

Farklı Besiyerleri Kullanılarak Mayadan Tek Hücre Proteinini Üretimi

Ebru Karacan¹, Fatma Bulunuz¹, Seyhan İçier², Burcu Kaplan Türköz^{1*}

¹Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

²Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Manisa, Türkiye

* bkaplan@sabanciuniv.edu

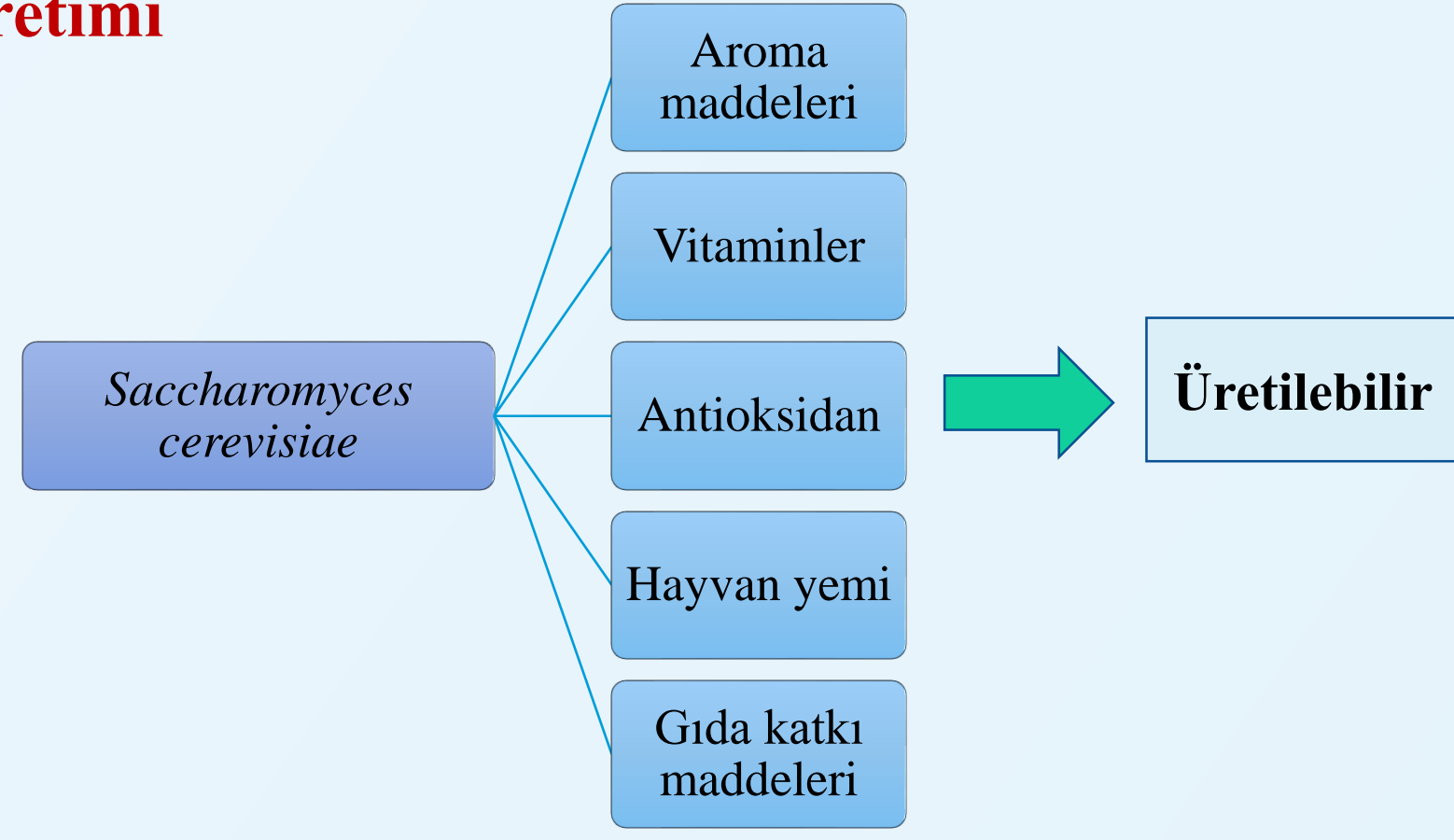
Dünya nüfusu artış hızının son yıllarda kritik boyutlara ulaşmış olması, geleneksel protein kaynaklarının üretimindeki zorluklar ve bu proteinli gıdaların yüksek maliyetli olması nedeniyle alternatif protein kaynakları ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır. Mayalar, mantarlar, bakteriler ve mikro algler gibi farklı mikrobiyal kaynakların biyokütlelerinin protein olarak kullanımına yönelik çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir. Bu şekilde üretilen toplam protein Tek Hücre Proteinini (THP) olarak isimlendirilmektedir. THP üretim ve kullanımında çeşitli problemler mevcuttur; bunlar arasında üretim maliyetlerinin yüksek olması ve alerjenite riski gibi konular öne çıkmaktadır. Bu çalışmada farklı besiyerleri kullanılarak kesikli sistemlerde *Saccharomyces cerevisiae* THP'si eldesi, farklı besiyerlerinin üretim verimine etkisi ve elde edilecek THP'nin protein dağılımı incelenmiştir. Bu amaçla, farklı pH değerlerinde farklı karbon kaynakları içeren ortamlar ile fermentasyonlar gerçekleştirilmiş ve fermentasyon sırasında hücre yoğunluğu ve pH değişimi incelenmiştir. Protein moleküler ağırlıklarının dağılımının analizi, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlenmiştir. Sonuç olarak *S.cerevisiae*'nin THP'sini üretmek için en uygun pH değerinin 4.5 ve en uygun substratların ise glukoz ve maltozun bir kombinasyonu olan besiyerleri olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tek Hücre Proteinini (THP), maya, jel elektroforez, fermentasyon.

