

Melas'dan Sürekli Yöntemle Mikrobiyel Yağ Üretimi

Nevin KESKİN — Ali MATUR

H.Ü. Fen Fakültesi, Genel Biyoloji Bölümü — ANKARA

ÖZET

Değişik üretim şekilleri, mayaların üremesini ve lipid sentezini etkilemektedir. Kesikli üretim gibi kapalı sistemlerde ortamın içeriği değiştiği için hücreler dengeli üreyemez. Oysa, sürekli üretimde hücreler dengeli bir şekilde üreyebildiği için ürün de daha yüksek miktarda ve dengeli olur. Bu yüzden ileride yapılacak çalışmalarda sürekli üretim şekli tercih edilecektir.

Bu çalışmada, sürekli üretim denenmiş ve yağ üretimi için elverişli olduğu saptanmıştır. Sürekli üretimden elde edilen lipidler, ince tabaka plak kromatografisi ve silisik asit kolon kromatografisi ile analiz edilmiştir.

Total lipid verimi C : N oranına bağımlı olduğu için, ortamdaki şeker ve azot kullanımı da incelenmiştir.

GİRİŞ

Hücrelerin üremeleri esnasında, fazlardaki hücresel olaylar ve yağ biriktirme sınırlıdır. Değişik üreme koşulları, mayaların üremesini ve lipid sentezini etkilemektedir. Kesikli üretim gibi kapalı sistemlerde hücrelerin her başarılı jenerasyonu ile, ortamın içeriği değişir. Bu da hücrelerin dengeli üremesini önler. Kesikli üretimle üretilen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida lipolytica*'da lipid artışı geç logaritmik aşamada maksimumu bulunmuştur (1, 13, 18).

Duraklama ve ölüm aşamalarında, total lipide hızlı bir artış gözlenmiştir. Oysa sürekli üretilen hücrelerde kararlı durum sağlanabilir (steady state). *Candida 107*'nin azotu sınırlandırılmış, düşük dilüsyon hızı sürekli kültürlerinde yüksek derişimde yağ birikimi bulunmuştur (4, 6, 15).

YÖNTEM VE GEREÇLER

Kullanılan mikroorganizma : *Candida albicans 628* (Danimarka, Kopenhan'dan gönderildi). Mikroorganizma, sobouraud dexrose agarlı

yatık kültür üzerinde üretilip, ayda bir kez olmak üzere yenilenerek korunmuştur.

Melaslı üreme ortamı : Melas, pancar şekeri kuruluşundan sağlanmıştır ve % 45 C.H. içermektedir. Total C.H. % 1 olacak şekilde hazırlanıp ortamlara eklenmiştir. Buna göre 1 lt lik Murray ve Walker (12) ortamına 22.2 gr Melas eklenmiştir.

Murray ve Walker (1956)'nın üreme ortamı değiştirilerek kullanılmıştır. Buna göre :

(NH)₂ SO₄ — 1.5 gr., KH₂ NO₄ — 0.36 gr., CaCl₂ . 6 H₂O — 0.1 gr., MgSO₄ . 7H₂O — 0.5 gr., FeSO₄ . 7H₂O — 0.05 gr., ZnSO₄ . 7H₂O — 0.02 gr., NaCl — 0.1 gr., İspirto mayası 0.25 gr. (Biotin yerine), Melas 22.2 gr. (Gluköz yerine). pH : 5.5 olacak şekilde NaOH ile ayarlanmıştır. Ortam 120°C lik otoklavda 15 dak. sterilize edilmiştir.

Sürekli üretimin uygulanması : Toplam hacmi 3 lt olan fermentörde (BİOTEK, NR 381) 2,5 lt hacminde hazırlanan melaslı üreme ortamı ile başlangıç pH'sı 5,5 tutularak, 30°C ve 200 rpm'de önce kesikli çalışılıp (Batch), ortalama 20. saatte akış hızı 0,43 ml/dak ile sürekli üretime geçildi. Yeni bir üreme ortamıyla geç. log. faz aşamasına erişinceye kadar, aynı koşullarda (30°C, 200 rpm'de) üreme sağlandı. Saptanan akış hızı ile taze ortam eklenen üreme ortamından, yine aynı oranda maya içeren kültür ortamında alınması ile kültür sürekli log aşamasında tutularak üreme (optik dansite ölçümü olarak), total şeker, azot, total lipid, nötral lipid, glikolipid ve fosfolipid tayinleri yapıldı.

