

***Rhodotorula* CİNSİNE AİT BAZI MAYA TÜRLERİNİN  
BETA-KAROTEN ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF BETA-CAROTENE  
PRODUCTIONS OF SOME YEAST SPECIES  
THAT BELONG TO *Rhodotorula* GENUS**

**FAZİLET MIDİK**

**PROF. DR. Z. YEŞİM ÖZBAŞ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

**DOKTORA TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2021

Sevgili Annem, Babam, Kardeşlerim  
ve Pati'ye.

## ÖZET

### ***Rhodotorula* CİNSİNE AİT BAZI MAYA TÜRLERİNİN BETA-KAROTEN ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ**

**Fazilet MIDİK**

**Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ**

**Ağustos 2021, 252 sayfa**

Bu tez çalışmasında, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine çeşitli fermantasyon parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Araştırmada, tüm fermantasyon deneyleri kesikli sistemde, sıcaklığı ve çalkalama hızı kontrol edilebilen su banyolarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ilk olarak, *Rhodotorula* cinsine ait on farklı suşun  $\beta$ -karoten üretimleri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. İncelenen suşlar arasından en yüksek  $\beta$ -karoten üretimi (3.68 mg/L), *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile elde edilmiştir. Daha sonra seçilen bu suşun farklı karbon ve azot kaynakları içeren fermantasyon ortamlarında  $\beta$ -karoten üretimleri araştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz ve sakkarozun etkilerinin incelendiği deneylerde, en yüksek  $\beta$ -karoten üretimi sırasıyla; galaktoz (5.57 mg/L) ve fruktoz (3.88 mg/L) ile çalışıldığında elde edilmiş, çalışmaya daha ucuz bir substrat olan fruktoz ile devam edilmesine karar verilmiştir. İnorganik azot kaynakları olarak; amonyum sülfat, sodyum nitrat ve amonyum klorür, organik azot kaynakları olarak; et, kazein, soya kaynaklı pepton ve maya özütünün çeşitli kombinasyonlarının etkilerinin incelendiği deneylerde çalışılan suş ile en yüksek  $\beta$ -karoten üretimi (6.84 mg/L), kazein kaynaklı pepton ile amonyum sülfat karışımı kullanıldığında elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında daha sonra, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kullanılan programda yer alan; dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan, merkezde 6 tekrarlı, toplam 30 deneysel noktadan oluşan, bir deney tasarım planı kullanılmıştır. Tasarımda bağımsız değişkenler olarak; fermantasyon ortamının fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri, başlangıç pH'ı ve sıcaklık seçilirken, bağımlı değişkenler; en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125'in özgül üreme hızı ve ürün oluşum hızı olarak belirlenmişlerdir. Tasarım planında verilen koşullarda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlara, çoklu regresyon analizi uygulanarak, bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkilerini gösteren model eşitlikler türetilmiş ve türetilen bu eşitliklerin uygunlukları, varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Optimizasyon, programda yer alan istenen hedefe ulaşma oranı kullanılarak, nümerik olarak gerçekleştirilmiştir. Program tarafından oluşturulan 100 çözümden, istenen hedefe ulaşma oranının; 1.000, fermantasyon ortamının fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri ile başlangıç pH'ı ve sıcaklığın sırasıyla; 49.459 g/L, 8.371 g/L, 3.815 ve 27.402°C olduğu bir çözüm seçilmiştir. Seçilen koşullarda gerçekleştirilen deneyde, maksimum  $\beta$ -karoten derişimi; 7.18 mg/L, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125'in özgül üreme hızı; 0.025 sa<sup>-1</sup> ve maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı; 0.031 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak elde edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen bu deneylerin sonuçları değerlendirildiğinde, tüm deneysel sonuçların kabul edilebilir sınırlar içerisinde ve optimum koşulların %95 güven aralığında olduğu doğrulanmıştır.

Bu tez çalışmasında, çeşitli doğal substrat kaynaklarının, doğrudan fermantasyon ortamı olarak veya sentetik fermantasyon ortamında karbon kaynağı yerine kullanılmalarının, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimine etkileri de araştırılmıştır. Çalışmada doğal substrat kaynakları olarak; şeker pancarı küspesi, üzüm, elma ve armut posası özütleri, kestane ve fındık kabuğu ile yer elması hidrolizatları ve üzüm suyu denenmiştir. İncelenen suş ile en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi (8.46 mg/L), fermantasyon ortamında karbon kaynağı yerine elma posası özütü kullanıldığında elde edilmiştir. Doğal substratların doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde ise, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi (5.48 mg/L) yer elması hidrolizatı ile çalışıldığında elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında incelenen suş tarafından üretilen bazı  $\beta$ -karoten örneklerinin, FT-IR spektrometresiyle moleküler yapı analizleri de gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrumların, saf  $\beta$ -karoten örneği ile uyumlu karakteristik pikler içerdikleri tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Rhodotorula glutinis*,  $\beta$ -karoten, fermantasyon, yanıt yüzey yöntemi, optimizasyon, doğal substrat

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF BETA-CAROTENE PRODUCTIONS OF SOME YEAST SPECIES THAT BELONG TO *Rhodotorula* GENUS

**Fazilet MIDIK**

**Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ**

**August 2021, 252 pages**

In this thesis, the effects of various fermentation parameters on  $\beta$ -carotene production by the *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 strain were studied. All batch fermentations were carried out in water baths with controlled temperature and agitation speed.  $\beta$ -carotene production by each of ten different strains belonging to the genus *Rhodotorula* was quantitatively assessed. Among the strains examined, the highest  $\beta$ -carotene production (3.68 mg/L) was obtained in the *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 strain. Thus,  $\beta$ -carotene production by this strain was investigated using different fermentation media containing various carbon and nitrogen sources. In experiments using glucose, fructose, galactose, maltose, or sucrose were used as carbon source, the highest  $\beta$ -carotene production was obtained with galactose (5.57 mg/L) followed by fructose (3.88 mg/L). Further studies were conducted using fructose (the cheaper of these 2 substrates). In experiments in which ammonium sulfate, sodium nitrate, and ammonium chloride were used as inorganic nitrogen sources, and meat, casein, soy-based peptone, and yeast extract were used as organic nitrogen sources, the highest  $\beta$ -carotene yield (6.84 mg/L) was obtained in medium containing a mixture of casein-based peptone and ammonium sulfate.