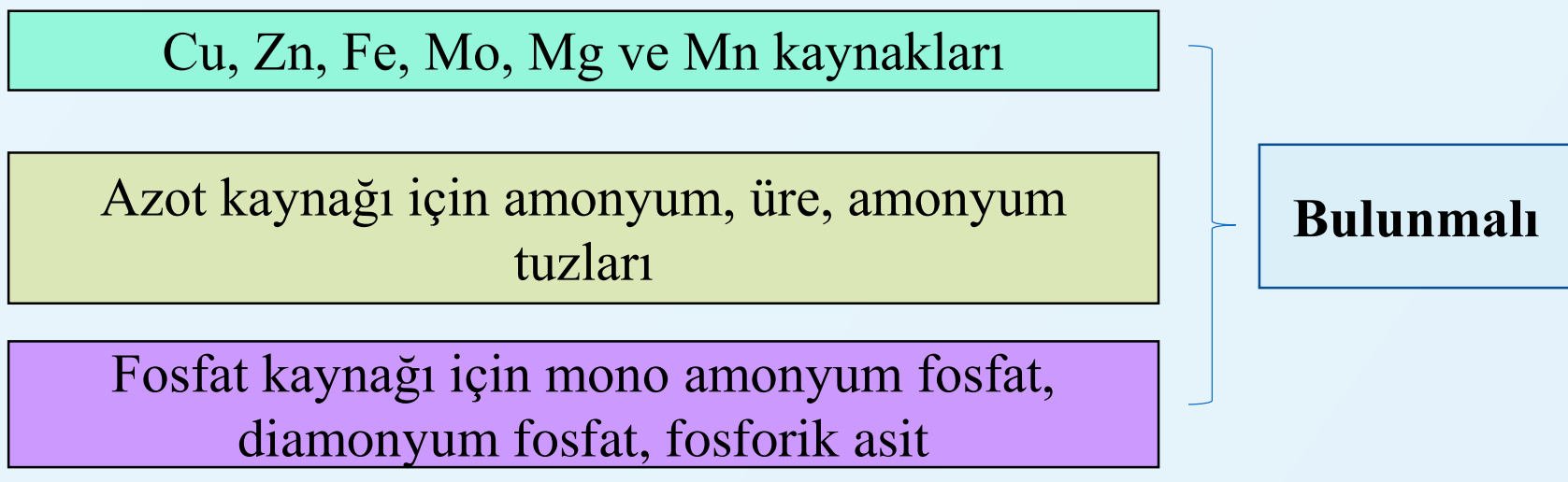
Tek Hücre Proteinini

- THP yüksek protein içeriğinin yanı sıra yağlar, karbohidratlar, nükleik asitler, vitaminler ve mineraller de içerir.
- Çöp depolama alanlarındaki gıda atıkları mikroorganizmalarla fermente olur ve karbondioksit ve metan gibi gazlar salınır. Bu sorun gıda atıkları ile THP üretimi sayesinde çözülebilir. Çünkü gıda atığından THP üretimi, anaerobik sindirime göre bir gıda atığı yönetimi stratejisi olarak daha iyi sonuçlar verebilecek; başka bir gelecek vaat eden mikrobiyal tabanlı teknolojidir.
- Mikroorganizma:** Mikroorganizma bileşimi, kültür üretimi sırasındaki davranış biçimi, toksik olmaması, yüksek protein içeriği, yüksek verimde çoğalabilen tür olması önemli faktörlerdir
- Besiyeri:** Çeşitli THP türlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan tarımsal kökenli substratlar arasında peynir altı suyu, portakal kabuğu kalıntısı, tatlı portakal kalıntısı, şeker kamışı küspesi, kağıt fabrikası atığı, pirinç kabuğu, buğday samanı kalıntısı, manyok atığı, şeker pancarı küspesi, hindistan cevizi atığı, üzüm ve mango atığı bulunmaktadır

Saccharomyces cerevisiae mayasından THP üretimi



Fermentasyon ortamında:



Fermentasyon sırasında sıcaklık, pH, havalandırma hızı, çözülmüş oksijen konsantrasyonu, solunum katsayısı, substrat besleme hızı, azot ve fosfat kaynaklarının miktarı ve besleme hızı kontrol edilir.