Şeker tayini : Fenol - Sülfirik asit yöntemi-ne göre tayin edildi (8).

Azot tayini : Nesslerizasyon yöntemine göre tayin edildi (14).

Total lipid : Wilson - Hanner yöntemi kullanıldı (21).

Lipid özütünün elde edilmesi : Lipid özütünü elde etmek için Dovson ve Craing (1966) (2)'in önerdiği yöntemden yararlanıldı.

İnce tabaka - plak kromatografisi : Lipid ayırımı için adsorbant olarak silica - gel kullanıldı. Plak kalınlığı 0,25 mm olarak hazırlandı. Çözücü sistem, Kloroform - Metanol - Su (65 : 25 : 4) (v/v) kullanıldı (11, 20).

Çeşitli lipidler, özel boya ayıraçları ile nitel (kalitatif) olarak tayin edildi.

Difenilamin ayıracı : Glikolipid'leri ayırmada kullanıldı. Ayıraç, Jatzkewitz ve Mahl; 1969 (7)'in önerdiği şekilde hazırlandı.

Ninhidrin ayıracı : Serbest amino grubu içeren lipidleri belirlemek için kullanıldı (17).

Dragendroff ayıracı : Kolin içeren fosfolipidleri belirlemek için kullanıldı (20).

Molybdenum - Blue ayıracı : Fosfolipidleri belirlemek için kullanıldı (3).

Sililik asit kolon kromatografisinin uygulanması : Lipid özütünü fraksiyonlara ayırmak için yapıldı. 1 x 20 cm. lik kolon kullanıldı. 10 gr. sililik asit 20 ml. kloroform içinde çözüldü (19). Kolon dolduruldu. Sistemde sabit fazın yükseldiği 12 cm. de kaldı.

Nötral lipid, Glikolipid ve Fosfolipidlerin tayin edilmesi : Sürekli üretimde elde edilmiş 1 gr. kuru hücreden elde edilen lipid özütü, sililik asitli kolon ile yağ fraksiyonlarına ayrıldı (9).

BULGULAR

250 ml. lik erlenmayerlerde, 100 ml. lik melaslı üreme ortamlarına *C. albicans* 628 ekilip yapılan kesikli üretimde, total lipid düzeyinin maksimum olduğu 48 saatteki genel görünüm TABLO 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Kesikli Üretimde *C. albicans* 628'in Genel Görünümü.

Üreme (0.0490 nm)	Şeker	Azot	Total lipid $\mu\text{g}/5 \text{ ml.}$
	Kullanımı %	Kullanımı %	
0.340*	92.5	83	300

* Bu değer 10 kez sulandırılmış örneklerden alınan sonuçtur.

Fermentörde melas içeren üreme ortamına *C. albicans* 628 ekildi. Daha önce yapılan deneylerde, geç logaritmik faza 20. saatte geldiği bulunduğundan, bu saatte sürekli üretime geçildi. 0.43 ml/dak. ve 0.22 ml/dak. olmak üzere iki dilüsyon hızı denendi. Üç gün devam eden sürekli üretimin ardından tekrar kesikli üretime dönüldü (Şekil 1).

Sürekli üretimden elde edilen hücre lipid özütlerinin ince tabaka plak kromatogramları (Şekil 2, 3, 4 ve 5)'da gösterilmiştir.

