

Fungal lipid üretimi ve biyodizel üretiminde kullanılabilirliği

[Fungal lipid production and usage in biodiesel production]

Figen Çiçek¹,
Emine Yalçın²

Giresun Üniversitesi, ¹Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler Ve Teknikler Bölümü,
²Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Figen Çiçek

Giresun Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu,
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü,
Güre Yerleşkesi/ Giresun
Tel. 05301139728
E-posta. figencekk@hotmail.com

Kayıt Tarihi: 25 Temmuz 2012; Kabul Tarihi: 17 Mart 2013
[Registered: 25 July 2012; Accepted: 17 March 2013]

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum* ve *Fusarium culmorum* mantarlarından lipid üretimi ve elde edilen lipidden de biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Maksimum lipid üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla pH, farklı karbon ve azot kaynakları, demir varlığı gibi çeşitli sistem parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Kültür ortamlarından lipid ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen lipidler biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Biyodizel üretimi transesterifikasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen biyodizelin karakterizasyonu karbon kalıntısı, viskozite, parlama noktası ve kükürt oranı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Çalışma sonucunda maksimum fungal lipid üretimi *Fusarium proliferatum* ile 24.96g/L olarak bulunmuştur.

Sonuç: Lipidlerden elde edilen biyodizelin araştırılan karbon kalıntısı, kükürt oranı, kinematik viskozite ve parlama noktası özellikleri standartlara uygun bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, biyodizel, transesterifikasyon

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

ABSTRACT

Objective: In this study lipid production from *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum* ve *Fusarium culmorum* was studied, and biodiesel production from these lipids was investigated.

Materials and Methods: The effect of system parameters such as pH, carbon source type, nitrogen source type and presence of iron on lipid production was investigated. Fungal lipid extraction from fungal biomass was achieved and the extracted lipids were used in biodiesel production. Transesterification method was used in biodiesel production. Flash point, viscosity, sulfur content and carbon residue analysis were used in biodiesel characterization.

Results: In the result of study, maximum lipid production were found as 24.96 g/L by *Fusarium proliferatum*.

Conclusion: Flash point, viscosity, sulfur content and carbon residue properties of the biodiesel produced in this study was found as in the range of standards.

Key Words: *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, biodiesel, transesterification

Conflict of Interest: The authors do not have a conflict of interest.

Giriş

Dünya nüfusunun ve insan ihtiyaçlarının hızlı artışına bağlı olarak enerji tüketimi de gün geçtikçe artmaktadır. Bu artışa bağlı olarak hızlı sanayileşme ve fosil kaynaklarının aşırı kullanımı sonucu artan çevresel sorunlar ülkesel bir sorun olmaktan çıkmış ve küresel bir sorun haline gelmiştir [1]. Dünyanın tüm enerji ihtiyacının %85 kadarı kömür, petrol, doğalgaz, bitümlü şist gibi fosil yakıtlardan üretilmektedir. Fosil yakıtlar insan sağlığında tehlike yaratacak zararlı gazlar içermektedir. Bu tür yakıtların tüketimi ile hem çevre zarar görmekte hem de küresel ısınma gün geçtikçe artmaktadır. Fosil yakıtların kullanımı sonucu yakıt içerisindeki karbonun havadaki oksijen ile birleşmesi sonucu CO₂ veya CO gazları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca fosil yakıtlarda eser miktarda bulunan kurşun, kükürt gibi elementler yanma sıcaklığında oksijen ile birleşerek insan sağlığı açısından tehdit oluşturan bileşiklere (SO_x, PbO, NO_x...) dönüşmektedir. Bu yanma ürünleri atmosferde birikmekte, güneş ve yer yüzü arasında tabii olmayan bir katman meydana getirmekte, insan ve bitki hayatı üzerinde negatif etkiye neden olmaktadır [2]. Bu sebepler alternatif enerji kaynağı arayışına neden olmaktadır. Alternatif enerji kaynakları petrol, kömür ve hidrolik potansiyele dayanmayan doğal ve yenilenebilir enerji kaynaklarıdır [3]. Yenilenebilir enerji kaynakları, miktarlarının sınırlı olmaması, çevreye daha az zarar vermeleri ve güvenli olmaları nedeniyle fosil yakıtlardan daha avantajlıdır. En fazla bilinen alternatif enerji kaynakları arasında güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, biyokütle ve su gücünden üretilen enerji kaynaklarıdır [4]. Biyokütleden çeşitli yöntemlerle katı, sıvı ve gaz halinde biyoyakıtlar üretilir. Biyoyakıtların en yaygın olanı sıvı yakıtlardan biyodizeldir.

