Span 20. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, 330-332, (1997).