

# YAĞ ÜRETİMİ VE MİKROORGANİZMALAR

## OIL PRODUCTION AND MICROORGANISMS

Yüksel DENLİ, Aziz TEKİN

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

**ÖZET:** Mikroorganizmalar diğer bitki ve hayvanlardan farklı olarak, oldukça çeşitli yağ üretebilmektedirler. Bunlar trigliseritler gibi basit lipitlerden, poliisopropenoid eter gibi doğada pek rastlanılmayan kompleks lipitlere kadar uzanmaktadır.

Genellikle besiyeri ortamı mikroorganizmaların gelişimi için gerekli bütün besin elementlerini içerecek şekilde hazırlanır, yağ üretimi düşmektedir. Hücre sayısını artıran besin elementleri (özellikle N) belirli düzeyde olmalı ve ortam glukoz gibi fermente olabilir karbon kaynakları zenginleştirilmelidir. İnorganik tuzlar, vitaminler, oksijen miktarı ortam sıcaklığı ve pH gibi faktörler gerek üretilen yağ miktarını, gerekse bileşimini etkilemektedir.

**ABSTRACT:** Microorganisms can produce a wider range of lipid types than either plants or animals. These lipids range from simple lipids such as triglycerides, to complex and unusual lipids such as polyisopropenoid ether.

Generally, a well-balanced medium reduces the production of oil. There should be no more than enough of growing nutrients (such as nitrogen) to increase the production of cell population, and medium should be rich in some fermentable carbon source. The factors such as inorganic salts, vitamins, oxygen supply, temperature and pH are greatly effective on either content or composition of oil.

### GİRİŞ

Maya, küf bakterisi ve alg gibi mikroorganizmaların uygun koşullarda yağ üretebilecekleri bilinmektedir ve bu yolla ticari yağ üretim olanakları üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır (RATLEDGE, 1976 ve 1978; WASEF, 1977). Yağların fermentasyon yoluyla ticari olarak üretilmesi özellikle 1. ve 2. dünya savaşları sırasında Almanya'da gündeme gelmiştir (RATLEDGE, 1978). Bu konudaki ilk ciddi çalışma, 1914-1918 yılları arasında, Almanya'da Linder adında bir araştırmacı tarafından *Endomyces vernalis* kullanılarak gerçekleştirilmiş ve bu çalışma HESSE (1949) ve WOODBINE (1959) tarafından tekrar edilmiştir. Fakat bu sıralarda işlemin ekonomik fayda sağlayacağı hiç düşünülmemiştir.

Mikrobiyel yağ üretimi ile ilgili patentlerin çoğu 1920-1945 yılları arasında rastlanmaktadır. Özellikle ABD, İsveç, Yugoslavya ve Almanya orijinli bu çalışmalar sayesinde, mikroorganizmaların yağ üretebilmesiyle ilgili temel bilgilere ulaşılabilmektedir. Bu yıllar arasında, biyokitlelerin %70'lere varan yağ birikimi gerçekleştirebildiği çok sayıda maya ve küf teşhis edilebilmiştir. Bu organizmalar arasında *Geotrichum candidum*, *Torula (Candida) utilis*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.* ve *Rhodotorula spp.* sayılabilir. Bu süreçte yapılan yoğun çalışmalara rağmen, özellikle büyük ölçekli fermentasyon düzeneklerinin olmayışı, ticari gelişmeyi sınırlamıştır. Büyük ölçekli mikrobiyel işlem olarak, sadece *Aspergillus niger*'den sitrik asit üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca büyük fermentörlerin kullanıldığı anaerobik işlemler (aseton/bütanol üretimi gibi) ile bira, şarap ve laktik asit üretimleri yapılabilmekteydi. Ancak 1970'lere kadar ilgisiz kalan mikrobiyel yağ üretimi, endüstriyel kirliliğin giderek artması enerji maliyetlerinin yükselmesi ve endüstri atıklarının fermentasyon yoluyla özellikle gıda endüstrisinde kullanılabilmesinin anlaşılmasından sonra tekrar gündeme gelmiştir. Bu yıllarda etanol ve hayvan yemi olarak biyokitle üretimi daha popüler olmasına rağmen, yağ üretimi de potansiyel bir avantaj durumuna gelmiştir.