MATERYAL VE METOD

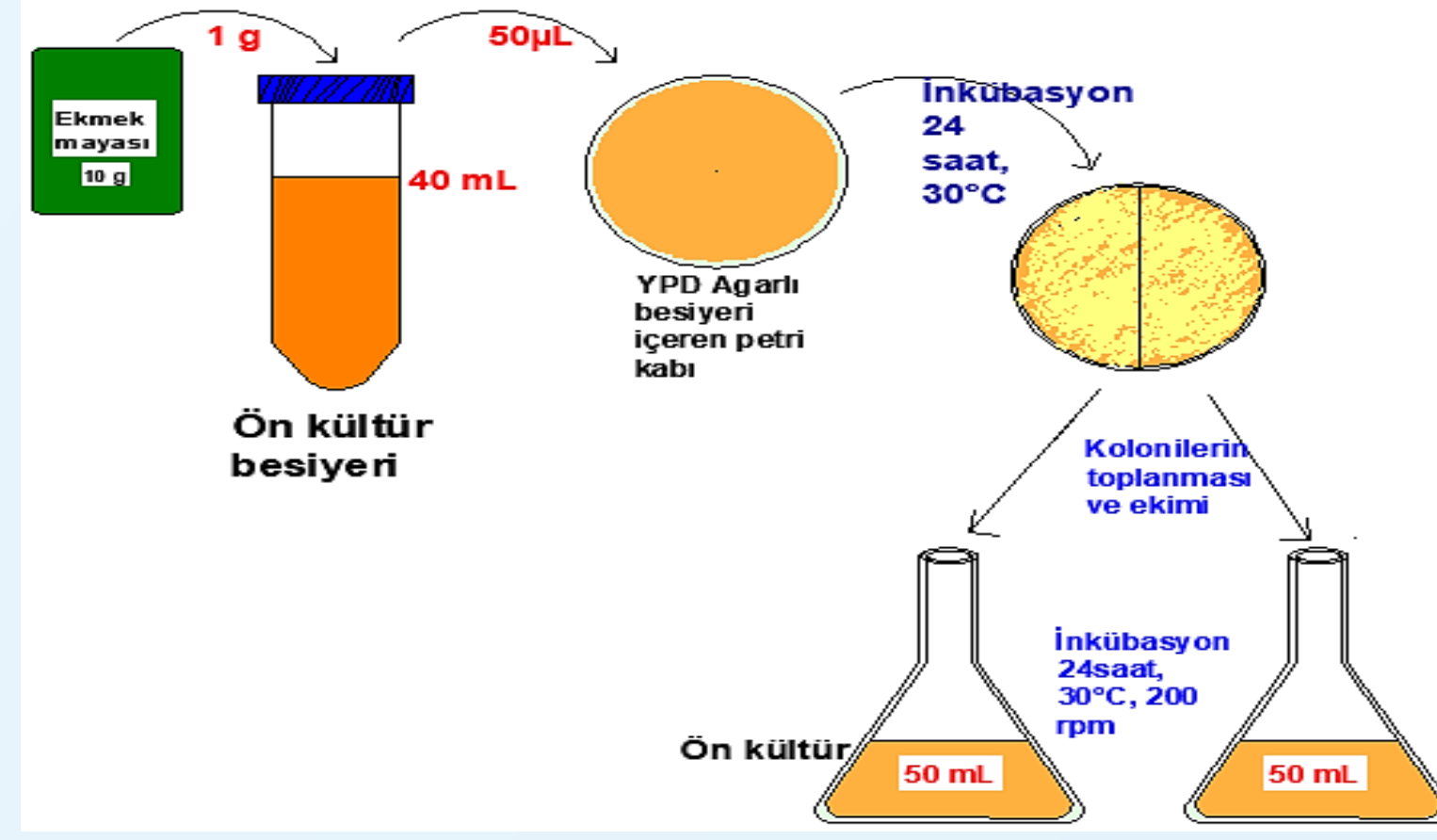
Saccharomyces cerevisiae ile THP üretimi için optimum koşulları bulmak üzere farklı besiyerleri ile dört farklı fermentasyon yapılmıştır. Bunlar Fermentasyon 1, Fermentasyon 2, Fermentasyon 3 ve Fermentasyon 4 olmak üzere isimlendirilmiştir.

Mikroorganizma: Bu çalışmada Pakmaya markasının *Saccharomyces cerevisiae* ticari suşu kullanılmıştır.

Tablo 1. Fermentasyon Besiyeri İçerikleri.

