

**MİKROBİYAL YAĞ ÜRETİMİNDE GÜL
YAĞI ATIK MATERYALİNİN
KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi
Ayşe GÖKDAL
Eskişehir, 2018**

**MİKROBİYAL YAĞ ÜRETİMİNDE GÜL YAĞI ATIK MATERYALİNİN
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYŞE GÖKDAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Mart 2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1503F110 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Gökdal'ın “Mikrobiyal Yağ Üretiminde Gül Yağı Atık Materyalinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması” başlıklı tezi 14/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Ünvanı-Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Merih KIVANÇ
Üye : Prof. Dr. Berrin BOZAN
Üye : Prof. Dr. Semra İLHAN
Üye : Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU
Üye : Yard. Doç. Dr. Hülya GENÇER

Prof. Dr. Ersin YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

MİKROBİYAL YAĞ ÜRETİMİNDE GÜL YAĞI ATIK MATERYALİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe GÖKDAL

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mart 2018

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Ülkemiz gül üretiminde öncü ülkeler arasında yer almakta olup gül yağı ve gül suyu çıkarıldıktan sonra artan posa çevreye bırakılmakta ve ekonomik olarak değerlendirilememektedir. Yüksek miktarda ortaya çıkan gül posasının hem çevre kirliliğine sebep olmaktan çıkması hem de ülke ekonomisine ucuz ve çevreci bir yakıt olan biyodizel üretimine bir katkı sağlaması amacıyla bu çalışmada karbon kaynağı olarak atık gül posası içeren besiyerlerinde mayalar yardımıyla mikrobiyal yağ üretilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada teste alınan 162 maya izolatının atık gül posası içeren Yeast extract peptone dekstroz agarda gelişip gelişmediği incelenmiş ve bu ortamda gelişen mayalarda lipid birikimi Sudan Black B boyama yöntemiyle belirlenmiştir. Seçilen izolatlar 26S rDNA'nın D1/D2 bölgesi NL1 ve NL2 primerleri kullanılarak dizi analizi ile tanımlanmıştır. Atık gül posası içeren besi ortamında % lipid oranı 3,5'dan yüksek olan altı maya izolatu (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) seçilerek optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. İlk önce atık gül posasının su ve asit ile ön muamelesinin % lipid verimine etkisi belirlenmiştir. Daha sonra sıcaklık, inokulum yaşı ve inokulum hacminin optimizasyonu Box Behnken deney tasarımı yöntemi ile belirlenmiştir. Validasyon çalışmalarından sonra elde edilen lipidin yağ asidi analizleri GC-MS cihazı ile yapılmıştır.

Atık gül posasının kullanıldığı çalışmada en yüksek yağ verimi; *W. subpelliculosus*-6 ile 35°C de 38 saatlik kültür ve %25 inokulum hacminde asitle muamele edilen atık gül posasında % 45 oranında elde edilmiştir. *W. subpelliculosus*-6 ile ilk kez bu çalışmada lipid üretilmiştir. Üretilen yağ asidi profili ise %45 palmitik asit, %42,62 stearik asit ve %7,38 oleik asit olup yağ asit bileşimi bitkisel yağ asitlerine benzemektedir. Bu nedenle de biyodizel üretimi için uygun bir materyal olarak düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Maya, Atık gül posası, Mikrobiyal yağ.

ABSTRACT

SEARCHING USABILITY OF WASTE MATERIAL OF ROSE OIL FOR MICROBIAL OIL PRODUCTION

AYŞE GÖKDAL

Advanced Technologies Department

Anadolu University, Graduate School of Sciences, March 2018

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Our country is one of the leading countries in rose production and the pulp that is left over after extraction of rose oil and rose water is released to environment and is not utilized economically. This study aims to produce microbial oil with the help of yeasts in waste rose pulp-containing media as a carbon source so that rose pulp, which emerge in large quantities, may cease to be an environmental pollutant but may also contribute to production of biodiesel, an environment-friendly oil that is cost-effective for the national economy.

The study investigated whether 162 tested yeast isolates propagated in the yeast extract peptone dextrose agar, and lipid buildup developing in this setting was assayed using Sudan Black B staining method. The selected isolates were identified with sequence analysis using the primers NL1 and NL2 of 26S rDNA D1/D2 domain. The six yeast isolates with percent lipid ratio of above 3.5 in the nutrient media containing waste rose pulp (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 and *K. marxianus*-155) were chosen, followed by optimization work. First, the effect of pretreatment of waste rose pulp with water and acid on lipid yield % was determined. Then temperature, inoculum age and inoculum volume optimization was undertaken using the Box Behnken experimental design. Following validation work, fatty acid analyses of the obtained lipid were carried out with the GC-MS.

In this study which used waste rose pulp, the highest oil yield was 45% from the waste rose pulp following a 38-hour culture at 35°C with *W. subpelliculosus*-6 and treatment with acid at 25% inoculum volume. Lipid was obtained with *W. subpelliculosus*-6 for the first time in this study. The obtained fatty acid profile included 45% palmitic acid, 42.62% stearic acid and 7.38% oleic acid, with a fatty acid composition that is similar to vegetable oil acids. It can therefore be considered as a suitable material for biodiesel production.

Keywords: Yeast, Waste material of rose, Microbial oil.

TEŞEKKÜR

Uzun süreli tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olarak mikrobiyoloji ve özellikle mayaları bana sevdiren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Merih Kıvanç'a,

Biyokimyasal deney aşamalarımda yardım ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Araş. Gör. Dr. Emir Zafer Hoşgün ile Prof. Dr. Berrin Bozan'a ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım sevgili yüksek lisans öğrencileri Ebru Tunç ve Selin Ürey'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan Biyoloji/Biyoteknoloji bölümündeki tüm hocalarım ve laboratuvar çalışmaları konusunda benimle tüm deneyimini paylaşarak deneylerimin planlanmasına destek olan Derya Berikten'e,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyerek laboratuvarda geçirdiğimiz uzun süreli zamanları çok keyifli kılan değerli laboratuvar arkadaşlarıma,

Son olarak öğrenim hayatım ve yüksek lisans çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle ayrı şehirlerde olsak bile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli aileme, her zaman yanımda olan sevgili ev arkadaşım Selen Yüzüak'a, ek olarak verdiğim aradan sonra tezimi tamamlamam konusunda beni motive eden sevgili eşim Çağdaş Otuzbiroğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Ayşe GÖKDAL

Mart-2018

14/03/2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Ayşe Gökdal

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARINA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
GİRİŞ.....	1

BİRİNCİ BÖLÜM

1. MAYALARIN FİZYOLOJİSİ VE KULLANIM ALANLARI.....	3
1.1. Mayaların Fizyolojisi.....	3
1.1.1. Çalışmada kullanılan maya türlerinin fizyolojisi ve kullanım alanları.....	5
1.2. Yağlı Mikroorganizmalar ve Önemi.....	7
1.2.1. Lipid üretim yolizi.....	9
1.2.2. Mayalar ile üretilen yağların özellikleri.....	11
1.2.3. Yağlı mayalar ile lipid üretimi.....	11
1.2.4. Lipid üretimine etki eden faktörler.....	12
1.3. Yağlı Mayalar İle Lipid Üretiminde Atık Materyallerin Kullanımı.....	13
1.3.1. Atık gül posasının karbon kaynağı olarak kullanılması.....	15
1.4. Biyodizel ve Önemi.....	15
1.4.1. Mayaların biyodizel üretiminde kullanılması.....	17

İKİNCİ BÖLÜM

2. MATERYAL VE METODLAR.....	18
------------------------------	----

2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Çalışmada kullanılan mayalar.....	18
2.1.2. Çalışmada kullanılan atık.....	18
2.1.3. Besiyerleri.....	18
2.1.3.1. Yeast extract peptone dextrose agar (YPD Agar).....	18
2.1.3.2. İnokülant besiyeri.....	18
2.1.3.3. Üretim besiyeri (%1'lik H₂SO₄'lü).....	19
2.1.3.4. Üretim besiyeri (distile sulu).....	19
2.1.4. Çalışmada kullanılan boyalar ve çözeltiler.....	19
2.1.4.1. Sudan black B.....	19
2.1.4.2. Lugol çözeltisi.....	19
2.1.4.3. Lizis buffer çözeltisi.....	20
2.1.4.4. 400 µL Digestion solution.....	20
2.1.4.5. PCR mix (100x).....	20
2.1.4.6. HCl (4M).....	20
2.1.4.7. H₂SO₄ (%1).....	21
2.1.4.8. Dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi (1 L).....	21
2.1.4.9. 4,8 buffer.....	21
2.1.4.10. BF3 çözeltisi.....	21
2.2. Metodlar.....	22
2.2.1. Araştırmada kullanılan izolatların aktive edilmesi.....	22
2.2.2. Kullanılacak atık gül posasının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	22
2.2.2.1. Nem tayini.....	22
2.2.2.2. Lignin tayini.....	22
2.2.2.3. Ham kül tayini.....	23
2.2.2.4. Yağ ekstraksiyonu (Soxhlet yöntemi).....	24
2.2.2.5. Azot tayini.....	24
2.2.3. Atık gül posası içeren ortamda maya izolatlarının gelişme durumunun belirlenmesi.....	24
2.2.4. Atık gül posası içeren ortamda maya izolatlarının lipid üretiminin belirlenmesi.....	25

2.2.5. Yağ üretme özelliğine sahip maya izolatlarının moleküler teknikle tanımlanması.....	25
2.2.6. Atık gül posası içeren besiyerinde geliştirilen mayaların lipid miktarı ve lipid veriminin belirlenmesi.....	27
2.2.6.1. Maya kuru hücre ağırlığının belirlenmesi.....	27
2.2.6.2. Lipid ekstraksiyonu ve lipid kuru ağırlığının belirlenmesi.....	28
2.2.6.3. Yüzde lipid veriminin hesaplanması.....	29
2.2.7. Seçilen maya izolatları ile lipid üretimi.....	29
2.2.7.1. Asitli ve sulu atık gül posası ön işlem sıvılı besiyerinde geliştirilen mayaların lipid ekstraksiyonu.....	30
2.2.8. Gül posası miktarının lipid üretimine etkisi.....	31
2.2.9. pH'nın maya gelişimi üzerine etkisi.....	31
2.2.10. Farklı azot kaynakları içeren besiyerlerinde mayaların geliştirilmesi.....	32
2.2.11. İndirgen şekerin hesaplanması.....	33
2.2.12. Atık gül posasında lipid üretim parametrelerinin optimizasyonu.....	35
2.2.13. Optimize edilen koşullarda lipid üretimi.....	37
2.2.14. Üretilen lipidlerin yağ analizleri.....	37

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

2. BULGULAR VE YORUM.....	39
3.1. Mayaların Lipid Üretimi Açısından Mikroskobik Olarak Taranması.....	39
3.2. Yağ Üretme Özelliğine Sahip Maya İzolatlarının Moleküler Tekniklerle Tanımlanması.....	41
3.3. Atık Gül Posasının Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	43
3.4. Mayaların Kullandığı İndirgen Şeker Miktarı.....	43
3.4.1. Asit ön işlemlili besiyerinde indirgen şeker miktarı.....	44
3.4.2. Su ön işlemlili besiyerinde indirgen şeker miktarı.....	44
3.5. Atık Gül Posası İçeren Besiyerinde Geliştirilen Mayaların Lipid Miktarının Belirlenmesi.....	45

3.6. Farklı Ön İşlemlerin Lipid Miktarına Etkisi.....	46
3.7. Ön İşlem Sıvısındaki Atık Gül Posası Miktarının Lipid Miktarına Etkisi.....	47
3.8. Mayaların Geliştiği Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	49
3.9. Farklı Azot Kaynakları İçeren Besiyerlerinde Mayaların Geliştirilmesi.....	51
3.10. Farklı Azot Kaynaklarında Geliştirilen Mayaların Lipid Boyamalarının Yapılması.....	52
3.11. Atık Gül Posası Kullanılarak Lipid Üretimi Parametrelerinin Optimizasyonu.....	53
3.12. Optimize Edilen Koşullarda Lipid Üretimi.....	78
3.13. Lipid üreten 6 maya örneğinin yağ analizlerinin yapılması.....	79
SONUÇ.....	81
KAYNAKÇA.....	91
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Türkiye’deki 10 yıllık gül çiçeği üretimi.....	1
Tablo 1.2. Gül posası kimyasal analiz sonuçları.....	14
Tablo 1.3. Biyodizelin fiziksel özellikleri.....	16
Tablo 2.1. Lipid üretiminde incelenen parametreler ve seviyeler.....	36
Tablo 2.2. Lipid üretiminde bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonları.....	36
Tablo 3.1. Tanımlaması yapılan maya örnekleri ve türleri.....	43
Tablo 3.2. Gül posasının bazı özellikleri.....	43
Tablo 3.3. Asit ön işlemlili besiyerinde maya izolatları geliştirildikten sonra ortamda kalan indirgen şeker miktarları.....	44
Tablo 3.4. Maya örneklerinin su ön işlemlili besiyerinde indirgen şeker miktarları.....	45
Tablo 3.5. Atık gül posasında mayaların biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid derişimi ve %lipid miktarı.....	45
Tablo 3.6. 10 gram atık gül posalı asitli ön işlem sıvısı ile hazırlanan besiyerinde elde edilen biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid derişimi ve %lipid miktarı.....	46
Tablo 3.7. 10 gram atık gül posalı sulu ön işlem sıvılı besiyeri ile hazırlanan üretim besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid derişimi ve %lipid miktarı.....	46
Tablo 3.8. 12 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan sulu ön işlem sıvılı üretim besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid derişimi ve %lipid miktarı.....	47
Tablo 3.9. 12 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan asitli ön işlem sıvılı besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid derişimi ve %lipid miktarı.....	48
Tablo 3.10. 15 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan sulu ön işlem sıvılı üretim besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid derişimi ve %lipid miktarı.....	48
Tablo 3.11. 15 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan asitli ön işlem sıvılı besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid derişimi ve %lipid miktarı.....	49

Tablo 3.12. Sulu ve asitli ön işlem sıvısı ile hazırlanan üretim besiyerinde 24 ve 48 saat inkübe olan mayaların sayımları (kob/ml).....	50
Tablo 3.13. Farklı azot kaynaklarında maya gelişimleri (oluşan zon çapı mm).....	51
Tablo 3.14. Maksimum lipid eldesi için çalışılması gereken koşullar.....	53
Tablo 3.15. <i>W. subpelliculosus</i> -6 için Box Behnken deney tasarımı sonuçları.....	54
Tablo 3.16. <i>W. subpelliculosus</i> -6'dan üretilen lipid yüzésinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi.....	55
Tablo 3.17. <i>W. subpelliculosus</i> -6 için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi.....	56
Tablo 3.18. <i>C. albicans</i> -7'den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları.....	58
Tablo 3.19. <i>C. albicans</i> -7'den üretilen lipid yüzésinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi.....	59
Tablo 3.20. <i>C. albicans</i> -7 için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi.....	60
Tablo 3.21. <i>Y. lipolytica</i> -18'den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları.....	62
Tablo 3.22. <i>Y. lipolytica</i> -18'den üretilen lipid yüzésinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi.....	63
Tablo 3.23. <i>Y. lipolytica</i> -18 için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi.....	64
Tablo 3.24. <i>Y. lipolytica</i> -48'den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları.....	66
Tablo 3.25. <i>Y. lipolytica</i> -48'den üretilen lipid yüzésinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi.....	67
Tablo 3.26. <i>Y. lipolytica</i> -48 için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi.....	68
Tablo 3.27. <i>P. anomola</i> -141'den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları.....	70
Tablo 3.28. <i>P. anomola</i> -141'den üretilen lipid yüzésinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi.....	71
Tablo 3.29. <i>P. anomola</i> -141 için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi.....	72
Tablo 3.30. <i>K. marxianus</i> -155'den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları.....	74

Tablo 3.31. <i>K. marxianus</i> -155'den üretilen lipid yüzünün Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi.....	75
Tablo 3.32. <i>K. marxianus</i> -155 için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi.....	76
Tablo 3.33. Maya izolatları için maksimize edilen sonuçlarda lipid ekstraksiyon sonuçları.....	78
Tablo 3.34. Maya izolatlarının içerdiği % yağ asidi miktarları.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kesikli kültürde üretilen yağlı maya ve küllerdeki lipid birikimi.....	9
Şekil 1.2. Yağlı mayaların lipid sentezinin metabolik yolu.....	10
Şekil 2.1. Maya izolatları ile lipid üretim basamakları.....	30
Şekil 2.2. Glikoz-absorbans kalibrasyonu doğrusu.....	34
Şekil 3.1. <i>W. subpelliculosus</i> -6 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları.....	57
Şekil 3.2. <i>C. albicans</i> -7 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları.....	61
Şekil 3.3. <i>Y. lipolytica</i> -18 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları.....	65
Şekil 3.4. <i>Y. lipolytica</i> -48 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları.....	69
Şekil 3.5. <i>P. anomola</i> -141 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları.....	73
Şekil 3.6. <i>K. marxianus</i> -155 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları.....	77

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Lipid ekstraksiyonu sonucunda ependorflarda kalan alkolü uçmuş lipidli kısım.....	28
Görsel 3.1. <i>Wickerhamomyces subpeliculosa</i> -6 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x).....	39
Görsel 3.2. <i>Candida albicans</i> -7 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x).....	39
Görsel 3.3. <i>Yarrowia lipolytica</i> -18 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x).....	40
Görsel 3.4. <i>Yarrowia lipolytica</i> -48 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x).....	40
Görsel 3.5. <i>Pichia anomola</i> -141 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x).....	40
Görsel 3.6. <i>Kluyveromyces marxianus</i> -155 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x).....	41
Görsel 3.7. Maya izolatlarının elektroforez sonrasındaki jel görüntüleri (100V, 30 dk) (sırasıyla: 6, 7, 9, 18, 21, 24, 26, 34, 48, 73, 74 ve 89 numaralı mayalar).....	42
Görsel 3.8. Maya izolatlarının elektroforez sonrasındaki jel görüntüleri (100V, 30 dk) (sırasıyla 93, 141, 152 ve 155 numaralı mayalar).....	42
Görsel 3.9. Atık gül posası, amonyum klorür, tripton ve pepton azot kaynaklarını içeren besiyerlerinde maya gelişmesi.....	52
Görsel 3.10. Sodyum nitrat, et ekstraktı, amonyum sülfat ve maya ekstraktı azot kaynaklarını içeren besiyerlerinde maya gelişmesi.....	52
Görsel 3.11. <i>C. albicans</i> -7'nin farklı parametrelerde oluşturduğu lipidli kısım (en alt şeffaf tabaka).....	58
Görsel 3.12. <i>C. albicans</i> -7'nin farklı parametrelerdeki lipidli kısmı içeren alt fazının pastör pipeti ile ayrı bir falkona alınmış hali.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Celsius
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
bp	: Base pair (baz çifti)
C	: Karbon
dk	: Dakika
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribo Nükleik Asit)
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamin tetraasetik asit)
ELİSA	: Enzyme linked Immuno Sorbent Assay
g/L	: Gram/litre
g	: Gram
GC-MS	: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
M	: Molarite
mL	: Mililitre
N	: Normal
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Power of Hydrogen
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribosomal Deoxyribonucleic acid (Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit)
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
rRNA	: Ribosomal Ribonucleic Acid (Ribo Nükleik Asit)
sn	: Saniye
UV	: Ultraviyole
SCOs	: Single cell oils (Tek hücre yağları)
TAE	: Tris-acetate-EDTA (Tris asetik asit EDTA)
TAGs	: Triacylglycerol
YPD	: Yeast Peptone Dextrose (Maya özütü peptonlu dekstroz)

GİRİŞ

Mikrobiyolojik canlılar, yapısal ve fonksiyonel görevlerini yerine getirebilmek için lipid sentezlemek zorundadır. Yüksek lipid içeriğine sahip mikroorganizmalarda biriktirilen lipid daima triaçilgliserol formundadır (Ertuğrul, 2010). Fakat az sayıda mikroorganizma lipidleri depo maddesi olarak biriktirebilmektedir. Bu nedenle lipid biriktirme özelliği sadece bazı maya, fungus ve mikroalglerde görülmektedir. Bu özelliği taşıyan mikroorganizmalara da ‘yağlı mikroorganizmalar’ denmektedir (Ertuğrul, 2010).

Bakteriler genellikle triaçilgliserol (TAGs) üretmezler bunun yerine polibetahidroksi bütirat ve alkanolat depo ederler. Bu yüzden yağ biriktirme özelliği sadece bazı maya, fungus ve alglerde görülmektedir. Mayaların ürettiği mikrobiyal yağlar bitkisel yağlara göre pek çok avantajlara sahiptirler. Bunlardan bir tanesi kısa yaşam döngüsüne sahip olmaları nedeni ile lipid eldesinin kolay sağlanmasıdır. Aynı zamanda yağlı mayalar, tarım ve endüstriden gelen besleyici atıklar gibi pek çok değersiz materyali de kapsayan oldukça çeşitli substratlar üzerinde iyi gelişebilmektedirler. Bu da ürettikleri yağların maliyetini düşürmektedir (Zhu vd., 2008).

Dünya çapında tarımsal üretimin artması sonucunda hem bitkisel hem de endüstri atıklarının miktarı yıldan yıla artış göstermektedir (Çıtak vd., 2006). Ülkemizde atık olarak çıkan ve geri dönüşümü yapılmayan atık materyaller düşünüldüğünde, Isparta’da ki fabrikalarda gül suyu ve gül yağının üretilmesi sonucu oluşan tonlarca atık posanın enerji üretimi amacıyla kullanımı söz konusu değildir. “Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü” tarafından hazırlanan 2016 yılı gülçiçeği raporuna göre Türkiye’de ki 2008-2016 yılları arasındaki gül çiçeği üretimi Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Türkiye’deki gül çiçeği üretimi (Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü 2016 yılı gülçiçeği raporu, 2017)

Yıllar	Gül çiçeği üretimi (Ton)	Yıllar	Gül çiçeği üretimi (Ton)
2009	6.500	2013	6.700
2010	6.000	2014	6.750
2011	6.000	2015	6.750
2012	6.500	2016*	7.250

*2016 verileri tahminidir.

Gül çiçeklerinin işlenmesi sonucunda yüksek miktarlarda atık gül posası ortaya çıkmaktadır. Verilere göre, bir sezonluk süreçte 27500 ton atık posa ortaya çıkmakta ve atık olarak çıkan gül posaları 3 şekilde değerlendirilmektedir; İlki, iyi yanma özelliğine sahip olduğundan köylerde sobalara atılarak ısınma amaçlı, ikincisi, posanın anaerobik şartlarda arıtılması sonucu biyogaz üretme amaçlı ve üçüncüsü ise gül posasının doğrudan ya da zenginleştirilmiş formunun tarım alanlarında gübre olarak kullanılması sözkonusudur (Erdal ve Aydemir, 2003). Uluslararası literatürlerde de gül posasının yalnızca yün ipliklerine renk verme amacıyla yararlanıldığı saptanmıştır. Tüm literatür taramaların sonucunda ülkemizde yüksek oranlarda ve sürekli gül üretimi olduğu, ancak üretim sonucu açığa çıkan gül posalarının enerji amacıyla kullanımının olmadığı görülmüştür.

Gül yağı ve gül suyu çıkarıldıktan sonra artan posa çevreye bırakılmakta ve bu atık yığınları kötü bir kokuya neden olmaktadır. Ayrıca bu atık ekonomik olarak değerlendirilememektedir. Bu nedenle bu çalışmada, yüksek miktarda ortaya çıkan gül posasının hem çevre kirliliğine sebep olmaktan çıkması hemde ülke ekonomisine ucuz ve çevreci bir yakıt olan biyodizel üretime bir katkı sağlaması amacıyla karbon kaynağı olarak atık gül posası içeren besiyerlerinde mayalar yardımıyla mikrobiyal yağ üretilmesi amaçlanmıştır.

1. MAYALARIN FİZYOLOJİSİ VE KULLANIM ALANLARI

1.1. Mayaların Fizyolojisi

Mayalar, tek hücreli fungi olarak tanımlanan, misel oluşturabiliyor olsalar da tek hücreli olmaları nedeniyle küflerden, hücrelerinin daha büyük, oval, eliptik, uzun veya yuvarlak hücre şekilleri ve tomurcuklanarak üremeleri nedeniyle bakterilerden ayrılmaktadırlar. Boyutları, türlere ve kültür koşullarına bağlı olarak 2-50 µm arasında değişmektedir. Mayaların hücre duvarı, hücrelerin plazma membranını dıştan saran bir örtü olup hücre kuru ağırlığının % 15-30'unu oluşturmaktadır (Howell ve Hazen, 2011). Hücre duvarlarının büyük çoğunluğunu glukun ve mannan gibi polisakkaritler oluştururken küçük bir yüzdesini ise kitin oluşturmaktadır. Hücre duvarının diğer komponentleri proteinler, lipidler ve inorganik fosfatlardır.

Mayalar, birbirlerinden eşeyli üreme biçimleri, yapıları, yaşam döngüleri ve bazı fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Mayalarda eşeysiz (vejetatif) ve eşeyli olmak üzere iki farklı şekilde üreme görülmektedir. Tomurcuklanma mayalarda görülen en yaygın vejetatif üreme şeklidir.

Eşeyli üremesi saptanmayan fungusların tümü *Deuteromycota (Fungi imperfecti)* sınıfında incelenirken, eşeyli üremeleri saptanan mayalar ise *Ascomycota* ve *Basidiomycota* sınıflarında incelenmektedir (Dixon ve Fromtling, 1995).

Karasal ve sucul ortamlar ile havadan izole edilebilen mayaların en yaygın habitatları bitkilerdir. Mayalar kemoherotrof oldukları için organik bileşikleri enerji kaynağı olarak kullanabilirler dolayısıyla güneş ışığına ihtiyaç duymazlar. Karbon kaynağı olarak glukoz ve fruktoz gibi heksoz şekerleri kullanırlar. Bazı maya türleri riboz, alkol ve organik asit gibi pentoz şekerlerini metabolize edebilirler (Huang ve Tang, 2007). Hareketsiz olan mayalar taşınım için aerosollere, hayvansal vektörlere ve insan aktivitesine gereksinim duymaktadırlar. Doğal habitatları dışında mayalar insan yapımı çevrelerde, örneğin laboratuvar ortamlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Mayalar besinsel çevreleri ile dinamik etkileşim halindedir. Birçok maya polimorfik olarak kabul edilmektedir ve ortamdaki besinlerden faydalanabilmek için şekil değişikliği yaparak filament oluşturabilmektedirler (Walker, 1998).

Mayalar genellikle 20-30°C'de gelişmektedirler. Psikrofil mayalar 12-15°C'de gelişirken termofilik *Kluyveromyces marxianus* türleri 52°C'de gelişmektedir. Maksimum gelişme sıcaklıkları sadece türe bağlı olmayıp karbon kaynağı, oksijeni

kullanım kapasitesi, su potansiyeli ve etanol varlığı gibi gelişme şartlarına da bağlıdır (Gençer, 2012).

Mayaların gelişimi için pH büyük önem taşımaktadır ve mayaların birçoğu pH 4.5-6.5 arasında iyi gelişmektedir. Çevre pH'sı, mayaların ısı toleransı ve kimyasal bileşenlere karşı dayanıklılıkları gibi diğer fizyolojik davranışlarını önemli ölçüde etkilemektedir (Pitt ve Hocking, 2009).

Mayalar, çeşitli tipte lipidleri içermektedir. Örneğin triaçilgliserol, diaçilgliserol, monoaçilgliserol, yağ asitleri, steroller, gliserofosfolipid, kardiyolipin, sfingolipid, stearil esterler, glikolipid bunlardan bazılarıdır. Ayrıca mayalar, plazma membranlarındaki 4 farklı çeşit lipidden ayırt edilebilirler; gliserofosfolipid, sfingolipid, stearil ester ve mono ve diaçilgliserol (Sitepu vd., 2014).

Mayaların kullanım olanlarına bakılacak olursa, mayalar tarih öncesi zamanlardan beri ekmek ve şarap yapımında kullanılmaktadır ancak yüksek miktarlarda geliştirilip kullanılmaları 19.yy'da başlamıştır. Özellikle *Saccharomyces cerevisiae*, bira, ekmek, şarap ve pekçok ürünün üretiminde kullanılan ilk evcilleştirilmiş organizmadır (Sitepu vd., 2014). Mayalar günümüzde, yüksek oranlarda endüstriyel fermentasyon işlemlerinde, gıda ürünlerinde vitamin kaynağı olarak ve çeşitli antibiyotik ve steroid hormonlarının üretimlerinde kullanılmaktadırlar (Huang ve Tang, 2007). Son yıllarda mikrobiyal lipidlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda mayalar araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Çünkü mayaların ürettiği mikrobiyal yağlar bitkisel yağlara göre pek çok avantajlara sahiptirler. Bunlardan en önemlileri, büyüme hızları ve genetik manipulasyonları nedeniyle avantajlı mikroorganizmalar olmalarıdır. Mikrobiyal yağların biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımlarının önemi son dönemde daha çok önem kazanmıştır. Aynı zamanda mayaların yüksek metabolik aktivite gösterme özellikleri nedeniyle fermantasyona öncülük ederler. Bu karakteristik özelliklerinden dolayı kimya, gıda ve eczacılık endüstrilerindeki geleneksel kullanımlarının dışında biyoteknoloji alanında da kullanımlarının önemi giderek artmaktadır. Aynı zamanda mayaların endüstriyel atık ve atık sularının iyileştirilmesinde kullanımları ise ticari önemlerini göstermektedir (Nguyen vd., 1973).

1.1.1. Çalışmada kullanılan maya türlerinin fizyolojisi ve kullanım alanları

Candida albicans; *Deuteromyces* sınıfı içerisinde yer almakta ve insalarda patojen veya kommensal olarak bulunabilmektedir. Genellikle dairesel veya oval formlarda olup farklı çevresel koşullarda farklı morfolojik formlarda olabilmektedir. Hücre duvarı %80-90 oranında karbonhidratlardan oluşmaktadır. Proteinler %6-25, lipidler %1-7 ve kitin %8.5-9 oranındadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). Gelişim gösterdiği pH aralığı 3-8 aralığıdır.

Vejetatif ve tomurcuklanarak üremektedirler. Tomurcuklanma ile ürediklerinde tomurcuklar birbirinden ayrılmadan uzayıp aralarında boğum bulunduran ve pseudohif adı verilen hücre zincirlerini oluşturabilmektedir. Ayrıca oluşturabildikleri çimlenme borusu (germ tüp), *C. albicans*'ın tanımlanmasında kullanılan önemli kriterlerden birtanesidir (Gençer, 2012). *C. albicans*'ın hücre yapısının en dışında bulunan hücre duvarı konak ile ilişkide önemli bir rol oynamaktadır. Patojenlik ve virulans ile ilgili biyolojik fonksiyonların bir çoğu hücre duvarlarında yerleşiktir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). Biyoyileştirme alanında kullanımları mevcuttur. Ticari amaçlar amacıyla lipaz üretimi yapılabilmektedir.

Yarrowia lipolytica; *Ascomycota* sınıfında yer almaktadır. Gelişim gösterdiği pH aralığı 3-8 ve sıcaklık ise 16-38°C dir (Huang ve Tang, 2007). Maya formundan hif formuna geçebilen, dikkat çekici dimorfik bir mayadır. Pseudohifsel farklılaşma göstermektedir.

Y. lipolytica'nın topraktan, tarımsal ve endüstriyel atıklardan, yağ ve protein içeren materyallerden izole edildiği bilinmektedir. Bu tür, proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olması nedeni ile peynirlerin olgunlaşmasında kullanılabilir (Kesentaş ve Akbulut, 2006). Büyüme koşullarına bağlı olarak hücre yapısı değişim gösterebilmektedir. Aerobik özellikte olup taşıdığı bazı fizyolojik özelliklere bağlı olarak biyoteknolojik açıdan önemli bir mayadır. Proteaz ve lipaz aktivitesine sahiptir ve hidrokarbonları kullanabilme yeteneğindedir.

Farklı karbon kaynaklarından sitrik asit, izositrik asit, α ketoglutarik asit ve pürivik asit gibi biyoteknolojik açıdan önemli karboksilik asitleri üretebildiği bilinmektedir (Barth ve Gaillardin, 1996). Aynı zamanda yağ üretme özelliği nedeniyle son dönemde önemi daha çok artmıştır.