Biyodizel, bitkisel yağların, kullanılmış atık yağların veya hayvansal yağların, mikrobiyal yağların alkol ile uygun bir katalizör kullanılarak kimyasal tepkimesi sonucunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. Yağlar yüksek viskozite seviyesi, düşük uçuculuk ve yağlardaki doymamış hidrokarbon zincirlerinin düşük reaktivitesinden dolayı direkt yakıt olarak kullanılamaz [5,6]. Viskoziteyi azaltmak için piroliz, mikroemülsiyon, seyreltme, transesterifikasyon yöntemlerinden yararlanılır. Transesterifikasyon, trigliseridlerin katalizör varlığında alkollerle reaksiyona girmesi sonucu metil esterlerin oluştuğu reaksiyondur. Transesterifikasyon düşük maliyetli ve kolay olmasından dolayı en çok tercih edilen yöntemdir [7].

Biyodizel üretiminde bitkisel, hayvansal, algal ve mikrobiyal lipidler kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipidleri alg, maya, bakteri ve fungi oluşturmaktadır. Fungal lipid üretiminde iki faz gözlenmektedir. İlk faz dengeli bir gelişmenin gözleendiği fazdır ve bu fazda bütün besin elementleri ortamda yeterli miktarda bulunmaktadır. Besin maddelerinin azalması özellikle azot kısıtlamasının başladığı durumda ikinci faz olan lipogenik faz başlar. Bu faz ise lipid üretimi için gerekli olan tüm besin elementleri tükenene dek devam eder. Lipid üretimi için

gerekli besin elementlerinin ortama yeniden ilave edilmesi durumunda lipogenik faz yüksek düzeyde devam eder ve biyokütleden lipid üretimi açısından yüksek verim elde edilir [8,9]. Mikroorganizmaların yağ üretme kapasiteleri bazı sistem parametreleri tarafından sınırlanmaktadır. Lipid üretimi birincil besin maddelerinin varlığı ile doğrudan alakalıdır. Ortamdaki azot kaynağının azalması lipid üretimini indüklemektedir. Benzer şekilde karbon kaynağı miktarındaki artış da lipid üretimini arttırmaktadır. Azot kaynağındaki azalma, protein ve nükleik asit sentezinde yavaşlamaya neden olmaktadır. Bu metabolik yollarda azot esansiyel elementtir ve azotun azalmasına bağlı olarak protein ve nükleik asit metabolizmasının durması sonucu hücre gelişimini sınırlamaktadır. Bu durumda kullanılan karbon, lipid üretiminde ve depolanmasında kullanılmaktadır [8,10]. Organizmalar lipid birikimini triaçilgliserol (TAG) depolayarak gerçekleştirmektedir. TAG'lar ökaryotlardan prokaryotlara kadar pek çok türde lipidin depo şeklidir. Mayalar ve küfler gibi pek çok fungal kütleler iyi birer TAG üreticisidir ve depolayıcısıdır. Lipid birikimi ve üretimi biyosentetik yolların düzenlenmesi ve öncü moleküllerin varlığı ile yakından ilişkilidir. Lipid üretiminde önemli olan öncü moleküllerden bazıları asetil CoA, malonil CoA, gliserol-3-fosfat, NADPH'tır.

Lipid üretim basamağında sitozolik yağ asidi sentaz enzimi görev almaktadır. Bu enzim 6 α and 6 β olmak üzere multimerik bir yapıya ve 48 aktif merkeze sahiptir. Yağ asidi sentezinde başlangıç reaksiyonları için sabit bir asetil CoA kaynağı ve uzama safhaları için malonil CoA gereklidir [11]. Azot kısıtlaması AMP-deaminaz enzimini aktive etmektedir. Bu aktivasyonla mitokondri AMP derişimini azalmakta ve buna bağlı olarak izositrat dehidrogenaz aktivitesi düşmektedir. İzositrat dehidrogenaz enzimi trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün kontrolünde önemli bir enzimdir ve bu enzimin azalması, izositrat birikime ve TCA siklusunun bloke olmasına neden olmaktadır. Aşırı biriken izositrat, sitrat şeklinde mitokondriden sitoplazmaya malat sitrat mekiği ile taşınmaktadır. Sitozolik ATP-sitrat liyaz enzimi sitoplazmaya pompalanan sitratı okzoloasetat ve asetil CoA'ya dönüştürmektedir. Asetil CoA ise lipid sentezinde öncü molekül olarak kullanılmakta ve bu yolla lipid üretimi artmaktadır. Bu çalışmada *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum* ve *Fusarium culmorum* mantarlarından lipid üretimi ve elde edilen lipidden de biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Mikroorganizmaların temini ve saklanması

Çalışmada *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum* ve *Fusarium semitectum* fungusları kullanılmıştır. Mikroorganizmalar Kırıkkale Üniversitesi, Mantar Yetiştiriciliği Programı koleksiyonundan temin edilmiştir. Mikroorganizmaların stok kültürlerinin sürekliliğini sağlamak amacıyla, Potato Dekstroz Agar katı besi ortamı kullanılmıştır. Stok fungus kültürleri haftada bir

yatık taze besi ortamına transfer edilmiş, 28°C'de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Elde edilen tüm kültürler ile-riki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Mikroorganizmaların üretimi

Çalışmada kullanılan fungal biyokütle üretim için kullanılan besiyeri bileşimi 50 g/L glukoz, 1 g/L maya ekstraktı, 5 g/L KH₂PO₄, 2 g/L NaNO₃, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O ve 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O olarak belirlenmiştir. Besiyeri pH'ı 0.1 M HCl ile 7.0'a ayarlanmış ve 1.5 atm basınç altında 110°C'de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. Fungusların stok kültürlerinden, hazırlanan besiyeri ortamlarına ekim yapılmıştır. Stok kültürleri 5 ml steril distile su içerisinde süspanse edildikten sonra hazırlanan miselyum süspanسیونu steril koşullarda 100 ml besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere ekilmiştir. Kültürler 28°C inkübasyon sıcaklığında 150 r.p.m. çalkalama hızında, 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir kültürde lipid üretim düzeyi araştırılmıştır.