### MİKROBİYEL YAĞ ÜRETİMİNDE FİZYOLOJİK DURUM

Mikrobiyel yağ üretiminde yüksek ve arzulanan özelliklerde ürün elde edebilmek için, üretim koşullarının ve mikroorganizmaların fizyolojik durumlarının dikkatli bir şekilde incelenmesi ve belirlenmesi oldukça önemlidir. Bir mikroorganizmanın yüksek düzeyde yağ üretmesi özellikle boyut ve hücre yapısıyla ilişkilidir. Ökaryot olarak

adlandırılan maya ve küfler, prokaryot olarak adlandırılan bakterilere göre daha büyük hücre yapılarına sahiptirler. Çubuk şeklindeki Bacillus'lar 3-5 µm x 1 µm ve kok şeklindeki bakteriler 1-2 µm boyutlarında iken, oval yapıdaki mayalar 10-20 µm çapındadır. Küfler ise 200 µm uzunluğunda ve 5-10 µm genişliğinde hiflere sahiptirler.

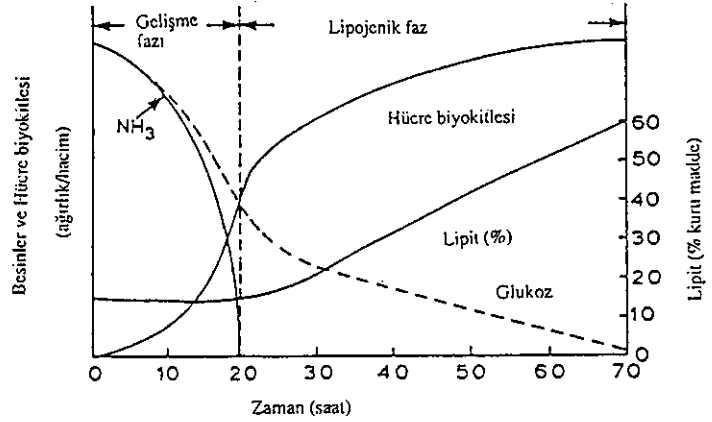
Bütün ökaryot mikroorganizmalar yağ üretme yeteneğine sahip değildir. 590 maya çeşitinden, sadece 25 kadarının %20'den fazla yağ üretebilme yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir. 60.000 tür küf mantarının ise çok az bir bölümü (40-50 kadarı) biyokitlelerinde %25'in üzerinde yağ biriktirebilmektedirler. Bu yeteneklerinden dolayı bu mikroorganizmalara yağlı (oleaginous) mikroorganizmalar denilmektedir (RATLEDGE 1989).

Mikroorganizmaların yağ üretme kabiliyetlerini sınırlayan bazı etkenler bulunmaktadır. Yağ organizmalarda lipit üretiminin başlaması, gelişme ortamındaki primer besin elementlerinin tükenmesine bağlıdır. Bu durum özellikle ortamda  $NH_4^+$  durumunda bulunan azotun bitmesiyle ilişkilidir (Şekil 1). (RATLEDGE, 1994). Ortamda yağ birikimini teşvik etmek için, azot miktarının azaltılmasının yanında, kullanılabilir karbon miktarının artırılması gerekmektedir. Protein ve nükleik asit sentezi için esansiyel olan azotun ortamda tükenmesi, hücre gelişimini sınırlayacak, buna karşılık ortamda bulunan karbon (özellikle glukozdan kaynaklanan) hücreler tarafından asimile edilmeye devam edecektir (Şekil 1). Hücreler alınan bu karbonu önce yağ asitlerine, daha sonra da trigliseritlere sentezleyebilmektedir.

Azotun dışında bazı inorganik tuzlar (fosfat, magnezyum, demir veya sülfat) vitaminler ve inozitolün de yağ üretimini sınırlayıcı etki yaptığı belirtilmiştir (WOODBINE, 1959; GILL ve ark. 1977); Karbon kaynağı olarak genellikle glukoz kullanılmasına rağmen, pentoz ve laktozun da bu amaç için kullanıldığı bilinmektedir.