Kluyveromyces marxianus; *Ascomycota* sınıfında yer almakta olup doğada yayılımı yüksek oranda olup izole edilmesi kolaydır. Enzim (β galaktosidaz, inulinaz, β glukosidaz vb.), tek hücre proteini ve etanol üretiminde kullanımı mevcut olup karışımlara aroma verme amacıyla da kullanılmaktadır. Gıda ürünlerindeki laktoz miktarını düşürme, peynir altı suyu üretiminde biyolojik amaçla kullanımı ve biyolojik iyileştirmelerde kullanımı mevcuttur (Fonseca vd., 2008). Fermente süt olarak bilinen kefirin üretiminde, kefir tanelerinin içinde bulunan mikroorganizmalar arasında da yer almaktadır (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003).

Saccharomyces cerevisiae; *Ascomycota* sınıfında yer almakta olup hücreleri 5-10 μ çapında olup yuvarlak ya da yumurta şeklindedir. Tomurcuklanak çoğalırlar. Eski çağlardan beri bira, şarap ve ekmek yapımında kullanıldıklarından dolayı önemli maya türlerinden biridir.

S. cerevisiae, kısa hayat döngüsü, haploid veya diploid olarak bulunabilmesi, transformasyonunun kolay olması, üreme ortamının ucuz ve basit olması, patojenik veya toksik bir etkisinin olmaması, endüstriyel bir mikroorganizma olması gibi nedenlerden dolayı ökaryotik moleküler genetik çalışmaları için uzun süredir iyi bir model sistem olarak kullanılmaktadır. Model ökaryotik organizma olmasının nedeni genom dizisi tamamlanmış, genetik ve fiziksel özelliklerinin karakterize edilmiş olmasıdır (Gençer, 2012).

S. cerevisiae, oksijen yokluğunda enerji elde etmek için, karbonhidratları karbondioksit, etanol ya da laktik aside dönüştürebilir. Etanol üretimi için karbon kaynağı olarak sükroz, glukoz, ksiloz, laktoz ve selülozu, gliserol üretimi için ise glukoz ve fruktozu kullanabilmektedir.

Pichia kudriavzevii; *Saccharomyces* sınıfında yer almakta olup yuvarlak veya oval hücre yapısına sahiptir. meyvelerden, çay yaprağından ve doğadan izole edilmesi oldukça kolay bir maya türüdür. Fermentasyon özelliği azdır (Kurtzman ve Smiley, 1976).

Wickerhamomyces anomalus (sinonim : *Pichia anomala*; eski adıyla *Hansenula anomala*); bu maya türü endüstriyel bir mikroorganizma olup içecekler, yiyecekler, böcekler ve atıksular gibi birçok doğal ortamdan izole edilebilmekte ve aynı zamanda geniş bir metabolik ve fizyolojik çeşitliliğe sahiptir (Walker, 2010).

P. anomala, yüksek çevresel stres koşullarında (örneğin düşük veya yüksek pH, yüksek osmotik basınç, anaerobik koşullar vb.) gelişim gösterebilmektedir. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda biyokontrol ajanı olarak kullanılmakta olup aynı zamanda salgıladığı ölümcül toksin sayesinde antimikrobiyal ajan olma potansiyeline de sahiptir (Passoth vd., 2006).

Wickerhamomyces subpelliculosa (sinonim: *Hansenula subpelliculosa*); amyolitik özellik gösteren bir maya suşu olup amyolitik bir enzim olan glikoamilaz üretme özelliğine sahiptir (Kumar ve Satyanarayana, 2001). Yüksek osmotik yapıya sahip özellikle tuz veya yüksek şekerli gıdalardan izole edilemektedir. Yüksek osmotik basınca sahip gıda ürünlerinde gelişebildiğinden ürünün kalitesini düşürebilmektedir (Kurtzman vd., 2011).

1.2. Yağlı Mikroorganizmalar ve Önemi

Maya, küf, bakteri ve alg gibi mikroorganizmaların uygun koşullarda yağ üretme yetenekleri konusunda yapılan çalışmalar göstermiştir ki tüm canlıların yapısal ve fonksiyonel görevlerini yerine getirebilmek için belli miktarlarda lipid sentezlemek zorundadırlar (Ertuğrul, 2010). Ancak az sayıda mikroorganizma lipidleri depo maddesi olarak biriktirebilmektedir. Bu nedenle lipid biriktirme özelliği sadece bazı maya, fungus bakteri ve mikroalglerde görülen bir özelliktir (Meng vd., 2008). Yapılan çalışmalara göre 590 maya çeşidinden sadece 25 kadarının %20'den fazla lipid biriktirebilme yeteneğine, 60.000 tür küfün çok az bir kısmının %25'ten fazla lipid biriktirebilme yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir. Bu özelliği taşıyan mikroorganizmalara da 'yağlı mikroorganizmalar' denmektedir (Denli ve Tekin, 2000).

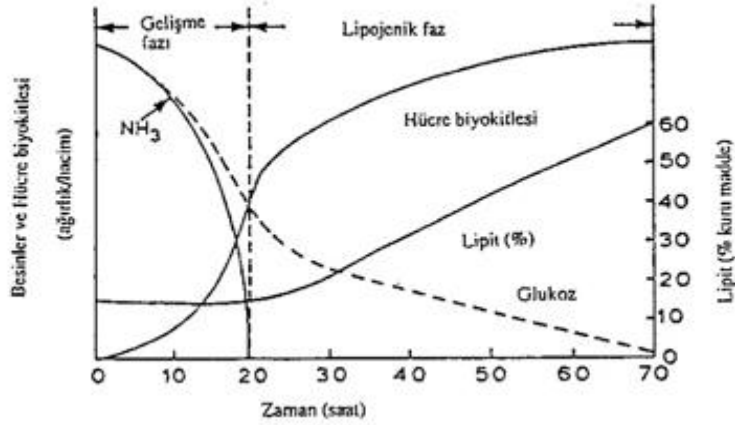
Yaşayan mikroorganizmalar yapısal lipid sentezlemek zorundadırlar ancak birkaç mikroorganizma lipid üretebilme özelliğine sahiptir ve kuru ağırlıklarının %20'sinden daha fazla lipid biriktirebilmektedirler (Donot vd., 2014). Yapılan çalışmalar sonucunda, kuru ağırlığının %20'sinden daha fazla yağ üretebilen 70'den fazla maya türü saptanmıştır. *Y. lipolytica*, *Lipomyces* türleri, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gaminis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* ve *Cryptococcus albidus* yağlı mayalar kategorisinde bulunan en önemli mayalar olarak sayılmaktadır (Sitepu vd., 2014).

Mikroorganizmaların lipid üretim kabiliyetlerini etkileyen ve sınırlayan bazı etkenler bulunmaktadır. Azot ve karbon oranları, gelişim ortamında ki primer besin elementleri ve bu elementlerin tükenmesi, inorganik tuzlar ve vitaminler mikroorganizmaların lipid üretimlerine etki eden faktörler arasındadır. Ortamda lipid birikimini arttırmak için azot miktarının azaltılması ve kullanılabilir karbon miktarının artırılması gerekmektedir. Azotun ortamda tükenmesi sonucunda hücrel gelişim sınırlanacak ve buna karşılık ortamda bulunan karbon, hücreler tarafından kullanılmaya başlanacaktır. Bunun sonucunda hücreler, alınan bu karbonu önce yağ asitlerine daha sonra da trigliseritlere sentezleyebileceklerdir (Denli ve Tekin, 2000).

Yağ üreten mikroorganizmalardan en büyük başarıyı mayalar sağlamaktadır (Liang ve Jiang, 2013). Yüksek lipid içeriğine sahip *Candida curvata* (%58), *C. albidus* (%65), *L. strakeyi* (%64), *R. glutinous* (%72) türleri yüksek yüzdelerde yağ oranlarına sahip olduklarından araştırmacılar tarafından çalışılma sebebidir (Forde ve ark. 2014). Ayrıca *Rhodosporidium*, *Lipomyces* ve *Cryptococcus* türleri kendi biyokütlelerinin %70'inden daha fazla hücre içi lipid (genellikle TAGs) biriktirebilme özelliğine sahiptirler (Dong vd., 2016).

Sitepu vd., (2014) yaptıkları çalışmayla hücre içi lipid biriktirme özelliğine sahip 12 yeni yağlı türü daha rapor etmişlerdir. Bunlar; *Kurtzmaniella cleridarum*, *Myxozyma melibiosi*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Rhodotorula colostri*, *Rhodosporidium babjevae*, *Rhodosporidium diobovatum*, *Rhodosporidium fluviale*, *Cryptococcus terreus*, *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus oierensis*, *Hannaella aff. zae*, *Tremella encephala*, *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus aff. taibaiensis*, *Trichosporon guehoae*, *Cryptococcus ramirezgomezianus*, *Prototheca aff. zopfii*.

Aşağıdaki Şekil 1.1'de kesikli kültürde gelişen yağlı maya veya küflerde lipid birikimini göstermektedir ve incelendiğinde mikrobiyal lipid üretiminin iki aşamalı bir işlem olduğu söylenebilir.

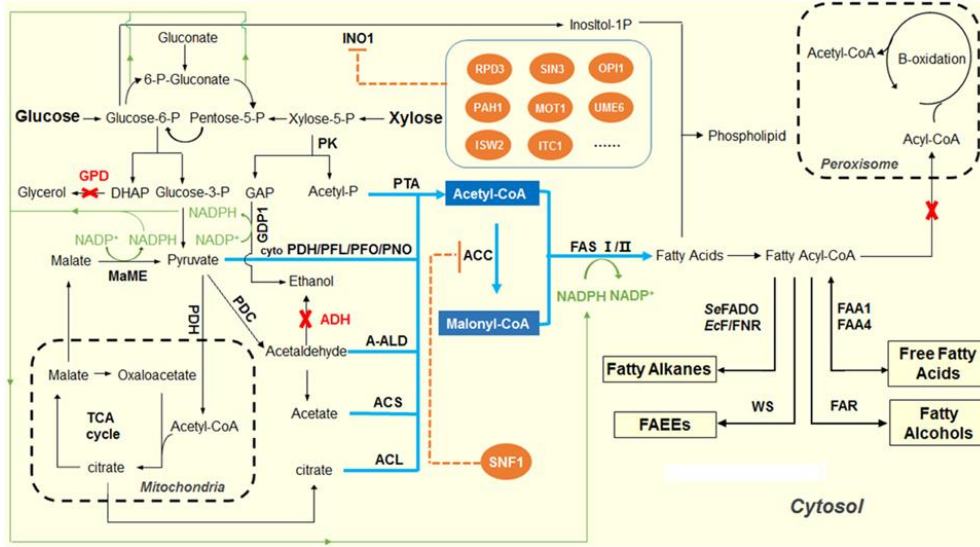


Şekil 1.1. Kesikli kültürde üretilen yağlı maya ve küflerdeki lipid birikimi (Denli ve Tekin, 2000)

Birinci aşamada, hücrelerin gelişimi için gerekli bütün besin elementleri bulunduğu için dengeli bir gelişim vardır. Ancak ortamda azot kaynağı tükendiği zaman birinci aşama sona ererek yağ üretim aşaması başlamaktadır. Bu aşama ise ortamda bulunan karbon kaynağı tükeninceye kadar ya da yağ üretimi için gerekli diğer besin elementleri hücreler tarafından tamamen kullanıncaya kadar devam etmektedir. Eğer bu besin elementleri ortama tekrar ilave edilirse yağ üretim aşaması yeniden başlar ve bu şekilde biyokütleden yüksek yağ verimi elde edilebilir (Denli ve Tekin, 2000).

1.2.1. Lipid üretim yolizi

Merkez karbon metabolizmasından trioz fosfatın sifonlanarak uzaklaştırılması sonucunda okso fonksiyonel grubun azalması ve asilasyon ile yağ asitlerinin fosfatidik asidi aktifleştirmesi ile lipid biyogenezi başlamaktadır. Fosfatidik asit çeşitli membran lipidlerinin (örneğin TAGs) lipid biyogenezi için başlangıç noktasıdır. TAGs biyosentezi için gerekli olan metabolik girdi ya karbon ve enerji fazlalığı ya da var olan kaynakların dönüşümüdür. Fizyolojik değişiklikler, stres koşulları (örneğin ışık, pH, sıcaklık, ortamdaki besin maddeler vb.) membran lipidlerinin TAGs dönüşümünde etkili olan faktörlerdir (Levering vd., 2015). Lipid sentezi Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Yağlı mayaların lipid sentezinin metabolik yolu (Sheng vd., 2015)

Yağ asidi sentezi asetil-CoA ve malonil-CoA ile başlamakta olup yağ asidi sentezi için gerekli olan asetil-CoA'lar mitokondri ve sitoplazmada oluşmaktadır. Piruvat dehidrogenaz kompleksi (PDH) mitokondride, piruvat dekarboksilaz (PCD) sitoplazmada asetil-CoA üretimi için kullanılmaktadır (Sheng vd.,2015). Malonil-CoA'dan asetil-CoA sentezlenmesi sonucunda zincir uzaması gerçekleşmektedir ve yağ asitleri oluşmaktadır. Dış mitokondriyal membranda bulunan yağlı açil CoA sentetaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonla aktiflenerek bir dizi tepkimeler sonucunda yağ açil CoA oluşmaktadır (Qin vd., 2017).

Sitoplazmada oluşan pirüvatın mitokondri matriksine taşınması sonucunda pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksi tarafından oksidatif dekarboksilasyon işlemi sonucunda asetil-CoA oluşmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonu mitokondride olduğundan son ürün aynı zamanda asetil-CoA'dır. Ardından Krebs döngüsü (TCA döngüsü) başlamakta ve asetil-CoA ve matrikste bulunan oksaloasetat birleşerek sitrat oluşmaktadır. (Qin vd., 2017). Sonuç olarak yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan asetil-CoA başka yağ asitlerinin sentezinde kullanılmaktadır.

1.2.2. Mayalar ile üretilen yağların özellikleri

Biyodizel üretimi, elektrik enerjisi ya da ısınma enerjisi için kullanılan materyallerden soya, kolza ve palmiye yağının üretiminin yavaş olması ve talep edilme oranlarının her geçen gün artması dolayısıyla mikroorganizmaların ürettikleri yağlara olan ilgi giderek artmaktadır. Yağlı mikroorganizmaların yağ asitleri üretebiliyor olmaları ve yağ asiti türevlerinin gıda, kimya ve enerji endüstrisi için büyük öneme sahip olması nedeniyle mikroorganizmaların ürettikleri tek hücre yağları (Single cell oils: SCO₂) önem taşımaktadır (Donot vd., 2014).

Canlı organizmalardan üretilen lipidler 3 ana gruba ayrılmaktadır, bunlar; fosfolipidler, glikolipidler (membran yapı lipidleri) ve trigliseridler (enerji kaynağı lipidler, TAGs).

Yağ üreten mikroorganizmalar, kendi kuru kütlelerinin %70'inden daha fazla TAGs biriktirebilirler. TAGs, bitkisel yağların temel bileşenidir. Gliserol triesterler ve polar olmayan yağlı asitlerle su içerisinde çözünmeyen yapı göstermektedirler Ayrıca karbon ve enerji depolama bileşenleri olmaları dolayısıyla mekanik ve kimyasal aşamaların sonucunda yağlı tohumlardan ekstrakte edilebilirler. Enerji sektörünün TAGs için olan ilgisi, hidrofobik yağların mayalar, küfler, mikro agler ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından üretilebiliyor olmasından kaynaklanmaktadır (Donot vd., 2014). Ayrıca mayalardan elde edilen mikrobiyal lipidlerin yaklaşık %80-90'ını TAGs'dır (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Yağlı mayalar, yapı lipidlerinin %90'ı kadar TAGs biriktirebilmektedirler. Bu biriktirilen TAGs, %44 oranında doymamış yağ asitlerinden oluşurken geri kalan nötral lipidleri ise serbest yağ asitleri, monogliseridler, digliseridler, sterol-esterler ve polar parçacıklar oluşturmaktadır (Bonturi ve ark, 2015). Yağ depolayan mayalardaki ana yağ asitleri ise miristik (C14:0), palmitik (C16:0), steroik (C18:0), oleik (C18:1), palmitoleik (C16:1) ve linoleik (C18:2) asitlerdir (Uemura, 2012).

1.2.3. Yağlı mayalar ile lipid üretimi

Mayalarda lipid üretimi, de novo lipid sentezi ve ex novo lipid birikimi olmak üzere iki yolla olabilmektedir. Bu iki yol arasındaki fark; de novo hidrofilik substratlardan, ex novo hidrofobik substratları içeren farklı biyokimyasal yollardır. Ayrıca yağlı mayalar kullanılarak de novo yoluyla üretilebilen lipidler ekonomik olarak

büyük potansiyele sahip olup uygulanabilir yöntemlerdir. Buna karşılık ex novo yoluyla lipid üretimi ise yemek ve tıbbi endüstri için katma değeri yüksek bir yoldur (Uemura, 2012). Maya hücrelerinin içindeki yağ birikimi, organizmanın gelişmek için gerekli olan bir besin maddesi tükendiğinde ve ortamda kullanılabilir karbon bulunduğunda gerçekleşmektedir.

1.2.4. Lipid üretimine etki eden faktörler

De novo ve ex novo lipid sentezinde fermantasyon ortamının içeriği oldukça büyük önem taşımaktadır. Yağ üretebilme özelliğine sahip mikroorganizmalar karbon kaynağı olarak fruktoz, glukoz, maltoz, ksiloz, ham gliserol vb. birçok substratı kullanabilirken karbon-azot oranının (C:N) zengin biyokütleler oluşturulmasında önemi büyüktür. Azot kaynağı olarak mikroorganizmalar yeast ekstrakt, amonyum sülfat, malt ekstrakt, pepton, nitrat vb. kullanabilmektedirler. Ayrıca fosfat, sülfat, magnezyum, demir gibi metal iyonlarının da lipid üretimini artırıcı yönde etki sağladığı saptanmıştır (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Lipid sentezinde fiziksel faktörler de lipid üretimine etki etmekte olup kültür koşulları ile ekstraksiyon yönteminin çalışılan mikroorganizmaya göre seçilmesi gerekmektedir. Donot vd., (2014), yaptıkları çalışmada lipid üretimine etki eden faktörleri tespit edebilmek için çoklu değişkenler kullanmış olup kesikli, durağan, beslemeli kesikli gibi kültür koşulları da deney planlarına dahil etmişlerdir. Lipid ekstaksiyonu aşaması ise çözgen karışımların kullanılarak lipid ile protein arasındaki hidrojen bağları ve iyonik güçleri koparacak alkoller içerir. Yapılan çalışmalar sonucunda kloroform/metanol (2:1) yönteminin en uygun yöntem olduğu saptanmıştır (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Çalışılan mikroorganizmaya göre sıcaklığın belirlenmesi lipid üretime etki eden önemli faktörlerden biri olup mikroorganizmanın çevre koşullarına adapte olmasını membran lipid kompozisyonu sağlamaktadır. Mikroorganizmanın sıcaklığa adapte olmaması durumunda membran lipid yağ asidinin doymamışlık derecesi artmaktadır (Darcan ve Sarıgül, 2015). Bunun sonucunda lipid üretimi azalmaktadır.

Mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri ve ürün oluşturmaları için besiyeri pH'sının optimal sınırlar içinde olması gerekmektedir. pH limitlerinin maksimum veya minimum sınırlarda olması durumunda üreme azalmakta ve hatta

durmaktadır (Çiçek ve Yalçın, 2013). Dolayısıyla optimizasyon çalışmalarıyla, çalışılan mikroorganizmanın maksimum üreme ve ürün oluşturma pH limitinin belirlenmesi elde edilen verimi arttırıcı yönde etki etmektedir.

Lipid üretimine kullanılan karbon kaynağı ile azot kaynağının da üretim kapasitine etkisi mevcuttur. Çiçek ve Yalçın, (2013), bir fungi türü ile yaptıkları çalışmada en yüksek lipid üretimini glukoz varlığında en düşük lipid üretimini ise mannitol varlığında gözlemlemişlerdir. Karbon kaynağı olarak dekstroz, glukoz, maltoz, laktoz vb. ve azot kaynağı olarak glisin, pepton, amonyum nitrat vb. kullanılması oldukça yaygınken son dönemde yapılan çalışmalar göstermiştir ki, çevresel atık materyaller karbon ya da azot kaynağı olarak kullanıldığında da mikroorganizmalar gelişimlerini devam ettirebilmektedir.

Lipid üretimine etki eden diğer parametreler ise; oksijen varlığı, havalandırma, yağ asidi üretimini arttırıcı maddelerin ilave edilmesi, inkübasyon süresi, organizmanın yaşı, organizmanın gelişme hızı gibi faktörlerdir (Darcan ve Sarıgül, 2015).

Lipid ekstaksiyon aşamalarında kuru ve ıslak biyokütle kullanılabilir. Biyokütle ıslak biyokütle (melas, nişastalılar, meyve sanayi atıkları vb.) ve kuru biyokütle (odun, zirai atıklar vb.) olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Üçgül ve Akgül, 2010). Son dönemde yapılan lipid ekstaksiyon çalışmalarda kuru biyokütle kullanımı oldukça yaygın olmakla birlikte ıslak biyokütle ile yapılan çalışmalar maliyetli kurutma aşamalarının atlanması dolayısıyla ticarileşmeye yakındır (Dong vd., 2016).

1.3. Yağlı Mayalar ile Lipid Üretiminde Atık Materyallerin Kullanımı

Biyoyakıtlar kısa süre önce yaşamış organizmalar ya da onların metabolik çıktılarından elde edilen alternatif enerji kaynaklarıdır ve biyodizel, biyogaz ve biyoetanolu de kapsamaktadır. Biyoyakıtların üretilen en yaygın formu etil alkoldür (etanol). Temelde bitkisel şekerlerin mayalanması ile elde edilebilen ve oldukça eski bir prosesdir. Tahılların şeker oranı yüksek tohumları şeker, nişasta veya selüloz içerikli bitkilerden elde edilebilmektedir (Forde vd., 2014).

Biyokütle biyolojik kökenli fosil olmayan organik madde kitlesi olarak tanımlanabilmektedir. Başka bir deyişle, petrol ve kömür gibi güneş enerjisinin depolanmış halidir. Biyoyakıtların içerisindeki karbon, bitkilerin havadaki

karbondioksidi parçalaması sonucu elde edildiği için biyoyakıtların yakılması dünya atmosferinde net karbondioksit arttırımına neden olmaz. Bu nedenle pek çok ülke atmosferdeki karbondioksit miktarının artmasına engel olabilmek için fosil yakıtlar yerine biyoyakıtların kullanımını arttırmıştır (Acaroğlu, 2008).

Dünya çapında petrol kaynaklarının hızla tükenmesi ve fiyatlardaki artış ile birlikte biyodizel, gelecek vaat eden bir biyoyakıt konumuna gelmiştir (Liang ve Jiang, 2013). Biyodizel, kolza (kanola), ayçiçek, soya, aspir gibi yağlı tohum bitkilerinden elde edilen bitkisel yağların veya hayvansal yağların bir katalizör eşliğinde kısa zincirli bir alkol ile (metanol veya etanol) reaksiyonu sonucunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür (Yücel, 2012). Evsel kızartma yağları ve hayvansal yağlar da biyodizel hammaddesi olarak kullanılabilir (Forde vd., 2014). Kullanılacak yağ atık yağ ya da bitkisel yağlar olabileceği gibi mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal yağlar da olabilmektedir.

Mikroorganizmaların ürettiği SCO_s 'nin üretim prosesinde substrat olarak atık materyallerin kullanılması yenilenebilir enerjinin kullanılmasına sebep olarak maliyeti düşük yollarla çevresel sorunlara yol açmadan çevreci yaklaşımlar oluşturulabilir. Bu amaçla karbon ve azot kaynağı olarak kullanılarak geri dönüşümü sağlanabilecek birçok madde yapılan son çalışmalarda substrat olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların yağ üretme özelliği kullanılarak etanol üretimi gerçekleştirilmek isteniyorsa, mikroorganizmanın geliştirildiği ortamdaki azot/karbon oranı büyük önem taşımaktadır. Çünkü lipid üretiminin başlaması için gelişme ortamındaki primer besin elementlerinin tükenmesi gerekmektedir. Lipid üretimini arttırmak için azot miktarının azaltılması ve kullanılabilir karbon miktarının arttırılması gerekmektedir (Denli ve Tekin, 2000). Bu amaçla kullanılan karbon kaynaklarından başlıcaları; glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, metanol, alkoller ve yağ asitleri sayılabilmektedir (Huang ve Tang, 2007). Ayrıca buğday samanı, küspe (özü alınmış meyvelerin kalan bölümü), ham glukoz, ham gliserol, domates hidrolizat atığı, fruktoz, laktoz, nişasta, yeast ekstrakt, pirinç kabuğu hidrolizatı, kabuklu tatlı sorgum, malt ekstrakt, nitrat, salamura turp, yer elması yumru ekstraktı, manyok nişasta hidrolizatı, şeker kamışı hidrolizatı son dönemde kullanılmakta olan diğer maddeler arasında sayılabilir (Donot vd., 2014).

1.3.1 Atık gül posasının karbon kaynağı olarak kullanılması

Türkiye'nin gül, gül yağı, gül suyu üretiminde önemli bir pozisyonda olması, artık olarak çıkan gül posalarının etkin bir şekilde değerlendirilememesi ve atık posanın depolandığı çukurlarda anaerobik koşulların oluşması sonucunda çevreyi rahatsız edici kokuların oluşması atık gül posasının bu tez çalışması için seçilmesinde ana etmenlerden bir tanesidir. Yapılan çalışmalara göre gül posası kimyasal analiz sonuçları aşağıdaki Tablo 1.2.'de verilmiştir (Tosun vd., 2003).

Tablo 1.2. *Gül posası kimyasal analiz sonuçları (Tosun vd., 2003)*

Parametre	100 g kuru gül posasında (g)
100°C'de rutubet	91,446
Mutlak kuru posa ağırlığı	8,5540
Ham kül	7,8050
Organik madde	92,194
SiO ₂	2,2133
Ca	1,2914
Mg	0,7766
K	1,0327
Fe	0,0590
P ₂ O ₅	0,0593
P	0,0258
N	3,0203

Gül posası analiz sonuçlarına göre mayaların geliştirilmesinde kullanılan YPD (Yeast extract peptone dextrose) agar besiyerinde karbon kaynağı olarak glukoz yerine atık gül posası kullanılmıştır.

1.4 Biyodizel ve Önemi

Tüm dünyanın küresel ısınmayla mücadele ettiği, aynı zamanda büyüyen enerji ihtiyacını karşılamak için alternatif arayışların hız kazandığı bir dönemde tarımsal potansiyelleri yüksek ülkelerde biyoyakıtlar; biyodizel, biyogaz ve biyoetanol yeni fırsat açılımları yaratmaktadır. Yenilenebilir enerji kaynakları, güneş, rüzgar, jeotermal enerjisi ve son dönemde önemli bir konumda olan biyokütle olarak sayılabilir. Biyokütleden elde edilen biyoyakıtlar, günümüzde birçok dünya ülkesinde kullanılmaktadır. Biyoyakıtların hammaddesi büyük ölçüde tarımsal ürünler ve atıklardır. Bu atıkların belli teknolojiler ile enerjiye dönüştürülmesiyle biyoyakıtlar oluşmaktadır. Günümüzde bir biyoyakıt çeşidi olan biyodizelin önemi giderek

artmaktadır. Bunun en önemli nedeni ise Dünya çapında petrol kaynaklarının hızla tükenmesi ve fiyatlarda ki artışın, biyodizeli gelecek vaat eden bir biyoyakıt konumuna getirmiş olmasıdır (Liang ve Jiang, 2013).

Biyodizel, kolza (kanola), ayçiçek, soya, aspir gibi yağlı tohum bitkilerinden elde edilen bitkisel yağların veya hayvansal yağların bir katalizör eşliğinde kısa zincirli bir alkol ile (metanol veya etanol) reaksiyonu sonucunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. (Yücel, 2012). Diğer bir deyişle biyodizel, bitkisel veya hayvansal yağlardan transesterifikasyon ile elde edilen uzun zincirli mono alkil esterlerdir (Yücel, 2012).

Biyodizel üretiminin çeşitli metodları olmakla birlikte, günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntem transesterifikasyon (alkoliz) yöntemidir. Transesterifikasyon reaksiyonunda hammadde olarak kullanılacak yağ, monohidrik bir alkolle (etanol, metanol), katalizör (asidik, bazik katalizörler ile enzimler) varlığında ana ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserin vererek esterleşmektedir (Ertuğrul, 2010).

Biyodizel ham maddesi olarak, evsel kızartma yağları ve hayvansal yağlar da kullanılabilir (Forde vd., 2014). Bitkisel yağların sülfür içeriğinin az olması, yüksek setan sayısı, yapısında oksijen bulunması yüksek parlama noktasına sahip olması, yağlama özelliklerinin iyi olması gibi avantajları nedeniyle alternatif yakıt üretiminde kullanılmaktadırlar (Aktaş ve Segmen, 2008). Aşağıdaki Tablo 1.3'de biyodizelin fiziksel özellikleri verilmiştir (Fidan ve Alkan, 2014).

Tablo 1.3. *Biyodizelin fiziksel özellikleri (Fidan ve Alkan, 2014)*

Özgül ağırlık	0,88	Kükürt, wt%	0,0-0,002
Setan sayısı	48-65	Kaynama noktası, °C	315-350
Yüksek ısı değeri, Btu/gal	127,04	Parlama noktası, °C	100-170
Alt ısı değeri, Btu/gal	118,17	Bulut noktası, °C	-3 ile 15
Karbon, wt%	77	Akma noktası, °C	-5 ile 10
Hidrojen, wt%	12	40°C'de kinematik vizkozite	4-6
Oksijen, wt%	11	15,5°C'de yoğunluk, lb/gal	7,3

Bitkisel yağların motor yakıtı olarak kullanılması eski dönemlere dayanmaktadır ve bunun öncüsü olan Rudolp Diesel, 1898 yılında Paris'te düzenlenen Dünya Sergisinde fıstık yağı ile çalıştırdığı dizel motorunu sergilemiştir (Alptekin ve Çanakçı, 2006). Dünya üzerinde birçok ülkede biyoyakıtlara verilen önemin giderek artmasıyla, araştırmacılar da dizel yakıtına alternatif bulmak için bitkisel yağlardan yararlanmaya

başlamış ve biyoyakıt üreticilerinin kurdukları örgütler kurumsallaştırılmıştır (Üstün ve Genç, 2015).

Ülkeler enerji ve tarım politikalarında biyoyakıtlara yer vermekte ve yatırımların artırılması için teşvikler sağlamaktadır. Türkiye’de de yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelik destek ve teşvikler son yıllarda artmaktadır.

Biyodizel üretiminde Almanya, ABD, Fransa, Arjantin ve Brezilya dünyanın ilk beş ülkesi arasında sayılmaktadır. Ülkemizde, 14 Eylül 2011 verilerine göre Enerji Piyasası Düzenleme Kuruluna (EPDK) kayıtlı 36 firmanın biyodizel üretim lisansına sahip olduğu tespit edilmiştir. Biyodizel üretiminin yapıldığı şehirler arasında; Ankara, İzmir, Adana, İstanbul, Kocaeli, Balıkesir, Bursa, Afyon, Konya, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa olarak sayılabilmektedir (Fidan ve Alkan, 2014).

1.4.1. Mayaların biyodizel üretiminde kullanılması

Biyodizel üretiminde atık, bitkisel ve hayvansal yağların kullanımının dışında son dönemde lipid üreten mikroorganizmaların öneminin artmasıyla, mayalar da bu amaçla kullanılan mikroorganizmalar arasında önemli bir pozisyonda sayılmaktadır. Çünkü, bitkisel ve hayvansal yağlardan enerji eldesi ham madde açısından maliyetlidir.