Total Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi

Toplam lipid tayininde sülfo-fosfo-vanillin yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem hızlı, güvenilir ve uygulaması oldukça kolay bir yöntemdir [12,13]. Lipid analizi amacı ile besiyerinden ayrılan fungal biyokütle kloroform-metanol karışımı ile ekstrakte edilmiş ve santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant lipid analizinde kullanılmıştır. Bu amaçla 0.010 ml süpernatant 1.0 ml H₂SO₄ içerisinde tamamen çözünmüş ve karışım sıcak su banyosunda 10 dk süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler hızlı bir şekilde soğutulmuş ve tüplere 1.0 ml fosfovanilin ayırıcı ve 1.0 ml distile su ilave edilmiştir. Standart olarak etanol içerisinde çözünmüş zeytin yağı kullanılmıştır. Standart ve örnek çözeltilerinin 530 nm'de absorbanst artışı tayin edilmiştir.

Fosfovanilin ayırıcı: 0.6 g vanilin 10 ml etanol içerisinde çözünmüş ve 100 ml distile su ile seyreltilmiştir. Karışıma 400 ml fosforik asit ilave edilmiş ve homojen görüntü oluşana dek karıştırılmıştır.

Optimum Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi

Mikroorganizmalar gelişme ortamında oluşabilecek herhangi bir değişime oldukça hızlı cevap vermektedir. Bu durum sadece fungal gelişimi değil aynı zamanda fungal lipid üretimini de etkilemektedir. Maksimum lipid üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla pH, karbon kaynağı, azot kaynağı ve demir varlığı gibi sistem parametreleri incelenmiştir.

Lipid Üretimi Üzerine pH Etkisi

Lipid üretimi üzerine pH etkisini belirlemek için besiyeri pH'ı 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir mikroorganizma farklı pH'lardaki bu besiyeri ile 35°C'de 10 gün süre ile inkübe edilmiş ve lipid analizi gerçekleştirilmiştir.

Lipid Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi

Lipid sentezine karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla sıvı besiyerlerinde karbon kaynağı olarak glukoz, laktoz, dekstroz, maltoz ve mannitol kullanılmıştır. Bu amaçla temel besiyerine ilgili karbon kaynağı %1 (w/v, v/v) oranında ilave edilmiştir. 35°C'de 10 gün süre ile inkübasyon sonrasında karbon kaynaklarının lipid üretimi üzerine etkisi, farklı karbon kaynağı içeren kültürlerde lipid miktarının ölçümü ile belirlenmiştir.

Lipid Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi

Lipid üretiminde azot kaynağının etkisini belirlemek amacıyla sıvı besi yerlerine %0.2 oranında potasyum nitrat, amonyum nitrat, pepton ve glisin ilave edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde lipid miktarı belirlenmiştir.

Lipid Üretimi Üzerine Demir Varlığının Etkisi

Lipid üretiminde demir metal iyonunun varlığını belirlemek amacıyla sıvı besi yerlerine 0.0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L derişimlerinde FeSO₄ ilave edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde lipid miktarı belirlenmiştir.

Lipid Ekstraksiyonu

Fungal biyokütle tarafından üretilen lipidlerin ekstraksiyonu Bligh ve Dyer'in önerdiği yöntemle uygulanmıştır [14]. Besiyeri ve fungal biyokütle bir homojenizatör ile öğütülmüş ve kloroform:metanol (2:1, v/v) karışımı ile 20 dakika süre ile orbital karıştırıcıda ekstrakte edilmiştir. Süre sonunda karışıma kloroform:su (1:1) karışımı ilave edilmiş ve 10 dakika süre ile karıştırılmıştır. Süre sonunda ekstrakte edilen faz santrifüjlenerek ayrılmıştır. Elde edilen organik faz evaporatörde uçurularak lipid kalıntısı ince tabaka haline getirilmiş ve toplanarak biyodizel üretiminde kullanılmıştır.