Şekil 1. incelendiğinde, mikrobiyel lipit üretiminin 2 aşamalı bir işlem olduğu görülmektedir. 1. aşamada hücrelerin gelişimi için gerekli bütün besin elementleri bulunduğu için, dengeli bir gelişme söz konusudur. Ortamda seçilen besin elementi tükendiği zaman bu aşama sona erer ve yağ üretim aşaması veya "lipogenik faz" başlar. Bu safha, ya ortamda bulunan karbon kaynağı tükeninceye veya yağ üretimi için gerekli diğer besin elementleri hücreler tarafından tamamen kullanılincaya kadar devam eder. Eğer bu besin elementleri ortama tekrar ilave edilirse, lipogenik faz tekrar başlar ve kitleden oldukça yüksek yağ verimi elde edilebilir. RATLEDGE (1989), bazı durumlarda maya ve küf biyokitlelerinden bu yolla %70'in üzerinde yağ elde edilebileceğini belirtmiştir. Buna karşılık bütün yağ üreten mikroorganizmalar aerobik oldukları için, kültürler için gerekli olan oksijen bir süre sonra gelişmeyi sınırlayıcı faktör haline gelebilmektedir. Hücre gelişimi, biyokitle 60g/l düzeyinin üzerine çıktığında, oldukça savaşılar, 100g/l'nin üzerinde ise hemen hemen imkansız hale gelir. Buna karşılık, lipit biyosentezi büyük oranda oksijene bağımlı değildir ve lipit üretebilen mayalar, kontrollü koşullarda 150g/l yoğunluğuna kadar gelişebilirler. Bu nedenle oksijen de bir besin elementi olarak düşünülmeli ve hücre ölümlerini önlemek için fermentöre yeterli düzeyde oksijen verilmelidir.

Mikroorganizmalar, ürettikleri lipit rezervlerini bir süre sonra metabolizma faaliyetleri için kullanmaya başlarlar (HOLDSWORTH ve RATLEDGE, 1988). Eğer ortamda karbon dışında; diğer besin elementleri yönünden açlık yaratılırsa lipit kullanımı ve parçalanması oldukça yavaş gerçekleşecektir. Ancak ortamda karbon tükenip N ve fosfat gibi besin elementleri zenginleştirilirse, bu durumda parçalanma oldukça hız kazanmaktadır. Bu da lipitlerin hücreler tarafından karbon kaynağı kullanılımasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 1. Kesikli Kültürde Gelişen Yağlı Maya veya Küflerde Lipit Birikimi

Diğer taraftan, mikroorganizmaların gelişme koşulları (sıcaklık, pH, verilen oksijen miktarı) üretilen yağın çeşit ve bileşimini etkilemektedir (RATLEDGE, 1982). Substrat olarak kullanılan karbondioksitlerin bileşimi de, üretilen lipitlerin bileşimini ve yağ asiti dağılımlarını etkilemektedir.

Mikroorganizmalar gelişme ortamında oluşabilecek herhangi bir değişime oldukça hızlı reaksiyon vermektedirler. Bu durum mikroorganizmaların sadece gelişme ve üretimlerini değil, aynı zamanda üretilen lipitlerin bileşimlerini de etkilemektedir. Bu nedenle koşullar (sıcaklık, pH ve oksijen miktarı) belirlenirken ve değiştirilirken oldukça dikkatli davranılmalıdır. Ayrıca fermentasyon sıcaklığının yağ asiti kompozisyonunu en fazla etkileyen parametre olduğu bildirilmiştir (RATLEDGE, 1978).

## YAĞ KAYNAĞI OLARAK KÜFLER VE MAYALAR

### Maya ve Küf Lipitleri

Maya ve küf lipitleri ve yağ asiti kompozisyonları oldukça yoğun bir şekilde çalışılmıştır (WASSEF, 1977; WEETE 1980). Fungi olarak da sınıflandırılan bu grup mikroorganizmaların yağ içeriklerinin, türe ve özellikle yetiştirme koşullarına bağlı olduğu belirtilmiştir. Yetiştirme koşulları olarak, sıcaklık, pH, karbon kaynağı, inorganik besin maddeleri ve havalandırma sayılabilir.