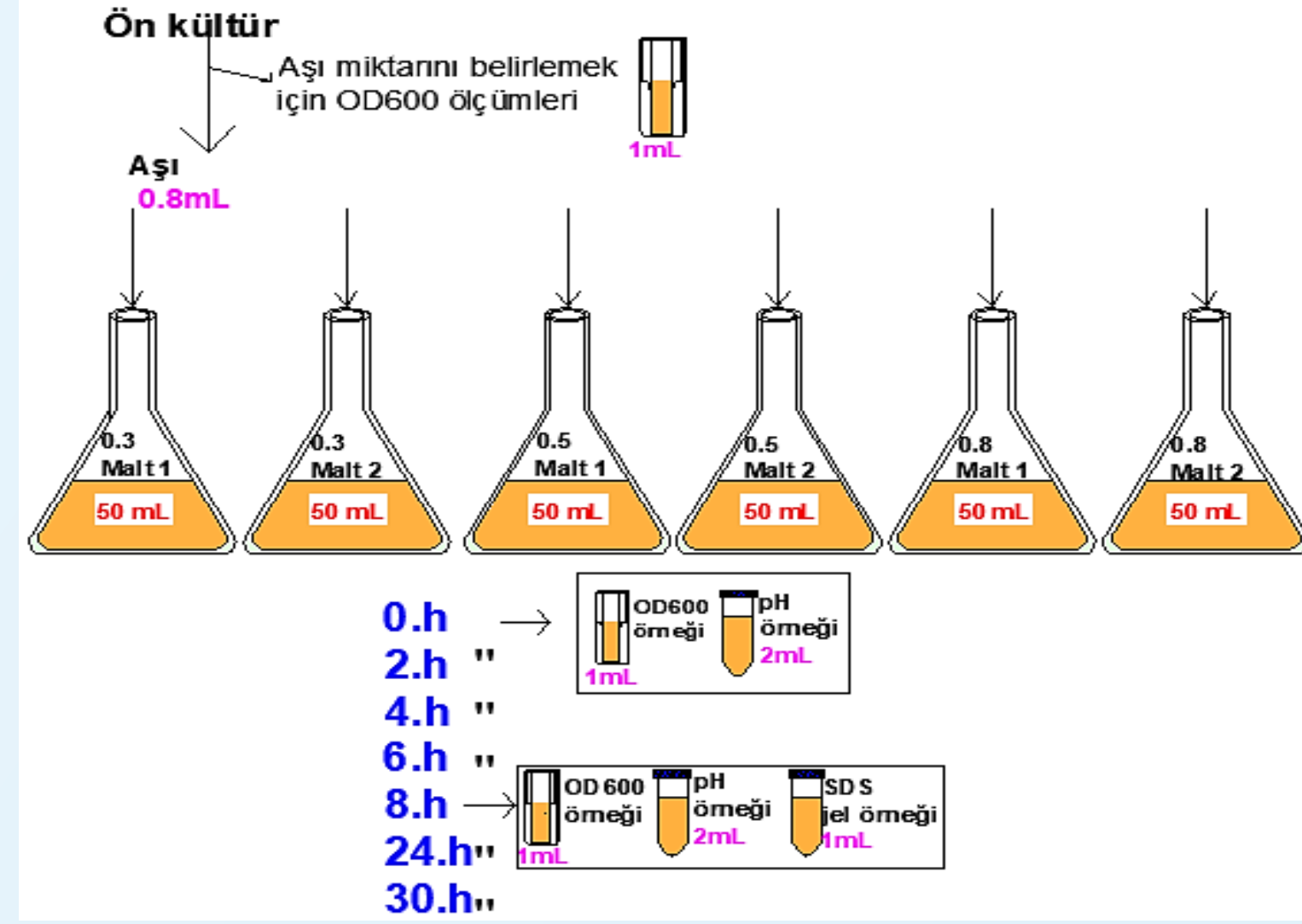
	Fermentasyon 1		Fermentasyon 2		Fermentasyon 3		Fermentasyon 4	
	pH	pH	pH	pH	pH	pH	%0.3 Malt	%0.5 Malt
	6.84	5.0	5.5	4.5	5.0	4.5	0.3	0.5
Glikoz	%1	%1	%1	%1	%1	%1	%0.5	-
Maya Ekstraktı	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3	%0.3
Baktopepton	%0.5	%0.5	%0.5	%0.5	%0.5	%0.5	%0.5	%0.5
Malt	-	-	-	-	-	-	%0.3	%0.5

Ön Kültürün Hazırlanması:

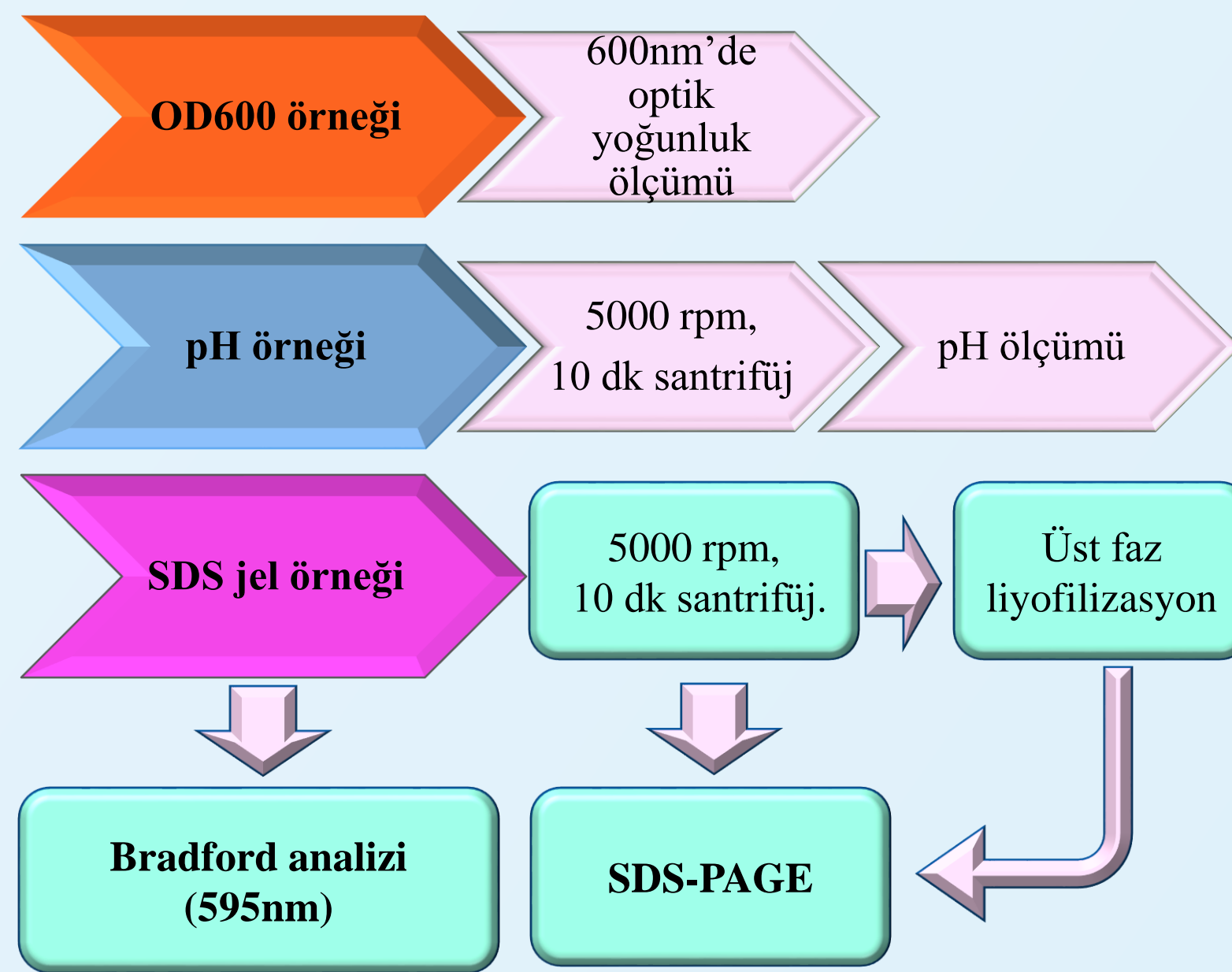


Şekil 1. Ön kültürün hazırlanması

Fermentasyonlar (Mayadan THP üretimi)



Şekil 2. Fermentasyon 4 prosedürü.



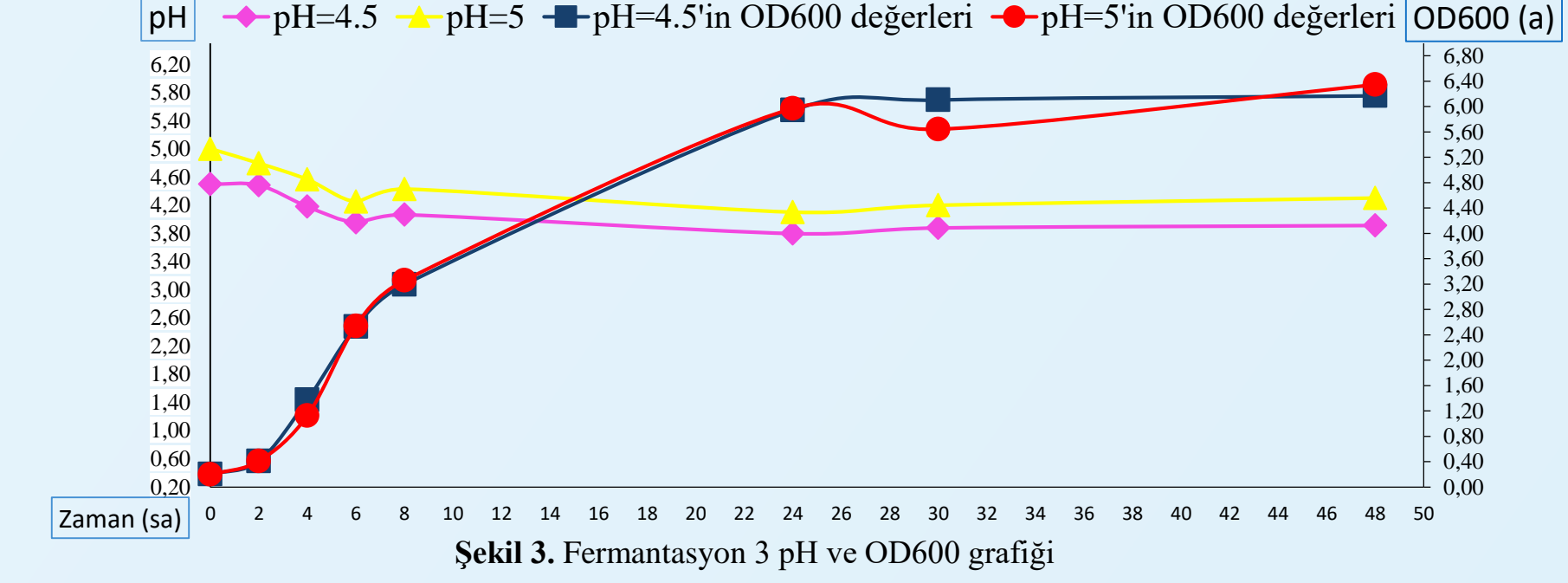
- Peletler ve liyofilize üst fazlar SDS-PAGE öncesi eşit hacimde 100 µL tampon A (50 mM Tris pH 8.5, %5 gliserol, 150 mM NaOH) ile resüspanse edilmiştir. Daha sonra örnekler jel yükleme boyası eklenmiş, 95°C'de 10 dakika denatüre edilmiş ve SDS-PAGE için jellere 20 µL örnek yüklenmiştir.
- Protein miktarının belirlenmesi için Bradford testi yapılmıştır. THP örnekleri için hücre peletleri dondur-çöz ve vorteks ile parçalanmıştır. Tampon A ile 1:20 seyreltilmiş örnekten 4 µL alınarak 200 µL Bradford boyası ile karıştırılmış ve 595 nm absorbansları ölçülmüştür. Standart olarak BSA kullanılmıştır.