To optimize the  $\beta$ -carotene production of the *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 strain, it was subjected to response surface methodology. Using a rotatable central composite design method, an experimental plan consisting of 30 experiments with six replicates at the center point was adopted. Initial fructose and peptone concentrations in the fermentation media, and initial pH and temperature of fermentation medium were selected as independent variables. The dependent variables were  $\beta$ -carotene concentrations, specific growth rates of *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125, and product formation rate. Multiple regression analysis was applied to the results of all experiments, and equations were derived to model the effects of independent variables on dependent variables. Performance of the derived equations was evaluated using analysis of variance (ANOVA). Optimization was performed numerically using the program's desirability function. Among the 100 solutions derived from the program, the one having a desirability value of 1.000 was selected for further experiments. In this solution initial fructose and peptone concentrations, initial pH, and temperature of the fermentation medium were 49.459 g/L, 8.371 g/L, 3.815 ve 27.402°C, respectively. These conditions were selected for further experiments. Experiments performed under these selected conditions yielded a maximum  $\beta$ -carotene concentration was found as 7.18 mg/L, the specific growth rate of *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 was 0.025 h<sup>-1</sup>, and the maximum  $\beta$ -carotene production rate was 0.031 mg  $\beta$ -carotene/(L.h). Statistical analyses of these experiments performed under optimum conditions verified that all experimental results were within acceptable limits, and optimum conditions were confirmed to be within 95% confidence intervals.

This thesis also reported the effects of the direct usage of various natural substrates as fermentation media or usage of natural substrates as carbon source in synthetic fermentation medium on  $\beta$ -carotene production by *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125. In this study, sugar beet pulp, grape, apple, and pear pulp extracts, chestnut and hazelnut shells, Jerusalem artichoke hydrolysates, and grape juice were used as natural substrates. The highest  $\beta$ -carotene concentration (8.46 mg/L) was obtained using apple pulp extract as carbon source in fermentation medium. In the experiments in which natural substrates were used directly as fermentation media, the highest  $\beta$ -carotene concentration (5.48 mg/L) was obtained with Jerusalem artichoke hydrolysate.

The molecular structures of some  $\beta$ -carotene samples produced by the studied strain were analyzed using FT-IR spectrometer. The spectra of all analyzed samples were consistent with the characteristic peaks of pure  $\beta$ -carotene.

**Keywords:** *Rhodotorula glutinis*,  $\beta$ -carotene, fermentation, response surface methodology, optimization, natural substrate



# İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xxv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	7
2.1. Kesikli Olarak Çalışan Fermantasyon Sistemlerinde İncelenen Parametreler ve Kullanılan Bazı Eşitlikler.....	43
2.1.1. Mikroorganizma Özgül Üreme Hızı .....	43
2.1.2. Mikroorganizma Özgül Ürün Oluşum Hızı .....	43
2.2. Deney Tasarımı Yöntemi ve Fermantasyon Koşullarının Optimizasyonu .....	44
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	53
3.1. Materyal .....	53
3.1.1. Maya Kültürleri.....	53
3.1.2. Besiyerleri .....	53
3.1.3. Doğal Substrat Kaynakları .....	54
3.1.4. Deney Düzenegi.....	55
3.2. Yöntem.....	55
3.2.1. Fermantasyon Ortamı İçin İnokülüm Hazırlanması ve İnokülüm Başlangıç Derişiminin Belirlenmesi .....	55
3.2.2. $\beta$ -Karoten Derişiminin Tayini.....	56
3.2.3. Biyokütle Derişiminin Tayini .....	56
3.2.4. Şeker Derişimi Tayinleri.....	57

3.2.5. pH ölçümü .....	58
3.2.6. Moleküler Yapı Analizi .....	58
3.2.7. $\beta$ -Karoten Üretiminde Kullanılacak Olan Maya Suşunun Belirlenmesi ...	59
3.2.8. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkilerinin İncelenmesi .....	59
3.2.9. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkilerinin İncelenmesi.....	60
3.2.10. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşu İle $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Bazı Bağımsız Değişkenlerin Etkilerinin İncelenmesi Amacıyla Deney Tasarım Planı Oluşturulması .....	63
3.2.11. Çalışmada Seçilen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmeleri.....	65
3.2.12. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşu İle $\beta$ -karoten Üretiminin Optimizasyonu.....	66
3.2.13. Çeşitli Doğal Substrat Kaynaklarının <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	68
3.2.13.1. Şeker Pancarı Küspesi Özütünün Hazırlanması .....	69
3.2.13.2. Üzüm Posası Özütünün Hazırlanması .....	70
3.2.13.3. Fındık ve Kestane Kabuğu Hidrolizatlarının Hazırlanması.....	70
3.2.13.4. Armut ve Elma Posası Özütlerinin Hazırlanmaları .....	71
3.2.13.5. Üzüm Suyunun Hazırlanması .....	71
3.2.13.6. Yer Elması Hidrolizatının Hazırlanması .....	72
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	73
4.1. $\beta$ -karoten Üretiminde Kullanılacak Olan Maya Suşunun Seçilmesi Deneilerine İlişkin Sonuçlar.....	73
4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar.....	77