Biyodizel Üretimi

1 ml %20' lik metanol ve 0.5 gram %1'lik sodyum hidroksit (NaOH) cam behere aktarılarak ısıtıcıda 30°C'ye kadar ısıtılmıştır. Katalizör olarak kullanılan NaOH'ın metanol içinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Alkol + katalizör karışımı üzerine fungal lipid (24.96 g/L) ilave edilmiş ve reaksiyon 60±1°C'de yaklaşık 1 saat süresince devam ettirilmiştir. Reaksiyon süresinin bitiminde karışım ayırma hunisine alınmış ve sıcak su eklenmiştir. Gliserin fazının ayrılması için karışım 12 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve ayrılan gliserin fazı ayırma hunisinden alınmıştır. Kalan metil ester, iki katı miktarda 60°C'deki distile su ile reaksiyon kabında bir süre karıştırıldıktan sonra ayırma hunisine alınmış ve faz ayrımı oluşumu sonrasında alınan ester filtreden geçirilmiştir.

Biyodizelin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu

Her bir mikroorganizmadan maksimum verimle elde edilen biyodizel örnekleri ile karbon kalıntısı, kükürt oranı, kinematik viskozite ve parlama noktası tayini gerçekleştirilmiştir. Karbon kalıntısı TS 6148 EN ISO

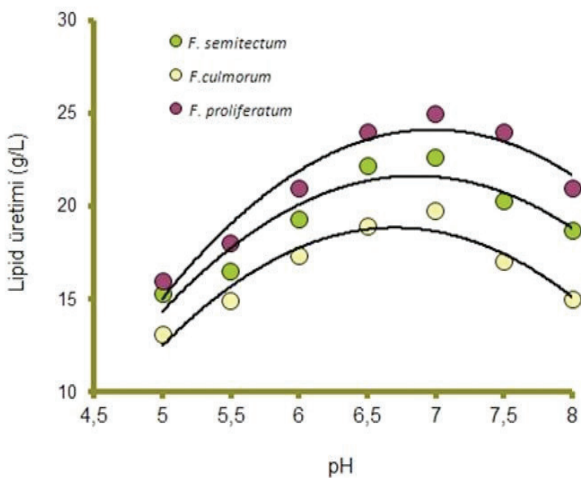
10370, kükürt oranı TS EN ISO 4264 kinematik viskozite TS 1451 EN ISO 3104, parlama noktası ise TS EN ISO 121185 analiz yöntemlerine göre yapılmıştır.

Bulgular

Biyodizel üretimi hedefli bu çalışma iki aşamadan oluşmuştur. İlk aşamada fungal biyokütlelerden lipid üretimi sağlanmış ve lipid üretiminde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise elde edilen lipidler, biyodizel üretiminde kullanılmış ve biyodizel karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında maksimum lipid üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla fungal lipid üretimi üzerine sistem parametrelerinden pH, karbon kaynağı, azot türü ve demir varlığının etkisi incelenmiş ve yüksek düzeyde lipid üretimi elde edilmiştir.

Lipid Üretimi Üzerine pH Etkisi

Mikroorganizmaların ürün oluşturmaları ve yaşamlarını devam ettirmelerinde besin ortamının pH'ı önemli bir parametredir. Mikroorganizmaların üremeleri için, besiyerinin pH 'sının optimal sınırlar içinde bulunması gereklidir. Minimal ve maksimal pH limitlerine yaklaştıkça üreme azalır ve durur. Bu amaçla fungal lipid üretimi üzerine pH etkisi 5.0-8.0 aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 1'de verilmiştir. Tüm biyokütleler için 5.5-6.0 ve 7.5-8.0 pH aralıklarında düşük lipid üretimi, pH 6.5-7.0 aralığında ise yüksek lipid üretimi gözlenmiştir. En yüksek lipid üretimi 7.0 pH değerinde *Fusarium proliferatum* ile 24.96 g/L olarak bulunmuştur. pH değerinin 5.0'dan 7.0'a artırılması ile lipid üretim kapasitesinin *Fusarium proliferatum* için 1.56, *Fusarium semitectum* için 1.48, *Fusarium culmorum* için ise 1.51 kat arttığı belirlenmiştir. pH değerinin 7.0'dan 8.0'a azalması durumunda ise lipid üretim kapasitesinin *Fusarium proliferatum* için 1.19, *Fusarium semitectum* için 1.22, *Fusarium culmorum* için 1.32 kat azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan biyokütlelerin lipid üretimi için nötral ve nötrale yakın pH değerlerini tercih ettikleri belirlenmiştir.



