

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞI ZEYTİN KARASUYUNDAN
BİYOTEKNOLOJİK PROSESLER İLE KATMA DEĞER YARATAN ÜRÜNLER
ÜRETİMİ

Alper KARAKAYA

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Şubat

2018

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Alper KARAKAYA

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Serpil TAKAÇ danışmanlığında Alper Karakaya tarafından hazırlanan bu çalışma tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Zümriye AKSU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Z. Serpil TAKAÇ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Aziz Tekin

İmza:

Üye: Prof. Dr. Haluk HAMAMCI

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığı Zeytin Karasuyundan Biyoteknolojik Prosesler ile Katma
Değer Yaratan Ürünler Üretimi

Alper KARAKAYA

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Tez çalışmasının amacı, zeytinyağı üretim fabrikalarının doğaya verilmeden önce arıtılması gereken ancak içerdiği bileşenler nedeniyle önemli bir yan ürün olan zeytin karasuyundan (ZK) biyoteknolojik bir proses içerisinde değerli ürünler üretimi ile fayda sağlanması ve eşanlı olarak arıtılmasıdır. Bu kapsamda zeytin karasuyunun, maya çoğaltma ortamı ve fenolik antioksidan kaynağı olarak kullanılarak katma değere dönüştürülmesine ve kirlletici etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Olaeajenik maya *Rhodotorula glutinis*, ZK ortamında kesikli ve sürekli fermentasyonlar ile çoğaltılmıştır. Kesikli sistemde 10,63 g/L hücre ve 4,56 g/L toplam lipid üretilmiştir. Sürekli biyoreaktör sisteminde yapılan çoğaltmalarda ise 14,17 g/L hücre ve 1,14 g/L toplam lipid miktarına ulaşılmıştır. Sürekli sistemde %60 a kadar toplam fenol giderimi sağlanmıştır. Bu koşullarda 1 L biyoreaktör ortamında ZK biyoarıtım hızı 4 ml/saat'dir. Ortam sıcaklığı üretilen mikrobiyal lipitin doymuşluk derecesini istatistiksel olarak anlamlı değiştiren en önemli parametredir. 30 °C ve 150 rpm koşullarında ZK ortamında çoğaltılan *R. glutinis* toplam lipid ekstresinde, %17,27 doymuş yağ asiti, %66,05 tekli doymamış yağ asiti (%65,10 oleik asit) ve %16,67 çoklu doymamış yağ asiti ölçülmüştür. Toplam lipitin trigliserit miktarı %98'dir. Üretilen mikrobiyal lipitin toplam fenol miktarı 1749 mg/kg; karotenoid miktarı ise 190 mg/kg olarak bulunmuştur. Zeytin karasuyundan antioksidanların geri kazanımı çalışmalarında ise bir diğer fenolik bileşen kaynağı olan üzüm cibresi kullanılmış; cibre karasu ile karıştırılarak sıcaklık, öğütme derecesi, karıştırma hızı gibi parametreler değiştirilmiş ve cibre tarafından en yüksek ZK fenolü tutulma koşulları merkezi kompozit deney tasarımı ile belirlenmiştir. En uygun koşullarda ZK ortamından %64 fenol giderimi sağlanmıştır. Cibreye geçen fenollerin üzüm antioksidanları ile birlikte geri kazanım için yapılan ekstraksiyonda çözücü türü, süre ve sıcaklık parametreleri optimize edilmiş; etil alkol: su karışımı ile cibreten optimum koşullarda 11,97 mg/g cibre fenol geri kazanılmıştır. Cibre ile işlem görerek fenol düzeyi azaltılan ZK ortamının *R. glutinis* ile biyoarıtımı sonucu %55 fenol giderilmiştir. Böylece süreç sonucunda hesaplanan toplam fenol giderimi %83 olarak gerçekleşmiştir.

2018, 162 sayfa

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Biyoarıtım, Fenolik Madde, Karotenoid, Mikrobiyal Lipit, *Rhodotorula glutinis*, Üzüm Cibresi, Zeytin Karasuyu,

ABSTRACT

PhD Thesis

Production of Value-Added Products from Liquid By-product of Olive Oil Processing
Plants by means of Biotechnological Processes

Alper KARAKAYA

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

The aim of the dissertation is to provide benefit from olive mill wastewater (OMW), which is an important by-product of olive oil production plants and should be remediated before being discharged to nature, through production of valuable products in parallel its remediation in a biotechnological process. In this context, the study is focused on adding value to OMW and reduction of its pollutant effects by using it as a medium for yeast growth and also as a source for antioxidant compounds. Oleagenic yeast *Rhodotorula glutinis* was cultivated in batch and continuous fermentation systems in OMW medium. 10,63 g/L cell and 4,56 g/L total lipid concentrations were using batch system. In continous system, however, the concentrations of cell and total lipid were 14,17 g/L and 1,14 g/L, respectively, where the total phenol reduction was 60%. Under these conditions OMW bioremediation rate was 4 ml/h for 1L bioreactor medium. Medium temperature was found to be the most important parameter that affected the degree of saturation of microbial lipid, with a statistical significance. It was found that the amounts of saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acids of total lipid extracted from *R. glutinis*, grown in OMW medium at 30 °C and 150 rpm, were 17,27, 66,05 (65,10% oleic asit) and 16,67%, respectively. The amount of total lipid triglyceride was 98%. Besides, total phenol level of microbial lipid was calculated as 1749 mg/kg and the level of carotenoids was found as 190 mg/kg. Grape marc, which is another source of phenolic substances, was used in the studies for the recovery of the antioxidants from OMW. OMW was mixed with grape marc and the conditions for the highest recovery of OMW phenols were found by changing the temperature, the degree of grinding and the stirring rate using central composite design method. 64% phenol removal was obtained under the best conditions. The effects of solvent type, extraction time and temperature on the extraction of phenolics from treated grape marc were optimised; and 11,97 mg/g grape marc was recovered using ethyl alcohol: water mixture under the optimum extraction conditions. 55% total phenol removal was obtained after the bioremediation of the medium of the treated olive mill wastewater by *R. glutinis*. The overall degree of phenol removal in the process was achieved as 83%.

2018, 162 pages

Keywords: Antioxidants, Bioremediation, Caroteniods, Grape Marc, Microbial Antioxidants, Microbial Lipids, Olive Mill Wastewater, Phenolic Substances, *Rhodotorula glutinis*,

TEŞEKKÜR

Tezin gerçekleşmesinde emeği geçenler ve bağlantı haritası Şekil 0.1’de verilmiştir.

Bana balık tutmayı öğreten, musiki sevdasını ve mühendislik bakış açısını aşılayan babam Ahmet KARAKAYA’ya, her zaman kanaatkâr olmayı gösteren annem Sevgi KARAKAYA’ya, arkadaşlığını ve maddi, manevi desteğini esirgemeyen ağabeyim Mesut Batuhan KARAKAYA’ya, varlığımın kaynağı aileme büyük minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu yola yönlendirerek tez çalışmasının tohumlarını atan, alt yapısını oluşturan kavramların şekillenmesinde fikri emeği geçen, tıkağı noktalarda yeni bakış açıları kazandıran, çalışmaların yürütülmesinde maddi desteğini ve usta-çırak ilişkisi içerisinde kılavuzluğunu esirgemeyen Prof. Dr. Yahya LALELİ’ye kendisi gibi bir bilim insanıyla çalışabilme şansı verdiğini için hürmetlerimi sunarım.

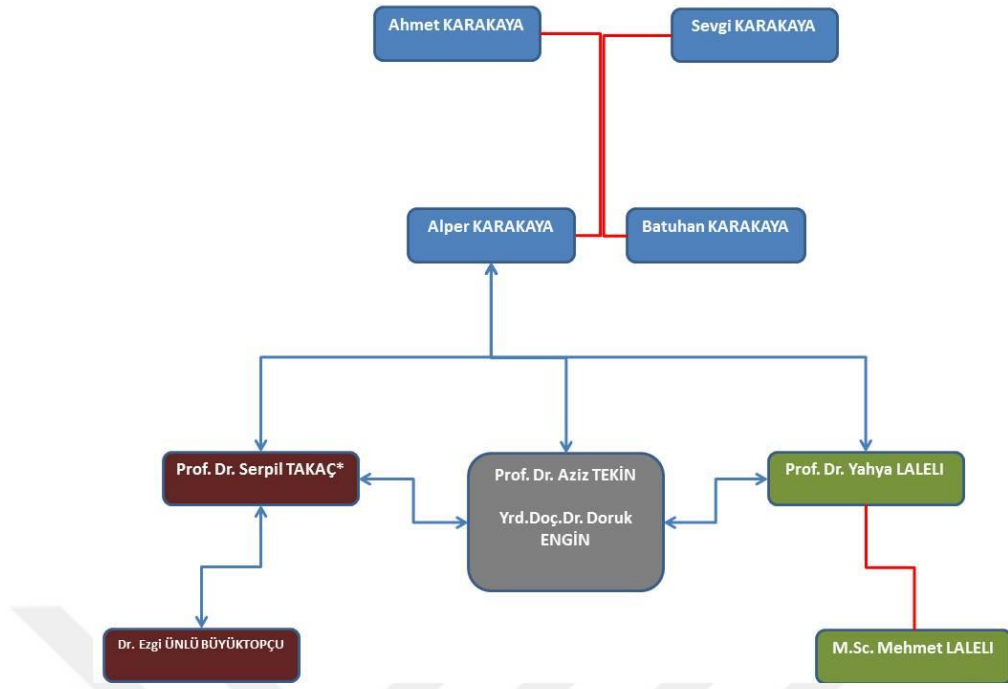
Laboratuvar içerisinde arkadaşlığını ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPÇU’ya yakınlığı için teşekkür ederim.

Umutsuzluğa kapıldığım ve sıkıntıya düştüğüm durumlarda dostluğunu ve ağabeyliğini esirgemeyen Mehmet LALELİ’ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının gelişiminde fikirleri ile destek veren ve bazı analiz ve deneylerin yapılmasında yardımcı olan Tez İzleme Komitesi hocalarım Prof. Dr. Aziz TEKİN veYrd. Doç Dr. Doruk ENGİN’e teşekkür ederim.

Son olarak, bu tezin gerçekleşmesinde hiç şüphesiz en yüksek özveri ve emeği harcayan, dürüst ve disiplinli bir araştırmacı olarak her zaman örnek aldığım, bizleri büyük sabırla işleyen, kıymetli hocam, tez danışmanım Prof.Dr. Serpil TAKAÇ’a aramızdaki özel bağdan ötürü sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımızın bizden sonraki dünyanın daha yaşanır bir yer olmasına katkı sağlaması dileğiyle...



Şekil 0.1. Tezin gerçekleşmesinde emeği geçenler; Mavi: Karakaya Ailesi, Kırmızı: Ankara Üniversitesi Ailesi (* Tez Danışmanı), Gri: Tez İzleme Komitesi Üyeleri, Yeşil: Düzen Biyolojik Bilimler Ailesi

Kurumsal Teşekkür

Lisansüstü eğitimimi tamamladığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne, tez çalışmasının gerçekleşmesinde alt yapı oluşturan Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümüne, bazı laboratuvar analizlerimizin yapılmasında yardımcı olan Düzen Norwest Çevre ve Gıda Analiz Laboratuvarına, tezin endüstri kolu olan Düzen Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş.'ye, araştırma desteği aldığımız TÜBİTAK (109M290, 111M441, 113M589) ve Ankara Üniversitesi (12B43433001, 14H0443002, 17H0443001) kurumlarına teşekkürlerimi sunarım.

Alper KARAKAYA

Tarih

28.03.2018

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
SEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER DİZİNİ	xxi
1 GİRİŞ	1
2 KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 ZEYTİN KARASUYU ORTAMINDA ÇOĞALAN MAYA İLE MİKROBİYAL LİPİT VE KATMA DEĞERİ OLAN DİĞER ÜRÜNLERİN ÜRETİMİ	8
2.2 ANTIOKSİDAN ÖZELLİKTEKİ FENOLLERİN CİBREYE ADSORPSİYONU VE GERİ KAZANIMI, KARASUYUN ATIK ÖZELLİKLERİNİN VE BİYOARITIM DERECESİNİN İYİLEŞTİRİLMESİ.....	17
3 GEREKÇE VE AMAC.....	23
3.1 ÇALIŞMANIN GIDA ENDÜSTRİSİNDEKİ ÖNEMİ.....	23
3.2 ÇALIŞMANIN YAKIT EKONOMİSİ AÇISINDAN ÖNEMİ.....	24
3.3 ÇALIŞMANIN KOZMETİK ENDÜSTRİSİ AÇISINDAN ÖNEMİ	25
3.4 ÇALIŞMANIN TOPLUM, ÇEVRE VE EKONOMİ AÇISINDAN ÖNEMİ	26
4 MATERYAL VE YÖNTEM	28
4.1 MATERYAL	28
4.2 YÖNTEM.....	29

5 ARASTIRMA BULGULARI.....37

5.1 ZEYTİN KARASUYUNUN *RHODOTORULA GLUTINIS* İLE BİYOARITIMI SIRASINDA ÇOĞALAN BİYOKÜTLEDEN MİKROBİYAL LİPİT ÜRETİM KOŞULLARI 37

5.1.1 ZEYTİN KARASUYUNUN *RHODOTORULA GLUTINIS* ÇOĞALMASI VE LİPİT ÜRETİMİNE ETKİSİ 37

5.1.2 ZEYTİN KARASUYU ORTAMINDA GLUKOZ KATKISININ ETKİSİ.....39

5.1.3 KATKI MADDELERİ VE ÖN İŞLEM ETKİSİ 44

5.1.4 ÖN İŞLEM ETKİSİ 51

5.1.5 KARIŞTIRMA HIZI ETKİSİ 54

5.1.6 *RHODOTORULA GLUTINIS*'İN ZK ORTAMINDA ÇOĞALMASI SIRASINDA İNDİRGEN ŞEKER VE FENOLİK BİLEŞENLERİN DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ.....55

5.1.7 *RHODOTORULA GLUTINIS* İLE KAROTENOİD, KURU HÜCRE VE TOPLAM LİPİT ÜRETİMİNE SICAKLIK ETKİSİ.....59

5.1.8 *RHODOTORULA GLUTINIS*'DEN ELDE EDİLEN LİPİT EKSTRAKTININ FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....62

5.2 BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE *RHODOTORULA GLUTINIS* İLE BİYOKÜTLE VE LİPİT ÜRETİMİ.....65

5.2.1 BİYOREAKTÖRDE KESİKLİ İŞLETİM 66

5.2.2 BİYOREAKTÖRDE SÜREKLİ İŞLETİM 66

5.3 ZEYTİN KARASUYUNUN FENOLİK MADDELERİNİN ARDIŞIK HOMOJENİZASYON-EKSTRAKSİYON PROSESLERİ İLE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE BİYOARITILABİLİRLİĞİNİN KOLAYLAŞTIRILMASI İÇİN ENTEGRE BİR PROSES GELİSTİRİLMESİ.....75

5.3.1 ZEYTİN KARASUYUNDAKİ FENOLİK BİLEŞENLERİN CİBREYE GEÇMESİ İÇİN OPTİMUM İŞLEM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ 76

5.3.2 ZEYTİN KARASUYU İLE İŞLEM GÖRMÜŞ CİBREDEN ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU İLE FENOLLERİN GERİ KAZANILMASI.....89

5.3.3 OPTİMUM KOŞULLARDA CİBRE İLE İŞLEM GÖRMÜŞ ZK ORTAMINDA *RHODOTORULA GLUTINIS* ÇOĞALMASI.....98

6	<u>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>100</u>
7	<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>105</u>
8	<u>EKLER.....</u>	<u>114</u>
8.1	EK-1 ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR.....	114
8.2	EK-2 ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL LİSTESİ	115
8.3	EK-3 HÜCRE TARTIMI TEKRARLANABİLİRLİK TESTİ	116
8.4	EK-4 TOPLAM LİPİT ANALİZİNİN TEKRARLANABİLİRLİĞİ	117
8.5	EK-5 TOPLAM FENOL DERİŞİMİ ÇALIŞMA DOĞRUSU.....	118
8.6	EK-6 TOPLAM FENOL ANALİZİ İÇİN TEKRARLANABİLİRLİK TESTİ.....	119
8.7	EK-7 TOPLAM LİPİT FAZINDA KAROTENOİD ANALİZİ	120
8.8	EK-8 İNDİRGEN ŞEKER TAYİNİ.....	121
8.9	EK-9 ZK ORTAMINA ADAPTE OLMUŞ <i>RHODOTORULA GLUTINIS</i> 'İN PROTEİN FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI.....	122
8.10	EK-10 %25 ZK İÇEREN GLUKOZ KATKISI DENEMESİNE AİT CEVAPLAR (T= 30 °C, N=150 RPM).....	125
8.11	EK-11 %10 ZK İÇEREN ORTAMLARDA GLUKOZ KATKISI DENMESİNE AİT CEVAPLAR 126	
8.12	EK-12 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM BİYOREAKTÖR DENEMESİ KURU HÜCRE DERİŞİMİ VERİLERİNE AİT ANOVA ÇİZELGESİ	127
8.13	EK-13 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM SÜREKLİ İŞLETİM BİYOREAKTÖR DENEMESİ TOPLAM LİPİT VERİLERİNE AİT ANOVA ÇİZELGESİ	128
8.14	EK-14 FAKTÖRİYEL TASARIM I DENEYİNE AİT TASARIM MATRİSİ VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR	129
8.15	EK-15 FAKTÖRİYEL TASARIM I DENEYİNE AİT, ZK/CİBRE ORANI, CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ TF GİDERİMİNE TEKLİ VE ÇOKLU ETKİLERİ İÇİN ANOVA ANALİZİ	130

8.16EK-16 FAKTÖRİYEL TASARIM I DENEYİNE AİT ZK/CİBRE ORANI, CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ RENK GİDERİMİNE TEKLİ VE ÇOKLU ETKİLERİ ANOVA ANALİZİ	131
8.17EK-17 FAKTÖRİYEL TASARIM II DENEYİNE AİT DENEY TASARIM MATRİSİ VE CEVAPLAR	132
8.18EK-18 FAKTÖRİYEL TASARIM II DENEYİNE AİT; CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ, TF GİDERİMİNE TEKLİ ETKİLERİ İÇİN ANOVA ANALİZİ	133
8.19EK-19 FAKTÖRİYEL TASARIM II DENEYİNE AİT; CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ RENK GİDERİMİNE ETKİLERİ İÇİN ANOVA ANALİZİ.....	134
8.20EK-20 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI I DENEYİNE AİT DENEY MATRİSİ VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR.....	135
8.21EK-21 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI I DENEYİNE AİT TOPLAM FENOL GİDERİMİNDE YÜZEY CEVABI KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ	136
8.22EK-22 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI I DENEYİNE AİT RENK GİDERİMİ CEVAP YÜZEYLERİNİN KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ.....	137
8.23EK-23 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI- II DENEYİNE AİT DENEY TASARIMI VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR.....	138
8.24EK-24 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM II DENEYİNE AİT TOPLAM FENOL GİDERİMİNDE CEVAP YÜZEY KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ.....	139
8.25EK-25 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI II DENEYİNE AİT RENK GİDERİMİNDE CEVAP YÜZEY KÜBİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ	140
8.26EK-26 ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU SONUCU ZK İLE MUAMELE EDİLMİŞ CİBREDEN GERİ KAZANILAN FENOLLERİN ZK FENOLLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI HPLC KROMATOGRAMLARI	141
8.27EK-27 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI III DENEYİNE AİT DENEY TASARIM MATRİSİ VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR.....	144

8.28 EK-28 GERİ KAZANILAN TOPLAM FENOL MİKTARINA CEVAP YÜZEY KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ.....	145
8.29 EK-29 BİYOPROSES VE ZEYTİN KARASUYU FENOLLERİNİN CİBRE İLE BİRLİKTE GERİ KAZANIMI ÇALIŞMALARININ BÜTÜNSELLİĞİNİ GÖSTEREN SÜREÇ AKIŞ ŞEMASI.....	146
<u>9 ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>147</u>
<u>10 TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>149</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 0.1. Tezin gerçekleşmesinde emeği geçenler; Mavi: Karakaya Ailesi, Kırmızı: Ankara Üniversitesi Ailesi (* Tez Danışmanı), Gri: Tez İzleme Komitesi Üyeleri, Yeşil: Düzen Biyolojik Bilimler Ailesi.....	vi
Şekil 1.1. Vincent van Gogh, “The Olive Trees” tuval üzerine yağlı boya, 73x91cm, 1889 (MoMA koleksiyonu)	2
Şekil 1.2. İznik Vakıf Çinileri tarafından Laleli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi için özel olarak tasarlanmış zeytin ağacı figürü	2
Şekil 2.1. Yağ asiti zincir uzaması ve desaturasyonu biyokimyasal haritası (41).....	15
Şekil 4.1. Sürekli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi: (1) Ham ZK şiesi, (2) Peristaltik pompa, (3) Hava girişi, (4) Mekanik karıştırıcı, (5) pH probu, (6) Sıcaklık probu, (7) Geri soğutucu, (8) ZK tahliye şiesi, (9) biyoreaktör tankı	30
Şekil 5.1 UYM ve %100 ZK içeren UYM ortamlarında üretilen lipitin yağ asiti profilleri (T= 30 °C, N=150 rpm, UYM 72 saat, ZK-UYM 168 saat)	38
Şekil 5.2. %25 ZK içeren ortamlarda zaman ve glukoz derişimine karşı a) kuru hücre, b) toplam lipit ve c) FAME değişimi yüzey cevapları (T= 30 °C, N=150 rpm)	40
Şekil 5.3. %10 ZK içeren ortamlarda zaman ve glukoz derişimine karşı a) kuru hücre derişimi b) toplam lipit ve c) FAME değişimi yüzey cevapları (T= 30 °C, N=150 rpm)....	41
Şekil 5.4 %10 ZK içeren ortamlarda glukoz derişimi ve zaman değişkenlerine bağlı doymuş ve doymamış yağ asitleri oranları yüzey cevabı (T= 30 °C, N=150 rpm)	42
Şekil 5.5. %10 ZK içeren ortamlarda glukoz ve zaman değişkenlerine bağlı hücre başına FAME düzeyi değişimi yüzey cevabı (T= 30 °C, N=150 rpm).....	43
Şekil 5.6. %10 ZK içeren ortamlarda 50 ve 100 g/L glukoz katkısının yağ asiti profiline etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm, 192 saat).....	43
Şekil 5.7. 20 ve 40 g/L gliserol içeren ZK ortamlarında kontrol deneyine karşı zamanla biyokütle ve lipit derişimi değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm).....	44

Şekil 5.8. 20 ve 40 g/L gliserol içeren ZK ortamlarında kontrol deneyine karşı zamanla FAME düzeyi değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm).....	45
Şekil 5.9. 40 g/L gliserol ortamında en yüksek miktarda lipit üretiminin görüldüğü ortamda FAME dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 288 saat.).....	46
Şekil 5.10. 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlara ait zamanla hücre çoğalması (T= 30 °C, N=150 rpm)	47
Şekil 5.11. 40 ve 60 g/L gliserol ortamlarına ait FAME ve toplam lipit derişimi (T= 30 °C, N=150 rpm, 400 saat).....	47
Şekil 5.12 Farklı katkı maddeleri içeren ortamlara ait kuru hücre-toplam lipit (a), lipit/kuru hücre-toplam lipit (b), toplam lipit-FAME (c) ve Lipit/kuru hücre ve FAME/kuru hücre (d) grafikleri. (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat).....	49
Şekil 5.13. ZK, cibre ile işlem gömüş ZK (CZK) ve yağı uzaklaştırılmış ZK(yağsız) ortamlarına ait kuru hücre derişimi ve FAME düzeyleri (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)	52
Şekil 5.14. Karıştırma hızının hücre derişimi ve toplam lipit derişimine etkisi (T= 30 °C, 120 saat)	54
Şekil 5.15. Karıştırma hızının FAME derişimine etkisi (T= 30 °C, 120 saat)	55
Şekil 5.16. %25 ZK çoğalma ortamında pH, hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve indirgen şeker derişiminin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)	56
Şekil 5.17. %25 ZK ortamlarında toplam fenol derişimi ve biyofenol derişimlerinin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm).....	57
Şekil 5.18. Oleuropein'in β -glukozidaz ve esteraz enzimleri ile verdiği hidroliz reaksiyonları (77).....	58
Şekil 5.19. 10, 20 ve 30 °C sıcaklıklarda ZK ortamlarında ve 30 °C sıcaklıkta UYM ortamında karatenoid izlenmesine yönelik hücre çoğalması (N=150 rpm)	59
Şekil 5.20. K10 ortamına ait zamanla yağ asiti doymamışlık profilleri (T= 10 °C, N=150 rpm).....	61

Şekil 5.21. 10, 20 ve 30 °C ZK ortamları ve UYM ortamına ait en yüksek toplam lipid üretim anındaki yağ asiti doymamışlık profili (N=150 rpm)	62
Şekil 5.22. Kesikli işletim biyoreaktör denemesine ait pH eğrisi (T= 30 °C, N=250 rpm) .	66
Şekil 5.23. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarında zaman ile beslenen ZK miktarının değişimi a) pH 6,5 - b) pH 7 - c) pH 7,5 - d) pH 8 (T= 30 °C, N=250 rpm).....	68
Şekil 5.24. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarındaki ortalama ZK tüketim hızları (T= 30 °C, N=250 rpm)	68
Şekil 5.25. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarına bağlı olarak ortam hacmi başına üretim miktarları. a) Kuru hücre b) Toplam lipid c) FAME (T= 30 °C, N= 250 rpm)	69
Şekil 5.26 Farklı pH koşullarında üretilen FAME doymuşluk ve doymamışlık oranları (T= 30 °C, N=250 rpm)	70
Şekil 5.27. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarında üretim hızları. a) kuru hücre üretim hızları b) toplam lipid üretim hızları c) FAME üretim hızları (T= 30°C, N= 250 rpm).....	70
Şekil 5.28 Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarında ortalama arıtım hızları a) toplam fenol tüketim hızları b) toplam fenol giderimleri c) ortalama toplam fenol tüketim hızları (T= 30°C, N= 250 rpm)	71
Şekil 5.29. Merkezi kompozit deney tasarımı sürekli işletim biyoreaktör denemesine ait sıcaklık ve pH koşullarına bağlı kuru hücre derişimi yüzey cevabı (N= 250 rpm).....	73
Şekil 5.30. Merkezi kompozit deney tasarımı sürekli işletim biyoreaktör denemesine ait sıcaklık ve pH koşullarına bağlı toplam lipid yüzey cevabı (N= 250 rpm)	74
Şekil 5.31. Merkezi kompozit deney tasarımı sürekli işletim biyoreaktör denemesine ait sıcaklık ve pH koşullarına bağlı kuru hücre başına toplam lipid yüzey cevabı (N= 250 rpm)	74

Şekil 5.32. Merkezi kompozit I denemesine ait yüzde toplam fenol gideriminin (%) ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi (dakika) ile değişimi (T=30 °C, Parçalama süresi 120 sn).....	82
Şekil 5.33. Merkezi Kompozit Tasarım I deneyine ait renk giderimine ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi(dakika) etkisi cevap yüzeyi (T=30 °C, Parçalama süresi 120 sn).....	83
Şekil 5.34. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyine ait çalkalama süresi (dakika) ile toplam fenol gideriminin (%) değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (ZK/cibre oranı=3 ml/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s).....	86
Şekil 5.35. Merkezi Kompozit Tasarım II deneyine ait çalkalama süresi (dakika) ile % renk gideriminin değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (ZK/cibre oranı=3 ml/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s).....	87
Şekil 5.36. Yapılan optimizasyon deneyine ait cibre ile muameleden önce ve sonra zeytin karasuyunun HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (Kırmızı kromatogram: işlem görmemiş ZK, Siyah kromatogram: işlem görmüş ZK) (ZK/cibre oranı=3 ml/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s, Çalkalama süresi 343 dakika).....	89
Şekil 5.37. ZK işlem görmüş cibrenin n-hekzan ile yıkanmasının etil alkol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılan ekstraksiyonda toplam fenol geri kazanımına etkisi (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 °C, N=150 rpm).....	90
Şekil 5.38. Zeytin karasuyu ile işlem görmüş cibreden fenolik maddelerin geri kazanımı için yapılan çözücü ekstraksiyonunda çözücü türünün etkisi (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 oC, N=150 rpm).....	91
Şekil 5.39. Çözücü etkisi deneyine ait “ZK ile işlem görmüş” ve “ZK ile işlem görmemiş” cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarlarının karşılaştırılması (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a); T=30 oC, N=150 rpm)	92
Şekil 5.40. Çözücü ekstraksiyonu ile “ZK ile işlem görmüş cibreden” geri kazanılan fenolik madde çeşitliliğinin çözücü türü ile değişimini gösteren karşılaştırmalı HPLC kromatogramları (t= 24 saat).....	92
Şekil 5.41. “ZK ile işlem görmüş ve görmemiş cibre”den etil alkol:su (1.1) çözücüsü ile geri kazanılan fenolik maddelerin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları (t=24 saat)	93

Şekil 5.42. Zeytin karasuyunun ve etil alkol:su (1:1) ile ekstrakte edilmiş cibrenin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları.....	94
Şekil 5.43. Merkezi Kompozit Tasarım III deneyine ait geri kazanılan toplam fenol miktarına çözücü/cibre oranı ile sıcaklık etkisi (T= 5 saat).....	97
Şekil 5.44. Cibre ile işlem görmüş-görmemiş ZK ortamlarında <i>R. glutinis</i> çoğalmasına ait pH, toplam fenol ve kuru hücre değişimi grafiği (%25 ZK, T=30 °C, N=150 rpm)	99



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı mikroorganizmaların ürettiği liptin yağ asiti profilleri (40)	13
Çizelge 2.2. Naturel zeytin yağının fenolik bileşenleri (47)	18
Çizelge 2.3. Zeytin karasuyunda bulunan baskın fenolik bileşikler	19
Çizelge 4.1. Çalışmalarda kullanılan zeytin karasuları.....	28
Çizelge 4.2. Kullanılan jeller için protokoller	32
Çizelge 4.3. Elektroforez tamponu için protokol.....	32
Çizelge 4.4. GC analiz koşulları	34
Çizelge 4.5. HPLC analiz koşulları	35
Çizelge 5.1 UYM ve ZK içeren UYM ortamlarında ölçülen en yüksek lipit ve kuru hücre derişimleri (T= 30 °C, N=150 rpm)	38
Çizelge 5.2. %25 ZK içeren glukoz katkısı denemesine ait deney tasarım matrisi (T= 30 °C, N=150 rpm)	39
Çizelge 5.3. %10 ZK içeren ortamlarda glukoz katkısı denemesine ait deney tasarım matrisi (T= 30 °C, N=150 rpm).....	41
Çizelge 5.4. 20 ve 40 g/L gliserol içeren ZK ortamlarında kontrol deneyine karşı üretilen en yüksek kuru hücre ve toplam lipit derişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)	45
Çizelge 5.5. UYM,ZK ve gliserol içeren ortamlarda üretilen lipitlerde ait yağ asiti dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 400 saat)	48
Çizelge 5.6. Tirozol, oleuropein, oleik asit, zeytinyağı ve gliserol içeren UYM ortamlarına ait katkı maddeleri ve miktarları.....	49
Çizelge 5.7. Tirozol, oleuropein, oleik asit, zeytinyağı ve gliserol içeren ortamlarda çoğalan <i>R. glutinis</i> 'e ait yağ asitleri doymuşluk-doymamışlık dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)	50

Çizelge 5.8. Ortamlara uygulanan işlemler ve ortam bileşenleri	51
Çizelge 5.9. Farklı ortamlarda üretilen yağ asiti doymamışlık değerleri (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)	52
Çizelge 5.10. ZK ortamında fenol varlığının hücre, toplam lipit, FAME ve yağ asiti doymuşluk derecelerine etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)	53
Çizelge 5.11. Farklı karıştırma hızlarında üretilen yağ asitleri doymamışlık yüzdeleri (T= 30 °C, 120 saat)	55
Çizelge 5.12. 10, 20 ve 30 °C ZK ortamları ve 30 C UYM ortamına ait en yüksek biyokütle, toplam lipit, toplam lipit/biyokütle ve karoten değerleri	60
Çizelge 5.13. ZK ortamında çoğalmış <i>R. glutinis</i> 'den elde edilen toplam lipit ekstresinin – mono, -di ve -tri gliserit yüzdeleri (T= 30 °C, N=150 rpm, 168 saat)	63
Çizelge 5.14. <i>R. glutinis</i> ekstresinden elde edilen lipit fazının yağ asiti dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 168 saat)	64
Çizelge 5.15. <i>R. glutinis</i> 'ten elde edilen lipitin fenol profili (T= 30 °C, N=150 rpm, 168 saat)	64
Çizelge 5.16 ZK ortamında çoğalan mayadan elde edilen toplam lipit fazının fizikokimyasal özellikleri (Çoğalma koşulları: %25 ZK, 1 g/L üre, 30 °C, 150 rpm, 7 gün)	64
Çizelge 5.17. Biyoreaktör denemesi merkezi kompozit deney tasarım matrisi	72
Çizelge 5.18. Faktöriyel Tasarım I deneyine ait incelenen parametreler ve düzey aralıkları	76
Çizelge 5.19. Faktöriyel Tasarım I deneyine ait ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinin TF giderimine % etkileri	77
Çizelge 5.20. Faktöriyel Tasarım I deneyine ait ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi	77

Çizelge 5.21. Faktöriyel Tasarım II deneyine ait parametreler ve düzeyleri	78
Çizelge 5.22 Faktöriyel tasarım II deneyine ait cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine ana parametrelerin etki değerlendirmesi	79
Çizelge 5.23 Faktöriyel Tasarım II denemesine ait; Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının, renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi	79
Çizelge 5.24. Merkezi Kompozit Tasarımı I deneyinde incelenen faktörler ve seviyeleri..	80
Çizelge 5.25. Merkezi Kompozit Tasarım I deneyine ait toplam fenol giderimi için olası modellerin <i>Lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi	81
Çizelge 5.26. Merkezi Kompozit Tasarımı I deneyine ait renk giderimi için olası modellerin <i>Lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi	82
Çizelge 5.27. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyinde incelenen faktör seviyeleri	84
Çizelge 5.28. Merkezi Kompozit Tasarım II deneyine ait toplam fenol giderimi için modellerin <i>Lack of fit</i> testi çizelgesi	85
Çizelge 5.29. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyine ait renk giderimi için olası modellerin <i>Lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi	86
Çizelge 5.30. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyine ait toplam fenol giderimi ve renk giderimi cevaplarının optimizasyon çizelgesi	87
Çizelge 5.31. Model optimum değerlerinde gerçekleştirilen deneyler ve sonuçların model ile uyumu.....	88
Çizelge 5.32. Farklı çözücüler ile yapılan ekstraksiyonların örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri (t=24 saat).....	94
Çizelge 5.33. ZK ile işlem görmüş cibre ve ZK ile işlem görmemiş cibreden etil alkol:su (1:1) ile yapılan ekstraksiyonların geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri (t=24)	95

Çizelge 5.34 Merkezi Kompozit Tasarımı III deneyine ait incelenen faktörler ve seviyeleri	95
Çizelge 5.35. Merkezi Kompozit Tasarım III deneyine ait geri kazanılan toplam fenol miktarı için olası modellerin <i>Lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi.....	96
Çizelge 5.36. Optimizasyon Çizelgesi (Merkezi Kompozit Tasarımı III)	97



SİMGELER DİZİNİ

AOCS	American Oil Chemists' Society
ÇDYA	Çoklu Doymamış Yağ Asiti
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNS	Dinitrosalisilik Asit
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
DYA	Doymuş Yağ Asiti
FAME	Yağ Asiti Metil Esteri
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IC₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
IOOC	International Olive and Oliveoil Council
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
OMW	Olive Mill Wastewater
PVDF	Polivinilidenflorit
RNA	Ribonükleik Asit
RSM	Response Surface Method
s	Saniye
Ss	Standard Sapma
TA	Toplam Antioksidan
TDYA	Tekli Doymamış Yağ Asiti
TF	Toplam Fenol
UYM	Universal Yeast Medium
ZK	Zeytin Karasuyu
HTY	Hidroksitirozol
TYR	Tirozol
RSM	Response Surface Method
Ma	Molekül ağırlığı

1 GİRİŞ

Doktora tez çalışmasının temel amacı; zeytin karasuyunun biyoteknolojik açıdan değerlendirilmesi için kurulması planlanan pilot ve endüstriyel üretim sistemlerine laboratuvar ölçeğinde veri üretmektir. Bu amaca yönelik olarak tez kapsamında, zeytin karasuyu (ZK) ortamında *Rhodotorula glutinis*'in çoğalması esnasında, biyokütle, toplam lipit, krotenoidler ve antioksidan bileşiklerin üretimi erlen ve biyoreaktör deneyleri ile incelenmiştir. Ayrıca ZK ortamında maya çoğalması sırasında meydana gelen biyokimyasal değişiklikler incelenerek biyosentez süreci anlaşılmaya çalışılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümü olan üzüm cibresi ve ZK antioksidanlarının birlikte değerlendirildiği çalışmada ise ZK'nın maya çoğalma ortamı olarak kullanılmadan önce fenolik bileşenlerinin bir diğer Akdeniz ülkeleri endüstriyel yan ürünü olan üzüm cibresine aktarılarak toplam antioksidan fenolik madde ekstraksiyon koşulları incelenmiştir.

Zeytin ağacının insanlık tarihinde önemli yeri vardır. Büyük dinlerin yazılı kaynaklarında zeytin ağacına birçok atıfda bulunulmuştur. Kutsal olarak görülen zeytin ağacı sükunet, huzur ve insanoğlu ile dünya arasındaki sonsuz bağı sembolize eder (1). Genesis 8:11'de bir güvercinin Nuh peygambere zeytin dalı getirdiği ifade edilir. Güvercin ve zeytin dalı metaforlarının barışı sembolize etmesi buna dayanmaktadır (2). Nur 24/35'de ilahi ışığı, zeytin yağından yapılan bir kandilin ışığına benzeterek "Duvarı bir hücre; içinde bir kandil, kandil de bir cam fânûs içinde. Fânûs sanki inci gibi parlayan bir yıldız. Mübarek bir ağaçtan ne doğuya ne de batıya ait olan zeytin ağacından tutuşturulur. Bu ağacın yağı, ateş dokunmasa bile, neredeyse aydınlatacak (kadar berrak) tır." ifadesi geçmektedir (3). Sanat alanında da zeytin ağacı birçok esere konu olmuştur. Özellikle Vincent van Gogh'un zeytin ağaçları serisi en bilinen örneklerdendir (Şekil 1.1) Hayat ağacı olarak (*tree of life*) bilinen ve evrendeki her şeyin birbiriyle olan ilişkisini sembolize eden zeytin ağacı figürü de farklı şekillerde karşımıza çıkmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Vincent van Gogh, “The Olive Trees” tuval üzerine yağlı boya, 73x91cm, 1889 (MoMA koleksiyonu)



Şekil 1.2. İzmir Vakıf Çinileri tarafından Laleli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi için özel olarak tasarlanmış zeytin ağacı figürü

İnsanlık tarihinde, kültüründe ve sanatta köklü yeri olan zeytin ağacının ve zeytin ürünlerinin günümüz toplum ekonomisinde önemli yeri vardır. Ancak artan talebi karşılamak için yapılan üretim sonucu açığa çıkan yan ürünlerin yönetimi ve değerlendirilmesi de en az

konvansiyonel zeytin ürünleri kadar önemlidir. Bu nedenle zeytin ve zeytin ürünlerinin biyoekonomik olarak katma değerini arttıracak şekilde yan ürünlerin de değerlendirilerek üretimde çevrimi sağlamak önemlidir.

Biyoekonomi doğası gereği çevrimseldir, çünkü doğada bitkiler tarafından tutulan karbon bu bitkilerden elde edilen ürünlerin tüketime kazandırılmasıyla yeniden toprağa ve havaya verilerek döngüye katılır (4). Sürdürülebilirlik kavramı ile yakın ilişki içerisinde olan bu güncel yaklaşım, şüphesiz ki insanın doğayı taklit edebilme çabasına dair bir kavramdır. Bu kavramların ifade ettikleri süreçlerin en kusursuz örnekleri doğada bulunmaktadır. Yüksek teknolojiyi kullanarak doğayı tahrip ettiğimiz gibi, aynı bilgi ve teknikler ile bu tersinir dengeyi girdiler yönünde değiştirebileceğimizi anlamamıza katkı sağlamak bu doktora çalışmasının en önemli çıktılarından olacaktır. Tarımsal üretim sektöründe sürdürülebilir gelişimin ön koşullarından biri döngüsel biyoekonomidir. Döngüsel biyoekonominin sağlanabilmesi için, biyolojik atık ve yan ürünlerin karbon ayak izi bakımından değerlendirilerek ekonomiye geri dönüşümünün sağlanması başat faktörlerdendir (5).

Zeytin karasuyu, içerdiği katma değeri yüksek antioksidanlar nedeniyle atıktan ziyade geri dönüşümü sağlanabilecek bir endüstriyel yan üründür. Zeytin karasuyu, zeytin işleme tekniğine göre zeytinyağı üretiminin farklı fazlarında çıkabilir. Dünyadaki yaklaşık 12 bin zeytinyağı işletmesinin %90'ı santrifüj temelli yağ üretim sistemleri kullanmaktadır. Bu tür sistemler, çıkan ürün ve yan ürünlerin fazlarına göre iki ve üç fazlı sistemler olarak ikiye ayrılmaktadırlar (5). İki fazlı zeytin işleme sistemlerinde su ve katı (pirina) fazlar birlikte çıkar. Üç fazlı sistemlerde ise yağ, su ve pirina fazları ayrı çıkmaktadır. Sistemden çıkan pirina hekzan ile kalan yağı çıkarmak üzere pirina fabrikalarına gönderilir. Yağı uzaklaştırılan ve kurutulan pirina daha sonra birincil yakıt kaynağı olarak kullanılır. Karasu ise konvansiyonel yöntemlerle rehabilitasyonu oldukça güç olan bir yan üründür. Kısa üretim döneminde (3-4 ay) bu kadar yüksek hacimli atık suyun açığa çıkması, karasuyun herhangi bir işlem yapılmadan çevreye verilmesi durumunda, ciddi ekolojik problemler meydana getirir. Yüksek derecede oksijen ihtiyacı ($KOİ = 40-220 \text{ g/L}$) ve fenolik içeriği ($0.5-24 \text{ g/L}$) yüzey ve yeraltı sularında oksijen eksikliği yaratmakta, bitki ve mikrobiyal türlere toksik etki göstermektedir (6). 1 m^3 zeytin karasuyunun kirletici etkisinin 200 m^3 evsel atığa karşılık geldiği bildirilmiştir (7).

Literatürde zeytin karasuyu ile ilgili yapılmış çok sayıda yayın yer almaktadır. Karasuyu sadece atık olarak ele alıp filtrasyon, kimyasal çöktürme gibi fizikokimyasal işlemlerle

arıtmak ekonomik bakımdan sürdürülebilir olmamakla birlikte döngüsel ekonomi açısından da bir kambur olarak değerlendirilmektedir. Bu doktora çalışmasının temel amacı zeytinyağı üretimine döngüsel biyoekonomi ve sürdürülebilirlik kavramları açısından olumlu katkı sağlamaktır. Bu nedenle gerçekleştirilen tez çalışmasında karasuyunun değerli bir antioksidan kaynağı ve ayrıca mikrobiyal biyokütle üretimi için çoğalma ortamı olarak kullanılarak değerlendirilebileceği, mikrobiyal kütlenin de çoğalırken değerli biyomoleküller ürettiği ve eşanlı olarak da atık özelliklerinin iyileştirilebileceği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Fosil kaynakların azalması ve atmosfer karbondioksit düzeylerinin artmasıyla biyolojik kaynaklı alternatif yakıtlara olan ilgi artmaya başlamıştır. Dizel yakıtı alternatif olarak önerilen biyolojik yakıtlar zamanla dünyada yayılmaya başlamıştır. Önceleri mısır gibi tohumluk bitkilerin yağlarından üretilen biyodizel, mısırın mutfaktaki fiyatının tüketiciye olumsuz yönde yansımaya neden olmuştur. Biyodizel alternatif olarak şeker kaynağı olan bitkilerden biyoetanol üretilse de birincil biyolojik kaynaklardan yakıt elde etmenin tek olumsuz yanı gıda ürünleri ile girdikleri rekabet değildir. Doğal kaynaklar insanlığın tarihinden beri siyaset konusu olmuştur. Günümüze kadar büyük göçler, savaşlar ve toplu ölümlerin temelinde yatan halkların doğal kaynaklara erişim için verdikleri mücadeledir. Günümüzde zengin petrol, uranyum ve değerli maden kaynaklarına sahip ülkeler dünya siyasetini belirleyecek güce sahiptirler. Ancak gelecekte erk el değiştirerek içilebilir temiz suya sahip olana geçebilir. Bu nedenle son yıllarda tarımsal ürünlerin maliyetini belirlerken o ürünü yetiştirmek için harcanan su miktarı da önemli parametreler arasına girmiştir. Mısır bitkisi kullanılarak 1 litre biyodizel üretmek için 2854 litre su tüketilmesi gerektiği rapor edilmiştir. Bu değer soya kaynaklı biyodizel için 11000 litredir (8). Bitkisel kaynaklı yakıtlara alternatif olarak mikroorganizmaların kullanıldığı çalışmalar da günümüzde yaygınlaşmıştır. Yağ kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı su tüketimi açısından tarımsal faaliyetlerle kıyaslandığında oldukça caziptir. Algler ve mayalar ile mikrobiyal lipid üretiminin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Işık ve yüzey alanı isteği bakımından mayalar alglerden daha avantajlıdır. Buna karşın biyokütle üretim verimliliği açısından algler daha üstündür. Elde edilen ürünlerin biyokimyasal özelliklerini ise kullanım amacına göre kıyaslamak daha doğrudur. Bu doktora çalışmasında önerilen sistemde, ZK'nın kapalı fermentörlerde özellikle ışık gereksinimi ve harici su tüketimine ihtiyaç duyulmadan biyokütle, mikrobiyal lipid, karotenoid ve antioksidan üretimi ortaya konulmuştur. Özellikle kozmetik alanında yan etkileri bilinen paraben, sodyum lauril sülfat,

fitalatlar, propilen glikol ve formaldehit ya da formaldehit açığa çıkaran kimyasallar yerine biyoteknoloji temelli ürünlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Biyoteknoloji, günümüz kozmetik sektörüne, polifenoller, terpenler, karotenoidler, organik asitler, amino asitler, vitaminler, polisakkaritler, polipeptidler, esansiyel yağ asitleri, steroller ve lipit türevleri gibi çok geniş yelpazede hammadde sağlayabilmektedir (9). Piyasada beta-glukan (CMG) C90, maya ekstraktı E100, maya nükleotidleri N80, maya mannoproteinleri M60, bakır ile zenginleştirilmiş maya ekstresi Z20 ticari isimleriyle ürünler bulunmaktadır (10). Yaşlanma karşıtı, nemlendirici ve canlandırıcı etkileriyle sunulan birçok ürün içerisinde maya ekstresi kullanılmaktadır (11).

Tez çalışmasında kullanılan *Rhodotorula glutinis*'in doğal olarak zeytin ağacında bulunan bir tür olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada zeytin ağacının meyve, dal, yaprak ve zeytin posasında doğal olarak bulunan *R. glutinis* suşları izole etmişlerdir (12). Bir diğer çalışmada ise *R. glutinis*'in zeytin salamura ortamındaki aktivitesi bildirilmiştir (13). *R. glutinis* türünün bazı oleik ekosistemlerde bulunması mayanın karasu ortamında da uyumlu bir şekilde çoğalabileceğinin göstergesi olmuştur. *R. glutinis*'in aynı zamanda zirai olarak zararlı olan birçok mikroorganizma türüne karşı antagonistik etkisi olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar *R. glutinis*'in çilek meyvesinde hastalığa neden olan *Botrytis cinerea*'nın biyokontrolünde kullanılabileceğini göstermişlerdir (14). Bu açıdan bakıldığında tez çalışması zeytinin suyunda çoğalan *R. glutinis*'in zeytin bitkisine zararlı olan mikroorganizmaların biyokontrolünde kullanımı ile ilgili çalışmalara da ışık tutabileceğini göstermektedir.

Tez çalışmasının yapısı, üretim ve araştırma açısından incelendiğinde üç alt bölüme ayrılmaktadır.

1- Zeytin karasuyu ortamında *Rhodotorula glutinis* ile biyokütle, toplam lipit ve diğer katma değeri olan ürünlerin üretimine ortam parametreleri, ön işlem ve katkı maddeleri etkilerinin incelenmesi

2- Zeytin karasuyu ortamında *Rhodotorula glutinis* ile farklı işletim türlerinde biyokütle ve mikrobiyal lipit üretimlerinin incelenmesi ve ZK ortamında çoğalan *R. glutinis* suşunun protein farklılıklarının araştırılması

3- Zeytin karasuyu ve üzüm cibresi antioksidan fenollerinin aynı proses içerisinde geri kazanımları ve eşanlı olarak zeytin karasuyunun atık özelliklerinin iyileştirilmesi

2 KURAMSAL TEMELLER

Zeytin karasuyu (ZK), zeytinyağı üretimi sırasında açığa çıkan bir tarımsal yan üründür. Kimyasal özellikleri işlenen zeytinin cinsine, coğrafyaya, yıla ve yağış miktarı gibi dış etkenlere bağlıdır. Zeytinyağı üretiminde açığa çıkan karasu miktarı, zeytinin içeriğindeki su yanında işlem sırasında eklenen su miktarına da bağlıdır. Çevresel bakımdan, asidik özellikte olması (pH=4-6.7), yüksek miktarda fenol içermesi (0.5-24 g/L) ve kimyasal oksijen ihtiyacının (KOİ) yüksek olması (220 g/L ye kadar), çevreye deşarjını kısıtlamaktadır. Kimyasal özellikleri nedeniyle alıcı çevredeki mikroorganizma ve bitki faunasını olumsuz yönde etkiler. Koyu kırmızı-siyah renkli olması ve keskin kokusu da çevresel olumsuzluk teşkil eder. Bunların yanından şeker, polifenoller, tanenler, polialkoller, pektinler ve lipidler gibi yüksek çeşitlilikte kimyasal bileşenlere sahiptir. Araştırmacılar zengin içerikli tarımsal yan ürünlerin sürdürülebilir yöntemlerle değerlendirilmesi için çalışmalar yapmaktadırlar (15).

Uluslararası Zeytinyağı Konseyinin verilerine göre 2013-2014 sezonunda Dünya’da 3,1 milyon ton zeytinyağı üretimi gerçekleşmiştir. Zeytinyağı üretiminden açığa çıkan karasu miktarı ise Dünya’da yıllık 30 milyon ton olarak verilmektedir (16).

Zeytin karasuyunun toprağa doğrudan verilmesi, toprağın gözeneklilik ve pH gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkiler. Ancak, karasuyun sulamada doğrudan kullanımındaki temel zorluk, fitotoksik etki gösteren ve bitki tohum gelişimini inhibe edebilen fenolik bileşenlerin yüksek derişimidir. Zeytin karasuyunun arıtımında fiziksel, kimyasal, biyolojik ve birleşik prosesler kullanılabilir. Bunlar arasında çevre dostu biyolojik arıtım ilgi çekmektedir. Zeytin karasuyunun biyolojik olarak koyu renginin giderilmesinde, organik yükünün azaltılmasında ve fitotoksik etki gösteren bileşenlerin uzaklaştırılmasında birçok biyoproses ve mikroorganizma denenmiştir. Bu amaçla, başlıcan bakteri, fungus, birleştirilmiş bakteri-fungal sistemi, anaerobik mikroorganizmalar ve birleştirilmiş aerobik-anaerobik mikroorganizmalar kullanılmaktadır (17). Kimyasal oksijen ihtiyacında, polifenol miktarında ve renkte önemli ölçüde azalma sağlayan etkili bir arıtım biyoprosesi, zeytin karasuyunun güvenli ve ekonomik olarak bertaraf edilmesini sağlayacaktır. Ancak, zeytin karasuyu arıtımı için teknik bakımdan etkili ve ekonomik olarak sürdürülebilir bir sistem henüz geliştirilmemiştir. Biyoarıtımdan önce, çeşitli fiziksel veya kimyasal ön işlemler uygulanarak zeytin karasuyunun toplam fenol düzeyinin düşürülmesi biyoarıtım etkinliğini artıracaktır.

Zeytin karasuyu atık özelliklerinin yanında, değerli bir antioksidan kaynağı olarak da bilinmektedir. Oleuropein, hidroksitirozol ve tirozol, içerdiği antioksidan bileşikler arasında en bilinen ve düzeyi en yüksek olanlarıdır. Bu maddelerin antikarsinojen, kalp ve damar hastalıklarına karşı iyileştirici ve önleyici etkileri iyi bilinmektedir. Zeytinyağına antioksidan özelliği veren maddeler bu fenolik bileşiklerdir. Ancak bu maddeler daha çok polar karakterlidir ve bu nedenle zeytinlerin işlenmesi sırasında büyük bir kısmı su fazına geçmektedir. Zeytinyağının içerdiği fenolik bileşiklerin düzeyi, zeytin meyvesinin yalnızca %2'si kadardır. Geriye kalan %98'lik kısım su fazına geçerek proses suyu ile birleşmektedir (18). Zeytinde bulunan fenolik bileşenler çok çeşitlidir. Zeytin karasuyu, en yüksek miktarlarda bulunan hidroksitirozol ve tirozol dışında vanilik asit, kumarik asit, kafeik asit gibi monofenoller ve oleuropein gibi kompleks yapıdaki biyofenoller ile monofenollerin polimerize olmuş formlarını da içermektedir. Biyokimyasal ve kimyasal yollarla bu biyofenoller zeytin meyvesi içerisinde ya da zeytin karasuyunda, daha basit fenol türevlerine, daha yüksek yapıli bileşiklere ya da çeşitli kondenzasyon ve hidroliz tepkimeleriyle birbirlerine ya da farklı bileşiklere dönüşürler (21-22).

Zeytin karasuyu içerisinde çözünmüş olarak bulunan biyofenollerin, gıda, farmasötik ve kozmetik endüstrilerde kullanımları vardır. Yüksek katma değeri olan bu bileşiklerin bir kısmı sentetik olarak üretildiği gibi zeytin karasuyundan da geri kazanılabilmektedir. Geri kazanımda ve saflaştırmada başlıca çözücü ekstraksiyonu, membran teknolojileri ve kromatografik yöntemler tek başına ya da kombinasyonlar ekinde kullanılmaktadır. Yöntemler arasında çözücü ekstraksiyonu en yaygın kullanılanıdır. Ekstraksiyon için organik çözücü kullanımı düşük maliyetlidir ancak kullanılan çözücülerin yanıcı ve toksik olmaları dezavantaj yaratmaktadır. Süperkritik koşullarda yapılan ekstraksiyon ise yüksek maliyetli sistemler gerektirmektedir. Buna karşın çözücü ekstraksiyonu saflaştırılmak istenen bileşiğe spesifik olmayıp, belirli ortak özellikleri taşıyan biyofenol grubunun tümünün birden ekstrakte edilmesini sağlar. Bu nedenle ekstraksiyon, membran ile saflaştırmasından önce ön adım olarak düşünülmektedir. Gelişen membran teknolojileriyle istenilen biyofenolun zeytin karasuyundan yüksek saflıkta ayrılması sağlanabilmektedir (21).