4.3. Farklı Azot Kaynaklarının <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar .....	84
4.4. Deneysel Tasarım Planının Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar .....	94
4.5. Çalışmada Seçilen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmelerine İlişkin Sonuçlar .....	125
4.6. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşu Tarafından $\beta$ -KAROTEN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONUNA İLİŞKİN SONUÇLAR .....	166
4.7. Çeşitli Doğal Substrat Kaynaklarının <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesine İlişkin Sonuçlar .....	173
4.7.1. Şeker Pancarı Küspesi Özütü İle Yapılan Çalışmalar.....	174
4.7.2. Üzüm Posası Özütü İle Yapılan Çalışmalar.....	178
4.7.3. Fındık Kabuğu Hidrolizati İle Yapılan Çalışmalar .....	184
4.7.4. Kestane Kabuğu Hidrolizati ile Yapılan Çalışmalar.....	188
4.7.5. Armut Posası Özütü ile Yapılan Çalışmalar .....	191
4.7.6. Üzüm Suyu ile Yapılan Çalışmalar.....	195
4.7.7. Elma Posası Özütü İle Yapılan Çalışmalar .....	200
4.7.8. Yer Elması Hidrolizati İle Yapılan Çalışmalar .....	206
4.7.9. Çeşitli Doğal Substrat Kaynaklarının Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanıldığı Çalışmaların Genel Değerlendirmesi.....	210
4.8. $\beta$ -karotenin Moleküler Yapı Analizine İlişkin Sonuçlar .....	213
5. SONUÇ .....	216
KAYNAKLAR .....	220
EKLER.....	233
EK 1. DENEMELERDE KULLANILAN FARKLI <i>Rhodotorula</i> KÜLTÜRLERİ.....	233
EK 2. $\beta$ -KAROTEN DERİŞİMİNİN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇALIŞMA DOĞRUSU .....	235

EK 3. BİYOKÜTLE DERİŞİMİNİN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇALIŞMA DOĞRULARININ OLUŞTURULMASI.....	236
EK 4. FERMANTASYON ORTAMLARINDAKİ ÇEŞİTLİ ŞEKERLERİN TAYİNLERİNDE KULLANILAN ÇALIŞMA DOĞRULARI .....	238
EK 5. FENOL SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİ.....	240
EK 6. DİNİTROSALİSİLİK ASİT YÖNTEMİ.....	240
EK 7. FINDIK VE KESTANE KABUĞU HİDROLİZATLARININ HAZIRLANIŞI	241
EK 8. İNCELENEN SUŞ TARAFINDAN ÜRETİLEN $\beta$ -KAROTEN ÖRNEĞİ İLE SAF $\beta$ -KAROTEN ÖRNEĞİNE AİT FT-IR SPEKTRUMLARI.....	242
Ek 9. OPTİMİZASYON ÇALIŞMASINDA BAĞIMLI DEĞİŞKENLER (YANITLAR) İÇİN BELİRLENEN HEDEFLER VE ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER.....	244
EK 10. OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN ÖRNEK BİR GRAFİK.....	247
EK 11. TEZDEN TÜRETİLMİŞ BİLDİRİLER .....	248

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Gıda endüstrisinde kullanılan bazı doğal renk maddeleri .....	9
Çizelge 2.2. Çeşitli karotenoidlerin üretimlerinde kullanılan bazı bakteri, fungus ve mikroalgler.....	15
Çizelge 2.3. Gıda katkısı olarak kullanılan bazı karotenoid kaynakları .....	16
Çizelge 2.4. Çeşitli kaynaklardan elde edilen ticari bazı $\beta$ -karoten ürünleri ve markaları .....	31
Çizelge 2.5. Bazı mayaların kullanıldığı $\beta$ -karoten sentezi ile ilgili yapılan çalışmalar	31
Çizelge 2.6. Mayalar ile karoten üretiminde kullanılan bazı doğal substrat kaynakları.	40
Çizelge 3.1. $\beta$ -karoten üretiminde kullanılan maya suşları ve izolasyon kaynakları .....	53
Çizelge 3.2. <i>R. glutinis var. glutinis</i> NBRC 1125 suşu ile $\beta$ -karoten üretiminde kullanılan fermantasyon ortamlarında denenen çeşitli organik ve inorganik azot kaynakları ile azot içerikleri .....	61
Çizelge 3.3. <i>R. glutinis var. glutinis</i> NBRC 1125 suşu ile $\beta$ -karoten üretiminde kullanılan fermantasyon ortamlarında denenen azot kaynağı kombinasyonları ve ortamdaki başlangıç derişimleri.....	62
Çizelge 3.4. Deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri.....	64
Çizelge 3.5. Deney tasarımında kullanılan bağımlı değişkenler ve simgeleri.....	64
Çizelge 3.6. Optimizasyonda kullanılan bağımsız (X) ve bağımlı (Y) değişkenler için belirlenen hedefler ile minimum ve maksimum değerler .....	67
Çizelge 4.1. Yüksek $\beta$ -karoten üretimine sahip suşun seçimi amacıyla yapılan deneyde incelenen maya suşlarının başlangıç inokülasyon derişimleri ve fermantasyon sırasında belirlenen en yüksek $\beta$ -karoten derişimleri.....	74
Çizelge 4.2. $\beta$ -karoten üretimi yüksek suşlar ile gerçekleştirilen deneylerde kullanılan suşların başlangıç inokülasyon derişimleri ve bu suşlar ile elde edilen en yüksek $\beta$ -karoten derişimleri .....	76