Şekil 1. Lipid üretimi üzerine pH etkisi

Lipid Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi

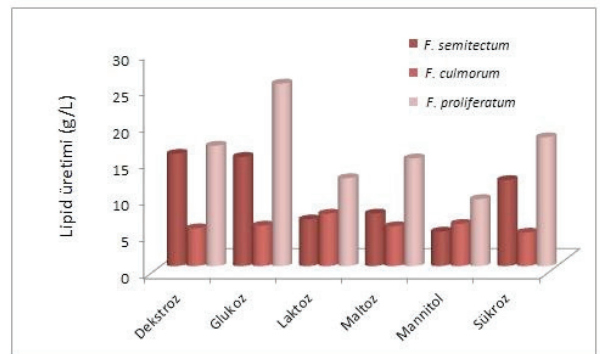
Fungal lipid üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi Şekil 2'de verilmiştir. Karbon kaynağı olarak dekstroz, glukoz, laktöz, maltöz, mannitol ve sükroz şekerleri test edilmiştir. En yüksek lipid üretimi diğer fungal kütlere kıyasla *Fusarium proliferatum* ile elde edilmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini glukoz varlığında gösterirken, en düşük lipid üretimi ise mannitol varlığında gözlenmiştir. Mannitole kıyasla glukoz varlığında *Fusarium proliferatum*da lipid üretim kapasitesi 2.73 kat artış gözlenmiştir. *Fusarium proliferatum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi glukoz varlığında 25 g/L olarak, en düşük üretim ise yine mannitol varlığında 9.18 g/L olarak bulunmuştur. *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi dekstroz varlığında 15.38 g/L olarak, en düşük üretim ise yine mannitol varlığında 4.7 g/L olarak bulunmuştur. *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi laktöz varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Sükroz varlığında ise tüm biyokütleler arasında minimum düzeyde olan 4.5 g/L lipid üretimi gözlenmiştir.

Lipid Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi

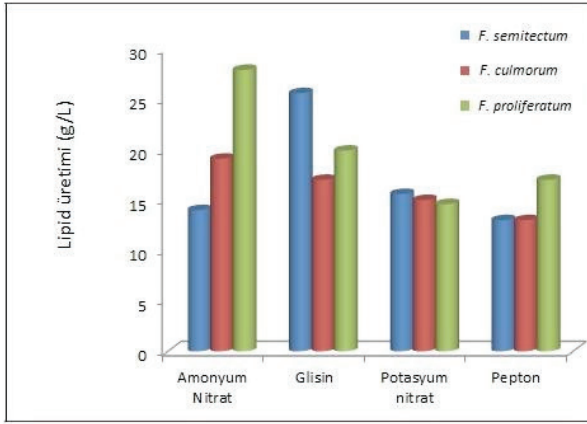
Azot kaynağının lipid üretimi üzerine etkisi Şekil 3'de verilmiştir. *Fusarium proliferatum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi amonyum nitrat varlığında 27.9 g/L olarak, en düşük üretim ise potasyum nitrat varlığında 14.6 g/L olarak bulunmuştur. *Fusarium semitectum* en yüksek lipid üretimini glisin varlığında gösterirken, en düşük lipid üretimi pepton varlığında gözlenmiştir. *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi amonyum nitrat varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Farklı mantar türleri farklı azot kaynağını tercih ederken, genel olarak mantarlar tarafından amonyum nitratın tercih edildiği gözlenmiştir.

Lipid Üretimi Üzerine Demir Varlığının Etkisi

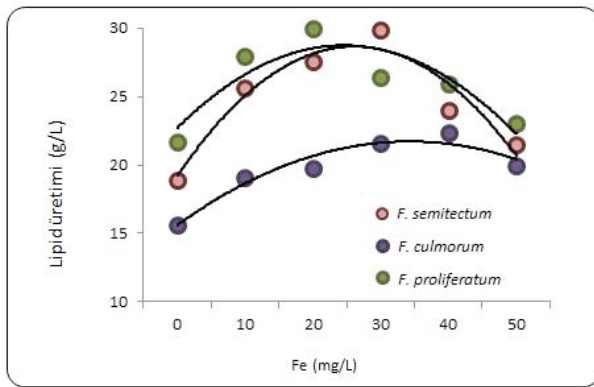
Demir varlığının lipid üretimi üzerine etkisi Şekil 4'te verilmiştir. Besi ortamında demir derişiminin artışına bağlı olarak lipid üretiminde de önemli artışlar olduğu belirlenmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini 20 mg/L demir varlığında, *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi



Şekil 2. Lipid üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi



Şekil 3. Lipid üretimi üzerine azot kaynağı etkisi



Şekil 4. Lipid üretimi üzerine demir varlığının etkisi

30 mg/L demir varlığında gözlenirken, *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi 40 mg/L demir varlığında maksimuma ulaşmıştır.

Biyodizel Özellikleri

Çalışma sonucunda %93.15'lik biyodizel üretimi ve elde edilen biyodizelin özelliklerinin belirlenmesinde karbon kalıntısı, viskozite, parlama noktası ve kükürt oranı analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Viskozite değeri TS 1451 ENISO 3104 stan-

darlarına göre (40°C'de) 1.0-6.0 mm²/sn aralığında, parlama noktası TSEN ISO 121185 standartlarına göre 100-170°C aralığındadır. Kükürt oranı TSEN ISO 4264 standartlarına göre %0.0-0.0024 aralığındadır. Karbon kalıntısının TS 6148 ENISO 10370 standartlarında limit aralığı maksimum %0.030 (m/m)'dur.