Zeytin karasuyunun zengin organik içeriği bazı mikroorganizmaların üremeleri için uygun ortam oluşturmaktadır. Çevreye zararlı olarak bilinen fenolik bileşikler karbon kaynağı

olarak kullanan organizmaların olduğu bilinmekte ve bu mikroorganizmaların karasuda çoğaltımları üzerine çok sayıda çalışma mevcuttur (19-23-24).

2.1 ZEYTİN KARASUYU ORTAMINDA ÇOĞALAN MAYA İLE MİKROBİYAL LİPİT VE KATMA DEĞERİ OLAN DİĞER ÜRÜNLERİN ÜRETİMİ

Mikrobial lipit üretiminde alglerin kullanımı yaygındır. Ancak mayaların çoğalma süreleri alglerden daha kısadır ve algler ile yapılan üretimlerde ölçek büyütme mayalara göre zordur. Ayrıca mayalar, alglerin aksine ışık gereksinimi duymazlar, bu da sistem tasarımında ve işletiminde kolaylık sağlamaktadır. Mikrobiyal lipit üretimi üzerine yayınlanan çok sayıdaki çalışmada, çeşitli sentetik ortamlarda *R. glutinis* dahil çeşitli mikroorganizmalardan lipitlerin üretimi yer almaktadır. Ancak, *R. glutinis* ile zeytin karasuyu ortamında lipit üretimini araştıran herhangi bir çalışma henüz yayınlanmamıştır.

Lipomyces starkeyi, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* ve *Yarrowia lipolytica* gibi türler yağ üreten mikroorganizmalar “oleaginous” olarak bilinirler. Bu mikroorganizmalar çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanarak lipit üretebilirler; ortamdaki mevcut lipitleri de lipit sentezinde kullanarak lipit kompozisyonunu çeşitlendirebilirler. 600 maya çeşidi arasında sadece 30 türün kendi kuru ağırlıklarının %25 i kadar lipit üretebildikleri bildirilmiştir.

Bazı mayaların mikrobial lipit üretiminde ekonomik olarak fizibiliteleri vardır. Bunlar;

1. *Cryptococcus curvatus*: Gliserolde çoğalabilir, 118 g/L biyokütle ve %69 lipit üretimi yapabilir.
2. *Lipomyces starkeyi*: Ksiloz, etanol ve arabinoz ortamında çoğalabilir ve %73 lipit üretimi yapabilir.
3. *Rhodotorula toruloides*: 100 g/L biyokütle oluşturabilir ve %76 lipit üretimi yapabilir.
4. *Rhodotorula glutinis*: 180 g/L biyokütle oluşturabilir ve %66 lipit üretimi yapabilir.
5. *Yarrowia lipolytica*: Ürettiği lipit kompozisyonu: C16:0=%11, C18:0=%28 ve C18:2=%51

Tüm bu verilerle birlikte, mayalardan üretilen lipit miktarı ve bileşiminin fermantasyon ortam bileşimi ve koşullarına bağlı olarak değişim gösterdiği de vurgulanmaktadır (24).

Bir çalışmada 250 maya türünün ksiloz ortamında çoğalma ve bu molekülü metabolize etme kapasiteleri incelenmiş ve sekiz oleajinöz tür seçilmiştir. Bu türler içerisinde yapılan lipit içeriği analizinde *Rhodotorula glutinis*'in %36,6 ile en fazla lipit birikimini yaptığı belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz, maya ekstraktı; azot kaynağı olarak da peptonun kullanıldığı ortamda ise mayanın lipit üretim kapasitesi %49'a yükselmiştir. Beş litre hacimli biyoreaktör ortamında lipit üretimi %60'a kadar arttırılmıştır (25).

R. glutinis ve *Chlorella vulgaris*'in karışık kültürüyle yapılan bir diğer çalışmada ise çoğalma ortamı olarak deniz ürünleri ve şeker pancarı işleme tesisleri atıkları kullanılmıştır. Maya mikro:alg oranının 1:1 (a:a) olarak ayarlandığı ortamda oluşan 4,62 g/L biyokütleden 88 g/L lipit üretimi gerçekleşmiştir (26).

Monosodyum glutamat üretim atık suyunun, *R. glutinis* de lipit üretimine etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, atık su ortamına üç farklı stratejiyle glukoz eklenmiştir. Başlangıçta (%4 glukoz), kesikli olarak ve kesikli beslemeli olarak yaptıkları üç farklı glukoz ekleme stratejisinden en fazla verim ile lipit üretimi kesikli beslemeli sistemde elde edilmiştir. Araştırmacılar, bu ortamda 25 g/L biyokütle, %20 lipit birikimi ve %45 KOİ giderimi sağlamışlardır. Kesikli beslemeli sistem ile glukoz derişiminin sürekli olarak 15 g/L düzeyinde tutulduğu durumda ise mayanın ortamın toksik etkisinden daha az etkilendiği ve 36 saat içinde üstel çoğalma fazına ulaştığı rapor edilmiştir (27).

R. glutinis ve *Rhodosporidium toruloides* mayaları ile yapılan başka bir çalışmada ise, mayalar hidrolizlenmemiş levoglukosan ortamında çoğaltılmışlardır. Yapılan enzim aktivite testlerinde levoglukosan kinazların aktiviteleri ölçülmüş ve levoglukosanın glukoz-6-fosfata fosforillenme metabolik yolunun aktif olduğu anlaşılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi 0,22 U/mg protein ile *R. glutinis* içeren ortamda ölçülmüştür. Bununla birlikte *R. glutinis* ile çoğalma ortamında sırası ile 6,8 ve 2,7 g/L biyokütle ve lipit üretimi de gerçekleştiği bildirilmiştir (28).

Bir diğer çalışma araştırmacılar, biyodizel üretimi yan ürünü olan ham gliserolü tek karbon kaynağı olarak kullanarak, çoğalma ortamına azot kaynağı amonyum sülfat ve sürfaktan Tween 20 eklenmiş ve bu ortamda *R. glutinis* çoğaltılarak lipit ve karotenoid üretimini incelemişlerdir. Yüzey cevap yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada karbon/azot (C/N) oranının da biyokütle, lipit ve karotenoid üretimine etkileri incelenmiştir. Optimizasyon sonuçları, en yüksek biyokütle üretimin %8,5 gliserol ve C/N=60 oranında gerçekleştiğini

göstermiştir. Buna karşın optimum lipit ve karotenoid üretim koşullarının %9,5 gliserol ve C/N=85 oranında gerçekleştiği görülmüştür. Karıştırılmalı tank reaktör kullanarak yapılan deneylerde ise, pH 6 ve 2 vvm havalandırma hızında %60,7 lipit ve 135,25 mg/L karotenoid üretimi gerçekleşmiştir (29).

Diğer bir çalışmada ise, *R. glutinis* ile lipit ve karotenoid üretim koşulları karbon kaynağı olarak bira fabrikası sıvı atığı kullanılarak incelenmiştir. Atık su (13:1 C/N), glukoz ile desteklenmiş atık su (33:1 C/N) ve sentetik şeker ortamı (103:1 C/N) olmak üzere üç farklı ortamda yapılan fermentasyonlarda sırası ile 5,22, 7,38 ve 9,55 g/L biyokütle üretimi gözlenmiştir. Her üç ortamda da 0,6 ile 1,2 mg/L karotenoid üretilirken, üretilen karotenoidler arasında en yüksek orana %50 ile beta-karotenin sahip olduğu görülmüştür. Lipit üretiminde optimum C/N oranının yaklaşık 100 olduğu belirtilmektedir. Bu değer sentetik şeker ortamının C/N oranına yakındır. Bununla birlikte genel olarak lipit üretiminin azot eksikliğinde indüklendiği vurgulanmaktadır. Çalışmada, bira atık suyu ve glukoz ile desteklenmiş atık su ortamında 120. saatte 200 mg/L ölçüldüğü rapor edilmiştir. Sentetik şeker ortamında ise 48. saatte 20 mg/L olan yağ asidi üretimi 120 saatte 40 mg/L düzeyine yükselmiştir. Araştırmacılar ayrıca mayanın ürettiği lipitlerin ekstrakte edilebilir ve edilemeyen türlere dönüşümlerine göre ölçülen düzeylerin etkilenebileceğini de vurgulamışlardır (30).

Diğer bir araştırma grubu *R. glutinis* ile yaptıkları çalışmada ortamdaki çözünmüş oksijen miktarının lipit üretimine etkisini incelemişlerdir. 30, 40 ve 50 ml ortam hacmi ve 60, 150 ve 210 rpm çalkalama hızlarında yaptıkları deneylerde düşük çözünmüş oksijen miktarının lipit birikimini artırsa da genel lipit kompozisyonunun değişmediğini bildirmişlerdir. Çalışmada en yüksek lipit üretimi 50 ml ortamda %25 olarak belirlenmiştir (31).

Melas ortamında *R. glutinis* ile lipit üretiminin incelendiği bir çalışmada steril olmayan ortam koşulları denenmiştir. Farklı pH ve melas konsantrasyon koşulları denenerek kullanılan *R. glutinis* TR29 suşunun ortamda daha baskın tür olması sağlanmıştır. Araştırmacılar %20 melas ve pH 5 koşullarında kontaminasyon olmadığını gözlemlemişlerdir. Aynı koşulların sabit tutulduğu 25 °C, 4 g/L azot kaynağı ve 168 st çoğalma koşullarında 16,2 g/L hücre ve 10,5 g/L lipit üretimi gözlenmiştir (32).

Patates işleme atık suyu ve gliserol ortamında yapılan bir çalışmada *R. glutinis* ile protein, lipit ve karotenoid üretimi incelenmiştir. pH 4-7 aralığında yapılan çoğalmalarda 72 saat

sonunda üretilen biyokütle miktarı 17,2- 19,4 g/L, % 38,5-41,3 protein, %10,2-12,7 lipit ve 191,7-202,9 ug/g kuru hücre karotenoid üretimi gözlenmiştir. Üretilen lipitin baskın yağ asiti kompozisyonu ise %48-53 oleik asit, %21,4-25,1 linoleik asit ve %13-15,8 palmitik asit olarak hesaplanmıştır. Aynı koşullardaki karotenoid kompozisyonu ise %43,5-47,7 torulen, %34,7-38,6 β -karoten ve %12,1-16,8 torularhodin olarak rapor edilmiştir (33).

Yapılan bir çalışmada hücre çoğalması ve lipit üretim fazını ayıran iki fazlı yarı kesikli sistemde *R. glutinis* ile lipit üretimi incelenmiştir. Hücre çoğalma fazı ve lipit üretim fazına glukoz, sukroz ve gliserolün etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Araştırmacılar aktif transport sisteminin olmamasından ötürü gliserolü karbon kaynağı olarak uygun bulmadıklarını bildirmişlerdir. Optimum koşullardaki 84 saatlik çoğalmada 106 g/L biyokütle ve %63 lipit üretimi gözlenmiştir. Yapılan çalışmada araştırmacılar diğer yağ üreten mayalara göre göz ardı edilemeyecek düzeyde gliserol üretimi de gözlemişlerdir. Karbon kaynağı olarak glukoz ve furuktozun kombinasyonunun kullanıldığı denemelerde ise diauksik çoğalma fazı görüldüğü rapor edilmiştir (34).

Yüzey cevap yöntemi (RSM) kullanılarak yapılan bir çalışmada *R. glutinis* ile üretilen lipitin ortam koşulları değiştirilerek yağ asiti profili biyodizel üretimine en uygun olacak şekilde ayarlanmaya çalışılmıştır. Çalışmada ortam parametreleri olarak sıcaklık, karbon azot oranı ve glukoz derişimi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, yüksek sıcaklık ve azot miktarının tekli doymamış yağ asiti miktarını artırdığı, düşük sıcaklık ve yüksek glukoz derişiminin ise doymuş yağ asiti oranını artırdığı görülmüştür. Zamanın sabit parametre olarak 5 gün ile sınırlandırıldığı çalışmada elde edilen en yüksek biyokütle miktarı 9 g/L, kuru hücre başına toplam lipit miktarı %31 (30 °C, 30 g/L glukoz, 0,5 g/L amonyum sülfat), 18:1 yağ asiti miktarı ise %66 (30 °C, 10 g/L glukoz, 1 g/L amonyum sülfat) olarak ölçülmüştür (35).

Rhodotorula glutinis ile yapılan bir diğer çalışmada ise biyokütle ve lipit verimini arttırmak için bir alg türü olan *Chlorella vulgaris* ile karışık kültür kullanılmıştır. Hava kaldırmalı biyoreaktör kullanılarak yapılan çalışmada karışık kültür ortamında, ayrı ayrı yapılan tekli kültürlerle göre, biyokütle veriminde %17,3, toplam lipit veriminde ise %70,9 artış görülmüştür. İki farklı tür arasındaki bu sinerjestik etki O_2/CO_2 dengesi, madde değişimi, çözünmüş oksijen ve pH düzeyleri bakımından incelenmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek lipit verimi 48 saatlik karışık kültürde 2,58 g/L olarak ölçülmüştür (36).

Literatürde *R. glutinis* dışında diğer mayalar ile de yapılan lipit üretimleri de mevcuttur. Bir çalışmada araştırmacılar ham gliserol ortamında yağ üretme potansiyeli olan yabani tip mayaları incelemişlerdir. Çalışmada öncelikle 129 maya türünün tanımlaması yapılarak lipit üretim potansiyeli görülen beş farklı tür seçilmiştir. Seçilen türler arasında LEB-M3 olarak kodladıkları Pantanal'dan izole edilen mayanın saf gliserol ortamında %20,46, ham gliserol ortamında ise %56,58 lipit ürettiğini bildirmişlerdir. Yapılan genetik analizde bu maya *Candida sp.* türü olarak tanımlanmıştır. Mayanın ürettiği yağ asiti profilinde ise, saf gliserol ortamında %57,35 oleik asit ($C_{18:1}$), ham gliserol ortamında %46 linoleik asit ($C_{18:2}$) bulunmaktadır. Genel yağ asiti profilinin bitkisel yağlara benzer olduğu bildirilmiştir (37).

Bir diğer çalışmada araştırmacılar mısır koçanı hidrolizat ortamında *Trichosporon coremiiforme* türü ile %37,8 lipit içeren, 20,4 g/L toplam biyokütle elde etmişlerdir. Şeker içeriği 45,7 g/L olarak bildirilen hidrolizat, kültür ortamı olarak kullanılmadan önce aktif karbon kullanılarak detoksifiye edilmiştir. Araştırmacılar bu suşun lignoselülozik biyokütleden mikrobiyal lipit üretimi için iyi bir suş olduğunu belirtmişlerdir (38).

Başka bir çalışmada ise araştırmacılar denizden izole ettikleri *Rhodotorula mucilaginosa*'nın lipit üretim potansiyelini incelemek için moleküler teknikler kullanmışlardır. Öncelikle izole edilen mayanın 18S rDNA genlerinin sekanslanarak tanımlanması yapılmıştır. FTIR spektroskopisi kullanarak doymamış yağ asitlerinin mayadaki varlığını gösterilmiştir. Yağ asitleri içerisinde C_{16} ve %6-7 arasında Omega-3 içeren $C_{18:1}$ yağ asitlerinin varlığı bildirilmiştir. Araştırmacılar deniz ortamından izole edilen türlerin Omega-3 yağ asitlerinin üretimi için potansiyel organizmalar olduklarını belirtmişlerdir (39).

Oleajenik mayalar ile lipit üretimi sekonder anabolik aktivite olarak bilinmektedir. Bu mayaların hidrofobik substrat ortamlarında lipit üretimi ve depolaması yaptıkları gibi (ex-novo lipit biyosentezi), şeker temelli ortamlarda da lipit sentezi ve birikimi yaptıkları (de-novo lipit biyosentezi) bilinmektedir. Ancak de-novo ile sentezlenen lipit miktarı çok daha fazladır. Mikrobiyal lipitler çoğunlukla triaçilgliserol formundadır. Bunların yanında mono- ve di- açilgliseroller, stearil-esterler, fosfolipitler, sifingolipitler ve glikolipitlerden oluşmaktadır. Ayrıca, oleajinöz mayaların doymamış yağ asiti içeriği, diğer mayalara göre daha yüksektir. Bu nedenle medikal ve diyetetik amaçlı kullanılacak olan çoklu doymamış yağ asiti bakımından zengin lipit üretiminde (gama-linolenik asit, araşidonik asit, dokohegzanoik asit vb) oleajinöz mayalar tercih edilmektedir. Organizmalar, değerli olan çoklu doymamış yağ asit üretimi bakımından genetik olarak manipüle edebilmekte,

desaturaz, elongaz ve açil-transferaz enzim ifadeleri ve aktiviteleri üzerinde değişiklik yapılabilmektedir. Oleajinöz mikroorganizmalarda de-novo lipit sentezi üzerine yoğunlaşmaktadır. De-novo lipit sentezi özellikle azot yoksunluğunda upregüle edilen prosesdir. Ancak yapılan bazı çalışmalar göstermiştir ki sadece azot değil sülfat ya da fosfat eksikliği durumunda da mayalar lipit birikimine yönlendirilebilmektedir (40). Mikroorganizmaların ürettiği lipit miktarı kadar yağ asiti kompozisyonu da önemlidir. Çizelge 2.1’de bazı mikroorganizmaların ürettikleri yağ asiti kompozisyonları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı mikroorganizmaların ürettiği lipitin yağ asiti profilleri (40)

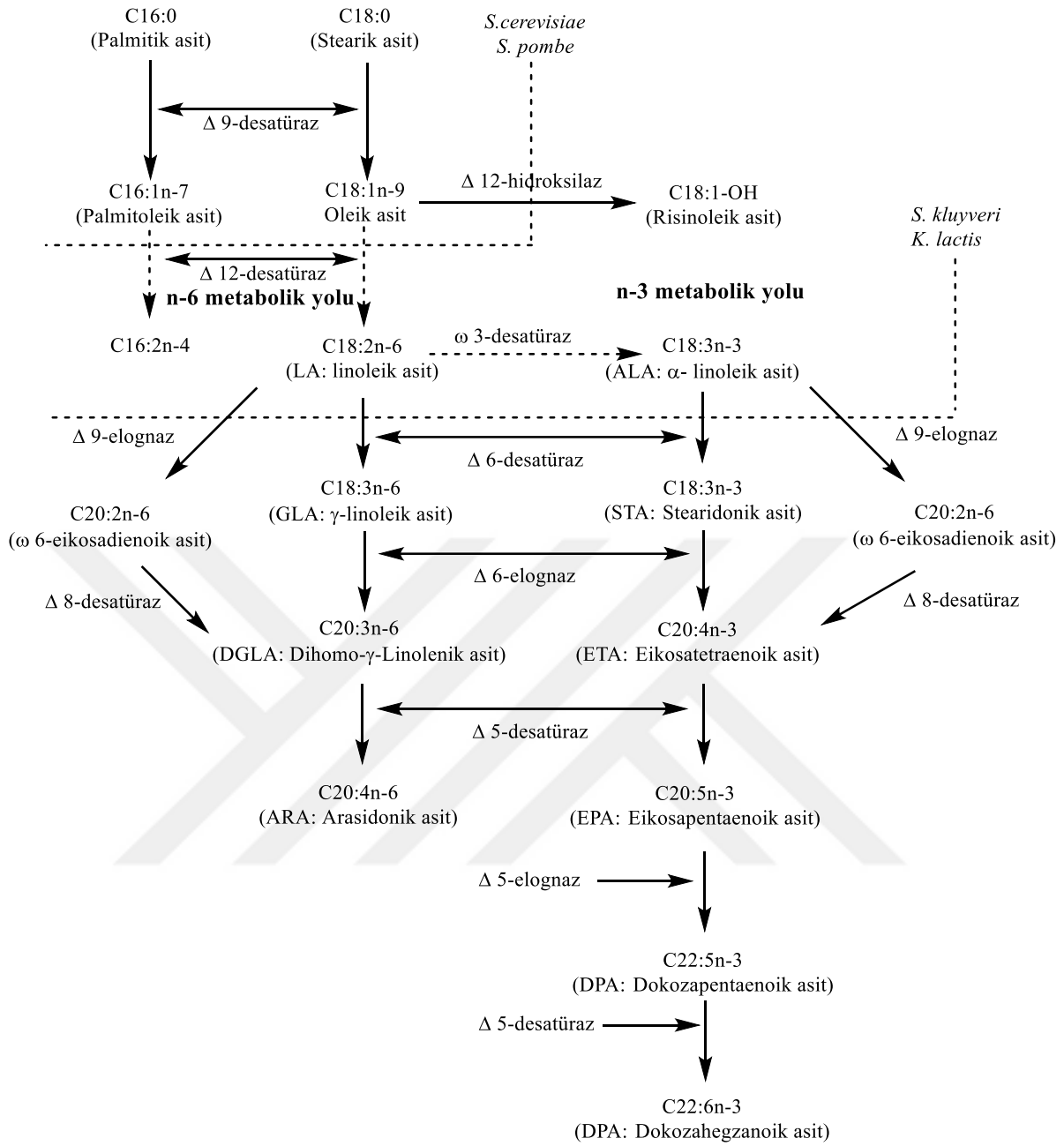
Tür	Lipit (%a/a)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Candida sp.</i>	40,3	23	13	3	54	5	2
<i>Rhodotorula gracilis</i>	41	21	T.	13	51	11	3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	43,2	15	2	11	47	21	3
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	67,5	20	1	15	47	13	3
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	65,2	34	T.	13	48	1	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	62,1	26	2	5	62	3	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	55,6	43	T.	16	35	2	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	68	56	2	14	26	T.	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61,5	37	4	6	49	1	T.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	48,6	22	2	9	55	11	T.
<i>Trichosporon capitatum</i>	37,6	12	1	2	74	9	n.r.
<i>Rhodotorula sp.</i>	22	22	1	7	56	12	n.r.
<i>Candida oleophila</i>	15,3	13	3	7	66	11	n.r.

Yağ asiti kompozisyonu mikroorganizmanın türüne bağlı olduğu gibi çoğalma ortamının bileşenlerine ve koşullara da bağlıdır (40). Biyodizel üretimi açısından bakıldığında zaman 18:1 yağ asiti kompozisyonunun mümkün olduğunca yüksek düzeyde olması istenmektedir. Kanola bitkisinde bu oran %55-65 civarındadır. Yapılan bir çalışmada *R. glutinis*’in 30 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda %65 den fazla oleik asit ürettiği rapor edilmiştir. Ortam sıcaklığı 25 °C’ye indiği zaman ise 18:1 yağ asiti oranının %45’in altına kadar azaldığı görülmektedir. Bu durumun düşük sıcaklıklarda oleoil-CoA (18:1)’yı linoleoil-CoA (18:2)’ya dönüştüren $\Delta 12$ -desaturaz aktivitesinin artmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (35).

Doymamış yağ asitleri hücre membranlarının temel bileşenlerindendirler. Membran akışkanlığı ve sinyal iletim işlemleri üzerinde rolleri vardır. Bu nedenle stres koşulları

altında hücrelerin yağ asiti bileşimleri değişmektedir. Birçok organizma yoğunluklu olarak 16- ve 18- karbonlu yağ asitleri sentezlerler. Yağ asiti desatürasyonu palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asitlerin $\Delta 9$ pozisyonunda bulunan karbon bağına ikinci bir bağ eklenmesiyle başlar. Yağ asiti uzunluğu ve doymamışlık oranları türe göre değişmektedir. *S. cerevisiae* sadece doymuş ve monosatüre 16- 18- yağ asitleri içermektedir. Çünkü *S.cerevisiae* sadece $\Delta 9$ -desaturaz enzimine sahiptir ve böylelikle palmiyoleik C16:1 ve C18:1 n-9 oleik asit üretebilir. Bazı mikroorganizmalarda ise $\Delta 12$ pozisyonunu desature edebilen $\Delta 12$ -desaturaz enzim, oleik asiti tekrar desature ederek linoleik aside (C18:2n-6) dönüşmesini sağlar. Linolenik asit ise linoleik asitin $\Omega 3$ -desaturaz ile 3. çift bağı eklenmesi ile oluşur (Şekil 2.1) (41).





Şekil 2.1. Yağ asiti zincir uzaması ve desaturasyonu biyokimyasal haritası (41)

Yapılan tez çalışmasında *R. glutinis* ile üretilen lipitin yağ asiti kompozisyonunun ortam koşullarıyla ilişkisi incelenmiştir. Mayada ortam koşullarına bağlı olarak gelişen biyokimyasal değişimler proteomik olarak da incelenmiştir. Mikroorganizmalar diğer bütün canlılarda olduğu gibi değişen çevresel koşullarına karşı stres cevabı oluşturmaktadırlar. Mikrobiyal stres mekanizmasının anlaşılması, endüstriyel mikrobiyoloji ve biyolojik arıtım alanlarında önemlidir. Bu alanlarda kullanılan çoğalma ortamları genellikle toksik bileşik içeren yan ürün, tarımsal ya da endüstriyel atıklardır ve bu ortamlar arıtım ve üretim için kullanılacak suların doğal ortamlarından farklıdırlar. Buna karşın mikroorganizmalar farklı

ortamlara adapte olma eğilimindedirler. Mikroorganizmanın alışkın olmadığı bir ortamda çoğalması üzerinde stres yaratır. Mikroorganizma, ortam bileşenlerine bağlı olarak farklı mekanizmalar üzerinden direnç geliştirerek ortama uyum sağlayabilir. Stres cevabı mekanizmalarının anlaşılması ile genetik ya da metabolik mühendisliği yaklaşımlarıyla arıtım ve üretim prosesleri iyileştirilebilir. Bu mekanizmaların anlaşılmasında genellikle genom ve proteom teknikleri kullanılmaktadır. Bir dış etken ile canlıda meydana gelen genetik ya da proteomik değişimler orijinal suş referans alınarak izlenebilmektedir. Bu teknikler aynı zamanda tür tanımlanmasında kullanılan moleküler teknikleri içermektedir. Genomik temele dayanan “mikroarray” ve proteomik temele dayanan jel elektroforez ve MALDI-TOF kütle spektrometresi tekniklerinin kombinasyonları araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (42).

Daha önce yaptığımız çalışmalarda *R. glutinis*’in ZK ortamına adaptasyonu ve biyoarıtımda kullanımı incelenmiştir (43). UYM agar ortamından doğrudan zeytin karasuyuna aktarılan mayaların yaşayamadığı; ancak ZK ile hazırlanmış UYM ortamlarından kademeli olarak seyreltilmiş ZK ortamlarına aktararak adaptasyonları sağlanan hücrelerin yaşadığı ve ileri aşamalarda ZK’ya uyum sağlayarak toksik olan fenolik maddeleri karbon kaynağı olarak kullanmaya başladıkları görülmüştür. Adaptasyon mekanizması tam olarak anlaşılmasa da fenolik bileşenlerin metabolizmasından sorumlu enzimlerin ekspresyon düzeylerinin artması ve membran modifikasyonları ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

Literatürde adaptasyon mekanizmaların aydınlatılması üzerine yapılmış farklı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada *D. hansenii*’nin artan tuz derişimi karşısındaki proteomik değişimi 2D-PAGE ile incelenmiş ve protein spotları MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. Üç saat boyunca farklı derişimlerde NaCl ortamına maruz bırakılan sularda protein sayısında ve çeşidinde derişimler gözlenmiştir. Sonuçta, %8 ve %12 tuz derişimine maruz kalan mayalarda kontrol grubuna göre %28 daha az protein spotu görülmüştür. Bununla birlikte tuza maruz bırakılan mayalarda ekspresyonu artan proteinlerin gliserol sentezinde ve glikolizin üst basamaklarında yer alan enzimler olduğu anlaşılırken, ekspresyonu azalanların glikolizin daha alt basamaklarında ve Krebs döngüsünde görev alan enzimler olduğu belirlenmiştir (44).

Diğer bir araştırma grubu ise *Pseudomonas putida* bakterisinin fenole karşı verdiği stres yanıtını kantitatif proteom teknikleri ile incelemişlerdir. Çalışmada fenol toksisitesi ve tolerans gelişimi iki farklı fenol derişimi içeren ortamlarda incelenmiştir. 2D- PAGE ile

yapılan protein analizlerinde fenole maruz bırakılan bakterilerin 68 farklı yeni protein üretirken 13 proteinin de baskılandığı görülmüştür. Yapılan protein karakterizasyonunda “up-regüle” olan proteinlerin, oksidatif stres cevabı, genel stres cevabı, yağ asiti biyosentezi, transkripsiyonun düzenlenmesi, hücre bölünmesinin inhibisyonu, bakteriyel zarf oluşumu, küçük molekülerin taşınımı ve enerjetik metabolizmadan sorumlu proteinler olduğu anlaşılrken, baskılanan proteinlerin ise nükleotid biyosentezi ve hücre ölümü mekanizmalarıyla ilişkili proteinler olduğu görülmüştür.

2.2 ANTİOKSİDAN ÖZELLİKTEKİ FENOLLERİN CİBREYE ADSORPSİYONU VE GERİ KAZANIMI, KARASUYUN ATIK ÖZELLİKLERİNİN VE BİYOARITIM DERECESİNİN İYİLEŞTİRİLMESİ

Zeytin karasuyunda bulunan biyofenollerin oluşumu, meyvenin çeşidi ve olgunluğuna, iklim koşullarına, depolama süresine ve proses tekniğine bağlı olarak değişir (45). Zeytinin hem etli kısmı hem de çekirdeği fenolik bileşikler açısından zengindir. Bu fenolik bileşikler, zeytinin işlenmesi sırasında serbest kalarak su ve yağ fazları arasında dağılır; bir kısmı ise zeytin kekinde tutulur. Serbest kalan fenolik bileşiklerin su ve yağ fazı arasındaki dağılımı, fenolik bileşenlerin iki fazdaki çözünürlüklerine bağlıdır. Zeytin fenolleri su fazında yağ fazından daha fazla çözünürler. Zeytinyağında bulunan fenollerin derişimi 50-100 mg/g yağ aralığında değişir (46). Zeytinyağının fenolik fraksiyonu, zeytin meyvesinin toplam fenol içeriğinin yalnızca %2’sini içerir, kalan %98’lik kısım ise zeytin karasuyuna geçer. Zeytin karasuyunda bulunan fenoller, depolama süresince, yıkımı oldukça zor olan yüksek moleköl ağırlıklı polimerlere polimerize olma eğilimindedirler (18).

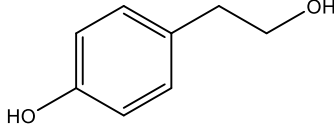
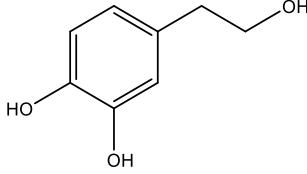
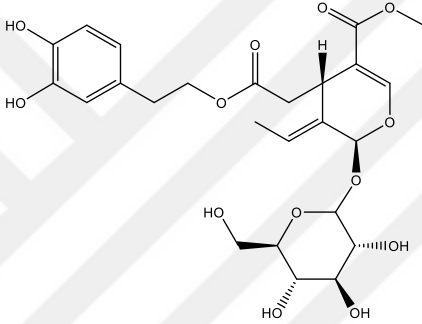
Zeytinde bulunan biyofenoller basit veya karmaşık yapıda çok fonksiyonlu gruplar içerebilirler. Vanilik asit, kumarik asit, kafeik asit, tirozol ve hidroksitirozol gibi basit biyofenoller alken, alkol ve karboksilik gruplar içerir. Sekoiridoitler (oleuropein ve ligstrosit), glikozidik ve monoterpenoid gruplar taşırlar. Naturel zeytinyağının fenolik bileşenleri Bendini ve arkadaşları tarafından Çizelge 2.2’de gösterildiği gibi gruplandırılmıştır (47).

Çizelge 2.2. Naturel zeytin yağının fenolik bileşenleri (47)

Fenolik sınıfı	Fenolik Bileşenler
Benzoik asit türevleri	3-hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoikasit, gentisik asit, vanilik asit, gallik asit, sirincik asit
Sinamik asit ve türevleri	o-kumarik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapinik asit
Sekoiridoit aglikonlar	Oleuropein aglikon, ligstrosit aglikon Oleuropein aglikonun aldehit formu Ligstrosit aglikonun aldehit formu
Fenolik asitler ve türevleri	p-hidroksifenilasetik asit, 4-hidroksi-3-metoksifenilasetik asit 3-(3,4-dihidroksifenil) propanoik asit
Lignanlar	(+)-pinoresinol, (+)-1-asetoksinorsinol, (+)-1-hidroksipinoresinol
Fenil etil alkoller	Tirozol (p-hidroksifenil etanol), hidroksitirozol (3,4-dihidroksifenil etanol)
Sekoiridoitlerin dialdehid formu	Dekarboksimetiloleuropein aglikon, dekarboksimetil ligstrosit aglikon
Hidroksiizokromanlar	1-fenil-6,7-dihidroksiizokroman
Flavonlar	Apigenin, luteolin
Flavonoller	(+)-taksifolin

Zeytin karasuyunda bulunan ana biyofenollerin kimyasal yapıları Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir (21).

Çizelge 2.3. Zeytin karasuyunda bulunan baskın fenolik bileşikler

Biyofenol	Kimyasal Yapısı	Özellikleri
Tirozol		Ma: 138.164 g/mol CAS No.: 501-94-0
Hidroksitirozol		Ma: 154.16 g/mol CAS No.: 10597-60-1
Oleuropein		Ma: 540.514 g/mol CAS No.: 32619-42-4

Zeytin karasuyunda bulunan biyofenollerin antioksidan, serbest radikal tutucu, antimikrobiyal ve antikarsinojenik özellikleri çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuş ve Obied ve ark. tarafından özetlenmiştir (45). Zeytin karasuyuna antioksidan özelliğini özellikle orto-difenolik bileşenler kazandırmaktadır. Bunlar arasında hidroksitirozol ve oleuropeinin zeytin karasuyundan geri kazanımları için üzerinde çok çalışılan bileşiklerdir. Bunların yanısıra, sonradan tanımlanan hidroksitirozil açıldihidroelenolat ve p-kumarol-6'-sekologanozid fenoliklerinin yüksek antioksidan özelliğe sahip oldukları da bildirilmiştir (48). Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek -karbohidrat, DNA, protein ve lipidler gibi substratların oksitlenmelerini önlemek veya geciktirmek suretiyle- hücrelere zarar vermelerini engelleyen moleküllerdir. Antioksidanlar, metabolizmada ve günlük hayatta öneme sahiptir. Canlılar için savunma sistemi olarak görev yaptıkları gibi, endüstriyel alanda özellikle gıda ve plastik sektörlerinde katkı maddesi olarak kullanılırlar. Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşikler arasında hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), antioksidan özelliği nedeni ile dikkat çekici bir bileşiktir (47). Hidroksitirozol, doğal besin antioksidanı olarak ve fonksiyonel gıdaların, farmasötik çözeltilerin ve kozmetiklerin hazırlanmasında kullanılır (49). Aynı zamanda antimikrobiyal

ve antikarsinojenik etkisi de vardır (50). *In vitro* koşullarda yapılan çalışmalar sonucunda, hidroksitirozolün düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği, serbest radikalleri bağladığı, trombositlerin bir araya gelmesini inhibe ettiği, insan nötrofilleri için lökotrien ürettiği ve hücre korumasını sağladığı gösterilmiştir. Hidroksitirozolün ayrıca *in vitro* koşullarda gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel ajan olduğu gösterilmiştir (51). Hidroksitirozol önceleri ticari olarak bulunmazken, son zamanlarda araştırmalarda kullanılmak üzere ticari olarak (1000-2000 \$/g) sağlanabilmekte ve antioksidan olarak farklı markalarda piyasada bulunmaktadır (45).

Zeytin karasuyu, biyoaktif bir polifenol olan oleuropein açısından da oldukça zengindir. Oleuropein, üç yapısal alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimler; bir polifenol olan hidroksitirozol, bir sekoiridoid olan elenolik asit ve glukozdur. Yapılan bir çalışmada kullandıkları zeytin karasularında toplam fenol bileşimini, flavonidleri, flavanoller ve proantosiyonidinleri belirlemişler ve ZK'da en fazla bulunan fenolik maddenin hidroksitirozol olduğunu (%55-79) belirtmişlerdir. Zeytin karasuyunun antioksidan aktivitesinin ise askorbik asite yakın olduğunu bildirilmiştir (7). Diğer bir çalışmada araştırmacılar çalıştıkları beş farklı zeytin karasuyundaki ana bileşenlerin hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit, vanilik asit, verbaskozid, oleuropein, ferulik asit ve p-kumarik asit olduğunu; DPPH ile yaptıkları antioksidan testlerinde alkil aromatik alkol grubunun en yüksek antioksidan aktivitesini ($IC_{50}=20$ mg/L) ve saf hidroksitirozolün ise daha yüksek antioksidan aktivitesi ($IC_{50}=2$ mg/L) gösterdiğini belirtmişlerdir (52).

Üzüm meyvesi de zeytinde olduğu kadar zengin antioksidan içeriğe sahiptir. 2014 yılı dünya üzüm üretimi 74 milyon tondur. Bu üretimin 26 milyon tonu Avrupa'da gerçekleşmektedir. Türkiye'de yıllık üretim ise 4 milyon ton olarak rapor edilmiştir. Dünya'da 2014 yılı şarap üretimi ise 29 milyon ton olarak bildirilmiştir (53). Bu düzeydeki üretim sonucu olarak çok miktarda antioksidan ve organik madde bakımından zengin olan üzüm cibresi açığa çıkmaktadır. Fransız araştırmacılar sekiz farklı şarap bölgesinin üzüm çeşitlerini kimyasal içerik bakımından incelemişler ve cibrenin kimyasal yapısının temel olarak yağ (%3-6), şeker (glukanlar ve ksiloglukanlar) (%20-46) ve kondense tanenlerden (%20-51) oluştuğunu ve bu maddelerin düzeylerinin coğrafyaya göre değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir (54).

“Fransız paradoksu” olgusunun ortaya atılması ile birlikte üzüm ve şarabın fenolik özellikleri de ilgi çekmeye başlamıştır. Özellikle kırmızı üzüm kabuğundan gelen polifenol yapısındaki antioksidan bileşiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Üzüm ve

üzümsü meyvelerin (frambuaz, böğürtlen vb.) fenolik yapısı üzerine yapılmış birçok çalışma vardır. Üzüm fenolleri kimyasal olarak basit fenoller (örn: kafeik asit) ve polifenoller (örn: katekin) olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu sınıflandırmanın yanında, flavinoidler ve nonflavinoidler olarak ayrı bir sınıflandırma da mevcuttur. Kırmızı üzümde bulunan fenollerin %85'ini flavinoidler oluşturur. Antosiyaninler, 3-flavanoller ve tanenler flavinoid sınıfı bileşiklerdir. Flavanoller, üzüm meyvesinde güneşe bağlı olarak sentezlenen renk bileşenleridir. En iyi bilinen flavanol olan kuersetin sarı renkli bir bileşik olup sentezi üzümün aldığı güneş miktarının bir fonksiyonu olarak değerlendirilmektedir. Antosiyaninler ise üzümsü meyvelere mavi ve kırmızı rengini veren O-glikozit yapısındaki bileşiklerdir. Siyanidin, peonidin, delfidin, petunidin ve malvidin üzümde bilinen antosiyanin bileşikleridir. Meyve olgunlaşması esnasında şeker derişimi ile eşanlı olarak artarlar. Bulundukları ortamın pH düzeyine göre kırmızı ve mavi tonları arasında renk değitirirler. Tanenler ise çok miktarda hidroksil grubu içeren gallik asit monomerlerinden oluşan polimer yapıdaki bileşiklerdir. Nonflavinoid grubundaki fenolik bileşikler ise, hidroksisinamik asitler (kafeik asit), benzoik asitler (gallik asit) ve stilbenlerden (resveratrol) oluşmaktadır. Hidroksisinamik asitler, kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asitlerden oluşmaktadır. Son yıllarda üzerine çok çalışılan stilben olan resveratrol, üzüm meyvesi tarafından Botrytis ve diğer mantar enfeksiyonlarına koruma amaçlı üretilir (55).

Üzümden fenollerin ekstrakte edilmesi için farklı ekstraksiyon sistemleri incelenmiştir. Bunlar arasında çözücü ekstraksiyonu en çok kullanılan yöntemdir. Ekstraktın antioksidan profili, kapasitesi ve saflığı kullanılan sisteme göre değışmektedir. Antioksidan ekstraksiyonunda çözen olarak etil alkol ve etilasetat-su karışımının, sıcaklığın (28-60°C) ve ekstraksiyon süresinin (5-24 st) etkisinin incelendiğı bir çalışmada, sıcaklığın ve çözücü cinsinin istatistiksel olarak önemli parametreler olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada en yüksek ekstraksiyon verimi etil alkol ile elde edilmiş; buna karşın bu çözücü ile elde edilen saflığın daha düşük olduğu belirlenmiştir. 60 °C sıcaklıkta 24 °C'ye göre daha yüksek verim elde edilirken 5 ile 24 saat ekstraksiyon süreleri arasında önemli fark kaydedilmemiştir (56). Diğer bir çalışmada, cibreden fenol ekstraksiyonu için metil alkol, etil alkol, aseton, isopropil alkol ve etilasetat çözen olarak denenmiştir. Araştırmacılar ekstraksiyon süresi ve ortam pH'sı gibi parametrelerin de inceledikleri çalışmada 1:1 etil alkol:su çözeltisinin en yüksek fenol ekstraksiyonunu sağladığını (%95,6) bulmuşlar ve ekstraktın fenol düzeyi ve toplam antioksidan aktivitesi arasında korelasyon olmadığını bildirmişlerdir (57). Bir diğer çalışmada cibreden fenol ekstraksiyonunda sıcaklık, süre ve etil alkol:su oranının etkisi

incelenmiştir. Çalışmada merkezi kompozit deneysel tasarımı yapılmış, optimum ekstraksiyon koşulları incelenmiş ve optimum parametre düzeyleri 44,93 °C, 19,34 st ve 70:08 etil alkol:su oranı olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda ekstrakte edilen toplam fenol miktarı ise 388,79 mg/100 g olarak verilmiştir (58).



3 GEREKÇE VE AMAÇ

Biyoteknoloji, farklı temel disiplinlerin bir araya gelerek piyasaya ürün veya hizmet arz eden faaliyetleri içerir. Bu nedenle biyoteknolojik bir çalışmanın önemini değerlendirirken, yapılacak çalışmaları gerekçelendirirken ve amaç ve hedefleri belirlerken piyasa ihtiyaçlarının ve ekonomik parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Akademik ya da endüstriyel alanlardaki farklılıklar gözetilmeksizin biyoteknolojik faaliyetlerin başat parametreleri üretim, ekonomi ve toplumsal faydalanımdır. Bu doktora tez çalışmasının hedeflenen çıktıları birçok endüstriyel alanda talep olan girdiler olarak bilinmektedir. Bu endüstriyel alanlar biyoteknoloji politikalarında önemli yeri olan gıda, yakıt endüstrileri ve yüksek katma değeri olan kozmetik endüstrisi açısından değerlendirilebilir.

3.1 ÇALIŞMANIN GIDA ENDÜSTRİSİNDEKİ ÖNEMİ

Dünya tarıma dayalı gıda üretim hacmi 2000-2014 yılları arasında Dolar bazında 3 kat artmıştır. Aynı süre içerisinde tarımsal alanlar 10 kat artmış, dünya nüfusu da %18 artarak 6 milyardan 7 milyara yükselmiştir (59). Nüfusun %18 artışına karşın tarımsal alanların 10 kat artışı gıda dağılımında ve tüketiminde dengesizlik olduğunun göstergesidir. Bu dengesizliğin kaynağında gıda üretiminde yaşanan kayıplar ve israf nedenleri ön sıradadır. Her yıl dünyada üretilen gıdanın dörtte biri kaybedilmektedir. Bu kaybın içerisinde tüketicinin payı büyüktür (60). Tarımsal faaliyetlerin en önemli parametreleri iklim ve sudur. 1 kilo buğday ekmeği üretmek için 1600 litre su harcanmaktadır (8). Bu veriler içilebilir suyun israfını ortaya koymaktadır. Son yıllarda enerji ve su tüketimi bakımından daha az maliyetli olan mikrobiyal kaynaklı gıdalara olan ilgi artmıştır. Doğrudan gıda kaynağı olarak kullanılan alglerin yanında biyoteknolojik süreçlerle üretilmiş gıda desteği ürünleri de ticari önem kazanmaktadır. Mikroorganizmaların fermentasyon ile gıdalarda kullanımı binlerce yıldır uygulanan süreçlerdir. Ancak son yıllarda mikroorganizmaların kendisi doğrudan gıda kaynağı olarak ya da destekleyici ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Alg, maya ve bakteri kaynaklı olabilen tek hücre proteinleri, insan ve hayvan gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Vitamin ve esansiyel amino asitler bakımından oldukça zengin olan tek hücre proteinleri içerdikleri nükleik asitlerin sindirim zorluğu ve allerjen etkisiyle tartışmaya açıktır (61). Ancak bir kilo sığır eti üretmek için 15 ton su tüketimi gerektiği (8) ve enterik fermentasyondan kaynaklı karbon emisyonunun dünya toplamının %28'i olduğu düşünüldüğünde tek hücre proteinlerinin yan etkilerinin ileri saflaştırma teknikleriyle

giderilme ve verim yükseltme çalışmaları daha makul görülebilir (62). Mikrobiyal yağlar da gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Algler, mayalar, bakteriler ve maya benzeri deniz mikroorganizmaları olan “*thraustochytridsler*” ile çoklu doymamış yağ asitleri, özellikle oldukça değerli olan Omega-3 ve Omega-6 yağ asitlerinin üretimi ve gıda takviyesi olarak kullanımları değerlendirilmektedir (63).

Tez çalışması, gıda amaçlı maya biyokütlesi, yağ ve antioksidan üretimi için konvansiyonel tarım ve hayvancılık uygulamalarına göre su ve enerji tüketimini azaltacak süreç ortaya koymaktadır.

3.2 ÇALIŞMANIN YAKIT EKONOMİSİ AÇISINDAN ÖNEMİ

Doktora tezinde zeytin karasuyunun biyoarıtımı esnasına çoğalan maya kütesinden gıda, kozmetik ve biyoyakıt endüstrisine yönelik mikrobiyal lipit üretimi için biyoproses geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı gıda ve biyoyakıt üretimi son yıllarda hızla önem kazanmaktadır. Birinci ve ikinci dünya savaşları sırasında Almanya’da tek hücre proteinleri gıda desteği olarak kullanılmış; 1960’lardan sonra ise mikroorganizma kütesinden yakıt üretimi üzerine çalışmalar ve çok sayıda yayın yapılmıştır. 1973’teki kriz ile petrol fiyatlarının yükselmesi sonucu Brezilya ve A.B.D. biyoyakıt üretim programlarını gündemlerine almışlardır. 1980’lerin sonunda tarımsal hammadde fiyatlarındaki artış ve petrol fiyatlarındaki düşüş ile biyoyakıtlara azalan ilgi, 2000’li yıllarda petrol kaynaklarının azalmaya başlaması ve karbondioksit salınımının iklim değişikliği üzerindeki olumsuz etkilerinin anlaşılma başlanması ile alternatif enerji kaynaklarına yönelim sonucu yeniden artmıştır. Hükümetler petrol kaynaklı yakıtlara çeşitli oranlarda yenilenebilir yakıtların karıştırılmasını zorunlu koşmaya başlamışlardır ve bu şekilde biyoyakıt üretimi yaygınlaştırmıştır. Ancak tarımsal alanların ve yenilebilir ürünlerin de bu amaçla kullanılması, gıda ürünlerinde rekabete yol açmıştır. Tüm bu olumsuzluklar biyoyakıt üretiminin üretici ve tüketiciler tarafından olumsuz algılanmasıyla sonuçlanmıştır. Ancak bu olumsuzlukları doğuran biyoyakıtın kendisi değil biyoyakıt üretiminde kullanılan hammaddedir. Günümüzde ileri biyoteknoloji teknikleri kullanılarak sürdürülebilir üretim mümkündür. Doğal kaynakların zenginliği biyoteknolojik sistemlerin uygulama alanını çok büyük ölçüde genişletmektedir. Bu geniş yelpazeye mikroorganizmalar da (maya, alg ve bakteri) girmektedir. Doktora tezinde çalışılan maya, oleajinöz bir tür olan *Rhodotorula glutinis*’dir. Oleajinöz mayalar hücre içinde yüksek miktarlarda lipit biriktiren mayalar olarak bilinirler

ve *R. glutinis*'in uygun koşullarda kendi ağırlığının %66'sına kadar lipid biriktirdiği bildirilmiştir (64).

Genişleyen pazar hacmi karşısında biyodizel üretimi için gıda amaçlı kullanılmayan tarımsal ürünlerin (birinci nesil biyoyakıt kaynakları) dışında alternatif kaynakların bulunması kaçınılmaz hale gelmiştir. İkinci nesil kaynaklar arasında yer alan mikroorganizmalar için gerekli çoğalma ortamları ise sistem maliyetini belirleyen en önemli girdilerdendir. Bu nedenle endüstriyel atıkların çoğalma ortamı olarak kullanımı çevre, sürdürülebilirlik ve ekonomik açılardan önemlidir.

Biyoyakıt piyasası petrol yakıtlarının alternatifi oldukları için dünya petrol politikaları ve piyasalarından önemli ölçüde etkilenmektedir. 2010 yılından sonra 100 Amerikan Doları düzeylerinde olan ham petrol varil fiyatları günümüzde 50 Dolara kadar düşmüştür (65). Bu nedenle son yıllarda biyoyakıtlara olan talep de değişen maliyet dengeleri nedeniyle azalmıştır. Bu nedenle yapılan tez çalışmasından elde edilen ürünler daha çok gıda, kozmetik ve farmasötik amaçlı kullanıma yönelik değerlendirilmiştir. Ancak unutulmamalıdır ki fosil kaynaklı yakıtlar sürdürülebilir değildir. Gelecekte çevresel koşulların önemi maliyet dengelerinin üzerine çıkacak ve biyoyakıtların yaygınlaşması daha da önem kazanacaktır.

3.3 ÇALIŞMANIN KOZMETİK ENDÜSTRİSİ AÇISINDAN ÖNEMİ

Yağ asitleri kozmetik sektöründe nemlendirici ve yumuşatıcı amaçlı yaygın olarak kullanılan hammaddelerdir. Yağ asitleri cilt yüzeyinde hidrofobik bir tabaka oluşturarak cildin nem kaybını engellemektedir. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri güçlü antioksidan maddelerdir ve güneşin ciltte yarattığı oksidatif strese karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda kollajen yıkımını engelleyerek kırışık oluşumu gibi yaşlanma etkilerini azalttığı da bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda zeytin karasuyu fermentasyonu ile mayadan elde edilen lipitin çoklu doymamış yağ oranının ortam sıcaklığı ve pH gibi faktörlerle arttırılabileceği görülmüştür. Polifenoller ve karotenoidler de cilt bakım ürünlerinde serbest radikallere karşı kullanılan hammaddelerdendir. Yüksek düzeyde antioksidan etkileri olduğu bilinen bu maddeler aynı zamanda güçlü antimikrobiyal maddelerdir (9). Böylelikle içeriğinde bulunduğu kozmetik ürünler için doğal bir koruyucu olarak görev yaparlar.

3.4 ÇALIŞMANIN TOPLUM, ÇEVRE VE EKONOMİ AÇISINDAN ÖNEMİ

Sürdürülebilirlik, döngüsel ekonomi, karbon ve su ayak izi, biyoekonomi, geri dönüşüm, karbon emisyonu gibi terimler sıklıkla teknik ve akademik yayınlarda kullanılmaya başlanmış, sadece akademi düzeyinde değil, toplumsal sözcük dağarcığımızda da yer edinerek gündelik hayatımıza dahil olmuş kavramlardır. Dergi ve gazetelerde, haber bültenlerinde, televizyon kanallarının altın saatler diliminde yayınlanan programlara konu olan bu kavramların şüphesiz toplum mühendisliği ile de yakından ilişkisi vardır. Organik gıdalara olan ilgi, doğu felsefesini temel alan yoga gibi pratiklerin yaygınlaşması, doğal yaşam modelleri beyaz yakalı olarak sınıflandırılan entelektüel kesimin ilgisini katlayarak çekmekte, bu ilgi kişisel eğitimler, seminerler ve toplu etkinlikler ile birlikte yeni arz talep dengesi oluşturmaktadır. Tüm bu faaliyetler önerilen yeni toplum modeli ile birlikte yeni ekonomi ve sanayi modellerini de içermektedir. Organik gıdanın da halka ekstra maliyetler yükleyerek sunulması doğru değildir. Devletler halkın her kesimine sunulan her çeşit gıdanın eşit derecede güvenli ve sağlıklı olmasını kontrol etmek ve sağlamakla yükümlüdürler. Ancak organik tarım uygulamalarının yüksek maliyeti topluma yansımaktadır. Tarımsal üretimlerde atıkların geri dönüşümü ve yeniden değerlendirilmesi bu maliyetleri düşüreceğinden halka sunulan organik ve konvansiyonel ürün fiyatları arasındaki uçurumu dengeleyecektir.

Geçtiğimiz yüzyıl petrol ve zengin yeraltı kaynaklarını sanayide kullanabilen ülkelerin altın yıllarıyken, temiz su ve diğer doğal kaynaklara erişim önümüzdeki yüzyılda oyun değiştirici olacaktır. Bu kaynaklara sahip olmak değil, bilinçli kullanımı esastır.

Avrupa Birliği üretimde sürdürülebilirliğinin sağlanması için üret-kullan-at doğrusal ekonomik modelin yerine döngüsel ekonomiye geçilmesi için yasal düzenlemeler yapmaktadır. Bu kapsamda yeşil teknolojiler gelişmektedir ve günümüzde hacmi 1 trilyon Avro olan endüstri alanı doğurmuştur. Bu hacmin 2020 yılında ikiye katlanması öngörülmektedir. Döngüsel ekonominin yaygınlaşması ile karbon emisyonunun 2020 yılında %48, 2050 yılında %84 oranında azaltılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca otomobil üretimi, yapı malzemeleri, sentetik gübreler, pestisitler, tarımsal su kullanımı, yakıtlar ve yenilenemeyen elektrik bakımından birincil malzeme tüketiminin 2020 yılında %32, 2050 yılında %53 azalacağı da rapor edilmiştir. Biyoekonomi, döngüsel ekonomi içerisinde büyük paya sahiptir. Avrupa’da 2012 yılından itibaren atık ve biyokütlelerinin dönüşümü ve

ekonomiye yeniden kazandırılması için yapılan çalışmalarda 3,7 milyar Avro yatırımla yenilikçi teknolojiler ve biyorafineriler kurulmuştur (66).