Bakteri, fungus ve mayalar lipid depo edebilme özelliği gösterebilirler de maya ve mikroalg türlerinden birkaçının ürettikleri yağ bitkisel yağlara benzer niteliklerdedir. Mayalar, hücrelerindeki lipid oranlarının ortalama olarak %20’yi geçmesi ve yağlı mikroorganizmalar arasında sayılıp, ürettikleri yağın triaçilgliserol formunda olması nedeniyle çalışılma sebebi olarak görülmektedirler (Meng vd., 2008). Bunlara ek olarak mayaların, değişen iklim ve hava şartlarından etkilenmemeleri, hücrelerinde diğer mikroorganizmalara oranla daha yüksek miktarda lipid içeriğine sahip olmaları, kısa süre içinde çok miktarda üretilibilmelerinin avantajı kullanılarak biyodizel üretiminde kullanışlı bir hammadde oldukları düşünülmektedir. Aynı zamanda mayaların ürettiği mikrobiyal yağlar bitkisel yağlarla karşılaştırıldığında pek çok avantaja sahiptir. Bunlardan en önemli faktör ise, mayaların bitkisel atık materyaller dahil pek çok substratın üzerinde gelişebilme özellikleridir. Bu durum da mayaların ürettikleri yağların maliyetini düşürmekte ve aynı zamanda atık materyaller de değerlendirilmiş olmaktadır (Zhu vd., 2008).

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan mayalar

Çalışmada Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Biriminden sağlanan 162 maya izolatu test edilmiştir. Çalışmalara yüksek yağ birikimi olan 16 maya izolatu ile devam edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada kullanılan atık

Gül posası

Gül üretimi ve işlenmesi konusunda ülkemizde büyük bir öneme sahip olan Isparta'da bulunan 2 farklı gül işleme fabrikasından temin edilen atık gül posaları bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Atık gül posaları, çalışma süresince -20°C soğuk odada muhafaza edilmiştir. Gül posa örneklerinin nem, lignin, ham kül, azot ve katı yağ miktar analizleri yapılarak çalışma için uygunluğu tespit edilmiştir.

2.1.3. Besiyerleri

2.1.3.1. *Yeast extract peptone dextrose agar (YPD Agar)*

Yeast extract	10 g
Pepton	20 g
Glukoz	20 g
Agar	15 g
Distile su	1 L

YPD agar besiyeri belirtilen içeriklere göre hazırlanıp 121°C'de 15 dk 1,5 atm. basınçta otoklavlanarak steril edilmiş ve steril petrilere dökülerek maya izolatlarının canlandırılma işlemleri için kullanılmıştır (Salinee ve ark., 2013).

2.1.3.2. *İnokülant besiyeri*

Glukoz	20 g
Yeast ekstrakt	10 g
Pepton	20 g
Distile su	1 L

Hazırlanan besiyeri 50 ml'lik erlenlerde 20 mL olacak şekilde hazırlanıp ağızları pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 121°C, 15 dk otoklavlanmıştır.

2.1.3.3. Üretim besiyeri (%1'lik H₂SO₄'lü)

Atık gül posası	50 g
Yeast extract	10 g
Pepton	20 g
(%1'lik H ₂ SO ₄)	1 L

Blenderdan geçirilerek boyutları küçültülen atık gül posaları kullanılmış ve 50 mL'lik erlenlerde 20 mL olacak şekilde hazırlanıp ağızları pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 121°C, 15 dk otoklavlanmıştır.

2.1.3.4. Üretim besiyeri (distile sulu)

Atık gül posası	50 g
Yeast extract	10 g
Pepton	20 g
Distile su	1 L

Blenderdan geçirilerek boyutları küçültülen atık gül posaları kullanılmış ve 50 mL'lik erlenlerde 20 mL olacak şekilde hazırlanıp ağızları pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 121°C, 15 dk otoklavlanmıştır.

2.1.4. Çalışmada kullanılan boyalar ve çözeltiler

2.1.4.1. Sudan black B

Sudan black B	0,3 g
%70'lik etanol	100 mL

Sudan black boya ile %70'lik etanol bir kaptan homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.4.2. Lugol çözeltisi

İyod	50 g
Potasyum iyodür	100 g
Distile su	1 L

2.1.4.3. Lizis buffer çözeltisi

Triton X-100	20 mL
Sodyum dodesilsülfat	10 g
NaCl (1M)	5,844 g
Trisma base (0,01M, pH:8)	1,21 g
EDTA	0,292 g
Distile su	1 L

1 litre lizis buffer çözeltisi hazırlamak için tüm malzemeler tartılmış ve 1 litre distile su içerisinde vortex yardımı ile çözümleri sağlanmıştır.

2.1.4.4. 400 µL Digestion solution

Fenolkloroformizoamilalkol (24:25:1)	400 µL
Lizis buffer	400 µL
Boncuk	7 adet
Maya örneği	1 kürdan dolusu

400 µL digestion solution hazırlamak için, tüm maddeler ependorfa konularak 30 dakika 11000 rpm santrifüj yapılmış ve boncuklar olmadan sıvı kısım ayrı bir ependorfa alınmıştır. Aynı şekilde 5 dk, 11000 rpm santrifüjün ardından süpernant faz dökülerek DNA ekstaksiyon basamaklarına devam edilmiştir.

2.1.4.5. PCR mix (100x)

10x taq buffer+KCL-MgCl	250 µL
MgCl ₂ (25 µm)	250 µL
dNTP mix (2,5 µm)	200 µL
MQ (nükleaz free su)	1175 mL
Taq DNA polimeraz	25 mL
NL1	250 µL
NL4	250 µL

2.1.4.6. HCl (4M)

HCl	66,12 mL
Distile su	33,88 mL

100 mL 4M HCl çözeltisi hazırlamak için önce HCl ardından distile su eklenerek karışım hazırlanmıştır.

2.1.4.7. H_2SO_4 (%1)

H_2SO_4 (%100) 5 mL
Distile su 495 mL

500 mL %1'lik H_2SO_4 çözeltisi hazırlamak için önce H_2SO_4 ardından distile eklenerek karışım hazırlanmıştır.

2.1.4.8. Dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi (1 L)

Ultra saf su 1 L
2 Hydroxy 3,5 dinitrobenzoik asit 7,571 g
NaOH 14,14 g
Rochella 218,5 g

Çalışmada kullanılmak üzere 28 mL DNS çözeltisi hazırlamak için, yukarıda ki malzemeler uygun ölçülerde hazırlanarak dışı aliminyum folyo ile kaplı bir erlen içerisine konulmuş ve içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcıda 1 saat süresince çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 0,162 g fenol tartılarak 97°C sıcak su banyosunda çözüldürüldükten sonra karışıma eklenmiştir. Son olarak 0,166 g sodyum metabisülfid karışıma eklendikten sonra 30 dk süreyle tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

2.1.4.9. 4,8 buffer

Asetik asit (0,2M) 20 mL
Sodyum asetat (0,2M) 30 mL
Ultra saf su 50 mL

100 mL 4,8 buffer çözeltisi hazırlamak için tüm malzemeler balon joje içerisinde karıştırılmıştır.

2.1.4.10. BF_3 çözeltisi

%35 $BF_3/MeOH$
%45 MeOH
%20 Hekzan

2.2. Metodlar

2.2.1. Araştırmada kullanılan izolatların aktifleştirilmesi

Çalışmada kullanılan maya kùltürleri öncelikle malt ekstrakt katı besiyerinde geliştirilmiştir. Gelişen kùltürler maya özütü peptonlu dekstroz (YPD) sıvı besiyerine ekilerek 3-4 gün süreyle 25°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda maya izolatları YPD agar besiyerine ekilmiş ve aynı şekilde 25°C’de 3-4 gün süreyle inkübe edilmiştir. Gelişim gösteren tüm maya örneklerinin saflık kontrolleri yapılmış ve maya izolatları %20 gliserolde stoklanarak -80°C’ye kaldırılmıştır.

2.2.2. Kullanılacak atık gül posasının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Besiyerlerinin hazırlanmasında karbon kaynağı olarak kullanılacak atık gül posasının fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla nem tayini, lignin tayini, ham kül tayini, katı yağ miktar analizi ve azot tayini yapılmıştır.

2.2.2.1. Nem tayini

Atık gül posasından 0,5-0,6 g arası tartılarak Mettler Toledo HB43-S Halogen (Liebestrasse/İsviçre) marka nem tayini cihazında kurutulmuş ve nem ölçümü yapılmıştır (Kaplan vd., 2010).

2.2.2.2. Lignin tayini

Lignin tayini hem atık gül posasına hem de atık gül posası ön işlem sıvısına yapılmıştır. Ön işlem sıvısı için, 1/10 oranına göre atık gül posası ve %1’lik H₂SO₄ bir erlende karıştırılarak 1 saat süresince 121°C’de otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen karışım filtre kağıdı ve huni kullanılarak süzölmüş ve kurutma kağıdında kalan katı örnekler 45°C etüvde kurumaya bırakılmıştır. Herbir örnekten 0,3 g tartılarak erlenlere konulmuş, üzerlerine 3 mL %72’lik H₂SO₄ eklenmiş ve 1 saat 30°C çalkalamalı su banyosunda karıştırılmıştır. Ardından örneklerdeki H₂SO₄ konsantrasyonunun %4 olması için 84 mL saf su ile seyreltilmiş ve 1 saat 121°C otoklavlanmıştır. Erlenlerin sıcaklığı oda sıcaklığına geldikten sonra ön işlem sıvıları filtre kağıdı ve huni kullanılarak süzölmüş ve kağıdın üzerinde kalan katı su ile yıkanarak tüm katı maddenin toplanması sağlanmıştır. Örneklerin pH’sı nötr hale gelinceye kadar su ile

yıkamaya devam etmiş ve pH kağıdı kullanılarak pH kontrol edilmiştir. Herbir örneğin katısı krozelere alınmış ve 2 gün süreyle 105°C etüvde kurumaya bırakılmıştır. Bu sürenin ardından krozeler tartılmış ve bu değerler m_1 olarak kaydedilmiştir. Ardından krozeler 1 gün süreyle 600°C kül fırınına konulmuş ve bu sürenin ardında soğumaları ve aynı zamanda nem kapmamaları için desikatöre yerleştirilmiştir. Ardından krozeler yeniden tartılmış ve bu değer ise m_2 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen verilere göre lignin miktarı aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (Kaplan vd., 2010).

$$\text{Lignin miktarı (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100$$

m_0 = başlangıçtaki hammadde

m_1 = 105°C'de kurutulduktan sonra kalan miktar

m_2 = 600°C'de yakıldıktan sonra kalan miktar

2.2.2.3. Ham kül tayini

Bir adet kroze sabit tartıma getirilmek üzere 500°C kül fırınına konulduktan sonra soğuması ve aynı zamanda nem kapmaması için desikatöre konularak oda sıcaklığına getirilmiştir. Ardından kroze tartılmış ve bu değer m değeri olarak kaydedilmiştir. Daha sonra bir miktar atık gül posası tartılmış ve krozenin içerisine konularak yeniden tartım yapılmıştır. Tartım sonucu m_1 değeri olarak kaydedilmiştir. İçerisinde atık gül posası bulunan kroze yüzeyi ıslanacak şekilde etil alkol dökülmüş ve çakmakla yakılarak yanmanın bitmesi beklenmiştir. Ardından kroze 4 saat süreyle 500°C kül fırınına konulmuştur. Yakma işlemi tamamlandıktan sonra kroze nem kapmaması amacıyla desikatöre alınmış ve oda sıcaklığına gelinceye kadar soğuması beklenmiştir. Soğuyan kroze tartılarak bu değer m_2 değeri olarak kaydedilmiştir. Elde edilen verilere göre kül tayini aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (Kaplan vd., 2010).

$$\text{Ham kül (\%)} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

m = krozenin darası

m_1 = içerisine atık gül posası konulan krozenin ağırlığı

m_2 = 500°C kül fırınında yakıldıktan sonra kalan miktar

2.2.2.4. Yağ ekstraksiyonu (Soxhelet yöntemi)

Selüloz kartuşun darası alınarak içerisine blenderdan geçirilmiş 3 g atık gül posası konulmuş ve selüloz kartuşun ağzı pamukla kapatılmıştır. Ardından selüloz kartuş cihaza ait hazneye yerleştirilmiştir. Cihaza ait olan cam kaplar ise tartıldıktan sonra 150 mL petrol eteri doldurularak cihaza yerleştirilmiştir. Cihaz çalıştırılarak ekstraksiyon başlatılmıştır. İşlem sonucunda cam kaplar haznelerinden çıkarılmış ve yağdan petrol eterinin uçması amacıyla 1 saat süreyle çeker ocağa konulmuştur. Ardından cam kaplar tartılmış ve aşağıda verilen formüle göre yüzde yağ miktarı hesaplanmıştır (Kaplan vd., 2010).

$$Yağ (\%) = \frac{(B-A) \times 100}{C}$$

A= cam kabın ağırlığı

B= cam kap ve içindeki yağın toplam ağırlığı

C= örneğin ağırlığı

2.2.2.5. Azot tayini

0,5-1 g aralığında olacak şekilde atık gül posasından tartılmış ve tüpe konulmuştur. Ardından 2 adet katalizör (Cu_2SO_4 ve K_2SO_4) de tüplere konulduktan sonra 12 mL H_2SO_4 eklenmiştir. Yakma aparatına konulan tüpün 1 saat $420^\circ C$ 'de yakma işlemi yapılmıştır. Ardından cihaz açılmış ve boş bir tüp kör olarak okutulmuştur. Yakma işlemi tamamlanan tüp soğuduktan sonra cihaza yerleştirilip okuması yapılarak gül posasının azot miktarı belirlenmiştir (Kaplan vd., 2010).

2.2.3. Atık gül posası içeren ortamda maya izolatlarının gelişme durumunun belirlenmesi

YPD agar besiyerinde gelişim gösteren 162 maya örneği için karbon kaynağı olarak kullanılan glukozun besiyerinden çıkarılıp yerine atık gül posası kullanılarak hazırlanan YPD agar besiyerine ekimleri yapılmıştır. Ekimi yapılan maya örneklerini içeren petripler 2-6 gün süreyle $30^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir. Gelişim göstermeyen örnekler için karbon kaynağı olarak atık gül posası içeren aynı içerikli sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Soğuyan sıvı besiyerlerine 24 saatlik maya kültürlerinden 20 ml'de $5\mu L$

olacak şekilde maya ekimi yapılmış ve 30°C, 120 rpm çalkalamalı etüvde 2-6 gün süre aralığında gelişimleri kontrol edilmiştir.

2.2.4. Atık gül posası içeren ortamda maya izolatlarının lipid üretiminin belirlenmesi

Atık gül posasında gelişen izolatların lipid üretimleri Sudan Black B boyası ile boyanarak belirlenmeye çalışılmıştır. Karbon kaynağı olarak atık gül posası içeren YPD agar besiyerinde geliştirilerek bu kültürlerden hazırlanan preparatlar incelenmiştir. Bu amaçla 162 maya örneğinin yağ üretme özelliklerinin olup olmadığını anlamak için lam üzerine damlatılan 1 damla steril su üzerine petrilerden kürdan ile alınan örnekler lam üzerine yayılmıştır. Ardından her bir lam ateş üzerinde 3 kere fikse edildikten sonra Sudan Black B ile boyanmış ve 5 dk beklenmiştir. Bu sürenin ardından preparat üzerindeki fazla boya akıtılmış ardından lugol ile 30 saniye boyama yapıldıktan sonra preparatlar su ile yıkanmıştır (Pan vd., 2008).

Preparatlar faz kontrast mikroskopunda incelenmiş ve hücre içerisindeki mavi veya gimsi yağ damlaları gözlenmeye çalışılmıştır.

2.2.5. Yağ üretme özelliğine sahip maya izolatlarının moleküler tekniklerle tanımlanması

Hücre içlerinde yağ damlacıkları gözlemlenen 16 maya izolatının (6, 7, 9, 18, 21, 24, 26, 34, 48, 73, 74, 89, 93, 141, 152 ve 155 numaralı mayalar) türlerinin belirlenmesi amacıyla DNA ekstraksiyonları “Maya DNA İzolasyon Kiti” kullanılarak yapılmış olup, kit’in içerisinde bulunan kitapçığa göre işlem basamakları gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda olumlu sonuç alınamayınca literatür taramalarına göre başlangıçtaki işlem basamakları farklılaştırılarak uygulanmıştır. Yapılan değişikliğe göre maya hücrelerinin parçalanması amacıyla her bir ependorfta ki maya örneği için 7 adet boncuk kullanılmış olup fenol kloroformizo amil alkol (24:25:1) ve digestion solution çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bir ependorf içerisine 400 µL fenol kloroformizo amil alkol (24:25:1), 400 µL lizis buffer, 7 adet boncuk ve öncesinden 24 saat süreyle 25°C etüvde YPD agar besiyerinde aktifleştirilen maya hücrelerinden bir kürdan konulduktan sonra 30 dk süreyle 11000 rpm santrifüj yapılmıştır. Sonra ependorftaki süpernatant kısım ayrı bir ependorfa alınarak yeniden 30

dk 11000 rpm santrifüjlenmiş ve ardından kit kitapçığında belirtilen işlem basamaklarına devam edilerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonları yapılan örnekler +4°C buzdolabında saklanmıştır.

DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'ları gözlemlemek amacıyla 16 maya örneğine (6, 7, 9, 18, 21, 24, 26, 34, 48, 73, 74, 89, 93, 141, 152 ve 155 numaralı mayalar) 100 volt, 30 dk süre ile jel elektroforezinde yürütülmüştür ve Uvitec marka Uvphoto cihazına konularak jel görüntülemesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre herbir maya örneğinin jel görüntüsü istenilen şekilde elde edilmiş ve PCR için uygun oldukları saptanmıştır.

Maya örnekleri PCR yoluyla çoğaltılmış olup, moleküler tanılama için 26S rDNA' nın D1/D2 bölgesi NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) ve NL2 (5'-GGTCCGTGT TTCAAGACGG) evrensel primerleri kullanılmıştır (Maoura vd., 2005). 26S rDNA' nın 5' bölgesine yerleşmiş olan D1/D2 domaini yaklaşık olarak 600 baz uzunluğunki bölge olup birçok mayanın tanımlanmasında kullanılmaktadır. D1/D2 domaini polimeraz zincir reaksiyonları ile NL1 ve NL4 primerleri kullanılarak çoğaltılmaktadır (Gençer, 2012).

Maya DNA'larına uygulanacak olan PCR için öncelikle PCR mix hazırlanmıştır. Ardından PCR tüplerine 1µL örnek ve 24 µL PCR mix olacak şekilde konulmuş ve kısa süreyle santrifüj yapılmıştır. Sonrasında örnekler denatürasyon 94°C 5 dk, annealing 94°C 45 sn, uzama 72°C 1 dk PCR döngüsünde amplifiye edilmiştir.

PCR ile çoğaltılan rDNA bölgeleri dizi analizleri yapılmak üzere Exogene Biyoteknoloji adlı firmaya gönderilmiştir ve dizi analizleri belirlendikten sonra veri tabanında analizleri yapılarak tanımlamada kullanılmıştır (Richard vd., 2008). Firmadan gelen dizi analizi sekans sonuçları doğrultusunda, elde edilen veriler NCBI BLAST, CLUSTALW kullanılarak veri bankasındaki dizilerle karşılaştırılmış ve maya izolatlarının tür seviyesinde moleküler tanıları yapılmıştır.

2.2.6. Atık gül posası içeren besiyerinde geliştirilen mayaların lipid miktarı ve lipid veriminin belirlenmesi

Yağ üretme özelliğinin olduğu saptanan 16 maya örneğinin (6, 7, 9, 18, 21, 24, 26, 34, 48, 73, 74, 89, 93, 141, 152 ve 155 numaralı mayalar) lipid üretme potansiyellerini görmek amacıyla lipid ekstraksiyonu aşamaları Pan vd., (2008) göre yapılmıştır.

İçinde 20 mL inokulant besiyeri (2.1.3.2.) içeren 50 ml'lik erlene, YPD agarda geliştirilmiş 48 saatlik kültürden bir kürdan dolusu olacak şekilde ekilmiş ve 3 gün süreyle, 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.

İçinde atık gül posası içeren üretim besiyerinden (2.1.3.4.) 20 mL içeren 50 ml'lik erlene, her bir maya örneğinin inokulant besiyerinden 1000 µL aşılama yapılmış ve 3 gün süreyle 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda maya biyokütlesi (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve % lipid verimi hesaplanmıştır.

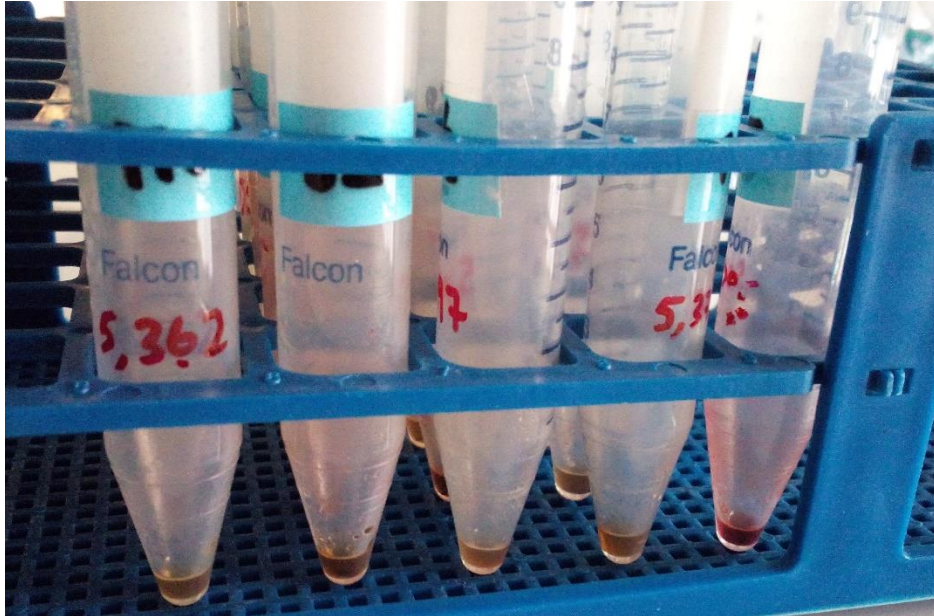
2.2.6.1. Maya kuru hücre ağırlığının belirlenmesi

Üç gün süreyle üretim besiyerinde inkübasyona bırakılan örnekler bu sürecin sonunda kuru kütle ağırlıklarının hesaplanması için öncesinde daraları alınan 2 ml'lik ependorfta 1,5 mL olacak şekilde her bir maya örneği için ayrı ayrı ependorflara alınmıştır. Ependorflar 5000 rpm, 5 dk süre ile santrifüjlenmiş ardından süpernatant kısım dökülerek 1,5 mL distile su eklenmiştir. Ependorflar vorteksle karıştırılarak çökelen kısmın karışması sağlanmış ve 5000 rpm, 5 dk süre ile yeniden santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant kısım dökülerek aynı işlem 2 kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminin ardından süpernatant kısım döküldükten sonra ependorflar ağızları açık bir şekilde 55°C'lik etüvde kurumaya bırakılmışlardır. Kuruduktan sonra kurukütle tartılarak 1,5 mL deki lipid kuru hücre ağırlığı belirlenmiş ve 1000 ml'deki biyokütle g/L cinsinden hesaplanmıştır (Pan vd., 2008). Tüm deneyler iki kez tekrar edilmiştir.

2.2.6.2. Lipid ekstraksiyonu ve lipid kuru ağırlığının belirlenmesi

Maya hücreleri içerisindeki lipid miktarının belirlenmesi amacıyla ekstraksiyon, kurutma ve tartımlar Bling ve Dyer, (1959) göre yapılmıştır.

Üretim besiyerinde (2.2.3.4'de hazırlanan) geriye kalan örnekler 50 ml'lik falkonda 15 mL olacak şekilde ayrı ayrı falkonlara alınmıştır. Falkonlar 5000 rpm, 5 dk süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant kısım dökülerek 18 mL distile su konulmuştur. Falkonlar vorteksle karıştırılarak çökelen kısım ile distile suyun karışması sağlanmış ve yeniden 5000 rpm, 5 dk süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından aynı işlem bir kez daha tekrarlanmış ve süpernatant kısım döküldükten sonra her bir falkona 10 mL 4M HCl çözeltisi konulmuştur. Bir saat süreyle 60°C su banyosunda bekletilen falkonlar üzerlerine 20 mL kloroform:metanol (1:1) eklenmiş ve bir gün süreyle 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüve konulmuştur. Daha sonra falkonlar 5000 rpm, 5 dk süre ile santrifüj yapılmış ve lipidlerin olduğu alt tabaka pastör pipeti kullanılarak önceden daraları alınmış olan 15 ml'lik falkonlara konulmuştur. Falkon tüpleri ağızları açık olacak şekilde 55°C'lik etüvde kurumaya bırakılmışlardır. Görsel 2.1'de gösterildiği şekilde sıvılar tamamen kuruduktan sonra tartımları yapılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Tüm deneyler iki kez tekrar edilmiştir.



Görsel 2.1. Lipid ekstraksiyonu sonucunda ependorflarda kalan alkollü uçmuş lipidli kısım

2.2.6.3 Yüzde lipid veriminin hesaplanması

Yüzde lipid hesabı için, aynı numaralı maya örneğinin kuru kütle (g) ve lipid miktarı (g/L) baz alınarak % lipid miktarı belirlenmiştir.

Yüzde lipid veriminin hesaplanması için öncelikle kuru kütle hesabının yapılması gerekmektedir. Bu amaçla kuruyan kuru kütlelerin bulunduğu ependorflar tartılarak daraları ile arasındaki farklar alınmıştır. Ardından “1,5 ml’de kaç gram kuru kütle varsa 1000 ml’de kaçtır” şeklinde bir oran orantı ile 1000 ml’deki biyokütle g/L cinsinden hesaplanmıştır.

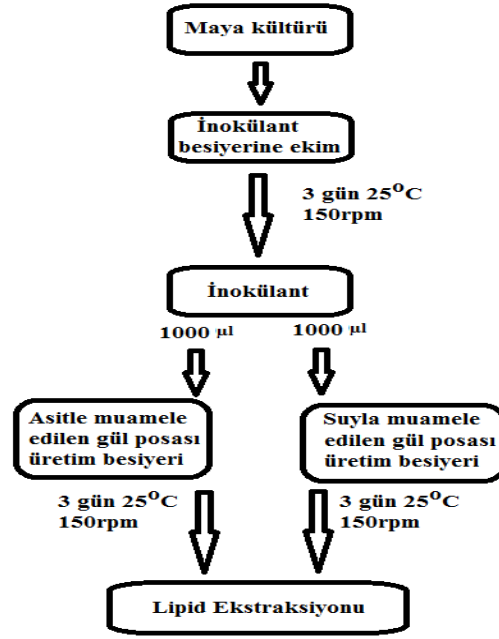
Kuruyan lipidlerin bulunduğu falconlar da aynı şekilde tartılarak daraları ile aralarında farklar alınmıştır. Ardından “15 ml’de kaç gram lipid varsa 1000 ml’de kaçtır” şeklindeki oran orantı ile 1000 ml’deki lipid miktarı g/L cinsinden hesaplanmıştır.

Yüzde lipid hesabı için, aynı numaralı maya örneğinin kuru kütle ve lipid hesabı baz alınarak “bulunan kuru kütle ne kadar lipid içeriyorsa 100’de kaçtır” oran orantısı ile % lipid hesabı yapılmıştır.

Yapılan hesaplamalara göre yüzde lipid oranı %3,5’ten yüksek olan 6 maya izolatu (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) sonraki deney aşamaları için seçilmiştir.

2.2.7. Seçilen maya izolatları ile lipid üretimi

Seçilen 6 maya izolatu (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) ile lipid üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılan atık gül posasına 2 farklı muamele uygulanarak lipid üretimi yapılmıştır (Şekil 2.1). Bunlardan birinde gül posası asit ile muamele edildikten sonra kullanılmıştır. Diğerinde ise su ile ön işlemden geçirilerek direk olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Maya izolatları ile lipid üretim basamakları

2.2.7.1. Asitli ve sulu atık gül posası ön işlem sıvılı besiyerinde geliştirilen mayaların lipid ekstraksiyonu

Hazırlanan inokülant besiyeri (2.1.3.2.) her bir maya örneği için 2 paralel çalışılmış ve 50 ml'lik erlenlerde 20 mL olacak şekilde hazırlanıp ağzları pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 121°C, 15 dk otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkan besiyerleri soğuduktan sonra, öncesinde YPD agar besiyerine ekilmiş ve inokulum yaşı 48 saat olan 6 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) her bir erlene bir kürdan dolusu olacak şekilde ekilerek 3 gün süreyle, 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Üç günün ardından inokülant besiyerinden aşılama yapmak için iki farklı üretim besiyeri hazırlanmıştır.

Birinci üretim besiyeri (2.1.3.3.) için; 1/10 oranına göre (blenderdan geçirilmiş 10 g atık gül posası+100 mL %1'lik H₂SO₄ kullanılarak) hazırlanmıştır.

İkinci üretim besiyeri (2.1.3.4.) için; 1/10 oranına göre (blenderdan geçirilmiş 10 g atık gül posası+100 mL distile su kullanılarak) hazırlanmıştır.

İki farklı şekilde hazırlanana üretim besiyerlerinin ağzı pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 1 saat, 121°C de otoklavlanmıştır. Üretim besiyerleri soğuduktan

sonra hazırlanan iki üretim besiyeri bir huni ve süzme kağıdı kullanılarak iki ayrı ön işlem sıvısı elde edilmiştir.

Hazırlanan üretim besiyerlerinin pH'ları mayaların gelişimi için uygun olan pH 5'e NaOH kullanılarak ayarlanmış ve 2 paralel olarak çalışılan 6 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) için 50 ml'lik erlenlerde 20 mL olacak şekilde hazırlanıp ağızları pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 121°C, 15 dk otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkan besiyerleri soğuduktan sonra her bir maya örneğinin inokulant besiyerinden üretim besiyerine 1000 µL aşılama yapılmış ve 3 gün süreyle 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Pan vd., 2008).

Bu sürecin sonunda maya kuru hücre ağırlığı, lipid kuru ağırlığı ve %lipid verimi sırasıyla 2.2.6.1, 2.2.6.2, 2.2.6.3 bölümlerinde verilen yöntemle göre belirlenmiştir.

2.2.8. Gül posası miktarının lipid üretimine etkisi

Atık gül posası miktarının lipid üretimine olan etkisini belirlemek için üretim besiyerleri 12 g ve 15 g atık gül posası kullanılarak hazırlanmıştır. Diğer işlemler 2.2.5.1'de verilen yöntemle göre yapılmıştır. Yukarıdaki aşamalardan sonra kuru kütlelerin bulunduğu ependorflar ve kuruyan lipidlerin bulunduğu falkonlar tartılarak maya kuru hücre ağırlığı, lipid kuru ağırlığı ve %lipid verimi sırasıyla 2.2.6.1, 2.2.6.2, 2.2.6.3 bölümlerinde verilen yöntemle göre belirlenmiştir.

2.2.9. pH'nın maya gelişimi üzerine etkisi

Farklı pH'ların maya gelişimi üzerine etkisini tespit etmek için, pH 3 - pH 7 aralığında 5 farklı pH değeri hem sulu hem de %1'lik H₂SO₄'lü ön işlem sıvıları ile hazırlanan üretim besiyerlerinde denenmiştir. Bu amaçla öncelikle, 6 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) için inokulant besiyeri hazırlanmıştır.

Beş farklı pH değerinin %1'lik H₂SO₄ ve sulu ön işlem sıvılarını içeren üretim besiyerlerinde (2.1.3.3.) denenmesi amacıyla inokulant besiyeri (2.1.3.2.) her bir maya örneği için cam tüplerde 5 mL olacak şekilde hazırlanıp ağızları pamuk ve folyo ile kapatıldıktan sonra 121°C, 15 dk otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkan besiyerleri soğuduktan sonra inokulant besiyerine, YPD agarda 48 saat geliştirilen 6 maya

izolatından ayrı ayrı her bir erlene bir kürdan dolusu olacak şekilde ekilmiş ve 3 gün süreyle, 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.

Hazırlanan bu kültürden asit ön işlemlili (2.1.3.3.) ve sulu ön işlemlili (2.1.3.4.) olarak hazırlanan ve pH'ları 3, 4, 5, 6 ve 7 olarak ayarlanan 5 mL besiyerlerine 1000 µL aşılama yapılmış ve 48 saat süreyle 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir pH için maya sayımları damlatma plak yöntemi ile yapılmıştır.