BULGULAR

✓ OD600, pH ve SDS-PAGE

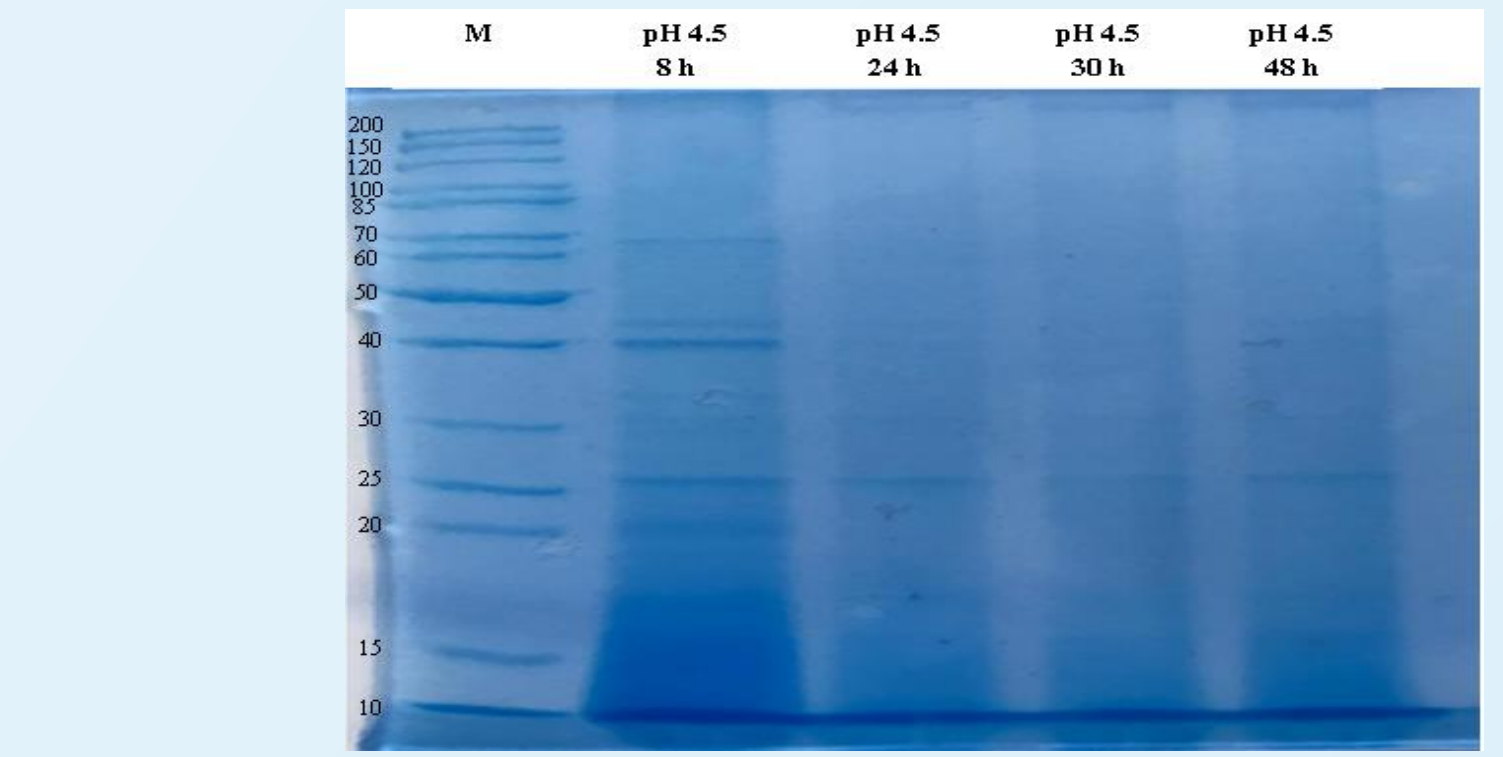
- Fermentasyon 1'de pH değerinin yüksek (6,84) olması nedeniyle yeterli miktarda THP üretilmemiştir.
- Fermentasyon 2'de iki farklı pH değerinde (pH 5.0 ve 5.5) besiyeri kullanılmış ve fermentasyon 1'e göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Fermentasyon 3 pH ve OD600 grafiği