Çizelge 4.3. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun $\beta$ -karoten üretimi üzerine farklı azot kaynağı karışımlarının etkilerinin incelendiği deneylerde elde edilen en yüksek $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme ve özgül ürün oluşum hızı değerleri.....	91
Çizelge 4.4. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde, seçilen bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri .....	95
Çizelge 4.5. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde, seçilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri .....	96
Çizelge 4.6. Merkezi karma tasarım yöntemine gerçekleştirilen deneylerde elde edilen en yüksek $\beta$ -karoten derişimleri ( $Y_1$ ), özgül üreme hızları ( $Y_2$ ) ve en yüksek $\beta$ -karoten oluşum hızları ( $Y_3$ ) .....	126
Çizelge 4.7. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ), en yüksek $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerindeki etkilerine ilişkin varyans analizi sonuçları .....	128
Çizelge 4.8. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ) özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerindeki etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları .....	141
Çizelge 4.9. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ), maksimum $\beta$ -karoten oluşum hızı ( $Y_3$ ) üzerindeki etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları .....	153
Çizelge 4.10. Bağımlı değişkenlerin deneysel değerleri ve optimizasyon programı kullanılarak hesaplanan teorik değerleri ile minimum ve maksimum değerleri .....	171
Çizelge 4.11. Doğal substratların kullanıldığı ortamlarda elde edilen en yüksek $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme, ürün ve özgül ürün oluşum hızları.....	211
Çizelge 4.12. Saf $\beta$ -karoten, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 ile üretilen ve bazı literatür çalışmalarından alınan $\beta$ -karoten örneklerine ait FT-IR analizi sonuçları .....	214
Çizelge Ek 9. Optimizasyon çalışması sonucunda program tarafından hesaplanan optimum işletme koşulları ve bağımlı değişkenlerin (yanıtların) bu koşullardaki teorik değerleri.....	244

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karotenoid oluşumunda yer alan temel asiklik C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> yapısı.....	10
Şekil 2.2. Bazı önemli karotenoidlerin açık kimyasal formülleri.....	10
Şekil 2.3. <i>Rhodotorula</i> türlerinde karotenoid biyosentezi.....	22
Şekil 2.4. Mikrobiyel yolla karotenoid üretimi.....	24
Şekil 2.5. Üç faktörlü bir merkezi karma tasarım modeli.....	48
Şekil 4.1. <i>Rhodotorula</i> cinsine ait çeşitli maya suşları ile yapılan çalışmalarda β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	73
Şekil 4.2. Seçilen bazı maya suşları ile yapılan çalışmalarda, β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	75
Şekil 4.3. Farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	77
Şekil 4.4. Farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	79
Şekil 4.5. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun farklı karbonhidratlar içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin ln değerlerinin zamanla değişimleri. (a): Glukoz, (b): Fruktoz, (c): Galaktoz, (d): Maltoz, (e): Sakkaroz.....	80
Şekil 4.6. Farklı karbonhidratların kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimleri.....	82
Şekil 4.7. Farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	85
Şekil 4.8. Farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	86

Şekil 4.9. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun farklı azot karışımları içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin ln değerlerinin zamanla değişimleri. (a): et kaynaklı pepton + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (b): kazein kaynaklı pepton + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (c): soya kaynaklı pepton + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (d): Üre + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (e): maya özütü + NaNO <sub>3</sub> , (f): maya özütü + NH <sub>4</sub> Cl, (g): maya özütü + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	88
Şekil 4.10. Farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	90
Şekil 4.12. 26°C’da gerçekleştirilen 1-8 numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	99
Şekil 4.13. 26°C’da gerçekleştirilen 1-8 numaralı (a-h) deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri.....	101
Şekil 4.14. 26°C’da gerçekleştirilen 1-8 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	102
Şekil 4.15. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri ...	104
Şekil 4.16. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	105
Şekil 4.17. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 (a-h) numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri.....	107
Şekil 4.18. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	108
Şekil 4.19. 28°C’da gerçekleştirilen, 17-22 numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri ...	109
Şekil 4.20. 28°C’da gerçekleştirilen 17-22 numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	110
Şekil 4.21. 28°C’da gerçekleştirilen 17-22 (a-f) numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri.....	112



Şekil 4.22. 28°C’da gerçekleştirilen 17-22 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	113
Şekil 4.23. 24°C’da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişiminin zamanla değişimi .....	114
Şekil 4.24. 24°C’da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi .....	115
Şekil 4.25. 24°C’da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin lnX değerlerinin zamanla değişimi.....	116
Şekil 4.26. 24°C’da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi.....	117
Şekil 4.27. 32°C’da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişiminin zamanla değişimi .....	118
Şekil 4.28. 32°C’da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi .....	118
Şekil 4.29. 32°C’da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin lnX değerlerinin zamanla değişimi.....	119
Şekil 4.30. 32°C’da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi.....	120
Şekil 4.31. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri...	121
Şekil 4.32. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	122
Şekil 4.33. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı (a-f) deneylerde, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri .....	123
Şekil 4.34. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	124
Şekil 4.35. Maksimum β-karoten derişimi (Y <sub>1</sub> ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X <sub>1</sub> ) ve pepton başlangıç derişiminin (X <sub>2</sub> ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X <sub>3</sub> = 6.0, X <sub>4</sub> = 28°C).....	129

Şekil 4.36. Maksimum $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ).....	131
Şekil 4.37. Maksimum $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişiminin ( $X_1$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$ g/L, $X_3 = 6.0$ ) .....	133
Şekil 4.38. Maksimum $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamı pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ının etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ) .....	135
Şekil 4.39. Maksimum $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_3 = 6.0$ ) .....	137
Şekil 4.40. Maksimum $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_2 = 5$ g/L) .....	138
Şekil 4.41. Maksimum $\beta$ -karoten derişiminin ( $Y_1$ ); deneysel değerleri ile, Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8014x + 0.805$ , $R^2 = 0.801$ ) .....	139
Şekil 4.42. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_3 = 6.0$ , $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ) .....	143
Şekil 4.43. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ) .....	145
Şekil 4.44. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin ( $X_1$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$ g/L, $X_3 = 6.0$ ).....	146
Şekil 4.45. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ) .....	148