Bunun için 900 µL FTS bulunan yedili ependorf setleri hazırlanmıştır. İçlerinden 100µL alınan herbir tüp 10⁷'ye kadar delüe edilmiş ve her bir ependorfтан YPD agar besiyerine 10 µL olacak şekilde ekim yapılarak 24 ve 48 saat, 25°C inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra 24 ve 48 saat sonra gelişen koloniler sayılmıştır.

2.2.10. Farklı azot kaynakları içeren besiyerlerinde mayaların geliştirilmesi

Farklı azot kaynakları kullanılarak hazırlanan YPD agar besiyerlerinde 6 maya örneğinin (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) damla ekimleri yapılarak koloni sayımları yapılmış ve hangi azot kaynağında daha yüksek gelişim olduğu saptanmıştır. Bu amaçla 8 farklı azot kaynağı (tripton, yeast extract, pepton, beef extract, amonyum klorür, sodyum nitrat, amonyum sülfat, atık gül posası) denenmiş ve 100 ml'lik erlenlerde 50 mL olacak şekilde 8 adet farklı YPD (Yeast extract peptone dextrose) agar besiyerleri hazırlanmıştır.

Ayrıca 6 adet maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) 10 mL YPD sıvı besiyerine 100 µL aşılama yapılarak canlandırılmış ve 25°C'lik etüvde 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından maya örneklerini içeren deney tüpleri 5 dk, 5000 rpm'de santrifüjlenerek süpernatant kısım dökülmüştür. Ardından 10 mL steril FTS konulan deney tüpleri, dibe çöken peletin karışması için vortexlenmiştir. Tüm tüplerin bulanıklığı Mc Farlant 3'e göre ayarlanmıştır. Herbir tüpten 8 farklı karbon kaynağı (tripton, yeast extract, pepton, beef extract, amonyum klorür, sodyum nitrat, amonyum sülfat, atık gül posası) içeren 8 ayrı petriye, herbir maya örneği için iki paralel olacak şekilde 10 µL alınarak damla ekim yapılmıştır. Petriler 3 gün süre ile 25°C inkübe

edilmiştir. İnkübasyondan sonra oluşan gelişimleri çaplarının ölçülmesinin ardından değerlendirilmiştir.

2.2.11. İndirgen şekerin hesaplanması

Mayaların kullandığı şeker miktarını saptamak için, sıvıda çözünen indirgen şeker miktarı tayini DNS metodu ile belirlenmiştir (Miller, 1959). Bu amaçla öncelikle DNS çözeltisi hazırlanmıştır.

28 mL DNS çözeltisi için malzemeler dışı alüminyum folyo ile kaplı bir erlen içerisine konulmuş ve içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcıda 1 saat süresince çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 0,162 g fenol tartılarak 97°C sıcak su banyosunda çözüldürüldükten sonra karışıma eklenmiştir. Son olarak 0,166 g sodyum metabisülfid karışıma eklendikten sonra 30 dk süreyle tamamen çözünmesi sağlanmıştır (Miller, 1959).

Mayaların kullandığı şeker miktarını saptamak için öncelikle içerisinde maya geliştirilmeyen atık gül posaları ile hazırlanmış %1'lik H₂SO₄ 'lü ve sulu ön işlem sıvıları hazırlanmıştır. 1/10 oranına göre %1'lik H₂SO₄ ve su ile hazırlanan atık gül posalı ön işlem sıvılarının DNS değerleri saptanması için cam deney tüplerine alınan ön işlem sıvılarının pH'ları CaCO₃ ile 4,8'e ayarlanmış ve 2 ön işlem sıvısı için de 4 paralel olarak çalışılmıştır. Yapılan DNS metoduna göre tamponlu ve tamponsuz olmak üzere UV spektrometrede 540 nm'de iki okuma yapılmıştır.

Tamponlu okuma basamakları:

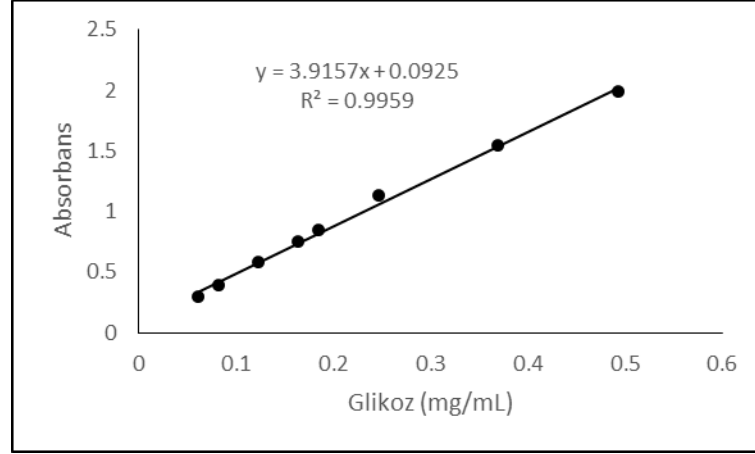
1. Ön işlem sıvılarının bulunduğu tüplerden 200 µL çekilerek, içinde 1000 µL 4,8 buffer bulunan ayrı deney tüplerine eklenmiştir.
2. Deney tüpleri vortexlenmiş ve içerinden 250 µL çekilerek 2 ayrı deney tüpüne bölünmüştür.
3. Herbir tüpe hazırlanan DNS çözeltisinden 500 µL eklenmiştir.
4. Tüpler 5 dakika süre ile 96°C sıcak su banyosunda ve ardından 1 dakika süre ile soğuk su banyosunda bekletilmiştir.
5. Herbir tüpteki numuneden 200 µL çekilerek, içinde 2500 µL ultra saf su bulunan deney tüplerine konulmuştur.

6. Seyreltme işlemi ultra saf su ile yapıldığından kör olarak kuvarz küvetlerin her ikisine de ultra saf su konulmuş ve sıfırlama işlemi yapılmıştır.
7. Her bir tüp UV spektrometrede okunmadan önce vortexlenmiş ve ardından ve UV-1800 Shimadzu markalı spektrometrenin kuvarz küvetine konularak 540 nm'de okumaları yapılmıştır.

Tamponsuz okuma basamakları:

1. Ön işlem sıvılarının bulunduğu tüplerden 250 µL çekilerek 2 ayrı tüpe konulmuş ve üzerlerine 500 µL DNS çözeltisi eklenmiştir.
2. Tüpler 5 dakika süre ile 96°C sıcak su banyosunda ve ardından 1 dakika süre ile soğuk su banyosunda bekletilmiştir.
3. Her bir tüpte ki numuneden 200 µL çekilerek, içinde 2500 µL ultra saf su bulunan deney tüplerine konulmuştur.
4. Seyreltme işlemi ultra saf su ile yapıldığından kör olarak kuvarz küvetlerin her ikisine de ultra saf su konulmuş ve sıfırlama işlemi yapılmıştır.
5. Herbir tüp UV spektrometrede okunmadan önce vortexlenmiş ve ardından ve UV-1800 Shimadzu markalı spektrometrenin kuvarz küvetine konularak 540 nm'de okumaları yapılmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar ve derişim aşamasında kullanılan değerler, saf glikoz çözeltileri kullanılarak önceden hazırlanmış olan mg/mL glikoz (mg/mL)-absorbans kalibrasyon doğrusu ($R^2:0,9959$) baz alınarak yapılmıştır ve Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Glikoz-absorbans kalibrasyonu doğrusu

Asitli ve sulu ön işlemlerinde indirgen şekerin hesaplaması için 6 adet maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) öncelikle 50 ml'lik erlenlerde 20 mL olacak şekilde inokulant besiyerinde 3 gün süreyle, 25°C ve 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 1/10 oranına ve pH 5 değerine göre, 50 ml'lik erlenlerde 20 mL olacak şekilde hazırlanan %1'lik H₂SO₄'lü ve sulu gül ön işlem sıvısını içeren üretim besiyerlerine inokulant besiyerinden 1000 µL aşılama yapılmış ve 3 gün süreyle 25°C, 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından erlenlerdeki örnekler cam deney tüplerine 5 mL olacak şekilde alınmış ve pH'ları CaCO₃ ile 4,8'e ayarlanmıştır. Ardından tüm örnekler için tamponsuz okuma basamakları yapılmıştır.

2.2.12. Atık gül posasında lipid üretim parametrelerinin optimizasyonu

Yapılan deneylerde mayaların ne kadar hacimde, hangi karbon kaynağında, hangi pH değerinde ve hangi ön işlem sıvısında daha yüksek oranlarda gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre mayaların, 1/10 oranına göre (10 g atık gül posası+100 mL %1'lik H₂SO₄) pH 5 olarak hazırlanan %1'lik H₂SO₄'lü gül ön işlem sıvısını içeren ve azot kaynağı olarak peptonun kullanıldığı üretim besiyeri ile yapılan lipid ekstaksiyonlarında daha yüksek verimlere sahip oldukları saptanmıştır.

Sıcaklık, inokulum yaşı ve inokulum hacmini içeren lipid üretim parametrelerinin yanıt düzey yöntemi ile optimizasyon deneylerinde 15 deneysel noktadan 2 tekrarlı 3 değişkenden oluşan "Box Behnken Deneysel Tasarımı Yöntemi" kullanılmıştır. İncelenen sıcaklık (°C) (X₁), inokulum yaşı (saat) (X₂), inokulum hacmi (ml) (X₃)

parametrelerinin seviyeleri Tablo 2.1’de, bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu ise Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Cevap (Y) değerini belirlemek için önerilen ikinci derece polinom model eşitliği aşağıdaki denklemde gösterilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

Tablo 2.1. Lipid üretiminde incelenen parametreler ve seviyeler

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	1
X ₁ : Sıcaklık (°C)	25	30	35
X ₂ : İnokulum yaşı (saat)	18	33	48
X ₃ : İnokulum hacmi (%)	5	15	25

Tablo 2.2. Lipid üretiminde bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonları

Deney No	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)
1	30	48	25
2	30	18	25
3	35	18	15
4	30	33	15
5	30	33	15
6	30	18	5
7	25	48	15
8	35	33	5
9	25	18	15
10	35	48	15
11	30	48	5
12	25	33	5
13	35	33	25
14	25	33	25
15	30	33	15

Box Behnken deney tasarımı yöntemine göre, 6 maya örneğinin (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) lipid üretimin hangi parametrelerde maksimum düzeyde olduğu saptanmıştır. Verilerin istatistiki olarak modele uygunluk analizleri %95 güven aralığında ANOVA testi ile Minitab 17 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.13. Optimize edilen koşullarda lipid üretimi

Minitab 17 istatistik programının yüzey optimizeri kullanılarak “Response optimizer” seçeneğinden herbir maya örneğinin lipid üretimi için maksimum değerleri saptanmış ve elde edilen verilere göre lipid ekstraksiyon aşamaları yapılmıştır. Programın optimizasyon çalışması sonuçlarına göre, maksimum lipid eldesi için çalışılması gereken sıcaklık, inokulum yaşı ve inokulum hacmi değerleri saptanmıştır.

Lipid üretimi için; öncesinde YPD agar besiyerinde 48 saat süreyle 25°C etüvde canlandırılması yapılan maya örnekleri, bu sürenin sonunda 50 mL’lik erlenlerde 30 mL olacak şekilde hazırlanan inokulant besiyerlerine bir kürdan dolusu olacak şekilde aktarılmıştır. Ardından tablodaki inokulum yaşı ve inokulum hacmi değerlerine uygun olacak şekilde, azot kaynağı olarak pepton kullanılan asit ön işlemlili ve pH 5 değerine sahip üretim besiyerlerine aşılansarak geçirilmiştir. Üç gün süreyle Tablo 2.2’de belirtilen sıcaklıklarda 150 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılan örneklerin lipidleri Bölüm 2.2.6.2’de belirtilen yöntemle ekstrakte aşamaları edilmiştir.

2.2.14. Üretilen Lipidlerin Yağ Analizleri

Optimize edilen koşullarda yüksek lipid üretimine sahip 6 maya (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) örneğinden elde edilen lipidlerin içindeki doymuş ve doymamış yağ asitlerinin saptanması amacıyla öncelikle yağ asitlerinin metil esterleri (FAME) elde edilmiş ve daha sonra GC-MS ile analiz edilmiştir.

Bu amaçla 1/10 oranına göre pH 5 olarak hazırlanan %1’lik H₂SO₄’lü gül ön işlem sıvısını içeren ve karbon kaynağı olarak peptonun kullanıldığı üretim besiyeri ile lipid ekstraksiyon aşamaları tamamlanan 6 maya örneğinin, alkolü uçmuş lipid içeren falkonlarının üzerine 10 mL BF₃ çözeltisi eklenmiş ve karışım 50 cc’lik teflon kapaklı cam tüplere konmuştur. Tüpün ağzı çok sıkı olmayacak şekilde kapatıldıktan sonra 90°C sıcak su banyosunda 45 dakika süreyle bekletilmiştir. Sürenin ardından tüpler oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuş ve karışıma 10 mL hekzan ve 5 mL su eklenerek 2 dakika süresince ayırma hunisi kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır.

Ekstraksiyon sonucunda üst fazla kalan hekzanlı kısım bir şırınga yardımıyla ayrılmış ve üzerine suyun uzaklaştırılması için göz kararı olacak şekilde susuz sodyum sülfat eklenerek faz ayrımı olana kadar beklenmiştir. Susuz hekzanlı üst faz ayrıldıktan

sonra şırınga ile çekilmiş ve 0,45µm gözenek çaplı filtreden geçirilerek ayrı bir cam tüpe aktarılmıştır. Filtreden geçirilen numuneden 100 µL alınarak üzerine 900 µL hekzan eklenip karıştırılmış ve GC-MS kolonuna enjekte edilmiştir. GC-MS koşulları aşağıda verilmiştir:

Kolon: HP 88 (100 m x 0,250 mm x 0,2 µm)

Akış hızı: 1,5 ml/dk Helyum

İnjesiyon volume: 1 µL

Split ratio: 50:1

Sıcaklık programı: 120°C 1 dk, 10°C/min hızla

175°C 10 dk, 5°C/min hızla

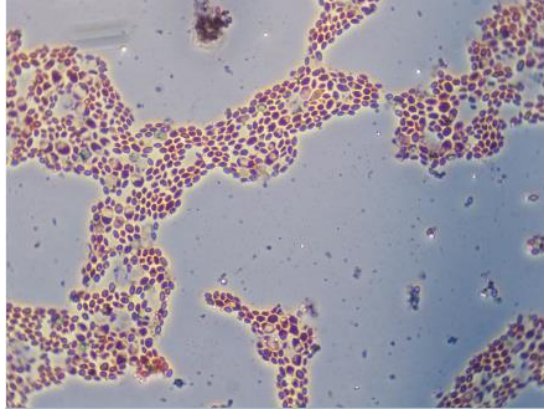
210°C 5 dk, 5°C/min hızla

230°C 10 dk

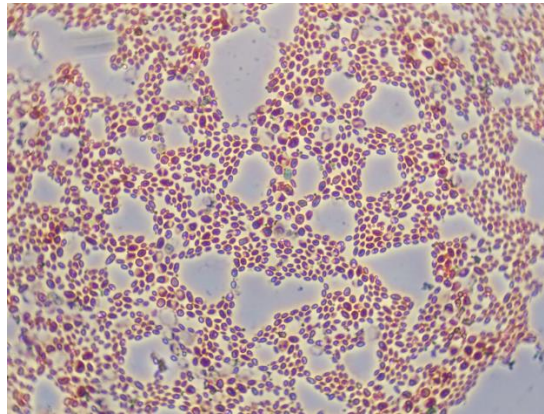
3. BULGULAR VE YORUM

3.1. Mayaların Lipid Üretimi Açısından Mikroskopik Olarak Taranması

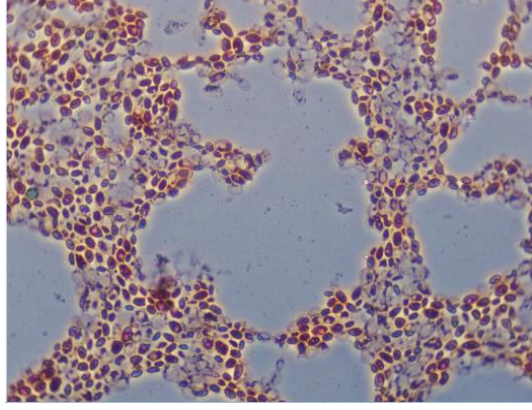
Ön çalışmalar sonucunda 162 maya örneğinden 138 tanesinin karbon kaynağı olarak atık gül posası kullanılan besiyerlerinde gelişim gösterdiği tespit edilmiştir ve lipidleri boyama özelliğine sahip Sudan Black B ile maya örneklerinin boyamaları yapılmış ardından maya örneklerinin preparatları faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. 138 maya örneğinden 16 tanesinde (6, 7, 9, 18, 21, 24, 26, 34, 48, 73, 74, 89, 93, 141, 152 ve 155 numaralı mayalar) yağ damlacıkları gözlemlenmiş ve yağ üretme özelliklerinin olduğu saptanmıştır. Lipid boyamaları yapılan maya örnekleri aşağıdaki Görsel 3.1 ile 3.6 arasında sunulmuştur.



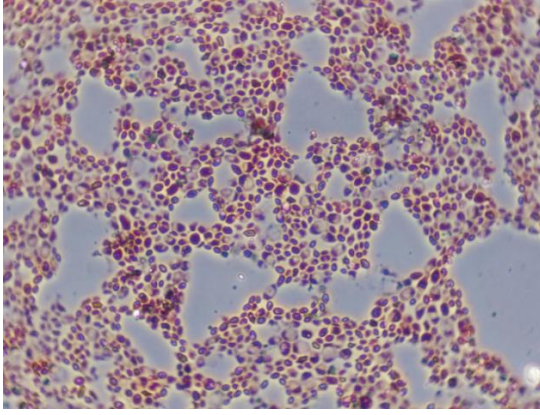
Görsel 3.1. *Wickerhamomyces subpelucosa-6* izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x)



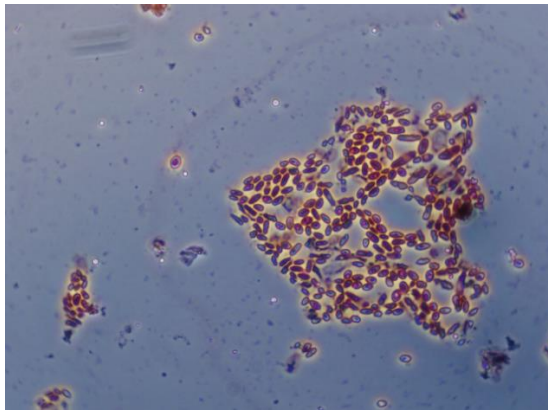
Görsel 3.2. *Candida albicans-7* izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x)



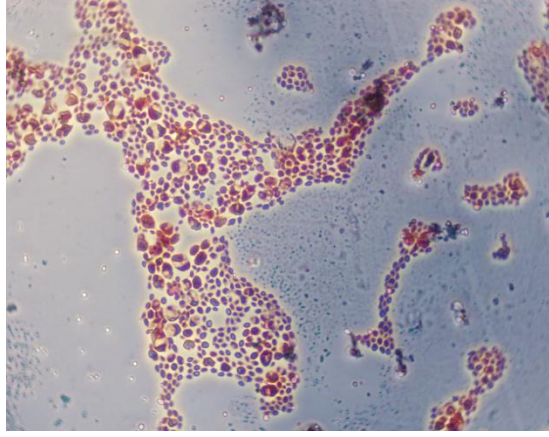
Görsel 3.3. *Yarrowia lipolytica*-18 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x)



Görsel 3.4. *Yarrowia lipolytica*-48 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x)



Görsel 3.5. *Pichia anomola*-14 izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x)

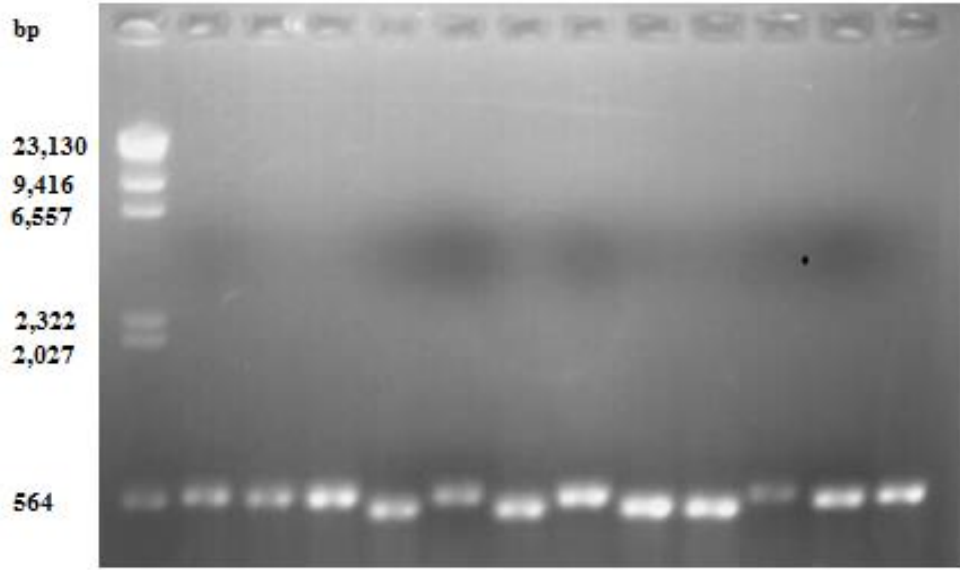


Görsel 3.6. *Kluyveromyces marxianus-155* izolatu hücrelerindeki yağ damlacıklarının faz kontrast mikroskobu görüntüsü (100x)

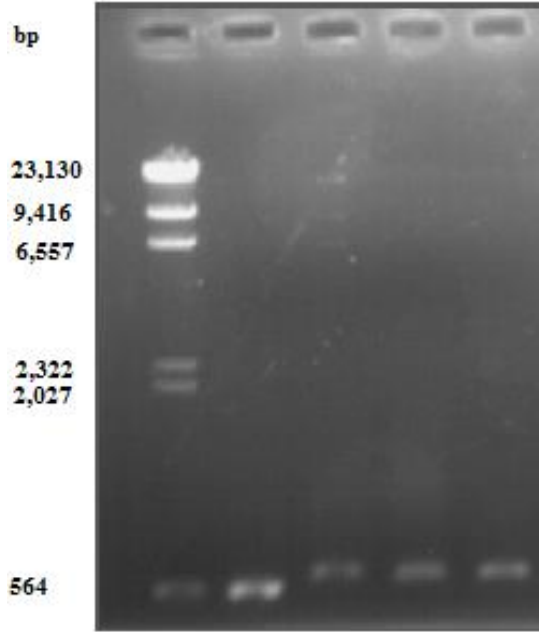
Görsellerde görüldüğü gibi, lipidleri boyanan mayalar mikroskop altında incelendiğinde, hücrelerinin içlerinde yarım ay şeklinde mavimsi ya da gri koyuluklar şeklinde yağ damlacıkları gözlemlenmiştir.

3.2. Yağ Üretme Özelliğine Sahip Maya İzolatlarının Moleküler Tekniklerle Tanımlanması

Hücre içlerinde yağ damlacıklarına sahip olan 16 maya örneğinin (6, 7, 9, 18, 21, 24, 26, 34, 48, 73, 74, 89, 93, 141, 152 ve 155 numaralı mayalar) DNA'larını gözlemlenmek amacıyla elektroforez yapılmıştır. Jel görüntülemesi yapılan her bir örneğin PCR için uygun oldukları saptanmış ve tür seviyesinde moleküler tanıları yapılmıştır. Her bir örneğe dair jel görüntüleri Görsel 3.7 ile 3.8'de ve tanımlamaları yapılan 16 maya örneği Tablo 3.1'de verilmiştir. Bir izolat *Wickerhamomyces subpellicolosa*, bir izolat *Candida albicans*, bir izolat *Wickerhamomyces anomalus*, beş izolat *Yarrowia lipolytica*, iki izolat *Saccharomyces cerevisiae*, iki izolat *Pichia kudriavzevii*, üç izolat *Kluyveromyces marxianus*, bir izolat *Pichia anomola* olarak tanımlanmıştır.



Görsel 3.7. *Maya izolatlarının elektroforez sonrasındaki jel görüntülemesi (100V, 30 dk) (sırasıyla: 6, 7, 9, 18, 21, 24, 26, 34, 48, 73, 74 ve 89 numaralı mayalar)*



Görsel 3.8. *Maya izolatlarının elektroforez sonrasındaki jel görüntülemesi (100V, 30 dk) (93, 141, 152 ve 155 numaralı mayalar)*

Tablo 3.1. Tanımlaması yapılan maya örnekleri ve türleri

Örnek no	Tür	Benzerlik (%)	Accession
6	<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i>	91	KT972112.1
7	<i>Candida albicans</i>	94	KC510076.1
9	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	92	KM589472.1
18	<i>Yarrowia lipolytica</i>	91	NG055393.1
21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94	FM180538.1
24	<i>Yarrowia lipolytica</i>	96	AB197666.1
26	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	KM279371.1
34	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	EU239379.1
48	<i>Yarrowia lipolytica</i>	97	FR856618.1
73	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KU862638.1
74	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	96	NG055077.1
89	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100	KX941983.1
93	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	KF810034.1
141	<i>Pichia anomola</i>	97	EU862177.1
152	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	KP268079.1
155	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	KC544466.1

3.3. Atık Gül Posasının Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Atık gül posasının nem, lignin, ham kül, katı yağ ve azot miktarı Tablo 3.2’de verilmiştir. Atık gül posasının nem oranı %7,70 olarak saptanmıştır. Yapılan lignin tayinine göre, atık gül posası ön işlem sıvısının %42,13 lignin içerdiği ve atık gül posasının ise %20,91 oranında lignin içerdiği saptanmıştır. Atık gül posasının ham kül miktarı %6,30 olarak bulunmuştur. Yağ miktarı ise %0,67 olarak bulunmuştur. Yapılan azot tayini sonucunda, atık gül posasının %2,91 oranında azot içerdiği saptanmıştır.

Tablo 3.2. Gül posasının bazı özellikleri

Özellik	Miktar (%)
Nem	7,70
Lignin	20,91
Ham kül	6,30
Katı yağ	0,67
Azot	2,91

3.4. Mayaların Kullandığı İndirgen Şeker Miktarı

%1’lik H₂SO₄ ve su ile hazırlanan atık gül posalı ön işlem sıvılarına yapılan tamponlu ve tamponsuz okumalar sonucunda, tampon kullanılmadığında elde edilen verilerin daha yüksek olduğu tespit edilerek sonraki deney aşamalarında tampon kullanmadan deneyler tamamlanmış ve okumalar yapılmıştır.

Sonuçlara göre %1'lik H₂SO₄ 'lü atık gül ön işlem sıvısında indirgen şeker miktarı 25,5480 mg/ml, su ile hazırlanan atık gül posalı ön işlem sıvısında indirgen şeker miktarı 2,0884 mg/mL olarak bulunmuştur.

3.4.1. Asit ön işlemlili besiyerinde indirgen şeker miktarı

Tablo 3.3'te verildiği şekliyle elde edilen sonuçlar, maya içermeyen %1'lik H₂SO₄'lü gül ön işlem sıvısındaki indirgen şeker miktarı ile karşılaştırıldığında 6 maya örneğinin (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) şeker kullandığı saptanmıştır. Bu verilere göre 6 maya izolatu kendi içinde karşılaştırıldığında en fazla indirgen şeker değerine sahip örneğin 1,20 mg/mL sonucu ile *C. albicans*-7'nin şekeri en fazla kullandığı görülmüştür.

Tablo 3.3. Asit ön işlemlili besiyerinde maya izolatları geliştirildikten sonra ortamda kalan indirgen şeker miktarları

Örnek no	Ortamda kalan indirgen şeker miktarı (mg/mL)
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> -6	1,90
<i>Candida albicans</i> -7	1,20
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	2,18
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	2,17
<i>Pichia anomola</i> -141	2,21
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	2,30

3.4.2. Su ön işlemlili besiyerinde indirgen şeker miktarı

Elde edilen sonuçlar maya içermeyen sulu gül ön işlem sıvısındaki indirgen şeker miktarı ile karşılaştırıldığında 6 maya izolatının da (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) şekeri kullandığı saptanmıştır. Tablo 3.4'teki verilere göre 6 adet maya örneği kendi içinde karşılaştırıldığında en fazla indirgen şeker değerine sahip örneğin 0,15 mg/mL sonucu ile *C. albicans*-7'nin şekeri en fazla kullandığı tespit edilmiştir.

Tablo 3.4. Maya örneklerinin su ön işlemlili besiyerinde indirgen şeker miktarları

Örnek no	İndirgen şeker miktarı (mg/mL)
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> -6	1,29
<i>Candida albicans</i> -7	0,15
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	1,18
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	1,18
<i>Pichia anomola</i> -141	1,10
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	1,12

3.5. Atık Gül Posası İçeren Besiyerinde Geliştirilen Mayaların Lipid Miktarının Belirlenmesi

Test mayaları ile atık gül posası içeren üretim besiyerinden elde edilen biyokütle ve lipid kuru ağırlığı ile lipid verimi Tablo 3.5’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre % lipid verimi 3,5’den yüksek olan mayalar (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) çalışmanın ileriki aşamaları için çalışılmak üzere seçilmiştir. Yapılan ön eleme sonucunda en yüksek % lipid değeri *C. albicans*-7 ile *P. anomola*-141 maya izolatlarında en düşük % lipid değeri ise *S. cerevisiae*-73 maya izolatında saptanmıştır.

Tablo 3.5. Atık gül posasında mayaların biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid verimi ve %lipid miktarı

Örnek no	Kuru hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> -6	0,037	24,66	0,016	1,06	4,32
<i>Candida albicans</i> -7	0,035	23,33	0,025	1,66	7,11
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> -9	0,038	25,33	0,006	0,40	1,57
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	0,036	24,00	0,019	1,26	5,27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -21	0,046	30,66	0,013	0,86	2,82
<i>Yarrowia lipolytica</i> -24	0,039	26,00	0,012	0,80	3,07
<i>Pichia kudriavzevii</i> -26	0,062	41,33	0,010	0,66	1,61
<i>Yarrowia lipolytica</i> -34	0,031	20,66	0,007	0,46	2,25
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	0,051	34,00	0,018	1,20	3,52
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -73	0,054	36,00	0,008	0,53	1,48
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -74	0,048	32,00	0,017	1,13	3,54
<i>Pichia kudriavzevii</i> -89	0,034	22,66	0,013	0,86	3,82
<i>Yarrowia lipolytica</i> -93	0,062	41,33	0,020	1,33	3,22
<i>Pichia anomola</i> -141	0,044	29,55	0,030	2,00	6,81
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -152	0,040	26,66	0,011	0,73	2,74
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	0,045	30,00	0,016	1,06	3,55

3.6. Farklı Ön İşlemlerin Lipid Miktarına Etkisi

Ön eleme yapılarak seçilen 6 adet maya örneğinin (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) %1'lik H₂SO₄ ile muamele edilen ve su ile hazırlanan atık gül posalarını içeren ön işlem sıvısının üretim besiyerinde kullanılması sonucu elde edilen % lipid verimleri Tablo 3.6 ve Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.6. 10 gram atık gül posalı asitli ön işlem sıvısı ile hazırlanan besiyerinde elde edilen biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid verimi ve %lipid miktarı

Örnek no	Kuru Hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> -6	0,005	3,33	0,021	1,16	34,83
<i>Candida albicans</i> -7	0,007	4,46	0,025	1,38	29,61
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	0,010	6,66	0,031	1,72	25,82
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	0,010	6,66	0,028	1,55	23,27
<i>Pichia anomola</i> -141	0,010	6,66	0,027	1,50	22,52
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	0,007	4,66	0,028	1,55	33,26

Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan ön işlem sıvısının üretim besiyerinde kullanılması 6 maya örneği için de (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) % lipid oranını arttırmıştır.

Tablo 3.7. 10 gram atık gül posalı sulu ön işlem sıvılı besiyeri ile hazırlanan üretim besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid verimi ve %lipid miktarı

Örnek no	Kuru Hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> -6	0,010	6,66	0,019	1,05	15,76
<i>Candida albicans</i> -7	0,004	2,66	0,006	0,33	12,40
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	0,010	6,66	0,012	0,66	09,90
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	0,005	3,33	0,011	0,61	18,00
<i>Pichia anomola</i> -141	0,004	2,66	0,012	0,66	24,81
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	0,010	6,66	0,018	1,00	15,01

Elde edilen sonuçlara göre, su ile hazırlanan ön işlem sıvısının %1'lik H₂SO₄ ile hazırlanan ön işlem sıvısına oranla *P. anomola*-141 örneği dışında kalan tüm mayalarda (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48 ve *K. marxianus*-155) daha düşük %lipid değerlerine sahip olduğu saptanmıştır.