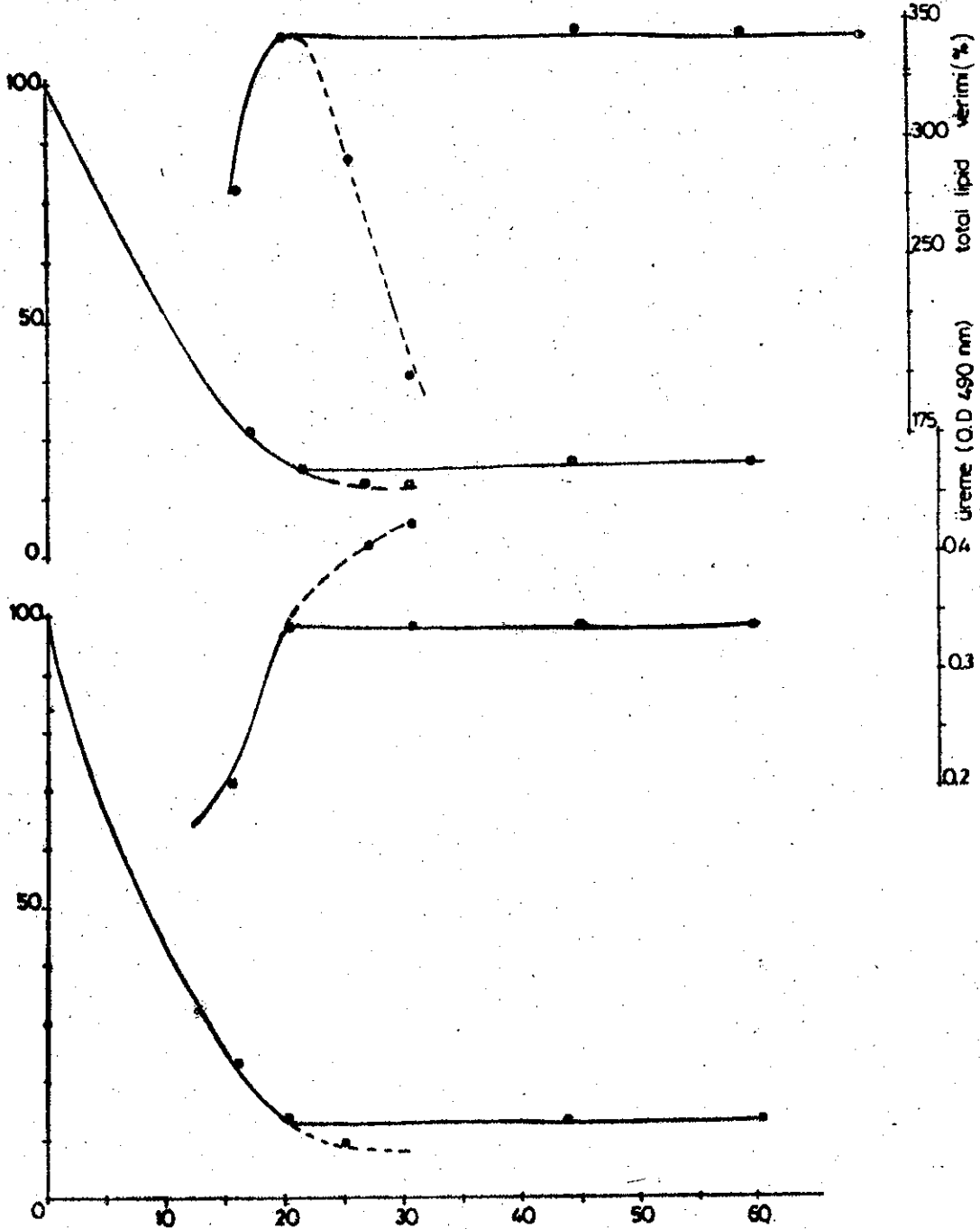
Melaslı üreme ortamıyla gerçekleştirilen sürekli üretimden elde edilen hücrelerden, sililik asit kolon kromatografisi kullanılarak elde edilen nötral lipid'ler, glikolipid'ler ve fosfolipidler miktarları ise Tablo II'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Melaslı üreme ortamı içeren fermentörle yapılan üretimde (Şekil 1), total lipid veriminin kesikli üretimle elde edilenden daha çok olduğu bulunmuştur (1/6 oranında). (Tablo I'e bakılacak olursa, kesikli üreme ortamından total lipid 300 $\mu\text{g}/5 \text{ ml}$ bulunmuştur. Şekil 1'de sürekli üretimden elde edilen total lipid 345 $\mu\text{g}/5 \text{ ml}$ olarak saptanmıştır). Bunun nedeni kesikli üretimde hücrelerin başarılı her generasyonunun, ortamın içeriğini değiştirmesi ve bu yüzden hücrelerin dengeli üremesini önlemesidir (16). Kesikli üretimde *Candida* türleri

Tablo II. Sürekli Üretimden Elde Edilen 1 gr. Kuru Hücrede Bulunan Lipid Miktarları (w/w)