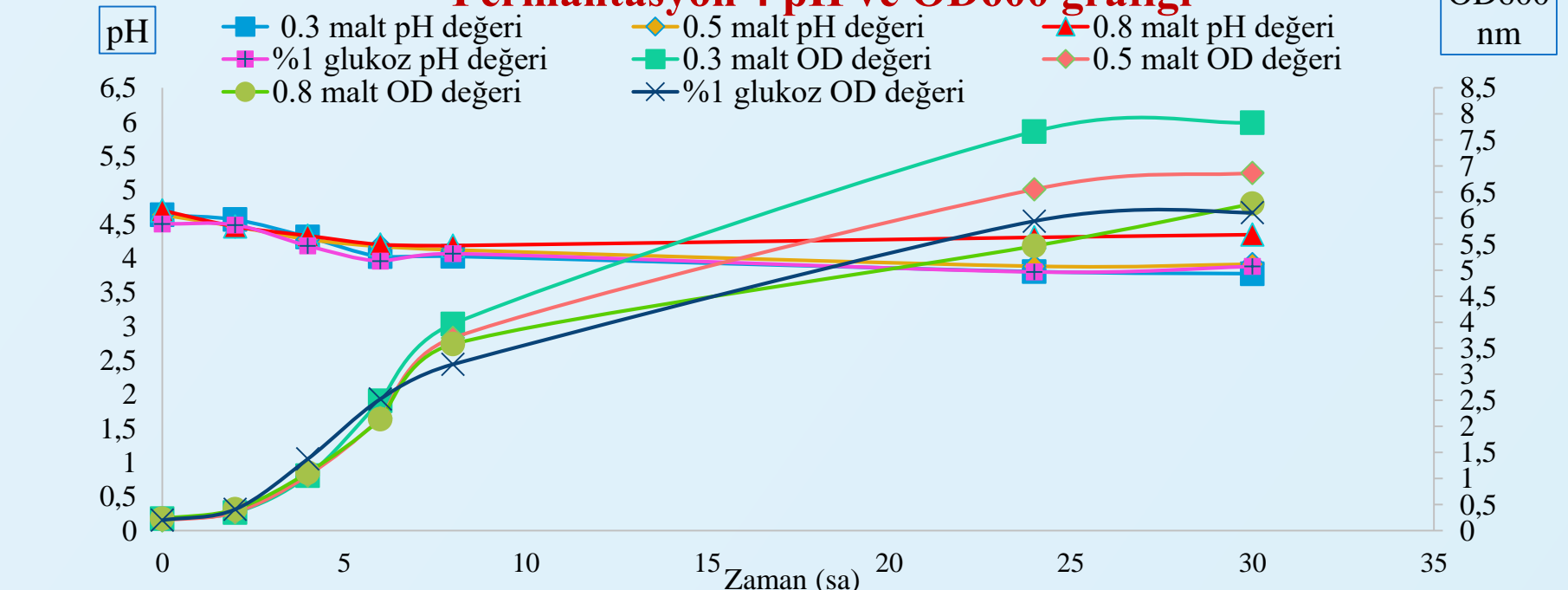


Şekil 3. Fermentasyon 3 pH ve OD600 grafiği

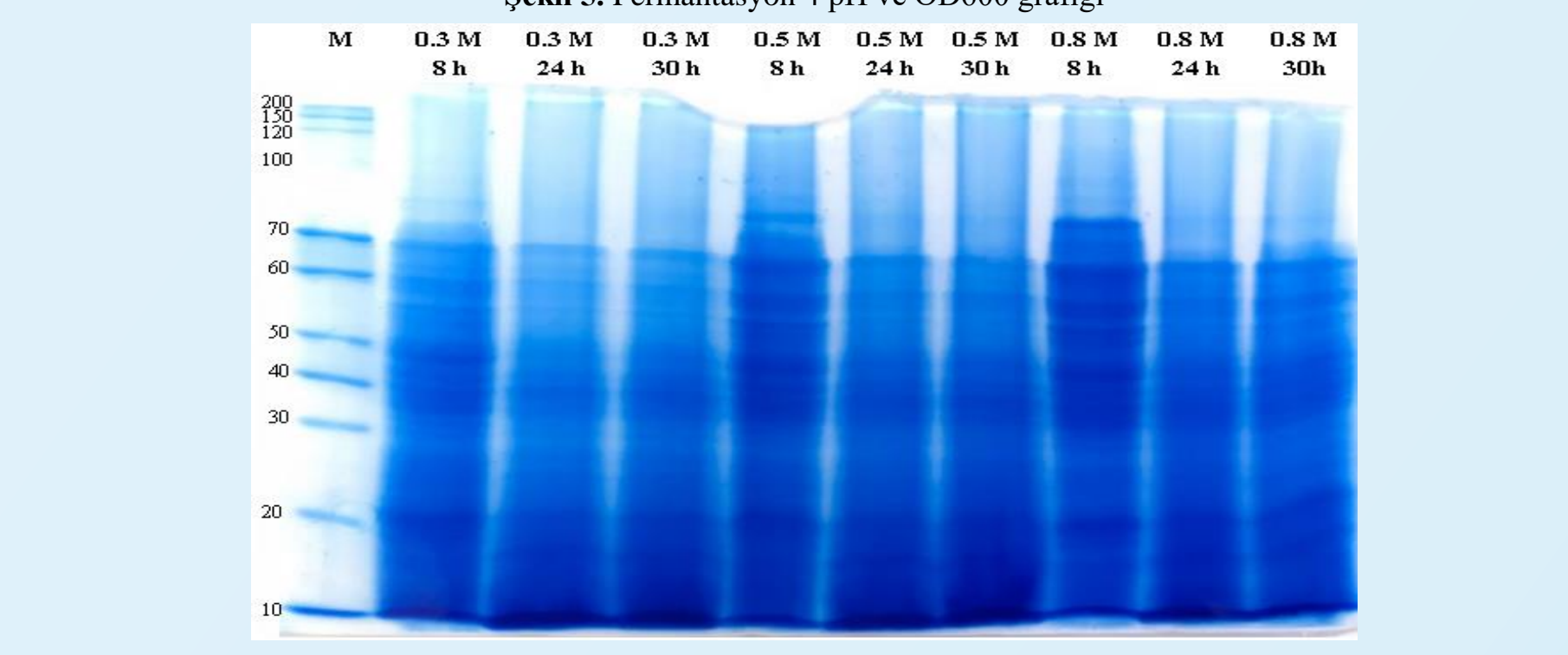
- Fermentasyon 3'de pH 4.5 besiyeri ortamında pH 5 ve 5.5 değerlerine göre daha yüksek miktarda biyokütle olduğu belirlendi.
- Fermentasyon 3'de üretilen protein miktarı Şekil 3'de görülmektedir.