3.7. Ön İşlem Sıvısındaki Atık Gül Posası Miktarının Lipid Miktarına Etkisi

Önceki deneylerde 1/10 (10 g atık gül posası+ 100 mL distile su veya (10 g atık gül posası+ 100 mL %1'lik H₂SO₄) oranına göre hazırlanan ön işlem sıvısı 12 g ve 15 g atık gül posası ve 100 mL distile su ve 100 mL %1'lik H₂SO₄ ile muamele edilerek lipid üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen % lipid değerleri Tablo 3.8 ila Tablo 3.11'de verilmiştir.

12 g atık gül posası ve 100 mL distile su ile hazırlanan ön işlem sıvısının üretim besiyerinde kullanılması sonucunda 6 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) için elde edilen % lipid değerleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. 12 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan sulu ön işlem sıvılı üretim besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid verimi ve %lipid miktarı

Örnek no	Kuru Hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> -6	0,015	10,0	0,013	0,72	7,20
<i>Candida albicans</i> -7	0,014	9,33	0,014	0,77	8,25
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	0,015	10,0	0,025	1,38	13,8
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	0,015	10,0	0,030	1,66	16,6
<i>Pichia anomola</i> -141	0,014	9,33	0,013	0,72	7,71
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	0,012	8,00	0,014	0,77	9,62

Elde edilen sonuçlara göre 12 g atık gül posası kullanılarak hazırlanan ön işlem sıvısı, 1/10 oranına göre hazırlanan ön işlem sıvısına göre daha yüksek % lipid değerlerine sahiptir. Bu nedenle su ile hazırlanan ön işlem besiyerlerinde gül atık posasının daha yüksek hacimde kullanılmasının, lipid üretimini artırıcı rol oynayabileceği düşünülmüştür.

12 g atık gül posası ve 100 mL %1'lik H₂SO₄ ile hazırlanan ön işlem sıvısının üretim besiyerinde kullanılması sonucunda 6 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) için elde edilen % lipid değerleri Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9. 12 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan asitli ön işlem sıvılı besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid verimi ve %lipid miktarı

Örnek no	Kuru Hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> - 6	0,005	3,33	0,016	0,88	26,42
<i>Candida albicans</i> -7	0,004	2,66	0,025	1,38	51,87
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	0,007	4,66	0,018	1,00	21,45
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	0,006	4,00	0,019	1,05	26,25
<i>Pichia anomola</i> -141	0,005	3,33	0,017	0,94	28,22
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	0,003	2,00	0,015	0,83	41,50

15 g atık gül posası ve 100 mL distile su kullanılarak hazırlanan ön işlem sıvısının üretim besiyerinde kullanılması sonucunda elde edilen % lipid değerleri Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10. 15 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan sulu ön işlem sıvılı üretim besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid verimi ve %lipid miktarı

Örnek no	Kuru Hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> - 6	0,016	10,6	0,015	0,83	7,78
<i>Candida albicans</i> -7	0,016	10,6	0,014	0,93	8,72
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	0,015	10,0	0,026	1,44	14,4
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	0,016	10,6	0,024	1,33	12,4
<i>Pichia anomola</i> -141	0,015	10,0	0,016	0,88	8,80
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	0,014	9,33	0,021	1,16	12,4

Elde edilen sonuçlara göre atık gül posasının 12 gramdan 15 grama çıkarılması 6 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) için de daha düşük % lipid değerlerinin elde edilmesine yol açmıştır. Bu nedenle %1'lik H₂SO₄ kullanılarak hazırlanan ön işlem sıvılarında atık gül posasının hacminin artırılmasının lipid üretimini baskılayıcı bir etkene sahip olabileceği düşünülmüştür.

15 g atık gül posası ve 100 mL %1'lik H₂SO₄ kullanılarak hazırlanan ön işlem sıvısının üretim besiyerinde kullanılması sonucunda elde edilen % lipid değerleri Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.11. 15 gram atık gül posası kullanılarak hazırlanan asitli ön işlem sıvılı besiyerinde biyokütle, lipid kuru ağırlığı, lipid verimi ve %lipid miktarı

Örnek no	Kuru Hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> -6	0,005	3,33	0,024	1,33	39,9
<i>Candida albicans</i> -7	0,006	4,00	0,021	1,16	29,0
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	0,006	4,00	0,017	0,94	23,5
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	0,010	6,66	0,030	1,66	24,9
<i>Pichia anomola</i> -141	0,005	3,33	0,019	1,05	31,5
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	0,004	2,66	0,004	0,22	8,27

Elde edilen sonuçlara göre, 15 g atık gül posasının kullanılması 3 maya örneğinde (*W. subpelliculosus*-6, *Y. lipolytica*-18 ve *P. anomola*-141) 12 g atık gül posası kullanılmasına oranla daha yüksek % lipid değerlerine sahiptir. 1/10 oranına göre hazırlanan ön işlem sıvısının üretim besiyerinde kullanılması sonucunda elde edilen % lipid değerleri bu deneyde elde edilen % lipid değerleri ile karşılaştırıldığında ise *K. marxianus*-155 dışında kalan 5 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48 ve *P. anomola*-141) için de daha yüksek % lipid değerleri elde edilmiştir.

3.8. Mayaların Geliştiği Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Üç gün süreyle inokulant besiyerinde inkübe edilen 6 maya örneği (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155), bu sürenin sonucunda atık gül posası ve %1'lik H₂SO₄ içeren, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6 ve pH 7 değerlerine göre hazırlanan üretim besiyerlerine aşılınmış ve 24. ve 48. saatlerde maya sayımları yapılmıştır. Maya kolonileri YPD (Yeast peptone dextrose) agar besiyerine damla ekimler halinde 10⁷ ye kadar dilüsyonlar hazırlanarak ekilmiş ve 1 gün süreyle 25°C etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonra maya sayımları yapılmıştır. 24. ve 48. saatler sonunda elde edilen sonuçlar Tablo 3.12'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, 24 saat inkübe olan mayaların sayımlarında genel olarak pH 3 ve pH 4 değerlerinde düşük oranda üreme olduğu saptanmıştır. Tüm maya örnekleri için pH 5'te en yüksek koloni sayımlarına ulaşılmıştır.

48 saat süreyle inkübe olan maya örneklerinin koloni sayımlarına göre, pH 3 tüm maya örnekleri için en düşük koloni sayımlarının yapıldığı ve pH 6 ise 6 maya (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve

K. marxianus-155) için de en yüksek koloni sayılarına ulaşıldığı değer olarak saptanmıştır.

Sulu ön işlem sıvısı ile hazırlanan üretim besiyerinde mayaların gelişmesi 24 ve 48 saat sonra belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 saat inkübe olan maya örneklerinin sayımlarında pH 3'te en düşük maya sayım değerleri görülmüş olup en yüksek maya sayımları tüm maya örnekleri için pH 5 olarak bulunmuştur.

48 saat süreyle inkübe olan maya örneklerinin sayımlarında aynı şekilde pH 3 değerinde en düşük maya sayımları yapılırken *C. albicans*-7 ile *K. marxianus*-155 numaralı mayalar için pH 5, *Y. lipolytica*-18 numaralı maya için pH 7, *W. subpelliculosus*-6, *Y. lipolytica*-48 ve *P. anomola*-141 örnekleri için pH 6 değerlerinde en yüksek maya sayımları yapılmıştır. Elde edilen değerler Tablo 3.12'de verilmiştir.

Tablo 3.12. Sulu ve asitli ön işlem sıvısı ile hazırlanan üretim besiyerinde 24 ve 48 saat inkübe olan mayaların sayımları (kob/ml)

Örnek	pH	İnkübasyon süresi(s)	<i>W. subpelliculosus</i> -6	<i>C. albicans</i> -7	<i>Y. lipolytica</i> -18	<i>Y. lipolytica</i> -48	<i>P. anomola</i> -141	<i>K. marxianus</i> -155
pH 3	Sulu ön işlem	24	3,00x10 ⁵	7,00x10 ⁵	1,70x10 ⁶	3,00x10 ⁵	1,50x10 ⁵	1,10x10 ⁵
		48	7,00x10 ⁴	3,00x10 ⁶	5,00x10 ⁴	1,10x10 ⁵	1,70x10 ⁵	2,00x10 ⁵
	Asitli ön işlem	24	1,00x10 ⁵	2,00x10 ⁵	-	3,00x10 ⁵	1,00x10 ⁴	1,80x10 ⁵
		48	4,00x10 ⁵	3,00x10 ⁵	3,00x10 ⁴	1,00x10 ⁴	5,00x10 ⁵	5,00x10 ⁴
pH 4	Sulu ön işlem	24	2,10x10 ⁶	3,00x10 ⁶	2,30x10 ⁶	3,10x10 ⁵	6,20x10 ⁵	6,80x10 ⁴
		48	1,05x10 ⁵	1,70x10 ⁷	2,10x10 ⁵	4,20x10 ⁵	5,10x10 ⁵	3,30x10 ⁵
	Asitli ön işlem	24	3,10x10 ⁶	4,40x10 ⁶	2,90x10 ⁶	1,00x10 ⁶	6,70x10 ⁵	2,60x10 ⁵
		48	1,60x10 ⁶	2,00x10 ⁶	5,60x10 ⁵	4,10x10 ⁵	6,00x10 ⁶	3,70x10 ⁵
pH 5	Sulu ön işlem	24	4,60x10 ⁶	4,30x10 ⁶	2,90x10 ⁶	4,40x10 ⁵	8,40x10 ⁵	7,20x10 ⁵
		48	1,70x10 ⁵	1,90x10 ⁷	2,30x10 ⁵	4,90x10 ⁵	5,40x10 ⁵	4,50x10 ⁵
	Asitli ön işlem	24	4,40x10 ⁶	4,90x10 ⁶	3,90x10 ⁶	4,30x10 ⁶	8,50x10 ⁵	7,90x10 ⁵
		48	1,80x10 ⁶	2,10x10 ⁶	5,70x10 ⁵	4,20x10 ⁵	6,00x10 ⁶	4,90x10 ⁵
pH 6	Sulu ön işlem	24	3,00x10 ⁶	2,70x10 ⁶	2,00x10 ⁶	4,20x10 ⁵	5,80x10 ⁵	6,00x10 ⁵
		48	2,10x10 ⁵	4,00x10 ⁶	2,90x10 ⁵	5,70x10 ⁵	5,60x10 ⁵	4,10x10 ⁵
	Asitli ön işlem	24	3,20x10 ⁶	3,30x10 ⁶	1,50x10 ⁶	1,10x10 ⁶	8,20x10 ⁵	6,30x10 ⁵
		48	2,70x10 ⁶	2,80x10 ⁶	6,10x10 ⁵	4,90x10 ⁵	6,10x10 ⁶	5,30x10 ⁵
pH 7	Sulu ön işlem	24	2,70x10 ⁶	2,10x10 ⁶	1,70x10 ⁶	3,60x10 ⁵	4,30x10 ⁵	5,70x10 ⁵
		48	1,30x10 ⁵	2,00x10 ⁶	3,90x10 ⁵	3,90x10 ⁵	4,00x10 ⁵	4,00x10 ⁵
	Asitli ön işlem	24	3,10x10 ⁶	2,80x10 ⁶	3,00x10 ⁶	1,00x10 ⁶	7,00x10 ⁵	6,10x10 ⁵
		48	1,10x10 ⁶	2,00x10 ⁶	3,70x10 ⁵	3,70x10 ⁵	5,10x10 ⁶	4,10x10 ⁵

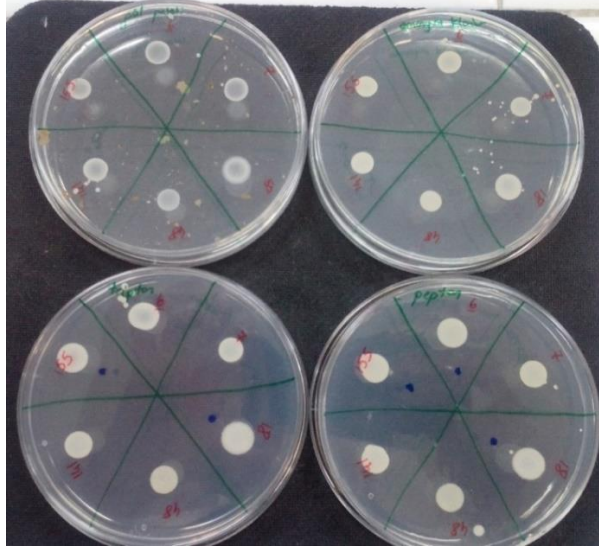
3.9. Farklı Azot Kaynakları İçeren Besiyerlerinde Mayaların Geliştirilmesi

YPD agar besiyerinde azot kaynağı olarak; tripton, amonyum klorür, sodyum nitrat, yeast ekstrakt, pepton, atık gül posası, beef ekstrakt ve amonyum sülfat kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerine 10 µL maya örnekleri ekilerek gelişme durumları incelenmiştir. Elde edilen gelişme miktarı (mm) ölçüm değerleri aşağıdaki Tablo 3.13’de verilmiştir.

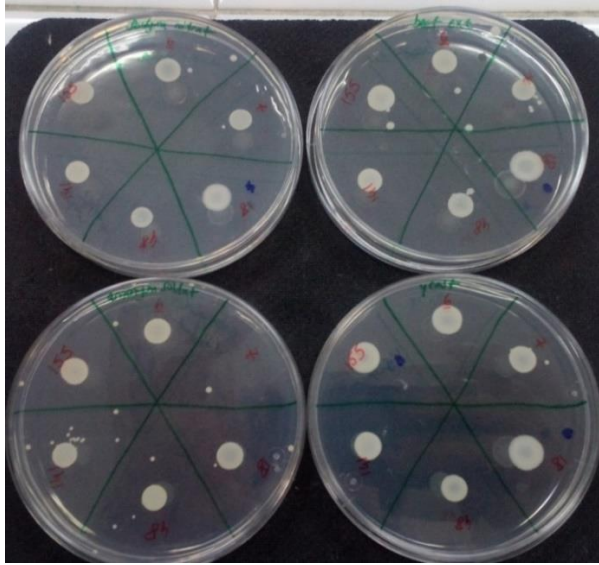
Tablo 3.13. Farklı azot kaynaklarında maya gelişimleri (oluşan zon çapı mm)

Örnek Azot kaynağı	<i>W. subpelliculosus-6</i>	<i>C. albicans-7</i>	<i>Y. lipolytica-18</i>	<i>Y. lipolytica-48</i>	<i>P. anomola-141</i>	<i>K. marxianus-155</i>
Tripton	0,9 ±0,092	0,9±0,076	1,0±0,09	0,8±0,07	0,8±0,05	0,9±0,10
Amonyum klorür	0,8±0,092	0,7±0,076	0,8±0,09	0,70±0,07	0,7±0,05	0,7±0,10
Sodyum nitrat	0,7±0,092	0,7±0,076	0,9±0,09	0,7±0,07	0,7±0,05	0,8±0,10
Yeast ekstakt	0,9±0,092	0,8±0,076	1,0±0,09	0,7±0,07	0,7±0,05	1,0±0,10
Pepton	1,0±0,092	0,8±0,076	1,0±0,09	0,9±0,07	0,8±0,05	0,9±0,10
Atık gül posası	0,8±0,092	0,7±0,076	1,0±0,09	0,7±0,07	0,8±0,05	0,7±0,10
Beef ekstrakt	0,8±0,092	0,7±0,076	1,0±0,09	0,8±0,07	0,7±0,05	0,8±0,10
Amonyum sülfat	0,8±0,092	0,7±0,076	0,8±0,09	0,8±0,07	0,7±0,05	0,8±0,10
Standart sapma	0,0916	0,0755	0,0916	0,0744	0,0517	0,1035

Görsel 3.9 ile 3.10’da gösterildiği üzere, 3 günün ardından cetvelle yapılan çap ölçümlerine göre, mayaların 0,6 mm⁻¹ cm aralığında yayılım gösterdiği tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre, azot kaynağı olarak seçilen peptonda, 5 maya örneği için (*W. subpelliculosus-6*, *C. albicans-7*, *Y. lipolytica-18*, *Y. lipolytica-48*, *P. anomola-141*) en yüksek çap değerlerine ulaşılmış ve *K. Marxianus-155* numaralı maya örneği için ise yeast extract’ın en yüksek çap değerine sahip olduğu belirlenmiştir.



Görsel 3.9. Atık gül posası, amonyum klorür, tripton ve pepton azot kaynaklarını içeren besiyerlerinde maya gelişmesi



Görsel 3.10. Sodyum nitrat, et ekstraktı, amonyum sülfat ve maya ekstraktı azot kaynaklarını içeren besiyerlerinde maya gelişmesi

3.10. Farklı Azot Kaynaklarında Geliştirilen Mayaların Lipid Boyamalarının Yapılması

8 farklı azot kaynağı (tripton, amonyum klorür, sodyum nitrat, yeast ekstrakt, pepton, atık gül posası, beef ekstrakt ve amonyum sülfat) kullanılarak hazırlanan YPD (yeast peptone dextrose) agar besiyerinde geliştirilen 6 maya örneğinin (W.

subpelliculosus-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) Sudan black B ile boyanıp mikroskopta incelenmesi sonucunda azot kaynağının pepton olduğu preparatlarda, hazırlanan diğer preparatlara oranla daha fazla yağ hücrelerinin olduğu saptanmıştır. Bu nedenle optimizasyon deney tasarımında azot kaynağı olarak peptonun kullanılmasına karar verilmiştir.

3.11. Atık Gül Posası Kullanılarak Lipid Üretimi Parametrelerinin Optimizasyonu

Yapılan deneylerde mayaların, 10 g atık gül posası göre pH 5 olarak hazırlanan %1'lik H₂SO₄'lü gül ön işlem sıvısını içeren ve karbon kaynağı olarak peptonun kullanıldığı üretim besiyeri ile yapılan lipid ekstaksiyonlarında daha yüksek verimlere sahip oldukları saptanmıştır. Lipid üretim parametrelerinin yanıt düzey yöntemi ile optimizasyon deneylerinde 15 deneysel noktadan 2 tekrarlı 3 değişkenden oluşan "Box Behnken Deney Tasarımı Yöntemi" kullanılmış ve Tablo 3.14'de seviyeleri verilen sıcaklık (°C) (X₁), inokulum yaşı (saat) (X₂), inokulum hacmi (ml) (X₃) parametrelerinin istatistiksel kombinasyonuna karşı elde edilen lipid yüzdeleri hesaplanmıştır. Minitab 17 istatistik programının yüzey optimizasyonu kullanılarak "Response optimizer" seçeneğinden herbir maya örneğinin lipid üretimi için maksimum değerlerini belirleyen koşullarda lipid üretimi yapılmıştır.

Tablo 3.14. Maksimum lipid eldesi için çalışılması gereken koşullar

Örnek no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)
<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i> - 6	35	38	25
<i>Candida albicans</i> -7	30	41	15
<i>Yarrowia lipolytica</i> -18	35	38	25
<i>Yarrowia lipolytica</i> -48	30	36	15
<i>Pichia anomola</i> -141	35	37	25
<i>Kluyveromyces marxianus</i> -155	30	35	25

W. subpelliculosus-6 ile yapılmış ve elde edilen değerler Tablo 3.15'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 35°C sıcaklık, 33 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi parametreleri kullanıldığında en yüksek % lipid değeri olan %40'a ulaşılmıştır.

Tablo 3.15. *W. subpelliculosus-6* 'dan elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Kuru hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
1	30	48	25	0,010	5,33	0,028	1,40	26,26
2	30	18	25	0,008	4,00	0,004	0,20	5,00
3	35	18	15	0,009	4,66	0,002	0,10	2,14
4	30	33	15	0,010	5,33	0,002	1,00	18,76
5	30	33	15	0,010	5,33	0,022	1,10	20,63
6	30	18	5	0,017	8,66	0,012	0,60	6,92
7	25	48	15	0,013	6,66	0,023	1,15	17,26
8	35	33	5	0,008	4,00	0,013	0,65	16,25
9	25	18	15	0,013	6,66	0,008	0,40	6,00
10	35	48	15	0,013	6,66	0,012	0,60	9,00
11	30	48	5	0,009	4,66	0,016	0,80	17,16
12	25	33	5	0,010	5,33	0,022	1,10	20,63
13	35	33	25	0,008	4,00	0,032	1,60	40,00
14	25	33	25	0,010	5,33	0,025	1,25	23,45
15	30	33	15	0,008	4,00	0,021	1,05	26,25

Box Behnken yanıt yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin lipid yüzdesi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiş ve Tablo 3.16'da gösterilmiştir. *W. subpelliculosus-6*'dan elde edilen lipid yüzdesi inokulum yaşının (saat) (X_2) artması ile doğrusal olarak artmıştır. İnokulum yaşının aynı zamanda kuadrik (2.derece polinom) etkisi de vardır ($p<0.05$). Lipid yüzdesi üzerine parametrelerin ikili etkisi gözlenmemiştir ($p>0,05$). Çalışılan koşullarda lipid verimi üzerine sıcaklığın ve inokulum hacminin etkisi görülmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 3.16. *W. subpelliculosus-6'dan üretilen lipid yüzeyinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi*

		DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model		9	1266,48	140,72	3,87	0,075
	Lineer	3	454,37	151,456	4,16	0,079
	sıcaklık (X1)	1	0	0	0	0,998
	inokulum yaşı (X2)	1	320,3	320,298	8,8	0,031
	inokulum hacmi (X3)	1	134,07	34,07	3,68	0,113
	İkinci derece polinom	3	661,63	220,545	6,06	0,04
	sıcaklık*sıcaklık (X1*X1)	1	2,93	2,933	0,08	0,788
	inokulum yaşı*inokulum yaşı (X2*X2)	1	566,7	566,7	15,57	0,011
	inokulum hacmi*inokulum hacmi (X3*X3)	1	61,88	61,879	1,7	0,249
	İkili etkileşim	3	150,48	50,159	1,38	0,351
	sıcaklık*inokulum yaşı (X1*X2)	1	4,84	4,84	0,13	0,73
	sıcaklık*inokulum hacmi (X1*X3)	1	109,52	106,516	3,01	0,143
	inokulum yaşı*inokulum hacmi (X2*X3)	1	36,12	36,12	0,99	0,365
Hata		5	181,96	36,392		
	Uyum eksikliği (lack of fit)	3	151,57	50,523	3,32	0,024
	Saf hata	2	30,39	15,197		
Toplam		14	1448,44			

W. subpelliculosus-6 için deneysel verilerin model uygulaması sonucunda elde edilen denklem:

$$\begin{aligned} \text{lipid 6 (\%)} = & -39 + 1,05*X1 + 4,20*X2 - 4,62*X3 \\ & - 0,036 X1*X1 - 0,0551 X2*X2 \\ & + 0,0409 X3*X3 - 0,0147 X1*X2 \\ & + 0,1047 X1*X3 + 0,0200 X2*X3 \end{aligned}$$

Modelden elde edilen lipid (%) verileri Tablo 3.17'de verilmiştir.

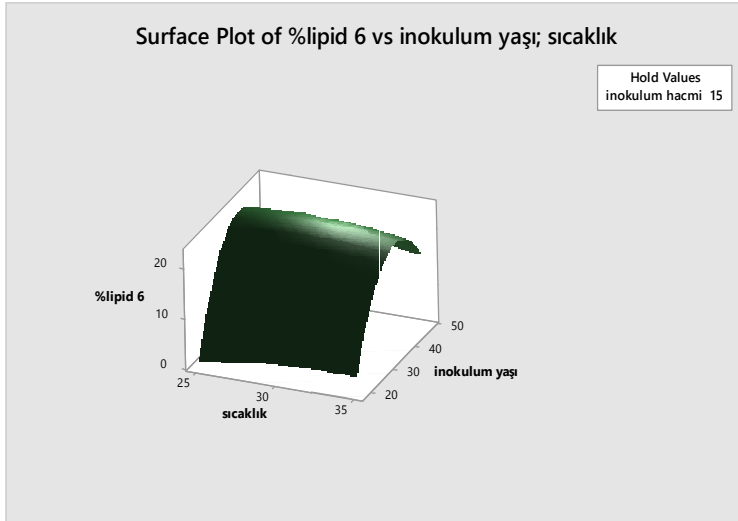
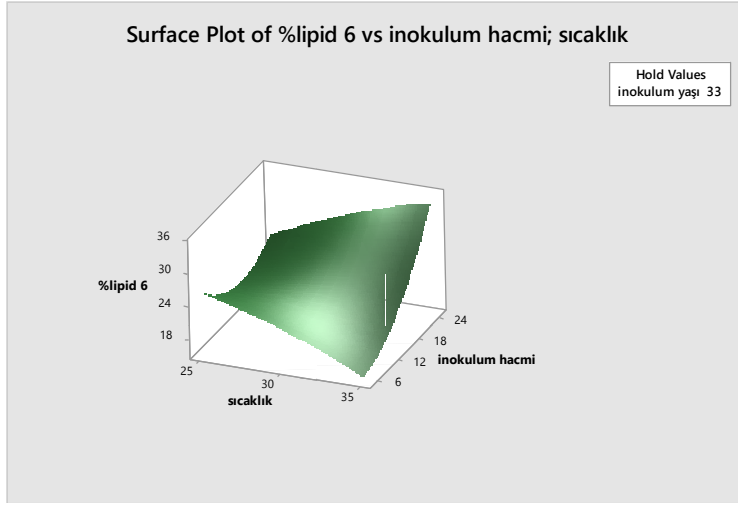
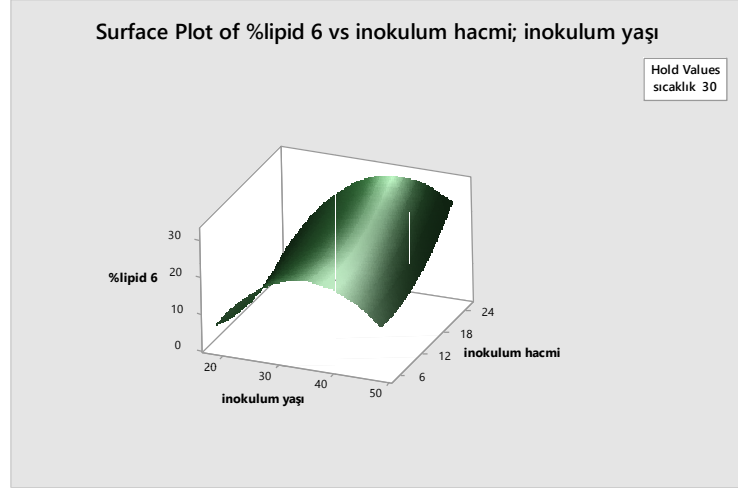
Tablo 3.17. *W. Subpelliculosus-6* için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi

Deney No	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Lipid (%) ¹	Lipid (%) ²
1	30	48	25	26,26	27,01
2	30	18	25	5,00	8,35
3	35	18	15	2,14	3,38
4	30	33	15	18,76	21,88
5	30	33	15	20,63	21,88
6	30	18	5	6,92	6,17
7	25	48	15	17,26	16,02
8	35	33	5	16,25	15,76
9	25	18	15	6,00	1,17
10	35	48	15	9,00	13,83
11	30	48	5	17,16	12,81
12	25	33	5	20,63	26,21
13	35	33	25	40,00	34,41
14	25	33	25	23,45	23,94
15	30	33	15	26,25	21,88

¹ Modelin belirlediği parametrelerde yapılan lipid ekstraksiyonu sonucunda elde edilen deneysel % lipid değeri

² Modelin bulduğu % lipid değeri

İncelenen parametrelerin *W. subpelliculosus-6*'dan elde edilen lipid üretimi (%) üzerine etkisinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 3.1'de verilmiştir. Parametrelerin orta noktaları sabit alınarak çizilen inokulum hacmi ile inokulum yaşı değişimi grafiğinde inokulum hacminin artmasıyla lipid yüzdesi artmıştır. İnokulum yaşının artması sonucunda ise lipid yüzdesi belli bir değere kadar artarken bir noktadan sonra düşmeye başlamıştır. Sıcaklığın artması ise yüzde lipid değerini olumlu olarak etkilemiştir.



Şekil 3.1. *W. subpelliculosus*-6 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları

C. albicans-7 için elde edilen sonuçlar Tablo 3.18’de verilmiş olup, 30°C sıcaklık, 33 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi parametreleri kullanıldığında en yüksek % lipid değeri olan %20,63’e ulaşılmıştır.

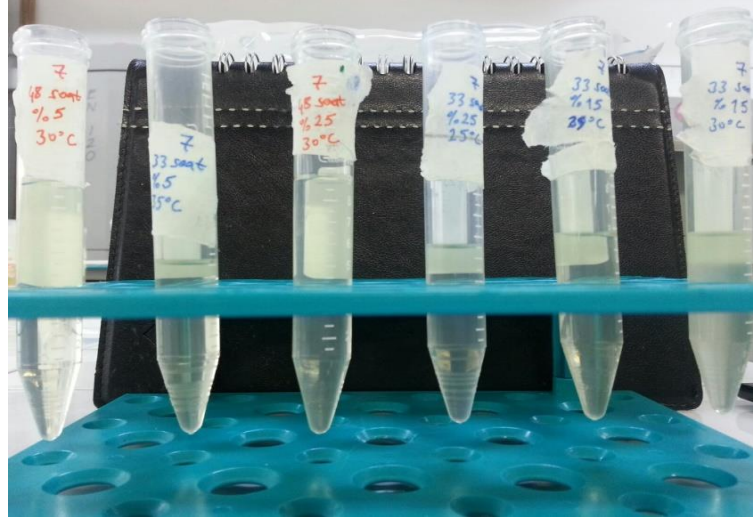
C. albicans-7’nin farklı parametrelerde oluşturduğu lipidli kısım Görsel 3.11de gösterilmiş olup en alttaki renksiz (şeffaf) tabaka, lipidleri içeren alf faz olarak gözlemlenmiş ve Görsel 3.12’de ilgili kısmın ayrı bir flakona pastör pipeti ile çekilerek aktarılmış hali gösterilmiştir.

Tablo 3.18. *C. albicans-7*’den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Kuru hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
1	30	48	25	0,018	9,33	0,030	1,5	16,07
2	30	18	25	0,016	8,00	0,017	0,85	10,62
3	35	18	15	0,009	4,66	0,012	0,6	12,87
4	30	33	15	0,013	6,66	0,022	1,1	16,51
5	30	33	15	0,010	5,33	0,022	1,1	20,63
6	30	18	5	0,016	8,00	0,015	0,75	9,37
7	25	48	15	0,016	8,00	0,027	1,35	16,87
8	35	33	5	0,013	6,66	0,020	1	15,01
9	25	18	15	0,017	8,66	0,014	0,7	8,08
10	35	48	15	0,014	7,33	0,024	1,2	16,37
11	30	48	5	0,013	6,66	0,019	0,95	14,26
12	25	33	5	0,012	6,00	0,016	0,8	13,33
13	35	33	25	0,012	6,00	0,014	0,7	11,66
14	25	33	25	0,016	8,00	0,016	0,8	10,00
15	30	33	15	0,013	6,66	0,024	1,2	18,01



Görsel 3.11. *C. albicans-7*’nin farklı parametrelerde oluşturduğu lipidli kısım (en alt şeffaf tabaka)



Görsel 3.12. *C. albicans-7*'nin farklı parametrelerdeki lipitli kısmı içeren alt fazının pastör pipeti ile ayrı bir falkona alınmış hali

Box Behnken yanıt yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin lipid yüzdesi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Tablo 3.19'da *C. albicans-7*'den elde edilen lipid yüzdesi inokulum yaşının (saat) (X_2) artması ile doğrusal olarak artmıştır. İnokulum yaşının aynı zamanda kuadrik (2.derece polinom) etkisi de vardır ($p < 0,05$). Sıcaklığın lipid verimi üzerine kuadrik etkisi görülmüştür ($p < 0,05$). Lipid yüzdesi üzerine parametrelerin ikili etkisi gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Tablo 3.19. *C. albicans-7*'den üretilen lipid yüzdesinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi

			DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model			9	155,522	17,2802	4,09	0,068
	Lineer		3	72,93	24,3099	5,75	0,045
		sıcaklık (X1)	1	7,277	7,2771	1,72	0,247
		inokulum yaşı (X2)	1	64,015	64,0146	15,14	0,012
		inokulum hacmi (X3)	1	1,638	1,6381	0,39	0,561
	İkinci derece polinom		3	75,518	25,1726	5,95	0,042
		sıcaklık*sıcaklık (X1*X1)	1	22,307	22,3065	5,28	0,07
		inokulum yaşı*inokulum yaşı (X2*X2)	1	20,878	20,8781	4,94	0,077
		inokulum hacmi*inokulum hacmi (X3*X3)	1	43,324	43,3236	10,25	0,024
	İkili etkileşim		3	7,075	2,3582	0,56	0,665
		sıcaklık*inokulum yaşı (X1*X2)	1	6,996	6,996	1,65	0,255
		sıcaklık*inokulum hacmi (X1*X3)	1	0	0,0001	0	0,996
		inokulum yaşı*inokulum hacmi (X2*X3)	1	0,078	0,0784	0,02	0,89
Hata			5	21,143	4,2286		
	Uyum eksikliği (lack of fit)		3	12,447	4,1489	0,95	0,548
	Saf hata		2	8,696	4,3881		
Toplam			14	176,665			

C. albicans-7 için deneysel verilerin model uygulaması sonucunda elde edilen denklem:

$$\begin{aligned} \text{lipid 7 (\%)} = & -117,6 + 6,67 *X1 + 1,401 *X2 - 0,955 *X3 \\ & - 0,0983 X1*X1 - 0,01057 X2*X2 \\ & - 0,0343 X3*X3 - 0,0176 X1*X2 \\ & - 0,0001 X1*X3 + 0,00093 X2*X3 \end{aligned}$$

Modelden elde edilen lipid (%) verileri Tablo 3.20’de verilmiştir.