Tartışma

Son yıllarda enerji kaynaklarının azalması ve küresel ısınmanın artması alternatif enerji kaynakları arayışına sebep olmuştur. Alternatif kaynaklardan biri olan biyodizel, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal yağlardan üretilen çevre dostu bir enerji kaynağıdır. Pek çok olumlu özelliği ile araçlarda, ısınmada, havacılık sanayinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Tarımsal ve besinsel öneme sahip yağların enerji eldesi için feda edilmesi pek çok sorunu da beraberinde getirmiş ve kısa vadeli çözüm olarak kalmıştır. Bu çalışmada yüksek lipid üretme kapasitesine sahip olduğu bilinen *Fusarium* türleri ile lipid üretimi ve elde edilen lipid ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyodizel üretimi için yeni hammadde olarak mikrobiyal lipidlerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu çalışmada, biyokütle olarak kullanılan *Fusarium* türlerinin besi ortamının modifiye edilmesi ile lipid üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda besiyerinin pH'nın karbon kaynağının, azot kaynağının ve demir varlığının lipid üretimine etkisi incelenmiştir. Besiyeri pH'sı mikroorganizma üretiminde etkili olan önemli bir çevresel parametredir. Mikrobiyal metabolizmayı önemli derecede etkileyen pH'nın lipid üretimi üzerine etkisi farklı pH değerlerinde incelenmiş ve tüm fungal biyoküteller için maksimum lipid üretimi pH 6.5-7.0 aralığında gözlenmiştir. Bu aralığın altında ve üzerindeki pH değerlerinde lipid üretiminin azaldığı belirlenmiştir. pH, moleküllerin bağlanması ve etkileşimi gibi mekanizmalarda önemli bir faktör olan iyonizasyon üzerine oldukça etkilidir. Örneğin mikroorganizmalar için eser element olan bazı metaller farklı pH değerlerinde farklı iyonizasyon derecelerine sahiptir ve bu derece metalin mikroorganizma tarafından kullanılabilirliğini etkilemektedir. pH, fungal kütlelerin ihtiyaç duyduğu çoğu moleküllerin çözünürlüğünü de etkilemektedir. Ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilerek dış ortama salınan ekstrasellüler enzimler de besiyer-

Tablo 1. Biyodizel karakterizasyonu

	Viskozite (mm ² /sn) (40 °C)	Parlama noktası (°C)	Kükürt oranı (%)	Karbon kalıntısı (%)
<i>Fusarium proliferatum</i>	5.8	150	0.0020	0.012
<i>Fusarium semitectum</i>	4.9	166	0.0019	0.014
<i>Fusarium culmorum</i>	5.1	140	0.0014	0.025

mının pH'sından etkilenmektedirler. pH'a bağlı olarak enzim molekülü üzerinde çeşitli elektrik yüklenmeleri ve buna bağlı olarak enzim aktivitesi için gerekli olan konformasyonel yapı meydana gelmekte ve substratla-enzim etkileşimi gerçekleşmektedir. Ortam pH'sındaki değişimler enzim yüklenmesi üzerinde farklılıklara neden olacağından enzim-substrat etkileşimi azalacak ve fungal metabolizmada aksamalar meydana gelecektir. Tüm bu sebeplerden dolayı besiyerinin pH'sı mikrobiyal büyümede ve metabolit üretiminde oldukça önemlidir. Lipid üretiminde kültür ortamına ilave edilen karbon kaynağının etkisini belirlemek amacıyla farklı karbon kaynakları varlığında lipid üretimi test edilmiştir. Biyokütlelerin maksimum lipid üretiminde farklı karbon kaynaklarını tercih ettiği belirlenmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini glukoz varlığında gösterirken, *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi dekstroz varlığında, *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi laktoz varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar ile biyokütlelerin farklı karbon kaynaklarını tercih ettiği gözlenmiştir. Easterling ve arkadaşları üretilen lipid miktarının ve bileşiminin mikroorganizmaların türlerine, kültür şartlarına ve karbon kaynaklarına göre değiştiğini belirtmişlerdir [15]. Monomerlerin parçalanması diğer şekerlere göre daha kolay olduğu için maksimum lipid üretiminde genel olarak monosakkaritlerin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Shinmen ve arkadaşları [16] ve Aki ve arkadaşları [17] sırasıyla *Mortierella alpina* ve *Mortierella alliace* türlerini kullanarak araşidonik asit üretimi için çeşitli karbon kaynaklarını araştırmışlar ve araşidonik asit üretimi için glukozun en uygun karbon kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir. Papanikolaou [18] lipid üretimi için başlıca karbon kaynağının glukoz olduğunu rapor etmiştir.

Lipid üretiminde kültür ortamına ilave edilen azot kaynağının etkisini belirlemek amacıyla farklı azot kaynakları varlığında lipid üretimi test edilmiştir. Biyokütlelerin maksimum lipid üretiminde farklı azot kaynaklarını tercih ettiği belirlenmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini amonyum nitrat varlığında gösterirken, *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi glisin varlığında, *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi amonyum nitrat varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar ile biyokütlelerin farklı azot kaynaklarını tercih etmesine rağmen, genel olarak mantarlar tarafından amonyum nitratın tercih edildiği gözlenmiştir. Huang ve arkadaşları organik azot kaynaklarının lipid üretimi ve depolanmasında etkin bir role sahip olduğunu fakat hücre üremesi açısından iyi birer azot kaynağı olmadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde inorganik azot kaynaklarının ise hücre büyümesi için oldukça kullanışlı olduğunu fakat lipid üretimi için etkili olmadığını rapor etmişlerdir. Bu kapsamda *Rhodospiridium toruloides* ile maksimum lipid üretiminin azot kaynağı olarak pepton varlığında elde edildiği rapor edilmiştir [19].