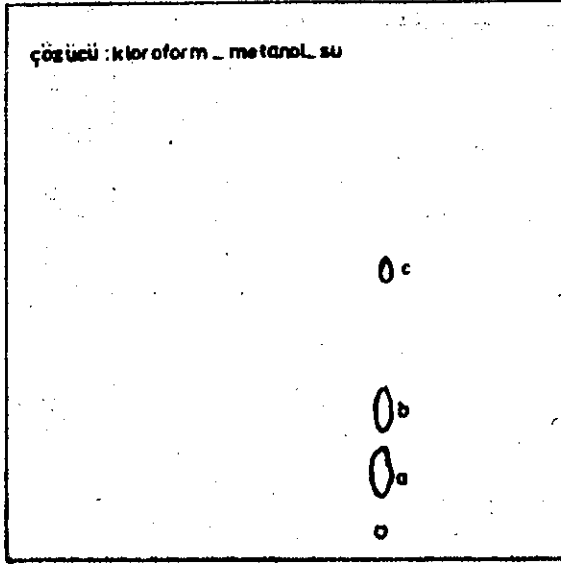
Mikroorganizma	Nötral Lipid		Glikolipid		Fosfolipid	
	Miktar	% oranı	Miktar	% oranı	Miktar	% oranı
<i>C. albicans</i> 628	0.43404	58.4	0.17754	24	0.13039	17.6



Şekil 1.

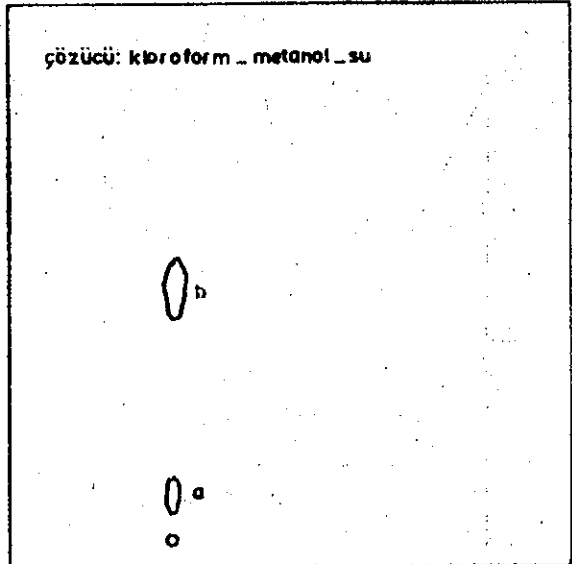
geç logaritmik aşamada en yüksek total lipid miktarını vermektedir (13, 18). Durgunluk ve ölüm aşamalarında total lipid de ani düşüşler de gözlenmiştir ki, bunlar bulgularımızı desteklemektedir. Sürekli üretimle üretilen hücrelerde kararlı bir durum sağlandığı için, hücreler dengeli ürer ve daha çok lipid verme olasılığı ortaya çıkar (4, 5, 6, 10, 15). Sürekli üretimin

ardından, akışlar durdurulup kesikli üretime geçildiğinde, total lipid de ani bir düşme gözlenmiştir ki, bu zaten beklenen sonuçtur. Thorpe ve Ratledge 1972 (3), yaptıkları deneylerde aynı şekilde, logaritmik aşamadan durgunluk ve ölüm aşamalarına geçildiğinde total lipide ani bir düşüş gözlemişlerdir. Sürekli üretimden elde edilen lipid özütlerinin ince



Rf: a:0.13
b:0.26
c:0.56

ŞEKİL: 2

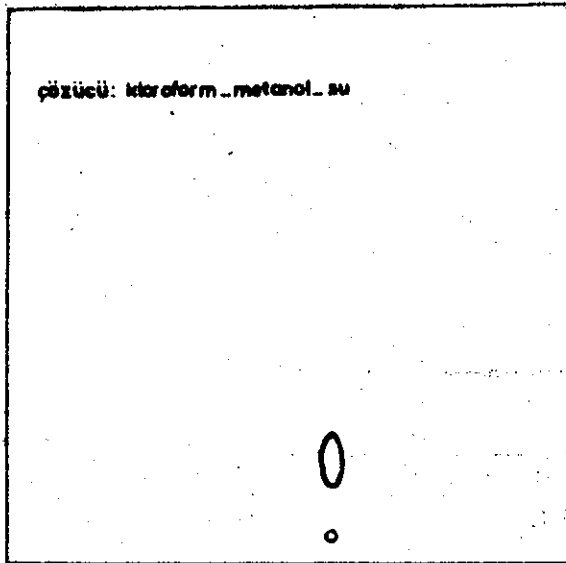


Rf: a:0.14
b:0.59

ŞEKİL: 3

Melastı üreme ortamı kullanılarak fermantörde üretilen *C.albicans* 628 den elde edilen FOSFOLİPİDLER.