Fungiler optimal yetiştirme sıcaklıklarına göre mezofilik, psikrofilik termofilik ve termo-tolerant olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Bu dört grup arasında yağ içeriği açısından bir fark yoktur. Ancak mezofilik fungiler doymamış yağ asitlerince, termofilik fungilere göre daha zengindir. Ayrıca sıcaklık düştükçe doymamışlığın arttığı belirtilmiştir (GUNSTONE ve ark., 1994) Fungal gelişme için en önemli karbon kaynağı, glukozdur. En iyi disakkarit ise maltozdur. Bu ve diğer şekerler kolaylıkla lipitlere sentezlenebilirler. Buna karşılık, fungiler farklı şekerlere göre, farklı önemlerde yağ sentezleyebilmektedirler. Örneğin, *Penicillium chrysogenum*'un ya üretilimi için sukroz > fruktoz > glukoz sıralaması tespit edilmiştir. Bunun yanında, kullanılan şeker konsantrasyonunun da yağ üretiminde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (WEETE, 1980; RATTRAY ve ark; 1975). Lipit sentezi için genel olarak %40 oranında sukroz veya glukozun optimal olduğu ifade edilmiştir.

Fungilerin inorganik besin elementleri ihtiyacı iki açıdan önemlidir. Bunlardan birincisi hangi elementin gerekli olduğu, ikincisi ise bu elementin miktarıdır. Örneğin *Candida utilis* için fosfor miktarı, fosfolipit miktarını değiştirirken, oranlarda bazı *Candida spp.* için sodyum klorür miktarı (%0-10) toplam lipit oranını değiştirmektedir (%0.3'ten, %6.3'e kadar). Fungal lipit sentezinde, en önemli besinsel parametre C/N oranıdır. Yüksek yağ birikimi düşük protein senteziyle ilişkilidir. Aslında en yüksek yağ içeriği, azot içermeyen ortamlardan elde edilmiştir (GUNSTONE, 1994).

pH'nın fungal lipid birikimi üzerine etkisi henüz tam olarak açıklanmış değildir. Bazı türler için pH'nın artırılmasının lipit sentezini artırdığı belirtilirken, bazıları için ise hiç bir etki tespit edilememiştir (WEETE, 1980). Diğer taraftan havalandırma derecesi, sterol ve doymamış yağ asitleri sentezi için önemlidir. Ayrıca havalandırma derecesi fungal gelişme ve farklılaşmayı etkilemektedir. Örneğin *Mucor rouxii* aerobik koşullar altında geliştirilirse, filamentler şeklinde anaerobik koşullarda ise maya gibi hücreler şeklinde bir gelişme gözlenmektedir.

Bunların dışında bazı fungiler gelişme ve lipid sentezi için belirli vitamin ve amino asitlere de ihtiyaç duymaktadırlar. Genel olarak vitamin eksikliği lipit içeriğini azaltmaktadır.

Fungiler 10 karbondan 24 karbona kadar doymuş ve doymamış düz zincirli yağ asitleri sentezleyebilmektedir. Palmitik asit en fazla bulunan doymuş yağ asiti iken, oleik asit en fazla bulunan monoenlinoleik asit ise en yaygın çoklu doymamış yağ asittir (Çizelge 1,2). Bunun yanında küfler özellikle  $\omega$ -3 ve  $\omega$ -6 doymamış yağ asitlerini de üretebilirler. Küflerden bir kısmı  $\alpha$ -linolenik asit üretirken, bazıları ise ticari öneme sahip  $\gamma$ -linolenik asit üretebilmektedir. Genetik olarak oldukça kolay modifiye edilebilen küflerin, özellikle düşük oranlarda üretebildikleri bu yağ asitlerinin ( $\gamma$ -linolenik asit gibi) miktarını genetik modifikasyonlarla artırma üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Mayalar ise gerek yağ asiti dağılımları, gerekse yağ asitlerinin gliseritlerdeki dağılımları açısından bitki lipitlerine oldukça benzemektedir. Trigliseritlerin 2-pozisyonlarında doymamış yağ asitlerinin bulunması bu tezi kuvvetlendirmektedir (RATLEDGE, 1982, 1989). Özellikle *Rhodotorula glutinis* gibi mayaların %70'ler civarında yağ üretebilmesi (Çizelge 2), mayaların yemeklik yağ üretimine oldukça uygun mikroorganizmalar olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, maya lipitlerinin linolenik asit içeriği de oldukça düşüktür. Yapılan çalışmalar mayaların yağ üretiminin özellikle C/N oranına bağlı olduğunu göstermiştir.