Çalışmamızda *Fusarium semitectum* ile elde ettiğimiz sonuçlar bu genel fenomeni doğrulamaktadır. *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi organik azot kaynağı olan glisin varlığında elde edilmiştir. Fakat diğer biyokütlelerde en yüksek verim inorganik azot kaynakları varlığında elde edilmiştir ve bu nedenle böyle bir genellemenin bu çalışmada kullanılamayacağı açıktır. Fungal lipid üretimi birincil besin maddelerinin varlığı ile doğrudan etkilenmektedir. Ortamdaki azot kaynağının türü kadar ve miktarı da lipid üretim düzeyini önemli derecede etkilemektedir. Azot kaynağındaki azalma, azotun esansiyel element olduğu protein ve nükleik asit metabolizmasında yavaşlamaya neden olmaktadır. Ortamdaki azot kaynağının azalmasına bağlı olarak bazı metabolik yolların yavaşlaması hücre gelişimini sınırlamaktadır. Bu durumda besin kaynağı olarak kullanılan karbon diğer metabolik yollar yerine lipid üretiminde ve depolanmasında kullanılmaktadır [8,10]. Kısaca azot sınırlaması fungal kütlelerde iyi bir lipogenez indikatörüdür. Sınırlı azot düzeyi mitokondriyal AMP-deaminaz enzimini aktive etmektedir ve mitokondri AMP düzeyi azalmaktadır. Bu azalma ile izositrat dehidrogenaz aktivitesi azalmakta ve izositrat düzeyi artmaktadır. Bu artış, TCA siklusunun bloke olmasına ve biriken izositratın sitoplazmaya transferi ile sitoplazmik asetil CoA düzeyinde yükselmeye neden olmaktadır. Sitoplazmik asetil CoA lipid sentezinde öncü molekül olarak kullanılmakta ve bu yolla lipid üretimi ve depolanması artmaktadır [20]. Besiyerindeki eser element bileşiminin optimizasyonu daha yüksek ürün verimi elde etmek için önemlidir. Demir fungal kültür ortamının önemli temel inorganik bileşenlerinden biridir [21]. Bu nedenle çalışmamızda lipid üretiminde kültür ortamına ilave edilen demir varlığının etkisi ve miktarı araştırılmıştır. Demir derişiminin artışı ile lipid üretiminde önemli artışlar gözlenmiştir. *Fusarium semitectum* ile en yüksek lipid üretimi 30 mg/L demir varlığında, *Fusarium culmorum* ile en yüksek lipid üretimi 40 mg/L demir varlığında gözlenirken, *Fusarium proliferatum* ile en yüksek lipid üretimi 20 mg/L demir varlığında gözlenmiştir. Demirin yüksek derişimlerinde lipid üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. Totani ve arkadaşları [22] *Mortierella alpina* kültüründe mineral varlığının lipid üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır ve hücre büyümesi için fosfor, potasyum, demir ve manganın temel olduğunu ve demirin lipid sentezinde önemli rollere sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Kyle [23] demir, çinko ve bakır ilavesinin *M. alpina* kültüründeki araşidonik asit verimini arttırdığını ispatlamıştır. Bu durum asetil-CoA'nın malonil-CoA'ya dönüştürülmesini katalize eden ve kofaktör olarak bivalent metal iyonlarını gerektiren asetil-CoA karboksilaz aktivitesinin artması ile açıklanabilir [24]. Maksimum lipid üretimi çalışmaları sonrasında elde edilen lipidler, biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Elde edilen biyodizelin standartlara uygunluğunu belirlemek amacıyla karbon kalıntısı, viskozite, parlama noktası ve kükürt

oranı analizleri gerçekleştirilmiştir. Biyodizele ait bu özelliklerin tamamı standart değerler aralığındadır ve elde ettiğimiz tüm biyodizel örneklerinin standartlara uyduğu görülmektedir. Fungal lipidler, doymamış lipid içeriği bakımından zengindir. Doymamış yağ asitleri daha kolay esterleşme reaksiyonuna girdikleri için ideal bir biyodizel üretiminde bu yağ asitlerinin yüksek olması tercih edilmektedir. Fungal lipidlerle elde edilen biyodizelin standartlara uygun olması ve iyi özellik göstermesi fungal lipid içeriğinde doymamış lipidlerin bulunması ile açıklanabilir.