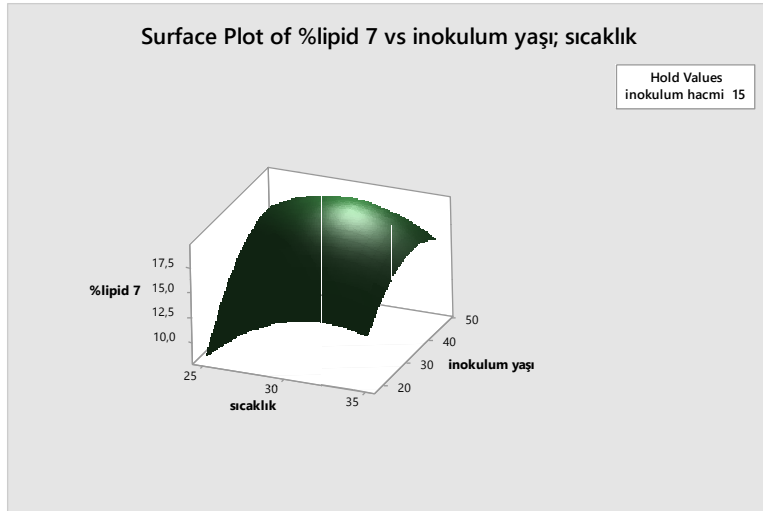
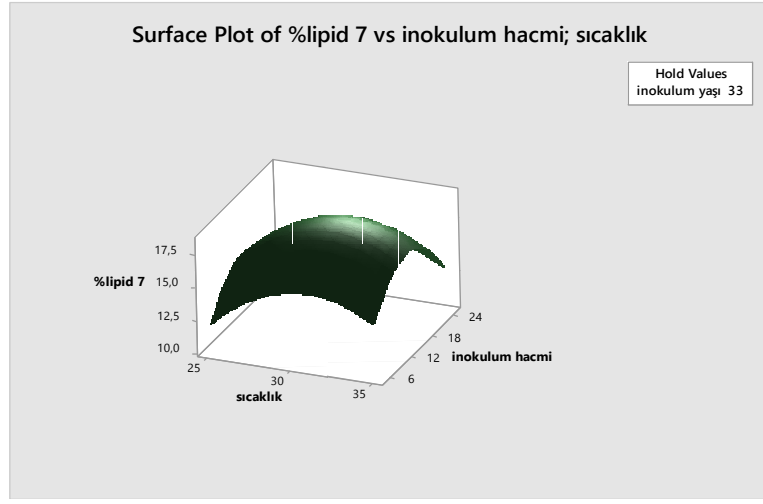
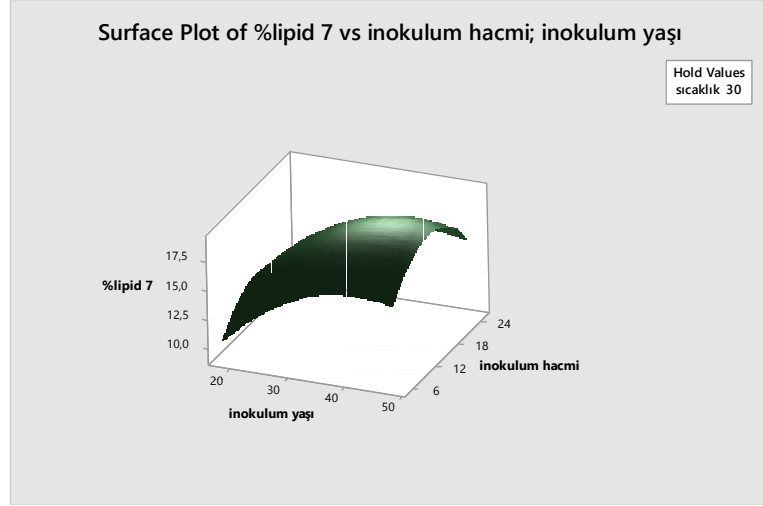
Tablo 3.20. *C. albicans-7 için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi*

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Lipid (%) ¹	Lipid (%) ²
1	30	48	25	16,07	15,10
2	30	18	25	10,62	9,16
3	35	18	15	12,87	12,99
4	30	33	15	16,51	18,38
5	30	33	15	20,63	18,38
6	30	18	5	9,37	10,34
7	25	48	15	16,87	16,74
8	35	33	5	15,01	13,91
9	25	18	15	8,08	8,44
10	35	48	15	16,37	16,01
11	30	48	5	14,26	15,72
12	25	33	5	13,33	11,99
13	35	33	25	11,66	13,00
14	25	33	25	10,00	11,10
15	30	33	15	18,01	18,38

¹ Modelin belirlediği parametrelerde yapılan lipid ekstraksiyonu sonucunda elde edilen deneysel % lipid değeri

² Modelin bulduğu % lipid değeri

İncelenen parametrelerin *C. albicans-7* için elde edilen lipid üretimi (%) üzerine etkisinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 3.2’de verilmiştir. Parametrelerin orta noktaları sabit alınarak çizilen inokulum hacmi ile inokulum yaşı değişiminde her iki parametre değerlerinin artışı ile lipid yüzdesi belirli bir değere kadar artarken bir noktadan sonra bu artış hızı azalmıştır. Aynı durum sıcaklık için de gözlenmiştir.



Şekil 3.2. *C. albicans*-7 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları

Y. lipolytica-18 için elde edilen sonuçlar Tablo 3.21’de verilmiş olup, çalışılan parametreler içinde 35°C sıcaklık 33 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi parametreleri kullanıldığında en yüksek % lipid değeri olan %35’e ulaşılmıştır.

Tablo 3.21. *Y. lipolytica*-18’den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Kuru hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
1	30	48	25	0,010	5,33	0,015	0,75	14,07
2	30	18	25	0,012	6,00	0,002	0,1	1,66
3	35	18	15	0,013	6,66	0,008	0,4	6,00
4	30	33	15	0,008	4,00	0,019	0,95	23,75
5	30	33	15	0,010	5,33	0,020	1,	18,76
6	30	18	5	0,008	4,00	0,006	0,3	7,75
7	25	48	15	0,010	5,33	0,011	0,55	10,31
8	35	33	5	0,005	2,66	0,014	0,7	26,31
9	25	18	15	0,010	5,33	0,001	0,05	0,93
10	35	48	15	0,009	4,66	0,020	1	21,45
11	30	48	5	0,010	5,33	0,019	0,95	17,82
12	25	33	5	0,006	3,33	0,014	0,7	21,02
13	35	33	25	0,008	4,00	0,028	1,4	35,00
14	25	33	25	0,012	6,00	0,022	1,1	16,66
15	30	33	15	0,008	4,00	0,013	0,65	16,25

Box Behnken yanıt yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin lipid yüzdesi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Tablo 3.22’den anlaşılacağı üzere *Y. lipolytica*-18’den elde edilen lipid yüzdesi inokulum yaşının (saat) (X_2) ve sıcaklığın artması ile doğrusal olarak artmıştır ($p < 0,05$). İnokulum yaşının aynı zamanda kuadratik (2.derece polinom) etkisi de vardır. Lipid yüzdesi üzerine parametrelerin ikili etkisi gözlenmemiştir.

Tablo 3.22. *Y. lipolytica-18*'den üretilen lipid yüzeyinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi

		DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model		9	1168,43	129,826	10,5	0,009
	Lineer	3	481,98	160,659	12,99	0,009
	sıcaklık (X1)	1	198,4	198,403	16,05	0,01
	inokulum yaşı (X2)	1	279,78	279,78	22,63	0,005
	inokulum hacmi (X3)	1	3,8	3,795	0,31	0,603
	İkinci derece polinom	3	633,3	211,1	17,07	0,005
	sıcaklık*sıcaklık (X1*X1)	1	18,76	18,762	1,52	0,273
	inokulum yaşı*inokulum yaşı (X2*X2)	1	546,71	546,714	44,22	0,001
	inokulum hacmi*inokulum hacmi (X3*X3)	1	31,2	31,195	2,52	0,173
	İkili etkileşim	3	53,16	17,719	1,43	0,338
	sıcaklık*inokulum yaşı (X1*X2)	1	9,21	9,211	0,74	0,428
	sıcaklık*inokulum hacmi (X1*X3)	1	42,58	42,576	3,44	0,123
	inokulum yaşı*inokulum hacmi (X2*X3)	1	1,37	1,369	0,11	0,753
Hata		5	61,82	12,364		
	Uyum eksikliği (lack of fit)	3	32,67	10,89	0,75	0,616
	Saf hata	2	29,15	14,575		
Toplam		14	1230,25			

Y. lipolytica-18 için deneysel verilerin model uygulaması sonucunda elde edilen denklem:

$$\begin{aligned} \text{lipid 18 (\%)} &= 57,8 - 6,06 *X1 + 3,298 *X2 - 3,03 *X3 \\ &+ 0,0902 X1*X1 - 0,05408 X2*X2 \\ &+ 0,0291 X3*X3 + 0,0202 X1*X2 \\ &+ 0,0653 X1*X3 + 0,0039 X2*X3 \end{aligned}$$

Modelden elde edilen lipid (%) verileri Tablo 3.23'de verilmiştir.

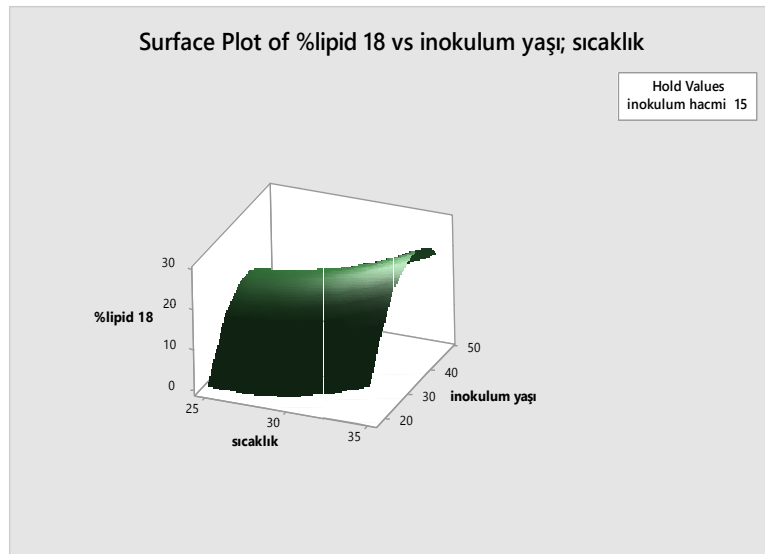
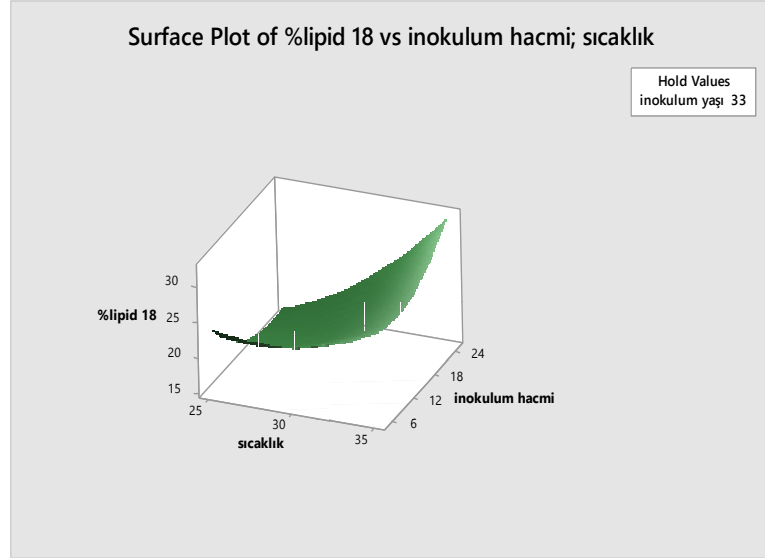
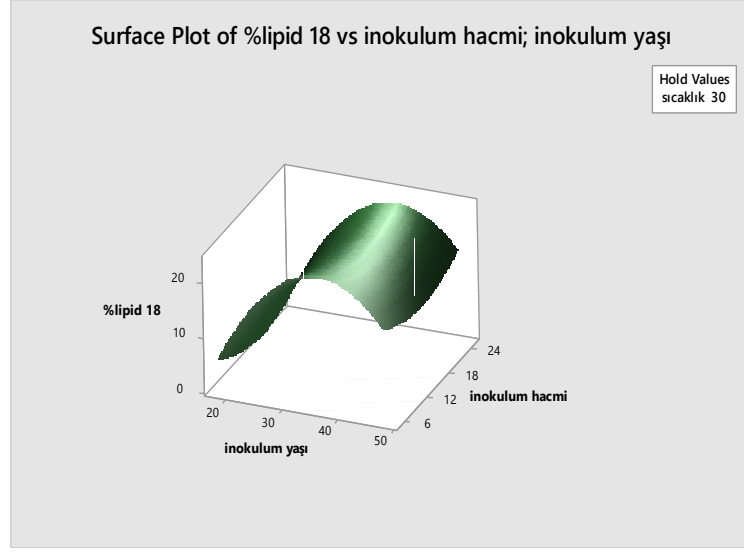
Tablo 3.23. *Y. lipolytica-18* için deneysel ve modelden bulunan lipid verimi (%)

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Lipid (%) ¹	Lipid (%) ²
1	30	48	25	14,07	16,13
2	30	18	25	1,66	3,14
3	35	18	15	6,00	7,22
4	30	33	15	23,75	19,59
5	30	33	15	18,76	19,59
6	30	18	5	7,75	5,68
7	25	48	15	10,31	9,09
8	35	33	5	26,31	27,15
9	25	18	15	0,93	0,30
10	35	48	15	21,45	22,08
11	30	48	5	17,82	16,34
12	25	33	5	21,02	23,72
13	35	33	25	35,00	32,30
14	25	33	25	16,66	15,82
15	30	33	15	16,25	19,59

¹ Modelin belirlediği parametrelerde yapılan lipid ekstraksiyonu sonucunda elde edilen deneysel % lipid değeri

² Modelin bulduğu % lipid değeri

İncelenen parametrelerin *Y.lipolytica-18*'den elde edilen lipid üretimi (%) üzerine etkisinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 3.3'de verilmiştir. Parametrelerin orta noktaları sabit alınarak çizilen inokulum hacmi ile inokulum yaşı değişimi gafiğinde inokulum hacminin artmasıyla lipid yüzdesi artmış olmasına rağmen bu artış anlamlı değildir ($p>0.05$). İnolulum yaşının artması sonucunda ise lipid yüzdesi belli bir değere kadar artarken bir noktadan sonra düşmeye başlamıştır. Sıcaklığın artması ise yüzde lipid değerini olumlu olarak etkilemiştir.



Şekil 3.3. *Y. lipolytica*-18 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları

Y. lipolytica-48 için elde edilen sonuçlar Tablo 3.24’de verilmiş olup, çalışılan parametreler içinde 30°C sıcaklık 33 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi parametreleri kullanıldığında en yüksek %lipid değeri olan %39,03’e ulaşılmıştır.

Tablo 3.24. *Y. lipolytica*-48’den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Kuru hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)	% lipid verimi
1	30	48	25	0,013	6,66	0,029	1,45	21,77
2	30	18	25	0,004	2,00	0,002	0,1	5,00
3	35	18	15	0,009	4,66	0,020	1	21,45
4	30	33	15	0,009	4,66	0,029	1,45	31,11
5	30	33	15	0,008	4,00	0,026	1,3	32,50
6	30	18	5	0,017	8,66	0,008	0,4	4,61
7	25	48	15	0,016	8,00	0,015	0,75	9,37
8	35	33	5	0,012	6,00	0,027	1,35	22,50
9	25	18	15	0,014	7,33	0,009	0,45	6,13
10	35	48	15	0,008	4,00	0,019	0,95	23,75
11	30	48	5	0,016	8,00	0,022	1,1	13,75
12	25	33	5	0,026	13,33	0,006	0,3	2,25
13	35	33	25	0,020	10,00	0,019	0,95	9,50
14	25	33	25	0,021	10,66	0,019	0,95	8,91
15	30	33	15	0,006	3,33	0,026	1,3	39,03

Box Behnken yanıt yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin lipid yüzdesi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Tablo 3.25’de *Y. lipolytica*-48’den elde edilen lipid yüzdesi sıcaklık ile doğrusal olarak artmıştır ($p<0,05$). İnokulum yaşının ve inokulum hacminin kuadrik (2. Derece polinom) etkisi gözlenmiştir ($p<0,05$). Lipid yüzdesi üzerine parametrelerin ikili etkisi gözlenmemiştir.

Tablo 3.25. *Y. lipolytica-48'den üretilen lipid yüzeyinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi*

		DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model		9	1741,34	193,482	7,76	0,018
	Lineer	3	443,46	147,82	5,93	0,042
	sıcaklık (X1)	1	319,29	319,286	12,81	0,016
	inokulum yaşı (X2)	1	123,64	123,638	4,96	0,076
	inokulum hacmi (X3)	1	0,54	0,536	0,02	0,889
	ikinci derece polinom	3	1186,48	395,493	15,87	0,005
	sıcaklık*sıcaklık (X1*X1)	1	352,11	352,111	14,12	0,013
	inokulum yaşı*inokulum yaşı (X2*X2)	1	317,49	317,49	12,74	0,016
	inokulum hacmi*inokulum hacmi (X3*X3)	1	688,76	688,758	27,63	0,003
	ikili etkileşim	3	111,4	37,135	1,49	0,324
	sıcaklık*inokulum yaşı (X1*X2)	1	0,22	0,221	0,01	0,929
	sıcaklık*inokulum hacmi (X1*X3)	1	96,63	96,629	3,88	0,106
	inokulum yaşı*inokulum hacmi (X2*X3)	1	14,55	14,554	0,58	0,479
Hata		5	124,64	24,928		
	Uyum eksikliği (lack of fit)	3	88,87	29,625	1,66	0,398
	Saf hata	2	35,77	17,883		
Toplam		14	1865,98			

Y. lipolytica-48 için deneysel verilerin model uygulaması sonucunda elde edilen denklem:

$$\begin{aligned} \text{lipid 48 (\%)} = & - 481 + 26,28 *X1 + 2,89 *X2 + 6,65 *X3 \\ & - 0,391 X1*X1 - 0,0412 X2*X2 \\ & - 0,1366 X3*X3 - 0,0031 X1*X2 \\ & - 0,0983 X1*X3 + 0,0127 X2*X3 \end{aligned}$$

Modelden elde edilen lipid (%) verileri Tablo 3.26'de verilmiştir.

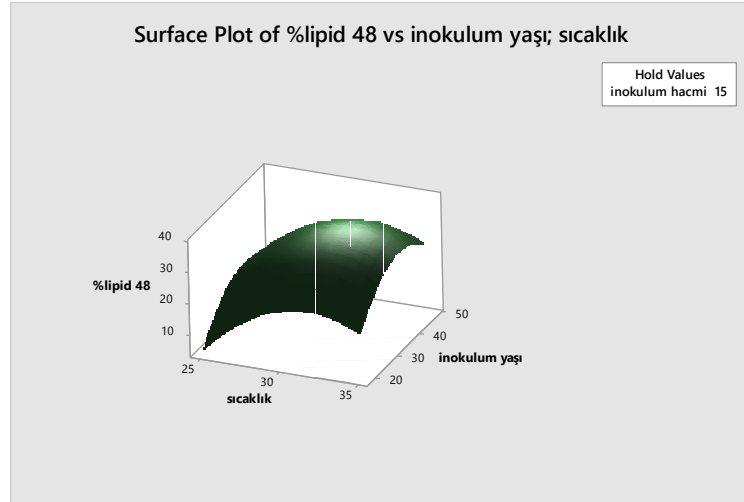
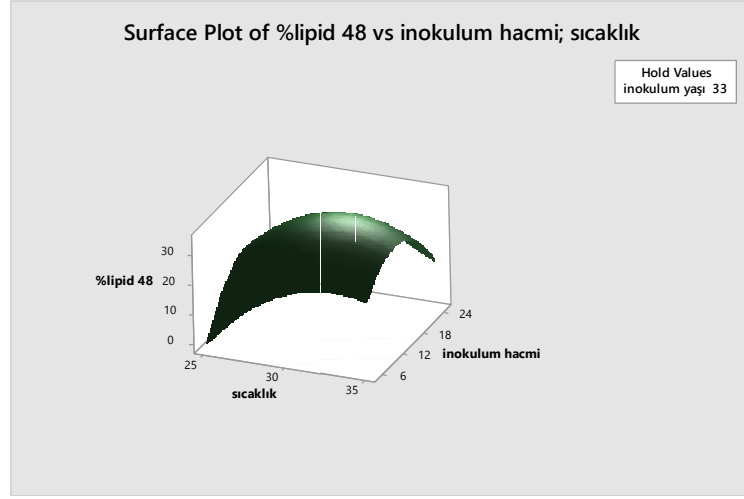
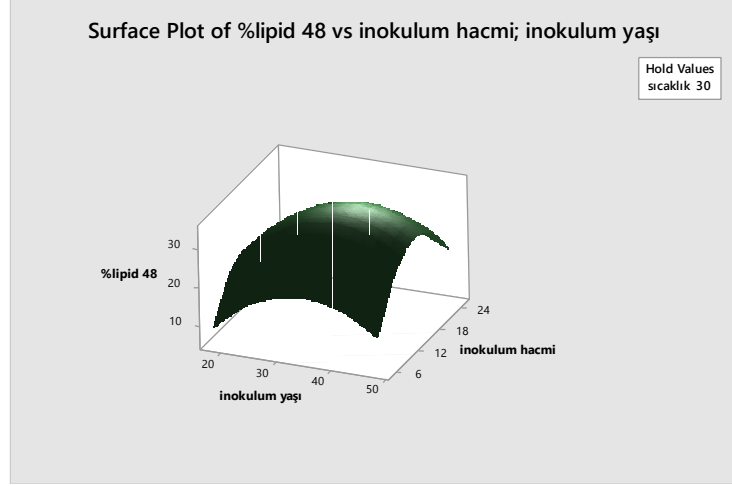
Tablo 3.26. *Y. lipolytica-48* için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Lipid (%) ¹	Lipid (%) ²
1	30	48	25	21,77	17,38
2	30	18	25	5,00	5,70
3	35	18	15	21,45	17,80
4	30	33	15	31,11	34,21
5	30	33	15	32,50	34,21
6	30	18	5	4,61	9,00
7	25	48	15	9,37	13,02
8	35	33	5	22,50	21,76
9	25	18	15	6,13	4,69
10	35	48	15	23,75	25,19
11	30	48	5	13,75	13,05
12	25	33	5	2,25	0,70
13	35	33	25	9,50	12,45
14	25	33	25	8,91	6,95
15	30	33	15	39,03	34,21

¹ Modelin belirlediği parametrelerde yapılan lipid ekstraksiyonu sonucunda elde edilen deneysel % lipid değeri

² Modelin bulduğu % lipid değeri

İncelenen parametrelerin *Y. lipolytica-48*'den elde edilen lipid üretimi (%) üzerine etkisinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 3.4'de verilmiştir. Parametrelerin orta noktaları sabit alınarak çizilen inokulum hacmi ile inokulum yaşı değişimi gafiğinde inokulum hacminin artmasıyla lipid yüzdesi azalmıştır. İnokulum yaşının artması sonucunda ise lipid yüzdesi belli bir değere kadar artarken bir noktadan sonra düşmeye başlamıştır. Sıcaklığın artması ise yüzde lipid değerini olumlu olarak etkilemiş olup belli bir değerden sonra artış hızı azalmıştır.



Şekil 3.4. *Y. lipolytica*-48 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları

P. anomola-141 için elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 3.27’de verilmiş olup, incelenen parametreler içinde 35°C sıcaklık 33 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi parametreleri kullanıldığında en yüksek %lipid değeri olan %33,26’ya ulaşılmıştır.

Tablo 3.27. *P. anomola-141*’den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Kuru hücre (g)	Kuru hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)
1	30	48	25	0,017	8,66	0,025	1,25	14,43
2	30	18	25	0,020	10,0	0,010	0,5	5,00
3	35	18	15	0,017	8,66	0,015	0,75	8,66
4	30	33	15	0,017	8,66	0,022	1,1	12,70
5	30	33	15	0,013	6,66	0,024	1,2	18,01
6	30	18	5	0,020	10,0	0,006	0,3	3,00
7	25	48	15	0,017	8,66	0,028	1,4	16,16
8	35	33	5	0,016	8,00	0,028	1,4	17,50
9	25	18	15	0,017	8,66	0,011	0,55	6,35
10	35	48	15	0,016	8,00	0,024	1,2	15,00
11	30	48	5	0,016	8,00	0,015	0,75	9,37
12	25	33	5	0,016	8,00	0,022	1,1	13,75
13	35	33	25	0,009	4,66	0,031	1,55	33,26
14	25	33	25	0,014	7,33	0,019	0,95	12,96
15	30	33	15	0,013	6,66	0,017	0,85	12,76

Box Behnken yanıt yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin lipid yüzdesi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Tablo 3.28’de *P. anomola*-141’den elde edilen lipid yüzdesi üzerine inokulum yaşının (saat) haricinde diğer parametrelerin anlamlı bir etkisi görülmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 3.28. *P. anomola-141*'den üretilen lipid yüzeyinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi

		DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model		9	619,801	68,867	3,74	0,08
	Lineer	3	267,645	89,215	4,85	0,061
	sıcaklık (X1)	1	79,38	79,38	4,32	0,092
	inokulum yaşı (X2)	1	127,6	127,6	6,94	0,046
	inokulum hacmi (X3)	1	60,665	60,665	3,3	0,129
	İkinci derece polinom	3	28,329	92,776	5,04	0,057
	sıcaklık*sıcaklık (X1*X1)	1	66,222	66,222	3,6	0,116
	inokulum yaşı*inokulum yaşı (X2*X2)	1	190,48	190,48	10,35	0,024
	inokulum hacmi*inokulum hacmi (X3*X3)	1	1,524	1,524	0,08	0,785
	İkili etkileşim	3	73,827	24,609	1,34	0,361
	sıcaklık*inokulum yaşı (X1*X2)	1	3,01	3,01	0,16	0,703
	sıcaklık*inokulum hacmi (X1*X3)	1	68,476	68,476	3,72	0,112
	inokulum yaşı*inokulum hacmi (X2*X3)	1	2,341	2,341	0,13	0,736
Hata		5	91,975	18,395		
	Uyum eksikliği (lack of fit)	3	73,388	24,463	2,63	0,287
	Saf hata	2	18,587	9,294		
Toplam		14	711,776			

P. anomola-141 için deneysel verilerin model uygulaması sonucunda elde edilen denklem:

$$\begin{aligned} \text{lipid 141 (\%)} &= 130,1 - 10,39 *X1 + 2,64 *X2 - 2,57 *X3 \\ &+ 0,1694 X1*X1 - 0,03192 X2*X2 \\ &+ 0,0064 X3*X3 - 0,0116 X1*X2 \\ &+ 0,0828 X1*X3 + 0,0051 X2*X3 \end{aligned}$$

Modelden elde edilen lipid (%) verileri Tablo 3.29'da verilmiştir.

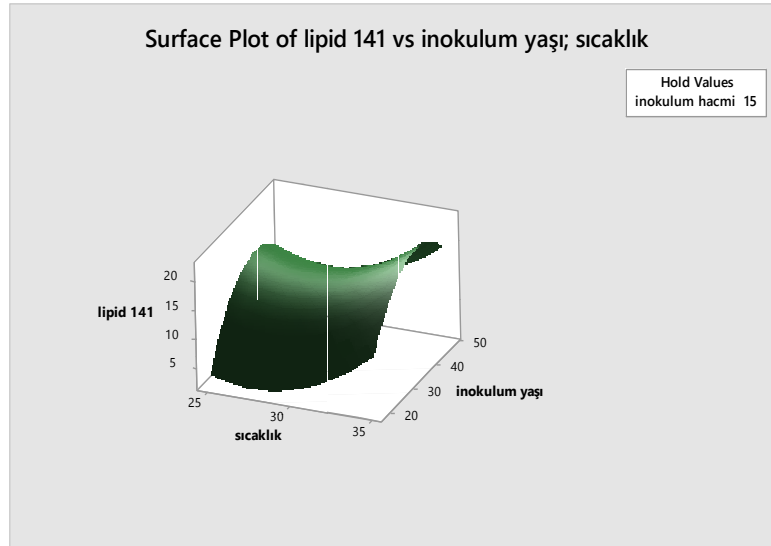
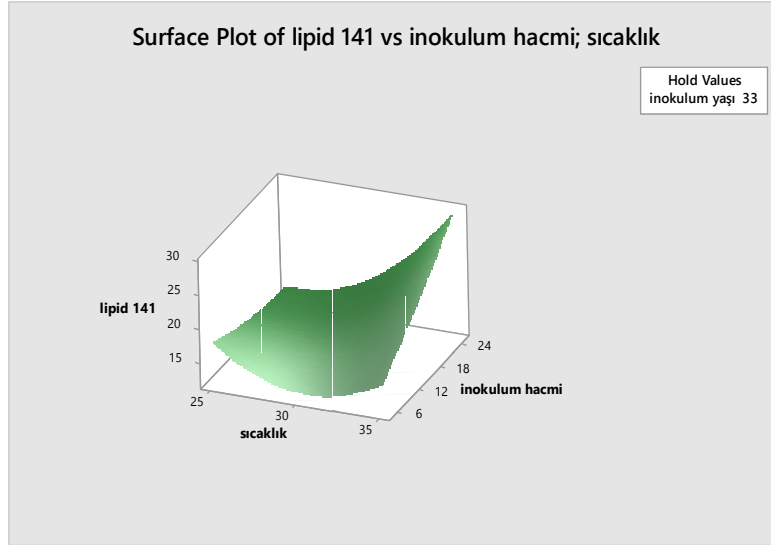
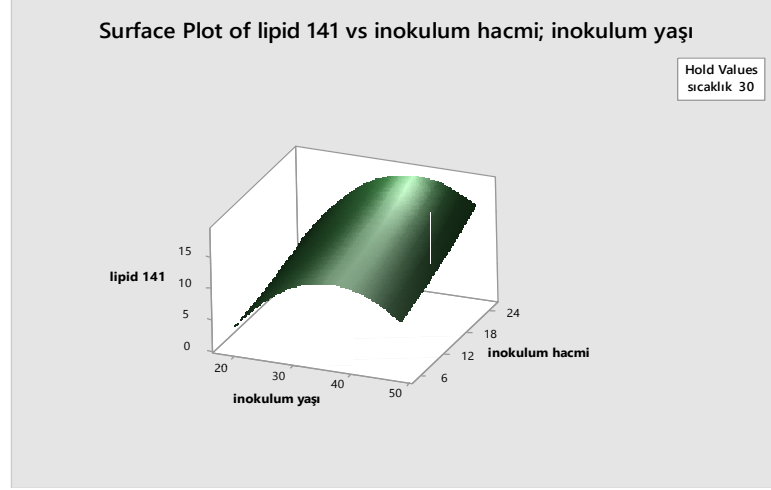
Tablo 3.29. *P. anomola-141* için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Lipid (%) ¹	Lipid (%) ²
1	30	48	25	14,43	15,46
2	30	18	25	5,00	5,94
3	35	18	15	8,66	11,57
4	30	33	15	12,70	14,49
5	30	33	15	18,01	14,49
6	30	18	5	3,00	1,97
7	25	48	15	16,16	13,25
8	35	33	5	17,50	15,63
9	25	18	15	6,35	3,53
10	35	48	15	15,00	17,82
11	30	48	5	9,37	8,42
12	25	33	5	13,75	17,60
13	35	33	25	33,26	29,41
14	25	33	25	12,96	14,83
1	30	48	25	12,76	14,49

¹ Modelin belirlediği parametrelerde yapılan lipid ekstraksiyonu sonucunda elde edilen deneysel % lipid değeri

² Modelin bulduğu % lipid değeri

İncelenen parametrelerin *P. anomola-141*'den elde edilen lipid üretimi (%) üzerine etkisinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 3.5'de verilmiştir. Parametrelerin orta noktaları sabit alınarak çizilen inokulum hacmi ile inokulum yaşı değişimi gafiğinde inokulum yaşının artmasıyla lipid yüzdesi belli bir değer kadar artmışken bir noktadan sonra düşmeye başlamıştır. Lipid yüzdesi inokulum hacmi ile doğrusal olarak artmış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Sıcaklığın artması ise yüzde lipid değerini pozitif yönde etkilemiştir.