Yapılan tez çalışmasında zeytinyağı fabrikası sıvı atığının maya üretme ortamı olarak kullanarak kozmetik, farmasötik, gıda ve biyoyakıt sektörüne hammadde sağlayabilecek bir sistem geliştirilebileceği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu sistem döngüsel biyoekonominin önemli tuğlalarından olan endüstriyel simbiyoz modeline de uymaktadır. Böylelikle zeytinyağı fabrikasının atığı bir başka endüstri kolunun hammaddesi haline gelmiş olacaktır.



4 MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 MATERYAL

Zeytin karasuyu

Çalışmada 2011, 2012, 2014 ve 2015 hasat dönemlerinde Düzen Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş. tarafından Taylıeli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi'nden (Burhaniye/Balıkesir) (üç fazlı üretim) sağlanan zeytin karasuyu (ZK) kullanılmış ve kullanılmadan önce -20 °C'de çalışan soğutucuda muhafaza edilmiştir. Kullanılan zeytin karasularının pH ve toplam fenol derişimleri ile kullanıldığı deneylerin yer aldığı tez bölümleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmalarda kullanılan zeytin karasuları

Hasat dönemi	pH düzeyi	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Kullanıldığı tez bölümleri
2011	4.7	1056	5.1
2012	4.98	1050	5.2 (5.2.7 hariç)
2014	4.5	905	5.3.1.1/5.3.1.2.1
2015	4.5	1500	5.2.7/5.3.1.2.2/5.4

Üzüm cibresi

2011 hasat dönemine ait Öküzgözü cinsi üzüme ait preslenmiş cibre Vinkara Şarap Fabrikasından (Kalecik/Ankara) sağlanmış ve -20 °C sıcaklıkta depolanmıştır. Üzüm cibresi kullanılmadan önce stoktan alınarak 60 °C sıcaklıkta 24 saat kurutulmuştur.

Mikroorganizma

Çalışmada ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) kullanılmıştır. Mayalar agar içeren eğik tüplerde, petri kaplarında ve mikrobank™ (Pro-lab Diagnostics Microbank™) viallerde saklanmış ve belli zaman aralıkları ile aktarım yapılarak stok tazeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından mikroorganizma stok ortamlarından sıvı biyoarıtım ortamlarına aktarılmıştır.

Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan ve Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyoproses Araştırma Laboratuvarlarında bulunan cihaz listesi EK-1’de verilmiştir.

Kimyasallar

Ortam hazırlama ve analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, biyokimyasallar mikrobiyolojik saflıktadır. GC analizinde kullanılan gazlar yüksek saflıkta; HPLC analizlerinde kullanılan çözücüler ise kromatografik saflıktadır. Kullanılan kimyasal maddelerin listesi EK-2’de verilmiştir.

4.2 YÖNTEM

Katı çoğalma ortamı

Rhodotorula glutinis iki ayrı katı agar ortamında çoğaltılmıştır.

- i) UYM (Universal Yeast Medium) ortam bileşimi; 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 10 g/L glukoz, 15 g/L agar ve saf su.
- ii) ZK agar; 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 10 g/L glukoz, 20 g/L agar ve santrifüjlenmiş ZK.

Hazırlanan katı ortamlar, 121 °C’ta 20 dk sterilize edilmiş ve biyogüvenlik kabininde tüplere ve cam petri kaplarına paylaştırılarak agarın donması beklenmiştir. Mayalar, katı agar ortamında 24 st süre ile 30 °C’de inkübe edilmiş ve +4°C’de saklanmıştır.

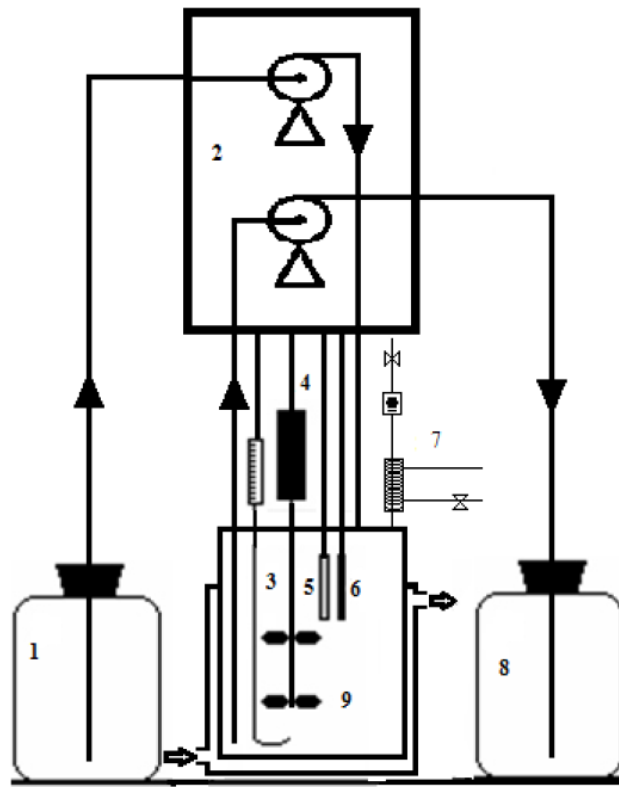
Sıvı çoğalma ortamı

Katı ortamlarda muhafaza edilen mayalar ZK ve saf su ile hazırlanmış ortamlara aktararak erlenlerde inkübe edilmişlerdir. Ortamlar incelenecek parametrelere göre farklı zeytin karasuyu derişimi, azot kaynağı ve derişimi, sıcaklık, karıştırma hızı vb. koşullarında inkübe edilmişlerdir. Zeytin karasuyu ortam hazırlamada kullanılmadan önce 12000xg’de 10 dk santrifüjlenmiştir ve ortamlar hazırlandıktan sonra 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir.

Biyoreaktörde üretim

Biyoreaktördeki üretimler, sıcaklık, karıştırma hızı, pH, hava akış hızı ve köpük kontrol birimleri ile donanımlı biyoreaktörde toplam 2 L hacimli tanklarda gerçekleştirilmiştir.

Denemeler kesikli ve sürekli işletimlerde yapılmıştır. Kesikli işletimde, %25 ZK ile hazırlanan 1 g/L üre içeren 1 L ortam biyoreaktör tankına konulmuş ve otoklavda sterilize edildikten sonra hücre inokule edilerek sistem çalıştırılmıştır. Sürekli işletimde ise 1 L %25 ZK ve 1 g/L üre ortamı içeren biyoreaktör tankına hücreler inokule edilmiştir. Biyoreaktör çalıştırıldıktan sonra pH sabit değerlere ayarlanmış ve sürekli olarak steril ZK beslenmiştir. Besleme akımı ile eş zamanlı olarak besleme hacmine eşit miktarda arıtılmış ZK ortamdan alınmıştır. Sürekli sistem Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Biyoreaktör tankı 0,6 L/dk hava akışı ve 250 rpm karıştırma hızında çalıştırılmıştır.



Şekil 4.1. Sürekli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi: (1) Ham ZK şiesi, (2) Peristaltik pompa, (3) Hava girişi, (4) Mekanik karıştırıcı, (5) pH probu, (6) Sıcaklık probu, (7) Geri soğutucu, (8) ZK tahliye şiesi, (9) biyoreaktör tankı

Hücre parçalama

100 ml üretim ortamı, +4 °C, 10000 rpm (12000xg) koşullarında 10 dk süre ile santrifüjlenerak hücreler sıvı fazdan ayrılmıştır. Distile su ile yıkanan hücrelerin üzerlerine 5 ml fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.0) eklenmiştir. Birer ml hacminde parçalama tüplerine alınan süspansiyondaki hücreler, 30 s’lik periyotlar halinde 10 kez parçalanmış ve her bir

parçalama periyodu ardından 30 s'lik süreler halinde buzda soğutulmuştur. Parçalama tüpleri 12000xg'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiş ve elde edilen üst faz hücre içi protein analizlerinde kullanılmıştır

Zeytin karasuyu ile üzüm cibresinin muamelesi

Cibre, zeytin karasuyu (ZK) ile muamele edilmeden önce öğütücüde parçalanmış ve homojen forma getirilmiştir. Kullanılan öğütücü 2 L hacimli (kullanım hacmi=1.5 L), metal blender haznesine sahip, 1200 W gücünde bir mutfak robotudur. Öğütme derecesi, blender haznesine her seferinde 100 g kuru cibre konularak standardize edilmiştir. Öğütülmüş olan kuru cibre, zeytin karasuyu ile karıştırılmıştır. Cibre miktarı her deneyde 7 g olacak şekilde sabitlenmiştir. Karışım, 150 rpm çalkalama hızındaki çalkalamalı hava banyosunda yerleştirilen ağzı alüminyum kağıt ile kapatılmış 250 ml erlenlere konularak zeytin karasuyunun cibre ile muamelesi gerçekleştirilmiştir.

Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibreden fenollerin geri kazanımı

Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibre, çözücü ekstraksiyonundan önce derişik HCl ile asitlendirilmiştir (pH~1,5). Bunun için kuru cibre 1:1 oranda damıtık su ile karıştırılmış, derişik HCl ile pH'sı 1,5 düzeyine ayarlanmış ve 24 saat süre ile 60 °C de kurutulmuştur.

Jel elektroforezi

Jel elektroforez analizleri (Biorad), Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında Biorad marka cihaz ile yapılmıştır. Tek boyutlu jel elektroforezi deneylerinde kullanılan örnek yükleme tamponu protokolü Çizelge 4.2'de verilmiştir. Kullanılan jeller için protokoller Çizelge 4.3'de verilmiştir

Çizelge 4.2. Kullanılan jeller için protokoller

SDS-PAGE			
Ayrırma jeli			
	Stok	Çalışan	12 ml
TrisCl pH 8.8	1M	0,375 M	4,5 ml
Acrylamide stock (30:0.8)	30%	16%	6,4 ml
SDS	20%	0,10%	0,06 ml
APS	10%	0,05%	0,06 ml
TEMED	100%	0,05%	0,006 ml
H₂O			0,974 ml
Yükleme jeli			
	Stok	Çalışan	4 ml
TrisCl pH 6.8	1 M	0,125 M	0,5ml
Acrylamide stock (30:0.8)	30%	3,75%	0,5 ml
SDS	20%	0,10%	0,02 ml
APS	10%	0,05%	0,02 ml
TEMED	100%	0,05%	0,002 ml
H₂O			2,958 ml

Elektroforez için hazırlanan tampon 1/5 oranında seyreltilmiştir. Hazırlanan tampon için protokol Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Elektroforez tamponu için protokol

Elektroforez Tamponu			5 x
	Stok	Çalışan	250 ml
Tris baz	1 M	0,125 M	31,25 ml
Glisin		0,96 M	18,017 g
SDS	20%	0,50%	6,250 ml
H₂O			200,733 ml

Protein örnekleri 80V potansiyel farkı ile 2 saat yürütülmüştür. Daha sonra bantlar %25 2-propanol, %10 asetik asitin sudaki çözeltisi ile 30 dakika bekletilmiştir. Boyama işlemi ise %0,006 Coomassie Blue G-250, %10 asetik asitin sudaki çözeltisi ile 4 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Boyama işleminin ardından %10 asetik asit ile fazla boya giderilmiştir (67).

Deney tasarımı

Deneylerin tasarımları ve elde edilen verilerin analizi Design Expert® 7.0 ® yazılımı ile yapılmıştır. Deneysel tasarımlarda genel faktöriyel tasarım ve yüzey cevapları için merkezi kompozit tasarım yaklaşımları kullanılmıştır (68).

Hücre derişimi tayini

Ortamlar darası bilinen santrifüj tüplerine alındıktan sonra 5000 rpm (3210xg) hızında 10 dk santrifüjlenmiş ve saf su ile yıkanmıştır. Hücreler 80 °C de 3 saat kurutulmuş ve sabit tartıma geldikten sonra tekrar tartım yapılarak kuru hücre derişimleri hesaplanmıştır. Hücre tartımı için tekrarlanabilirlik testi EK-3’de verilmiştir.

Toplam lipit miktarı tayini

Ortamdan çöktürülen hücrelere 6,25 ml kloroform ve 12,5 ml metanol eklenerek 10 dk çalkalanmıştır. Daha sonra 6,25 ml kloroform ve 6,25 ml serum fizyolojik eklenerek 10 dk daha çalkalandıktan sonra ortam santrifüjlenerek organik faz pipet ile alınmıştır. Lipit içeren organik faz daha sonra darası bilinen cam balonlarda döner buharlaştırıcıda buharlaştırılarak kalan lipit miktarı hassas terazi ile ölçülmüştür (69). Yapılan lipit miktarı tayininin tekrarlanabilirlik testleri EK-4’de verilmiştir.

GC ile FAME analizleri

Hücrelerden ekstrakte edilen lipit fazı için FAME analizleri gaz kromatografisi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla evaporatör ile çözücüsü uzaklaştırılan lipit 2 ml hekzan içerisinde çözünmüş, 0,2 ml 2 N KOH/metanol çözeltisi eklenmiştir. Vortekslendikten sonra ortam santrifüjlenmiş ve üst faz GC’de analizlenmiştir. Yapılan GC analizlerinde FID dedektör kullanılmıştır. GC analiz koşulları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. GC analiz koşulları

Enjeksiyon	Sıcaklık (°C)	240
	Taşıyıcı gaz	He
	Basınç (kPa)	261,5
	Toplam akış (ml/min)	124,2
	Kolon akışı (ml/min)	1,2
Fırın	Başlangıç sıcaklığı (°C)	100
	Toplam zaman (dk)	67,67
Fırın program		
	Artış oranı (°C/dk)	Bekleme Süresi (dk)
	-	100
	3	240
Kolon	Adı	RT-2560
	Film inceliği (um)	0,2
	Kolon uzunluğu (m)	100
	İç çap (mm)	0,25

Mono- di- tri-gliserit ölçümü

Analizler AOCS standard metoda göre HPLC cihazında Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yapılmıştır (70).

HPLC ile biyofenol analizleri

Bölüm 5.3’de yapılan biyofenol analizleri:

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin dağılımı HPLC analizleri ile belirlenmiştir. Bu amaçla ortamdan alınan örneklerin pH değerleri %37’lik HCl ile 2’ye ayarlandıktan sonra, fenolik bileşenler etil asetat ile üç kez ekstrakte edilmiştir. Döner buharlaştırıcıda etil asetat tamamen uzaklaştırıldıktan sonra etil alkol-su karışımında (60:40) tekrar çözünmüştür. Daha sonra örnekler, 0,45 µm PVDF filtreden süzülerek HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir. Analiz koşulları Çizelge 4.5’da verilmiştir

Çizelge 4.5. HPLC analiz koşulları

Değişken	Özellik
Kolon	XTerra RP18 (Waters)
Kolon boyutu	4.6 mm x 150 mm x 5 µm
Mobil faz akış hızı	0.3 ml/dk
Kolon sıcaklığı	25 °C
Dedektör	UV-VIS Dual Absorbance Detector (Waters 2487)
Dalga boyu	280 nm
Taşıyıcı faz A	%70: %30 asetonitril (ACN) : bidistile su (H ₂ O)
Taşıyıcı faz B	% 0.1 o-fosforik asit (o-H ₃ PO ₄)
Enjeksiyon hacmi	20 µL

Bölüm 5.1 ve 5.2’de yapılan biyofenol analizleri:

Waters marka HPLC cihazında (WATERS Spherisorb 5 µm ODS 2, 4,6 X 250 mm Analitik Kolon) Düzen Norwest Çevre ve Gıda Laboratuvarında IOOC standart metoda (COI/T.20/Doc No 29 November 2009) göre yapılmıştır (71).

Toplam fenol derişimi

Örnek hazırlama: Örneklerin pH değerleri %37’lik HCl ile 2’ye getirildikten sonra, fenolik bileşenler etil asetat ile üç kez ekstrakte edilmiş ve susuz sodyum sülfat ile 30 dk kurutulmuştur. Döner buharlaştırıcıda etil asetatı tamamen uzaklaştırılan örnekler, daha sonra etil alkol-su karışımında (60:40) tekrar çözülmüş ve toplam fenol derişim analizi için Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır (72).

Folin-Ciocalteu yöntemi: Toplam fenol derişim analizi için, yukarıdaki aşamalardan geçirilerek analize hazırlanan örnekten 20 µl cam tüplere alınmış; üzerine 1,58 ml saf su ve 100 µl Folin-Ciocalteu fenol reaktifi eklenmiştir. Çok iyi bir şekilde karıştırılan (vortekslenen) çözelti 8 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda 300 µl doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenerek tekrar vortekslenen tüp, ağzı kapatılarak 40 °C’deki su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda örneğin $\lambda=765$ nm’de absorbansı okunmuştur (UV-1601 Shimadzu). Çalışma doğrusu ve tekrarlanabilirlik testleri EK-5 ve EK-6’da verilmiştir.

Karotenoid analizi

ZK ortamında çoğalan hücrelerden lipit ekstraksiyonu sırasında elde edilen kloroform içerisinde çözülmüş lipit fazında bulunan karotenoid miktarı $\lambda=500$ nm’de

spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (73). Kullanılan kalibrasyon doğrusu EK-7’de verilmiştir.

İndirgen şeker derişimi

İndirgen şeker tayini, dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile yapılmıştır (74). Analiz için DNS çözeltisi (10 g/L DNS, 0,5 g/L sodyum sülfid, 10 g/L sodyum hidroksit) ve sodyum potasyum tartarat (40 g/L) çözeltileri hazırlanmıştır. 750 µL örnek (kör saf su) ile 750 µL DNS çözeltisi karıştırılarak 90°C’de 10 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL %40’lık sodyum potasyum tartarat çözeltisi konulmuş ve buz banyosunda 5 dk süre ile bekletilmiştir. Oda sıcaklığına getirildikten sonra mikro küvetlere konularak $\lambda=575$ nm’de absorbans değeri okunmuştur. Örneklerin indirgen şeker derişim analizlerinde kullanılan ve glukoz ile hazırlanan kalibrasyon doğrusu EK-8’de verilmiştir.

Toplam antioksidan aktivitesi tayini

Toplam antioksidan (TA) aktivitesi tayini için 4 ml etanolde çözünmüş örnek $10 \text{ ml } 1.5 \times 10^{-4}$ M DPPH çözeltisi ile karıştırılarak 30 dk boyunca karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin $\lambda=520$ nm’deki absorbansları spektrofotometre ile ölçülerek elde edilen verilerden TA aktivitesi hesaplanmıştır. % inhibisyonu değerleri Eş. (4.1) kullanılarak hesaplanmıştır (75). Kontrol olarak 4 ml etanol kullanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} * 100 \quad (4.1)$$

5 ARAŞTIRMA BULGULARI

Araştırma bulguları 3 ayrı bölümde verilmiştir. Bölüm 5.1’de erlenlerde kesikli sistemde *R. glutinis* ile zeytin karasuyu ortamında biyokütle, lipit, antioksidanlar ve karotenoidlerin üretimine ve ortam koşulları ile katkı maddelerinin etkisine ait sonuçlar yer almaktadır. Bölüm 5.2’de *R. glutinis* ile zeytin karasuyu ortamında biyoreaktör ile sürekli sistemde sıcaklık ve pH’nın üretim ve biyoarıtım hızlarına ve üretilen lipit profiline etkisi incelenmiştir. Bölüm 5.3’de ise zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşiklerin üzüm cibresini kullanarak geri kazanım koşulları yer almaktadır.

5.1 ZEYTİN KARASUYUNUN *RHODOTORULA GLUTINIS* İLE BİYOARITIMI SIRASINDA ÇOĞALAN BİYOKÜTLEDEN MİKROBİYAL LİPİT ÜRETİM KOŞULLARI

R. glutinis ile zeytin karasuyu (ZK) ortamında kesikli sistemde biyokütle ve mikrobiyal lipit üretimini incelemek amacıyla yapılan denemelerde; zeytin karasuyu derişimi, glukoz, gliserol, biyofenol, zeytinyağı katkısı ve ön işlem ile sıcaklık ve karıştırma hızının etkisi incelenmiştir. Ayrıca, hücre içi toplam fenol ve biyofenol üretimi ile yağ asiti profili incelenmiştir. Mayanın ürettiği yağ asitleri miktarının bir fonksiyonu olarak yağ asiti metil esteri (FAME) miktarları da ölçülmüştür. Çalışmalarda maya kütesinden elde edilen lipit ekstraktında bulunan toplam karotenoidlerin de analizi yapılmıştır. Bu bölümün tamamlayıcı çalışması olarak ZK ortamında *R. glutinis* çoğalması ile elde edilen lipit ekstresinin bazı fizikokimyasal özellikleri analiz edilerek olası son ürünlerden birinin tanımlaması da yapılmıştır.

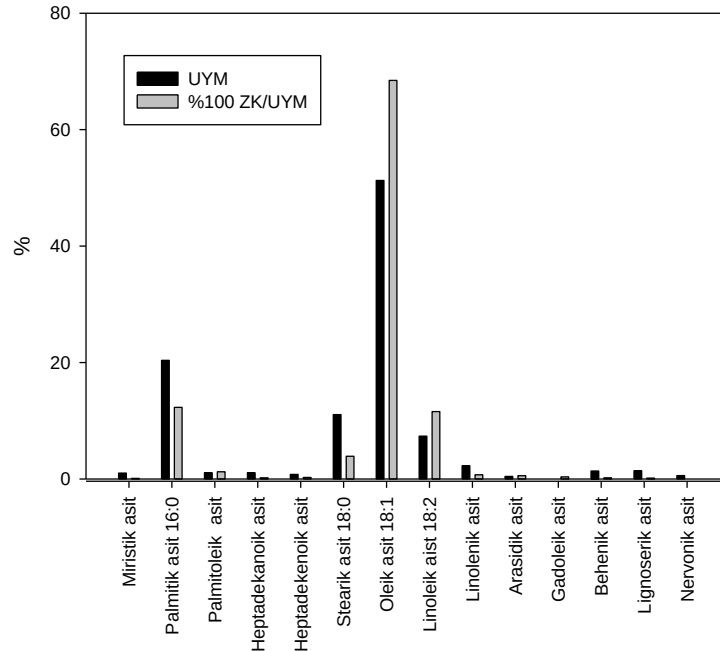
5.1.1 ZEYTİN KARASUYUNUN *RHODOTORULA GLUTINIS* ÇOĞALMASI VE LİPİT ÜRETİMİNE ETKİSİ

Zeytin karasuyunun toksik etkisi nedeniyle *R. glutinis*’in bu ortama uyumunun sağlanması için öncelikle hücreler -kolay çoğaldığı bilinen- UYM ortamında çoğaltılmış; ayrıca UYM ortamına kademeli olarak ZK eklenerek hücrelerin bu ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Ön denemelerde UYM ortamına farklı miktarlarda (%25, 50, 75 ve 100) zeytin karasuyu karıştırılarak hücresel aktivite ve lipit üretimi incelenmiştir. Ortamlarda üretilen en yüksek kuru hücre ve lipit miktarları ile elde edildiği zamanlar Çizelge 5.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1 UYM ve ZK içeren UYM ortamlarında ölçülen en yüksek lipit ve kuru hücre derişimleri (T= 30 °C, N=150 rpm)

ZK (%)	Ortamlar				
	0	25	50	75	100
Zaman (saat)	72	196	196	120	168
En yüksek lipit (g/L)	0,25	0,54	0,49	0,49	0,55
Zaman (saat)	96	144	120	168	168
En yüksek hücre (g/L)	5,5	10,9	8,83	6,4	6,6

En yüksek kuru hücre derişimine 144. saatte 10,9 g/L ile %25 ZK içeren UYM ortamında ulaşılmış; en yüksek lipit derişimi ise 0,55 g/L ile %100 ZK içeren UYM ortamında 168. saatte ölçülmüştür. UYM ortamına ZK katkısının toplam lipit ve hücre derişimlerini arttırdığı görülmektedir. Elde edilen lipitlerinin yağ asiti profilleri ise ZK katkısının UYM ortamında üretilen lipite göre doymamışlık düzeyini arttırdığını, doymuşluk düzeyini ise azalttığını göstermiştir (Şekil 5.1). ZK katkısı mayanın ürettiği doymamış yağ asitleri olan, oleik asit miktarını %51 den %68'e, linoleik asit miktarını ise %7 den %11 e yükseltmiştir. Doymuş yağ asitlerinde ise, ZK katkısı ile palmitik asit miktarının %20 den %12'ye stearik asit miktarının da %11 den % 4'e düştüğü görülmüştür.



Şekil 5.1 UYM ve %100 ZK içeren UYM ortamlarında üretilen lipitin yağ asiti profilleri (T= 30 °C, N=150 rpm, UYM 72 saat, ZK-UYM 168 saat)

Genel olarak ZK'nın UYM ortamında *R. glutinis* çoğalmasını arttırıcı yönde etkisi olduğu ve elde edilen yağ asitlerinin doymamışlık düzeyinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu veriler ile ZK'nın *R. glutinis* çoğalma ortamı olarak kullanımında endüstriyel açıdan olumlu etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. *R. glutinis*'in çoğalma davranışının da ZK ortamında farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Bu nedenle ZK ortamında çoğalan *R. glutinis* suşu ile UYM ortamında çoğalan orjinal *R. glutinis* suşlarının protein farklılıklarını göstermek amacıyla bir çalışma yapılmış ve sonuçları EK-9'da verilmiştir.

5.1.2 ZEYTİN KARASUYU ORTAMINDA GLUKOZ KATKISININ ETKİSİ

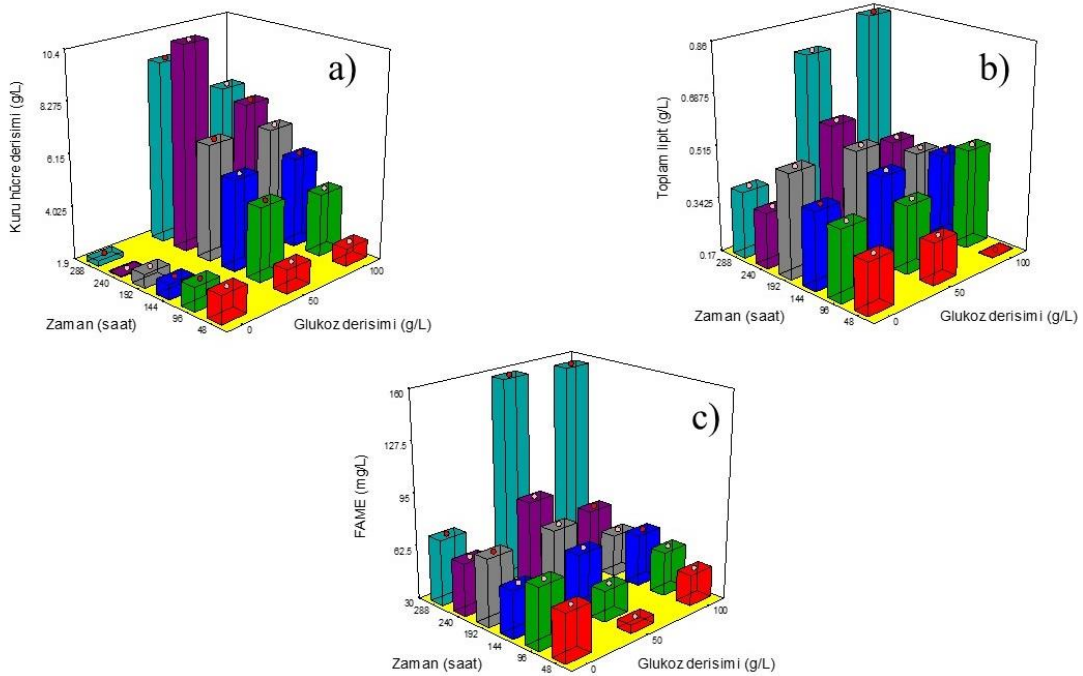
Zeytin karasuyu içeren ortamlarda hücrel aktivite ve lipit üretiminin gözlenmesinin ardından, UYM içermeyen ZK ortamına glukoz katkısının *R. glutinis*'in çoğalma, lipit üretimi, yağ asiti metil ester (FAME) miktarı ve yağ asiti profili üzerine etkileri incelenmiştir. Bunun için daha önceki deneylerde denenen en düşük ZK konsantrasyonu olan %25 ZK ortamı kullanılmıştır. Önceki çalışmalarımızda ZK ortamında üre katkısının *R. glutinis* çoğalması için olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir (43). Bu nedenle ortama ZK'nın yanında üre katkısı da yapılmıştır. Parametre olarak glukoz katkısının incelenmesi ise ortamın karbon yükünü arttırarak hücrel çoğalmanın geç fazlarında azot eksikliği koşullarını görmek amacı ile yapılmıştır. Ayrıca ZK'dan gelen azot yükü de vardır. Doğal olarak ortamın azot düzeyi azaltılamayacağı için, karbon yükü arttırarak karbon/azot (C/N) oranının değiştirilmesi amaçlanmıştır.

%25 ZK ve 1g/L üre içeren çoğalma ortamında glukoz derişiminin lipit üretimine etkisinin faktöriyel deney tasarımı ile incelenmesi için Design Expert® 7.0 programı ile tam faktöriyel deney tasarımı yapılmıştır. İki parametrelili denemenin parametre aralıkları ve seviyeleri ile yapılan deney setine ait tasarım matrisi Çizelge 5.2'de cevaplar ise Çizelge EK 10'da yer almaktadır.

Çizelge 5.2. %25 ZK içeren glukoz katkısı denemesine ait deney tasarım matrisi (T= 30 °C, N=150 rpm)

İsim	Birim	En düşük düzey	En yüksek düzey	Düze y sayısı
Glukoz	g/L	0	100	3
Zaman	saat	48	288	6

Farklı glukoz derişimlerindeki çoğalmalarda elde edilen verilerle oluşturulan 3-boyutlu grafikler Şekil 5.2’de verilmiştir. Elde edilen veriler biyokütle açısından incelendiğinde, zaman ve glukoz derişiminin artışı ile hücre derişiminin de arttığı görülmektedir. Zaman ve glukoz derişimine bağlı toplam lipit derişimlerine bakıldığı zaman da benzer değişim görülmektedir. FAME cinsinden incelendiğı zaman ise verilerin lipit verilerine göre daha az sapma gösterdikleri görülmüştür. Sonuç olarak, en yüksek lipit ve FAME miktarı 50 g/L glukoz içeren ortamda 288. saatte elde edilmiştir. Bu ortamın toplam lipit ve FAME değerleri sırası ile 0,78 g/L ve 158 mg/L ortamdır. Toplam lipit ve FAME düzeyleri bakımından 0-50 g/L glukoz içeren ortamların arasındaki fark, 50-100 g/L glukoz içeren ortamların arasındaki farktan daha yüksektir.



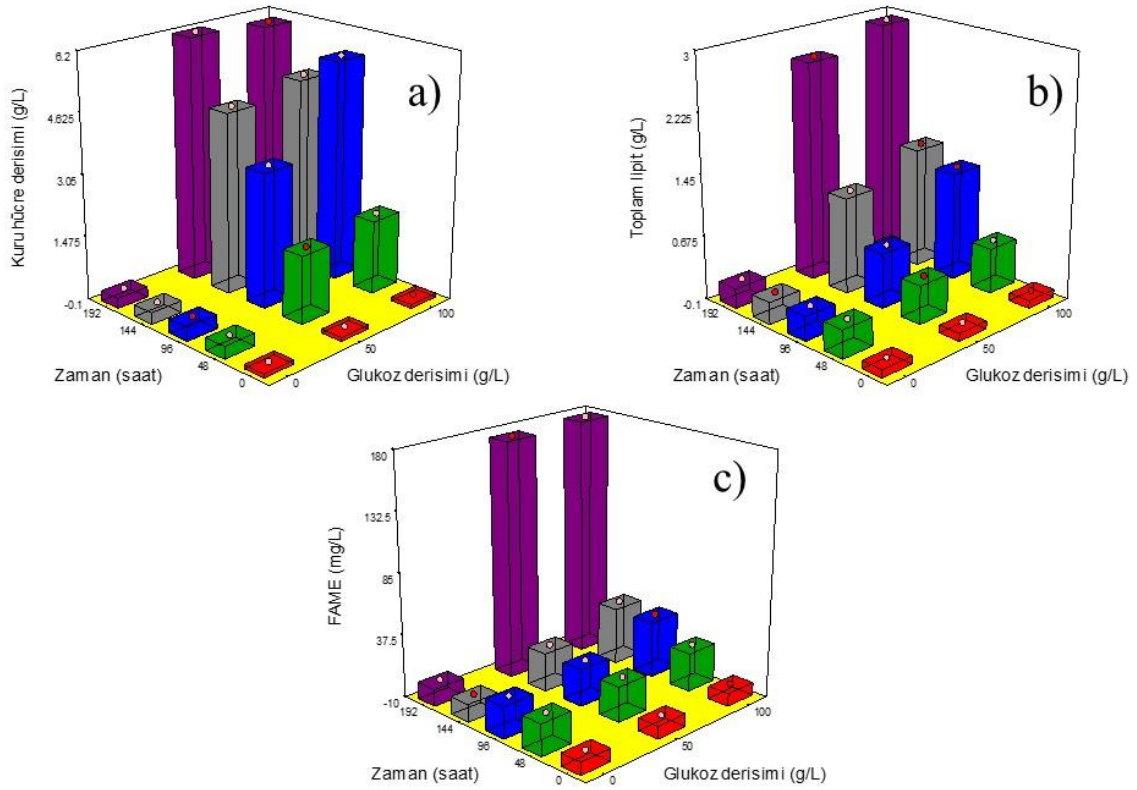
Şekil 5.2. %25 ZK içeren ortamlarda zaman ve glukoz derişimine karşı a) kuru hücre, b) toplam lipit ve c) FAME değişimi yüzey cevapları (T= 30 °C, N=150 rpm)

Yapılan ilk denemenin ardından glukoz katkısının etkisini daha iyi gözlemek amacıyla yeni bir deneme daha tasarlanmıştır. ZK dan gelen azot ve karbon yükü yüksek olduğu için, ortamlardaki karbon ve azot dengesinin etkisi perdelenmektedir; bu nedenle bu deney setinde ortama eklenen azot ve ZK miktarları azaltılarak glukozdan gelen karbon yükü ile ZK dan gelen azotun kısıtlayıcı etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için %10 ZK ve 0,4 g/L üre içeren ZK ortamlarında faktöriyel tasarım ile lipit üretimi incelenmiştir. Yapılan iki parametrelili denemenin parametre aralıkları ve seviyeleri ile yapılan deneye ait tasarım matrisi Çizelge 5.3’de cevaplar EK-11’de yer almaktadır.

Çizelge 5.3. %10 ZK içeren ortamlarda glukoz katkısı denmesine ait deney tasarım matrisi (T= 30 °C, N=150 rpm)

Parametre	Birim	En düşük düzey	En yüksek düzey	Düzye sayısı
Glukoz	g/L	0	100	3
Zaman	saat	0	192	5

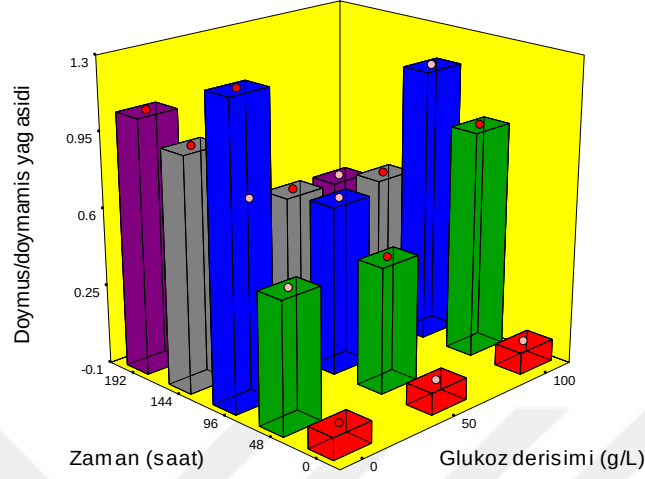
Deney parametrelerinin biyokütle üzerine etkisi incelendiğinde glukoz katkısının kuru hücre derişimi üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisinin olduğu görülmüştür. Ortamlarda çoğalan hücrelerden elde edilen toplam lipit ve FAME miktarlarında glukoz artışı ile anlamlı artış görülmektedir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. %10 ZK içeren ortamlarda zaman ve glukoz derişimine karşı a) kuru hücre derişimi b) toplam lipit ve c) FAME değışimi yüzey cevapları (T= 30 °C, N=150 rpm)

Farklı glukoz derişimlerinde çoğalan hücreler tarafından üretilen yağ asitlerinin dağılımı incelendiği zaman, glukoz içermeyen ortamda doymuş yağ asitleri miktarının doymamış yağ asitlerine göre 96. saatte yükseldiği ve sonra yüksek düzeylerde seyrettiği görülmektedir (Şekil 5.4). Glukoz içeren ortamlarda ise genel olarak doymuş yağ asiti oranı daha düşük

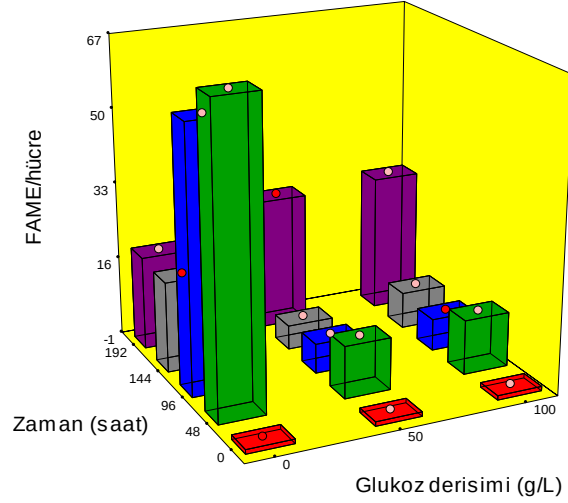
olmakla beraber 50 g/L glukoz eklenen ortamın doymamışlık oranı daha yüksek ölçülmüştür. Ancak her iki ortamda da 96. saatten sonra doymuşluk oranının düştüğü görülmektedir.



Şekil 5.4 %10 ZK içeren ortamlarda glukoz derişimi ve zaman değişkenlerine bağlı doymuş ve doymamış yağ asitleri oranları yüzey cevabı (T= 30 °C, N=150 rpm)

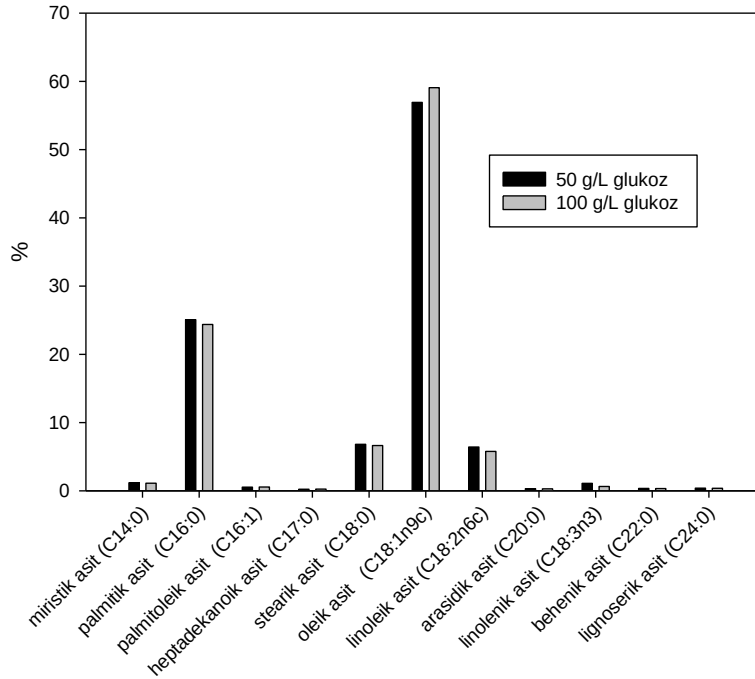
Birinci ve ikinci denemelerin sonuçlarına göre genel olarak, biyokütle artışı ile toplam lipit ve FAME düzeyleri artışı eşanlıdır. Ancak biyokimyasal açıdan hücreler azot yoksunluğu durumunda lipit biyosentezine yönelecek ve biyokütle artışından bağımsız olarak hücre içi yağ asiti yüzdelerinde artış görülecektir. Yüksek miktarda glukoz içeren ortamlarda hücrel çoğalmanın bir aşamasından sonra ortamda azot eksikliğinin görülerek hücrelerin lipit birikimine yönelmeleri literatüre uyumlu olarak beklenmektedir (76).

Elde edilen veriler ile hücre başına FAME miktarı oluşturulduğu zaman glukoz içermeyen ortamda zamanla hücre başına FAME miktarı azalırken 50 ve 100 g/L glukoz içeren ortamlarda 144. saatten sonra artış gözlenmektedir (Şekil 5.5). Bu durum azot eksikliğinden kaynaklanan lipit birikimi ile açıklanabilir.



Şekil 5.5. %10 ZK içeren ortamlarda glukoz ve zaman değişkenlerine bağlı hücre başına FAME düzeyi değişimi yüzey cevabı (T= 30 °C, N=150 rpm)

En yüksek FAME miktarları, 50 ve 100 g/L glukoz içeren ortamlarda 192. saatte sırası ile 28,4 ve 29,5 mg/L olarak ölçülmüştür. Bu ortamlara ait yağ asiti profillerine bakıldığında zaman benzerlik gösterdikleri ve yaklaşık olarak %60 ile en yüksek yağ asitinin oleik asit olduğu görülmektedir. Bu düzeyi %25 ile palmitik asit izlerken stearik asit ve linoleik asit düzeyleri %10 un altında görülmüştür (Şekil 5.6).



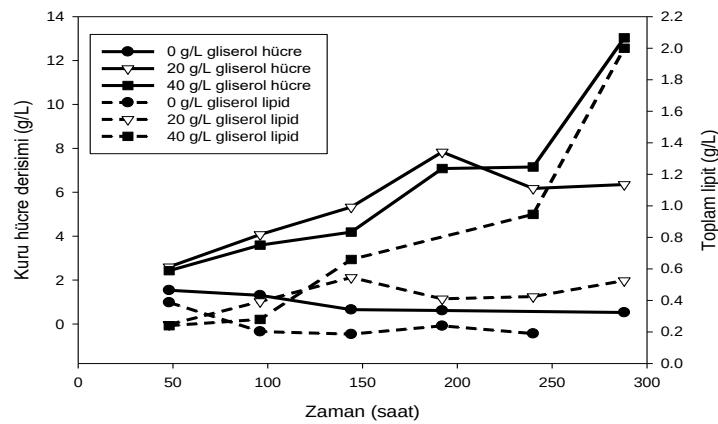
Şekil 5.6. %10 ZK içeren ortamlarda 50 ve 100 g/L glukoz katkısının yağ asiti profiline etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm, 192 saat)

Zeytin karasuyu ortamında glukoz katkısı etkisinin incelendiği deneylerde kontrol ortamına karşı 50 ve 100 g/L glukoz içeren ortamlarda maya çoğalması gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada kuru hücre, toplam lipit ve FAME düzeylerinin glukoz katkısıyla arttığı ancak 50 ve 100 g/L glukoz içeren ortamlar arasında büyük fark olmadığı görülmüştür. Ayrıca glukoz katkısının mayanın ürettiği yağ asitlerinin doymamışlık oranını da arttırdığı belirlenmiştir. Glukoz katkılı ortamlarda hücresel çoğalmanın geç fazlarında hücre başına yağ asiti üretiminin arttığı görülmüştür. Bunun nedeninin glukoz katkısı ile yükselen karbon/azot oranından kaynaklanan azot eksikliği olarak tahmin edilmektedir.

5.1.3 KATKI MADDELERİ VE ÖN İŞLEM ETKİSİ

5.1.3.1 UYM ve ZK ortamlarında gliserol katkısının lipit üretimi ve yağ asiti profiline etkisi

Gliserol de zeytin karasuyu gibi bir endüstriyel bir yan üründür ve aynı zamanda hücre çoğalması için değerli bir karbon kaynağıdır. Bu nedenle, gliserolün zeytin karasuyu ile birlikte *R. glutinis* çoğalmasına ve lipit üretimine etkisi incelenmiştir. 0, 20 ve 40 g/L gliserol içeren %25 ZK ortamlarında zaman ve gliserol parametrelerinin biyokütle ve lipit üretimi açısından etkisinin incelendiği deneylerde artan gliserol derişiminin biyokütle miktarını ve lipit üretimini arttırdığı görülmüştür (Şekil 5.7).



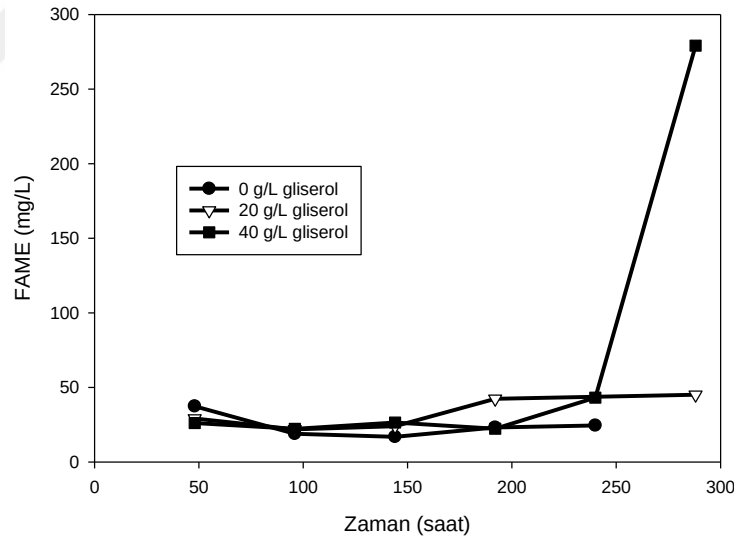
Şekil 5.7. 20 ve 40 g/L gliserol içeren ZK ortamlarında kontrol deneyine karşı zamanla biyokütle ve lipit derişimi değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

Farklı derişimlerde gliserol içeren ortamlarda üretilen en yüksek kuru hücre ve toplam lipit miktarları Çizelge 5.4’de verilmiştir

Çizelge 5.4. 20 ve 40 g/L gliserol içeren ZK ortamlarında kontrol deneyine karşı üretilen en yüksek kuru hücre ve toplam lipit derişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

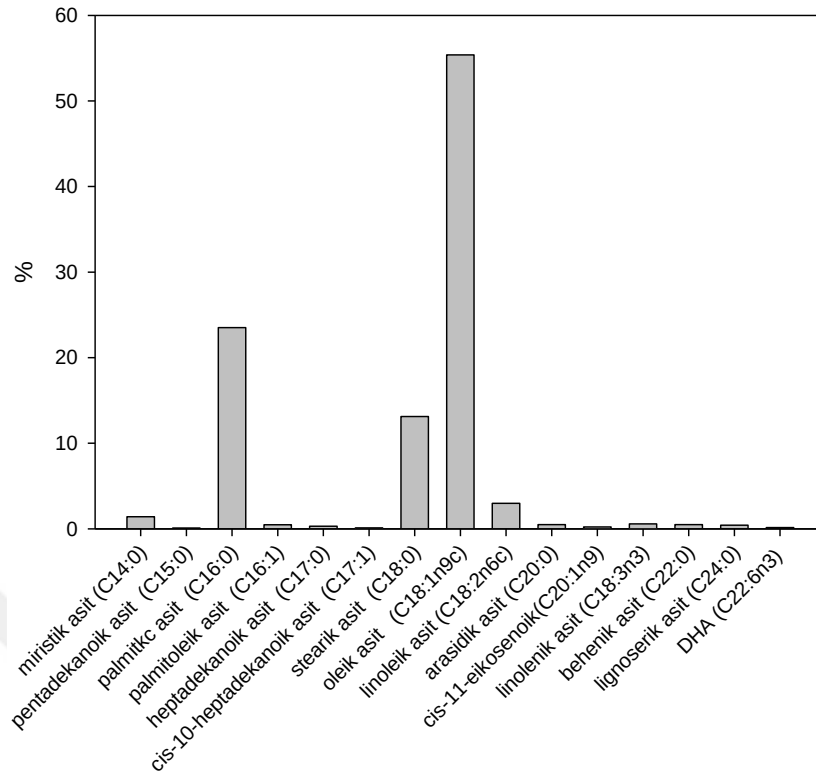
Gliserol (g/L)	Ortam		
	0	20	40
ZK %	25	25	25
Kuru hücre derişimi (g/L)	1,5	7,8	13
Toplam lipit (g/L)	0,48	0,54	2,5
Zaman (saat)	48	144	288

Sonuçlar, FAME düzeyleri açısından incelendiğinde 40 g/L gliserol içeren ortamda 288. saatte hızlı artış görülmektedir (Şekil 5.8). Gliserol içermeyen ve 20 g/L gliserol içeren ortamlarda en yüksek FAME miktarı sırasıyla 24 ve 45 mg/L iken 40 g/L gliserol içeren ortamda bu değer 279 mg/L olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.8. 20 ve 40 g/L gliserol içeren ZK ortamlarında kontrol deneyine karşı zamanla FAME düzeyi değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

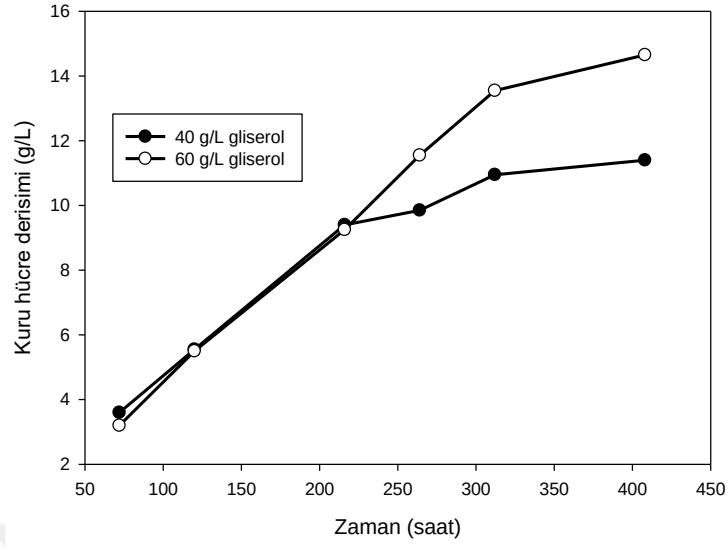
En yüksek lipit ve FAME miktarlarının ölçüldüğü 40 g/L gliserol ortamının 288. saat FAME dağılımı incelenirse palmitik asit (C16:0), oleik asit (C18:1) ve stearik asit (C18:0) miktarları sırası ile %24, 13 ve 55’dir (Şekil 5.9).



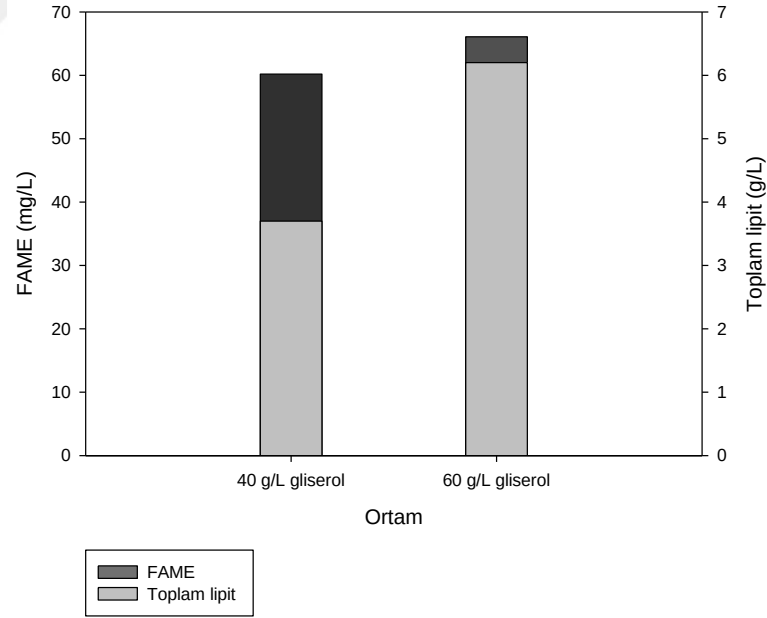
Şekil 5.9. 40 g/L gliserol ortamında en yüksek miktarda lipit üretiminin görüldüğü ortamda FAME dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 288 saat.)

Zeytin karasuyu ortamına eklenen gliserolün *R. glutinis*’in lipit üretimine etkisini incelemek için yapılan ilk deney setinde gliserol varlığının ve derişiminin biyokütle ve lipit üretimine önemli etkisi olduğu belirlenmiştir. 40 g/L gliserol içeren ortamda 288 saat sonunda üretilen toplam lipit 0,15 g/g kuru hücre (%15) olarak ölçülmüştür.

Daha yüksek derişimlerde gliserol etkisini incelemek için yapılan ikinci deney setinde *R. glutinis*, 40 ve 60 g/L gliserol içeren %25 ZK ortamlarına inokule edilmiştir. 400 saat sonunda 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlarda sırası ile 14 ve 12 g/L hücre ile 3,7 ve 6,2 g/L toplam lipit ölçülmüştür. 40 g/L gliserol içeren ortamda 60 mg/L; 60 g/L içeren gliserol ortamında 66 mg/L FAME ölçülmüştür (Şekil 5.10 ve Şekil 5.11).



Şekil 5.10. 40 ve 60 g/L gliserol içeren ortamlara ait zamanla hücre çoğalması (T= 30 °C, N=150 rpm)



Şekil 5.11. 40 ve 60 g/L gliserol ortamlarına ait FAME ve toplam lipit derişimi (T= 30 °C, N=150 rpm, 400 saat)

Gliserolün lipit üretimine olumlu etkisi belirlendikten sonra zeytin karasuyu ve gliserolün *R. glutinis*'in ürettiği lipit profiline ayrı ayrı etkilerini belirlemek amacıyla yapılan deney setinde 4 farklı ortam hazırlanmıştır. Ortamlarda en yüksek lipit üretiminin görüldüğü üstel çoğalma fazının sonlarında alınan örneklerde yapılan FAME analizi sonuçlarına göre, UYM ortamında %35 olan oleik asit miktarı, ortama ZK ve gliserol eklendiği zaman %52-55 aralığına yükselmektedir. UYM ortamında ZK'nın bulunması linoleik asit miktarını etkilemezken; gliserolün katkısı linoleik asit miktarını %12'den %5'e düşürmüştür. Gliserolün bu etkisi zeytin karasuyu ve gliserolün birlikte olduğu ZKGLY ortamındaki linoleik asit azalmasıyla da görülmektedir. UYM ortamına ZK veya gliserol eklenen her üç ortamda da oleik asit miktarı UYM ortamına göre %20 artarak %50 üzerine çıkmıştır. Oleik asit miktarındaki artış toplam lipitin doymamışlık oranını yükseltmektedir. Linolenik asit sadece ZK içeren ortamlarda ve %1 civarında görülmektedir. Bu nedenle ZK'nın doymamış yağ asiti üretimi üzerine büyük etkisinin olduğu görülmektedir. Ayrıca ortamlarda ZK varlığının mayanın linolenik asit üretmesine neden olduğu görülmektedir (Çizelge 5.5).