Gelişmeyle birlikte artan enerji kullanımı ve çevresel zararlar, dünyada olduğu gibi ülkemizde de biyodizel yakıtı gibi yenilenebilir enerji çeşitlerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Biyodizel konusunda gerekli üretim potansiyeline sahip olan ülkemizin hammadde ve üretim maliyetleri konusundaki sıkıntılar biyodizel konusunda istenilen noktaya gelmemizi engellemektedir. Biyodizel daha çok bitkisel ürünlerden elde edilmekte ve bu durum ileride besin azlığı ve kıtlık gibi daha önemli sorunları beraberinde getirebilmektedir. Bu nedenle biyodizel üretiminde hammadde açısından yeni alternatifler gündeme getirilmelidir. Bu çalışmada fungal lipidler bu anlamda kullanılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen biyodizel özelliklerinin standartlara yakın bir değer göstermesi ise oldukça umut vericidir.

Bilgi ve Teşekkür: Bu çalışma Giresun Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından FEN-BAP-140411-26 kodlu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Giresun Üniversitesi BAP Birimine teşekkür ederiz. Makale tez çalışmasından hazırlanmıştır.

Figen ÇİÇEK: Deney aşaması ve yazım aşaması, Emine YALÇIN: Tez danışmanlığı.

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Yaşar B. Türkiye’de biyodizel üretim maliyeti ve yaşanan sorunlar, VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, İstanbul, 2008;197-204.
- [2] Ünal S. Alternatif Enerji Kaynakları. <http://akmyo.kocaeli.edu.tr/altenerkaydersnot.pdf> (Son erişim tarihi: Nisan 2012)
- [3] Keleş R, Hamamcı C. Çevrebilim 2002;105 İmge Kitabevi, Ankara.
- [4] Savin J. Enerji İçin Yeni Bir Gelecek Yaratmak. Dünyanın Durumu. Çev. Şehnaz Tahir Gürçağlar, 2003;349 TEMA Vakfı Yayınları, İstanbul.
- [5] Demirbaş A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. Energy Conserv Manage 2009; 50:14-34.
- [6] Usta N, Ozturk E, Can O, Conkur ES, Nas S, Con AH. Combustion of biodiesel fuel produced from hazelnut soapstuck/waste sunflower oil mixture in a diesel engine. Energy Convers Manage 2005; 46:741-55.
- [7] Shahid EM, Jamal J. Production of biodiesel: A technical review. Renew Sustain Energy Rev 2011; 15(9):4732-45.
- [8] Denli Y, Tekin A. Oil production and microorganisms. Gıda 2000; 25(4):265-270.
- [9] Keskin A. Tall Yağı Esaslı Biyodizel ve Yakıt Katkı Maddesi Üretimi ve Bunların Dizel Motor Performansı Üzerindeki Etkileri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2005;166 Ankara.
- [10] Ratledge C. Lipids and fatty acids, Economic Microbiology 1978; 2:263-302.
- [11] Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. BBA 2007; 1171(83):255-270.
- [12] Knight JA, Anderson S, Rawle JW. Chemical basis of the sulpho-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. Clin Chem 1972; 18(3):199-202.
- [13] Jacobs SL, Henry RJ. Studies on the gravimetric determination of serum lipids. Clin Chim Acta 1962; 7:270-276.
- [14] Darnoko D, Cheryan M. Continuous production of palm methyl esters. JAOCS 2000; 77:1269-72.
- [15] Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of rhodotorula glutinis. Bioresour Technol 2009; 100:356-361.
- [16] Shinmen Y, Shimizu S, Akimoto K, Kawashima H, Yamada H. Production of arachidonic acid by mortierella fungi: selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production. Appl Microbiol Biotechnol 1989; 31:11-16.
- [17] Aki T, Nagahata Y, Ishihara K, Tanaka Y, Morinaga T, et al. Production of arachidonic acid by filamentous fungus, mortierella alliaacea strain YN-15. J Am Oil Chem Soc 2001; 78:599-604.
- [18] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by mortierella isabellina grown on high-sugar content media. Bioresource Technol 2004; 95(3):287-291.
- [19] Huang JZ, Shi QQ, Zhou XL, Lin YX, Xie BF, et al. Studies on the breeding of *Mortierella isabellina* mutant high producing lipid and its fermentation conditions. Microbiology 1998; 25:187-191.
- [20] Bielecki S, Krystynowicz A, Turkiewicz M, Kalinowska H. Bacterial Cellulose. In Steinbuchel A (Ed), Biopolymers: 2001; 7:37-90, Polysaccharides I. Wiley-VCH Verlag GmbH, Munster, Germany.
- [21] Aiba S, Humphrey AE, Millis NF. Biochemical Engineering.1973;266University of Tokyo Press, Japan.
- [22] Totani N, Someya K, Oba K. 1992. Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*. In: D. J. Kyle, and C. Ratledge (eds.). Industrial Applications of Single Cell Oils,1992; pp. 52-60, AOCS Press, IL, USA.
- [23] Kyle DJ. Arachidonic acid and methods for the production and use thereof. PCT Patent WO96/21037, 1996.
- [24] Guchhait RH, Polakis SE, Dimroth P, Stoll E, Moss J, Lane MD. Acetyl-coA carboxylase system of E. coli: purification and properties of the biotin protein carboxylase, carboxytransferase and carboxyl carrier protein components. J Biol Chem 1974; 249: 6633-45.