Şekil 3.5. *P. anomola*-141 için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları

K. marxianus-155 için elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 3.30'da verilmiş olup, 35°C sıcaklık 33 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi parametreleri kullanıldığında en yüksek % lipid değeri olan %27,89'a ulaşılmıştır.

Tablo 3.30. *K. marxianus*-155'den elde edilen biyokütle (g/L), lipid kuru ağırlığı (g) ve lipid verimleri (%) için Box Behnken deney tasarımı sonuçları

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Kuru hücre (g)	Kuru hücre (g)	biyokütle (g/L)	Lipid kuru ağırlığı (g)	lipid miktarı (g/L)
1	30	48	25	0,017	8,66	0,037	1,85	21,36
2	30	18	25	0,014	7,33	0,015	0,75	10,23
3	35	18	15	0,012	6,00	0,006	0,3	5,00
4	30	33	15	0,009	4,66	0,022	1,1	21,45
5	30	33	15	0,013	6,66	0,024	1,2	18,01
6	30	18	5	0,016	8,00	0,009	0,45	5,62
7	25	48	15	0,018	9,33	0,021	1,05	11,25
8	35	33	5	0,010	5,33	0,004	0,2	3,75
9	25	18	15	0,017	8,66	0,014	0,7	8,08
10	35	48	15	0,016	8,00	0,011	0,55	6,87
11	30	48	5	0,014	7,33	0,025	1,25	17,05
12	25	33	5	0,009	4,66	0,021	1,05	22,51
13	35	33	25	0,009	4,66	0,026	1,3	27,89
14	25	33	25	0,013	6,66	0,026	1,3	19,51
15	30	33	15	0,009	4,66	0,021	1,05	22,53

Box Behnken yanıt yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin lipid yüzdesi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Tablo 3.31'de *K. marxianus*-155'den elde edilen lipid yüzdesi inokulum yaşının (saat) ve hacminin artması ile doğrusal olarak artmıştır ($p < 0,05$). İnokulum yaşının aynı zamanda kuadrik (2.derece polinom) etkisi de vardır. Lipid yüzdesi üzerine sıcaklık ve inokum hacminin ikili etkisi görülmüştür ($p < 0,05$).

Tablo 3.31. *K. marxianus*-155'den üretilen lipid yüzeyinin Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA testi

		DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model		9	790,001	87,778	6,34	0,028
	Lineer	3	247,954	82,651	5,97	0,042
	sıcaklık (X1)	1	39,783	39,783	2,87	0,151
	inokulum yaşı (X2)	1	95,22	95,22	6,88	0,047
	inokulum hacmi (X3)	1	112,95	112,95	8,16	0,036
	İkinci derece polinom	3	357,457	119,152	8,6	0,02
	sıcaklık*sıcaklık (X1*X1)	1	59,274	59,274	4,28	0,093
	inokulum yaşı*inokulum yaşı (X2*X2)	1	289,627	289,627	20,91	0,006
	inokulum hacmi*inokulum hacmi (X3*X3)	1	11,416	11,416	0,82	0,406
	İkili etkileşim	3	184,59	61,53	4,44	0,071
	sıcaklık*inokulum yaşı (X1*X2)	1	0,422	0,422	0,03	0,868
	sıcaklık*inokulum hacmi (X1*X3)	1	184,145	184,145	13,3	0,015
	inokulum yaşı*inokulum hacmi (X2*X3)	1	0,023	0,023	0	0,969
Hata		5	69,244	13,849		
	Uyum eksikliği (lack of fit)	3	58,101	19,367	3,48	0,231
	Saf hata	2	11,143	5,572		
Toplam		14	859,245			

K. marxianus-155 için deneysel verilerin model uygulaması sonucunda elde edilen denklem:

$$\begin{aligned} \text{lipid 155 (\%)} = & -105,8 + 2,965 *X1 + 2,64 *X2 - 4,21 *X3 \\ & - 0,1603 X1*X1 - 0,03936 X2*X2 \\ & + 0,0176 X3*X3 - 0,0043 X1*X2 \\ & + 0,1357 X1*X3 - 0,0005 X2*X3 \end{aligned}$$

Modelden elde edilen lipid (%) verileri Tablo 3.32'de verilmiştir.

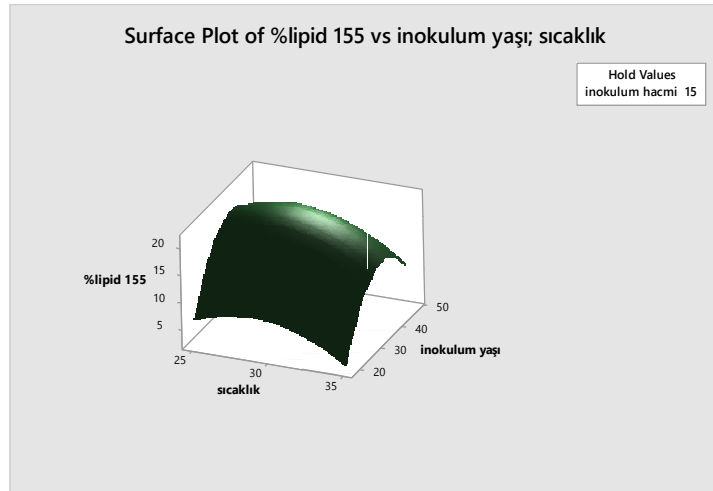
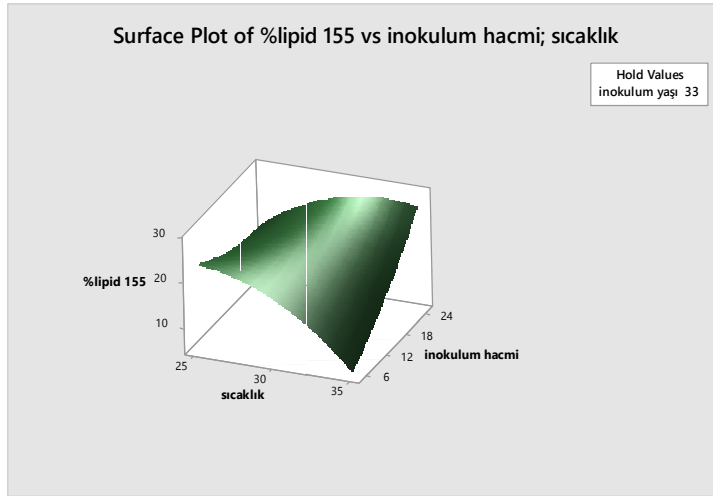
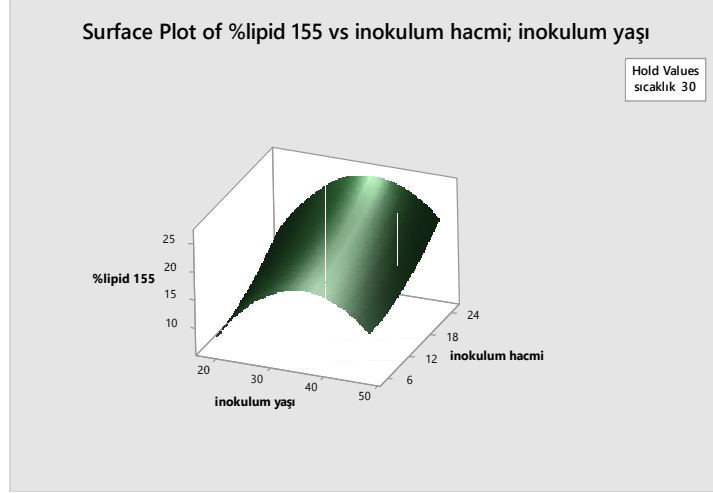
Tablo 3.32. *K. marxianus-155* için deneysel ve modelden bulunan lipid aktivitesi

Deney no	Sıcaklık (°C)	İnokulum yaşı (saat)	İnokulum hacmi (%)	Lipid (%) ¹	Lipid (%) ²
1	30	48	25	23,36	20,70
2	30	18	25	10,23	13,95
3	35	18	15	5,00	2,44
4	30	33	15	21,45	20,66
5	30	33	15	18,01	20,66
6	30	18	5	5,62	6,28
7	25	48	15	11,25	13,81
8	35	33	5	3,75	5,64
9	25	18	15	8,08	6,26
10	35	48	15	6,87	8,69
11	30	48	5	17,05	13,33
12	25	33	5	22,51	23,67
13	35	33	25	27,89	26,73
14	25	33	25	19,51	17,62
15	30	33	15	22,53	20,66

¹ Modelin belirlediği parametrelerde yapılan lipid ekstraksiyonu sonucunda elde edilen deneysel % lipid değeri

² Modelin bulduğu % lipid değeri

İncelenen parametrelerin *K. marxianus-155*'den elde edilen lipid üretimi (%) üzerine etkisinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 3.6'da verilmiştir. Parametrelerin orta noktaları sabit alınarak çizilen inokulum hacmi ile inokulum yaşı değişimi gafiğinde inokulum hacminin artmasıyla lipid yüzdesi doğrusal olarak artmışken inokulum yaşının artması sonucunda lipid yüzdesi belli bir noktadan sonra düşmeye başlamıştır. İnokulum hacminin azalması ve sıcaklığın artması ile lipid yüzdesi azalmıştır.



Şekil 3.6. *K. Marxianus-155* için parametrelerin lipid üretimi (%) üzerine etkileri grafik sonuçları

3.12. Optimize Edilen Koşullarda Lipid Üretimi

Ön görülen üretim parametreleriyle lipid üretiminde maksimum verimi elde etmek için MINITAB 17 programının yüzey optimizeri kullanılmıştır. MINITAB 17 programı kullanılarak her bir maya için maksimize edilen değerleri saptanmıştır. Programın maksimize ettiği parametrelere uygun olarak lipid ekstraksiyon aşamaları yapılmış ve ulaşılması hedeflenen maksimum % lipid değerlerine ulaşılmıştır. Minitab 17 programın her bir maya için belirlediği parametreler Tablo 3.33'de verilmiştir. Elde edilen % lipid oranları, Minitab 17 istatistiksel programının maksimize ettiği değerler sonucunda hedeflenen % lipid oranları ile örtüşme göstermiş ve her bir maya örneği için optimize edilen koşullarda en yüksek % lipid verimine ulaşılmıştır.

Tablo 3.33. Maya izolatları için maksimize edilen sonuçlarda lipid ekstraksiyon sonuçları

Örnek Üretim parametreleri	<i>W. subpelliculosus-6</i>	<i>C. albicans-7</i>	<i>Y. lipolytica-18</i>	<i>Y. lipolytica-48</i>	<i>P. anomala-141</i>	<i>K. marxianus-155</i>
Sıcaklık (°C)	35	30	35	30	35	30
İnokulum yaşı (saat)	38	41	38	36	37	35
İnokulum hacmi (%)	25	15	25	15	25	25
Kuru hücre (g)	0,003	0,012	0,008	0,007	0,009	0,014
Biyokütle (g/L)	2	8	5,33	4,46	4	4,66
Lipid kuru ağırlığı (g)	0,12	0,13	0,16	0,12	0,13	0,14
% Lipid verimi	0,9	1,75	1,89	1,9	1,5	1,35
Optimizasyondan elde edilen %lipid hedef değeri	35,7	19,23	33,62	33,65	29,93	27,76
Elde edilen % lipid değeri	45,0	21,87	33,45	40,77	35,50	28,96

W. subpelliculosus-6 için programın belirlediği optimum üretim koşulları; 35°C, 38 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi olarak belirlenmiştir. Optimum koşulda beklenen lipid %35,7'dir. Beklenen bu değeri doğrulamak amacıyla yapılan deneyler sonucunda ise lipid %45,0 olarak bulunmuştur.

C. albicans-7 için programın belirlediği optimum üretim koşulları; 30°C, 41 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi olarak belirlenmiştir. Optimum koşulda beklenen lipid %19,23'dür. Beklenen bu değeri doğrulamak amacıyla yapılan deneyler sonucunda ise lipid %21,87 olarak bulunmuştur.

Y. lipolytica-18 için programın belirlediği optimum üretim koşulları; 35°C, 38 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi olarak belirlenmiştir. Optimum koşulda beklenen lipid %33,62'dir. Beklenen bu değeri doğrulamak amacıyla yapılan deneyler sonucunda ise lipid %35,45 olarak bulunmuştur.

Y. lipolytica-48 için programın belirlediği optimum üretim koşulları; 30°C, 35 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi olarak belirlenmiştir. Optimum koşulda beklenen lipid %35,65'dir. Beklenen bu değeri doğrulamak amacıyla yapılan deneyler sonucunda ise lipid %40,77 olarak bulunmuştur.

P. anomola-141 için programın belirlediği optimum üretim koşulları; 35°C, 37 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi olarak belirlenmiştir. Optimum koşulda beklenen lipid %29,93'dür. Beklenen bu değeri doğrulamak amacıyla yapılan deneyler sonucunda ise lipid %35,50 olarak bulunmuştur.

K. marxianus-155 için programın belirlediği optimum üretim koşulları; 30°C, 35 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi olarak belirlenmiştir. Optimum koşulda beklenen lipid %27,76'dır. Beklenen bu değeri doğrulamak amacıyla yapılan deneyler sonucunda ise lipid %28,96 olarak bulunmuştur.

3.13. Lipid Üreten 6 Maya Örneğinin Yağ Asidi Analizi

Optimize edilen koşullarda yüksek lipid üretimine sahip 6 maya örneğinin (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) 1/10 (10 g atık gül posası+100 mL %1'lik H₂SO₄) oranına göre pH 5 olarak hazırlanan %1'lik H₂SO₄'lü gül ön işlem sıvısını içeren ve karbon kaynağı olarak peptonun kullanıldığı üretim besiyeri ile lipid ekstaksiyon aşamaları tamamlandıktan sonra GC-MS cihazına enjekte edilmiştir.

GC-MS sonuçlarına göre maya izolatlarının içerdiği yağ asitleri aşağıdaki Tablo 3.34'de verilmiştir.

Tablo 3.34. Maya izolatlarının içerdiği % yağ asidi miktarları (C: Karbon sayısı)

Örnek Yağ asitleri	<i>W. subpelliculosus-6</i>	<i>C. albicans-7</i>	<i>Y. lipolytica-18</i>	<i>Y. lipolytica-48</i>	<i>P. anomola-141</i>	<i>K. marxianus-155</i>
Palmitik asit (16:0)	45,00	46,05	30,75	32,77	52,67	53,16
Stearik asit (18:0)	42,62	42,6	36,03	35,38	47,33	46,84
Oleik asit (18:1)	7,38	4,97	33,22	23,63	0,00	0,00
Linoleik asit (18:2)	0,00	6,38	0,00	8,22	0,00	0,00
Toplam doymamış yağ asidi	7,38	11,35	33,22	31,85	0,00	0,00
Toplam doymuş yağ asidi	92,62	88,65	66,78	68,15	100	100

Elde edilen sonuçlara göre, *W. subpelliculosus-6* ve *C. albicans-7* izolatları yüksek oranda palmitik aside sahipken en düşük değer oleik asit olarak bulunmuştur. *Y. lipolytica-18* için ise yüksek oranda stearik aside sahipken palmitik asit değeri en düşük olarak bulunmuştur. *Y. Lipolytica-48* yüksek oranda stearik asit, düşük oranda linoleik asite sahiptir. *P. anomola-141* ve *K. marxianus-155* ise yüksek oranda palmitik asit içerirken düşük oranda stearik asit içerdikleri tespit edilmiştir. Tüm maya örnekleri için ise, toplam doymuş yağ asidi miktarları toplam doymamış yağ asidi miktarlarına göre daha yüksek oranda bulunmuştur.

SONUÇ

Mayalar, tarih öncesi zamanlardan beri şarap ve ekmek yapımında kullanılan, günümüzde ise fermentasyon süreçlerinde, besin ögesi değerlerinin arttırılmasında vitamin kaynağı olarak ve birçok antibiyotiğin ve steroid hormonlarının üretilmesinde kullanılan tek hücreli funguslardır (Huang ve Tang, 2007). Mayalar lipid üretebilme özelliğine sahip olup kuru ağırlıklarının %20'sinden daha fazla lipid biriktirebilmektedirler (Donot vd., 2014). Çalışmamızda 162 maya izolatından 138 tanesinin karbon kaynağı olarak atık gül posası kullanılan besiyerlerinde gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Sudan Black B boyama sonuçlarına göre 138 maya izolatından 16'sının yağ üretme özelliğinde olduğu saptanmıştır. Yağ üretme özelliği olan mayalar mikroskop altında incelendiğinde maya hücrelerindeki yağlar yarım ay şeklinde gözlemlenmiş olup Shakh vd., (2012) de Sudan Black B boyama yöntemi ile mayaların içerdikleri yağların mikroskop altında yarım ay şeklinde görüldüğünü belirtmişlerdir. Benzer olarak Poontawee vd., (2017) lignosellülozik biyokütle kullanarak mikrobiyal yağ üretmek için 418 maya suşunu taramışlardır. Nile red boyama yöntemi ile 142 suşun lipid üretebildiğini ortaya koymuşlardır.

Yağlı mayaların 26S rDNA'larının D1/D2 bölgelerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi bilgileri Blast programı ile değerlendirilerek her bir izolatın NCBI gen bankasında benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir. Bu izolatlardan biri *Wickerhamomyces subpelliculosus*, bir izolat *Candida albicans*, bir izolat *Wickerhamomyces anomalus*, beş izolat *Yarrowia lipolytica*, iki izolat *Saccharomyces cerevisiae*, iki izolat *Pichia kudriavzevii*, üç izolat *Kluyveromyces marxianus*, ve bir izolat *Pichia anomala* olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarla özellikle *Y. lipolytica*, *Lipomyces* türleri, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gaminis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* ve *Cryptococcus albidus* türleri yağlı mayalar kategorisinde bulunan en önemli mayalar olarak belirlenmiştir (Sitepu vd., 2014). Benzer olarak yapılan bir başka çalışmada da ham gliserol kullanılarak *Y. lipolytica* CCMA 0357, *Y. lipolytica* CCMA 0242, *W. anomalus* CCMA 0358, ve *Cryptococcus humicola* CCMA 0346 yağ üretiminde kullanılmıştır (Souza vd., 2017). *W. anomalus* ile tarımsal ve endüstriyel atık sulardan yağ üretiminde kullanılmıştır. Ancak çalışmamızda *W. anomalus* ile atık gül posasından yağ üretiminde (%1,57) düşük yağ verimi elde edilmiştir. Benzer şekilde çürük meyvelerden biyodizel üretimi

için yağ eldesinde kullanılan *P.kudriavzevii* ile çalışmamızda düşük yağ verimi (%1,67) elde edilmiştir. Bu nedenle de optimizasyon çalışmalarında kullanılmamıştır. Çalışmamızda literatür bilgisine paralel olarak *Y. lipolytica* izolatları ile yüksek yağ verimi alınmıştır (%5,27-2,25). Buna karşın yağlı mayalar içinde yer almamasına karşın *C. albicans* ile atık gül posasında yüksek miktarda yağ verimi (%7,11) elde edilmiştir. *W. subpelliculosus*, *K. marxianus*, *P. anomola* atıklardan yağ üretiminde kullanıldığını gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Mikrobiyal yağ özellikleri çalışılan mayalardan *Cryptocossus curvatus*'un kuru kütlelerinin %60'ı kadar yağ biriktirdiği bildirilmiştir (Ratledge, 1990). Sankh vd., (2013) yağlı maya olarak *Pichia kudriavzevii* ve Wang vd., (2012) *Rhodospiridium toruloides*'i yüksek yağ oluşturan yağlı maya olarak belirlemişlerdir. *W. subpelliculosus*, *K. marxianus*, *P. anomola* ve *C. albicans* yağlı mayalar içinde yer almamaktadır. *Rhodospiridium fluviale* DMKU-SP314 ile kuru biyokütlenin % 55.0 (14,3 g/L) kadar lipid elde edilmiştir (Poontawee vd., 2017).

Mayalar organik karbonu kullanarak hücre içinde yağ damlacıkları şeklinde yağ biriktirmektedir. Bazı mikroorganizmaların lipid üretkenliğinin, yağ üreten bitkilerden daha fazla olduğu bildirilmiştir (Beopoulos ve Nicaud, 2012). Bazı mayaların ise lipid oranının %25 fazlasını biriktirdiği bildirilmiştir (Beopoulos ve Nicaud, 2012, Ageitos ve Vallejo, 2011). Yağlı olduğu düşünülen *Rhodospiridium toruloides* 21167, *Rhodotorula toruloides* AS 21389, *Yarrowia lipolytica* ve *Cryptococcus curvatus* gibi türlerin ise %60 lipid biriktirdiği ortaya konmuştur (Patel vd., 2017). Bu yağlı mayalar arasında *Rhodospiridium spp.* hücresel bölmesinde en yüksek lipid miktarını ürettiği bildirilmiştir (Li vd., 2007). Yağlı mayaların kültürü mevsimden veya iklimden etkilenmez bu nedenle de endüstriyel olarak büyük önem taşımaktadırlar. Ayrıca 5-9 gün gibi çok daha kısa sürede lipid biriktirebilme özelliğine sahiptirler. Yağlı mayalar tarımsal ve endüstriyel atık materyalleri kullanabilmeleri nedeniyle önem taşımaktadır (Patel vd., 2017).

Çalışmamızda seçilen maya suşlarının karbon kaynağı olarak atık gül posasını kullanabildiği görülmüştür. Çalışmada karbon kaynağı olarak kullanılan atık gül posası Isparta'da ki bir gül fabrikasından getirilmiş olup fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre atık gül posasının; %7,70 nem, %20,91 lignin, %6,3 ham kül, %0,67 yağ ve %2,91 azot değerlerine sahip olduğu saptanmıştır.

Sonrasında seçilen maya örnekleri karbon kaynağı olarak atık gül posasının kullanıldığı üretim besiyerlerinde geliştirilerek hem lipid verimlerinin artırılması hem de atık gül posalarının endüstriyel bir atık olmaktan çıkıp etkin bir şekilde değerlendirilmesi sağlanmaya çalışılmıştır.

Gül posasının karbon kaynağı olarak kullanıldığı yağ üretimi sonucunda % lipid miktarları altı maya izolatında %3,5'un üzerinde olduğu diğer yağlı mayalarda daha düşük oranlarda % lipid miktarları saptanmıştır. *W. subpelliculosus*-6 %4,32, *C. albicans*-7 %7,11, *Y. lipolytica*-18 %5,27 , *Y. lipolytica*-48 %3,52, *P. anomola*-141 %6,81 ve *K. marxianus*-155 %3,55 olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalar bu altı maya ile yürütülmüştür.

Mayalar pek çok materyal veya atık ürünü karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Pan vd., (2008) yaptıkları lipid üretimi kapasite ölçümü çalışmalarında karbon kaynağı olarak ksiloz kullanmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre maksimum %15,38 lipid üretimi gerçekleştirilmiş ve ksilozun %39 seviyesine kadar mayalar tarafından kullanıldığı bildirilmiştir. Yağlı mayalar kullanılarak lipid üretiminde ucuz ve bol olarak bulunduğu için ve yüksek şeker içeriği nedeniyle melas yaygın şekilde kullanılmaktadır (Freitas vd., 2014). *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium toruloides* ve *Yarrowia lipolytica* gibi yağlı mayalar karbon kaynağı olarak lignoselülozik materyalleri kullandığı saptanmıştır (Yu vd., 2014, Zhan vd., 2013). Şeker kamışı küspesi, şeker kamışı kabuğu, buğday samanı, pirinç samanı ve mısır atıkları da aynı amaçla kullanılmaktadır (Kim ve Dale, 2003, Kadam ve McMillan, 2003). Donot vd., (2014) ise buğday samanı, küspe, pirinç kepeği, yer elması yumru ekstraktı, şeker kamışı hidrolizati, salamura turp, glukoz, gliserol, ham gliserol vb. karbon ve azot kaynaklarını yaptıkları deneysel çalışmada lipid sentezinde substrakt olarak kullanmışlardır. Gong vd., (2015), yaptıkları çalışmada lignoselülozik materyallerden olan darı, mısır koçanı, buğday samanı ve kepeğini karbon kaynağı olarak kullanmış lipid üretimi yapmıştır. Ancak yapılan karşılaştırma çalışmasında karbon kaynağı olarak glukoz veya sükrozun kullanılması durumlarında lipid üretiminde %4 ila %8 oranında artış kaydedilmiştir. Leiva-Candida vd., (2014) ise yaptıkları çalışmada tatlı sorgum posası, glukoz, manyok kökünden çıkarılan nişasta, buğday samanı ile pirinç kabuğu hidrolizati, mısır maserasyon sıvısı vb. gibi çeşitli karbon kaynakları ile amonyum sülfat, amonyum klorür, yeast ekstrakt

ve pepton+yeast ekstrakt vb. gibi farklı nitrojen kaynakları ile çapraz çalışmalar yaparak çalıştıkları mayaların gelişimlerini sağlamışlardır. Yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak kullanılan endüstriyel atıkların yağlı mayaların üretimi ve biyodizel üretimine katkı sağlanarak yenilebilir bir enerji sağlanabileceği ortaya konmuştur. Çalışmamızda ise, karbon kaynağı olarak tarımsal bir atık olan gül posası seçilerek mayaların bu karbon kaynağını da kullanabilecekleri ve böylece bu atığın olumlu yönde değerlendirilebileceği ortaya konmaya çalışılmıştır.

Mikroorganizmaların lipid üretimine etki eden birçok parametre mevcuttur; C/N oranı, sıcaklık, pH, oksijen varlığı, yağ asidi üretimini arttırıcı maddelerin ilave edilmesi, inkübasyon süresi, organizmanın yaşı, organizmanın gelişme hızı bunlardan bazılarıdır (Darcın ve Sarıgöl, 2015). Galafassi vd., (2012), *Rhodotorula gaminis* türü üzerinde yaptıkları çalışmada farklı kültür koşullarının biyokütle verimi ile lipid konsantrasyonuna etkisi üzerine çalışmışlar ve değişen şartlarda farklı sonuçlar elde etmişlerdir.

Mayaların en iyi geliştikleri pH değerleri ise *C. albicans*-7 ve *K. marxianus*-155 için pH 5, *W. subpelliculosus*-6, *Y. lipolytica*-48 ve *P. anomola*-141 için pH 6, *Y. lipolytica*-18 için ise pH 7 olarak belirlenmiştir. Asitle muamele edilen atık gül posası ortamında ise 6 maya izolatu da pH 6'da en en iyi gelişmiştir. Su ve %1'lik H₂SO₄ kullanılarak hazırlanan ön işlem sıvılarına aşılana mayaların 24 saat sonunda yapılan sayımlarında; pH 5'te en yüksek üreme potansiyelinin olduğu ancak %1'lik H₂SO₄ kullanıldığında daha yüksek miktarlarda koloni oluşturdukları belirlenmiştir. 48 saatin sonunda yapılan sayımlarda ise pH 6'da maya koloni sayılarının arttığı belirlenmiştir. Chang vd., (2015) mikrobiyal lipid üretimi çalışmalarında mısır kocaını karbon kaynağı olarak kullanmış ve mayaların aşılacağı besiyerini pH 6 olarak hazırlamışlardır. Gong vd., (2014) aynı şekilde lipid üretimi çalışmalarında karbon kaynağı olarak mısır koçanı kullanmış ve besiyeri ortamını pH 5,5 olarak ayarlamışlardır. Mayaların optimum gelişim gösterdiği pH değeri Narendranath ve Power (2005)'a göre pH 4 ila pH 6 aralığı olarak belirlenmiştir.

Seçilen 6 maya izolatu azot kaynağı olarak tripton, amonyum sülfat, amonyum klorür, sodyum nitrat, atık gül posası, beef extract, pepton ve yeast extract kullanılan besi ortamında geliştirilmiş ve *W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48 ve *P. anomola*-141'nin en iyi peptonda, *K. marxianus*-155 ise yeast

ekstraktda geliştiği belirlenmiştir. Farklı azot kaynaklarında gelişim gösteren mayaların mikrobiyal lipid oluşturup oluşturmadıklarını kontrol etmek amacıyla preparatlar hazırlanmış ve Sudan Black B boyama yöntemi kullanılarak mikroskop altında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155 azot kaynağı olarak pepton kullanıldığında daha yüksek oranda yağ hücresi oluşturduğu gözlemlenmiştir. Sankh vd., (2013), yaptıkları çalışmada pepton, tripton, yeast extract, beef extract, amonyum klorür, sodyum nitrat, mısır maserasyon sıvısı, amonyum sülfat ve %2'lik mısır maserasyon sıvısı olmak üzere 9 farklı azot kaynağı ile çalışmış en yüksek değere %2'lik mısır maserasyon sıvısında ulaşmışlardır. Yapılan çalışmada pepton ise 6. sırada yer almaktadır.

Chang vd., (2014), yaptıkları çalışmada karbon/azot (C/N) oranının lipid üretimi üzerinde etkisi olduğu belirtmişlerdir. Çalışmalarında C/N konsantrasyonunun artması kuru biyokütleyi büyük oranda etkilemezken lipid üretimi ise belli bir orana kadar artmış ve sonrasında düşmüştür. Yağlı mikroorganizmalar aşırı karbon ve sınırlı nitrojen kaynağı koşullarında lipid biriktirmektedirler (Ageites vd., 2011).

Çalışmamızda seçilen 6 maya izolatının (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) da atık gül posasını karbon kaynağı olarak kullandığı belirlenmiştir. Ayrıca karbon kaynağı olarak kullanılan atık gül posasının miktarının değişmesinin de (10 g, 12 g, 15 g) lipid üretimine etkisi çalışılarak kaç gramda en yüksek lipid veriminin alındığı saptanmıştır. Ön işlem sıvılarının hazırlanmasında kullanılan atık gül posasının miktarının % lipid değerine etkisini bir parametre olarak belirlenmiş ve bu amaçla 12 g ve 15 g atık gül posası kullanılarak su ile ön muameleleri sonucunda hazırlanan üretim besiyerlerine mayalar aşılantmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-48 ve *K. marxianus*-155 12 g atık gül posası kullanıldığında en yüksek % lipid değerlerine ulaşırken *W. subpelliculosus*-6, *Y. lipolytica*-18 ve *P. anomola*-141 örnekleri ise 15 g atık gül posası kullanıldığında en yüksek % lipid değerlerine ulaşmıştır. Ön işlem sıvısının hazırlanmasında %1'lik H₂SO₄ ve atık gül posasının 12 g ve 15 g kullanılarak yapılan deneylerin sonucunda ise *P. anomola*-141 dışında kalan tüm maya örnekleri için 15 g atık gül posası kullanıldığında daha yüksek % lipid değerleri elde edilmiştir.