Şekil 4.46. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_3 = 6.0$ ) .....	150
Şekil 4.47. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_2 = 5$ g/L) .....	151
Şekil 4.48. Mikroorganizma özgül üreme hızlarının ( $Y_2$ ); deneysel değerleri ile, Eş 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.9171 x + 0.0031$ , $R^2 = 0.919$ ).....	152
Şekil 4.49. Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_3 = 6.0$ , $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ).....	156
Şekil 4.50. Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ).....	158
Şekil 4.51. Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin ( $X_1$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$ g/L, $X_3 = 6.0$ ) .....	160
Şekil 4.52. Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$ ).....	161
Şekil 4.53. Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_3 = 6.0$ ) .....	163
Şekil 4.54. Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$ g/L, $X_2 = 5$ g/L) .....	165
Şekil 4.55. Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızının ( $Y_3$ ); deneysel değerleri ile, Eş 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8456 x + 0.0037$ , $R^2 = 0.845$ ).....	166

Şekil 4.56. Optimum çalışma koşullarında <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimi.....	168
Şekil 4.57. Optimum çalışma koşullarında <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi .....	168
Şekil 4.58. Optimum çalışma koşullarında <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu için lnX değerlerinin zamanla değişimi .....	169
Şekil 4.59. Optimum çalışma koşullarında fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi.....	170
Şekil 4.60. Bileşenli ve bileşensiz şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri .....	174
Şekil 4.61. Bileşenli ve bileşensiz şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	175
Şekil 4.62. Bileşenli ve bileşensiz şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri.....	176
Şekil 4.63. Şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamlarındaki toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri .....	177
Şekil 4.64. Bileşenli ve bileşensiz üzüm posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	179
Şekil 4.65. Bileşenli ve bileşensiz üzüm posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	180
Şekil 4.66. Bileşenli ve bileşensiz üzüm posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	181
Şekil 4.67. Üzüm posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamlarındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	182

Şekil 4.68. Bileşenli üzüm posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamlarındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	183
Şekil 4.69. Bileşenli ve bileşensiz fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri .....	185
Şekil 4.70. Bileşenli ve bileşensiz fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	186
Şekil 4.71. Fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki indirgen şeker ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	187
Şekil 4.72. Bileşenli fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki indirgen şeker ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	187
Şekil 4.73. Bileşenli ve bileşensiz kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri .....	188
Şekil 4.74. Bileşenli ve bileşensiz kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	189
Şekil 4.75. Kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	190
Şekil 4.76. Bileşenli kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	190
Şekil 4.77. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri .....	192
Şekil 4.78. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	193

Şekil 4.79. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	194
Şekil 4.80. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	194
Şekil 4.81. Bileşenli ve bileşensiz üzüm suyunun kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	196
Şekil 4.82. Bileşenli ve bileşensiz üzüm suyunun kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	196
Şekil 4.83. Bileşenli ve bileşensiz üzüm suyunun kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	197
Şekil 4.84. Üzüm suyunun kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	198
Şekil 4.85. Bileşenli üzüm suyunun kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	198
Şekil 4.86. Bileşenli ve bileşensiz elma posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	200
Şekil 4.87. Bileşenli ve bileşensiz elma posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	201
Şekil 4.88. Bileşenli ve bileşensiz elma posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	202
Şekil 4.89. Elma posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda, fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin zamanla değişimleri .....	203
Şekil 4.90. Bileşenli elma posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda, fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin zamanla değişimleri.....	203
Şekil 4.91. Bileşenli ve bileşensiz yer elması hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri.....	206

Şekil 4.92. Bileşenli ve bileşensiz yer elması hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	207
Şekil 4.93. Bileşenli ve bileşensiz yer elması hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri.....	208
Şekil 4.94. Yer elması hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda, fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin zamanla değişimleri ....	209
Şekil 4.95. Bileşenli yer elması hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerini.....	209
Şekil Ek 1.1. <i>Rhodotorula</i> kültürleri.....	233
Şekil Ek 1.2. Fermantasyon ortamlarından alınan kültür örnekleri.....	233
Şekil Ek 1.3. Farklı <i>Rhodotorula</i> suşları için, santrifüjleme sonrası elde edilen peletler .....	234
Şekil Ek 1.4. (a): İki farklı <i>Rhodotorula</i> suşu için, aseton ekstraksiyonu sonrası örnek görüntüleri, (b): Ekstraksiyon ve santrifüj sonrası elde edilen pelet örneği .....	234
Şekil Ek 2.1. $\beta$ -karoten çalışma doğrusu ( $\lambda= 455$ nm; $y = 0.1362x - 0.0167$ ; $R^2 = 0.998$ ) .....	235
Şekil Ek 3.1. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu için oluşturulmuş, absorbands-yaş ağırlık çalışma doğrusu ( $\lambda= 600$ nm; $y = 0.175x + 0.044$ ; $R^2 = 0.982$ ) .....	237
Şekil Ek 3.2. <i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125 suşu için oluşturulmuş, kuru ağırlık-yaş ağırlık çalışma doğrusu ( $y = 0.11417x + 0.00003$ ; $R^2 = 0.988$ ) .....	237
Şekil Ek 4.1. Glukoz çalışma doğrusu ( $y = 3.0295x - 0.0429$ ; $R^2 = 0.993$ ) .....	238
Şekil Ek 4.2. Fruktoz çalışma doğrusu ( $y = 3.2676x - 0.0257$ ; $R^2 = 0.994$ ).....	238
Şekil Ek 4.3. Galaktoz çalışma doğrusu ( $y = 3.6904x - 0.0645$ ; $R^2 = 0.987$ ).....	239
Şekil Ek 4.4. Sakkaroz çalışma doğrusu ( $y = 7.3804x - 0.0155$ ; $R^2 = 0.995$ ) .....	239
Şekil Ek 8.1. Saf ticari bir $\beta$ -karoten örneğine ait FT-IR spektrumu.....	242
Şekil Ek 8.2. Elma posası özütü ile hazırlanan fermantasyon ortamında üretilen $\beta$ -karoten örneğine ait FT-IR spektrumu.....	243