Çizelge 5.5. UYM,ZK ve gliserol içeren ortamlarda üretilen lipitlerde ait yağ asiti dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 400 saat)

Ortam katkısı	UYM	UYMZK	UYMGLY	ZKGLY
ZK %	0	25	0	25
Gliserol g/L	0	0	20	20
Yağ asiti %				
Palmitik asit (C16:0)	24	16	23	22
Palmitoleik asit (C16:1)	0	0	0	1
Stearik asit (C18:0)	23	9	20	11
Oleik asit (C18:1)	35	57	52	55
Linoleik asit (C18:2)	13	12	5	8
Linolenik asit (C18:3n-3)	0	1	0	1

5.1.3.2 Zeytinyağı, fenol ve gliserol katkısı etkisi

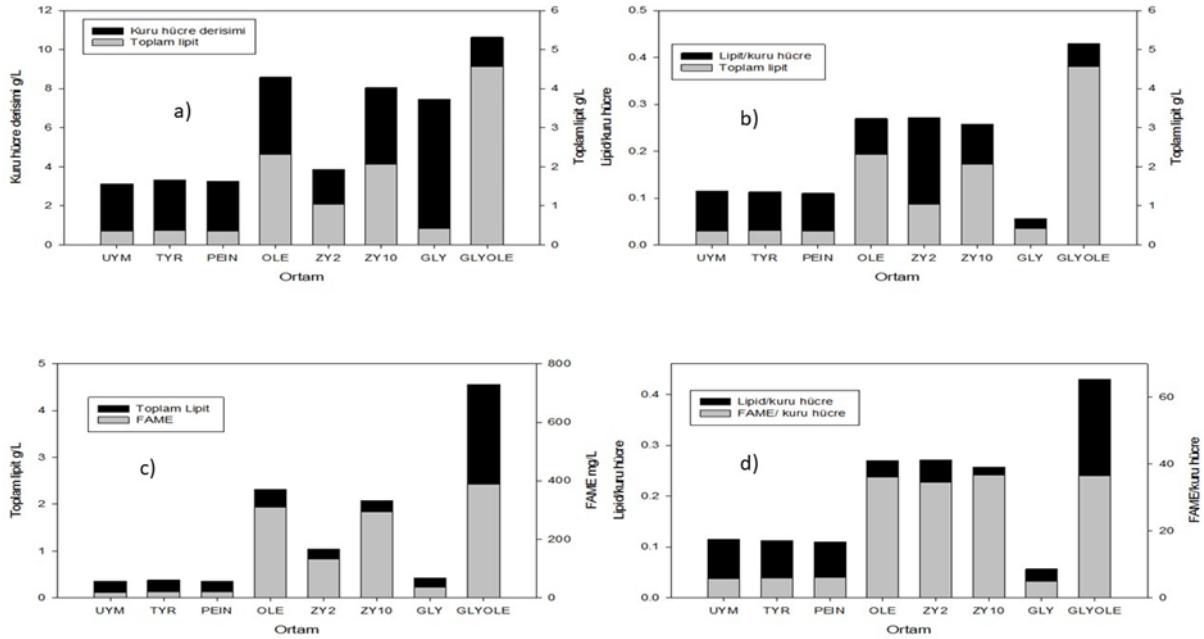
UYM ortamına eklenen ZK'nın *R. glutinis*'in ürettiği yağ asitlerinin doymamışlık oranını arttırıcı etkisini daha ayrıntılı görmek amacıyla yeni bir deney tasarlanmıştır. Yapılan analizlerde, bu deneylerde kullanılan ZK'nın 1050 mg/L toplam fenol yanısıra 1,98 g/L zeytinyağı içerdiği belirlenmiştir. ZK'daki fenolik maddelerin ve yağın, üretilen lipit miktarı ve yağ asiti profiline etkisini incelemek üzere UYM çoğalma ortamına ZK'da bulunan

fenoller ve yağ bileşenleri ayrı ayrı eklenerek *R. glutinis*'in bu ortamlarda ürettikleri lipid profiline etkisi incelenmiştir (Çizelge 5.6)

Çizelge 5.6. Tirozol, oleuropein, oleik asit, zeytinyağı ve gliserol içeren UYM ortamlarına ait katkı maddeleri ve miktarları

Ortam adı	Katkı maddeleri				
	Tirozol mg/L	Oleuropein mg/L	Oleik asit g/L	Zeytinyağı g/L	Gliserol g/L
UYM	-	-	-	-	-
TYR	250	-	-	-	-
PEIN	-	250	-	-	-
OLE	-	-	10	-	-
ZY2	-	-	-	2	-
ZY10	-	-	-	10	-
GLY	-	-	-	-	20
GLYOLE	-	-	-	10	20

120 saat sonunda ortamlara ait kuru hücre ve toplam lipid miktarları ile kuru hücre başına üretilen toplam lipid miktarları Şekil 5.12 (a, b)'de verilmiştir. Her bir ortamda çoğalan hücreler için toplam lipid ve FAME düzeyi arasındaki ilişki incelenirse, FAME düzeyinin daha düşük olduğu ancak toplam lipid düzeyi ile aralarında ilişki olduğu görülmektedir (Şekil 5.12 c-d).



Şekil 5.12 Farklı katkı maddeleri içeren ortamlara ait kuru hücre-toplam lipid (a), lipid/kuru hücre-toplam lipid (b), toplam lipid-FAME (c) ve Lipit/kuru hücre ve FAME/kuru hücre (d) grafikleri. (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)

Katkı maddeleri etkisinin incelendiği çalışmada, en yüksek hücre, toplam lipid ve FAME miktarları sırası ile 10,63 g/L, 4,56 g/L ve 388 mg/L olarak GLYOLE ortamında

ölçülmüştür. Kuru hücre başına üretilen lipit miktarı açısından bakıldığında da GLYOLE ortamı 0,43 g/g kuru hücre (%43) ile en yüksek verime sahiptir. Ancak kuru hücre başına FAME düzeyleri açısından OLE, ZY2, ZY10 ve GLYOLE ortamları arasında anlamlı fark olmadığı görülmektedir (Şekil 5.12, d). Bu, GLYOLE ortamında bulunan gliserol nedeniyle; hücre içine alınarak depolanmış ya da açillenmiş gliserolün ölçülen toplam lipit düzeylerine etkisi olabileceğini göstermektedir. FAME analizlerinde ise yağ asitleri açillenmiş formdan esterleşerek ayrıldıkları için gliserol varlığı sonuçları etkilememektedir.

Toplam lipit ve FAME düzeyleri açısından OLE, GLY ve GLYOLE ortamları incelenirse en düşük üretimin GLY ortamında olduğu görülmektedir (Şekil 5.22). Ancak OLE ve GLYOLE ortamlarını karşılaştırdığımız zaman gliserol etkisinin toplam lipit ve FAME düzeylerini arttırdığı görülmektedir. Gliserol içeren ortamda toplam lipit miktarı düşük olmasına rağmen biyokütle miktarı yüksektir. Bu nedenle kuru hücre başına en düşük toplam lipit üretimi %5,6 ile bu ortamda ölçülmüştür. ZY10 ve OLE ortamlarında ise eşit miktarlarda lipit ve FAME üretimi görülmüştür. Bu ortamlara ait hücre başına FAME ve lipit düzeyleri de benzerdir. Daha az miktarda zeytinyağı içeren ZY2 ortamında ise daha düşük düzeylerde lipit ve FAME ölçülmüştür. Ancak kuru hücre başına hesaplanan lipit düzeyleri aynıdır (Şekil 5.22, b). Bu nedenle 2 ve 10 g/L zeytinyağı arasında lipit üretim verimi bakımından fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 5.7. Tirozol, oleuropein, oleik asit, zeytinyağı ve gliserol içeren ortamlarda çoğalan *R. glutinis*'e ait yağ asitleri doymuşluk-doymamışlık dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)

Ortam	DYA %	TDYA %	ÇDYA %
UYM	65,3	27,52	7,18
TYR	61,6	28,79	9,61
PEIN	62,68	29,01	8,31
OLE	11,78	78,26	9,63
ZY2	19,745	68,12	11,83
ZY10	22,41	76,03	1,56
GLY	52,93	42,68	4,39
GLYOLE	12,48	76,68	10,57

ZK'da bulunan fenolik maddeler tirozol ve oleuropeinin toplam lipit, FAME, lipit verimi ve yağ asiti profiline etkisinin olmadığı görülmüştür. Doymuşluk düzeyleri açısından incelendiğinde GLYOLE ortamının %76 ile en yüksek tekli doymamışlık düzeyine sahip olduğu görülmüştür. *R. glutinis*'in yağ asiti bulunan ortamda ex-novo sentezine yöneldiğinin göstergesi olabilir. UYM ortamına gliserol katkısının ise doymuş yağ asitleri oranını az

miktarda azaltırken tekli doymamış yağ asiti miktarını arttırdığı görülmektedir. Yağ asitlerinin çoklu doymamışlık oranının en yüksek olduğu ortam ise %11,8 ile ZY2’dir (Çizelge 5.7).

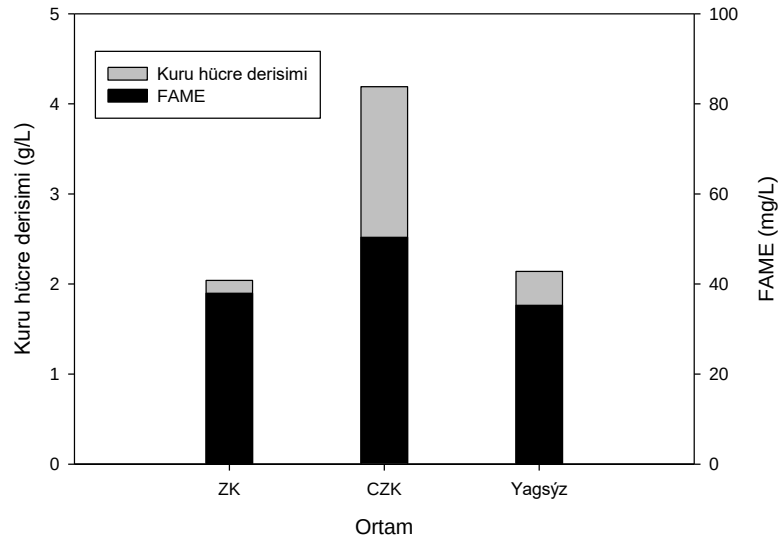
5.1.4 ÖN İŞLEM ETKİSİ

5.1.4.1 ZK’da bulunan zeytinyağının ve ZK’nın cibre ile ön işleminin hücrel aktivite ve lipit üretimine etkisi

Zeytin karasuyunda bulunan kalıntı zeytin yağının ve ZK’nın cibre ile ön işlem görmesinin (Bölüm 5.3) hücre çoğalması ile lipit üretimi ve yağ asiti profiline etkisi incelenmiştir. İlk olarak cibre ile işlem görerek fenol düzeyi azaltılmış ZK ortamında *R. glutinis*’in çoğalması incelenmiştir. İkinci olarak ZK’dan gelen zeytinyağının *R. glutinis*’in ürettiği lipitin yağ asiti profiline etkisini incelemek için hekzan ile yağı ayrılmış ZK ortamında mayaların çoğalması incelenmiştir. Ortam bileşenleri Çizelge 5.8’de verilmiştir.

Çizelge 5.8. Ortamlara uygulanan işlemler ve ortam bileşenleri

Ortam	Ön İşlem	Ortam Bileşimi
ZK	-	%25 ZK 1g/L üre
CZK	Cibre/ZK karışımı (1:3 a/a), 323 dk, 150 rpm, 30 °C çalkalayıcı hava banyosu (Bölüm 5.3)	%25 ZK 1g/L üre
Yağsız	ZK/hekzan (1:1 h/h) x 3, santrifüj	%25 ZK 1g/L üre



Şekil 5.13. ZK, cibre ile işlem görmüş ZK (CZK) ve yağı uzaklaştırılmış ZK(yağısız) ortamlarına ait kuru hücre derişimi ve FAME düzeyleri (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)

Yapılan denemelerde en yüksek hücre ve FAME düzeyleri sırası ile 4,19 g/L ve 50 mg/L ile CZK (Cibre ile ön işlem görmüş ZK) ortamında görülmüştür. CZK ortamında kuru hücre başına üretilen lipit miktarı da 0,083 mg/g olarak ölçülmüştür. Yağı hekzan ile ayrılmış ZK ortamında ile işlem görmemiş ZK ortamı arasında biyokütle, FAME ve FAME verimi bakımından anlamlı fark görülmemiştir (Şekil 5.13). Ortamlarda üretilen lipitin yağ asiti profiline bakıldığında en düşük doymuşluk oranının %22 ile CZK ortamında olduğu görülmektedir. ZK ve yağı uzaklaştırılmış ZK ortamlarında doymuş ve tekli doymamış yağ asiti yüzdeleri aynıdır. Tekli doymamış yağ asiti bakımından ZK ve yağı uzaklaştırılmış ZK ortamlarında %55 ile en yüksek düzey görülmektedir. Ancak CZK ortamında C18:2 yağ asiti düzeyi %30'a yükseldiği için çoklu doymamış yağ asiti oranı daha yüksek görülmüştür (Çizelge 5.9).

Çizelge 5.9. Farklı ortamlarda üretilen yağ asiti doymamışlık değerleri (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)

Ortam	DYA %	TDYA %	ÇDYA %
ZK	26	55	19
CZK	22	41	37
Yağısız	25	55	19

UYM ortamında *R. glutinis*'in ürettiği yağ asitlerinin doymuşluk oranı yüksektir. Ancak ortama ZK, oleik asit ya da zeytinyağı katkısının doymamış yağ asitleri düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Özellikle zeytinyağı ve oleik asit katkısı olan ortamlarda hücre içi oleik asit

değerlerinin %30 lardan %70 düzeylerine çıktığı görülmüştür (Bölüm 5.1.3.2). Bu durum literatürle de uyumlu olarak mayanın ex-novo yağ asiti sentezi de yaptığının göstergesidir (40). Paralel olarak ZK'nın doymamış yağ asiti oranını arttırıcı etkisinin de kalıntı zeytinyağından olduğu düşünülmüş ve yağı ayrılmış ZK ile de deney yapılmıştır. Ancak bu ortamda da yüksek doymamışlık görülmüştür. ZK'nın yağ asiti profilini ne şekilde etkilediğini anlamaya yönelik olarak ZK'daki tirozol ve oleuropein gibi fazla miktarda bulunan fenol katkılarının da etkileri ayrıca incelenmiş; ancak bu maddelerin lipit üretimi ve doymuşluk profili üzerine etkileri “5 günlük çoğalma sürecinde” gözlenmemiştir. Ön işlem etkilerinden cibre ile muamele edilmiş ZK'nın kullanıldığı denemede ise ortamda daha yüksek miktarda lipit üretimi olduğu görülmüştür. Ayrıca cibre ile muamele edilen ZK'nın kullanıldığı ortamda oleik asit oranı düşmüş, buna karşın çoklu doymamışlık içeren linoleik asit miktarı yükselmiştir.

5.1.4.2 ZK ortamında bulunan fenollerinin lipit üretimine etkisi

Zeytin karasuyunda var olan fenollerin *R. glutinis* ile lipit üretimine etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada, fenoller ZK ortamından uzaklaştırmak için etil asetat ile fenol ekstraksiyonu yapılmış ve ZK ortamındaki kalıntı çözgen döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak işlem görmemiş ZK kullanılmıştır. Ortamlara ait kuru hücre, toplam lipit, FAME ve yağ asitlerinin doymuşluk-doymamışlık dereceleri Çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5.10. ZK ortamında fenol varlığının hücre, toplam lipit, FAME ve yağ asiti doymuşluk derecelerine etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm, 120 saat)

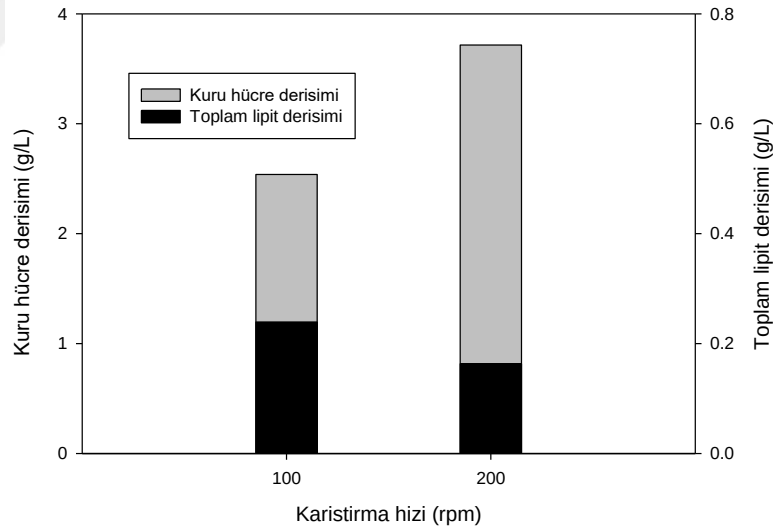
Ortam	Hücre g/L	Toplam lipit g/L	FAME mg/L	DYA %	TDYA %	ÇDYA %
Kontrol	1,42	0,32	62,86	17,68	70,75	11,58
Fenol uzaklaştırılmış	0,75	0,10	8,84	36,59	51,81	11,60

Elde edilen verilere göre ZK ortamında fenol varlığının toplam hücre, lipit ve FAME bakımından arttırıcı etkisi olduğu görülmektedir. Yağ asiti profili açısından bakıldığında fenolsüz ortamın doymuş yağ asiti oranı yaklaşık olarak iki kat daha yüksek ölçülmüştür. Tekli doymamışlık açısından ise fenol varlığının arttırıcı yönde etkisi olduğu görülmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri bakımından ortamlar arasında anlamlı fark yoktur. Sonuç olarak ZK ortamında fenol varlığı mayanın ürettiği lipit profilini önemli ölçüde değiştirmiştir. Fenol varlığı özellikle tekli doymamış yağ asiti oranını arttırmakta, doymuş

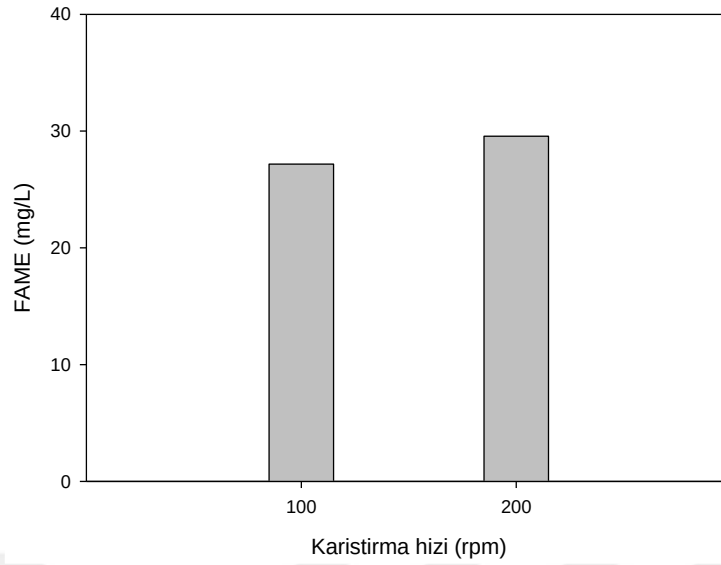
yağ asiti oranını azaltmaktadır. Ölçülen yağ asiti doymuşluk düzeylerine ve değişimlerine göre fenollerin hücrenin yağ asiti desatürasyon metabolizmasını $\Delta 9$ desatüراز enzim aktivitesi yönünde promote ettiği sayısal olarak görülmektedir. Ancak çoklu doymamış yağ asiti düzeyleri değişmediğinden $\Delta 12$ desatürasyon metabolizmasının fenol varlığından etkilenmediği söylenebilir (41).

5.1.5 KARIŞTIRMA HIZI ETKİSİ

Çoğalma ortamı karıştırma hızının *R. glutinis* ile ZK ortamında lipit üretimine ve FAME dağılımına etkisi 100 ve 200 rpm çalkalama hızlarında incelenmiştir. Çoğalmada ortam bileşimi %25 ZK ve 1g/L üredir. Farklı karıştırma hızlarına ait hücre ve toplam lipit derişimleri Şekil 5.14’de verilmiştir. 120 saat sonunda 100 rpm’de ölçülen hücre derişimi düşük, toplam lipit derişimi ise yüksektir. Her iki karıştırma hızında FAME düzeyleri bakımından ise anlamlı fark gözlenmemiştir (Şekil 5.15). Farklı karıştırma hızlarında elde edilen FAME profillerinde yağ asitlerinin doymuşluk profillerini bakımından da 100 ve 200 rpm hızları arasında anlamlı fark görülmemektedir (Çizelge 5.11).



Şekil 5.14. Karıştırma hızının hücre derişimi ve toplam lipit derişimine etkisi (T= 30 °C, 120 saat)



Şekil 5.15. Karıştırma hızının FAME derişimine etkisi (T= 30 °C, 120 saat)

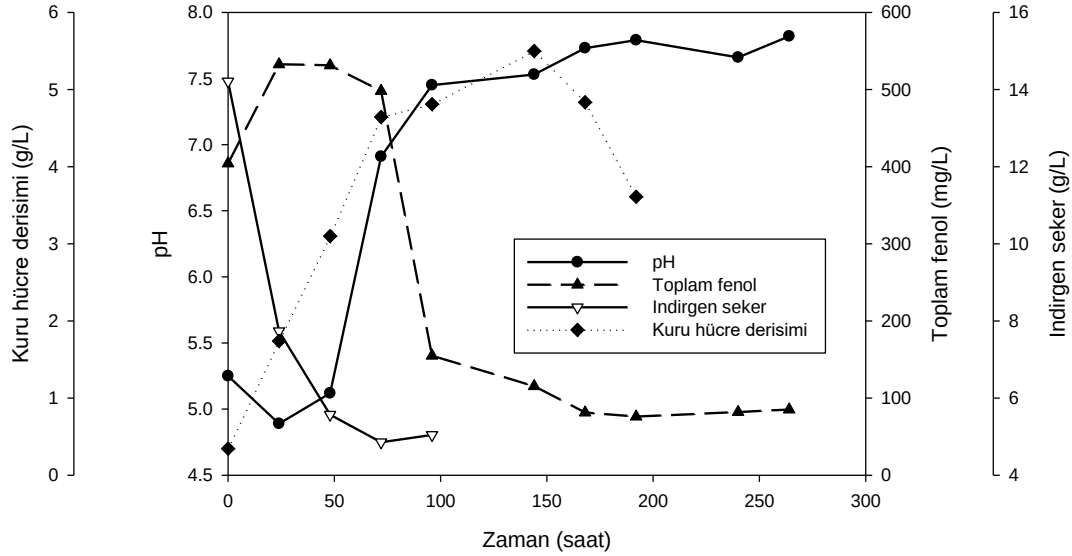
Çizelge 5.11. Farklı karıştırma hızlarında üretilen yağ asitleri doymamışlık yüzdeleri (T= 30 °C, 120 saat)

Karıştırma hızı	DYA (%)	TDYA (%)	ÇDYA (%)
100rpm	21,00	66,00	12,00
200rpm	22,00	65,00	13,00

5.1.6 RHODOTORULA GLUTINIS'İN ZK ORTAMINDA ÇOĞALMASI SIRASINDA İNDİRGEN ŞEKER VE FENOLİK BİLEŞENLERİN DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ

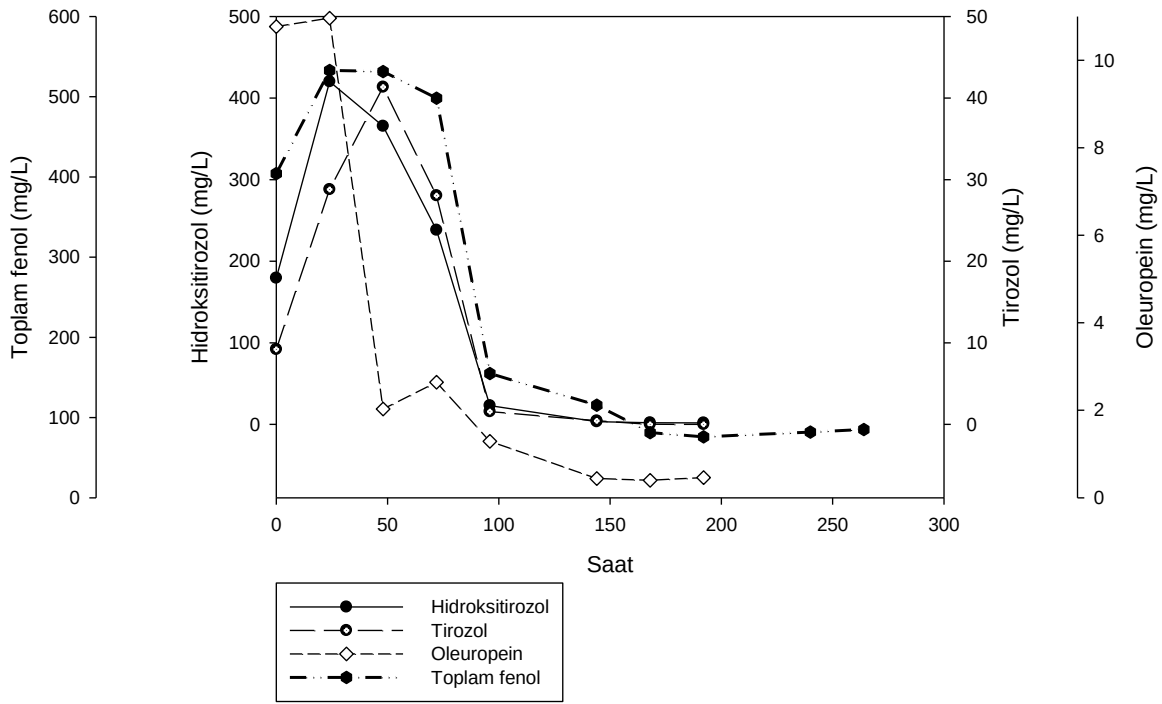
R. glutinis'in zeytin karasuyu ortamında çoğalması süresince ortam pH'ı, hücre derişimi, indirgen şeker derişimi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değışimi Şekil 5.16'de gösterilmiştir. Çoğalma ortamından farklı zamanlarda alınan örneklerdeki hücre derişimi ve pH verileri önceki deneyler ile uyuşmakta ve genelde zaman ile eşanlı olarak artmaktadırlar. Elde edilen en yüksek kuru hücre derişimi 5,5 g/L ile 144. saatte elde edilmiştir. Hücre çoğalması ile eşanlı olarak pH da 4,5 seviyesinden 7,5-8,0 aralığına yükselmiştir. İndirgen şeker derişimi çoğalmanın ilk 72. saatinde 14,2 g/L den 4,9 g/L değerine düşmüştür. Toplam fenol derişimindeki düşme ise ortamdaki indirgen şeker derişimi en düşük seviyeye ulaştığı

nokta olan 72. saatten sonra başlamış ve 192. saatin sonunda başlangıç değeri olan 498 mg/L den 75 mg/L ye düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 5.16. %25 ZK çoğalma ortamında pH, hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve indirgen şeker derişiminin zaman ile değışimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

R. glutinis %25 ZK ortamında çoğalırken toplam fenol derişimindeki düşmenin yanı sıra ZK'da bulunan baskın biyofenollerin (hidroksitirozol, tirozol ve oleuropein) zaman ile değışimleri de izlenmiş ve sonuçlar Şekil 5.17'de verilmiştir. Toplam fenol derişiminin önceki çoğalmalarda da olduğu gibi ilk 24 saatte yükseldiği ve sonra düştüğü görülmektedir. TF düzeyi yükselirken eşanlı olarak hidroksitirozol (HTY) derişiminde de yükselme görülmüştür; ilk 24. saatten sonra HTY düzeyi de azalmaya başlamıştır. Tirozol (TYR) derişimi ise TF ve HTY derişimlerinde olduğu gibi zaman ile artış göstermiş ancak 24. saatte TF düzeyinde artışın durmasına ve HTY düzeyi azalışa geçmesine rağmen TYR derişimi 48. saate kadar artışa devam etmiştir.



Şekil 5.17. %25 ZK ortamlarında toplam fenol derişimi ve biyofenol derişimlerinin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

Zeytin karasuyu ortamındaki çoğalmanın özellikleri genel anlamda değerlendirilirse, pH'nın çoğalmanın ilk 24. saatine kadar azaldığı daha sonra artışa geçtiği görölmektedir. Ortam toplam fenol derişimi ilk 24 saat içerisinde %131 artarak 404 mg/L den 532 mg/L değerine yükselmiş, 48. saate kadar aynı düzeylerde kalmış ve 72. saatten sonra ise hızlı bir düşüşe geçmiştir. Bu verilerden göröleceği gibi, *R. glutinis* çoğalmanın erken fazlarında biyofenol üretimi yapmaktadır. Böylelikle *R. glutinis* zeytin karasuyu çoğalma süreci, biyofenollerin karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla maya biyokütlesi üretiminde kullanılabileceği gibi, erken çoğalma fazında çalıştırılacak bir fermantasyon sürecinde de biyofenol üretiminde de kullanılabilecektir. Biyofenol üretim sürecinde ortam indirgen şeker derişimi ise ilk 24 saat içerisinde, başlangıç değeri olan 14,2 g/L yarıya düşerek 7,74 g/L olmuştur. Bu değerlere bakılarak *R. glutinis*'in biyofenol üretim sürecinde karbon kaynağı olarak öncelikli indirgen şekerleri metabolize ettiği anlaşılmaktadır.

Zeytin karasuyunda bulunan baskın biyofenoller olan HTY, TYR ve OLE düzeyleri arasında metabolik bir ilişki olduğu görölmektedir. ZK ortamında bulunan 179 mg/L olan başlangıç HTY değeri çoğalmanın ilk 24 saatinde %234 artarak 420 mg/L'ye yükselmiştir. HTY zeytin karasuyunda serbest ve konjuge formlarda bulunur. En önemli HTY kaynaklarından

Oleuropein

β -glukozidaz

Oleuropein aglikon

esteraz

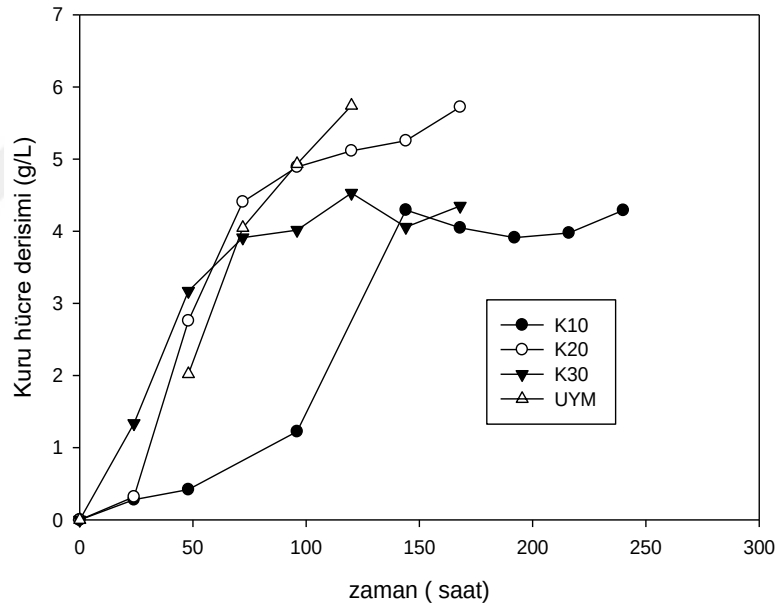
Hidroksitirozol

Elenoik asit

Yapılan bir araştırmada *R. glutinis*'in hücre yüzeyine egzojen β -glukozidaz enzimi salgıladığı bildirilmiştir (78). Ancak ilk 24 saat OLE düzeyinin sabit kalmasından ötürü, çoğalmanın erken fazlarındaki HTY artışı OLE hidrolizi ile açıklanamamaktadır. Buna karşın, demetileuropein, verbaskozit ve hidroksitirosol glukozitler gibi mevcut HPLC analiz yöntemiyle ölçülememiş olan diğer HTY'nin konjuge formlarının da β -glukozidaz enzimi ile hidrolizlenerek ağıa serbest HTY formu çıkardıkları bilinmektedir. Bunlarla birlikte HTY'nin hidrolize konjuge formlarının membran teknolojisi ya da çözücü ekstraksiyonu ile ayırlamadıkları da rapor edilmiştir (79). Bu bilgiler ile, çoğalma ortamından çözücü ekstraksiyonu ile ayrılan fenollerin analizlerinde görülen HTY miktarındaki %234 oranındaki artışın, gerçekte ekstrakte edilebilen mi yoksa enzimatik yollarla oluşan ürün mü olduklarının tam olarak anlaşılabilmesi için enzimatik aktivite analizlerinin yapılması gerekmektedir.

5.1.7 RHODOTORULA GLUTINIS İLE KAROTENOİD, KURU HÜCRE VE TOPLAM LİPİT ÜRETİMİNE SICAKLIK ETKİSİ

R. glutinis'in karotenoid üreten bir maya türü olduğu bilinmektedir (80). Yapılan deneyler sırasında üretilen karotenoid düzeyi gözlemsel olarak ortamda çoğalan maya kütlelerinin renginden anlaşılabilmektedir. Tez çalışmasının bu bölümünde maya kütlelerinden lipit ekstraksiyonu işlemi sırasında kloroform fazına geçen karotenoidlerin düzeyini ölçerek sıcaklık ve ZK varlığı ile ilişkisi anlaşılmaya çalışılmıştır. Hazırlanan %25 ZK ve 1 g/L üre içeren ZK ortamları 10, 20 ve 30 °C olarak üç ayrı sıcaklıkta (K10, K20 ve K30) çalkalamalı hava banyosunda inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak ZK içermeyen UYM ortamı da 30 °C de çalışan çalkalayıcı hava banyosuna konulmuştur. Ortamlar için farklı zamanlarda biyokütle, toplam lipit, karotenoid, toplam protein, indirgen şeker ve FAME analizleri yapılmıştır. Ortamda zamanla biyokütle değişimi Şekil 5.19'da gösterilmiştir.



Şekil 5.19. 10, 20 ve 30 °C sıcaklıklarda ZK ortamlarında ve 30 °C sıcaklıkta UYM ortamında karotenoid izlenmesine yönelik hücre çoğalması (N=150 rpm)

Ortamlarda elde edilen en yüksek toplam lipit ve karotenoid düzeyleri ise zaman ve biyokütle ilişkileri ile birlikte Çizelge 5.12'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre sıcaklık arttıkça en yüksek toplam lipit ve karotenoid değerlerine ulaşma zamanı azalmaktadır. Ortamda ZK varlığı toplam lipit ve karotenoid düzeylerini arttırmaktadır. Ayrıca sıcaklık azaldıkça toplam lipit ve karotenoid düzeyleri de artmaktadır.

En yüksek biyokütle düzeyi 4,8 g/L ile 20 °C sıcaklıkta (K20 ortamı), en yüksek toplam lipit ve karotenoid düzeyleri ise 0,56 g/L ve 13,49 mg/L ile 10 °C sıcaklıkta (K10 ortamı) elde edilmiştir. Karotenoid/lipit yüzdeleri hesaplandığı zaman K10, K20, K30 ve UYM ortamlarında sırası ile %2,41, %1,56, %1,53 ve %2,07 olduğu görülmüştür.

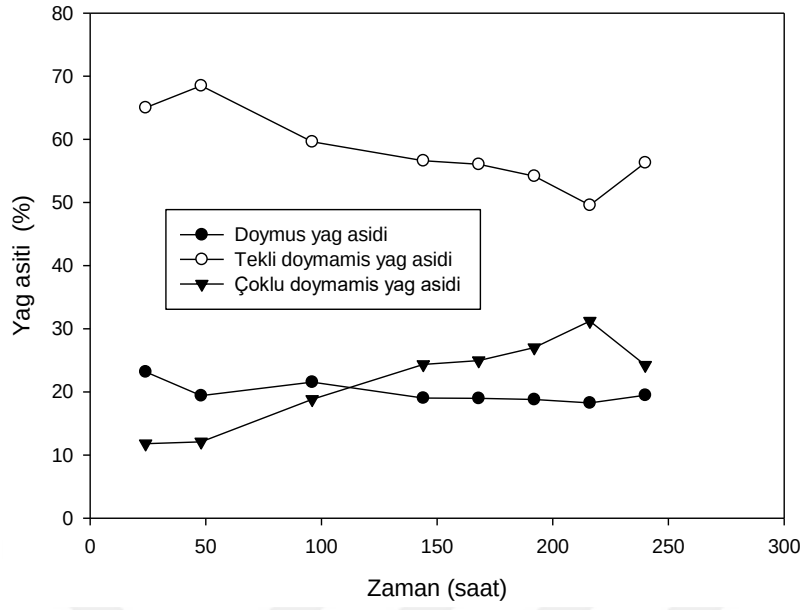
Çizelge 5.12. 10, 20 ve 30 °C ZK ortamları ve 30 C UYM ortamına ait en yüksek biyokütle, toplam lipit, toplam lipit/biyokütle ve karoten değerleri

	Zaman (saat) *	Biyokütle (g/L)	Toplam lipit (g/L)	Toplam lipit/biyokütle	Zaman (saat)**	Karotenoid (mg/L)
K10	192	3,9	0,56	0,14	216	13,49
K20	96	4,8	0,46	0,1	168	7,12
K30	72	3,9	0,42	0,11	144	6,36
UYM	48	2	0,23	0,12	120	4,75

* En yüksek toplam lipit düzeyinin ölçüldüğü çoğalma zamanı.

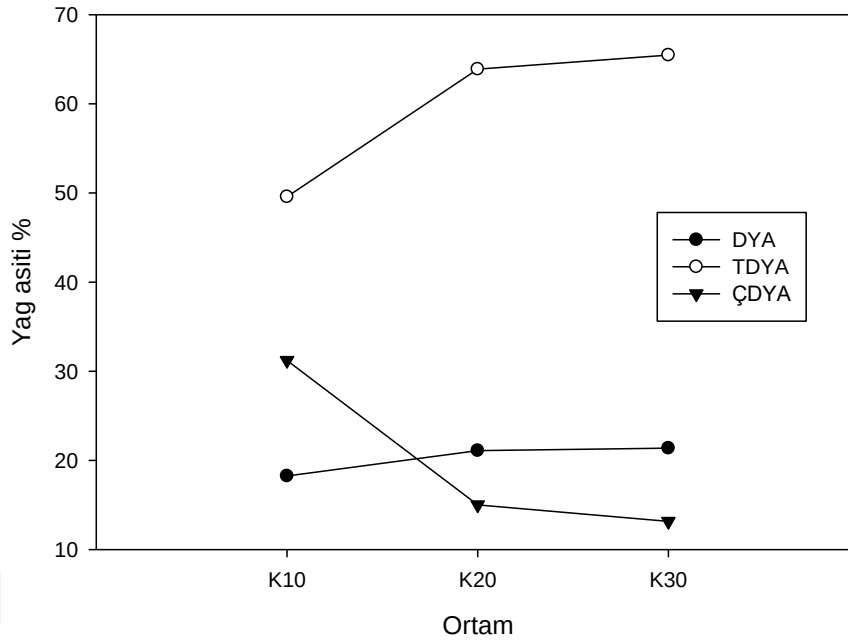
** En yüksek karoten düzeyinin ölçüldüğü çoğalma zamanı

K10 ortamından zamanla alınan örneklerden yapılan FAME analizine göre doymuş yağ asitlerinin yüzdelerinin hücre çoğalma fazıyla değişim göstermediği görülmüştür. Tekli doymamış yağ asiti (TDYA) ve çoklu doymamış yağ asiti (ÇDYA) arasında ise çapraz ilişki olduğu görülmüştür. Geç zamanlarda ÇDYA'nın artarken TDYA'lerinin azaldığı dikkat çekmiştir (Şekil 5.20).



Şekil 5.20. K10 ortamına ait zamanla yağ asiti doymamışlık profilleri (T= 10 °C, N=150 rpm)

Ortamlara ait en yüksek toplam lipid üretim anındaki yağ asiti kompozisyonuna bakıldığı zaman doymuş yağ asiti (DYA) miktarının ZK ortamında sıcaklık ile değişmediği UYM ortamında ise ZK ortamına göre DYA miktarının daha yüksek olduğu görülmüştür. TDYA'lar ise ZK ortamlarında sıcaklık ile artmıştır. UYM ortamının TDYA düzeyi ise K10 ortamı ile yakın düzeylerdedir. ÇDYA miktarı ise ZK ortamında sıcaklık arttıkça azalmıştır ve en düşük düzey UYM ortamında ölçülmüştür. Genel olarak TDYA ve ÇDYA düzeylerinin çapraz ilişkili olduğu görülmektedir (Şekil 5.21).



Şekil 5.21. 10, 20 ve 30 °C ZK ortamları ve UYM ortamına ait en yüksek toplam lipit üretim anındaki yağ asiti doymamışlık profili (N=150 rpm)

5.1.8 RHODOTORULA GLUTINIS'DEN ELDE EDİLEN LİPİT EKSTRAKTININ FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

R. glutinis'ten elde edilen hammaddelerin fiziksel ve kimyasal niteliklerinin, gıda, kozmetik, farmasötik ve enerji sektörlerinin ihtiyaçlarına göre çeşitlilik göstereceği yapılan bu doktora çalışmasında belirlenmiştir. Bu nedenle basit ve kontrol edilebilir parametreler olan sıcaklık ve pH ile beklentiye karşılık verecek şekilde ürün elde edilebilmesi, önerilen üretim sisteminin sanayiye uygulanabilirliğinin bir ölçüsü olarak görülmektedir. Biyodizel sektörü açısından düşünülürse; hammaddenin oksidasyona dayanıklı ve viskozite kararlılığının olmasının bir kalite parametresi olduğundan üretilen toplam lipitin doymamışlık/çoklu doymamışlık dereceleri önemlidir. Sanayide biyodizelin oksidatif kararlılığını arttırmak için dışarıdan antioksidanlar eklendiği bilinmektedir. Karotenlerin güçlü antioksidanlar olduğu bilindiğinden elde edilen biyodizel hammadde kaynağında bulunuyor olması ürünü avantajlı hale getirmekte ve cazibesini arttırmaktadır.

Gıda, farmasötik ve kozmetik alanlarında da antioksidan içeriği yüksek ürünlerin tercih edilebilirliği ve tüketicinin bu konudaki bilinçliliği son yıllarda artmıştır. Karotenlerin güçlü antioksidan moleküller olduğunun bilinmesinin yanında, *R. glutinis* ile üretilen toplam

karoten içeriğinin en büyük kısmını A vitaminin öncül maddesi (provitamin) olan β -karotenin oluşturduğu da (%68) rapor edilmiştir (80).

Çalışmanın bu bölümünde, *R. glutinis* hücrelerinden 7 günlük çoğalma süreci sonunda elde edilen 1,27 g/L toplam lipit fazının fizikokimyasal özellikleri analiz edilmiştir. Elde edilen lipit miktarı kuru hücre bazında %23 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen yağın doymuş yağ asiti düzeyi %23, tekli doymamış yağ asiti düzeyi %66 ve çoklu doymamış yağ asiti düzeyi ise %16'dır. Toplam lipit ekstresinin karotenoid derişimi 190 mg/L olarak ölçülmüştür, toplam fenol değeri ise 1740 mg/L dır. Literatürde bildirilmiş en yüksek toplam fenol içeriğine sahip zeytinyağının fenol düzeyi 1000 mg/kg dır (81). Elde edilen toplam lipit fazının HPLC ile ölçülen biyofenol derişimi ise 199 mg/kg olarak bulunmuştur. Lipit ekstresinin -mono,1-3 -di, 1-2 -di ve -tri gliserit düzeyleri sırası ile %98, 0,54, 0,72 ve 0,22 olarak ölçülmüştür (Çizelge 5.13).

Çizelge 5.13. ZK ortamında çoğalmış *R. glutinis*'den elde edilen toplam lipit ekstresinin – mono, -di ve -tri gliserit yüzdeleri (T= 30 °C, N=150 rpm, 168 saat)

Örnek	Trigliserit (%)	1-3 Digliserit (%)	1-2 Digliserit (%)	1- Monogliserit (%)
Paralel 1	98,46	0,55	0,77	0,22
Paralel 2	98,58	0,52	0,67	0,22
Ortalama	98,52	0,54	0,72	0,22

Elde edilen toplam lipit fazının yağ asiti profili ise Çizelge 5.14'de verilmiştir. Baskın yağ asitlerinin oleik asit, palmitik asit, linoleik asit ve stearik asit olduğu görülmektedir. Elde edilen toplam lipit doymamışlık bakımından da yüksek değerdedir. Tekli doymamışlık %66, çoklu doymamışlık %16 ve doymuş yağ oranı %14 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.14. *R. glutinis* ekstresinden elde edilen lipid fazının yağ asiti dağılımı (T= 30 °C, N=150 rpm, 168 saat)

Yağ asiti	%
Bütirik asit (C4:0)	0,32
Palmitik asit (C16:0)	12,68
Palmitoleik asit (C16:1)	0,25
Heptadekanoik asit (C17:0)	0,28
Cis-10-heptadekanoik asit (C17:1)	0,36
Stearik asit (C18:0)	3,16
Oleik asit (C18:1n9c)	65,10
Linoleik asit (C18:2n6c)	15,17
Araşidik asit (C20:0)	0,50
Cis-11-eikosenoik asit (C20:1n9)	0,34
Linolenik asit (C18:3n3)	1,22
Behenik asit (C22:0)	0,18
Cis-11,14,17-eikosatrienoik asit (C20:3n3)	0,29
Lignoserik asit (C24:0)	0,10

Elde edilen toplam lipid fraksiyonunda bulunan biyofenollerin dağılımı incelendiğinde ise en yüksek biyofenollerin %41 ile luteolin ve %34 ile apigenin olduğu görülmektedir. Zeytin karasuyunun baskın biyofenolleri olan HTY, TRY ve oleuropein (OLE) düzeyleri ise daha düşük bulunmuştur. HPLC ile ölçülen biyofenollerin toplam değeri ise 199,61 mg/kg olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.15)

Çizelge 5.15. *R. glutinis*'ten elde edilen lipidin fenol profili (T= 30 °C, N=150 rpm, 168 saat)

Biyofenol	mg/kg	%
Hidroksitirozol	11,24	5,63
Tirosol	20,35	10,19
p-Kumarik asit	14,51	7,26
Oleuropein	2,86	1,43
Luteolin	82,50	41,33
Apigenin	68,15	34,14
Toplam	199,61	100,00

Çizelge 5.16 ZK ortamında çoğalan mayadan elde edilen toplam lipid fazının fizikokimyasal özellikleri (Çoğalma koşulları: %25 ZK, 1 g/L üre, 30 °C, 150 rpm, 7 gün)

Maya lipid ekstresi özellikleri	
Toplam lipid (g/L)	1,27
Kuru hücre başına toplam lipid (%)	23,59
Doymuş yağ asiti (%)	14,12
Tekli doymamış yağ asiti (%)	66,05
Çoklu doymamış yağ asiti (%)	16,67
Karotenoit (ppm)	190
Toplam fenol (mg/kg)	1740
Toplam antioksidan aktivitesi (DPPH %)	75
Toplam biyofenol (HPLC) mg/kg	199,61

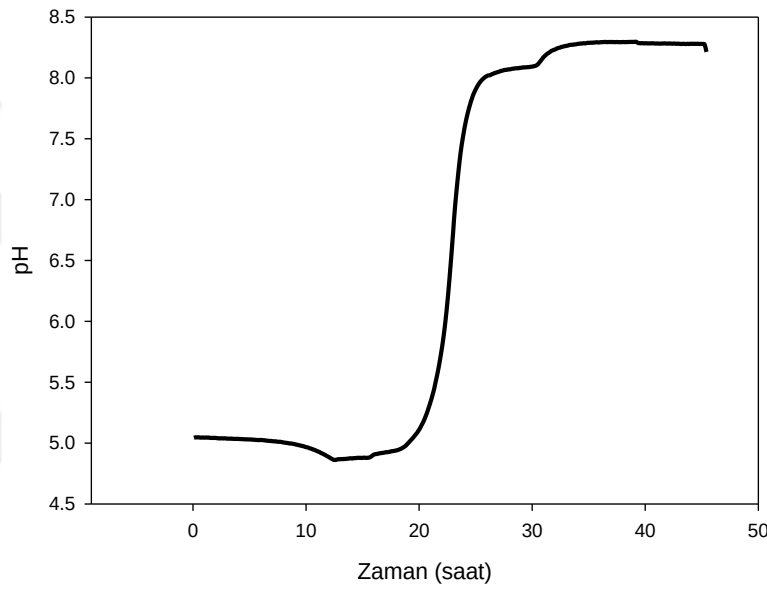
Zeytin karasuyu ortamında üretilen toplam lipitin fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri genel olarak değerlendirildiğinde; lipit fazının yağ asiti doymuşluk profili zeytinyağına benzer olduğu görülmüştür. Karotenoid düzeyi açısından kızıl palmiye yağı ile karşılaştırmak mümkündür. Kızıl palmiye yağının karotenoid düzeyi 500 mg/kg üzerinde rapor edilmiştir (82). Bu değer ile kıyaslandığında 190 mg/kg ile maya yağının karoten içeriği daha düşüktür ancak yağ asiti profiline bakıldığında en az %44 doymuş yağ oranı içeren palmiye yağına göre gıda amaçlı kullanımda daha sağlıklı olduğu görülmektedir (83). Toplam fenol içeriği bakımından zeytinyağı ile kıyaslamak mümkündür. Yapılan bir araştırmada çeşitli zeytin türleri ile üretilen erken hasat yağların toplam fenol düzeyleri ölçülmüş ve en yüksek 1000 mg/kg toplam fenol düzeyi rapor edilmiştir (81). *R. glutinis* yağının 1740 mg/kg ile fenolik bileşen bakımından zeytinyağından daha zengin olduğu görülmektedir. DPPH aktivitesi ise %75 olarak ölçülmüştür (Çizelge 5.16). Yapılan biyokimyasal çalışmalarda flavinoidlerin *R. glutinis* tarafından birbirlerine dönüştürüldüğü anlaşılmıştır (84). Ancak bu alanda yapılmış detaylı biyokimyasal çalışma sayısı literatürde çok azdır. *R. glutinis*'ten elde edilen yağın biyofenol profili zeytinyağına göre farklı bulunmuştur. *R. glutinis* yağı içerisinde zeytinyağı ve zeytin karasuyunda baskın olan HTY, TRY ve OLE bulunmaktadır. Ancak luteolin ve apigenin düzeylerinin sırası ile %41 ve 34 olarak daha baskın biyofenoller olduğu anlaşılmıştır. Literatürde luteolin flavinoidinin *R. glutinis* tarafından rejyoselektif olarak C8 orto- pozisyonundan hidroksillenerek hypoletin üretildiği bildirilmiştir. Flavonoidlerin hidroksillenme derecelerinin toplam antioksidan aktivitesiyle doğru orantılı olduğu bilinmektedir (84). Bu nedenle *R. glutinis* içerisinde bulunan luteolinin, maya tarafından stres koşullarına karşı daha yüksek antioksidan aktivitesi olan flavinoid üretiminde kullanılan bir ara metabolit olduğu düşünülebilir.

5.2 BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE RHODOTORULA GLUTINIS İLE BİYOKÜTLE VE LİPİT ÜRETİMİ

Yapılan 100 ml erlen ortamındaki denemelerin ardından 1 L biyoreaktör ile pH ve sıcaklık kontrollü denemeler yapılmıştır. Öncelikli olarak biyoreaktörde hücrel çoğalmanın gözlenebilmesi amacıyla kesikli işletim yapılarak zaman ile ortamın pH değişimi incelenmiş; daha sonra sürekli işletim denemelerine geçilmiştir. Sürekli işletim sistemi ve mekanizması Şekil 4.1.'de yer almaktadır. Sürekli işletimde pH ve sıcaklık parametre olarak belirlenmiştir.

5.2.1 BİYOREAKTÖRDE KESİKLİ İŞLETİM

Sürekli işletim ile üretime hazırlık olarak *R. glutinis* biyoreaktörde kesikli işletim ile çoğaltılmıştır. Bunun için hücreler %25 ZK ve 1 g/L üre içeren 1 L ortama inokule edilerek 30 °C sıcaklık ve 250 rpm karıştırma hızında çoğaltılmışlardır. Zamanla *R. glutinis*'in ZK ortamında çoğalma parametresi olan ortam pH'sının zamanla değişimi izlenmiştir. Zaman; pH değişiminden ortam pH değişiminin önceki çalışmalarda olduğu gibi hücre çoğalma kinetiğine uygun olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.22) (43).