Lignosellülozik materyallerin asit ile ön muamelesi en çok kullanılan fizikokimyasal ön işlem yöntemidir (Israilides vd., 1978). Ön işlemde asitler seyreltilmiş olarak ya da konsantre olarak kullanılabilir. Ancak konsantre asit kullanımı yüksek toksisite, korozyon gibi bazı problemlere yol açabilmektedir. Bu nedenle seyreltik asit ile ön muamele daha uygun olmaktadır. Asit ile muamele sonrası hemiselülozu oluşturan monomerler hidrolize olmakta ve mikroorganizmaların kullanabileceği karbon kaynağı oluşmaktadır. Seyreltik sülfirik asit ile ön işlem biyokütleden şekerin büyük bir kısmının ortama geçmesini sağlayabilmektedir (Mosier vd., 2005). Yu vd., (2011) seyreltik sülfirik asit ön-muamelesinden sonra, hemiselülozdan gelen şeker monomerinin, hidrolizat içerisinde %81,6 (v/v) toplam sıvı verimiyle çözüldüğünü bildirmişlerdir. Asidik ön işleme tabi tutulmuş mısır ve buğday kepeği hidrolizatlarının yağlı mayaların yağ üretimi için uygun besin maddelerini içerebileceği bildirilmiştir (Probst ve Vadlani, 2015). Mısır koçanının asitle ön muamelesi ile elde edilen hidrolizatın mikrobik yağ üretimi için umut verici olduğu Huang vd., (2013) tarafından rapor edilmiştir.

Atık gül posası ile hazırlanan ön işlem sıvılarının % lipid değerine etkisini belirlemek amacıyla 1/10 oranına göre hem su hem de %1'lik H₂SO₄ kullanılarak üretim besiyerleri hazırlanmıştır. Üretim besiyerlerinde aşılması yapılan 6 maya izolatının % lipid değerleri karşılaştırıldığında *P. anomola*-141 dışında tüm örneklerin %1'lik H₂SO₄ ile hazırlanan üretim besiyerinde daha yüksek % lipid değerlerine ulaştığı belirlenmiştir. Daha sonra asit ve su ön işlemlili besiyerlerinde mayaların kullandığı şeker miktarını saptamak için sıvıda çözünen şeker miktarı tayini DNS metoduna (Miller, 1959) göre belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan tüm maya izolatlarının iki farklı besiyerinde de şeker kullandığı saptanmış ve ortamda kalan indirgen şeker miktarı 1,20 mg/mL sonucu ve asit ön işlemlili besiyerinde, 0,15 mg/mL sonucu ile *Candida albicans*-7'nin su ön işlemlili besiyerinde şekeri en fazla kullandığı belirlenmiştir.

Optimizasyon tasarımı çalışmasına geçmeden yapılan deneyler sonucunda çalışılan mayaların, 1/10 oranına göre pH 5 olarak hazırlanan %1'lik H₂SO₄'lü gül ön işlem sıvısını içeren ve karbon kaynağı olarak peptonun kullanıldığı üretim besiyeri ile yapılan lipid ekstaksiyonlarında daha yüksek lipid verimlerine sahip oldukları saptanmıştır. Bu saptamaların dışında kalan inokulum yaşı, sıcaklık ve inokulum hacmi parametreleri "Box Behnken" optimizasyon tasarımından yararlanılarak belirlenmiş ve

6 maya örneğinin (*W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155) hangi koşullar altında maksimum lipid verimine ulaşabilecekleri saptanmaya çalışılmıştır.

Box Behnken optimizasyon tasarımı sonucu *K. marxianus*-155, *P. anomola*-141, *W. subpelliculosus*-6 ve yağlı maya *Y. lipolytica*-18 asitle ön işlem uygulanmış atık gül posasında en yüksek lipid üretimini 35°C sıcaklık 33 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacminde yapmışlardır. Lipid oranları sırasıyla %27,89, %33,26, %40,00 ve %35,00 olarak belirlenmiştir. *C. albicans*-7 ve yağlı maya *Y. lipolytica*-48 da ise 30°C sıcaklık 33 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi uygulandığında en yüksek lipid miktarları elde edilmiştir. Lipid oranları sırasıyla %20,63 ve %39,03 olarak belirlenmiştir. En yüksek lipid oranı *W. subpelliculosus*-6'da elde edilmiştir. Bu lipid oranı yağlı maya olan *Y. lipolytica*'nın biriktirdiği lipidin de üstünde saptanmıştır. Yu vd., (2011) asitle muamele edilmiş buğday samanı kullanılarak *C. curvatus* ile elde edilen lipid miktarını %33,5, *Y. lipolytica* için %4,6 olarak bildirmişlerdir. Ön işleme tabi tutulmuş mısır ve buğday kepeği hidrolizatlarını yağlı mayanın lipide biyolojik dönüşümü için uygun besleme maddeleri olarak görev yapabileceği ileri sürülmüştür.

Box Behnken deney tasarımına göre elde edilen sonuçlar Minitab 17 istatistiksel programı kullanılarak hangi maya örneğinin hangi parametrelerde maksimum % lipid değerine ulaşacağı belirlenmiştir. *W. subpelliculosus*-6 ve *Y. lipolytica*-18 için programın belirlediği 35°C, 38 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi parametreleri kullanılarak asitle ön işlem uygulanmış atık gül posasında elde edilen lipid miktarları sırasıyla %45 ve %35,45 olarak belirlenmiştir. *Y. lipolytica*-48 ve *K. marxianus*-155 için programın belirlediği 30°C, 35 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi parametreleri belirlenmiştir. Bu koşullarda yapılan üretim ile lipid miktarları sırasıyla %40,77 ve %28,96 olarak elde edilmiştir. *C. albicans*-7 için programın belirlediği 30°C, 41 saat inokulum yaşı ve %15 inokulum hacmi parametreleri kullanılarak elde edilen lipid %21,87, *P. anomola*-141 için programın belirlediği 35°C, 37 saat inokulum yaşı ve %25 inokulum hacmi parametreleri kullanılarak yapılan lipid üretiminde %35,50 olmuştur. Kolouchova vd., (2016) farklı azot ve karbon kaynakları kullanarak yağlı mayalar ve yağlı olmayan mayalar ile lipid üretimini çalışmışlardır. Araştırmacılar mayaların yüksek oranda doymamış yağ biriktirdiklerini bildirmişlerdir. Yağ oranlarını *Y. lipolytica* için %84, *Candida sp.* için

%80, *R. glutinis* için %79, *T. cutaneum*, %79, *K. polysporus* %89, *S. cerevisiae* %81 ve *T. delbrueckii* %67 olarak bildirmişlerdir. Souza vd., (2017), mayaların farklı karbon kaynaklarında farklı oranlarda geliştiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar gliserol ve glukoz kullanarak *Yarrowia lipolytica* CCMA 0357, *Y. lipolytica* CCMA 0242, *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 ve *Cryptococcus humicola* CCMA 0346 ile lipid üretimini gerçekleştirmişlerdir. *Y. lipolytica* CCMA 0357 ile en yüksek lipid üretimi gerçekleştirmişlerdir (%70 (wt/wt)). Ancak kefir orijinli bir izolat olan diğer bir *Y. lipolytica* CCMA 0242 ile ise (%23,85 (wt/wt)) oranında yağ elde etmişlerdir. Çalışmamızda ise kullandığımız iki *Y. lipolytica*-18 ve *Y. lipolytica*-48 ile optimizasyon sonucunda sırası ile %33,45 ve %40,77 lipid üretimi gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar lipid üretiminin sadece türlere göre değişebileceğine işaret etmektedir. Benzer bulgular Souza vd., (2017)'nin çalışmalarında da vurgulanmıştır. Araştırmacılar mikroorganizmanın izolasyon kaynağının da lipid üretimini etkileyebileceğini söylemişlerdir.

Bellou vd., (2016), azot kısıtlamasının yüksek lipid üretimi için yeterli olmadığını yağ üretim mekanizmasının iyi incelenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Diğer kullandığımız mayalar *W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *P. anomala*-141 ve *K. marxianus*-155 yağlı mayalar içinde belirtilmese de yağ üretimi gerçekleşmiştir. Özellikle *W. subpelliculosus*-6 (%45) bu çalışmada en yüksek yağ üretimini gerçekleştirmiştir.

Mayalar tarafından üretilen mikrobiyal yağların bileşimleri ve oranları farklılık göstermektedir. Yağ üretimin olduğu 6 maya örneğinin içerdikleri yağ asitleri GC-MS cihazı ile tespit edilmiş ve maya örneklerinin palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit olmak üzere farklı oranlarda yağ asitlerinden bir ya da birkaçını içerdikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm maya örnekleri palmitik asit ve stearik asit yüzdelerine sahipken oleik asit ve linoleik asit bazı maya örneklerinde saptanmamıştır. Mayaların içerdikleri asit yüzdeleri toplandığında ise toplam doymuş yağ asidi oranlarının toplam doymamış yağ asidi oranlarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Denli vd., (2000), mayaların yağ üretimlerinin büyük ölçüde C/N oranlarına bağlı olduğunu ve maya lipidlerinin linoleik asit içeriğinin genellikle düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Souza vd., (2014), 30 g/L ham gliserol içeren bir ortamda *Y. lipolytica* ile lipid üretimini incelemişlerdir. Yağ asidi bileşiminde ağırlıklı olarak palmitik (%26,13) ve stearik (%24,73) asitleri bulduklarını bildirmişlerdir. Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada *Y. lipolytica* ile ham gliserol kullanılarak üretilen yağın yağ-asit kompozisyonu palmitik (yağlı asit bileşiminin %45,73'ü), stearik (%16,43), palmitoleik (%13,29), linolenik (%10,77), heptadekanoik (%4,07) ve linoleik (%14,14) asit içerdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar elde edilen yağların ağırlıklı olarak linoleik asit içerdiğini bildirmişlerdir (Souza vd., 2017). Çalışmamızda ise *C. albicans*-7 ve *Y. lipolytica*-48 dışındaki mayalarda linoleik asit saptanamamıştır. Çalışmamızda gül posasından üretilen yağların yağ asit bileşiminde yüksek oranda palmitik asit ve stearik asit saptanmıştır. Knothe, (2009) , biyodizel üretiminde palmitik, stearik, linoleik, oleik ve linoleik asit içeren yağların önemli olduğunu bildirmiştir. Areesirisuk vd., (2015), yağlı mayaların ürettiği lipidlerde oleik asit (%34,40–67,28), stearik asit (%1,49–19,09) ve linoleik asit (%6,30–17,29) bulunduğunu bildirmişlerdir. Şeker kamışı pekmezinde yetişen *Y. lipolytica* tarafından üretilen lipidlerde %21.6 stearik asit ve %27.1 palmitik asit saptanmıştır. Araştırmacılar substrat türünün maya tarafından üretilen lipidlerin miktarını ve kalitesini etkilediğini bildirmişlerdir (Karatay ve Dönmez, 2010). Serbest doymuş asitleri (C16:1-C18:0) içeren kültür ortamında geliştirilen *Y. lipolytica* üretilen lipidleri depoladığı gözlenmiştir (Papanikolaou vd., 2003). Kolouchova vd., (2016) mayaların biriktirdiği doymamış yağların yağ asit profillerinin kullanılan azot kaynağına bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Oleik (18:1), palmitik (16:1) ve linoleik (18:2) asitler yüksek miktarda saptanırken stearik (18:0), araşidik (20:0) asitlerin daha düşük miktarda olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *C. albicans* ile gül atık posasında %21,87 oranında yağ elde edilmiştir. En yüksek yağ asitleri olarak palmitik (45.0) ve stearik asit (42,62) saptanmıştır. Kolouchova vd., (2016) *Candida sp.* ile yaptıkları çalışmada ise elde edilen yağın oleik ve linoleik asit içerikli olduğunu bildirmişlerdir.

Mikroorganizmalardan mayalar uygun koşullarda yağ üretebilme potansiyeline sahiptirler. Yapılan çalışmalar da göstermektedir ki mayalar biyokütlerinin kat kat üzerinde yağ birikimi yapabilmektedir. Mikrobiyal yağ üretiminin önemi dünya çapında gün geçtikçe artmakta ve yapılan çalışmalarla farklı alanlarda ekonomik hedefler belirlenmektedir. Bu çalışmada tarhanadan izole edilmiş maya örnekleri kullanılarak

ürettikleri mikrobiyal yağ oranlarının arttırılabilmesi için karbon kaynağı olarak atık gül posası kullanılmış ve üretim için gerekli optimum değerler saptanmıştır. Atık gül posasının ülkemizde değerlendirilmiyor olması ve bu çalışmaya pozitif katkısının olması nedeniyle endüstriyel atık bir materyalin kötü kokulara sebep olmaktan çıkıp yararlı bir şekilde değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Asitle ön işlem uygulanan *W. subpelliculosus*-6 ile %45 oranında lipid üretimi gerçekleştirilmiş ve karbon kaynağı olarak atık gül posasının çalışmada kullanılmasının % lipid verimine daha büyük bir katkısı olabileceği görülmüştür. Yağlı mayalar içinde yer almayan *W. subpelliculosus*-6 yağlı maya olan *Y. lipolytica*-18 ve *Y. lipolytica*-48'den daha fazla yağ birikimi sağlamıştır. Atık gül posasını değerlendirmede *W. subpelliculosus*-6 ümit vaateden bir izolat olarak belirlenmiştir. Ancak bu değer farklı yağlı mayalar tarafından farklı atık materyallerden elde edilen yağ miktarı ile karşılaştırıldığında daha düşük olarak görülmektedir. Bu farklılığın nedeni atık materyallerin farklılığından ve atıkların sahip olduğu karbon kaynaklarının miktarından kaynaklanabilir. Ayrıca mikroorganizmaları türlerinin farklılığı hatta aynı türün suşlarının farklı olması nedeniyle de olabilir. Yapılacak bazı ilave çalışmalarla bu yağ üretim miktarı artırılabilir. Bunun için birçok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışılan maya örneklerinin gelişimlerinin hızlı olması, pH 5 ve pH 6 aralığında yüksek oranda üreme ve yayılım göstermeleri, karbon kaynağı olarak atık gül posasını kullanıp mikrobiyal lipid üretebilmeleri, 25-35 °C aralığında aerobik ortamda gelişim gösterebilmeleri, yüksek oranda mikrobiyal yağ üretebilmeleri mayalardan endüstriyel alanlarda da yararlanabileceğinin oldukça açık bir kanıtıdır. Aynı zamanda mayalardan mikrobiyal yağ üretimi açısından başka maya türlerinin de denenmesinde fayda vardır. Çalışılan yağlı ve yağsız maya izolatları *W. subpelliculosus*-6, *C. albicans*-7, *Y. lipolytica*-18, *Y. lipolytica*-48, *P. anomola*-141 ve *K. marxianus*-155'in atık gül posasını kullanarak lipid ürettikleri ve spesifik doymamış yağ asitlerini üretme kabiliyetinde oldukları görülmüştür. Yağlı maya *Y. lipolytica* ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Ancak karbon kaynağı olarak gül posası kullanılan ilk çalışmadır. Mayalardan elde edilen lipidlerin yağ asit kompozisyonuna baktığımızda en fazla bulunan palmitik asit (C16:0) ve stearik asit (C18:0) gibi uzun karbon zinciri içeren yağ asitleridir. Bu yağ asit bileşimi bitkisel yağ asitlerine benzemektedir (Yang vd 2015) ve biyodizel üretimi için uygun materyallerdir.

KAYNAKÇA

- Acaroğlu, M., (2008). Türkiyede Biyoktle – Biyoetanol ve Biyomotorin Kaynakları ve Biyoyakıt Enerjisinin Geleceği. VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, UTES'2008.
- Ageitos, J., Vallejo, J., Crespo, P., Villa, T., (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Microbiology and biotechnology* 2011 (90) 1219-1227.
- Aksoy, L., (2010). Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Biyodizel ve retim Prosesleri. *Taşıt Teknolojileri Elektronik Dergisi (TATED) Cilt 2, No: 3, 2010 (45-52)*.
- Aktaş, A., Segmen, Y., (2008). The effects of advance fuel injection on engine performance and exhaust emissions of a diesel engine fuelled with biodiesel. *Gazi Üniversitesi* 2008 (23) 199-206.
- Alptekin, E., anakçı M., (2006). Biyodizel ve Türkiye'deki durumu. *Mhendis ve makina*, cilt:47 sayı:561, 57-64.
- Ansari, T., Hanif, M., Mahmood, A., Ijaz, U., Khan, M., Nadeem, R., Ali, M., (2010). Immobilization of rose waste biomass for uptake of pb (II) from aqueous solutions. *SAGE-Hindawi access to research biotechnology research international volume 2011, Article ID 685023, 9 pages*.
- Areesirisuk, A., Chiu, C., Yen, T., Liu, C., Guo, J., (2015). A novel oleaginous yeast strain with high lipid productivity and its application to alternative biodiesel production. *Applied Biochemistry and Microbiology* 51 (2015), 387-394.
- Arslan, Y., Saraçoğlu, N.,(2012). Fındık Kabuğu Asit Hidroliz Kinetiği. *Gazi Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Ankara*.
- Aysal, F., Aksoy, F., Şahin, A., Aksoy, L., Yıldırım, H., (2014). Hardal Yağından Biyodizel retiminin Optimizasyonu ve Motor Performans Testleri. *AK FEMÜBİD* 14 (2014) 025901 (1-9).
- Beopoulos, A., Nicaud J., (2012). Yeast: a new oil producer. *OCL (Oilseeds and fats crops and lipids)* 2012 (19) 22-28.

- Barth, G., Gaillardin, C., (1996). *Yarrowia lipolytica* in: nonconventional yeasts in biotechnology. *Nonconventional yeast in biotechnology*, 313-388.
- Beligon, V., Poughon, L., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., Fontanille, P., (2015). Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. *Bioresource Technology* 192 (2015) 582–591.
- Bling, E.G., Dyer, W.J., (1959), A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37:911-917
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I., Mizerakis, P., Aggelis, G., (2016). High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *Journal of Biotechnology* 234 (2016), 116-126.
- Bozan, B., Temelli, E., (2003). Extraction of Poppy Seed Oil Using Supercritical CO₂. *Journal Of Food Science* Vol. 68, Nr. 2, 2003.
- Candida, L., Pinzi, S., Macias, R., Koutinas, A., Webb, C., Dorado, M., (2014). The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel* 123 (2014) 33-42.
- Chang, H., Chang, S., Lee, C., Hsu, C., Huang, C., Jang, H., (2014). Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corn cob hydrolysate as carbon source. *Biomass And Bioenergy* 72 (2015), 95-103.
- Çıtak, S., Sönmez, S., Öktüren, F., (2006). Bitkisel kökenli atıkların tarımda kullanılabilirlik olanakları. *Derim* 23 (1): 40-53.
- Çiçek, F., Yalçın, E., (2013). Fungal lipid üretimi ve biyodizel üretiminde kullanılabilirliği. *Türk biyokimya dergisi* 38 (2): 193-199.
- Darcan, S., Sarıgül N., (2015). Mikroorganizmalardan tek hücre yağları üretimi. *Türk mikrobiyal Cem Drg* 45(2):55-67.
- Denli, Y., Tekin, A., (2000). Yağ üretimi ve mikroorganizmalar. *Gıda* 25 (4) : 265-278.
- Dixon, D., Fromtling R., (1995). Morphology, taxonomy, and classification of the fungi. *Manual of clinical microbiology 6th edition*, Washington, DC., 699-708.

- Dong, T., Knoshaug E. P., Pienkos P. T., Laurens L. M. L., (2016). Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy* 177 (2016) 879-895.
- Erdal İ., İ., Aydemir, O., (2003). Gül posasının doğrudan ve zenginleştirilmiş formunun tarımda kullanılabilme olanakları. *S.D.Ü. Fen bilimleri enstitüsü dergisi* 7.1 (2003) 20-26.
- Ertuğrul, S., Mikrobiyal lipidlerin biyodizel üretiminde kullanım kapasitelerinin belirlenmesi (2010). Doktora tezi, Ankara.
- Fidan, M., Alkan, E., (2014). Bitkisel Hammaddelerden Elde Edilen Biyodizelin Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Kullanılması. *GÜFBED/GUSTIJ* (2014) 4 (2): 144-160.
- Fonseca, G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A., (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Microbiology and biotechnology*, Volume 79, Issue 3, 339-354.
- Forde, C., Meane, M., Carrigan J., Mills C., Boland, S., Hernon A., (2014). Biobased fats (lipids) and oils from biomass as a source of bioenergy. *AER BIO National institute for bioprocessing research & training*, Chapter 12.
- Freitas, C., Parreira, T., Roseiro, J., Reis, A., Silva, T., (2014). Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. *Biosource technology* 2014 (158) 355-359.
- Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula gaminis*. *Bioresource Technology* 111 (2012) 398-403.
- Gençer, H., (2012). Bazı maya türlerinde trehaloz ve glikojen metabolizmasına etki eden faktörlerin analizi. *Anadolu Üniversitesi Biyoloji Anabilim dalı doktora tezi*.
- Gupta, N., Steele, A., Fogel, M., Giffin, P., Adams, M., Summons, R., Yang, H., Cody, G., (2013). Experimental formation of geomacromolecules from microbial lipids. *Organic geochemistry* 67 (2014) 35-40.

- Harder, M., Delabio, A., Cazassa, S., Remedio, R., Pires, J., Monteiro, T., Arthur, V., (2013). Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments 274-278.
- Hoekman, S., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M., (2011). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (2012) 143– 169.
- Howell, S., Hazen, K., (2011). *Candida, Cryptococcus* and other yeast of medical importance. *Manual of clinical microbiology*, 10th edition, Washington, DC., 1693-1711.
- Huang, C., Chen, X., Xiong L., Yang, X., Chen., X., Ma, L., Chen, Y., (2013). Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy* 49 (2013), 273-278.
- Huang, W., Tang, I., (2007). Chapter 8. Bacterial and Yeast Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* 185-223.
- Israilides, C., Gant, G., Han, Y., (1978). Sugar level, fermentability and acceptability of straw treated with different acids. *Applied and Environmental Microbiology* 36 (1978), 43-46.
- Jeong, D., Cho, S., Shin, H., Jung, K., (2013). Application of an electric field for pretreatment of a seeding source for dark fermentative hydrogen production. *Bioresource technology* 139 (2013) 393-396.
- Kadam, K., Mcmillan, J., (2003). Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. *Bioresource technology* 2003 (88) 17-25.
- Kantarcıoğlu, A., Yücel, A., (2013). *Candida Albicans*'da Mannan: Çeşitli Özellikleri Ve Önemi. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Kaplan, M., Kıvanç M., Yılmaz, N., Öziç, R., Yılmaz, M., Mutlu, B., Tay, T., Saltan, Z., (2010). *Anadolu Üniversitesi Gıda Laboratuvarı Uygulama Kitabı*, (2010). Anadolu Üniversitesi yayını no:2063, Açık Öğretim Fakültesi yayını no:1097.

- Karaboyacı, M., (2013). Recycling of rose wastes for use in natural plant dye and industrial applications. The journal of the textile institute 2014.
- Karatay, S., (2010). Mikrobiyal lipidlerin biyodizel üretiminde kullanım kapasitelerinin belirlenmesi. Ankara üniversitesi fen bilimleri fakültesi doktora tezi.
- Karatay, S., Dönmez, G., Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses, (2010). Science Direct 101 (2010), 7988-7990.
- Katı Atık Araştırma ve Denetimi Türk Milli Komitesi, (2003). Katı Atık ve Çevre. Sayı 52.
- Kesentaş, H., Akbulut, N., (2006). Mayaların peynir üretiminde destek starter kültür olarak kullanımı. Ege üniversitesi ziraat fakültesi dergisi 43(2): 165-174, 2006.
- Kılıç, O., Çopur, Ö., Göktay, Ş., (1991). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi Uygulama Kılavuzu. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları:7, Bursa, 147.
- Kızılaslan, N., Ünaş, T., (2014). Türkiye ve Avrupa Birliği'nde Biyoyakıt. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 2(1): 26–33, 2015.
- Kim, S., Dale, B., (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass and bioenergy 2004 (26) 361-375.
- Kitcha, S., Cheirsilp, B., (2011). Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. Energy Procedia 9 (2011) 274–282.
- Knothe, G., (2009). Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. Royal Society of Chemistry 2 (2009), 759-766.
- Kolouchova, I., Matatkova, O., Sigler, K., Masak, J., Rezanka, T., (2016). Production of palmitoleik and linoleic acid in oleaginous and nonoleaginous yeast biomass. International Journal of Analytical Chemistry 2016 (2016), 9 pages.
- Kumar, S., Satyanarayana, T., (2001). Medium optimization for glucoamylase production by a yeast, *Pichia subpelliculosa* ABWF-64, in submerged cultivation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2001 (17) 83-87.

- Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T., (2011). The yeast a taxonomic study, 2011 (1), 5th edition 915-916.
- Kurtzman, C., Robnett, C., (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Journal of Microbiology, Antonie van Leeuwenhoek* 1998 (73) 331–371.
- Kurtzman, C., Smiley, M., (1976). Heterothallism in *Pichia kudriavzevii* and *Pichia terricola*. *Journal of microbiology, Antonie van Leeuwenhoek* 1976 (42) 335-363.
- Levering J., Broddrick J., Zengler K., (2015) Engineering of oleaginous organisms for lipid production. *Current opinion in biotechnology* 2015, 36:32-39.
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F., (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and microbial technology* 2007 (41) 312-317.
- Liang, M., Jiang, J., (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via etabolic engineering technology. *Progress in lipid research* 52 (2013) 395-408.
- Maoura, N., Mbaiguinam, M., Nguyen, H., Gaillardin, C., Pourquie, J., (2005). Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (7) 646-656.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., (2008). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable energy* 34 (2009) 1-5.
- McKendry, P., (2001). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Biosource technology* 83 (2002) 37-46.
- Meral, R., Kanberoğlu, S., (2012). Tahıllardan Etanol Üretimi. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.* 2(3): 61-68, 2012.
- Miller, G., (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 426-428.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biosource Technology* 96 (2005), 673-686.

- Narendranath, N., Power, R., (2005). Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and environmental microbiology* 2005 (71;5) 2239-2243.
- Nguyen, C., Simard, R., Simard, T., (1973). Biological treatment of wastewater by yeasts. *Journal (water pollution control federation)*.
- Üstün, G., Bengi, G., (2015). Dünyada ve Türkiyede biyoyakıtların durumu. *Uludağ üniversitesi ziraat fakültesi dergisi* 2015 (29) 157-164.
- Pan, L., Yang, D., Shao, L., Li, W., Chen, G., Liang, Z., (2008). Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid producing capacities. *Food technol-biotechnol* 47 (2) 215-220.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I., (2003). Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Current Microbiology* 46 (2003), 124-130.
- Passoth V., Fredlund E., Druvefors A., Schnürer J., (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala* 6 (1) :3-13.
- Patel, A., Arora, N., Mehtani, J., Pruthi, V., Pruthi, P., (2017). Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and sustainable energy reviews* 2017 (77) 604-616.
- Pitt, J., Hocking, A., (2009). *Fungi and food spoilage*. Springer science and business media llc 2009.
- Probst, K., Vadlani, P., (2015). Production of single cell oil from *Lipomyces starkeyi* ATCC 56304 using biorefinery by-products. *Bioresource technology* 198 (2015), 268-275.
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A., Wei, D., (2017). From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeast. *Bioresource technology* 245 (2017), 1507-1519.
- Ratledge, C., (1990). Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnol* 429-438.

- Sankh, S., Thiru, M., Saran, S., Rangaswamy, V., (2012). Biodiesel production from newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel* 106 (2013) 690-696.
- Saxena, R., Adhikari, D., Goyal, H., (2007). Biomass based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and sustainable energy reviews* 13 (2009) 167-178.
- Sawangkeaw, R., Ngamprasertsith, S., (2013). A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable and sustainable energy reviews* 25 (2013) 97-108.
- Sheng, J., Feng, X., (2015). Metabolic engineering of yeast to produce fatty acid-derived biofuels: bottlenecks and solutions. *Frontiers in Microbiology, Articles* (8 June 2015).
- Sitepu, I. R., Garay L. A., Sestric R., Levin D., Block D. E., German J. B., Boundy-Mills K. L., (2014). Oleaginous yeast for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances* 32 (2014) 1336-1360.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., (2011). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. Technical report NREL/TP-510-42618.
- Souza, K., Ramos, C., Schwan, R., Dias, D., (2017). Lipid production by yeast grown on crude glycerol from biodiesel industry. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 47 (2017) 357-363.
- Souza, K., Schwan, R., Dias, D., (2014). Lipid and citric acid production by wild yeast grown in glycerol. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (2014), 497-506.
- Sriwongchai, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Bajwa, P., Lee, H., (2013). Screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains. *Journal of microbiology, biotechnology and food science*, Sriwongchai et al. 2013: 2 (5) 2344-2348.

- Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., Shima, J., (2013). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource Technology* 153 (2014) 230–235.
- Tosun, İ., Gönüllü, M., Günay, A., (2003). Gül posasının kompostlaştırılmasına gözenek malzemesi ve aşının etkisi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü 93-102.
- Tosun, İ., Gönüllü, M., Arslankaya, E., (tarihsiz). Gülyağı sanayi proses atıkları özelliklerinin belirlenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü.
- Tosun, İ., Gönüllü, M., Avşar, Y., (tarihsiz). Gül posası kompostunda kalite parametrelerinin araştırılması. Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü.
- Tosun, İ., Günay, A., Gönüllü, M.,(2003). Gül posasından biyogaz üretimi ve çevresel önemi. *Katı Atık ve Çevre* sayfa 11.
- Tsigie, Y., Wang, C., Kasim, N., Diem, Q., Huynh, L., Ho, Q., Truongi C., Ju, Y., (2011). Oil Production from *Yarrowia lipolytica* P01g Using Rice Bran Hydrolysate. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2012, Article ID 378384, 10 pages.
- T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü, (2017). 2016 yılı gülçiçeği raporu.
- Uemura, H., (2012). Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. *Microbiology and Biotechnology*, 2012 Volume 95, Issue 1, 1-12.
- Üçgül, İ., Akgül, G., (2010). Biyokütle teknolojisi. *Yekarum Dergi* 1(1), 2010 3-11.
- Vogel, L., Sopher, C., Lee, H., (1998). Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1998) 20, 75–81.

- Walker, G., (2010). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. 99(1): 25-34
- Walker, G., (1998). *Yeast physiology and biotechnology* (1998), Book page 13.
- Wang, Y., Gong, Z., Yang, X., Shen, H., Wang, Q., Wang, J., Zhao, Z., (2015). Microbial lipid production from pectin-derived carbohydrates by oleaginous yeasts. *Process Biochemistry* 50 (2015) 1097–1102.
- Yalçın, S., Ergül, Ş., Özbaş, Z., (2010). Moleküler esaslı yöntemlerin gıda kaynaklı mayaların tanımlanmalarında kullanılmaları. *Gıda* (2010) 35 (5): 379-386.
- Yang, X., Jin, G., Wang, Y., Shen, H., Zhao, Z., (2015). Lipid production on free fatty acids by oleaginous yeasts under non-growth conditions. *Bioresource Technology* 193 (2015) 557–562.
- Yu, X., Zheng, Y., Xiong, X., Chen, S., (2014). Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biomass and bioenergy* 71 (2014) 340-349.
- Yücel, Y., (2012). Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. *Fuel processing technology* 99 (2012) 97-102.
- Yüksekdağ, Z., Beyatlı, Y., (2003). Kefir Mikroflorası ile Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Genetik Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* Yıl: 2003 Cilt: 01 Sayı: 02 49-69.
- Zhan, J., Lin, H., Shen, Q., Zhou, Q., Zhao, Y., (2013). Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as a new source for single cell oils production by *Trichosporon fermentans*. *Biosource technology* 2013 (135) 622-629.
- Zhu, L., Zong, M., Wu, H., (2008). Efficient lipid production with *trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology* (2008) 7881-7885.
- Marietta Collage. Biofuel production through yeast fermentation, (tarihsiz). <http://www.marietta.edu/~biol/introlab/index105.html> (Erişim tarihi: 06.07.2017).