Şekil Ek 10. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretiminde, istenen hedefe ulaşma oranının, fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve sıcaklık ( $X_4$ ) ile değişimi ( $X_2=5$  g/L,  $X_3=6.0$ ).....247



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$C_{\text{Fruktoz}}$	Fruktoz derişimi (g/L)
$C_{\text{Galaktoz}}$	Galaktoz derişimi (g/L)
$C_{\text{Glukoz}}$	Glukoz derişimi (g/L)
$C_{\text{Maltoz}}$	Maltoz derişimi (g/L)
$C_{\text{Sakkaroz}}$	Sakkaroz derişimi (g/L)
$C_{40}H_{56}$	Karotenoid oluşumunda yer alan temel asiklik yapı
d	İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu
dP/dt	Ürün oluşum hızı
E	Uluslararası sınıflandırma sistemindeki kod
F	Fischer
f	Bağımsız değişkenler olan $x_1, x_2, \dots, x_k$ 'nin fonksiyonu
$H_2SO_4$	Sülfürik asit
k	Bağımsız değişken sayısı
KBr	Potasyum bromür
KO	Kareler ortalaması
$N_0$	Merkez noktada tekrar edilecek deney sayısı
N	Tasarımdaki deney noktalarının sayısı
$NaNO_3$	Sodyum nitrat
$NH_4Cl$	Amonyum klorür
$(NH_4)_2SO_4$	Amonyum sülfat
p	Anlamlılık düzeyi
$R^2$	Belirtme katsayısı değeri

t	Zaman (sa)
X	Yaş ağırlık-kuru ağırlık
X <sub>y</sub>	Absorbans-yaş ağırlık
X <sub>1</sub>	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (g/L)
X <sub>2</sub>	Pepton başlangıç derişimi (g/L)
X <sub>3</sub>	Başlangıç pH'ı
X <sub>4</sub>	Fermantasyon ortam sıcaklığı (°C)
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin karesel etkisi
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	Fermantasyon ortamının başlangıç fruktoz ve pepton derişimlerinin etkileşimi
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ve pH'ının etkileşimi
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ve sıcaklığının etkileşimi
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişiminin karesel etkisi
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi ve pH'ının etkileşimi
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	Fermantasyon ortamının pepton derişimi ve sıcaklığının etkileşimi
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının karesel etkisi
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	Fermantasyon ortamının sıcaklığı ile başlangıç pH'ının etkileşimi
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	Fermantasyon ortamının sıcaklığının karesel etkisi
y	Bağımlı değişken; yanıt
Y <sub>1</sub>	En yüksek β-karoten derişimi
Y <sub>2</sub>	Özgül üreme hızı
Y <sub>3</sub>	En yüksek β-karoten oluşum hızı

$x_i$	Bağımsız değişkene ait kodlanmış değer
$X_0$	Bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değeri
$\Delta X_i$	$X_i$ ve $X_0$ değerlerinin buldukları düzeylerin arasındaki farkı
$X_i$	Bağımsız değişkene ait gerçek değeri
$X_j$	Modeldeki bağımsız değişken
$y$	Bağımlı yanıt değişkeni
$\varepsilon$	İstatiksel hata terimi
$\beta$	Regresyon katsayısı
$\beta_0$	Sabit regresyon katsayısı
$\beta_i$	Modeldeki bağımsız değişkenlerin lineer etki regresyon katsayısı
$\beta_{ii}$	Modeldeki bağımsız değişkenlerin ikinci dereceden etki regresyon katsayısı
$\beta_{ij}$	Modeldeki bağımsız değişkenlerin ikili etki regresyon katsayısı
$\mu$	Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $sa^{-1}$ )
$\mu_{max}$	Mikroorganizma maksimum özgül üreme hızı ( $sa^{-1}$ )
$\gamma$	Özgül ürün oluşum hızı (mg $\beta$ -karoten/g mo.sa)
$\gamma_m$	En yüksek özgül $\beta$ -karoten üretim hızı ( mg $\beta$ - karoten/g mo.sa)
$\lambda$	Dalga boyu (nm)
$\alpha$	Tasarımdaki yıldız (star) noktasının merkez noktaya olan uzaklığı

## Kısaltmalar

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMD	Yaş a bağlı maküla dejenarasyonu
ANOVA	Varyans analizi (analysis of variance)
APÖ	Armut posası özütü
BAİBÜ	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
CCD	Merkezi karma tasarım (central composite design)
CCRD	Döndürülebilir merkezi karma tasarım (central composite rotatable design)
CVD	Kardiyovasküler hastalıklar
DMAPP	Dimetilallil pirofosfat
DNS	Dinitrosalisilik asit
EPÖ	Elma posası özütü
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FKH	Fındık kabuğu hidrolizatı
FPP	Farnesil-pirofosfat
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GPP	Geranil pirofosfat
GGPP	Geranilgeranil pirofosfat
GRAS	Genel olarak güvenilir
HCl	Hidroklorik asit
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA
IPP	İsopentil pirofosfat