Çizelge 3. Bazı Alglerin Yağ Asidi Bileşimleri

	Yağ Asidi (%)											
	16:0	16:1	16:2	16:3	16:4	18:1	18:2	18:3	18:4	20:4	20:5	22:6
Deniz fitoplanktonları												
<i>Monochrysis lutheri</i> (Chrysophyceae)	13	22	5	7	1	3	1	tr	2	1	18	7
<i>Olisthodiscus spp.</i> (Xanthophyceae)	14	10	2	2	1	4	4	6	18	2	19	2
<i>Lauderia borealis</i> (Bacillariophyceae)	12	21	3	12	1	2	1	tr	-	tr	3	-
<i>Amphidinium carterae</i> (Dinophyceae)	24	1	1	tr	-	5	1	2	15	1	14	25
<i>Dunaliella salina</i> (Chlorophyceae)	41	15	tr	tr	-	11	8	19	-	-	-	-
<i>Hemiselmis brunescens</i> (Cryptophyceae)	13	3	3	tr	tr	2	tr	9	30	tr	14	-
Deniz makroalgleri												
<i>Fucus vesiculosus</i> (Phaeophyceae)	21	2	tr	-	tr	26	10	7	4	15	8	-
<i>Chondrus crispus</i> (Rhodophyceae)	34	6	tr	-	-	9	1	1	4	18	22	-
<i>Ulva lactuca</i> (Chlorophyceae)	18	2	tr	1	18	9	2	17	24	1	2	tr
Tatlı su türleri												
<i>Scenedesmus obliquus</i>	35	2	tr	tr	15	9	6	30	2	-	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	26	8	7	2	-	2	34	20	-	-	-	-
Tuza dayanıklı türler												
<i>Ankistrodesmus spp.</i>	13	3	1	1	14	25	2	29	2	-	1	-
<i>Isochrysis spp.</i>	12	6	-	-	15	4	6	17	-	-	2	13
<i>Nannochloris spp.</i>	9	20	7	9	-	4	1	1	-	-	27	-

## SONUÇ

Mikroorganizmalar tarafından üretilen yağların miktar ve bileşimleri oldukça farklıdır. Fakat yağ üretimi için uygun koşullar yaratıldığında, üretilen yağ genellikle trigliseritlerden oluşabilmekte, ayrıca çok az düzeylerde fosfatid, sterol ve hidrokarbonlar bulunmaktadır. Diğer taraftan, genetik modifikasyonlarla arzulan bileşim ve özelliklerde yağ üretebilmekte mümkündür. Mikrobiyel yağ üretimi üzerine yapılan çalışmalarda daha çok maya ve küfler üzerinde durulmaktadır. Çünkü, yüksek yağ içeriklerinin yanında, özellikle mayaların yağ asiti dağılımla-

## YAĞ KAYNAĞI OLARAK ALGLER VE BAKTERİLER

Algler alginat ve kaeregenan gibi polisakkaritleri üretebilmeleri nedeniyle, gıda kaynağı olarak kullanılmaktadır. Diğer mikroorganizmalar gibi, biyokütellerinden yüksek yağ elde edilebilmesine rağmen, alglerle steril bir ortamda çalışılması oldukça güçtür. Çünkü kolaylıkla kontamine olabilmektedirler.

Algler tarafından üretilen lipitler oldukça çeşitlilik göstermektedir. Ancak alg lipitlerinin özellikle çoklu doymamış yağ asitlerince zengin oldukları bilinmektedir (Çizelge 3). Ancak arzulan çoklu doymamış yağ asitini zenginleştirme çabaları, daima toplam yağ oranlarını düşürmüştür.