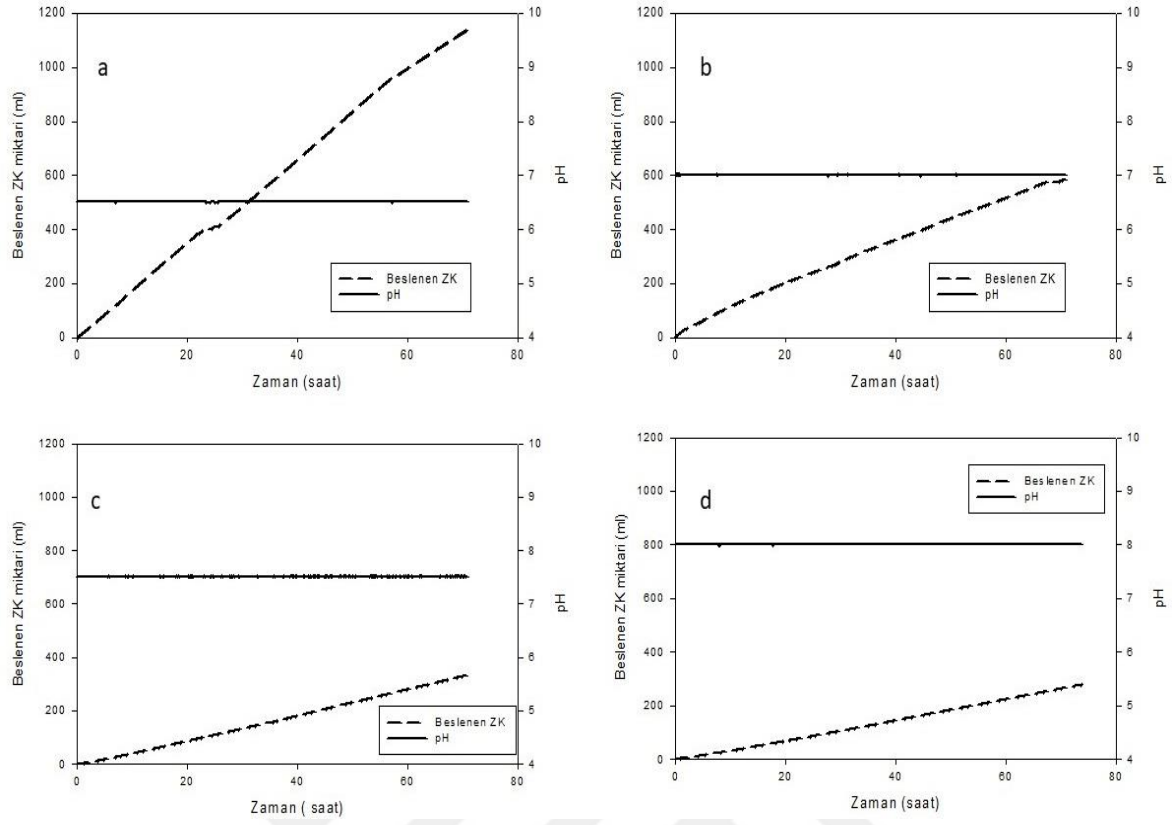
Şekil 5.22. Kesikli işletim biyoreaktör denemesine ait pH eğrisi (T= 30 °C, N=250 rpm)

5.2.2 BİYOREAKTÖRDE SÜREKLİ İŞLETİM

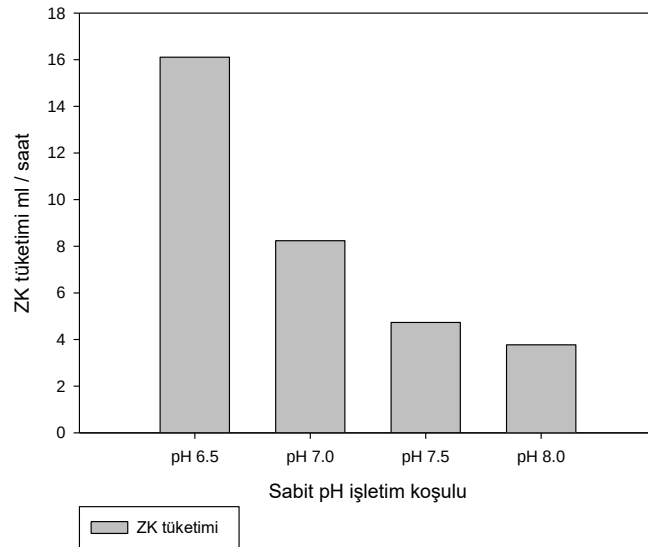
Sürekli işletim denemeleri %25 ZK ve 1g/L üre içeren 1L ortam ile 30 °C de başlatılmıştır. Biyoreaktör; hücreler ortamda çoğalmaya başladıkça ve çoğalmanın göstergesi olarak pH artışı oldukça ortam pH sı sabit değerde tutulmak üzere ortama seyreltilmemiş ham zeytin karasuyu pompalamak üzere ayarlanmıştır. Böylelikle sabit pH koşullarında sisteme sürekli olarak ZK beslemesi yapılmıştır. Aynı besleme pompasına bağlanmış olan bir diğer tahliye hortumu besleme ile eşit miktardaki karasuyu ortamdan çekerek tahliye şişesine aktarmaktadır. Elde edilen veriler ile pH ilişkili ZK beslemesinin ortamda meydana gelebilecek substrat toksisitesini kaldırdığını göstermiştir.

Sürekli işletim denemelerinde biyoreaktör pH= 6,5-7,0-7,5-8,0 sabit koşullarında çalıştırılmıştır. Her bir sabit pH koşulunda sistem 72 saat boyunca izlenmiş, ortama beslenen ZK miktarı ölçülmüştür. İşletim sonucunda sistem çıkışında toplanan ZK ortamından toplam fenol değeri ölçülmüştür. Ayrıca ortamda çoğalan hücrelerden hücre derişimi, toplam lipit ve FAME düzeyleri ölçülmüştür

Şekil 5.23’da görüldüğü gibi sabit pH değeri arttıkça ZK besleme eğrisinin eğimi ve toplam beslenen ZK miktarı azalmaktadır. ZK ortamının pH değerinin artışı hücre çoğalması ile ilişkilidir. Sistem sabit pH’sı, sisteme beslenen ham ZK pH’sından ne kadar yüksek düzeye ayarlanırsa hücrelerin ham ZK pH’sını o düzeye yükseltmeleri için gerekli zaman ile ilişkili olarak ham ZK alıkonma süresi artmakta ve bununla ilişkili olarak ZK tüketim hızı azalmaktadır (Şekil 5.24). Bu nedenle ayarlanan sistem sabit pH düzeyi yükseldikçe ZK tüketimi yavaşlamaktadır. Elde edilen ZK besleme hız eğrilerinin doğrusal olması ayarlanan sabit pH koşullarında hücresel çoğalma fazının da o pH koşullarında sabit olduğunun göstergesidir. Bu veriler ile sürekli sistemde yatışkın koşul elde etmek için, *R. glutinis* ile ZK ortamında pH kontrolünün belirli bir kemostat koşulunu sağlamakta kullanılabileceği söylenebilir.

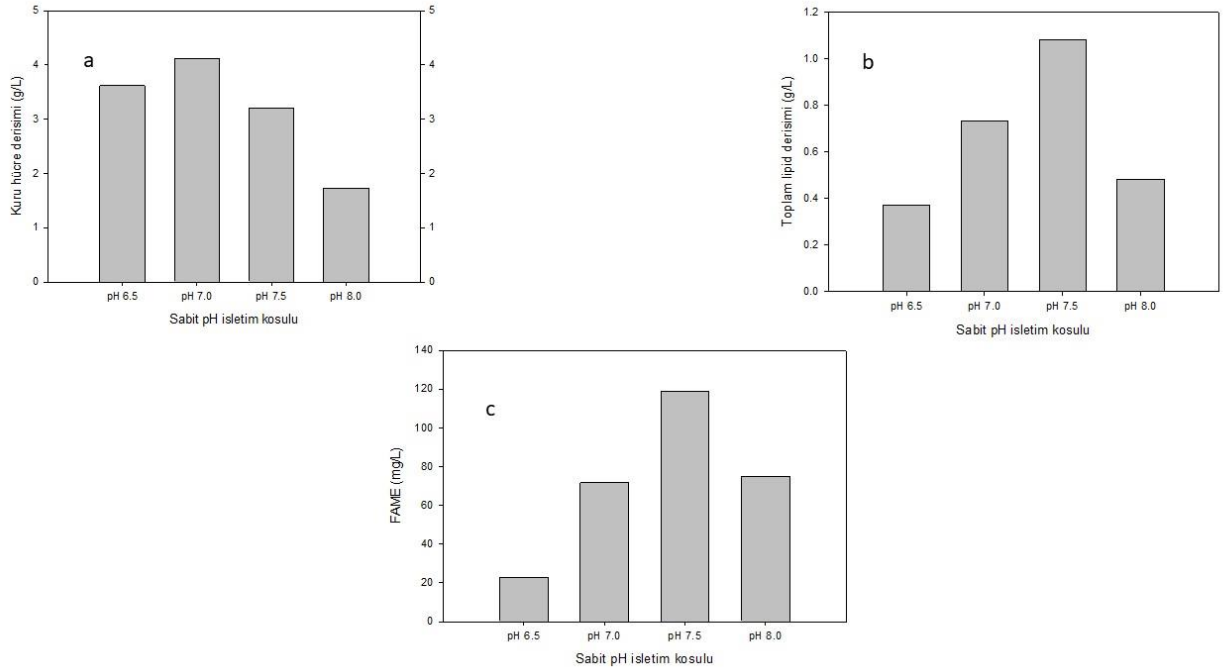


Şekil 5.23. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarında zaman ile beslenen ZK miktarının değişimi a) pH 6,5 - b) pH 7 - c) pH 7,5 - d) pH 8 ($T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N=250\text{ rpm}$)



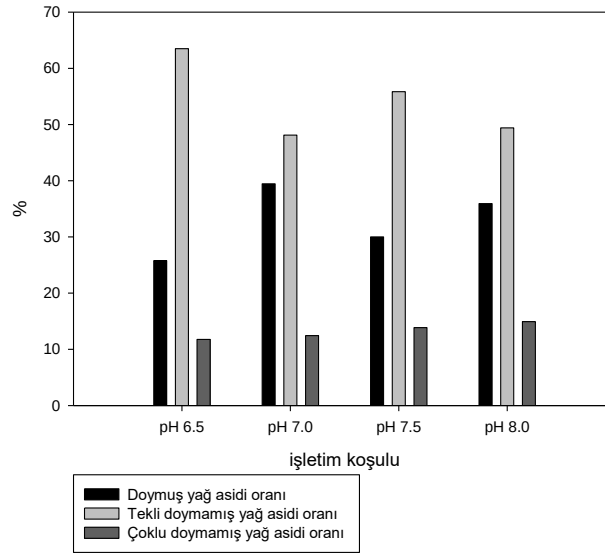
Şekil 5.24. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarındaki ortalama ZK tüketim hızları ($T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N=250\text{ rpm}$)

Ortam parametrelerini üretim açısından incelenirse, çoğalan hücre derişiminin pH 6,5'den 7,0'a arttığı, 8,0'e de azaldığı (Şekil 5.25 a); toplam lipid derişimin de pH artışı ile artarak pH 7,5 da en yüksek değere ulaştığı, pH 8.0 de azaldığı görülmektedir (Şekil 5.25 b). FAME düzeyleri de toplam lipid derişimi artışı ile uyumludur (Şekil 5.25 c).



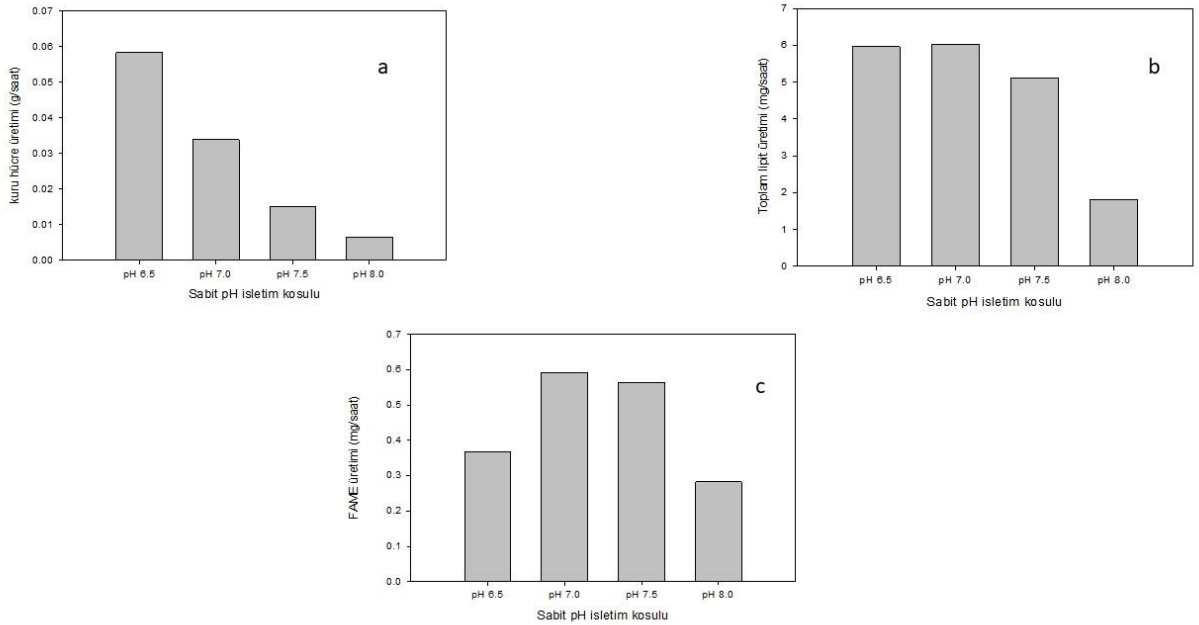
Şekil 5.25. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarına bağlı olarak ortam hacmi başına üretim miktarları. a) Kuru hücre b) Toplam lipid c) FAME (T= 30 °C, N= 250 rpm)

Ortamlarda üretilen FAME dağılımına göre pH 6,5'dan 7,0'a çıkarıldığı zaman doymuş yağ asiti miktarı artmakta, tekli doymamış yağ asiti miktarı azalmaktadır. Çoklu doymamış yağ oranlarında ise değişim olmamaktadır. pH 7,0'dan 7,5'e çıkarıldığında ise doymuş yağ asiti miktarı azalmakta, tekli doymamış yağ asiti miktarı artmaktadır. Çoklu doymamışlık bakımından ise anlamlı fark görülmemiştir. pH 7,5'dan 8,0'a çıkarıldığı zaman ise doymuş yağ asiti oranı tekrar artmakta, tekli doymamışlık oranı azalmaktadır. Genel olarak sabit işletim pH'sı artışı ile birlikte çoklu doymamışlık bakımından düşük düzeyde bir artış görülmektedir (Şekil 5.26).



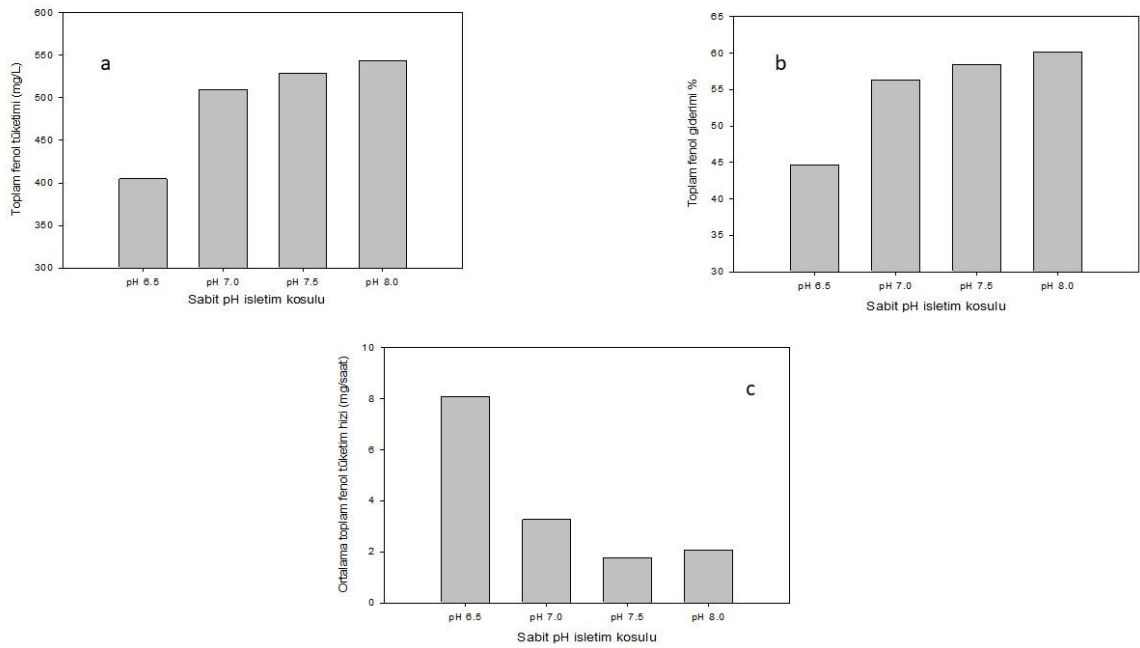
Şekil 5.26 Farklı pH koşullarında üretilen FAME doymuşluk ve doymamışlık oranları (T= 30 °C, N=250 rpm)

Ölçülen ortam parametreleri ortalama üretim hızları bakımından değerlendirilirse; hücre ve toplam lipid üretim hızının işletim pH'sı arttıkça azaldığı görülmektedir (Şekil 5.27 a,b). FAME üretim hızı ise pH 6,5'dan 7,0 ye çıkarıldığında artmış, 8,0'a arttıkça azalmıştır (Şekil 5.27 c).



Şekil 5.27. Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarında üretim hızları. a) kuru hücre üretim hızları b) toplam lipid üretim hızları c) FAME üretim hızları (T= 30°C, N= 250 rpm).

Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarına bağlı olarak ZK arıtımının derecesi de incelenmiştir. Arıtım parametresi olarak toplam fenol derişimleri ve yüzde toplam fenol giderimleri incelendiği zaman pH arttıkça toplam fenol gideriminin arttığı görülmektedir. Ancak pH artışıyla toplam fenol gideriminin de artmasına karşıt olarak, sistem ZK akış hızı azalmaktadır. Bu nedenle ortalama toplam fenol tüketim hızları açısından değerlendirildiğinde sabit pH düzeyleri arttıkça birim zamanda tüketilen toplam fenol düzeyleri azalmaktadır (Şekil 5.28.).



Şekil 5.28 Sürekli işletimde çalışan biyoreaktörde farklı sabit pH koşullarında ortalama arıtım hızları a) toplam fenol tüketim hızları b) toplam fenol giderimleri c) ortalama toplam fenol tüketim hızları (T= 30°C, N= 250 rpm)

Yapılan sürekli işletim denemelerinde farklı sabit pH işletim koşullarında *R. glutinis* ile üretim ve arıtım parametreleri birim ortam hacimi başına ve birim zamanda incelenmiştir. Zeytin karasuyu çoğalma ortamında ortam pH'sı hücre çoğalması ile doğru orantılı olduğu için işletim pH düzeyi arttıkça ZK akış hızı azalmaktadır. Buna bağlı olarak ortam başına üretim miktarları pH arttıkça artmasına karşın birim zamanda üretim ve tüketim hızları azalmaktadır. Çalışmanın devamında sürekli işletim koşullarına işletim parametresi olarak sıcaklık da eklenmiştir. Bir sonraki deneyde pH ve sıcaklık parametrelerinin eşanlı olarak merkezi kompozit tasarım ile üretim verimlerine ve hızlarına etkisi incelenmiştir.

Her bir parametre için yeni bir ortam hazırlanarak reaktör işletimi başlatılan deneylerde işletimler 500 ml ZK tüketimi gerçekleşene kadar sürdürülmüştür. ZK besleme ortamı da -

bir önceki denemeden farklı olarak- %100 ZK ortamı yerine %25 ZK ve 1 g/L üre ile hazırlanmıştır. Sıcaklık ve pH'nın parametre olarak seçildiği deney tasarım matrisi Çizelge 5.17'de verilmiştir.

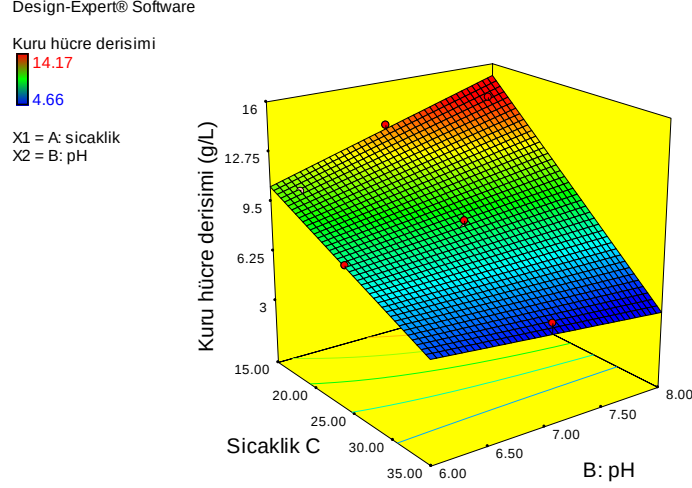
Çizelge 5.17. Biyoreaktör denemesi merkezi kompozit deney tasarım matrisi

Parametre	Birim	Düzy -1	Düzy +1	Alfa -	Alfa +
Sıcaklık	°C	16,59	33,41	15	35
pH		6,16	7,84	6	8

Yapılan merkezi kompozit tasarım ile elde edilen verilerin yüzey cevap yöntemine uygunluğu analiz edildiğinde deneyin iki faktörlü etkileşim (2FI) modeline uygun olduğu Design Expert® 7.0 yazılımı ile bulunmuştur. Sıcaklık ve pH parametreleri için hesaplanan standart hata 0,38 olarak hesaplanmıştır. Bu değerin temel standart sapma(Ss) katsayısı olan 1'den küçük olması istenilen bir durumdur. Sonuçlar kuru hücre derişimi bakımından incelenirse, verilerin ANOVA analizine göre sıcaklık ve pH parametrelerinin hücre derişimine etkilerinin F değerleri sırası ile 514,92 ve 17,82 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler sıcaklık parametresinin bu deneyde hücre derişimi üzerine daha büyük etkisi olduğunu göstermektedir. Prob>F değerlerinin 0,05'den küçük olması o terimin model içerisindeki öneminin ve uygunluğunun bir fonksiyonudur. Buna göre sıcaklık, pH ve sıcaklık-pH parametreleri etkileşiminin kuru hücre derişimi üzerine anlamlı etkisi olmakla beraber bu verilerin seçilen modele (Eş. (5.1)) uygun olduğu "significant" uyarısı ile belirtilmiştir (EK-12)

$$Kuru hücre derişimi \left(\frac{g}{L} \right) = -12.81653 + 0.64013 * sıcaklık + 4.57608 * pH - 0.15167 * sıcaklık * pH \quad (5.1)$$

Sonuçlara göre sıcaklık artışı ile hücre miktarı istatistiksel olarak anlamlı azalmaktadır. Hücre çoğalması üzerinde pH'nın etkisi düşük sıcaklıkta daha fazla iken yüksek sıcaklıklarda daha az olduğu görülmektedir. Düşük sıcaklıklarda pH arttıkça kuru hücre derişimdeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 5.29).



Şekil 5.29. Merkezi kompozit deney tasarımı sürekli işletim biyoreaktör denemesine ait sıcaklık ve pH koşullarına bağlı kuru hücre derişimi yüzey cevabı (N= 250 rpm)

Elde edilen toplam lipid miktarı verilerinin ANOVA analizine göre seçilen kuadratik model için “significant” uyumlu olduğu görülmüştür. Sıcaklık ve pH parametrelerinin F değerleri sırası ile 21,76 ve 5,07 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, her iki parametrenin de toplam lipid derişimi üzerine istatistiksel olarak etkisinin anlamlı ve sıcaklığın toplam lipid derişimi üzerine pH dan daha fazla etkili olduğunu göstermektedir. ANOVA analizine göre her iki parametrenin karşılıklı etkileşimli olarak toplam lipid düzeylerini etkilediği (AB: F value 3,40) ve sıcaklık parametresinin toplam lipid derişimine üstel etkisi olduğu (A²: F value 6,89) görüşmüştür (EK-13).

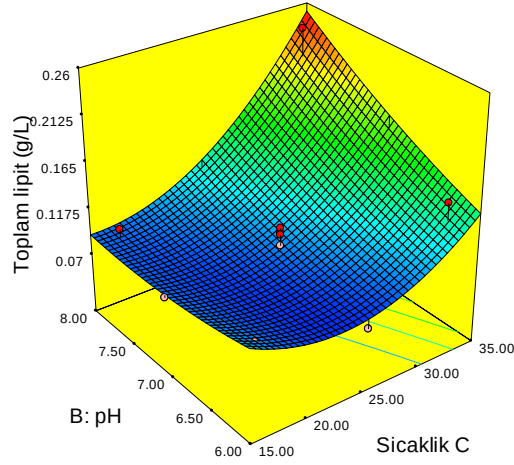
Toplam lipid verilerinin yüzey cevabı, sıcaklık artışı ile ortalama toplam lipid düzeylerinin arttığını göstermektedir. Yüksek pH değerlerinde sıcaklık ile toplam lipid artışı daha fazladır. Düşük sıcaklıklarda pH artışı toplam lipid miktarlarını değıştirmezen sıcaklık arttıkça pH’nın toplam lipid artışına etkisi gözle görülür düzeyde artmaktadır. Yüksek sıcaklıkta pH arttıkça toplam lipid düzeyleri de artmaktadır. Yüzey cevabına göre sıcaklık ile toplam lipid miktarları üstel ilişkilidir (Şekil 5.30). Elde edilen model Eş (5.2) ile verilmiştir.

$$\text{Toplam lipid} \left(\frac{g}{L} \right) = 0,97477 - 0.037206 * \text{sıcaklık} - 0.15942 * \text{pH} + 3.05456E - 003 * \text{sıcaklık} * \text{pH} + 4.16009E - 004 * \text{sıcaklık}^2 + 7.64809E - 003 * \text{pH}^2 \quad (5.2)$$

Design-Expert® Software

Toplam lipid
0.245248
0.0714286

X1 = A: sıcaklık
X2 = B: pH



Şekil 5.30. Merkezi kompozit deney tasarımı sürekli işletim biyoreaktör denemesine ait sıcaklık ve pH koşullarına bağlı toplam lipid yüzey cevabı (N= 250 rpm)

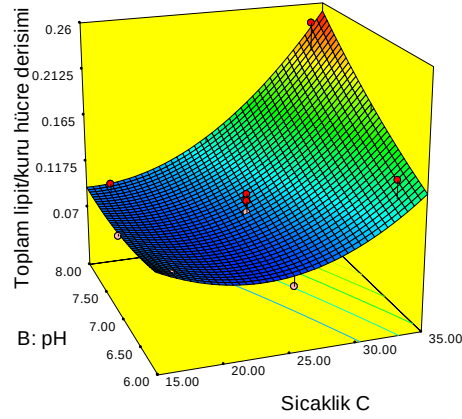
Kuru hücre başına toplam lipid yüzey cevabı ise hücrelerin sıcaklık artışıyla lipid birikimi yaptıklarını göstermektedir. pH parametresi hücrenin depoladığı lipid miktarını yüksek sıcaklıklarda daha çok etkilerken düşük sıcaklıkta etki derecesi azalmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda pH arttıkça hücrenin lipid biriktirme miktarı da artmaktadır (Şekil 5.31).

Design-Expert® Software

Toplam lipid/kuru hücre derisimi

0.245248
0.0714286

X1 = A: sıcaklık
X2 = B: pH



Şekil 5.31. Merkezi kompozit deney tasarımı sürekli işletim biyoreaktör denemesine ait sıcaklık ve pH koşullarına bağlı kuru hücre başına toplam lipid yüzey cevabı (N= 250 rpm)

Yapılan sürekli işletimlerde elde edilen verilere göre, ortam sıcaklığı ve biyoreaktör işletim pH düzeyi zeytin karasuyu ortamında *R. glutinis*'in çoğalma kinetiğini ve elde edilen ürünlerin nitel ve nicel özelliklerini önemli ölçüde değiştirmektedir. Yapılan birinci sürekli

işletimde ortam sıcaklığı sabit tutularak sürekli işletim pH düzeyinin biyoreaksiyon kinetiklerine etkisi görülmüştür. pH bütün mikroorganizmaların fiziksel çoğalma koşullarındandır. Buna ek olarak ZK ortamında *R. glutinis* çoğalmasının da bir fonksiyonudur. Bu nedenle sürekli işletimde farklı sabit pH işletim koşulu *R. glutinis*'in kesikli sistemdeki farklı bir çoğalma fazına denk gelmektedir. Ortamın fizikokimyasal özelliklerinin yanında değişen pH ile çoğalmayı fazı da değişmektedir. Ortam sıcaklığı da pH gibi mikroorganizmaların fiziksel çoğalma koşullarından biridir. pH ve sıcaklık aynı zamanda birbirleri ile ilişkili kavramlardır. Yapılan deneylerde bu ilişkinin *R. glutinis*'in ZK ortamında çoğalması üzerine karşılıklı etkileşimli etkisinin de olduğunu göstermektedir. Denenen aralıklardaki pH değişimlerinin incelenen cevaplara etkisi her sıcaklık aralığında farklı gözlenmiştir.

5.3 ZEYTİN KARASUYUNUN FENOLİK MADDELERİNİN ARDIŞIK HOMOJENİZASYON-EKSTRAKSİYON PROSESLERİ İLE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ VE BİYOARITILABİLİRLİĞİNİN KOLAYLAŞTIRILMASI İÇİN ENTEGRE BİR PROSES GELİSTİRİLMESİ

Tez çalışmasının önceki bölümlerinde (Bölüm 5.1 ve 5.2) zeytin karasuyu ortamında *R. glutinis*'in çoğalma koşulları ve süreçleri ile üretim ve arıtım parametreleri incelenmiştir. Bu süreçlerde yapılan biyokimyasal analizlerde mayanın ortamda çoğalırken ZK ortamında bulunan fenolik bileşikler karbon kaynağı olarak kullandığı görülmüştür. ZK fenollerinin maya tarafından kullanılarak farklı ürünlere biyodönüşümü endüstriyel mikrobiyoloji uygulamaları bakımından önemlidir. Ancak zeytinden gelen fenolik bileşikler aynı zamanda gıda, farmasötik ve kozmetik endüstrileri bakımından önemli antioksidan bileşiklerdir. Bu nedenle ZK'nın *R. glutinis* ile biyoüretim sürecine girmeden ön fenol ayırımı işlemine tabi olması toplam ZK değerlendirilmesi açısından önemlidir. Ayrıca biyoekonomi açısından ürün çeşitliliği sağlayacaktır. Tez çalışmasının bu bölümünde, ZK'nın bir diğer Akdeniz Bölgesi tarımsal yan ürünü olan üzüm cibresi ile ön işleme tabi tutularak içeriğindeki fenolik bileşiklerin doğal absorban madde olan cibre ile geri kazanımı incelenmiştir. Yapılan deneyler ve cevapların değerlendirilmesi Design Expert® 7.0 yazılımı kullanılarak faktöriyel ve merkezi kompozit tasarımları ile yapılmış ve yüzey cevapları değerlendirilerek model eşitlikleri verilmiştir.

5.3.1 ZEYTİN KARASUYUNDAKİ FENOLİK BİLEŞENLERİN CİBREYE GEÇMESİ İÇİN OPTİMUM İŞLEM KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin üzüm cibresine geçirilerek toplam fenol derişimini azaltmak amacıyla, karasu ile cibre farklı koşullarda işlem görmüştür. Bu amaçla cibrenin parçalanma süresi (s), zeytin karasuyu/cibre oranı (ml/g), parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalanma süresi (dk) ve çalkalama sıcaklığı (°C), etkileri incelenecek parametreler olarak seçilmiştir. Bu parametreler faktör olarak, toplam fenol (TF) derişimi ile renk giderimi ise cevap olarak seçilerek deney tasarımları yapılmıştır. Öncelikle faktöriyel tasarımlar yapılarak toplam fenol ve renk giderimi için önemli olan parametreler seçilmiştir. Ardından seçilen parametreler ile iki faktörlü merkezi kompozit tasarım yapılmış ve cevap yüzeyleri belirlenmiştir. Sonrasında tek faktörlü merkezi kompozit tasarımı yapılmış ve optimizasyon ile en yüksek toplam fenol giderimi ve renk gideriminin elde edildiği koşullarda cevap değerleri bulunmuştur. Son olarak teorik olarak elde edilen model ile belirlenen optimum değerlerin deneysel olarak kuramsal değerlere yakınlığı belirlenmiştir.

5.3.1.1 Faktöriyel Tasarım Deneyleri: Zeytin Karasuyu/Cibre Oranı, Cibrenin Parçalanma Süresi, Parçalanmadan Sonra Karasu ile Birlikte Çalkalama Süresi ve Çalkalama Sıcaklığının Toplam Fenol ve Renk Giderimine Etkileri

Yapılan ilk deneyde (Faktöriyel Tasarım I); zeytin karasuyu/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanma sonrasında karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinden, toplam fenol giderimi ve renk giderimi üzerine daha önemli olanlarını belirlemek üzere tam faktöriyel tasarım yapılmıştır. Çizelge 5.18’de incelenen parametreler ve seviyeleri, EK 14’de ise oluşturulan deney tasarım matrisi ve cevaplar yer almaktadır.

Çizelge 5.18. Faktöriyel Tasarım I deneyine ait incelenen parametreler ve düzey aralıkları

Faktör		Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
		-1	1
A:	ZK/cibre oranı (ml/g)	5	10
B:	Çalkalama sıcaklığı (°C)	20	30
C:	Parçalanma süresi (s)	30	120
D:	Çalkalama süresi (dk)	30	120

Yapılan deneylerden elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Denenen faktörlerin cevaplara etki dereceleri bulunmuştur.

Toplam fenol giderimi bakımından sonuçlar değerlendirildiği zaman, A parametresinin (ZK/cibre oranı) toplam fenol giderimine etkisinin %68 değerinde olduğu görülmektedir. Diğer tekli ve çoklu parametrelerin etkileri ise A parametresi yanında daha az önemlidir (Çizelge 5.19).

Çizelge 5.19. Faktöriyel Tasarım I deneyine ait ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinin TF giderimine % etkileri

Term	Effect	SumSqr	% Contrubution
A-ZK/Cibre oranı	-13,57	737,17	67,80
B-Çalkalama sıcaklığı	0,62	1,57	0,14
C- Parçalanma süresi	-0,47	0,89	0,08
D-Çalkalama süresi	-2,55	25,93	2,38

Verilerin ANOVA analizine göre de A parametresinin kareler toplamı diğer parametrelere göre en yüksek (737), p değeri (0,0004) ise modelin p değerinden (0,0060) daha küçüktür. Bu durum, A parametresi (ZK/cibre oranı) toplam fenol giderimine üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu anlamına gelmektedir (EK-15).

Sistem parametrelerinin renk giderimine tekli ve çoklu etkileri Çizelge 5.20’de görüldüğü gibidir. Buna göre, A parametresinin (ZK/cibre oranı) toplam fenol giderimine etkisi %42 ile en yüksek düzeydedir. A parametresinin yanında çalkalama sıcaklığı parametresi (B) de %11 ile yüksek etki derecesine sahiptir. Diğer parametrelerin etki dereceleri bu iki parametre yanında istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çizelge 5.20. Faktöriyel Tasarım I deneyine ait ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi

Term	Effect	SumSqr	% Contribution
Intercept			
A-ZK/Cibre oranı	-13,99	783,00	42,00
B-Çalkalama sıcaklığı	7,33	215,00	11,40
C-Parçalanma süresi	-0,31	0,37	0,02
D-Çalkalama süresi	-3,35	45,00	2,00

Verilerin ANOVA analizine göre de A parametresinin kareler toplamı diğer parametrelere göre en yüksek (783), p değeri (0,0084) modelin p değerinden (0,0476) daha küçüktür. Bu nedenle A parametresinin (ZK/cibre oranı) renk giderimi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (EK-16). İncelenen parametreler arasında zeytin karasuyundan renk giderimi üzerine en fazla etkiye sahip olan parametrenin ZK/cibre oranı olduğu belirlenmiştir.

Faktöriyel Tasarım I deneyi ile toplam fenol derişimi ve renk giderimini en çok etkileyen parametrenin ZK/cibre oranı olduğu anlaşılmıştır. Bu etki diğer 3 parametrenin etki değerlendirmesini perdelediği için diğer 3 parametre arasından en yüksek etkiye sahip olanı daha iyi görebilmek amacıyla ZK/cibre oranı sabitlenerek diğer 3 parametre ile tam faktöryel tasarım (2^3) yapılmıştır. Faktöriyel Tasarım II' nin amacı; cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının toplam fenol ve renk giderimi üzerine etki derecelerinin bulunması ve aralarında daha az önemli görünen parametrelerin elenmesidir. Bu denemede ZK/cibre oranı 5 ml/g düzeyinde sabitlenmiştir. Çizelge 5.21'de incelenen parametreler (faktörler) ve seviyeleri, EK-17'de ise oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Çizelge 5.21. Faktöriyel Tasarım II deneyine ait parametreler ve düzeyleri

Faktör		Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
		-1	1
A:	Parçalanma süresi (s)	30	240
B:	Çalkalama sıcaklığı (°C)	10	30
C:	Çalkalama süresi (dk)	30	240

Sistem parametrelerinin TF giderimine tekli ve çoklu etkileri Çizelge 5.22'de görülmektedir. Buna göre, C parametresinin (çalkalama süresi) toplam fenol giderimine etkisi en yüksek ve %85 değerindedir. Diğer ana parametreler ise C parametresi yanında önemli görülmemektedir.

Çizelge 5.22 Faktoriyel tasarım II deneyine ait cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine ana parametrelerin etki değerlendirmesi

Term	Effect	SumSqr	% Contribtn
A: Parçalanma süresi	-2,81	15,82	2,28
B: Çalkalama sıcaklığı	3,42	23,38	3,36
C: Çalkalama süresi	17,16	588,85	84,74

Verilerin ANOVA analizine C parametresi en yüksek kareler toplamı değerine (588) sahiptir ve p değeri (0,004) modelin p değerinden (0,0168) daha küçüktür (EK-18). Sonuç olarak; incelenen üç parametreden zeytin karasuyunda toplam fenol giderimi üzerine en fazla ve anlamlı etkiye sahip olan parametrenin cibre ile zeytin karasuyunun çalkalama süresi olduğu belirlenmiştir.

Sistem parametrelerinin renk giderimine tekli ve çoklu etkileri Çizelge 5.23’de verilmiştir. Buna göre, C parametresi (çalkalama süresi) ile A parametresinin (cibrenin parçalanma süresi) renk giderimine etkisi daha yüksek ve sırasıyla %54 ve %24 değerlerindedir. Diğer parametre olan çalkalama sıcaklığı ise bu iki parametre yanında daha az önemlidir.

Çizelge 5.23 Faktöriyel Tasarım II denemesine ait; Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının, renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi

Term	Effect	SumSqr	% Contribtn
A: Parçalanma süresi	11,97	286,49	23,98
B: Çalkalama sıcaklığı	6,83	93,29	7,81
C: Çalkalama süresi	17,91	641,22	53,66

Verilerin ANOVA analizine göre en yüksek kareler toplamı değeri (286) C parametresine aittir. Ayrıca C parametresinin p değeri (0,0185) seçilen modelin p değerinden (0,0377) daha küçüktür (EK-19). Bu nedenle C parametresinin renk giderimine etkisinde diğer ana etkilere göre daha anlamlı farkı olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri birlikte değerlendirildiğinde; incelenen üç parametreden zeytin karasuyundan renk giderimi üzerine cibrenin parçalanma süresi ve

karasu ile birlikte çalkalama süresinin çalkalama sıcaklığına göre daha fazla etkiye sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

5.3.1.2 Merkezi Kompozit Tasarım I: ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi etkileri

Faktöriyel Tasarım denemelerinde zeytin karasuyundan toplam fenol ve renk giderimi üzerine ZK/cibre oranının ve çalkalama süresinin diğer parametrelere göre daha önemli olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın devamında bu iki parametre ile merkezi kompozit tasarımlar yapılarak yüzey cevapları belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, daha önceki denemelerde en çok TF ve renk gideriminin sağlandığı parametre seviyeleri olan, cibre parçalanma süresi 240 s ve çalkalama sıcaklığı 30 °C olarak sabitlenmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi ile iki faktörlü merkezi kompozit tasarım yapılmıştır. Çizelge 5.24’de incelenen parametreler (faktörler) ve seviyeleri yer almaktadır. EK-20’de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Çizelge 5.24. Merkezi Kompozit Tasarımı I deneyinde incelenen faktörler ve seviyeleri

Faktör	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
	-1,27	-1	0	1	1,27
A: ZK/cibre (g/ml)	2,5	2,87	4,25	5,63	6
B: Çalkalama süresi (dk)	200	242,16	400	557,84	600

Yapılan deney sonucunda elde edilen cevaplar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve elde edilen modeller ile cevap yüzeyleri oluşturulmuştur. Elde edilen veriler toplam fenol giderimi bakımından “*Lack of fit test*” ile incelendiğinde; toplam fenol giderim cevaplarının kuadratik modele uygun olduğu görülmüştür (Çizelge 5.25).

Çizelge 5.25. Merkezi Kompozit Tasarım I deneyine ait toplam fenol giderimi için olası modellerin *Lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi

<i>Lack of fit Tests</i>						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Linear	198,6	6	33,1	3,55	0,12	<u>Suggested</u>
2FI	181,84	5	36,37	3,9	0,11	
Quadratic	58,56	3	19,52	2,09	0,24	<u>Suggested</u>
Cubic	14,01	1	14,01	1,5	0,29	Aliased
Pure Error	37,28	4	9,32			
<i>"Lack of fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.</i>						

Kuadratik modele göre seçilen toplam fenol giderimi yüzey cevaplarının ANOVA analizine göre, ZK/cibre oranı parametresi en yüksek kareler toplamı (848) değerine sahiptir, ayrıca p değeri (0,0001) modelin p değerinden (0,0013) daha küçüktür. Bu nedenle toplam fenol giderimi üzerine en yüksek etkiye A parametresi sahiptir (EK-21). Modelin *Lack of fit* değerinin önemsiz çıkması elde edilen yüzey cevaplarının seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir. Model denklemi Eş. (5.3)'de verilmiştir.

$$\begin{aligned}
 TF \text{ giderimi } (\%) = & 9,39006733 + 9,541996561 * \frac{ZK}{cibre} \text{ orani} + 0,176948763 * \\
 \text{Çalkalama süresi} - & 0,009391785 * \frac{ZK}{cibre} \text{ orani} * \text{Çalkalama süresi} - \\
 & 1,604608761 * \frac{ZK}{cibre} \text{ orani}^2 - 0,000153072 * \text{Çalkalama süresi}^2
 \end{aligned} \quad (5.3)$$

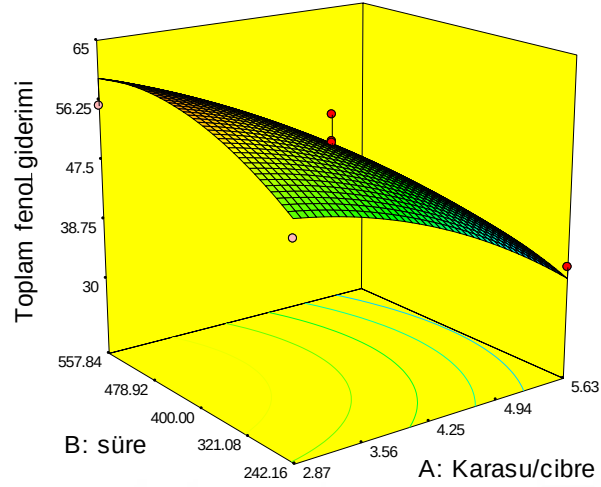
Şekil 5.32.'de verilen cevap yüzey grafiği, toplam fenol gideriminin ZK/cibre oranının 3 seviyesinin altındaki değerlere yaklaştıkça doygunluğa ulaşma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde 300 saatten sonra toplam fenol giderim eğrisi doygunluğa ulaşmaktadır.

Design-Expert® Software

Toplam fenol giderimi



X1 = A: Karasu/cibre
X2 = B: süre



Şekil 5.32. Merkezi kompozit I denemesine ait yüzde toplam fenol gideriminin (%) ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi (dakika) ile değişimi (T=30 °C, Parçalama süresi 120 sn).

Elde edilen veriler karasuda renk giderimi bakımından incelendiğinde; renk giderimi “*Lack of fit*” testine göre, cevapların kuadratik modele uygun olduğu görülmüştür (Çizelge 5.26).

Çizelge 5.26. Merkezi Kompozit Tasarımı I deneyine ait renk giderimi için olası modellerin *Lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi

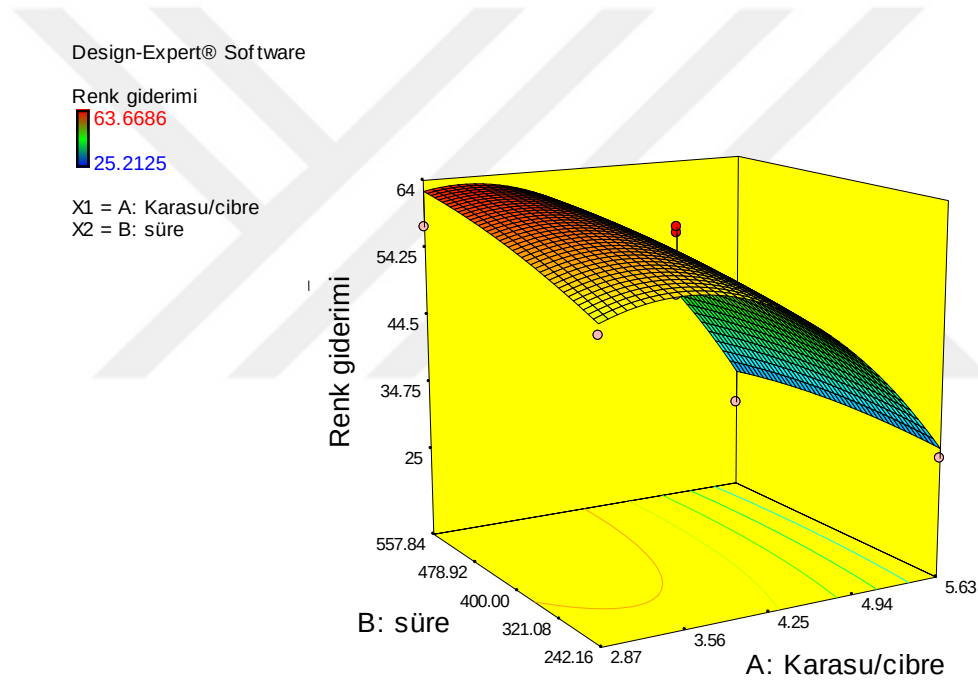
<i>Lack of fit Tests</i>						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Linear	733,76	6	122,29	8,45	0,029	
2FI	711,74	5	142,35	9,84	0,0229	
Quadratic	138,72	3	46,24	3,2	0,1456	Suggested
Cubic	109,28	1	109,28	7,55	0,0515	Aliased
PureError	57,89	4	14,47			

"*Lack of fit Tests*": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.

Kuadratik modele göre seçilen renk giderimi yüzey cevaplarının ANOVA analizine göre, ZK/cibre oranının en yüksek kareler toplamı (1366) değerine sahip olduğu ve p değerinin (0,0002) modelin p değerinden (0,0015) daha küçük olduğu görülmüştür. ZK/cibre oranının renk giderimine çalkalama süresine göre önemli bir farkla etki ettiği görülmektedir (EK-22) Modelin *Lack of fit* değerinin önemsiz olması, elde edilen yüzey cevaplarının seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir. Model Eşt (5.4)'de verilmiştir.

$$\begin{aligned}
\text{Renk giderimi (\%)} = & -32,56197398 + 41,05763094 * \frac{ZK}{cibre} \text{orani} + \\
& 0,095899081 * \text{Çalkalama süresi} - 0,010761612 * \frac{ZK}{cibre} \text{orani} * \\
& \text{Çalkalama süresi} - 5,496600477 * \frac{ZK}{cibre} \text{orani}^2 - 4,43728E - 05 * \\
& \text{Çalkalama süresi}^2
\end{aligned}
\tag{5.4}$$

Şekil 5.33’de verilen cevap yüzey grafiğinden görüldüğü gibi, renk giderimi ZK/cibre oranı parametresi seviyesi 3’ün altında doygunluğa ulaşmıştır. Çalkalama süresinde ise 200-400 dk aralığında önemli bir değişim olmamaktadır.



Şekil 5.33. Merkezi Kompozit Tasarım I deneyine ait renk giderimine ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi(dakika) etkisi cevap yüzeyi (T=30 °C, Parçalama süresi 120 sn)

Optimizasyon deneyi

ZK/cibre oranı ve çalkalama süresinin zeytin karasuyunda toplam fenol giderimi ve renk giderimine etkisini veren modeller (Eş 5.3 ve 5.4) belirlendikten sonra, optimum parametre düzeylerini bulmak için yapılan analizde ZK/cibre oranı=2.11 ml/g ve çalkalama süresi=528 dk değerlerinde TF giderimi %62.67 ve renk giderimi %55,84 olarak hesaplanmıştır. Optimizasyon sonucu bulunan ZK/cibre oranı, denenen aralığın dışındadır. Ayrıca, ZK/cibre

oranı >3 olduğu durumda karışım fazla yoğun olmakta ve çalkalama aşamasında fiziksel zorluk doğurmaktadır. ZK/cibre oranının 3'den küçük olması uygulanabilir değildir. Bu nedenle ZK/cibre oranının bulunan optimum değere en yakın ve uygulanabilen bir değer olan 3'de sabit tutulmasına karar verilmiştir. Ayrıca, çalkalama süresi için de optimum nokta olarak hesaplanan değer çok uzundur. Bu nedenle çalışmanın bir sonraki aşamasında, sadece çalkalama süresi parametre alınarak tek faktörlü merkezi kompozit tasarım yapılmış ve en yüksek toplam fenol ile renk giderimini sağlayacak süre belirlenmiştir.

5.3.1.3 Merkezi Kompozit Tasarım-II: Çalkalama süresi etkisinin optimizasyonu

Yapılan deneylerde denenen 4 parametreden 3 tanesinin seviyeleri sabitlenmiş ve tek bir parametre ile merkezi kompozit tasarım denemesi yapılmıştır. Bu tasarımda, ZK/cibre oranı=3 ml/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s değerlerinde sabitlenmiştir. Tek faktörlü tasarım için çalkalama süresi parametre seviyesi olarak ise 30-400 dk aralığı seçilmiştir. Çizelge 5.27'de incelenen parametre seviyeleri verilmiştir. EK-23'de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Çizelge 5.27. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyinde incelenen faktör seviyeleri

Faktör	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
	-1	-0,5	0	0,5	1
A: Çalkalama süresi (dk)	30	122	215	307,5	400

Deney sonucunda elde edilen cevaplar (TF giderimi ve renk giderimi) ile veri analizleri yapılmış ve bu cevaplar üzerine incelenen parametrenin etkisini gösteren modeller değerlendirilerek cevap yüzeyleri oluşturulmuştur. Deney sonuçları karasudan fenol giderimi bakımından incelendiğinde; elde edilen veriler, toplam fenol giderim cevaplarının kuadratik modele uygun olduğu görülmüştür (Çizelge 5.28). Model eşitliği Eş. (5.5) de gösterilmiştir

$$TF \text{ giderimi (\%)} = +50,84057819 + 0,100900765 * \text{çalkalama süresi} - 0,000158381 * \text{çalkalama süresi}^2 \quad (5.5)$$

Çizelge 5.28. Merkezi Kompozit Tasarım II deneyine ait toplam fenol giderimi için modellerin *Lack of fit* testi çizelgesi

<i>Lack of fit Tests</i>					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F
Linear	38,7	3	12,9	10,46	0,0885
<u>Quadratic</u>	<u>2,49</u>	<u>2</u>	<u>1,25</u>	<u>1,01</u>	<u>0,4974</u> <u>Suggested</u>
Cubic	0,087	1	0,087	0,071	0,8154
PureError	2,47	2	1,23		

Toplam fenol giderimi cevaplarının ANOVA analizine göre modelin *Lack of fit* değerinin önemsiz (*not significant*) olması, elde edilen cevap yüzeylerinin seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir (EK-24). Zaman parametresinin p değerinin (0,0003) seçilen modelin p değerinden (0,0006) daha küçük olması bu parametrenin seçilen aralıkta toplam fenol giderimi üzerine anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Şekil 5.34’da toplam fenol gideriminin zaman ile değişim grafiği yer almaktadır. Elde edilen verilere göre toplam fenol giderimi cevabı yaklaşık 300 saatte maksimum düzeye ulaşmaktadır. Elde edilen model Eş (5.6)’da verilmiştir

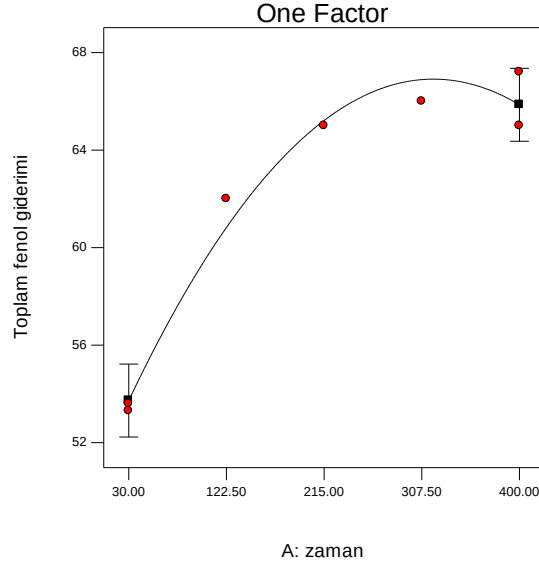
$$\text{Renk giderimi (\%)} = +46,36896906 + 0,207467063 * \text{çalkalama süresi} - 0,000771172 * \text{çakalama süresi}^2 + 9,53285 E - 07 * \text{çalkalama süresi}^3 \quad (5.6)$$

Design-Expert® Software

Toplam fenol giderimi

• Design Points

X1 = A: zaman



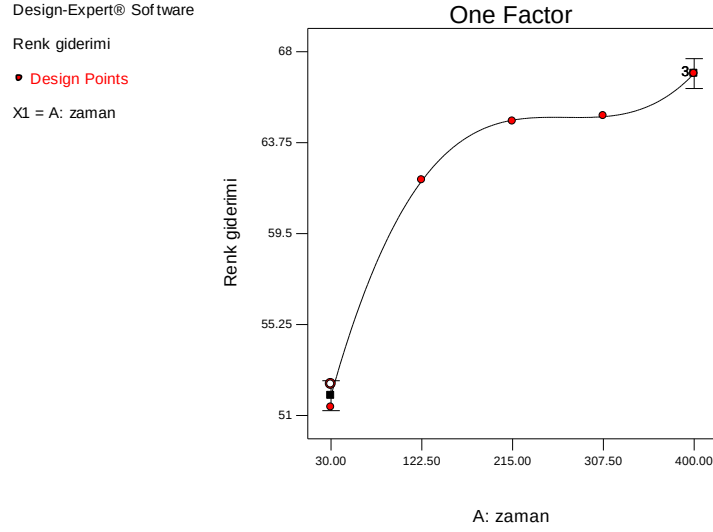
Şekil 5.34. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyine ait çalkalama süresi (dakika) ile toplam fenol gideriminin (%) değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (ZK/cibre oranı=3 ml/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s)

Veriler renk giderimi bakımından incelendiğinde; renk giderimi cevaplarının model uygunluk analizine göre, cevaplar kübik modele uygun olduğu görülmektedir (Çizelge 5.29).

Çizelge 5.29. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyine ait renk giderimi için olası modellerin *Lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi

Model SummaryStatistics					
Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	3	0,8316	0,7979	0,69	82,75
Quadratic	1,56	0,9637	0,9455	0,9125	23,35
<u>Cubic</u>	<u>0,44</u>	<u>0,9978</u>	<u>0,9956</u>	<u>0,9912</u>	<u>2,34</u>
					<u>Suggested</u>

Renk giderimi cevaplarının ANOVA analizine göre modelin *Lack of fit* değerinin önemsiz olması, elde edilen cevap yüzeylerinin seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir (EK-25). Şekil 5.35’de renk gideriminin çalkalama süresi ile değişim grafiği yer almaktadır.



Şekil 5.35. Merkezi Kompozit Tasarım II deneyine ait çalkalama süresi (dakika) ile % renk gideriminin değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (ZK/cibre oranı=3 ml/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s)

Çalkalama süresinin zeytin karasuyunda toplam fenol giderimi ve renk giderimine etkisini gösteren modeller belirlenmiştir. Elde edilen modele göre, çalkalama süresi $t = 323$ dk olduğu koşullarda % 67 toplam fenol giderimi ve % 65,05 renk giderimi öngörülmüştür (Çizelge 5.30).