KKH	Kestane kabuğu hidrolizatı
MKT	Merkezi Karma Tasarım
MVA	Mevalonik asit
MVP	Mevalonat fosfat
MVPP	Mevalonat pirofosfat
pH	Hidrojen kuvveti
RSM	Yanıt yüzey yöntemi (response surface methodology)
ŞPKÖ	Şeker pancarı küspesi özütü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
ÜPÖ	Üzüm posası özütü
ÜS	Üzüm suyu
YEH	Yer elması hidrolizatı



# 1. GİRİŞ

Karotenoidler çeşitli bitkiler, algler, fotosentetik bakteriler, küfler ve mayalar tarafından üretilen tetraterpenoid yapıda organik pigmentlerdir (Ramesh ve Muthuraman, 2018). Günümüzde yaklaşık 750 kadar doğal karotenoid tanımlanmış olup bunlardan 50 tanesi; insanlar tarafından tüketilen bazı gıdalarda ve 20'si ise; insan kanı ve dokularında bulunmaktadır (Arathi ve ark., 2015; Kot ve ark., 2018). Genellikle karotenoidler; sadece karbon ve hidrojenle oluşan  $\beta$ -karoten ve likopen gibi karotenler (hidrokarbon karotenoidler) ve epoksi (viyolaksantin, neoksantin, fuksoksantin), hidroksi (lutein ve zeaksantin), keto (astaksantin, kantaksantin) ve metoksi (spirilloksantin) fonksiyonel gruplarını içeren ksantofiller (oksijen içeren karotenler) olarak sınıflandırılmaktadır. Beslenme açısından karotenoidler önemli biyoaktif bileşikler olarak kabul edilmekte olup, insanlar ve hayvanların gereksinimlerini karşılayabilmelerinin tek yolunun; sindirim yoluyla besin kaynaklarından alım olduğu belirtilmektedir (Arathi ve ark., 2015).

Karotenoidler; kimya, gıda, ilaç ve kozmetik gibi farklı endüstri dallarında kullanım alanları olan önemli moleküller arasında kabul edilmektedirler. Karotenoidler, kümes hayvanları ve deniz canlılarının yemlerinde de önemli bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Sanchez ve ark., 2013; Kirti ve ark., 2014; Kot ve ark., 2018).

Karotenoidlerin, vücudun immün sistemini tekrar harekete geçirdiği, yaraların iyileşmesini hızlandırdığı ifade edilmektedir. Karotenoid takviyelerinin genel olarak, ultraviyole radyasyona karşı cildi koruyan ajanlar olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Bu moleküllerin; reaktif oksijen türlerinin yanı sıra serbest radikallere karşı antioksidan etki gösteren özelliklerine bağlı olarak; insan sağlığını destekleyici aktivite de gösterdikleri bildirilmektedir. İnsan vücudunun bu bileşikleri sentezleyememesi nedeniyle karotenoidlerin, gıdalara takviye olarak eklenmesi gerektiği ifade edilmektedir.

Karotenoidlerden;  $\beta$ -karoten, astaksantin, lutein, zeaksantin ve kantaksantin oldukça yüksek, endüstriyel öneme sahip oldukları ifade edilmektedir (Kot ve ark., 2018).  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten ve  $\beta$ -kriptoksantin; A vitamininin öncü maddeleri olarak bilinmektedirler. Bunun yanı sıra, bu moleküllerin bazılarının; renklendirici olarak

kullanıldıkları, antioksidan özellikler taşıdıkları ve sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunduğu da rapor edilmektedir.

Çok sayıda epidemiyolojik ve klinik çalışmanın; karotenoidlerin beslenme yoluyla tüketilmesi ile A vitamini eksikliği, kanser, kardiyovasküler hastalıklar (CVD) ve yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (AMD) gibi hastalıkların azalmasında, etkili olduğunu gösterdiği bildirilmektedir (Arathi ve ark., 2015). Provitamin A olmayan karotenoidlerden; likopene olan ilginin de giderek arttığı ve pek çok araştırmada likopen tüketimiyle, prostat kanserinin azalması arasında doğrudan bir korelasyonun gösterildiği bildirilmektedir.

Lutein ve zeaksantin; retinanın merkez bölgesinde yer alan elzem maküler pigmentler olarak kabul edildikleri ve yüksek enerjili mavi ışığa karşı filtre, tekli oksijen yakalayıcısı ve zincir kırıcı antioksidan görevlerini üstlenerek, gözde oluşabilecek fototoksik hasarları indirgedikleri belirtilmektedir. Astaksantin, fuksoksantin, sifonaksantin ise biyoaktif moleküller olarak, sağlıkla ilgili faydalarıyla, diyabet ve obeziteye karşı mücadelede gelecek vaat eden deniz karotenoidleri olarak tanımlanmaktadır (Arathi ve ark., 2015).

Karotenoidlerin kimyasal sentezlerinin zor ve pahalı olduğu bilinmektedir. Bitkilerden karotenoid eldesinde ise; hammadde uygunluğu, mevsimsel ve coğrafik değişimler, proses güçlüğü, geniş üretim alanı ihtiyacı gibi nedenlerle prosesin ekonomik olmadığı ve ayrıca bitkiden pigment ekstraksiyonunun da sınırlı kalabildiği rapor edilmektedir (Frengova, Simova ve Beshkova, 2006; Frengova ve Beshkova, 2009; Sanchez ve ark., 2013). Bu nedenle son yıllarda mikrobiyel fermantasyon ile doğal karotenoid üretimine olan ilginin giderek arttığı da belirtilmektedir. Kimyasal metotlar ile karşılaştırıldığında karotenoidlerin mikrobiyel yolla üretimlerinin, çevre dostu sistemler oldukları kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, tüm dünyada tüketicilerin doğal yolla üretilen ürünlere olan eğilimindeki artışa paralel olarak da, mikrobiyel karotenoid üretiminde, giderek artan bir ilginin olduğu rapor edilmektedir (Sanchez ve ark., 2013).