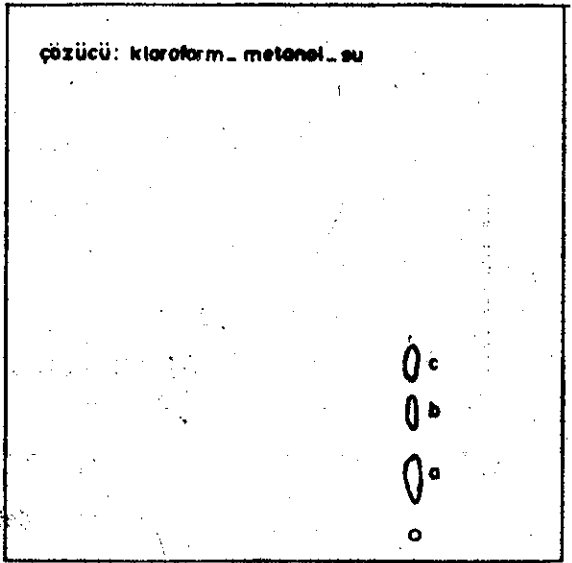
Melastı üreme ortamı kullanılarak fermantörde üretilen *C.albicans* 628 den elde edilen GLİKOLİPİDLER.



Rf: 0.155

ŞEKİL: 4

Melastı üreme ortamı kullanılarak fermantörde üretilen *C.albicans* 628 den elde edilen KOLİN İÇEREN LİPİDLER



Rf: a:0.15
b:0.28
c:0.38

ŞEKİL: 5

Melastı üreme ortamı kullanılarak fermantörde üretilen *C.albicans* 628 den elde edilen SERBEST AMİNO GRUBU İÇEREN LİPİDLER

tabaka plak kromatografisine uygulanması ve çeşitli boya ayıraçlarının kullanılması ile nitel olarak değişik lipid'ler analiz edilmiştir (Şekil 2, 3, 4, 5). Boya ayıraçları kullanılarak lipidleri nitel olarak tayin etmeyi birçok araştırmacı denemiştir (2, 11, 20). İnce tabaka plak kromatografisi ile yapılan bu tayinlerde herne kadar lipidler nicel (kantitatif) olarak bulunamıyorsa da, bir fikir yarattığı için önemlidir.

Sürekli üretimden elde edilen lipidler fraksiyonlara ayrıldığında, nötral lipidler en yüksek oranda bulunmuştur (Tablo II). Sonra sırasıyla glikolipidler ve fosfolipidler elde edilmiştir. Gill ve Ark. 1977 (5)'de yaptıkları araştırmalarda en yüksek oranda nötral lipidleri sonra sırasıyla glikolipid ve fosfolipidleri bulmuşlardır.

S U M M A R Y

Microbial Fat Production From Melas In Continuous Culture

The growth of yeast cells and the lipid synthesis by them are effected by various growth conditions. In closed systems such as batch cultures, the composition of medium is modified and must ultimately result in unbalanced growth. But in continuous culture, because of the cells which show a balanced growth help the yield to be balanced as well and even more sufficient. Thus, continuous culture would be profitable in further studies in this area.

In this study, continuous culture was tested and it was shown that this is a lot more suitable for fat production. The lipids obtained from continuous culture were analysed by thin layer chromatography and silisic acid column chromatography.

The production of total lipid is dependent on the proportion of C : N ratio. Therefore the glucose and the nitrogen used in media were also analysed.