Çizelge 5.30. Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyine ait toplam fenol giderimi ve renk giderimi cevaplarının optimizasyon çizelgesi

Constrains						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Çalkalama süresi	is in range	30	400	1	1	3
Toplam fenol giderimi	maximize	53,3	67,2	1	1	5
Renk giderimi	maximize	51,38	66,97	1	1	1
Solutions						
Number	Zaman (dakika)	Toplam fenol giderimi	Renk giderimi	Desirability		
1	323,38	66,9072	65,0522	0,961	Selected	

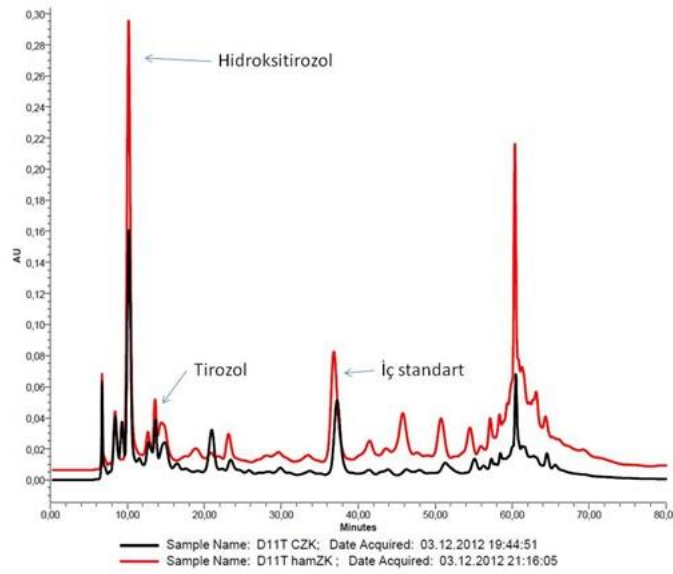
Optimize edilen modelinin tercih edirlilik değeri (desirability) 0,961 olarak bulunmuştur. Bu değerin 1'e yakın olması modelin gerçeğe yakınlığını göstermektedir. Bu nedenle, son olarak model ile hesaplanan optimum koşullarda deney yapılarak modelin gerçeğe uygunluğu

araştırılmıştır. Bu amaçla optimum koşullarda yapılan 5 paralel deneyin koşulları ve cevap değerleri Çizelge 5.31’de verilmiştir.

Çizelge 5.31. Model optimum değerlerinde gerçekleştirilen deneyler ve sonuçların model ile uyumu

Deney #	ZK/Cibre oranı (ml/g)	Çalkalama süresi (dk)	Parçalama süresi (s)	Çalkalama sıcaklığı (°C)	TF giderimi (%)	Renk giderimi (%)
1	3	323	240	30	64,08	71,64
2	3	323	240	30	64,66	72,21
3	3	323	240	30	66,65	74,39
4	3	323	240	30	62,27	73,25
5	3	323	240	30	64,41	72,07
Standart sapma					1,56	1,11
Deneysel değerlerin ortalamaları					64,41	72,71
Model değerleri					66,91	65,05
Fark					%3,87	9,74%

Optimum koşullarda yapılan deney verilerinin ortalamaları, model kullanılarak hesaplanan toplam fenol giderimi değerlerinden %3,87, renk giderimi değerlerinden ise %9,74 farklıdır. Farkın az olması elde edilen verilerde hesaplanan modelin gerçeğe uygun olduğunu göstermektedir. Belirlenen en uygun koşullarda cibre ile muamele edilen zeytin karasuyunun toplam fenol derişiminde deneysel olarak %64 azalma sağlanmıştır. Bu azalmanın zeytin karasuyunda bulunan fenolik maddelere göre dağılımını bulmak amacıyla zeytin karasuyunun cibre ile muamele edilmeden önce ve edildikten sonra HPLC analizleri yapılmıştır. Şekil 5.36’da verilen kromatograma göre ZK’da bulunan fenoller arasında bazıları kaybolmuş ve bazılarının da miktarları azalmıştır. Bu fenoller arasında antioksidan özellikte olan hidroksitirozol ve tirozolun cibre ile muamele edildikten sonra zeytin karasuyundaki miktarlarının azaldığı görülmektedir.



Şekil 5.36. Yapılan optimizasyon deneyine ait cibre ile muameleden önce ve sonra zeytin karasuyunun HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (Kırmızı kromatogram: işlem görmemiş ZK, Siyah kromatogram: işlem görmüş ZK) (ZK/cibre oranı=3 ml/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s, Çalkalama süresi 343 dakika)

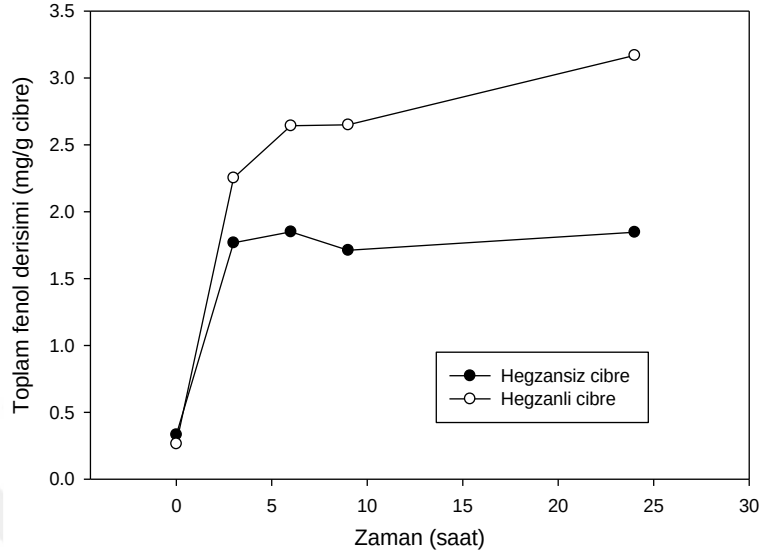
5.3.2 ZEYTİN KARASUYU İLE İŞLEM GÖRMÜŞ CİBREDEN ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU İLE FENOLLERİN GERİ KAZANILMASI

Yapılan deneylerde zeytin karasuyunun fenollerinin cibreye geçmesi için en uygun ZK/cibre oranı (3 ml/g), cibrenin parçalanma süresi (240 s), cibre ile zeytin karasuyunun birlikte çalkalanma süresi (323 dk) ve çalkalama sıcaklığı (30 °C) düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında cibreye geçen fenolik bileşiklerin cibrenin kendisinde bulunan fenoller ile birlikte çözücü ekstraksiyonu ile en uygun geri kazanım koşulları araştırılmıştır.

5.3.2.1 n-Hekzan ile yağ giderimi etkisi

Zeytin karasuyu ile işlem görmüş cibredeki fenolik maddelerin çözücü ile geri kazanımından önce cibrede bulunan ve ayrıca zeytin karasuyundan cibreye geçen yağın n-hekzan ile uzaklaştırılmasının geri kazanım üzerine etkisi incelenmiştir. ZK ile işlem görmüş ve HCl ile asitlendirilmiş (pH~1,5) cibre, 30'ar dakikalık adımlarla (2 kere 4:1 (h/a) ve bir kere 3:1 (h/a)) n-hekzan ile yıkanmıştır. Daha sonra hekzanı uzaklaştırılan cibre ile etil alkol:su (1:1) çözücü ekstraksiyonu yapılmış ve belirli zaman alınan örneklerde toplam fenol miktarı belirlenmiştir. Karşılaştırma amacıyla hekzan ile işlem görmemiş cibre örneği de aynı koşullarda etil alkol:su (1:1) ile işlem görmüştür. n-Hekzan ile işlem görmüş/görmemiş “ZK

ile işlem görmüş cibreden” etil alkol:su (1:1) çözücüsüne ekstrakte olan toplam fenol miktarının zaman ile değişimi Şekil 5.37’da verilmiştir.

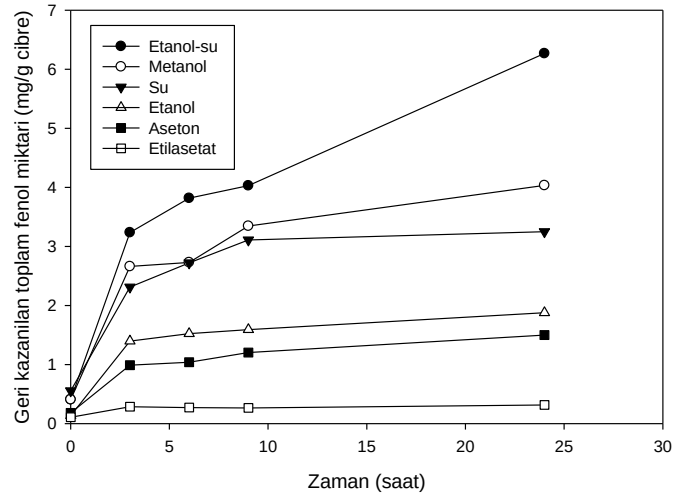


Şekil 5.37. ZK işlem görmüş cibrenin n-hekzan ile yıkanmasının etil alkol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılan ekstraksiyonda toplam fenol geri kazanımına etkisi (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 °C, N=150 rpm)

Elde edilen verilere göre, n-hekzan ile işlem görmüş cibreden 24 saat sonunda %42 daha fazla toplam fenol geri kazanılmıştır. Bu nedenle, fenol geri kazanımında kullanılacak çözücü türü etkisinin incelendiği deneylerinde n-hekzan ile yıkanmış örnekler kullanılmıştır.

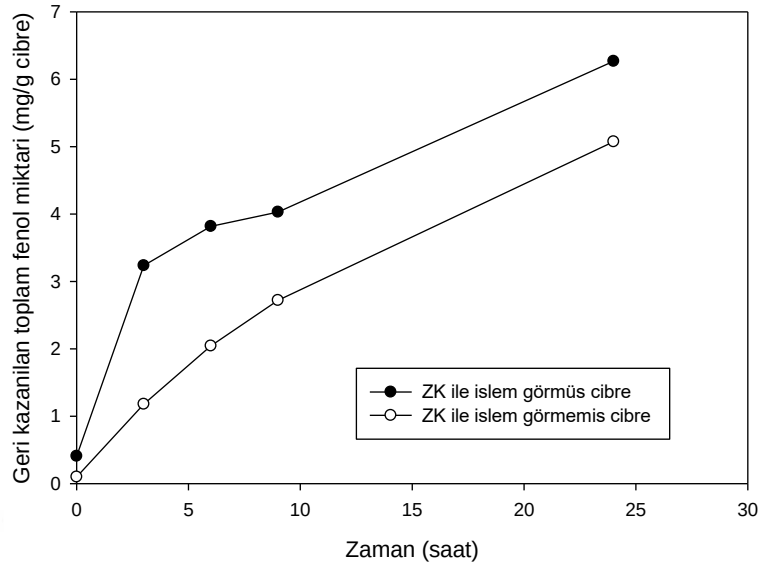
5.3.2.2 Çözücü türü etkisi

Çalışmanın bu aşamasında cibreden fenol geri kazanımı için denenmesi seçilen çözücüler; etil alkol:su (1:1), etil alkol, su, metil alkol, etil asetat ve asetonur. Organik çözücüler; suda tamamen çözünen (etil alkol (logP=-0.24), metil alkol (logP=-0.76), aseton (logP=-0.23)) ve kısmen çözünen (etil asetat, logP=0.68)) gruplardan seçilmiştir (85). Örneklerdeki toplam fenol miktarının zaman değişimi Şekil 5.38.’de verilmiştir.



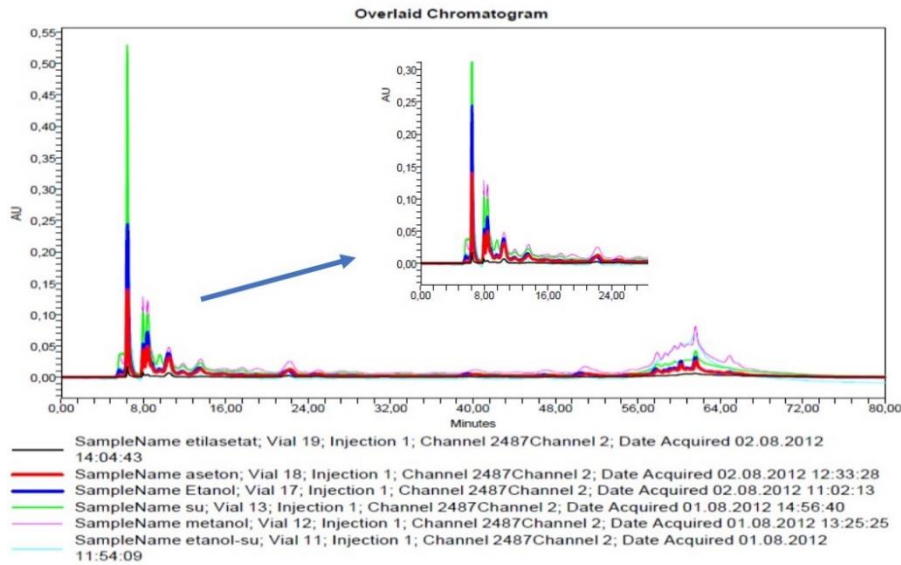
Şekil 5.38. Zeytin karasuyu ile işlem görmüş cibreden fenolik maddelerin geri kazanımı için yapılan çözücü ekstraksiyonunda çözücü türünün etkisi (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 oC, N=150 rpm)

Elde edilen verilere göre çözücülerin geri kazanımında etkinlik sırası etil alkol:su (1:1) > metil alkol > su > etil alkol > aseton > etil asetat eklindedir. En iyi çözücü etil alkol:su (1:1) ve ikinci iyi çözücü metil alkol dışında tüm ekstraksiyonlarda yaklaşık 10 st civarında dengeye gelmiştir. En uygun çözücü ile yapılan geri kazanımda “ZK ile işlem görmemiş ve görmüş cibrenin toplam fenol düzeyleri karşılaştırılmıştır (Şekil 5.39). Buna göre, “ZK ile işlem görmüş” cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarı %23 daha fazladır.



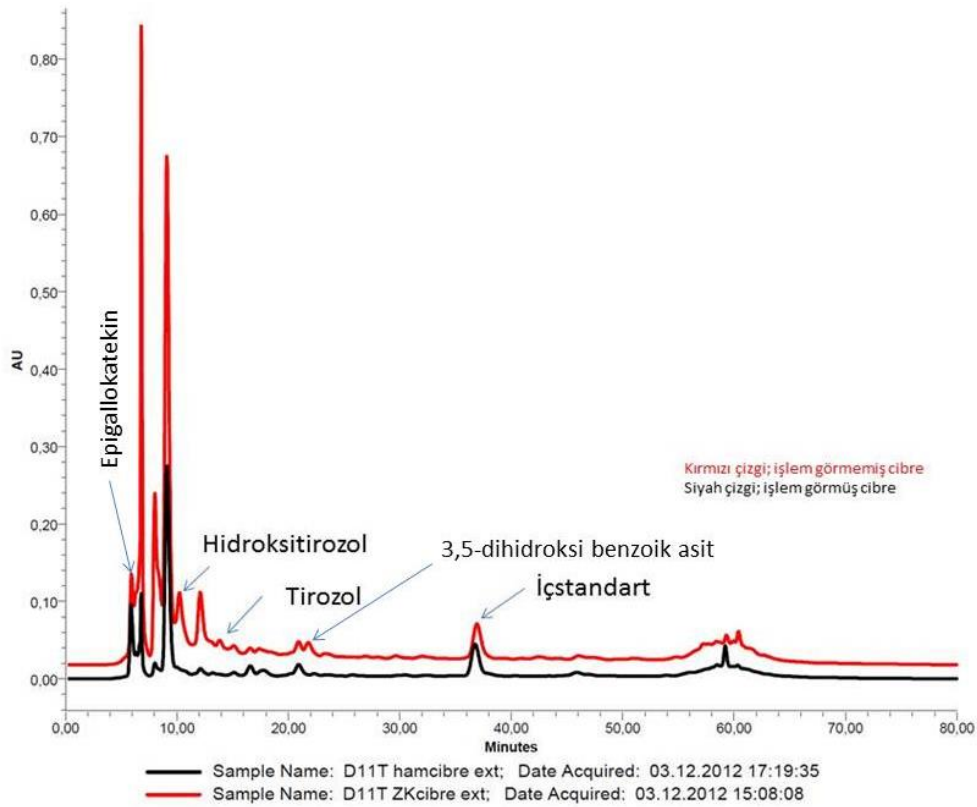
Şekil 5.39. Çözücü etkisi deneyine ait “ZK ile işlem görmüş” ve “ZK ile işlem görmemiş” cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarlarının karşılaştırılması (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a); T=30 oC, N=150 rpm)

Ekstraksiyonda kullanılan çözücü türünün geri kazanılan fenol çeşitliliğine etkisi kalitatif HPLC analizleri ile araştırılmıştır. Şekil 5.40’de tüm çözücü ekstraksiyonlarının örneklerine ait karşılaştırmalı HPLC kromatogramları yer almaktadır. Buna göre düşük ekstraksiyon özelliği gösteren etil asetat ve aseton ile geri kazanılan fenolik madde çeşitliliği de daha azdır.



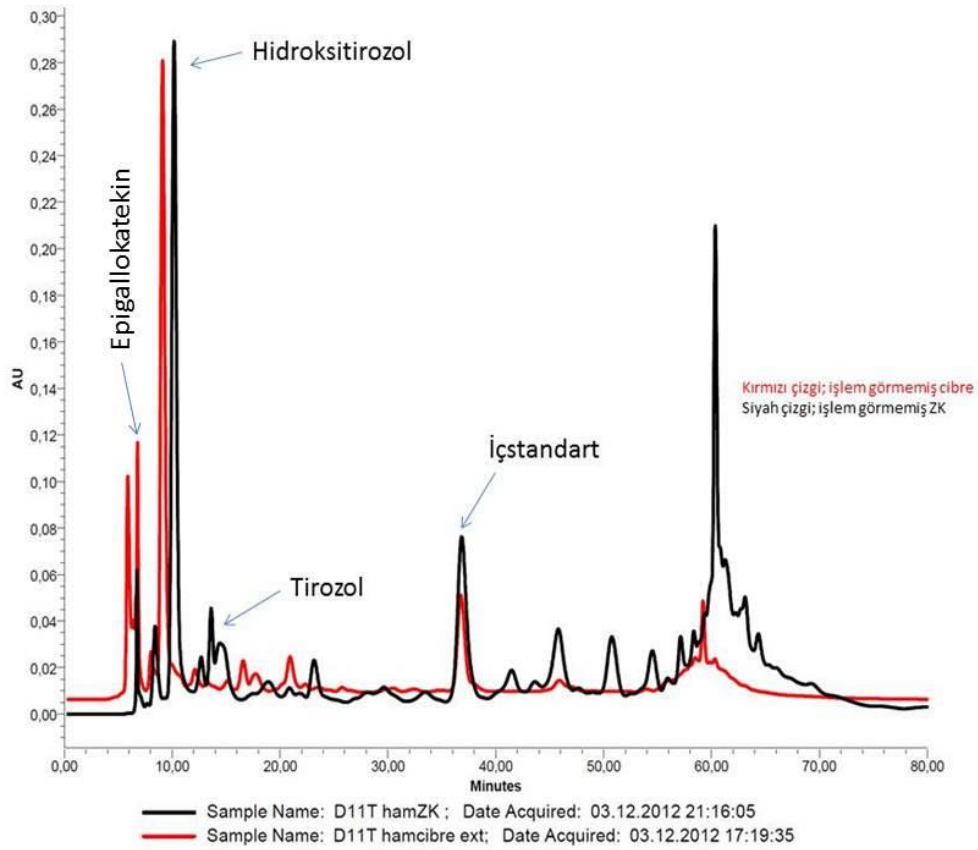
Şekil 5.40. Çözücü ekstraksiyonu ile “ZK ile işlem görmüş cibreden” geri kazanılan fenolik madde çeşitliliğinin çözücü türü ile değişimini gösteren karşılaştırmalı HPLC kromatogramları (t= 24 saat)

EK-26’da her bir çözücü ile geri kazanılan fenolik maddelerin zeytin karasuyunda ve cibrede bulunan fenolik maddeler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramları ayrı ayrı verilmiştir. “ZK ile işlem görmüş cibre” ve “ZK ile işlem görmemiş cibre” örneklerinin etil alkol:su (1:1) ekstraktlarının HPLC kromatogramları karşılaştırıldığında cibre zeytin karasuyu ile muamele edildikten sonra geri kazanılan fenolik madde sayısının beklenildiği gibi daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 5.41). Özellikle zeytin karasuyunun önemli fenolikleri hidroksitirozol ve tirozolün geçişi görülmektedir.



Şekil 5.41. “ZK ile işlem görmüş ve görmemiş cibre”den etil alkol:su (1.1) çözücüsü ile geri kazanılan fenolik maddelerin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları (t=24 saat)

Şekil 5.42’de zeytin karasuyunda bulunan ve cibreden etil alkol:su (1:1) ile geri kazanılan fenolik maddelerin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları verilmiştir. Bu kromatogramlar, zeytin karasuyu ve cibredeki fenolik madde dağılımının önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir. Zeytin karasuyunun önemli fenolik maddeleri hidroksitirozol ve tirozol cibrede bulunmamaktadır.



Şekil 5.42. Zeytin karasuyunun ve etil alkol:su (1:1) ile ekstrakte edilmiş cibrenin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları

Denenen farklı çözücü türleri toplam fenol geri kazanımı ve toplam antioksidan aktivitesi bakımından karşılaştırıldığı zaman toplam antioksidan aktivitelerinin toplam fenol düzeyleriyle doğrudan ilişkili olmadığı görülmüştür. Çözücülerin DPPH aktivitelerinin korunmasındaki etkinlik sırası su > etil alkol:su (1:1) > metil alkol > etil alkol > aseton > etil asetat eklindedir. En yüksek toplam fenol kazanımı ise etil alkol:su (1:1) ortamında gerçekleşmiştir (Çizelge 5.32)

Çizelge 5.32. Farklı çözücüler ile yapılan ekstraksiyonların örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri (t=24 saat)

Çözücü	TA aktivitesi (% inhibisyon)	Geri kazanılan TF miktarı (mg/g cibre)
Su	89	3,25
Etil alkol:su	85	6,7
Metil alkol	83	4,03
Etil alkol	78	1,88
Aseton	71	1,50
Etil asetat	12	0.31

Çizelge 5.33’de zeytin karasuyu ile işlem görmüş ve işlem görmemiş cibreden etil alkol:su (1:1) ile yapılan ekstraksiyonların t=24 st örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri verilmiştir. Her iki örneğin de toplam fenol derişimi aynı olmasına karşın, ZK ile işlem görmüş cibrenin toplam antioksidan aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu zeytin karasuyundan cibreye geçen fenolik bileşiklerin cibredekiilerden daha yüksek antioksidan aktivitesine sahip olduklarını göstermektedir

Çizelge 5.33. ZK ile işlem görmüş cibre ve ZK ile işlem görmemiş cibreden etil alkol:su (1:1) ile yapılan ekstraksiyonların geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri (t=24)

Örnek	TA aktivitesi (% inhibisyon)	Geri kazanılan TF miktarı (mg/g cibre)
ZK ile işlem görmüş cibre	85	6,27
ZK ile işlem görmemiş cibre	86	5,07

5.3.2.3 Merkezi Kompozit Tasarımı III: Çözücü ekstraksiyonu koşullarının optimizasyonu

Zeytin karasuyu ile işlem görmüş cibreden fenolik maddelerin en fazla geri kazanıldığı etil alkol:su (1:1) ile yapılacak çözücü ekstraksiyonunda en uygun sıcaklık ve çözücü/cibre oranı araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda geri kazanım işlemi süresi 5 saat olarak sabitlenmiştir. Çizelge 5.34’de incelenen parametreler (faktörler) ve seviyeleri yer almaktadır. EK-27’de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Çizelge 5.34 Merkezi Kompozit Tasarımı III deneyine ait incelenen faktörler ve seviyeleri

Faktör	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
	-1,27	-1	0	1	1,27
A: Çözücü/cibre oranı (ml/g)	10,53	14	27	40	43,47
B: Sıcaklık (°C)	10,99	15	30	45	49

Deneyden elde edilen cevaplar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve incelenen faktörlerin cevaplara etki düzeyleri bulunmuştur. Elde edilen veriler fenol geri kazanımı bakımından incelendiğinde geri kazanılan toplam fenol miktarı cevaplarının *Lack of fit* testine göre, cevapların kuadratik modele uygun bulunmuştur (Çizelge 5.35)

Çizelge 5.35. Merkezi Kompozit Tasarım III deneyine ait geri kazanılan toplam fenol miktarı için olası modellerin *Lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk çizelgesi

<i>Lack of fit Tests</i>					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Linear	9,88084	6	1,64681	5,27325	0,0647
2FI	8,842	5	1,7684	5,66261	0,0589
Quadratic	1,40641	3	0,4688	1,50116	0,3426 Suggested
Cubic	0,98361	1	0,98361	3,14962	0,1506 Aliased
Pure Error	1,24918	4	0,3123		

Yüzey cevabı kuadratik modelin ANOVA analizine göre ise *Lack of fit* değeri önemsiz bulunmuştur. Bu, elde edilen yüzey cevaplarının seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir. Model denklemi Eş (5.7) ile verilmiştir. ANOVA analizine göre kareler toplamı değeri (26) en yüksek olan parametre sıcaklıktır. Ayrıca sıcaklık parametresinin p değeri (0.0001) seçilen modelin p değerinden (0.0004) daha küçüktür. Sıcaklık parametresi çözücü/cibre oranı parametresinden toplam fenol giderimi bakımından daha önemli etkiye sahiptir (EK-28).

$$\begin{aligned}
 \text{Geri kazanılan TF miktarı} = & -3,50027 + 0,508926 * \frac{\text{çözücü}}{\text{cibre}} \text{oranı} + 0,312881 * \\
 & \text{sıcaklık} - 0,00261 * \frac{\text{çözücü}}{\text{cibre}} \text{oranı} * \text{sıcaklık} - 0,00663 * \frac{\text{çözücü}}{\text{cibre}} \text{oranı}^2 - \\
 & 0,00191 * \text{sıcaklık}^2
 \end{aligned} \tag{5.7}$$

Şekil 5.43.'de verilen cevap yüzey grafiğinden görüldüğü gibi çözücü/cibre oranı ve sıcaklık parametrelerinde, toplam fenol değerleri için doygunluğa ulaşılmıştır.

Design-Expert® Software

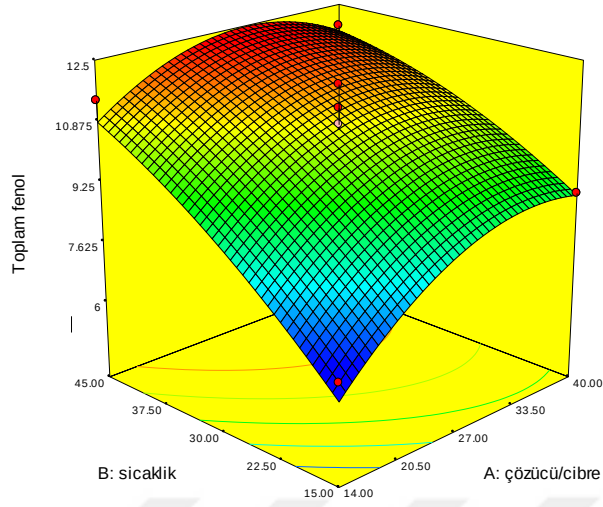
Toplam fenol

12.2308

6.51282

X1 = A: çözücü/cibre

X2 = B: sıcaklık



Şekil 5.43. Merkezi Kompozit Tasarım III deneyine ait geri kazanılan toplam fenol miktarına çözücü/cibre oranı ile sıcaklık etkisi (T= 5 saat)

Çözücü/cibre oranı ile sıcaklığın cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarına etkisini veren model (Eş (5.7)) ile optimum çözücü/cibre oranı ile sıcaklık değerlerini hesaplanmıştır. Elde edilen modele göre çözücü/cibre oranının 30 ml/g ve sıcaklığın 43 °C olduğu koşullarda geri kazanılan toplam fenol miktarı en yüksek ve 12,34 mg/g olacaktır (Çizelge 5.36)

Çizelge 5.36. Optimizasyon Çizelgesi (Merkezi Kompozit Tasarımı III)

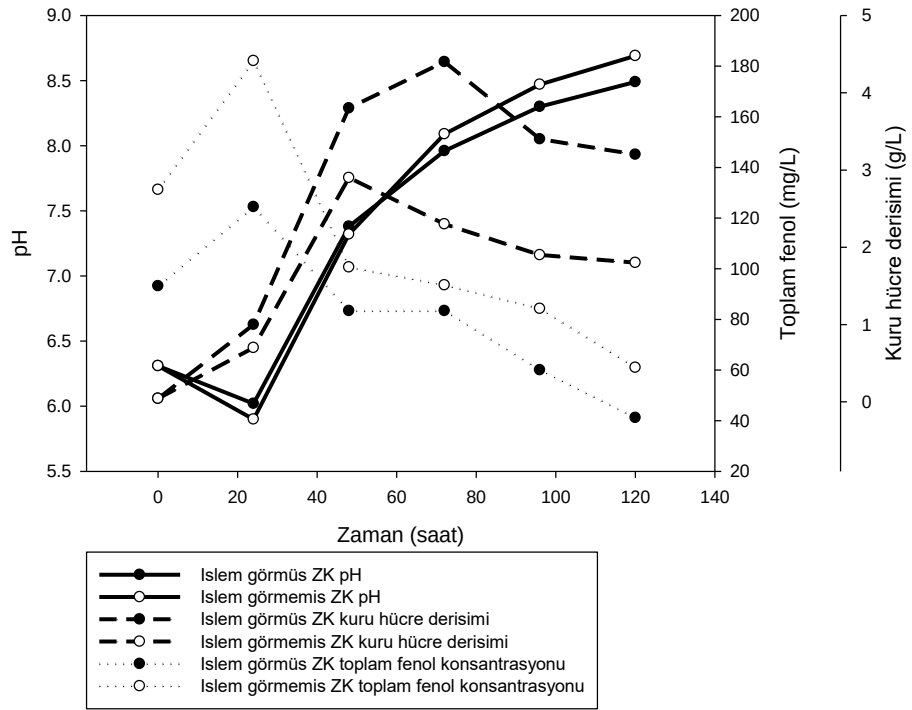
Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
çözücü/cibre	is target = 30.00	14	40	1	1	3
sıcaklık (°C)	is target = 43.00	15	45	1	1	3
Toplam fenol	maximize	6,51	12,23	1	1	5
Solutions						
Number	çözücü/cibre	sıcaklık (°C)	Toplam fenol	Desirability		
1	30	43	12,3422	0,99999	Selected	

Optimize edilen modelinin tercih edirlilik değeri (desirability) 0,99 olarak bulunmuştur. Bu değerin 1'e yakın olması modelin gerçeğe yakınlığını göstermektedir. Bu nedenle, son olarak modelden hesaplanan optimum koşullarda deney yapılarak modelin gerçeğe uygunluğu araştırılmıştır.

Eşt (5.7) ile verilen modelin gerçeğe uygunluğunun araştırılması için optimum koşullarda yapılan iki paralel deneyde (çözücü/cibre oranı=30 ml/g; T=43 °C) cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarı ortalaması 11,97 mg/g olarak bulunmuştur. Bu model kullanılarak hesaplanan toplam fenol miktarından (12,34 mg/g) %2,98 farklıdır. Farkın az olması -model sonuçları ile deneysel verilerin yakınlığı- ZK ile işlem görmüş cibreden etil alkol:su (1.1) ekstraksiyonu ile toplam fenol geri kazanımı için yapılan tasarımın iyi ve sonuçların uygulanabilir olduğunu göstermektedir. En uygun koşullarda geri kazanılan fenolik madde karışımının özellikleri incelendiği zaman ise toplam antioksidan aktivitesinin %81 (inh.) olduğu; bu karışıma zeytin karasuyundan geçen antioksidan özellikteki iki önemli fenolik madde tirozol ve hidroksitirozolün miktarlarının ise sırasıyla 0,038 ve 0,17 mg/g cibre olduğu belirlenmiştir.

5.3.3 OPTİMUM KOŞULLARDA CİBRE İLE İŞLEM GÖRMÜŞ ZK ORTAMINDA RHODOTORULA GLUTINIS ÇOĞALMASI

Cibre işleminin ZK'nın *R. glutinis* ile arıtımı ve mayanın bu ortamda çoğalması üzerine etkisini incelemek için yapılan karşılaştırmalı deneyde işlem görmüş ve görmemiş ZK ile hazırlanan ortamlar *R. glutinis* ile inokule edilmiştir. Yapılan deneyde işlem görmüş ZK da *R. glutinis*'in daha fazla çoğaldığı görülmüştür. ZK ortamında toplam fenol %55 azalarak 41 g/L ye ve işlem görmemiş ZK ortamında toplam fenol %53 azalarak 61 g/L ye düşmüştür. Cibre ile işlem görmüş ZK ortamında –başlangıç toplam fenol derişimi daha az olmasına karşın- çoğalan mikroorganizma miktarı daha fazladır. Cibre ile işlem görmemiş ZK ile en fazla 2,9 g/L hücre derişimine çıkılırken, cibre ile işlem görmüş ZK'da 4,4 g/L'dir. Bu, zeytin karasuyundaki bazı fenolik maddelerin cibreye geçmesi ile hücre üzerine olan inhibisyon etkinin azaldığını ve hücrelerin daha çok çoğalabildiğini göstermektedir. Buna karşın, her iki ortamda çoğalan hücreler zeytin karasuyunu arıtımında benzer etkinliği göstermişlerdir (Şekil 5.44).



Şekil 5.44. Cibre ile işlem görmüş-görmemiş ZK ortamlarında *R. glutinis* çoğalmasına ait pH, toplam fenol ve kuru hücre değişimi grafiği (%25 ZK, T=30 °C, N=150 rpm)

6 TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirilen doktora çalışmasında ileri sürülen tez, zeytinyağı fabrikası sıvı atığının biyoteknolojik yöntemler kullanılarak arıtımı yapılırken katma değer de yaratılabileceğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, zeytin karasuyunun ekonomik değeri olan mikrobiyal ürünler için ortam olarak kullanılırken atık özelliklerinin de iyileştirilebileceğini ortaya koymuştur. Önerilen biyoteknolojik proses, ters ozmoz, kimyasal çöktürme, buharlaştırma gibi konvansiyonel yöntemlere göre arıtma kapasitesi bakımından güçlü argümanlar ileri sürmemekte ve maliyet ve arıtma sonrası açığa çıkan diğer atıklar bakımından da çok iddali görünmemektedir. Ancak, yapılan çalışmada önerilen süreçler teknik verilerden önce, karbon ve su ayak izi, biyoekonomi ve sürdürülebilirlik kavramları açısından değerlendirilmelidir. Arıtım süreçleri bu kavramlar açısından değerlendirildiği zaman, önerilen süreç analoğu olarak kimyasal ve membran arıtma sistemleri ile karşılaştırılabilir. Kimyasal çöktürme işlemleri mevcut sıvı kütlesinin arıtımını sağlasa bile çökme sonrası elde edilen çamurun bertarafı da en az sıvı atığın kendisi kadar maliyetlidir; çevresel kirleticisi yükü yüksektir. Membran arıtma sistemlerinde ise, kullanılan ileri teknoloji ürünü olan membranların rejenerasyonları için tekrar kimyasal işlemlere gerek duyulmaktadır. Ayrıca membranların üretim süreçleri karbon ve su ayak izi bakımından sürdürülebilir değildir.

Önerilen biyoteknolojik süreçte yan ürün olarak açığa çıkan maya (*R. glutinis*) kütlesi, ekonomik olarak değerli bir üründür. Zeytin karasuyu ortamında *R. glutinis*'in üretim süreci, elde edilen ürünler bakımından tarımsal faaliyetlerin alternatifi olarak görülebilir. Mayanın karasu ortamında yağ asiti profili bakımından zeytinyağına benzer nitelikler taşıyan lipit ürettiği gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen lipit kütlesi toplam antioksidanlar bakımından da zeytinyağına göre çok daha zengindir. Mayanın aynı zamanda değerli karotenoid bileşikler ürettiği de belirlenmiştir. İnsan beslenmesi bakımından değerli olan bileşiklerin üretimi için yapılan tarımsal uygulamalar, ışık, alan ve su gereksinimi bakımından daha isteklidir. Önerilen süreçte ise, ışık ve ilave su katkısı kullanmadan bu ürünlerin üretiminin daha az yer gereksinimi olan kapalı fermentörlerde yapılabileceği gösterilmiştir. Önerilen süreçte elde edilen ürünler sadece gıda değil kozmetik ürün ve yakıt üretimi bakımından da değerli hammaddelerdir.

Günümüz dünyasında iklim değişikliği ve kuraklık etkileri dünya ekonomisini etkilemeye başlamaktadır. Gelecekte ise bu neden ile tarımsal uygulamalar daha da güçleşebilir. Tezde önerilen üretim süreci, sadece yeryüzü için geçerli koşullara bağımlı değildir. Önümüzdeki

yıllarda uzun süreli insanlı uzay seyahatleri ve dünya dışı karasal alanlara insan kolonilerin yerleştirilmesi planlanmaktadır. Dünya dışı ortamlarda da tarımsal uygulamalar enerji ve alan gereksinimi bakımından çok yüksek maliyetli olacaktır. Bu nedenle mikrobiyal süreçlerle yapılacak üretimler tarımsal uygulamaların yerini alacaktır.

Bu çalışmada, zeytin karasuyunun Akdeniz ülkelerinin bir diğer tarımsal yan ürünü olan üzüm cibresi de aynı proses içerisinde değerlendirilmiştir. Biyoproses ve zeytin karasuyu fenollerinin cibre ile birlikte geri kazanımı çalışmalarının bütünselliğinin ifade edilmesi amacıyla elde edilen veriler ile oluşturulan süreç akış şeması EK-29'da verilmiştir.

Doktora tez çalışmasının Bölüm 5.1 ve 5.2'de elde edilen verilere göre *R. glutinis*'in birçok mikroorganizma ve bitki için toksik nitelik taşıyan zeytin karasuyu ortamına kademeli olarak adapte olduğu görülmüştür. ZK ortamına üre katkısı *R. glutinis*'in ortamda çoğalmasını kolaylaştırmaktadır. *R. glutinis*'in ZK ortamında çoğalması ortamın pH artışıyla doğrudan ilişkilidir; ayrıca *R. glutinis* ZK'yı tek karbon kaynağı olarak kullanabilmekte ve ortamda çoğalabilmektedir. *R. glutinis* ile ZK ortamında mikrobiyal lipit, fenolik antioksidanlar ve karotenoid üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda *R. glutinis* ile kuru hücre ağırlığının %25'ine kadar lipit üretimi gerçekleştirilmiştir.

R. glutinis ZK ortamında çoğalması sırasında ZK'nın atık özellikleri bakımından da iyileştirilmesini sağlamaktadır. Yapılan lipit üretimlerinde, çoğalma ortamında ZK varlığının *R. glutinis*'in ürettiği yağ asitlerinin doymamışlık düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Kesikli ve sürekli işletim denemelerinde *R. glutinis* ile ZK ortamında üretilen biyokütle, toplam lipit, yağ asiti profili, karotenoid düzeyi gibi parametrelerin kalitatif ve kantitatif özellikleri ortam sıcaklığı ve pH düzeyine bağlı olarak istenilen şekilde değiştirilebilmektedir. ZK ortamından gelen tirozol, oleuropein ve hidroksitirozol gibi fenoller UYM ortamında ayrı ayrı eklendikleri zaman *R. glutinis* ile üretilen yağ asiti profili değişmemektedir. ZK ortamında *R. glutinis* çoğalmasının erken fazlarında biyofenol ortamda fenol düzeyinin arttığı görülmüştür. Böylece süreç fenollerin karbon kaynağı olarak kullanımı ile biyokütle ve mikrobiyal ürünlerin üretiminin yanında biyofenol üretimi içinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur. ZK ortamında yapılan analizler ile mayanın ortamda öncelikle indirgen şekerleri metabolize ettiği görülmüştür. Çoğalmanın bu fazında ZK ortamında toplam fenol düzeylerinin artması ile birlikte hidroksitirozol ve tirozol gibi oleuropein türevi olan biofenollerin de düzeylerinin arttığı görülmüştür. Bu bulgu *R.*

glutinis'in ZK ortamında fenol metabolizmasıyla ilişkili olan hücre dışı enzimler salgıladığının göstergesidir.

Bölüm 5.3'de zeytin karasuyunun içerdiği biyofenollerin doğal bile absorban olan kuru üzüm cibresine aktarılması ve daha sonra üzüm cibresinin fenollarıyla birlikte çözgen ekstraksiyonu ile geri kazanılması incelenmiştir. Elde edilen bulgular optimum koşullarda cibrenin ZK da bulunan fenollerin %64'ünü absorbe ettiği anlaşılmıştır. Bununla birlikte cibre ile işlem görmüş ZK ortamında yapılan *R. glutinis* çoğalma deneylerinde mayanın daha çok biyokütle ürettiği anlaşılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı deneyde işlem görmüş ZK ortamında üretilen biyokütle miktarı işlem görmemiş ortamdakine göre %50 daha fazladır. Ayrıca Bölüm 5.1.4.1'de cibre ile işlem görmüş ortamda çoğalan mayanın ürettiği lipidlerin çoklu doymamış yağ asiti bakımından daha zengin olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki üzüm cibresi *R. glutinis* çoğalmasında ortam olarak kullanımından önce ZK fenollerinin geri kazanımı için iyi bir absorban maddedir ve buna ek olarak ZK'yı *R. glutinis* çoğalma ortamı özellikleri bakımından da iyileştirmektedir. Cibre ile işlemin ardından yapılan *R. glutinis* çoğalma süreci de ZK'nın biyolojik olarak arıtılabilirliğini artırmaktadır. Arıtım düzeyleri bakımından değerlendirildiğinde işlem görmüş ZK'nın *R. glutinis* çoğalması sonrasında toplam fenol düzeyleri 40 mg/L ye düşerken işlem görmemiş ZK ortamında toplam fenol düzeyi biyoarıtım sonrasında 60 mg/L'de kalmaktadır.

Sonuç olarak; bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler bir zeytinyağı üretim prosesi atığı olan zeytin karasuyunun önerilen biyoteknolojik süreçlerde atık özellikleri iyileştirilirken ekonomik bakımdan değeri olan biyokütle (*R. glutinis*), lipid (doymamışlık düzeyi yüksek), antioksidanlar (hidroksitirozol, tirozol, apigenin, luteolin, katekin) ve karotenoid bileşiklerin üretilebileceğini göstermiştir. Çalışmada ZK üreticiye yük olan ve bertarafı maliyetli bir yan ürün olduğu için endüstriyel mikrobiyolojide kullanılan sentetik ortam bileşenlerinin yerini alabileceği ortaya konulmuştur. Yaklaşık bir hesaplama ile laboratuvar ortamında UYM bileşenleri kullanılarak hazırlanan sentetik ortamın maliyeti 0,46 Avro/g mayadır. Buna karşın zeytin karasuyu ekonomik değeri olmayan bir çoğalma ortamıdır. Ek olarak, zeytin karasuyu ortamında mayanın UYM ortamına göre koşullara bağlı olarak 3-4 kat daha fazla biyokütle ürettiği görülmüştür. Sonuç olarak, önerilen prosesin işletiminin ekonomik bakımdan uygulanabilir olduğu söylenilebilir.

Yapılan tez çalışması dünyadaki zeytinyağı üretiminden açığa çıkan zeytin karasuyu kütesine ve ilişkili olarak işletmelerin "ZK sorununa" çözüm önermemektedir. Elde edilen

verilerin ışığında kurulacak olan sistem, ZK'yı katma değeri olan mikrobiyal ürünlerin üretiminde ortam olarak kullanacak biyoteknolojik süreçlerin geliştirilmesi için kullanacaktır. Doktora çalışmasının son döneminde, bu tür sistemlerin geliştirilmesi için yapılacak olan pilot ölçekli çalışmalar için çok uluslu bir Avrupa Birliği projesi hazırlanmış ve Era-Net CoBiotech çağrısına sunulan RHODOLIVE isimli proje başvurusunun desteklenmesine karar verilmiştir (86). RHODOLIVE, zeytin işleme fabrikası yan ürünü olan karasuyun biyoproses, yeşil ayırma/saflaştırma işlemleri teknolojileri, sistem biyolojisi, biyoinformatik ve gıda mühendisliği teknik ve disiplinlerini birleştirerek yüksek katma değerli ürünlerin üretimini amaçlayan 6 ayrı ülkeden (Türkiye, Letonya, Slovenya, İspanya, İtalya, Almanya) 7 araştırma grubunun dahil olduğu bir konsorsiyumdur. Türkiye'nin konsorsiyum liderliğini yapacağı proje 36 ay süre ve 2 milyon Avro bütçe ile Avrupa Birliği ERA-COBIOTECH programı desteğini almaya hak kazanmıştır.

RHODOLIVE proje iş planı dahilinde sadece bilimsel araştırmaya yönelik faaliyetler değil, bilim insanları, üreticiler ve tüketicilere yönelik toplantılar, reklam filmleri, sosyal medya hesapları ve internet sitesi aktivitelerini içeren iletişim ve yaygınlaştırma iş paketi, bütün sürecin “beşikten mezara” karbon çevrimi ve sürdürülebilirlik kavramı bakımından matematiksel olarak ifadesini ve modellenebilmesini sağlayan “yaşam döngüsü analizi” iş paketi ve üretilen paylaşılabılır verinin yaygınlaştırılabilmesini dolayısı ile bilimsel çalışmanın şeffaflığını sağlayan “veri yönetim planı” iş paketleri de mevcuttur. Proje sonucunda 30 L pilot ölçekli sistemde zeytin karasuyu ortamında;

1. *R. glutinis* ile üretilen mikrobiyal ürünlerin tanımlaması yapılmış,
2. Üretilen ürünlerin çevreci sistemlerle ayırma ve saflaştırılma teknikleri geliştirilmiş,
3. Mikrobiyal kaynaklı gıda ürünleri geliştirilmiş ve bu gıda ürünlerinin toplumsal kabul edilebilirlik analizleri tamamlanmış,
4. *R. glutinis*'in ZK ortamında çoğalması esnasında (orijinal *R. glutinis* suşuna göre) gerçekleşen biyokimyasal farklılıklar ortaya konulmuş,
5. *R. glutinis* ile ZK ortamında üretilen hedef ürünlerin (lipit, biyofenoller, karotenoidler) metabolizmasında rol oynayan enzimlerin ve genlerin tanımlaması yapılmış
6. *R. glutinis*'in ZK ortamında hedef ürünlerin üretimi bakımından daha verimli çalışacak şekilde genetiği değiştirilmiş suşunun geliştirilmiş ve bu suş ile laboratuvar ölçekli üretim deneyleri yapılmış, ve

7. *R. glutinis* ile fermente edilmiş ZK'nın filamentli fungus ve alg türleriyle yeniden kullanım potansiyeli ve ileri biyoarıtım koşullarının araştırılmış

olunması hedeflenmektedir.

Doktora tez çalışmasının en önemli çıktısı olan pilot ölçekli RHODOLIVE projesinin başarıyla tamamlanmasına ardından, endüstriye ölçekte çalışacak entegre bir üretim sisteminin kurulması ile çalışmaların sürdürülmesi planlanmaktadır.



7 KAYNAKLAR

1. Israel Olive Bond. <http://israelolivebond.com/the-olive-tree/symbolism-of-the-olive-tree/>. Accessed October 10, 2017.
2. christian answers. <http://www.christiananswers.net/dictionary/olive-tree.html>. Accessed October 10, 2017.
3. kuran.gen.tr. https://www.kuran.gen.tr/?x=s_main&y=s_middle&kid=1&sid=24. Accessed October 10, 2017.
4. Nita V, Benini L, Ciupagea C, Kavalov B, Pelletier N. *Bio-Economy and Sustainability: A Potential Contribution to the Bio-Economy Observatory*.; 2013. doi:10.2788/78614
5. Serrano A, Feroso FG, Rodríguez-Gutierrez G, Fernandez-Bolaños J, Borja R. Biomethanization of olive mill solid waste after phenols recovery through low-temperature thermal pre-treatment. *Waste Manag.* 2017;148:314-323. doi:10.1016/j.wasman.2016.12.033
6. Karakaya A, Laleli Y, Takaç S. Development of process conditions for biodegradation of raw olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2012;75:75-82.
7. El-Abbassi A, Kiai H, Hafidi A. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chem.* 2012;132(1):406-412.
8. Water Footprint Network. <http://waterfootprint.org/en/resources/interactive-tools/product-gallery/>. Published 2017. Accessed May 24, 2017.
9. Sajna KV, Gottumukkala LD, Sukumaran RK. *White Biotechnology in Cosmetics*. Elsevier B.V.; 2015. doi:10.1016/B978-0-444-63453-5.00020-3
10. Angel Yeast Cosmetic Ingredients. https://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwix2NXq9IrUAhVpDcAKHYESC-0QFfgguMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.in-cosmetics.com%2F__novadocuments%2F47033%3Fv%3D635291732214500000&

usg=AFQjCNEoJq_u0tlKYQZFh4wSUEMswMCaQQ&. Accessed May 25, 2017.

11. Yeast Extracts. <https://www.lorealparisusa.com/ingredient-library/yeast-extracts.aspx>. Accessed May 25, 2017.
12. Pesce VM, Nally MC, Carrizo GP, et al. Antifungal activity of native yeasts from different microenvironments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. *Biol Control*. 2016. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.03.005
13. Arroyo-López FN, Querol a, Bautista-Gallego J, Garrido-Fernández a. Role of yeasts in table olive production. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):189-196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.018
14. Ge L, Zhang H, Chen K, Ma L, Xu Z. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved. *Food Chem*. 2010;120(2):490-495. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.042
15. Federici F, Fava F, Kalogerakis N, Mantzavinos D. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *J Chem Technol Biotechnol*. 2009;84(6):895-900.
16. Mateo JJ, Maicas S. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Res Int*. 2015;73:13-25. doi:10.1016/j.foodres.2015.03.007
17. McNamara C, Anastasiou C, Oflaherty V, Mitchell R. Bioremediation of olive mill wastewater. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2007;61:127-134. doi:10.1016/j.ibiod.2007.11.003
18. Morillo J a, Antizar-Ladislao B, Monteoliva-Sánchez M, Ramos-Cormenzana a, Russell NJ. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;82(1):25-39. doi:10.1007/s00253-008-1801-y
19. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Majo D Di. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. 2017;(May):98-112. doi:10.1079/NRR200495
20. Bianco A, Uccella N. Biophenolic components of olives. *Food Res Int*.

2000;33(6):475-485.

21. Takaç S, Karakaya A. Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater. *Recent Patents Chem Eng.* 2009;2:230-237.
22. Gonçalves C, Lopes M, Ferreira JP, Belo I. Bioresource Technology Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresour Technol.* 2009;100(15):3759-3763. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.004
23. Gonçalves, Cristiana, Lopes, Marlene, Aguedo, Mario, Belo I. Olive mill wastewater valorization : Use by non-conventional yeasts.
24. Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(4):1219-1227. doi:10.1007/s00253-011-3200-z
25. Dai, Tao J, Xie F, Dai Y, Zhao M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African J Biotechnol.* 2010;6(18):2130-2134.
26. Cheirsilp B, Suwannarat W, Niyomdecha R. Mixed culture of Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* and Microalga *Chlorella vulgaris* for Lipids Production from Industrial Wastes and Its Use as Biodiesel Feedstock. *N Biotechnol.* 2011;0(0):1-7. doi:10.1016/j.nbt.2011.01.004
27. Xue F, Miao J, Zhang X, Luo H, Tan T. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour Technol.* 2008;99(13):5923-5927. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.046
28. Lian J, Garcia-Perez M, Chen S. Fermentation of levoglucosan with oleaginous yeasts for lipid production. *Bioresour Technol.* 2013;133:183-189. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.031
29. Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem.* 2011;46(1):210-218. doi:10.1016/j.procbio.2010.08.009

30. Schneider T, Graeff-Hönniger S, French WT, et al. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*. January 2013. doi:10.1016/j.energy.2012.12.026
31. Yen H-W, Zhang Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *J Biosci Bioeng*. 2011;112(1):71-74. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.03.013
32. Taskin M, Ortucu S, Aydogan MN, Arslan NP. Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renew Energy*. 2016;99:198-204. doi:10.1016/j.renene.2016.06.060
33. Kot AM, Błażej S, Kurcz A, et al. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. *Electron J Biotechnol*. 2017;27:25-31. doi:10.1016/j.ejbt.2017.01.007
34. Lorenz E, Runge D, Marb??-Ard??bol AM, Schmach M, Stahl U, Senz M. Systematic development of a two-stage fed-batch process for lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis*. *J Biotechnol*. 2017;246:4-15. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.02.010
35. Sargeant L a, Chuck CJ, Donnelly J, Bannister CD, Scott RJ. Optimizing the lipid profile, to produce either a palm oil or biodiesel substitute, by manipulation of the culture conditions for *Rhodotorula glutinis*. *Biofuels*. 2014;5(1):33-43. doi:10.4155/bfs.13.64
36. Zhang Z, Ji H, Gong G, Zhang X, Tan T. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. *Bioresour Technol*. 2014;164:93-99. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.039
37. Duarte SH, de Andrade CCP, Ghiselli G, Maugeri F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresour Technol*. 2013;138:377-381. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.004
38. Huang C, Chen X, Xiong L, et al. Microbial oil production from corncob acid

- hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy*. 2013;49(2):273-278. doi:10.1016/j.biombioe.2012.12.023
39. Gupta A, Vongsvivut J, Barrow CJ, Puri M. Molecular identification of marine yeast and its spectroscopic analysis establishes unsaturated fatty acid accumulation. *J Biosci Bioeng*. 2012;114(4):411-417. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.05.013
 40. Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2011;113(8):1031-1051. doi:10.1002/ejlt.201100014
 41. Uemura H. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95(1):1-12. doi:10.1007/s00253-012-4105-1
 42. Rastogi G, Sani RK. Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J, eds. 2011:29-58. doi:10.1007/978-1-4419-7931-5
 43. Karakaya A. Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* Mayaları İle Biyoarıtımının İncelenmesi. 2011.
 44. Gori K, Hébraud M, Chambon C, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L. Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Res*. 2007;7(2):293-303. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00155.x
 45. Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J Agric Food Chem*. 2005;53(4):823-837.
 46. Niaounakis M, Halvadakis CP. *Olive Processing Waste Management Literature Review and Patent Survey Second Edition*. Elsevier Ltd; 2006.
 47. Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, et al. Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*. 2007;12(8):1679-1719. doi:10.3390/12081679

48. Obied HK, Karuso P, Prenzler PD, Robards K. Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *J Agric Food Chem.* 2007;55(8):2848-2853. doi:10.1021/jf063300u
49. Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Guillén R, Jiménez A. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas y Aceites.* 2006;57(1):95-106. doi:10.3989/gya.2006.v57.i1.25
50. Bouallagui Z, Sayadi S. Production of high hydroxytyrosol yields via tyrosol conversion by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized resting cells. *J Agric Food Chem.* 2006;54(26):9906-9911. doi:10.1021/jf062145g
51. Allouche N, Damak M, Ellouz R, Sayadi S. Use of whole cells of pseudomonas aeruginosa for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol. 2004;70(4):2105-2109. doi:10.1128/AEM.70.4.2105
52. Azaizeh H, Halahlil F, Najami N, Brunner D, Faulstich M, Tafesh A. Antioxidant activity of phenolic fractions in olive mill wastewater. *Food Chem.* 2012;134(4):2226-2234.
53. FAOSTAT. Annual grape and wine productions 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD>. Published 2014. Accessed December 8, 2014.
54. Rondeau P, Gambier F, Jolibert F, Brosse N. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. *Ind Crops Prod.* 2013;43:251-254. doi:10.1016/j.indcrop.2012.06.053
55. Waterhouse AL. Wine Phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957(1):21-36. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x
56. Spigno G, Faveri D De. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J Food Eng.* 2007;78:793-801. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087740500779X>. Accessed May 13, 2013.