Şekil 4. Fermentasyon 3 SDS jel elektroforez görüntüsü

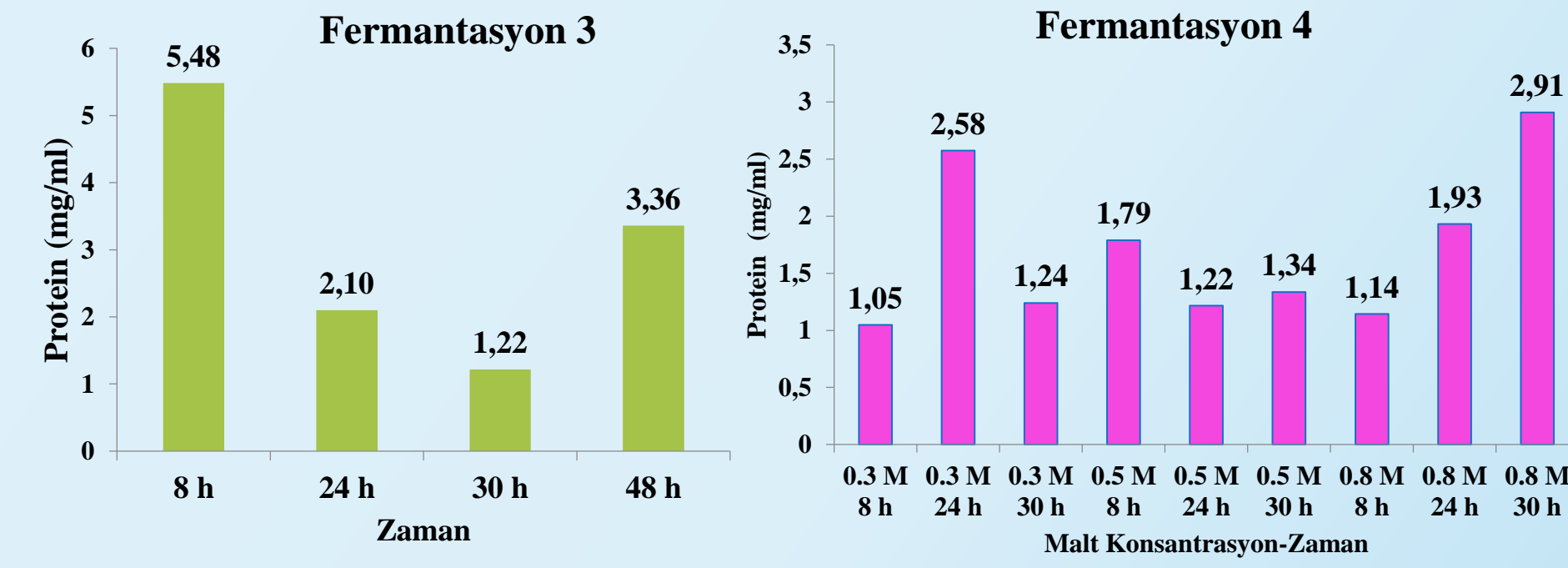


Şekil 5. Fermentasyon 4 pH ve OD600 grafiği



Şekil 6. Fermentasyon 4 SDS elektroforez jel görüntüsü

- Fermentasyon 4'de biyokütle ve protein miktarının sadece glukoz içeren besiyerine göre daha fazla olduğu görülmektedir.
- BRADFORD ANALİZİ**
- Fermentasyon 3 ve Fermentasyon 4'de protein konsantrasyonu belirlemek için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Bradford analiz sonucu

SONUÇ

Hücre üreme ve protein elektroforez sonuçlarına bakıldığında THP üretimi için en iyi besiyeri ortamının pH 4.5 ve karışık karbon kaynağı (%1 glukoz, %0.3 malt) olduğu görülmüştür. Protein miktar tayinleri için Bradford yöntemi kullanılmış ancak tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Bunun sebebinin de analiz öncesi hücrelerin homojen olarak parçalanmaması olduğu düşünülmektedir. Sonraki çalışmalarda üretilen proteinlerin karakterizasyonu ve biyoaktivitelerinin incelenmesi üzerine yoğunlaşılacaktır.

Kaynakça
1. Aran, N. (2010). Nobel Press Yayıncılık, 64-65.
2. Bajpai, P. (2017). Singapore: Springer, pp. 1-9.
3. Hashempour-Baltork, F., Khosravi-Darani, K., Hosseini, H., Farshi, P., & Reihani, S. F. S. (2020). Journal of Cleaner Production, Volume 253, 119958. ISSN0959-6526.
4. Hezarjaribi, M., Ardestani, F., Ghorbani, H. R. (2016). Applied Biochemistry and Biotechnology, 179(8), pp. 1336-1345.
5. LaTurner, Z. W., Bennett, G. N., San, K. Y., & Stadler, L. B. (2020). Journal of Cleaner Production, 123114, pp. 1-2.
6. Natesan, W., Phangthai, S., Sompugdee, C., Sakulsombhat, M., & Sriro, K. (2019). Sugar Tech, 21(2), pp. 348-354.
7. Pérez-Torraldo, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., Matallana, E. (2015). Trends in Food Science & Technology, 46(2), pp. 167-175.