K A Y N A K L A R

1. Castelli, A., Barbaresi, G., and Bertoli, E.T. (1969). Studies on the lipids of *S. cerevisiae* During The Growth Phase Ital. J. Biochem. 18: 91-99.
2. Dawson, P.S., and Craig, B.M. (1966). Lipids of *C. utilis* Changes with Growth. Can. J. Microbial 12: 775-785.
3. Dittmer, J.C., and Lester, D.I. (1964). Simple Specific Spray Reagent for Detection of Phospholipid on Thin-layer Chromatograms J. Lipid Res. 5: 126, 127.
4. Gill, C.O. (1973). The Physiology of a Yeast *Candida* Sp. Strain 107. Metabolizing n-alkanes Ph. D. Thesis University of Hall.
5. Gill, C.O., Hall, M.J., and Ratledge, C. (1977). Lipid Accumulation in an Oleaginous Yeast (*Candida* 107). Growing on Glucose in Single Stage Continuous Culture.
6. Hall, M.J., and Ratledge, C. (1977). Lipid Accumulation in on oleaginous. Yeast (*Candida* 107). Growing on Glucose Under Various Conditions in a One- and Two Stage Cotinuous culture Appl. Environ. Microbial 33: 577-584.
7. Jatzkevitz, H., and Mehl, E. (1969). Thin-layer Chromatography of Lipids. P. 541-546 in J.M. Lowenstein (ed) Methods in Enzymology Vol. 14 Acedemic Press. In New York.
8. Keleti, G., Lederer, W.H (1974). Handbook of Micromethods For Biological Sciences Van Nostrant Reinhold Campany.
9. Keskin, N. (1981). Endüstriyel Atıklar Üzerinde Mikropsal Yağ Üretimi, Doktora Tez Çalışması. Hacettepe Üniversitesi.
10. Krumphanzl, W., Gregr, V., Pelechova, J., and Uher, J. (1973). Biomass and Fat Production in *Rhodotorula gracilis* p. 245-256 in Advances in «Microbial Engineering» (part I) John Wiley and Sons New York.
11. Marinetti, G.V. (1962). Chromatographic Separation Identifications and Analysis of Phosphatides J. Lipid Res. 3: 1-20.
12. Murray, S., and Walker, T.K. (1956). Mycological Formation of Fat IV. Media Conducive to Formation of Fat Sucrose *Penicillium soppi*. Zaleski in Surface Cultone. J. Scin. Food. Agr. 7: 237.
13. Nyns, E.J., Chiong, N., and Wioux, A.Z. (1968). Comperative lipid Content of *Candida lipolytica* Grown on Glucose and on n-hexadecane. Antonie-Von leewenhock J. Microbial Serel. 34: 197-204.
14. Rand, M.C., Greenberg, A.E., Taras, M.J.

- (1976). Standart Methods for the Examination of water and Wastewater, 14. ed.
15. Ratledge, C. (1970). Microbial Conversions of n-alkanes to Fatty Acids: A new Attempt to obtain Economical Microbial Fats and Fatty Acids. Chem. Ind p. 843-845.
16. Rattray, J.B.M., Schibed, A., Kidby, O.K. (1978). Lipids of Yeasts. Bacterial Rev. 39: 197-231.
17. Skipski, V.P., Peterson, R.F., and Barclay, M. (1962). Separation of Phosphatidyl Ethanolamine, Phosphatidyl serine, and other Phospholipids by Thin-Layer chromatography. J. lipid Res. 3: 467-470.
18. Thorpe, R.F., and Ratledge, C. (1973). Fatty Acids of Triglycerides and Phospholipids From a Thermotolerant Strain of *Candida tropicalis* Grown on n-alkanes at 30 and 40°C. J. Gen. Microbial 78: 203-206.
19. Vorbeek, M.L., and Marinetti, B.V., (1965). Separation of Glycosyl Diglycerides From Phosphatides Using Silicic Acid Column Chromatography. J. Lipid Res. 6: 3-6.
20. Wagner, H., Hornhammer, L., and Wolff, P. (1961). Dünnschichtchromatographic Von Phosphatides and Glikolipides. Biochemische Z 334: 175-184.
21. Wilson Hanner (1955). Medical and Public Health Laboratory. Methods, p. 271.



Günümüzde süt... Pınar Süt



"Saf ve uzun ömürlü-taze"
süt çağını, Pınar açtı ülkemizde...

Üreticimizin emeğinin
değerlenmesinde,
tüeticimizin
sağlıklı beslenmesinde öncülük etti.

Ülkemizde kalite ve güven,
Pınar'dır bugün.

PINAR
"sağlığınız için"