57. Lafka T-I, Sinanoglou V, Lazos ES. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* 2007;104(3):1206-1214.
58. Shojaee-Aliabadi S, Hosseini SM, Tiwari B, Hashemi M, Fadavi G, Khaksar R. Polyphenols content and antioxidant activity of Ghure (unripe grape) marc extract: influence of extraction time, temperature and solvent type. *Int J Food Sci Technol.* 2013;48(2):412-418.
59. Food And Agriculture Organisation of the United Nations. <http://www.fao.org>. Accessed May 26, 2017.
60. *GLOBAL FOOD LOSSES AND FOOD WASTE*.; 2011.
61. Nasser a. T, Rasoul-Ami S, Morowvat MH, Ghasemi Y. Single Cell Protein: Production and Process. *Am J Food Technol.* 2011;6(2):103-116. doi:10.3923/ajft.2011.103.116
62. ENTERIC FERMENTATION MITIGATION. <https://www.c2es.org/technology/factsheet/EntericFermentation>. Accessed May 26, 2017.
63. Gupta A, Barrow CJ, Puri M. Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnol Adv.* 2012;30(6):1733-1745. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.014
64. Johnson V, Singh M, Saini VS, Sista VR, Yadav NK. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J Microbiol Biotechnol.* 1992;8(4):382-384. doi:10.1007/BF01198749
65. OPEC. Average annual OPEC crude oil price from 1960 to 2017 (in U.S. dollars per barrel). <https://www.statista.com/statistics/262858/change-in-opec-crude-oil-prices-since-1960/>. Accessed January 19, 2018.
66. Carrez D, Van Leeuwen P. Bioeconomy: circular by nature. *Eur Files.* 2015;(38):34-35. <http://europeanfiles.eu/wp-content/uploads/issues/2015-september-38.pdf>.
67. Beer LA, Speicher DW. Protein Detection in Gels Using Fixation. *Curr Protoc protein Sci.* 2002;CHAPTER 10:Unit-10.5. doi:10.1002/0471140864.ps1005s29

68. Design-Expert®. <http://www.statease.com/>.
69. Bligh EG. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. 1959;37.
70. AOCS Official Method Cd 11d-96.; 2017.
71. International Olive Council. *Determination of Biophenols in Olive Oils By Hplc*. Vol 29.; 2009.
72. Ayed L, Assas N, Sayadi S, Hamdi M. Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Lett Appl Microbiol*. 2005;40(1):7-11.
73. Kim BK, Park PK, Chae HJ, Kim EY. Effect of Phenol on β -Carotene Content in Total Carotenoids Production in Cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Time*. 2004;21(3):689-692.
74. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959;31(3):426-428. doi:10.1021/ac60147a030
75. Obied HK, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(7):1238-1248. doi:10.1016/j.fct.2007.01.004
76. Calvey CH, Su Y-K, Willis LB, McGee M, Jeffries TW. Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresour Technol*. 2016;200:780-788. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.104
77. Khoufi S, Hamza M, Sayadi S. Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresour Technol*. 2011;102(19):9050-9058. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.048
78. Rani V, Dash S, Nain L, Arora A. Expression of novel glucose tolerant B-glucosidase on cell surface by *Rhodotorula glutinis* isolate. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2015;4(3):380-387. doi:10.1016/j.bcab.2015.06.004
79. Hamza M, Khou S, Sayadi S, Bioproc L. Changes in the Content of Bioactive

- Polyphenolic Compounds of Olive Mill Wastewater by the Action of Exogenous Enzymes. 2012:66-73.
80. Zhang Z, Zhang X, Tan T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. *Bioresour Technol.* 2014;157:149-153. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.039
 81. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil : metabolism and health effects. 2002;13:636-644.
 82. Nagendran B., Unnithan U., Choo, Sundram, K. Characteristics of red palm oil, a carotene-and vitamin E- rich refined oil for food uses. 2000;21(2):Food and Nutrition Bulletin. 21(2):189. doi:10.1177/156482650002100213
 83. Cassidy L. Red palm oil. AOCS. <https://www.aocs.org/stay-informed/read-inform/featured-articles/red-palm-oil-february-2017>. Published 2017. Accessed May 9, 2017.
 84. Sordon S, Madej A, Popłoński J, et al. Regioselective ortho-hydroxylations of flavonoids by yeast. *J Agric Food Chem.* 2016;64(27):5525-5530. doi:10.1021/acs.jafc.6b02210
 85. Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 6th ed. Springer New York; 2011.
 86. Era-Net. CoBiotech. <https://www.cobiotech.eu/>. Accessed January 18, 2018.
 87. Bozkoyunlu G, Karakaya A, Laleli Y, Takaç S. Employment of immobilized *Rhodotorula glutinis* in olive mill wastewater treatment. In: *Current Opinion in Biotechnology* 22S. ; 2011:s36.

8 EKLER

8.1 EK-1 ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR

Çizelge EK 1 Çalışmada kullanılan cihaz listesi

Cihaz	Model
Öğütücü (Homojenizatör)	Krups KA950 Prep Expert® Mutfak Robotu
Çalkalamalı Hava Banyosu	Edmund Bühler TH 30; Shel Lab S16R-2
HPLC	Waters Alliance
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Rotina 35 R
Döner Buharlaştırıcı	Heidolph
Terazi	Mettler AB54-S; Scaltec
pH-metre	Sartorius PP25
Ultrasaf Su Cihazı	Millipore
Etüv; Kurutucu	Friocell 222; Zhichang- ZRD 5110
Laminer Akı Kabini	Biolab Faster BHG 2004-S
Sterilizatör	ALP CL-40M
Biyoreaktör	Sartorius Biostat B plus Twin
Mikrosantrifüj	Hettich Mikro 22

8.2 EK-2 ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL LİSTESİ

Çizelge EK 2 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal adı	Marka	Katalog No	Cas. No.
Agar	Fluka	5039	9002-18-0
Etil alkol (mutlak)	Sigma Aldrich	32221	64-17-5
Hidroklorik asit (%37)	Sigma Aldrich	7102	7647-01-0
Malt extract	Fluka	70167	8002-48-0
Yeast extract	Applichem	A1552	
Pepton from casein, acid digest	Fluka	70171	91079-40-2
Glukoz (susuz)	Applichem	A3666	50-99-7
Amonyum sülfat	Merck	101,217	7783-20-2
Amonyum nitrat	Sigma Aldrich	A9642	6484-52-2
Folin-Ciocalteu's Reagent, 2N	Sigma Aldrich	9252	
Pirogallol	Sigma Aldrich	254002.00	
Sodyum hidroksit	Sigma Aldrich	-6203	1310-73-2
Etil asetat (ekstra saf)	Merck	1.00864	141-78-6
Üre	Merck	108,487	57-13-6

8.3 EK-3 HÜCRE TARTIMI TEKRARLANABİLİRLİK TESTİ

Tekrarlanabilirlik analizi için 9 adet UYM ortamına aynı koşullarda *R. glutinis* inokule edilmiş ve 48. saatte bütün erlenlerde yaş biyokütle ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge EK 3’de verilmiştir.

Çizelge EK 3 hücre tartımı verileri

Ortamlar	Biyokütle (g/L)
1	17,84
2	18,16
3	17,49
4	16,56
5	17,77
6	17,3
7	17,58
8	17,52
9	17,89
STD sapma	0,04
Ortalama	17,57
% sapma	2,44

Yaş biyokütle verilerinden biyokütle tartımı için sapma %2,44 olarak hesaplanmıştır. Bu değer %95 güven aralığı içerisindedir.

8.4 EK-4 TOPLAM LİPİT ANALİZİNİN TEKRARLANABİLİRLİĞİ

Yapılan toplam lipit analizleri için 3 paralel ortamın verileri kullanılmıştır. Veriler Çizelge EK 4’de verilmiştir.

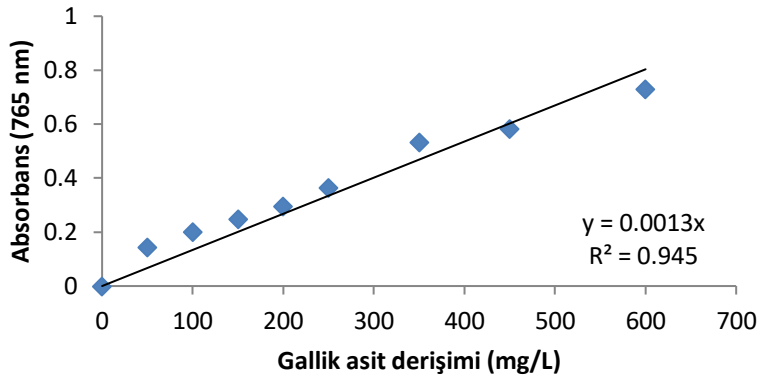
Çizelge EK 4 Ölçülen toplam lipit düzeyleri

Ortam	Toplam Lipit g/L
1	0,0084
2	0,0091
3	0,0084
Standart sapma	0,0003
Ortalama	0,0087

Ortalamlara ait veriler istatistiksel olarak değerlendirilirse; ölçümler %95 güven aralığı dahilindedir.

8.5 EK-5 TOPLAM FENOL DERİŞİMİ ÇALIŞMA DOĞRUSU

Renk reaksiyonu standart yönteme göre yapılmıştır (87). Standart grafiği 2000 mg/L gallik asit  z ltisi kullanılarak, 50-600 mg/L derişimlerinde hazırlanan gallik asit standart  z ltileri kullanılarak yapılmıştır. Örnekler 3 paralel şeklinde çalışılmıştır. Elde edilen veriler ile standart derişimlerine karşı absorbans değerleri ölçülerek toplam fenol derişimi için çalışma doğrusu çizilmiştir (şekil EK 5)



şekil EK 5 Toplam fenol derişimi için çalışma doğrusu

8.6 EK-6 TOPLAM FENOL ANALİZİ İÇİN TEKRARLANABİLİRLİK TESTİ

Tekrarlanabilirlik denemesi 350 mg/L gallik asit çözeltisiyle yapılmıştır. Alınan 10 örnek ile yapılan toplam fenol tayininde absorbans değerleri hesaplanarak toplam fenol derişimleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler (Çizelge EK 6-1) ile *t*-testi yapılmıştır (Çizelge EK 6-2).

Çizelge EK 6-1 Toplam fenol derişim analizi tekrarlanabilirlik testi için elde edilen veriler

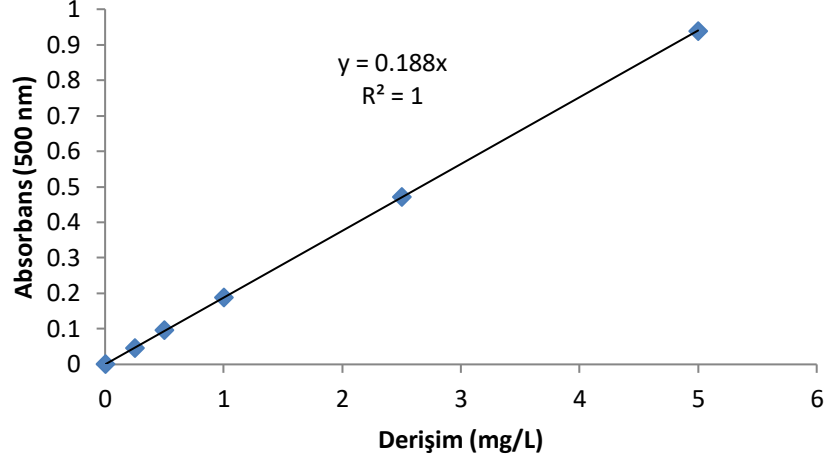
Toplam fenol derişimi (mg/L)	Absorbans (765 nm)
362	0,471
351	0,456
358	0,466
345	0,449
350	0,455
359	0,467
344	0,447
379	0,493
342	0,445
362	0,471

Çizelge EK 6-2 Toplam fenol analizi tekrarlanabilirlik denemesi için elde edilen veriler ile yapılan *t*-testi

Ortalama fenol derişimi (mg/L)	Standart sapma	Stok çözelti derişimi(mg/L)	N(tekrar sayısı)	<i>t</i> değeri	Serbestlik derecesi(N-1)	P:0,05 ihtimaliyet seviyesi ve 9 serbestlik derecesi için	P:0.01 ihtimaliyet seviyesi ve 9 serbestlik derecesi için
355,38	10,69	350	10	1,59	9	2,26	3,25

Yapılan istatistiksel analiz iki yanlı bir deneme için elde edilen verilerin kendi içerisindeki farklılıklarını analiz eder. *t* testine göre *p*:0.05 ve *p*:0.01 seviyelerinde olması gereken değerler sırası ile 2,26 ve 3,25 dir. Hesaplanan *t* değeri (mutlak değer) her iki değerden de küçük olduğu için yapılan analizler %99 ve %95 güven aralığı dahilindedir. Sistematiik hata yoktur.

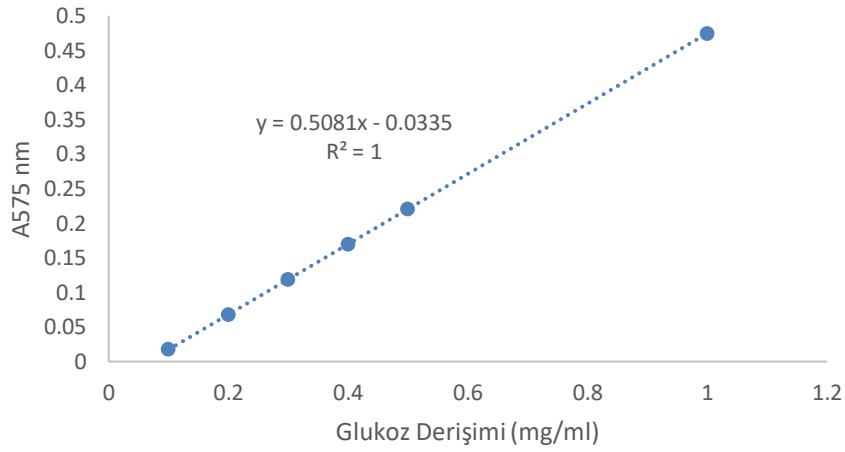
8.7 EK-7 TOPLAM LİPİT FAZINDA KAROTENOİD ANALİZİ



Şekil EK 7 Karotenoid analizi için 500 nm’de çizilen çalışma doğrusu

8.8 EK-8 İNDİRGEN ŞEKER TAYİNİ

İndirgen şeker derişimi tayininde, glukoz ve su ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki standart çözeltiler kullanılmış, her standart çözelti için DNS renk reaksiyonu yapılarak spektrofotometrik olarak 575 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Çalışma doğrusu Şekil EK 8’de verilmiştir.



Şekil EK 8 İndirgen şeker derişimi için 575 nm’de çizilen çalışma doğrusu

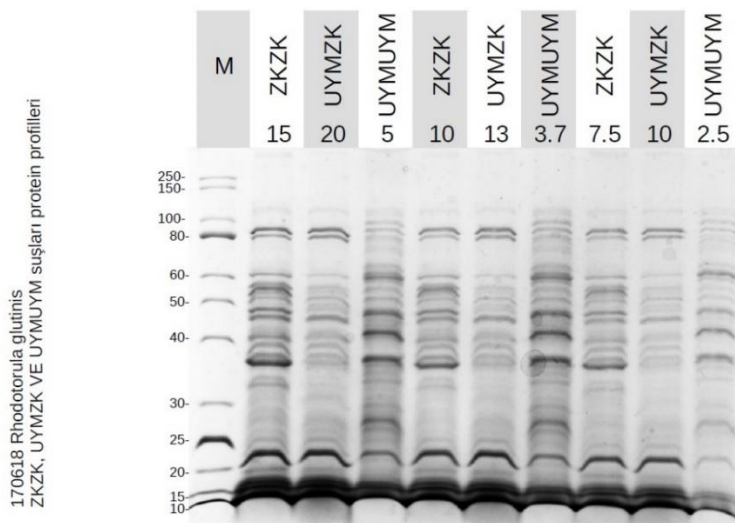
8.9 EK-9 ZK ORTAMINA ADAPTE OLMUŞ RHODOTORULA GLUTINIS'İN PROTEİN FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Tez çalışması boyunca ZK agar ve sıvı ZK ortamlarında çoğalmış *R. glutinis* türleri ile üretilen lipid ve biyofenol bileşimlerindeki farklılığın anlaşılması üzerine bu farklanmanın proteomik bakımdan ifade edilebilmesi amacıyla ek bir deney tasarlanmıştır. Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında yapılan deneyde 3 farklı *R. glutinis* suşunun hücre içi proteinleri tek boyutlu jel elektroforezi ile ayrılmış ve elde edilen protein bantları arasındaki benzerlik ve farklılıklar sayısal olarak incelenmiştir. Hücre içi proteinleri değerlendirilen suşlar ile saklama ve çoğalma koşulları;

- i) ZK-ZK suşu: Tez çalışması süresince ZK agar ortamında pasajlanmış ve sıvı ZK ortamında çoğalmış suş
- ii) UYM-ZK suşu: Tez çalışması süresince UYM agar ortamında pasajlanmış ve proteom çalışmasından önce ZK sıvı ortamında çoğalmış suş
- iii) UYM-UYM suşu (orjinal suş): UYM agar ortamında muhafaza edilen ve sıvı UYM ortamında çoğalan suş

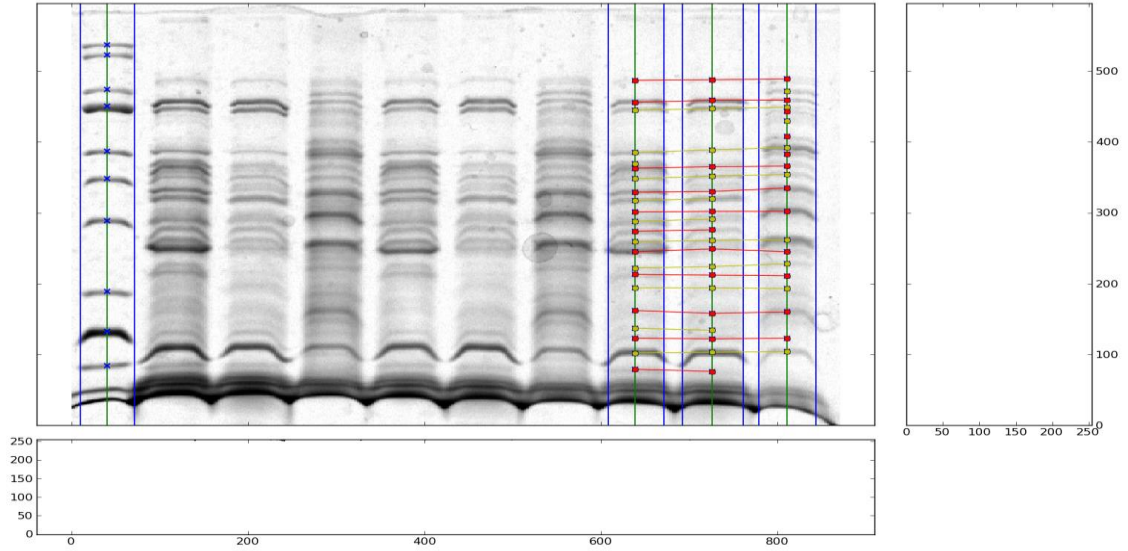
şeklindedir.

30 °C ve 150 rpm koşullarında 5 gün boyunca sıvı ortamda çoğaltılan hücrelerden protein ekstraksiyonu yapılmıştır. Her bir suş için 3'er farklı derişimlerde hazırlanan protein ekstraktları jel elektroforezi ile ayrılmışlardır (Şekil EK 9-1).



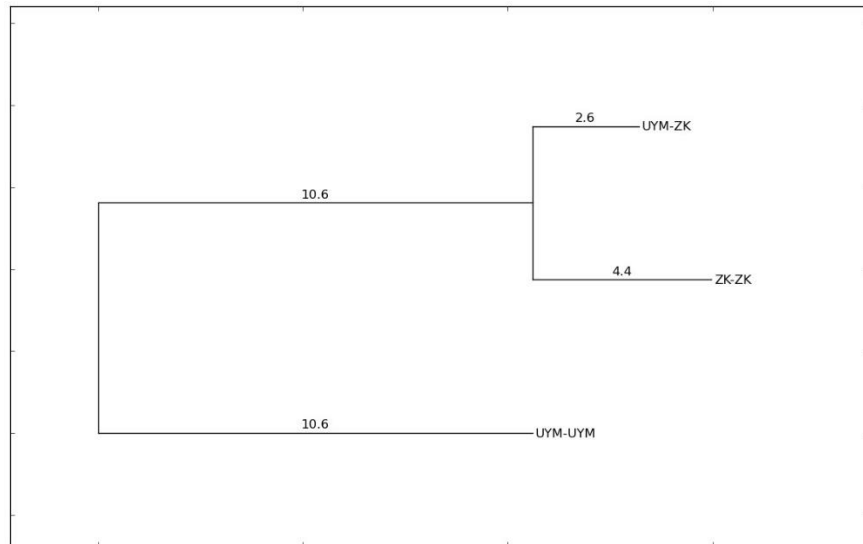
Şekil EK 9-1 ZK-ZK, UYM-ZK ve UYM-UYM suşlarına ait protein ekstraktlarının tek boyutlu jel elektroforezi görüntüsü (30 °C, 150 rpm, 120 saat)

Jel görüntüsünde en uygun bant görüntüsünü veren derişimlere ait bantlar seçilmiş ve görüntü PyElph 1.4 yazılımı ile sayısal olarak değerlendirilmiştir. Bantlar kullanılan yazılım yardımıyla eşleştirilerek benzerlik ve farklılıklar belirlenmiştir (Şekil EK 9-2)



Şekil EK 9-2 PyElph 1.4 yazılımı ile yapılan bant eşleştirme görüntüsü

Eşleştirilen ve farklı bantlar ile yazılım kullanılarak “neighbour joining” metodu ile dendrogram çizilmiştir. Suşların proteomik yakınlık ve uzaklıkları ise çizilen dendrogram ile gösterilmiştir (Şekil EK 9-3).



Şekil EK 9-3 PyElph 1.4 yazılımı ile çizilmiş dendrogram (neighbour joining method)

Dendrogram, suşların birbiri ile uzaklıklarını bağıl sayısal veriler kullanarak ifade etmektedir. Elde edilen verilerden ZK-ZK ve ZK-UYM suşlarının proteomik olarak UYM-

UYM suşuna göre farklılıkları görülmüştür. Ayrıca ZK-UYM suşunun UYM-UYM suşuna ZK-ZK suşuna proteomik olarak daha yakın olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak tez çalışması süresince ZK ortamında çoğalmış olan suşun orijinal suşa göre proteomik bakımdan farklı olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca ilk defa ZK ortamında çoğalmış orijinal suşun da UYM ortamında çoğalmış orijinal suşa, ZK-ZK suşuna göre daha yakın olması tez çalışması süresince ZK-ZK suşunda genetik olarak da farklılıklar gerçekleşmiş olabileceğinin göstergesidir. Daha detaylı çalışma, yakında başlayacak olan RHODOLIVE projesinde yapılarak proteomik ve genetik farklılıklar ortaya konulacaktır.



**8.10 EK-10 %25 ZK İÇEREN GLUKOZ KATKISI DENEMESİNE AİT
CEVAPLAR (T= 30 °C, N=150 RPM)**

Çizelge EK 10 %25 ZK içeren glukoz katkısı denemesine ait cevaplar (T= 30 °C, N=150 rpm)

Erlen No.	Glukoz (g/L)	Zaman (saat)	Kuru biyokütle (g/L)	Toplam lipit (g/L)	FAME	pH
1	0	48	3,05	0,34	60	7,38
2	50	48	2,88	0,31	35	5,81
3	100	48	2,63	0,17	49	5,79
4	0	96	2,89	0,41	69	8,26
5	50	96	4,95	0,40	49	5,83
6	100	96	4,49	0,50	58	5,73
7	0	144	2,52	0,43	60	8,60
8	50	144	5,66	0,46	66	5,61
9	100	144	5,62	0,45	63	5,62
10	0	192	2,47	0,52	72	8,64
11	50	192	6,70	0,51	75	5,41
12	100	192	6,48	0,43	57	5,52
13	0	240	1,94	0,35	63	8,75
14	50	240	10,39	0,57	87	5,33
15	100	240	7,24	0,44	67	5,30
16	0	288	2,12	0,39	71	8,72
17	50	288	9,40	0,78	158	5,37
18	100	288	7,63	0,86	156	5,22

8.11 EK-11 %10 ZK İÇEREN ORTAMLARDA GLUKOZ KATKISI DENMESİNE AİT CEVAPLAR

Çizelge EK 11 %10 ZK içeren ortamlarda glukoz katkısı denmesine ait cevaplar (T= 30 °C, N=150 rpm)

Erlen No.	Glukoz (g/L)	Zaman (saat)	Biyokütle (g/L)	Toplam lipit (g/L)	FAME (mg/L)	pH
1	0	0	0	0	0	6,4
2	50	0	0	0	0	6,4
3	100	0	0	0	0	6,4
4	0	48	0,22	0,26	66	8,28
5	50	48	1,64	0,39	11	5,36
6	100	48	1,8	0,48	11	5,25
7	0	96	0,26	0,21	58	8,58
8	50	96	3,37	0,6	6	5,03
9	100	96	5,59	1,28	6	5,12
10	0	144	0,2	0,18	19	8,74
11	50	144	4,57	1,13	4	5,08
12	100	144	4,86	1,44	7	5,08
13	0	192	0,16	0,15	20	9,02
14	50	192	6,19	2,69	28	5,2
15	100	192	6	2,93	30	5,11

8.12 EK-12 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM BİYOREAKTÖR DENEMESİ KURU HÜCRE DERİŞİMİ VERİLERİNE AİT ANOVA ÇİZELGESİ

Çizelge EK-12 Merkezi Kompozit Tasarım biyoreaktör denemesi kuru hücre derişimi verilerine ait ANOVA çizelgesi

Response	1 Kuru hücre derisimi					
ANOVA for Response Surface 2FI Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	93,39	3,00	31,13	186,78	< 0.0001	significant
A-sicaklik	85,82	1,00	85,82	514,92	< 0.0001	
B-pH	2,97	1,00	2,97	17,82	0,0022	
AB	4,60	1,00	4,60	27,61	0,0005	
Residual	1,50	9,00	0,17			not significant
Lack of fit	0,98	5,00	0,20	1,49	0,3599	
Pure Error	0,52	4,00	0,13			
Cor Total	94,89	12,00				

8.13 EK-13 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM SÜREKLİ İŞLETİM BİYOREAKTÖR DENEMESİ TOPLAM LİPİT VERİLERİNE AİT ANOVA ÇİZELGESİ

Çizelge EK-13 Merkezi Kompozit Tasarım sürekli işletim biyoreaktör denemesi toplam lipit verilerine ait ANOVA çizelgesi

Response 2 Toplam lipit						
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0,021	5	4,14E+00	7,53	0,0097	significant
A-sicaklik	0,012	1	0.012	21,76	0,0023	
B-pH	2,79E+00	1	2,79E+00	5,07	0,0590	
AB	1,87E+00	1	1,87E+00	3,40	0,1079	
A²	3,79E+00	1	3,79E+00	6,89	0,0342	
B²	1,28E-01	1	1,28E-01	0,23	0,6441	
Residual	3,85E+00	7	5,49E-01			
Lack of fit	3,53E+00	3	1,18E+00	14,91	0,0123	significant
Pure Error	3,16E-01	4	7,89E-02			
Cor Total	0,025	12				

8.14 EK-14 FAKTÖRİYEL TASARIM I DENEYİNE AİT TASARIM MATRİSİ VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR

Çizelge EK 14 Faktöriyel Tasarım I deneyine ait tasarım matrisi ve elde edilen cevaplar

Deney	A:	B:	C:	D:	TF	Renk
#	ZK/cibre	Çalkalama	Parçalanma	Çalkalama	giderimi	giderimi
	oranı	sıcaklığı	süresi	süresi	(%)	(%)
1	-1	-1	-1	-1	30,33	11,2
2	1	-1	-1	-1	13,04	-0,27
3	-1	1	-1	-1	24,96	13,6
4	1	1	-1	-1	17,09	15,6
5	-1	-1	1	-1	37,24	17,87
6	1	-1	1	-1	23,47	6,27
7	-1	1	1	-1	29,41	29,33
8	1	1	1	-1	5,36	10,4
9	-1	-1	-1	1	36,29	21,86
10	1	-1	-1	1	48,4	1,29
11	-1	1	-1	1	23,37	22,48
12	1	1	-1	1	11,56	9,17
13	-1	-1	1	1	36,11	34,02
14	1	-1	1	1	27,71	7,63
15	-1	1	1	1	34,08	43,67
16	1	1	1	1	17,66	15,12

8.15 EK-15 FAKTÖRİYEL TASARIM I DENEYİNE AİT, ZK/CİBRE ORANI, CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ TF GİDERİMİNE TEKİLİ VE ÇOKLU ETKİLERİ İÇİN ANOVA ANALİZİ

Çizelge EK-15 Faktöriyel Tasarım I deneyine ait, ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için ANOVA analizi

Response	1		Toplam fenol giderimi			
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Model	765,56	4	191,39	6,54	0,006	significant
A-ZK/Cibre oranı	737,17	1	737,17	25,2	0,0004	
B-Çalkalama sıcaklığı	1,57	1	1,57	0,05	0,82	
C- Parçalanma süresi	0,89	1	0,89	0,03	0,86	
D-Çalkalama suresi	25,93	1	25,93	0,89	0,37	
Residual	321,78	11	29,25			
Cor Total	1087,34	15				

8.16 EK-16 FAKTÖRİYEL TASARIM I DENEYİNE AİT ZK/CİBRE ORANI, CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ RENK GİDERİMİNE TEKLİ VE ÇOKLU ETKİLERİ ANOVA ANALİZİ

Çizelge EK-16 Faktöriyel Tasarım I deneyine ait ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri ANOVA analizi

Response	2		Renk giderimi			
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variancetable [Partialsum of squares - Type III]						
Source	Sum of	df	Mean	F	p-value	significant
	Squares		Square	Value	Prob> F	
Model	1043,65	4	260,91	3,42	0,0476	
A-ZK/Cibre orani	783,45	1	783,45	10,27	0,084	
B-Çalkalama sicakligi	214,81	1	214,81	2,82	0,1215	
C-Parçalanma süresi	0,37	1	0,37	0,0049	0,9454	
D-Çalkalama suresi	45,02	1	45,02	0,59	0,4586	
Residual	839,44	11	76,31			
Cor Total	1883,09	15				

8.17 EK-17 FAKTÖRİYEL TASARIM II DENEYİNE AİT DENEY TASARIM MATRİSİ VE CEVAPLAR

Çizelge EK-17 Faktöriyel Tasarım II deneyine ait deney tasarım matrisi ve cevaplar

Deney #	A: Parçalanm a süresi	B: Çalkalam a sıcaklığı	C: Çalkalama süresi	Toplam fenol giderimi (%)	Renk giderim i (%)
1	-1	-1	-1	16,5	28,83
2	1	-1	-1	21,32	49,43
3	-1	1	-1	29,44	32,44
4	1	1	-1	21,02	45,19
5	-1	-1	1	41,9	44,52
6	1	-1	1	36,03	55,26
7	-1	1	1	40,38	61,97
8	1	1	1	38,6	65,76

8.18 EK-18 FAKTÖRİYEL TASARIM II DENEYİNE AİT; CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ, TF GİDERİMİNE TEKİLİ ETKİLERİ İÇİN ANOVA ANALİZİ

Çizelge EK-18 Faktöriyel Tasarım II deneyine ait; cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının, TF giderimine tekli etkileri için ANOVA analizi

Response	1						Toplam fenol giderimi
ANOVA for selected factorial model							
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]							
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F		
Model	628,05	3	209,35	12,52	0,0168	significant	
A-Parçalama süresi	15,82	1	15,82	0,95	0,3857		
B-Çalkalama sıcakligi	23,38	1	23,38	1,40	0,3024		
C-Çalkalama süresi	588,85	1	588,85	35,23	0,0040		
Residual	66,86	4	16,72				

8.19 EK-19 FAKTÖRİYEL TASARIM II DENEYİNE AİT; CİBRENİN PARÇALANMA SÜRESİ, PARÇALANMADAN SONRA KARASU İLE BİRLİKTE ÇALKALAMA SÜRESİ VE ÇALKALAMA SICAKLIĞININ RENK GİDERİMİNE ETKİLERİ İÇİN ANOVA ANALİZİ

Çizelge EK-19 Faktöriyel Tasarım II deneyine ait; cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine etkileri için ANOVA analizi

Response	2		Renk giderimi			
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	1020,99	3	340,33	7,83	0,0377	significant
A-Parçalama süresi	286,49	1	286,49	6,59	0,0622	
B-Çalkalama Sicaklığı	93,29	1	93,29	2,15	0,2168	
C-Çalkalama süresi	641,22	1	641,22	14,75	0,0185	
Residual	173,9	4	43,4741			
Cor Total	1194,89	7				

8.20 EK-20 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI I DENEYİNE AİT DENEY MATRİSİ VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR

Çizelge EK-20 Merkezi Kompozit Tasarımı I deneyine ait deney matrisi ve elde edilen cevaplar

Deney #	A: ZK/cibre oranı (ml/g)	B: Çalkalama süresi (dk)	TF giderimi (%)	Renk giderimi (%)
1	2,87	242,16	48,33	51,66
2	5,63	242,16	34,96	28,9
3	2,87	557,84	55,63	57,37
4	5,63	557,84	34,07	25,21
5	2,5	400	64,9	60,32
6	6	400	30,73	25,32
7	4,25	200	42,58	52,09
8	4,25	600	50,63	63,67
9	4,25	400	48,06	53,74
10	4,25	400	55,57	54,67
11	4,25	400	51,76	58,11
12	4,25	400	48,36	49,43
13	4,25	400	51,52	58,94

8.21 EK-21 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI I DENEYİNE AİT TOPLAM FENOL GİDERİMİNDE YÜZEY CEVABI KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ

Çizelge EK-21 Merkezi Kompozit Tasarımı I deneyine ait toplam fenol gideriminde yüzey cevabı kuadratik modeli için ANOVA Çizelgesi

Response	Toplam fenol giderimi					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variancetable [Partialsum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F	
Model	1026,66	5	205,33	15	0,0013	significant
A-ZK/cibre (ml/g)	848,44	1	848,44	61,97	0,0001	
B-Çalkalama süresi (dk)	38,17	1	38,17	2,79	0,1389	
AB	16,77	1	16,77	1,22	0,305	
A2	48,3	1	48,3	3,53	0,1024	
B2	74,98	1	74,98	5,48	0,0518	
Residual	95,84	7	13,69			
Lack of fit	58,56	3	19,52	2,09	0,2437	Not significant

8.22 EK-22 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI I DENEYİNE AİT RENK GİDERİMİ CEVAP YÜZEYLERİNİN KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ

Çizelge EK-22 Merkezi Kompozit Tasarımı I deneyine ait renk giderimi cevap yüzeylerinin kuadratik modeli için ANOVA Çizelgesi

2	Renk giderimi					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partialsum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F	
Model	2000,39	5	400,08	14,24	0,0015	significant
A-ZK/cibre	1366,72	1	1366,72	48,66	0,0002	
B-Çalkalama süresi	38,63	1	38,63	1,38	0,2792	
AB	22,01	1	22,01	0,78	0,4054	
A2	566,72	1	566,72	20,18	0,0028	
B2	74,98	1	74,98	5,48	0,0518	
Residual	95,84	7	13,69			
Lack of fit	58,56	3	19,52	2,09	0,2437	Not significant
PureError	37,28	4	9,32			
Cor Total	1122,5	12				

8.23 EK-23 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI- II DENEYİNE AİT DENEY TASARIMI VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR

Çizelge EK-23 Merkezi Kompozit Tasarımı- II deneyine ait deney tasarımı ve elde edilen cevaplar

Deney #	Çalkalama süresi (dk)	TF giderimi (%)	Renk giderimi (%)
1	30	53,6	51,38
2	30	53,3	52,46
3	122,5	62	62
4	307,5	66	65
5	400	67,2	66,97
6	400	65	66,97
7	215	65	64,75

8.24 EK-24 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM II DENEYİNE AİT TOPLAM FENOL GİDERİMİNDE CEVAP YÜZEY KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ

Çizelge EK-24 Merkezi Kompozit Tasarım II deneyine ait toplam fenol gideriminde cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA çizelgesi

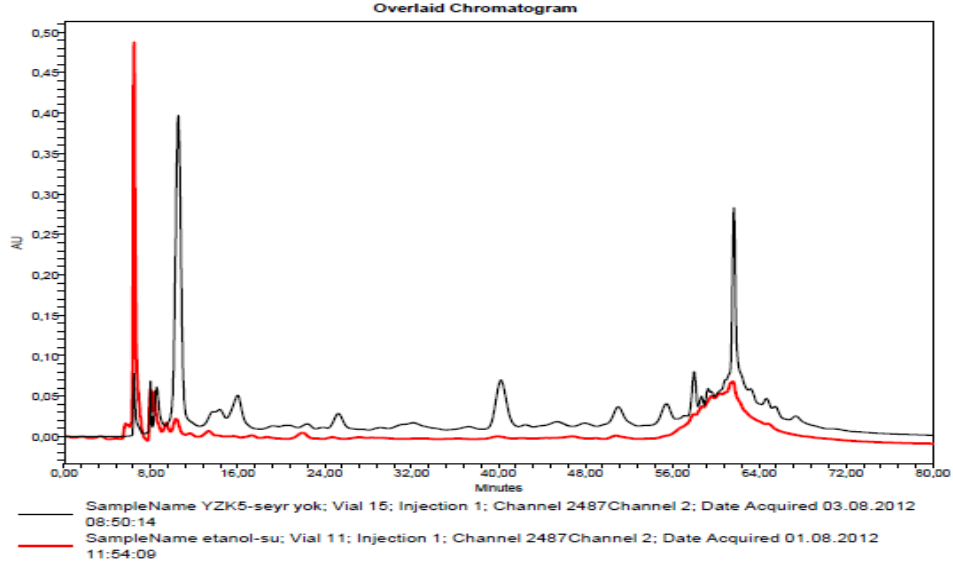
Response	Toplam fenol giderimi					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	201,87	2	100,93	81,45	0,0006	significant
A-zaman	165,66	1	165,66	133,68	0,0003	
A2	36,2	1	36,2	29,21	0,0057	
Residual	4,96	4	1,24			
Lack of fit	2,49	2	1,25	1,01	0,4974	not significant
Pure Error	2,47	2	1,23			
Cor Total	206,82	6				

8.25 EK-25 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI II DENEYİNE AİT RENK GİDERİMİNDE CEVAP YÜZEY KÜBİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ

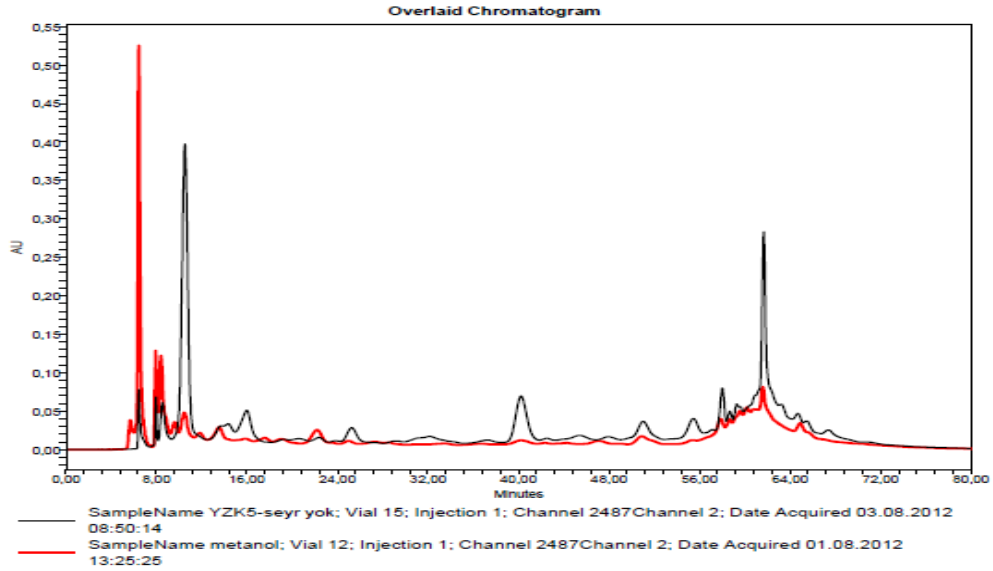
Çizelge EK-25 Merkezi Kompozit Tasarımı II deneyine ait renk gideriminde cevap yüzey kübik modeli için ANOVA çizelgesi

Response 2	Renk giderimi					
ANOVA for Response Surface Cubic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F	
Model	266,38	3	88,79	456,28	0,0002	significant
A-zaman	0,62	1	0,62	3,19	0,1722	
A2	35,26	1	35,26	181,2	0,0009	
A3	9,11	1	9,11	46,8	0,0064	
Residual	0,58	3	0,19			
Lack of fit	5,69E+00	1	5,69E+00	0.020	0,9013	not significant
PureError	0,58	2	0,29			
Cor Total	266,96	6				

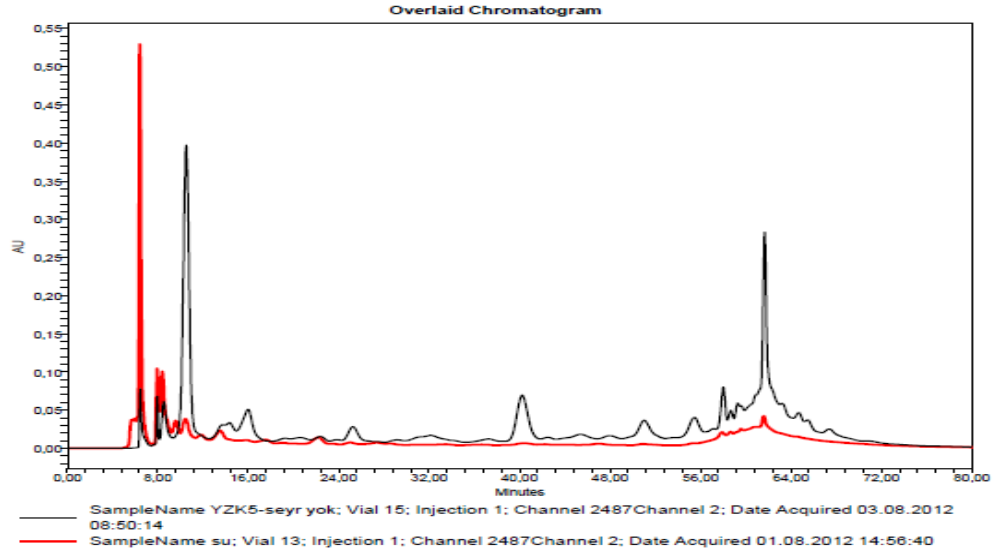
8.26 EK-26 ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU SONUCU ZK İLE MUAMELE EDİLMİŞ CİBREDEN GERİ KAZANILAN FENOLLERİN ZK FENOLLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI HPLC KROMATOGRAMLARI



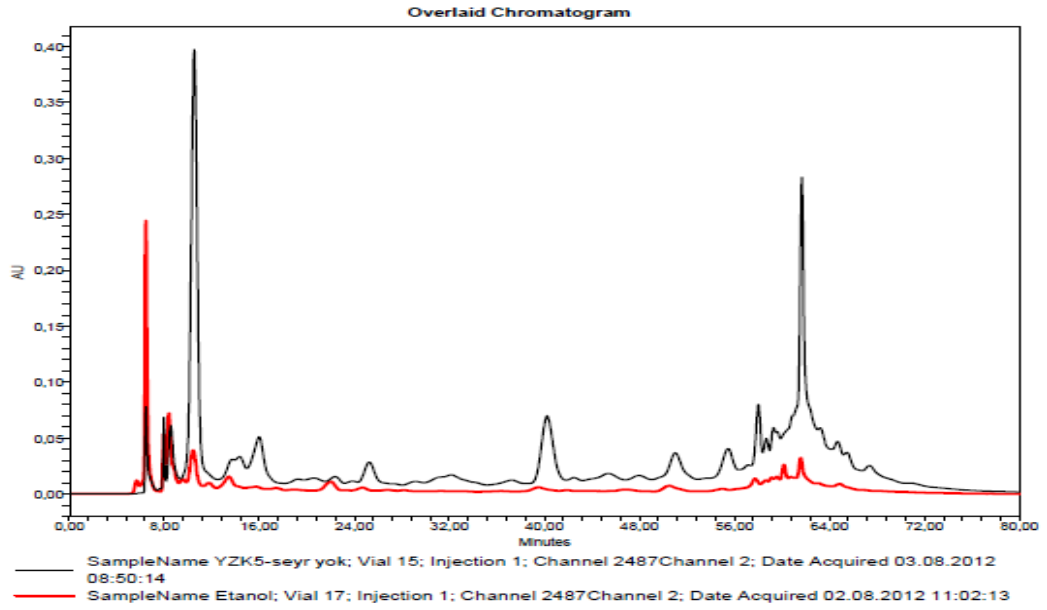
Şekil EK 26-1 Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan etanol-su karışımının ZK ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



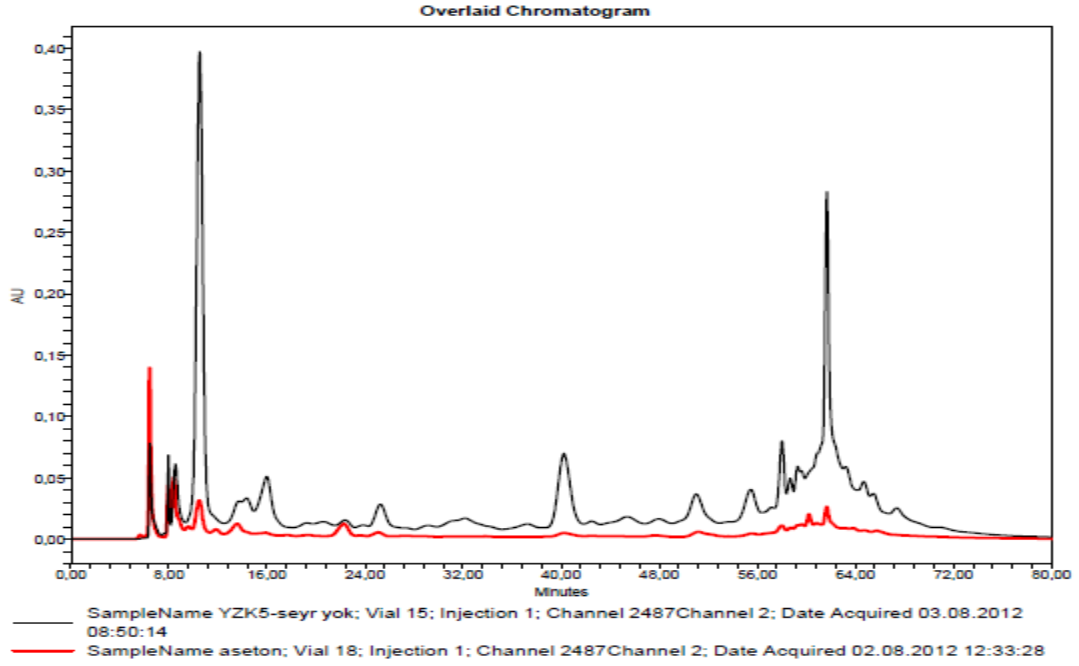
Şekil EK 26-2 Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan metanolün ZK ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



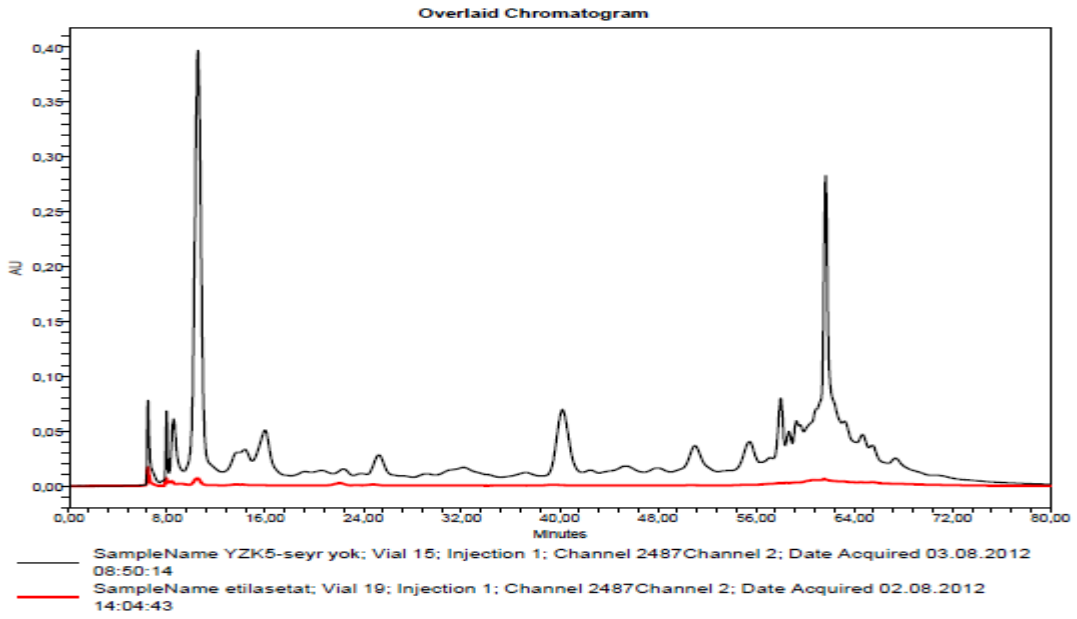
Şekil EK 26-3 Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan suyun ZK ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



Şekil EK 26-4 Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan etil alkolün ZK ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



Şekil EK 26-5 Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan asetonun ZK ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



Şekil EK 26-6 Ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan etil asetatın ZK ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı

8.27 EK-27 MERKEZİ KOMPOZİT TASARIMI III DENEYİNE AİT DENEY TASARIM MATRİSİ VE ELDE EDİLEN CEVAPLAR

Çizelge EK-27 Merkezi Kompozit Tasarımı III deneyine ait deney tasarım matrisi ve elde edilen cevaplar

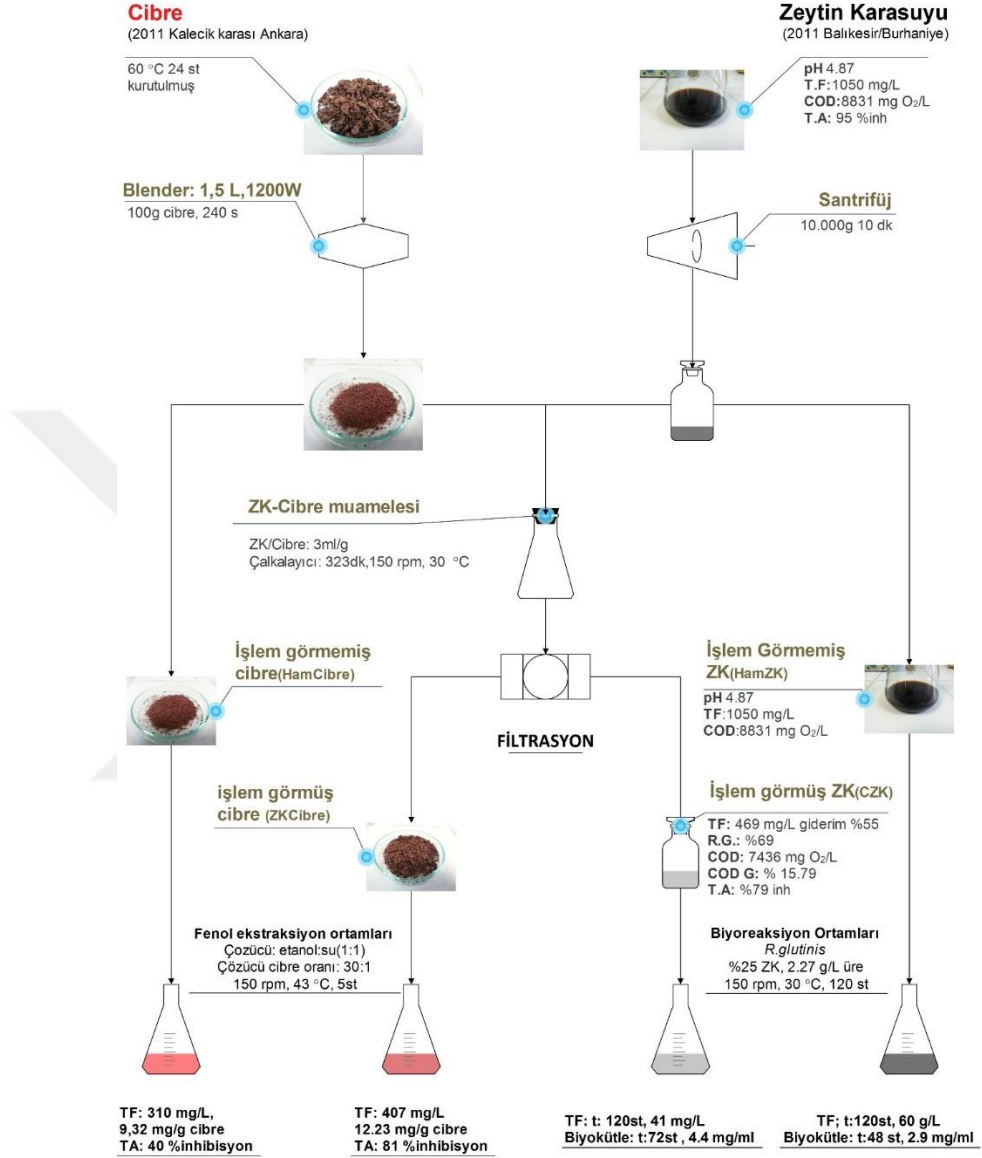
Deney #	Çözücü/cibre oranı (ml/g)	Sıcaklık (°C)	Geri kazanılan TF (mg/g)
1	14	15	6,51
2	40	15	8,99
3	14	45	11,45
4	40	45	11,88
5	10,53	30	7,24
6	43,47	30	10,29
7	27	11	7,53
8	27	49	12,23
9	27	30	11,26
10	27	30	10,54
11	27	30	10,58
12	27	30	11,87
13	27	30	10,82
13	30	43	11,09
13	30	43	12,86

8.28 EK-28 GERİ KAZANILAN TOPLAM FENOL MİKTARINA CEVAP YÜZEY KUADRATİK MODELİ İÇİN ANOVA ÇİZELGESİ

Çizelge EK-28 Geri kazanılan toplam fenol miktarına cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA çizelgesi

Response	1	Geri kazanılan TF miktarı				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	41,23	5	8,24672	21,738	0,0004	Significant
A-çözücü/cibre	6,368	1	6,36818	16,7862	0,0046	
B-sıcaklık	26,39	1	26,391	69,5654	< 0,0001	
AB	1,03883	1	1,03883	2,73831	0,1419	
A^2	6,48041	1	6,48041	17,0821	0,0044	
B^2	0,95519	1	0,95519	2,51783	0,1566	
Residual	2,65559	7	0,37937			

8.29 EK-29 BİYOPROSES VE ZEYTİN KARASUYU FENOLLERİNİN CİBRE İLE BİRLİKTE GERİ KAZANIMI ÇALIŞMALARININ BÜTÜNSELLİĞİNİ GÖSTEREN SÜREÇ AKIŞ ŞEMASI



Şekil EK-29 Biyoproses ve zeytin karasuyu fenollerinin cibre ile birlikte geri kazanımı çalışmalarının bütünselliği gösteren süreç akış şeması

9 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Alper KARAKAYA

Doğum Yeri: Antalya

Doğum Tarihi: 03.02.1983

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce (4/5), Fransızca (2/5)

Eğitim Durumu

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2008-2011)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2001-2008)

Lise: Antalya Lisesi (1996-2000)

İş Tecrübesi

Kurumu: ERA-NET CoBiotech ID: 12-TÜBİTAK 9170038

Biovalorization Of Olive Mill Wastewater to Microbial Lipids and Other Products via *Rhodotorula glutinis* Fermentation- Zeytin Karasuyunun *Rhodotorula glutinis* ile Mikrobial Lipid ve Diğer Katma Değeri Olan Ürünlerin Üretimi için Biyolojik Değerlendirilmesi

Görevi: Koordinatör-Proje Yürütücüsü

Yılları: 2018 - 2021

Kurumu: Düzen Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş.