Tatlı su alglerinin yağ asiti dağılımları, genel olarak bitki lipitlerine benzemektedir. Bu türlerde 16 karbonlu yağ asiti oranı yüksek, 18 karbonlu yağ asiti içeriği düşüktür. Aynı zamanda, 20 karbonlu yağ asiti sadece bazı türlerde iz miktarda bulunmaktadır. Buna karşılık deniz algleri 20 karbonlu yağ asitlerince zengindir. Ölü deniz gibi yüksek oranda tuz içeren deniz, alglerinin lipitlerinde araşidonik ve eikosagentanoik asitler en yaygın yağ asitleri olarak tespit edilmişlerdir (POHL ve ZURHEIDE, 1979; HARWOOD ve JONES, 1989). Diğer taraftan deniz alglerinde en fazla bulunan doymuş yağ asiti palmitik asit, en fazla bulunan tekli doymamış yağ asiti ile palmitoleik asittir. 18 karbonlu yağ asitleri daha düşük oranlardadır.

Bakteriler en basit ve en küçük mikrobiyel hücrelerdir. Yağ üretimleri düşük olan bakterilerin çok azı arzulan oranda trigliserit sentezleyebilmektedir. En yaygın depo yağı 3-hidroksibutirat poliesterlerdir. Bu poliester İngiltere'de ticari olarak üretilmekte ve doğa da parçalanabilir plastiklerin yapımında kullanılmaktadır. Diğer taraftan özellikle deniz ve tatlı sulardan izole edilen bakteriler, eikosapentanoik asit (20:5 ω-3) gibi çoklu doymamış yağ asitlerini sentezleyebilmektedirler.

rının ve gliserit yapılarının, bitki yağlarına benzemesi, hızla kalabalıklaşan dünyamız için yeni alternatif yağ kaynakları olarak düşünölmelerine neden olmuştur. Yağ açığı sorununu bir türlü çözemeyen ve her yıl oldukça yüksek miktarlarda yağ ithal etmek zorunda kalan ölkemizde de, bu konu üzerinde önemle durulmalı ve özellikle besin değeri ve teknolojik kalitesi olan yağların mikrobiyel olarak üretimi üzerinde çalışmalar yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- GILL, C.O., HALL, M.J. and RATLEDGE, C. 1977. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose in a single-stage continuous culture, *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 231, 239.
- GNUSTONE, F.D. HARWOOD, J.L. and PADLEY, F.B., 1994. *The Lipid Handbook, Second Edition*, Chapman and Hall, New York, 205-222.
- HARWOOD, J.L. and JONES, A.L. 1989. *Adv. Bot. Res.* 16, 1.
- HESSE, A. 1949. Industrial biosyntheses, Part I. *Fats. Adv. Enzymol.* 9: 653-704.
- HOLDSWORTH, J.E. and RATLEDGE, C. 1988, Lipid turnover in oleaginous yeasts, *J. Gen. Microbiol.* 134: 339-346.
- POHL, P. and ZURHEIDE, F. 1979. In *Marine Algae in Pharmaceutical Science* (Ed. H.A. Hoppe, T. Levring and Y. Tanaka), Walter de Gruyter, Berlin, 473.
- RATLEDGE, C., 1976. Microbial production of oils and fats, *Food From Waste*, Ed. by G.C. Birch, K.J. Parker and J.T. Worgan, Applied Science Pub. 98-113.
- RATLEDGE, C. 1978. Lipids and fatty acids, *Economic Microbiology*, Ed. A.H. Rose, Academic Press, London, 2: 263-302.
- RATLEDGE, C., 1982. Microbial oils and fats; an assesment of their commercial potential, *Prog. Indust-Microbiol.* 16: 119-206.
- RATLEDGE, C. 1989. Biotechnology of oils and fats, *Microbial Lipids*, Ed. C. Ratledge and S.G. Wilkinson, Academic Press, London, 2: 567-668.
- RATLEDGE, C. 1994. Yeast, moulds algae and bacteria as sources of lipids, *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*, Ed. by B.S. Kamel and Y. Kakuda, Blackie Academic and Professional, London, 235-291.
- RATTRAY, J. B.M. SCHIBECI, A. and KIDBY, O.K. 1975. Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* 39: 197-231.
- WASSEF, M.K. 1977. *Advances in lipid research*, Ed. by R. Paoletti and D. Kritchevsky, Academic Press, 15: 159.
- WEETE, J.D. 1980. *Lipid biochemistry of fungi and other organism*, Plenum Press, New York.
- WOODBINE, M. 1995. Microbial fat: microorganisms as potential producers, *Prog. Indust. Microbiol.* 1: 179-145.