Görevi: Araştırmacı

Yılları: 2008 – Günümüz (Dönemsel)

Kurumu: TUBİTAK 113M589

Zeytin Karasuyundan Katma Değer Yaratacak Biyomoleküller Üretimi

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2013-2015

Kurumu: TUBİTAK 111M441

Zeytin Karasuyunun Fenolik Maddelerinin Ardışık Homojenizasyon-Ekstraksiyon Prosesleri ile Zenginleştirilmesi ve Biyoarıtılabilirliğinin Kolaylaştırılması için Entegre bir Proses Geliştirilmesi

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2011-2012

Kurumu: TUBİTAK 109M290 (COST Action MC0903 (2010-13))

Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi (Utilisation of Biomass for Sustainable Fuels and Chemicals)

Görevi: Proje Bursiyeri (CNRS-FRANSA-Lyon kısa süreli araştırmacı bursu) **Yılları:** 2009-2011 (2+2 toplam 4 ay)

10 TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Karakaya, A., Kenar, A., Laleli, Y. Takaç S., 2017. Novel Two-Step Process to Co-valorize Antioxidant Rich By-products of Olive and Grape Processing Industries, Waste and Biomass Valorization, 8(3)829-837.

Karakaya, A., Laleli, Yahya, Takaç, S., 2016. Industry–University Partnership For The Simultaneous Biotechnological Degradation and Value Enhancement of Olive Mill Wastewater, OLIVAE, 123, 48-51.



A Novel Two-Step Process to Co-valorize Antioxidant Rich By-products of Olive and Grape Processing Industries

A. Karakaya¹ · A. Kenar² · Y. Laleli³ · S. Takaç⁴

Received: 19 October 2015 / Accepted: 15 July 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract An integrated process for collective recovery of phenolic compounds from olive mill wastewater (OMW) and grape pomace (GP), which would also benefit easier biodegradation of OMW in a further process, was developed. Response surface methodology was employed to optimize the process parameters. Treatment of GP with OMW resulted in the transfer of 64.41 % of total polyphenols contained in OMW to GP under the optimal conditions predicted by the model. In the following step, extraction of phenolic compounds in treated-GP with ethyl alcohol:water under the optimum conditions predicted by the model was performed and 11.97 mg g⁻¹ phenolics was recovered. The total antioxidant activity of the recovered phenolics was 81 % (inh.).

Keywords Olive mill wastewater · Grape pomace · Phenolic compound · Response surface methodology · Solvent extraction

Introduction

Nowadays, most of agri-industrial wastes are regarded as biomass-derived by-products to be valorized rather than large amount of bulks to be treated. Olive oil and wine production industries generate liquid and solid wastes similar to each other in their chemical compositions. The phenolic compounds contained in olive mill wastewater (OMW) and in grape pomace (GP) have strong antioxidant properties and extensive health-beneficial effects [1, 2]. Therefore, recovery of biophenols from olive and grape processing by-products is of great interest to benefit from them as natural antioxidants. In the present study, we aimed to develop an integrated process for collective recovery of phenolic compounds from OMW and GP, which would also benefit easier biodegradation of OMW in a further process. Response surface methodology (RSM) was employed to optimize the process parameters.

Global olive oil production for the year 2012 is reported to be 3,320,023 tons [3]. The production process of olive oil usually yields next to 20 % olive oil, a 30 % semi-solid waste and 50 % aqueous liquor [4]. The liquid effluent of olive oil process, which is OMW, amounts to 0.5–1.5 m³ per 1000 kg of olives depending on the process used [5]. The acidic property (pH 3–6), high phenolic content (0.5–24 g L⁻¹), and high degree of organic pollution (chemical oxygen demand; COD up to 220 g L⁻¹ and biochemical oxygen demand; BOD = up to 110 g L⁻¹) limit OMW to be discharged directly to the receiving environment. Despite its recalcitrance characteristics as

✉ A. Karakaya
alper.karakaya@ankara.edu.tr

A. Kenar
kenar@science.ankara.edu.tr

Y. Laleli
ylaleli@duzen.com.tr

S. Takaç
takac@eng.ankara.edu.tr

¹ Biotechnology Institute, Ankara University, 06100 Ankara, Turkey

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Ankara University, 06100 Ankara, Turkey

³ Düzen Laboratories, Atatürk Bulvarı, No. 237/39, 06680 Ankara, Turkey

⁴ Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, 06100 Ankara, Turkey

wastewater, OMW is a valuable source of natural compounds. It has considerable amounts of sugars, phenols, tannins, proteins and lipids. About 53 and 45 % of the phenolic content of the olive fruits remain in the aqueous phase and in the olive cake, respectively, during processing of olive to oil [4]. More than 30 phenolic compounds have been identified in OMW [2]. These compounds are simple biophenols such as gallic acid, cumaric acid, caffeic acid, vanillic acid, tyrosol, hydroxytyrosol and more complex biophenols such as secoiridoids (oleuropein and ligstroside) [6]. Polyphenols of OMW gain a considerable attention by the cosmetic and pharmaceutical industries as well as in food processing and food product conservation [7]. Most of them have antioxidant, antimicrobial, cardioprotective, antiatherogenic, chemopreventive, antihypertensive, and antiviral activities [2]. During recent years, numerous reports that describe several methods to recover phenolic compounds from OMW have appeared in literature [8–11]. In these studies, solvent or supercritical fluid extraction, membrane processes and chromatographic separations are the fundamental processes employed either individually or in integrated modes.

The wine-making industry also includes a rich in polyphenol waste namely grape pomace, the press residue remaining when grapes are processed. The worldwide production of grape is around 67B tons [12] and about 15 % by weight (wet up to 25–45 %) of the processed grape is grape pomace [13]. Despite its potential uses, GP is still largely used as soil conditioner or for compost production [14]. The pomace consists of skins, seeds and stems and contains up to 15 % sugars, 0.9 % phenolics/pigments (red grape pomace), 0.05–0.08 % tartarate and 30–40 % fibre. Grape seeds contain 4–6 % phenolics and 12–17 % oil very rich in linoleic acid-omega-6 fatty acid (76 %) [13]. Phenolic compounds contained in GP have attracted interest to be used in food, pharmaceutical and cosmetic industries since they possess antioxidant activity and antimicrobial, antiviral, and anti-inflammatory properties [1, 15, 16]. The activity of polyphenols from GP as food lipid antioxidants was also reported [17]. Phenolic compounds in grape may be classified into phenolic acids (gallic, p-coumaric, caffeic, chlorogenic, ferulic and sinapic acids), flavonoids (catechins and procyanidins), proanthocyanidins, stilbenes (resveratrol), and lignans [18, 19]. Similar to most vegetable wastes, the use of grape pomace for animal feed, through bioconversion or distillation or even through maceration for compositing or incineration may cause several problems [15]. Therefore, extraction of polyphenols appears to be the most effective method to value GP [1, 20–22].

The similar phenolic compositions of OMW and GP provide us a stimulus for recovery of natural antioxidants from these food wastes collectively. In the present study,

we have developed an integrated process composed of two sequential steps. The first step was the transfer of phenolic compounds contained in OMW to GP by treating GP by OMW and the second step was the recovery of polyphenols from treated-GP. The conditions of both steps were optimized by employing RSM. The resultant mixture of polyphenol extract was identified with its total phenol (TP) concentration and total antioxidant (TA) activity. A secondary aim of this process was to obtain OMW with low phenol content which was benefic for further cultivation of *Rhodotorula glutinis* cells and easier biodegradation of OMW.

Materials and Methods

Olive Mill Wastewater, Grape Pomace and Chemicals

Olive mill wastewater was obtained from Taylieli Olive Oil Company (Burhaniye, Turkey), where three-phase centrifugation method was used for oil extraction. The wastewater generated in 2011 harvest season was stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and subjected to centrifugation ($12,000\times g$, $4 + \text{C}$, 10 min) to remove the solid materials prior to utilization. The pH and total phenol concentration of the OMW stock were pH 4.7 and $\text{TP} = 1056\text{ mg L}^{-1}$, respectively. Pressed grape pomace (GP) from red winemaking was kept at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. The pomace samples were oven-dried at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h before grinded. The chemicals and solvents were of reagent or HPLC grade and purchased from commercial suppliers (Merck, Germany; Sigma-Aldrich, USA).

Treatment of Grape Pomace with Olive Mill Wastewater

Grape pomace was grinded in a food processor (Krups KA950, Germany). Treatment of GP with OMW was carried out in screw cap flasks in an orbital shaker (Shel Lab S16R-2, USA) at 150 rpm. Grinding time of GP (s), OMW/GP ratio (mL g^{-1}), treatment time (min) and treatment temperature ($^{\circ}\text{C}$) were the parameters investigated for their effects on dephenolization of OMW.

Recovery of Phenolic Compounds

After treatment, the resultant mixture was filtered and the precipitate was washed with distilled water and acidified with concentrated HCl to pH 1.5. Acidified treated-GP was oven-dried at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Residual lipids were removed by using hexane at the hexane to treated-GP ratio of 10:1 (v/w) to increase the extraction yield before solvent extraction as described elsewhere [21]. The treated-GP was

then oven-dried at 60 °C for another 24 h. The most effective solvent for the recovery of phenolics from treated-GP was selected by the extractions using different organic solvents at the solvent to treated-GP ratio of 10:1 (v/w) for 24 h. The optimization of solvent to treated-GP ratio (mL g^{-1}) and extraction temperature (°C) for the highest recovery of phenolics from treated-GP was performed at 150 rpm for 5 h. After extraction, the liquid phase was separated from the solid by centrifugation (HettichRotina 35 R) and prepared for the analyses.

Biodegradation of OMW

Rhodotorula glutinis (DSM 70398) was used in the study. The yeast was cultivated as described elsewhere [23]. The biodegradation experiments were carried out in OMW and treated-OMW both diluted to 25 % with distilled water and supplemented with urea (2.27 g L^{-1}) at 30 °C and 150 rpm conditions.

Total Phenol Concentration

Total phenolic content was determined spectrophotometrically (Shimadzu 1601, Japan) by using Folin Ciocalteu's method [24]. The samples were prepared for phenol analysis as described previously [23]. Dephenolization degree of OMW was calculated according to the following equation:

$$\% \text{Dephenolization} = ((C_{TP0} - C_{TP})/C_{TP0}) \times 100$$

where C_{TP0} and C_{TP} are the initial and final total phenol concentrations of the sample, respectively.

Free Radical-Scavenging Activity

Total antioxidant activity of extracts was determined in terms of free radical scavenging activity on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [25]. The sample in 4 mL methanol was mixed with 10 mL of $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ DPPH solution in methanol and the absorbance at $\lambda = 520 \text{ nm}$ was measured (A_{sample}) (Shimadzu UV-1601 UV) after 30 min in the dark at room temperature. The procedure was repeated without sample and served as control (A_{control}). Percent inhibition of DPPH radicals (%inh.) was then calculated according to the equation:

$$\% \text{inh.} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}) \times 100$$

Cell Concentration

Cell concentration was determined by dry weight after being centrifuged, washed with distilled water and dried at 85 °C to constant weight.

HPLC Analysis

Phenolic composition analysis of the extracts was performed by an HPLC (Shimadzu LC-10AD) according to the operation protocol of the International Olive Council [26].

Experimental Design and Data Processing

Response surface methodology has been widely used for developing, improving and optimizing processes. This technique, comprising statistical and mathematical tools, provides possible interaction effects between variables, suggests mathematical models that define the process and gives optimum conditions to improve the process. In this work, factorial and central composite designs were performed in order to apply RSM. Design of experiments, data analyzing and optimization of experiment conditions were done by using Design Expert Software (version 9).

Results and Discussion

Treatment of GP with OMW

In the treatment process of GP with OMW, the effects of variables on the transfer of phenolics contained in OMW to GP were investigated through factorial and central composite designs. Under the optimum conditions predicted by models, experiments were carried out to verify the validity and adequacy of the predictive models.

In the first set of factorial designs (FD-I), an experimental plan based on a four factor/two level (2^4) design and consisted of 16 experimental runs was employed. The independent variables were grinding time of GP (30 and 120 s), OMW/GP ratio (5 and 10 mL g^{-1}), treatment time of OMW with GP (30 and 120 min) and treatment temperature (20 and 30 °C). The response was dephenolization degree of OMW. Analysis of variance (ANOVA) showed that only OMW/GP ratio was significant model term.

By keeping the variable OMW/GP ratio at the constant value of 5 mL g^{-1} , a second set of factorial designs (FD-II) was performed. In this design, the experimental plan was based on a three factor/two level (2^3) design and consisted of 8 experimental runs. The independent variables were grinding time of GP (30 and 240 s), and treatment temperature (10 and 30 °C) and treatment time of OMW with GP (30 and 240 min). The results of ANOVA analysis showed that only treatment time was significant model term.

After determining that the OMW/GP ratio and treatment time more affected dephenolization of OMW than grinding time of GP and treatment time, a central composite design (CCD-I) was employed to find out the optimal values of

Table 2 CCD-II setting in the original and coded forms of the independent variable (X_i) and the corresponding experimental response (Y)

Run	X Treatment time (min)	Y Dephenolization of OMW (%)
1	30 (-1)	53.60
2	30 (-1)	53.30
3	122.5 (-0.5)	62.00
4	307.5 (+0.5)	66.00
5	400 (+1)	67.00
6	400 (+1)	65.00
7	215 (0)	65.00

Values in parenthesis are the coded forms of variables; responses are means of two analyses

At the optimum point estimated by the model (Eq. 2), 66.91 % of total phenolics would be removed from OMW. To verify the model, five independent experiments were carried out and mean value for dephenolization was found to be 64.41 % which was very close to that calculated using the model.

As a result of the sequential experimental designs employed for homogenization of OMW with GP, grinding time of 240 s, OMW/GP ratio of 3 mL g⁻¹, treatment time of 323 min, and treatment temperature of 30 °C were found to be the values that yielded the maximum dephenolization degree of OMW. More than half of phenolic compounds in OMW were successfully transferred to GP. Grape pomace and OMW treated under these conditions were then used in subsequent processes that were recovery of phenolics from treated-GP and biodegradation of remaining OMW, respectively.

In literature, there are several reports on the removal of phenolics from OMW by adsorption using several adsorbents. Among them, activated carbons [27, 28] and resins [29, 30] were the most commonly used adsorbents. Low cost adsorbents such as olive pomace [31] and wheat bran [32] were also tested to remove phenolics from OMW. However, the present work is the first one that uses grape pomace to dephenolize OMW, and furthermore benefits to collect phenolic compounds of OMW and GP collectively on pomace. It is also noteworthy to mention that some phenolics might have also transferred from GP to OMW during treatment. However, more than 60 % decrease in total phenolic concentration of OMW was considerably satisfactory to perform sequential studies on recovery of phenolics from treated GP.

The first part of this study showed that GP could be a promising natural adsorbent material for biophenol removal from OMW. Location and harvesting time based

similarities of these two agricultural by-products make the proposed process more feasible in industrial scale.

Recovery of Phenolic Compounds from Treated-GP

Ethyl alcohol:water (1:1), methyl alcohol, ethyl alcohol, acetone and ethyl acetate were tested as solvents for their recovery yields of total phenols from treated-GP prepared under optimum treatment conditions. The recovery yield with ethyl alcohol: water (1:1) was found to be the highest (Fig. 2). The efficiency of solvents to recover TP was found to be in the following order (mg g⁻¹ treated-GP): ethyl alcohol:water (1:1) 6.27; methyl alcohol 4.03; ethyl alcohol 1.88; acetone 1.50; ethyl acetate 0.31; ethyl-alcohol:water (1.1) with untreated-GP 5.07.

The polarity of organic solvents affects the efficiency of extraction of phenolics from plants [33]. Polyphenols are easily solubilized in polar protic media such as hydroalcoholic solutions [1]. In literature, almost all of the reports on the recovery of phenolics from GP and OMW accorded that alcohols were the best solvent type for the extraction of phenolics [1, 9, 34, 35]. On the other hand, solvents, such as methanol, ethanol, propanol, acetone, ethylacetate, dimethylformamide and their combinations were used for the extraction of phenolics, often with different proportions of water [33]. It was reported that aqueous solutions of ethanol, methanol or acetone were better than a single-compound solvent system for the extraction of total phenols from Muscadine grape seed powder [36]. Extraction with a mixture of ethyl alcohol to water 1:1 from winery wastes yielded a maximum phenol contents [21]. The addition of water to ethanol improved extraction rate whereas too high water content led to concomitant extraction of other compounds [35]. The use of organic/alcoholic solvent/water mixtures for the extraction of grape byproducts was addressed to the increase in the

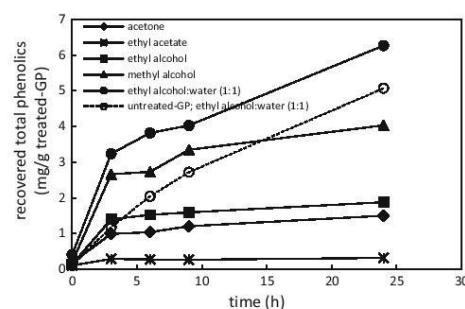


Fig. 2 Effect of solvent type and extraction time on the recovery of total phenolics from treated-GP (solvent/treated-GP = mL g⁻¹), T = 30 °C, N = 150 rpm)

these two variables to give the highest degree of dephenolization. In these experiments, grinding time of GP (240 s) and treatment temperature (30 °C) were kept at constant values. Table 1 shows the original and coded levels of the independent variables used in the experimental design. ANOVA analysis of the data obtained from the experiments showed that only X_1 (OMW/GP ratio) was significant model term.

The quadratic model fitted on the experimental data for dephenolization degree of OMW is given in coded forms by Eq. (1):

$$Y = +9.39006733 + 9.541996561 X_1 + 0.176948763 X_2 - 0.009391785 X_1 X_2 - 1.604608761 X_1^2 - 0.000153072 X_2^2 \quad (1)$$

Figure 1 shows the response surface plot for the effects of OMW/GP ratio and treatment time on the dephenolization degree of OMW. A decrease was observed in dephenolization degree of OMW with increasing OMW/GP ratio. The increase in dephenolization degree of OMW with increasing treatment time, however, appeared to reach a maximum at a higher treatment time than tested values.

The optimum value for the dephenolization degree of OMW was also estimated by the model given by Eq. (1). According to the model, 62.67 % of OMW would be dephenolized at OMW/GP ratio of 2.11 mL g⁻¹ and treatment time of 528 min. Both of these values were out of ranges tested. In practice, however, OMW/GP ratio below 3 was not workable since the mixture became highly dense to maintain an effective mixing. Therefore, the next central composite design (CCD-II) was performed at OMW/GP = 3 mL g⁻¹ to find out the effect of treatment

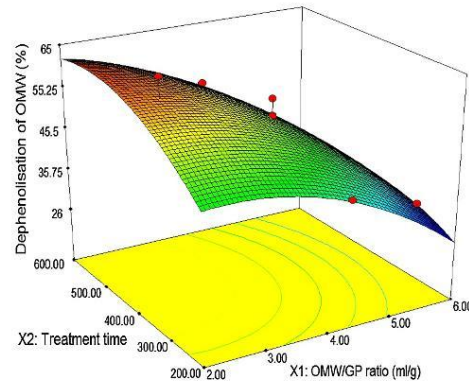


Fig. 1 Response surface plot for the effects of OMW/GP ratio (X_1) and treatment time (X_2) on dephenolization of OMW (Y) (CCD-I)

time on the dephenolization of OMW (%). In this experimental set, the grinding time of GP was 240 s and the treatment temperature was 30 °C. The original and coded levels of the independent variable (treatment time) and the corresponding response (dephenolization degree of OMW) are given in Table 2. ANOVA analysis of the data obtained from the experiments showed that X (treatment time) and X^2 were significant model terms.

Experimental data fitted to a quadratic model for dephenolization of OMW is given in coded forms by Eq. (2).

$$Y = +50.84057819 + 0.100900765 X - 0.000158381 X^2 \quad (2)$$

Table 1 CCD-I setting in the original and coded forms of the independent variables (X_1 , X_2) and the corresponding experimental response (Y)

Run	X_1 OMW/GP ratio (mL g ⁻¹)	X_2 Treatment time (min)	Y Dephenolization of OMW (%)
1	2.87 (-1)	242.16 (-1)	48.33
2	5.63 (+1)	242.16 (-1)	34.96
3	2.87 (-1)	557.84 (+1)	55.63
4	5.63 (+1)	557.84 (+1)	34.07
5	2.50 (-1.27)	400 (0)	64.90
6	6.00 (+1.27)	400 (0)	30.73
7	4.25 (0)	200 (-1.27)	42.58
8	4.25 (0)	600 (+1.27)	50.63
9	4.25 (0)	400 (0)	48.06
10	4.25 (0)	400 (0)	55.57
11	4.25 (0)	400 (0)	51.76
12	4.25 (0)	400 (0)	48.36
13	4.25 (0)	400 (0)	51.52

Values in parenthesis are the coded forms of variables; responses are means of two analyses

permeability of cell tissue, providing a better mass transfer and the recovery of water-soluble compounds [1].

In the present study, among the solvents with different polarities (log *P* value for; ethyl alcohol = −0.24, methyl alcohol = −0.76, acetone = −0.23 and ethyl acetate = 0.68) [37], higher recovery of total phenolics was obtained in the solvents with higher polarities. The presence of water in the solvent also increased the extraction yield consisted with the literature mentioned above.

Total antioxidant activity of the extracts appeared to be consisted with the amount of phenolics recovered by the solvents. Total activity of the extracts followed the order of (% inhibition): ethyl alcohol:water (1:1) 85; methyl alcohol 83; ethyl alcohol 78; acetone 71; ethyl acetate 12; ethyl-alcohol:water (1.1) with untreated-GP 86. In HPLC analyses, the presence of main phenolic compounds of OMW namely hydroxytyrosol, tyrosol, caffeic acid, vanillic acid, syringic acid, cumaric acid, luteolin and apigenin were determined in the extracts. The amount of hydroxytyrosol, which has the highest antioxidant activity among them, followed the order of: ethyl alcohol:water (1:1) 23 %, ethyl alcohol 21 %; methyl alcohol 13 %; ethyl acetate 7 % and acetone 5 %. This result showed that the antioxidant activity also depended on the phenolic contents of the extracts. On the other hand, lower recovery of phenolics from untreated-GP was obtained in comparison with the recovery from treated-GP under the same extraction conditions; however, the total antioxidant activity did not change. This results also suggested that the antioxidant activity did not depend only on the total phenol concentration but also on the nature of phenolic compounds recovered [38, 39].

After determining that ethyl alcohol:water (1:1) was the most effective solvent, a central composite design (CCD-III) was employed to optimize the solvent to treated-GP ratio and extraction temperature in the recovery of phenolics from treated-GP. In this experimental set, 13 runs were performed at the fixed extraction time of 5 h. Table 3 shows the original and coded levels of the independent variables and the corresponding response, which was recovered total phenolics (mg g^{−1} treated-GP). ANOVA analysis of the data obtained from the experiments showed that *X*₁ (solvent/treated-GP ratio), *X*₂ (extraction temperature) and *X*₁² were significant model terms.

The resulting quadratic model represented the experimental data for the recovered phenolics is given by Eq. (3).

$$Y = -3.50027 + 0.508926 X_1 + 0.312881 X_2 - 0.00261 X_1 X_2 - 0.00663 X_1^2 - 0.00191 X_2^2 \quad (3)$$

Figure 3 shows the response surface plot for the effects of solvent to treated-GP ratio and extraction temperature on the recovered phenolics from treated-GP. The increase in solvent/treated-GP ratio increased the recovered phenolics reaching a plateau at high ratios. Although the increase in temperature increased the recovered phenolics, higher temperatures than tested values were not suitable to be examined since they would lead to a decrease in the antioxidant property of the recoveries.

The model given by Eq. (3) was used to estimate the optimum value of recovered phenolics from treated-GP. According to the model, for solvent/treated-GP ratio of 30 mL g^{−1} and temperature of 43 °C, the recovered total phenolics would be 12.23 mg g^{−1} treated-GP. The optimized conditions were then used in two independent

Table 3 CCD-III setting in the original and coded forms of the independent variables (*X*₁, *X*₂) and the corresponding experimental response (*Y*)

Run	<i>X</i> ₁ Solvent/treated-GP ratio (mL g ^{−1})	<i>X</i> ₂ Extraction temperature (°C)	<i>Y</i> Recovered total phenols (mg g ^{−1})
1	14 (−1)	15 (−1)	6.51
2	40 (+1)	15 (−1)	8.99
3	14 (−1)	45 (+1)	11.45
4	40 (+1)	45 (+1)	11.88
5	10.53 (−1.27)	30 (0)	7.24
6	43.47 (+1.27)	30 (0)	10.29
7	27 (0)	10.99 (−1.27)	7.53
8	27 (0)	49.01 (+1.27)	12.23
9	27 (0)	30 (0)	11.26
10	27 (0)	30 (0)	10.54
11	27 (0)	30 (0)	10.58
12	27 (0)	30 (0)	11.87
13	27 (0)	30 (0)	10.82

Values in parenthesis are the coded forms of variables; responses are means of two analyses

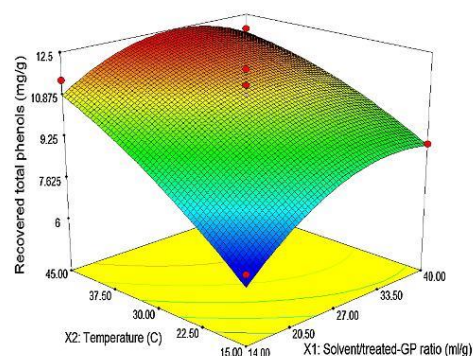


Fig. 3 Response surface plot for the effects of solvent/treated-GP ratio and temperature on the recovered total phenols (CCD-III)

extractions to validate the predicted model given by Eq. (3). The recovery of 11.97 mg g^{-1} treated-GP total phenols showed the predictability of the model for the extraction of phenolics from treated-GP with a high confidence. The total antioxidant activity of recovered phenolics from treated-GP under the optimum conditions was found to be 81 % (inh.).

In the second part of this study, the solvent extraction process resulted in a good mixture of phenolics. The combination of natural biophenols having different origins might be more beneficial than particular ones individually. Some researchers showed the synergistic and antagonistic effects of phenolic mixtures [40, 41]. The effect of the grape and olive extract mix on the inflammation-associated osteoarthritis processes was also reported [42]. Therefore, co-valorization of OMW and GP has a potential application in industrial scale.

Cultivation of *Rhodotorula glutinis* and Biodegradation of OMW

Rhodotorula species are important for food and pharmaceutical industries since they are capable of producing high amounts of carotenoids, enzymes, fatty acids and oils [43]. In our previous studies, we have also used *Rhodotorula glutinis* in successful biodegradation of OMW [23, 44]. In the present study, comparative experiments were carried out by *R. glutinis* using OMW and treated-OMW to evaluate the effect of pre-treatment of OMW with GP on the cultivation and biodegradation performance of the yeast. After 120 h of biodegradations, total phenol concentration in OMW and treated-OMW decreased by 53 and 55 %, respectively. The concentrations of the remaining TP in OMW and in treated-OMW were 61 and 41 mg L^{-1} ,

respectively. In the whole process, 30 % higher TP removal was obtained when OMW was treated with GP if compared to untreated-OMW. On the other hand, the cells grew up to 4.4 mg mL^{-1} concentration in treated-OMW whereas the highest cell concentration was 2.9 mg mL^{-1} in OMW. This may be due to removal of phenolic compounds in OMW that inhibited yeast growth during the treatment. The overall results have indicated that treatment of OMW with GP could be employed not only to recover phenolics of two food wastes collectively, but also to benefit a subsequent biodegradation of OMW. Easier cultivation of *R. glutinis* in treated-OMW would also yield to produce value-added products such as pigments from an industrial waste.

In this part of the study, it was shown that *R. glutinis* cells were successfully cultivated in OMW, of which phenolics content was decreased before cultivation. Pretreatment of OMW with GP would make OMW a more favorable substrate for also other cells to degrade OMW.

Conclusion

Olive mill wastewater and grape pomace constitute inexpensive sources for the extraction of polyphenols. Although numerous studies have been reported that recover phenolic compounds from these wastes individually, no work appears in literature to value OMW and GP in the same process. A tandem homogenization-extraction process suggested in this paper provides the recovery of considerably high amount of total phenolics from OMW and GP collectively; and also an easier biodegradation of OMW in a subsequent process. Easier cultivation of yeasts in treated-OMW compared to OMW was another benefit of the process to valorize wastewater for value-added products. In the whole process, sequential treatment and cultivation steps resulted in about 80 % decrease in total phenol concentration of OMW. In industrial application of the process, the remaining part of OMW after cultivation can be safely sent to evaporation ponds, the cultivated cells can be used as single cell protein for animal feed and the remaining part of GP can be used as fertilizer or bioenergy source. The employment of RSM in determining the optimum values appeared to be a satisfactory and dependable route in homogenization and extraction processes. Co-valorization of these by-products yields recovering of fine chemicals and offers more convenient effluent for further remediation processes. This approach also facilitates to maintain a sustainable development with regard to waste management strategy and to reduce carbon footprint of olive oil and wine production lines.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support provided by The Scientific and Technical Research Council of Turkey (TUBITAK-MAG 111M441). Grape pomace was kindly provided by Prof. Dr. R. Ertan Anlı (Ankara University Department of Food Engineering).

References

- Fontana, A.R., Antoniolli, A., Bottini, R.: Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **61**(38), 8987–9003 (2013). doi:10.1021/jf402586f
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R.: Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* **53**(4), 823–837 (2005)
- FAOSTAT: Global olive oil production for the year 2012. <http://faostat.fao.org/site/636/DesktopDefault.aspx?PageID=636#ancor>. Accessed June 25 2014
- Niaounakis, M., Halvadakis, C.P.: Foreword to the second edition. In: Michael, N., Constantinos, P.H. (eds.) *Waste Management series*, vol. 5, pp. xv–xvi. Elsevier, Amsterdam (2006)
- Paraskeva, P., Diamadopoulos, E.: Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**(9), 1475–1485 (2006). doi:10.1002/jctb.1553
- Bianco, A., Uccella, N.: Biophenolic components of olives. *Food Res. Int.* **33**(6), 475–485 (2000)
- Brozzoli, V., Crognale, S., Sampietro, I., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M.: Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresour. Technol.* **100**(13), 3395–3402 (2009). doi:10.1016/j.biortech.2009.02.022
- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., Sacchi, R.: Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem.* **104**(2), 858–867 (2007)
- Galanakis, C.M., Tomberg, E., Gekas, V.: Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**(8), 1148–1155 (2010)
- He, J., Alister-Briggs, M., Lyster, T.D., Jones, G.P.: Stability and antioxidant potential of purified olive mill wastewater extracts. *Food Chem.* **131**(4), 1312–1321 (2012)
- Takaç, S., Karakaya, A.: Recovery of phenolic antioxidants from olive mill wastewater. *Recent Pat. Chem. Eng.* **2**, 230–237 (2009)
- FAOSTAT: Global grape production by the year 2012. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Accessed June 25 2014
- Wadhwa, M., Bakshi, M.P.S.: Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. RAP Publication, Bangkok (2013)
- Kammerer, D.R., Scheiber, A., Carle, R.: Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace: a review. *Journal of applied botany and food quality* **79**(3), 189–196 (2005)
- Spatafora, C., Tringali, C.: Valorization of vegetable waste: identification of bioactive compounds and their chemo-enzymatic optimization. *Open Agric. J.* **6**, 9 (2012)
- Torres, J.L., Varela, B., García, M.T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J.J., Cascante, M., Sort, X., Bobet, R.: Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J. Agric. Food Chem.* **50**(26), 7548–7555 (2002)
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M.: Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem.* **66**(2), 209–215 (1999). doi:10.1016/S0308-8146(99)00046-1
- Nile, S.H., Kim, S.H., Ko, E.Y., Park, S.W.: Polyphenolic contents and antioxidant properties of different grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) cultivars. *BioMed Res. Int.* **2013**, 718065 (2013). doi:10.1155/2013/718065
- Yu, J., Ahmedna, M.: Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**(2), 221–237 (2013)
- Fiori, L., de Faveri, D., Casazza, A.A., Perego, P.: Grape by-products: extraction of polyphenolic compounds using supercritical CO₂ and liquid organic solvent—a preliminary investigation. *CyTA J. Food* **7**(3), 163–171 (2009). doi:10.1080/11358120902989715
- Lafka, T.-I., Sinanoglou, V., Lazos, E.S.: On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* **104**(3), 1206–1214 (2007)
- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A.: Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour. Technol.* **87**(1), 41–44 (2003)
- Karakaya, A., Laleli, Y., Takaç, S.: Development of process conditions for biodegradation of raw olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **75**, 75–82 (2012). doi:10.1016/j.ibiod.2012.09.005
- Ayed, L., Assas, N., Sayadi, S., Hamdi, M.: Involvement of lignin peroxidase in the decolorization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**(1), 7–11 (2005). doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01626.x
- Fki, I., Allouche, N., Sayadi, S.: The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chem.* **93**(2), 197–204 (2005)
- Council, I.O.: Determination of biophenols in olive oils by HPLC. In: *COI/T.20/Doc no. 29* (2009)
- Azzam, M.-O.J., Al-Malah, K., Al-Gazzawi, Z., Al-Omari, S.A.: Dynamic treatment response of olive mills wastewater using series of adsorption steps. *CLEAN Soil Air Water* **38**(9), 822–830 (2010). doi:10.1002/clean.200900035
- Padovani, G., Pintucci, C., Carlozzi, P.: Dephenolization of stored olive-mill wastewater, using four different adsorbing matrices to attain a low-cost feedstock for hydrogen photo-production. *Bioresour. Technol.* **138**, 172–179 (2013). doi:10.1016/j.biortech.2013.03.155
- Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Mikros, E., Tsarabopoulos, A., Gikas, E., Spanos, I., Manios, T.: A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **55**(7), 2671–2676 (2007)
- Scoma, A., Bertin, L., Zanolli, G., Fraraccio, S., Fava, F.: A physicochemical-biotechnological approach for an integrated valorization of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* **102**(22), 10273–10279 (2011). doi:10.1016/j.biortech.2011.08.080
- Patelas, A., Elia, I., Petalas, A.V., Halvadakis, C.P.: Use of a low-cost agricultural by-product for the adsorption of total phenols contained in olive-mill wastewater. In: *International Conference on Environmental Science and Technology, Kos island, Greece 2007*
- Achak, M., Hafidi, A., Mandi, L., Ouazzani, N.: Removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by adsorption onto wheat bran. *Desalin. Water Treat.* **52**(13–15), 2875–2885 (2014)

33. Naczek, M., Shahidi, F.: Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**(5), 1523–1542 (2006). doi:[10.1016/j.jpba.2006.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002)
34. Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A.: Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep. Purif. Technol.* **83**, 173–179 (2011). doi:[10.1016/j.seppur.2011.09.036](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036)
35. Spigno, G., De Faveri, D.M.: Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.* **78**(3), 793–801 (2007). doi:[10.1016/j.jfoodeng.2005.11.020](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.020)
36. Yilmaz, Y., Toledo, R.T.: Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **19**(1), 41–48 (2006)
37. Faber, K.: *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th edn. Springer, New York (2011)
38. Azaizah, H., Halahlih, F., Najami, N., Brunner, D., Faulstich, M., Tafesh, A.: Antioxidant activity of phenolic fractions in olive mill wastewater. *Food Chem.* **134**(4), 2226–2234 (2012). doi:[10.1016/j.foodchem.2012.04.035](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.035)
39. El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A.: Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chem.* **132**(1), 406–412 (2012)
40. Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., Montedoro, G.F.: Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**(11), 1589–1593 (1996). doi:[10.1007/bf02523530](https://doi.org/10.1007/bf02523530)
41. Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., Berset, C.: Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**(10), 1007–1012 (2003). doi:[10.1007/s11746-003-0812-z](https://doi.org/10.1007/s11746-003-0812-z)
42. Mével, E., Merceron, C., Masson, M., Urban, N., Beck, L., Guicheux, J.: The in vitro effects of procyanidins and hydroxytyrosol-containing grape and olive extract mix on the inflammation-associated osteoarthritis processes. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, S323 (2014). doi:[10.1016/j.joca.2014.02.599](https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.02.599)
43. Hernández-Almanza, A., Cesar Montanez, J., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N.: *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Biosci.* **5**, 64–72 (2014). doi:[10.1016/j.fbio.2013.11.007](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007)
44. Karakaya, A., Bozkoyunlu, G., Laleli, Y., Takaç, S.: Development of pH adjustment-based operational strategy to increase total phenol removal rate in biodegradation of olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*. *Desalin. Water Treat.* (2013). doi:[10.1080/19443994.2013.823357](https://doi.org/10.1080/19443994.2013.823357)

Industry–university partnership for the simultaneous biotechnological degradation and value enhancement of olive mill wastewater

Alper Karakaya^{1, 2*}, Yahya Laleli², Serpil Takaç³

¹ Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara, 06100, Turkey

² Düzen Laboratories, Atatürk Bulvarı, No 237/39, 06680, Ankara, Turkey

³ Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ankara University, Ankara, 06100, Turkey

* Corresponding author: Tel.: 00.90.312.203 34 34; fax: 00.90.312.212 15 46;
e-mail: alper.karakaya@gmail.com

Abstract

Olive mill wastewater poses a serious problem for olive oil producers in Mediterranean countries. As part of an industry–university collaborative initiative, this by-product was subjected to several microbial treatments to lower its high phenol content and simultaneously produce useful spinoff products. Two non-conventional yeasts – *Rhodotorula glutinis* and *Debaryomyces hansenii* – were used for the biodegradation of the olive mill wastewater in batch, fed-batch and continuous bioreactors. More than 85% of the total phenol content of the olive mill wastewater was removed. The resultant single cell oil and cell biomass were proposed as value-added biodegradation products for potential use in the energy sector and as a food supplement, respectively.

Introduction

Since 2009, a biotechnological process generating useful spinoff products from the dephenolisation of olive mill wastewater (OMW) has been developed as part of an industry–university partnership. The collaboration has entailed conducting R&D projects to treat OMW generated by the olive oil processing plant owned by the Düzen Company in Burhaniye (Laleli Olive Oil Company). Specifically, the OMW has been subjected to several treatments to reduce its phenolic content prior to its disposal on the land or use in the production of microbial products. These research activities have been supported by national projects funded by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (Takaç, 2015b; Takaç, 2012; Takaç, 2011) and Ankara University (Takaç, 2013; Takaç, 2015a). MSc and PhD theses, international papers and congress presentations are other academic outputs of the partnership. In the light of the results of laboratory-scale experiments carried out in Ankara University, studies are now aimed at designing, setting up and operating a

pilot-scale bioprocess unit near the olive oil processing plant at Burhaniye.

The aqueous by-product of olive oil production, known as OMW for short, is a serious problem for manufacturers in Mediterranean countries owing to its high phenolic content and organic load. It is estimated that the olive oil industry produces 30 million m³ of wastewater annually (Karakaya et al., 2012). The generation of this huge amount of wastewater in a short production season triggers severe ecological problems when discharged into the environment without treatment. High degrees of chemical oxygen demand (COD= 40–220 g/L) and phenolic content (0.5–24 g/L) lead to oxygen depletion in underground and surface water and have toxic effects on plant and microbial strains (Karakaya et al., 2012). The pollutant effect of 1 m³ of OMW is reported to be equivalent to 200 m³ of municipal waste (El-Abbassi et al., 2012).

In these biodegradation studies, two different non-conventional yeasts, namely *Rhodotorula glutinis* and

operations using free and immobilised cells, respectively (Karakaya et al., 2013).

The other *D. hansenii* yeast used for the biodegradation of the OMW was cultivated in diluted OMW media containing different concentrations of urea and ammonium sulphate as nitrogen supplements and sodium chloride. The cells grew in all the medium compositions and decreased total OMW phenol content by up to 60 %. The highest value recorded for dry biomass was 1.2 g/L. In all of the media, the pH increased with cell growth and total phosphorus removal, thus showing that it could also be considered an indicator of biodegradation by both *D. hansenii* and *R. glutinis*. Biomass accumulation also increased with sodium chloride concentration in the OMW cultivation medium. Moreover, the addition of 1.3% sea water to the OMW resulted in a very high total phenol removal rate (73%) and a biomass accumulation value of 0.9 g/L after 72 hours of cultivation (Figure 1). The most interesting result of the *D. hansenii* studies is that sea water can be used to dilute OMW prior to biodegradation by this halophilic yeast (Karakaya et al., 2011).

In the case of fed-batch OMW biodegradation by *D. hansenii*, cells were inoculated into 50% OMW medium and the increase in medium pH was monitored. When the medium pH increased to 8, undiluted raw OMW was added to the cultivation medium. Total OMW concentration increased to 91% in the flask and a rate of 42% total phenol degradation was recorded. In the continuous operation with *D. hansenii*, 55% total phenol degradation was achieved (Karakaya et al., 2011).

The aromatic degradation ability of microorganisms is associated with the production of extracellular oxidase enzymes such as laccases, peroxidases, and tyrosinases (El Hajjouji et al., 2008). To explain the decrease in total phenol concentration we conducted biodegradation studies to monitor the variations in the activities of phenol-degrading enzymes and in the concentrations of phenolic compounds throughout the cultivations. The enzyme activities of tyrosinase monophenolase, tyrosinase diphenolase, laccase, manganese peroxidase and tannase enzymes by *R. glutinis* and *D. hansenii* were monitored. The variations in tyrosol, hydroxytyrosol, catechol, 4-methylcatechol and vanillic acid concentrations were monitored over time. The results showed that *R. glutinis* resulted in tyrosinase monophenolase, tyrosinase diphenolase and laccase activity in the OMW cultivation medium, whereas *D. hansenii* resulted in tyrosinase diphenolase enzyme activity. The yeasts degraded phenolic compounds in OMW to varying degrees according to their different enzyme activity (Akardere, 2012).

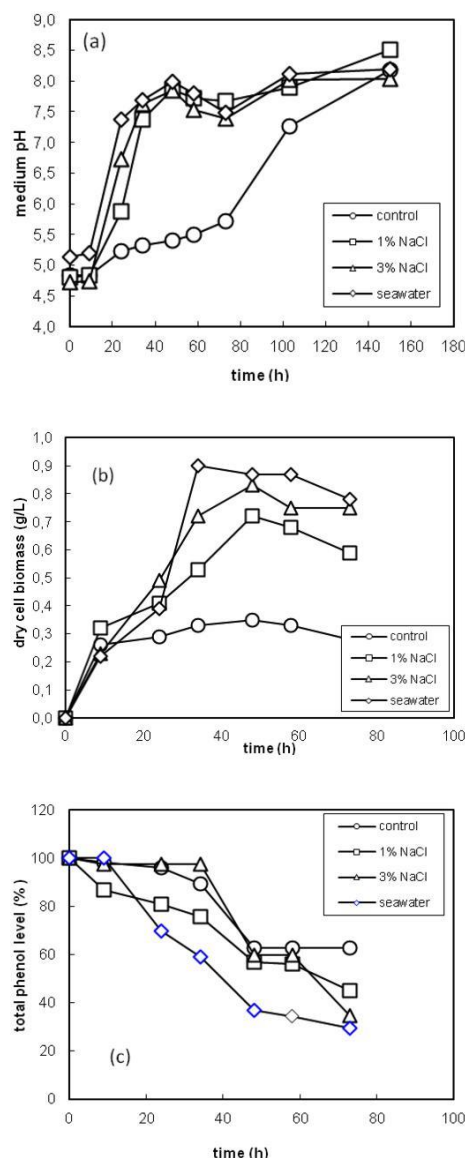


Figure 1: Effect of sea water on olive mill wastewater treatment by *D. hansenii* (OMW: pH=4.6; total phenol conc=32 mg/L; yeast extract, ammonium sulphate, seawater: 1.3 %). (a) time course of medium pH (b) time course of dry cell biomass (c) time course of total phenol level.

Debaryomyces hansenii, have been used. The red yeast *R. glutinis*, which is known for its ability to synthesise carotenoids, can also accumulate lipids. The extremophilic yeast *D. hansenii* is proposed as a promising future source for the production of several useful products. The common feature of these yeasts, which led to their being chosen as model cells for OMW biodegradation, is that they are capable of surviving in oil-containing media. In the proposed bioprocess, we aim to (i) remove a large proportion of the total phenol content of OMW, (ii) produce value-added products, mainly microbial oil, and (iii) cultivate sufficient yeast for simultaneous use as a food supplement.

Experiment

The defining characteristics of the OMW used in our studies were a total phenol concentration of 620–1800 mg/L, COD of 45 000–88 500 mg/L and pH of 4.25–4.60. *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) and *Debaryomyces hansenii* (NRRL Y-7426) were supplied by the manufacturers. During cultivation, the variations in yeast concentration and OMW characteristics were monitored. Biomass concentration was determined as dry cell weight; total phenol concentration was measured by using Folin Ciocalteu's method (Ayed et al., 2005) and COD level was monitored by the reflux colorimetric method (Karakaya, 2011). Ethyl acetate extracts of phenolic compounds were analysed with an HPLC (Karakaya et al., 2012) and enzyme activities were measured spectrophotometrically (Akardere, 2012).

Results

R. glutinis was cultivated in diluted and undiluted OMW supplemented with different nutrients. Batch-wise experiments were conducted to investigate the effects of centrifugation and sterilisation of the OMW medium, the presence of nitrogen supplements, initial medium pH, temperature, agitation rate and cultivation time on cell growth, total phenol removal and COD reduction. *R. glutinis* was found to be capable of surviving in raw OMW as well as of decreasing total phenol and COD levels and increasing the pH of the medium. In all the cultivations, medium pH was observed to increase in close step with cell accumulation and biodegradation. Medium pH was therefore monitored as an indicator of cell growth and dephenolisation throughout the cultivations. The best conditions for batch biodegradation were found to be a high initial medium pH using urea as nitrogen supplement, 30°C and 150 rpm. The addition

of yeast extract to the growth medium and OMW sterilisation and centrifugation were not observed to have any effect on the bioremediation process. Under the best conditions for total phenol removal, 89% and 18% reductions in total phenol content and COD level were achieved after 120 hours of cultivation, respectively. The highest amount of yeast biomass accumulated in the OMW cultivation medium was about 4 g/L. The characteristic strong odour of the OMW disappeared after bioremediation (Karakaya, 2011; Karakaya et al., 2012).

The OMW was also treated with alginate-immobilised *R. glutinis* cells in a batch system. The effects of pellet diameter, alginate concentration, cell loading, initial total phenol concentration, agitation rate and reusability of pellets on OMW dephenolisation were studied. A dephenolisation rate of up to 87% was obtained after 120 hours of biodegradation in a diluted OMW medium supplemented with urea at 30°C and 150 rpm. The number of pellets used increased with the addition of calcium ions to the biodegradation medium. Reuse of pellets five times every 48 hours led to a dephenolisation rate of approximately 70%. The structural properties of the alginate beads, such as diameter and hardness, had less effect on the extent of dephenolisation than operational parameters such as substrate concentration and agitation rate. This result indicates that the alginate gel tolerated the difficult properties of OMW, such as low pH and high salinity and phenolic content (Bozkoyunlu and Takaç, 2014; Bozkoyunlu, 2013).

OMW biodegradation was also carried out in fed-batch and continuous bioreactors in the light of the results of the batch experiments with *R. glutinis*. The strategy applied in the fed-batch operation was to add undiluted OMW intermittently to the batch medium to keep the medium pH stable. The addition of OMW to the biodegradation medium decreased the pH of the medium, provided fresh substrate for cells and kept cells active for biodegradation up to a critical pH value. This approach also enabled the biodegradation of high volumes of undiluted OMW. The total phenol removal rate achieved in fed-batch operations with free and immobilised cells was respectively enhanced approximately five- and two-fold relative to the corresponding batch-wise operations. Total phenol content decreased by 74% when free *R. glutinis* cells were used for 350 hours; however, this rate was 51% by the end of biodegradation with immobilised cells. On the other hand, in continuous biodegradation, the feed flow rate changed automatically according to the pH value set in the control system of the bioreactor to enable biodegradation to be carried out at a constant pH. In continuous operation, total phenol degradation rates of 89 and 83% were obtained in approximately 70 hours of

Our studies on biodegradation of OMW by *R. glutinis* also showed that some value-added products were also produced during cultivation. Because it is oleaginous, the *R. glutinis* yeast has the ability to accumulate lipids. Studies have shown that the fatty acid composition of the lipids produced by *R. glutinis* make them a suitable raw material for the production of biodiesel (Shales, 2007). We found that *R. glutinis* produced lipids representing more than 50% of its dry weight. The fatty acid composition of *R. glutinis* changed with the cultivation conditions, such as the addition of nutrient supplements to the medium, temperature and pH. We also observed that *R. glutinis* accumulated superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes during its cultivation in OMW (Degirmenbasi, 2016).

Future aspects

Our seven-year research projects on the cultivation of *R. glutinis* and *D. hansenii* yeasts for the biodegradation of OMW have shown that olive oil industry wastewater is a promising and costless substrate for lipids and enzymes as well as for biomass production. Single cell oil has a growing potential in the world market. Our latest data reveal that it is possible to tailor the fatty acid profile by changing the cultivation conditions. Moreover, beta-carotene, which is produced by *R. glutinis*, is a trending product with important uses in the food and beverage industries. As the next step, we aim to set up a pilot-scale production plant near Laleli Olive Oil Company in order to optimise the large-scale production of single cell oil, carotenoids and microbial biomass in OMW media.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from TUBITAK (109M290, 111M441, 113M589) and Ankara University (12B43433001, 14H0443002).

References

Akardere, E. 2012. Investigation of phenol degrading enzyme activities in bioremediation of olive mill wastewater. Ankara University.
 Ayed, L., Assas, N., Sayadi, S. and Hamdi, M. 2005. Involvement of lignin peroxidase in the decolorization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. Letters in applied microbiology. 40(1): 7–11.
 Bozkoyunlu, G. 2013. Bioremediation of olive mill wastewater by immobilized *Rhodotorula glutinis*. Ankara University.

Bozkoyunlu, G. and Takaç, S. 2014. Parameters and kinetics of olive mill wastewater dephenolization by immobilised *Rhodotorula glutinis* cells. Environmental Technology, 35(24): 81.
 Degirmenbasi, D. 2016. Production of antioxidant enzymes from olive mill wastewater. Ankara University.
 El-Abbassi, A., Kiai, H. and Hafidi, A. 2012. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. Food Chemistry, 132(1): 406–412.
 El Hajjouji, H., Ait Baddi, G., Yaacoubi, A., Hamdi, H., Winterton, P., Revel, J. C. and Hafidi, M. 2008. Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater. Bioresource Technology. 99(13): 5505–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083025>.
 Karakaya, A., Bozkoyunlu, G., Laleli, Y. and Takaç, S. 2013. Development of pH adjustment-based operational strategy to increase total phenol removal rate in biodegradation of olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*. Desalination and Water Treatment. August 2014: 1–5. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19443994.2013.823357>.
 Karakaya, A. 2011. Investigation of the biological treatment of olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis* and *Debaryomyces hansenii* yeasts. Ankara University.
 Karakaya, A., Laleli, Y. and Takaç, S. 2012. Development of process conditions for biodegradation of raw olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*. International Biodeterioration & Biodegradation, 75: 75–82. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096483051200234X> [Accessed June 14, 2013].
 Karakaya, A., Laleli, Y. and Takaç, S. 2011. Operational strategy for biodegradation of olive mill wastewater phenolics by *Debaryomyces hansenii*. In MESAEP- 16.
 Karakaya, A., Takaç, S. and Laleli, Y. 2011. Effect of medium composition on the biodegradation of olive mill wastewater phenolics by *Debaryomyces hansenii*. In MESAEP- 16.
 Shales, S. 2007. Biodiesel: a microbiologist's perspective. Europe (June).
 Takaç, S. 2012. Development of an integrated process for olive mill wastewater to enrich its phenolic compounds by successive homogenization-extraction process and to facilitate its bioremediation, TUBITAK, MAG 111M441.
 Takaç, S. 2013. Immobilization of *Rhodotorula glutinis* for bioremediation of olive mill wastewater, BAP 12B43433001.
 Takaç, S. 2015a. Medium design for the production of antioxidant enzymes from olive mill wastewater BAP 14H044302.
 Takaç, S. 2011. Process biodevelopment for remediation of olive mill wastewater and utilization in antioxidant production. TUBITAK MAG 109M290.
 Takaç, S. 2015b. Production of value added biomolecules from olive mill wastewater. TUBITAK 113M589.