Karotenoidler meyve ve sebze, yumurta sarısı ve somon gibi bazı balık türleri olmak üzere pek çok gıdaya sarı, turuncu, kırmızı rengini veren doğal pigmentler olarak da bilinmektedirler (Maldonade, Scamparini ve Rodriguez-Amaya, 2007). Bu grupta yer alan ve önemli bir karotenoid olan  $\beta$ -karotenin gıda endüstrisinde margarin, sosis gibi et ürünleri, alkolsüz içecekler ve fırıncılık ürünlerinde renklendirici ve besin desteği olarak kullanımının, her geçen gün arttığı bildirilmektedir (Valduga ve ark., 2014).

$\beta$ -karoten; tetraterpenoid yapısına sahip karoten grubunda yer alan, lipofilik özellikte ve sarı-turuncu renkte doğal pigmentlerden birisidir (Liaaen-Jensen, 2004; Erdal ve Ökmen, 2013).  $\beta$ -karoten, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır.  $\beta$ -karoten sentezleyemeyen hayvanlar ise, bu bitkilere ihtiyaç duymaktadırlar. Beslenme ile ilgili çalışmalarda  $\beta$ -karotenin, antioksidan ve A vitamini öncülü olma özellikleri sayesinde, pek çok kanser ve diğer hastalık türleriyle mücadelede faydalı olduğu bildirilmektedir (Bhosale ve Gadre, 2001a). A vitamini, öncül maddesi olmadan vücut tarafından sentezlenemediği için, insanlar ve tüm memeli hayvanlar için dışarıdan alınması zorunlu bir vitamin olarak bilinmektedir. Bu vitaminin eksikliğinin; vücut gelişimini, hücrenin yenilenmesini ve vücudun enfeksiyonlara karşı olan direncini olumsuz yönde etkilediği belirtilmektedir (Ötleş ve Atlı, 1997). En yüksek provitamin A aktivitesine,  $\beta$ -karotenin sahip olduğu bildirilmektedir (Kot ve ark., 2016).

Biyoaktivitesi ve renklendirici özelliği ile  $\beta$ -karotenin; gıda, kozmetik ve farmasötik sanayiinde, endüstriyel öneme sahip olduğu rapor edilmektedir. Gıda endüstrisinde; ısıtma işlemi uygulanmamış alkolsüz içecekler, yenilebilir yağlar, peynir, pastane ürünleri ve dondurma olmak üzere pek çok üründe  $\beta$ -karotenin kırmızı turuncu pigment olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Bogacz-Radomska ve Harasym, 2018). Karotenoid piyasasında en büyük pazar payına sahip olduğu belirtilen  $\beta$ -karotenin gıda endüstrisinde renklendirici, antioksidan, A vitamini öncülü olarak kullanıldığı bilinmektedir (Sanchez ve ark., 2013). Karotenoid ve  $\beta$ -karoten için 2007 yılındaki küresel pazar değerlerinin sırasıyla; 766 ve 247 milyon dolar olduğu belirtilmiştir (Kirti ve ark., 2014). 2015 yılı için öngörülen pazar rakamları ise o tarihte sırasıyla; % 2.3, %1.8 yıllık büyüme hızı ile; 919 ve 285 milyon dolar olarak bildirilmiştir. 2018 için

pazar büyüklüğünün; %2.3 büyüme hızı ile; 1.4 milyon doları aşabileceği rapor edilmiştir (Ogbodo ve Ugwuanyi, 2017).

$\beta$ -karotenin, gıdalarda ve besin takviyelerinde renklendirici olarak yaygın kullanılan, en çok tercih edilen karotenoid çeşidi olduğu rapor edilmektedir. Son yıllarda yapay renklendiricilerin insan sağlığı ile ilgili olumsuz etkileri üzerine, artan bir tüketici farkındalığı bulunmaktadır (Kot ve ark., 2016). Yapay renklendiricilerin tabiatında var olan mutajenik, karsinojenik ve teratojenik, olası yan etkilerinden dolayı; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilen doğal (biyolojik) renklendiricilerin, gıda üretim süreçlerinde tercih edildiği belirtilmektedir. Mikrobiyel kaynaklı gıda renklendiricilerinin; renk çeşitlilikleri, ışığa karşı kararlılıkları ve ısıya karşı toleransları ile diğer biyolojik renklendiricilere kıyasla gıda katkısı olarak daha çok ilgi gördüğü bildirilmektedir. Ayrıca mikrobiyel renklendirici üretimlerinin; suş gelişimi ile kontrol edilebilmesinin yanısıra, üretimin mevsimsel değişim ve coğrafik konumdan bağımsız olması nedeniyle öngörülebilir yüksek verimde gerçekleştirilebildiği de ifade edilmektedir. Mikrobiyel pigmentlerin; doğal karakterleri, potansiyel tedavi edici özellikleri, besin değeri ve kullanım güvenliği nedenleriyle tercih edildikleri de bildirilmektedir (Ogbodo ve Ugwuanyi, 2017). Yirmi yıl öncesine kadar, fermantasyon ile üretilen pigmentlerin gıdalarda kullanılabilirliği ve başarılı bir şekilde ticarileştirilmesi hakkında şüpheler olduğu ifade edilmiştir. Fermantasyon ile üretilen herhangi bir pigmentin başarısının; tüketiciler tarafından kabulüne, düzenleyici kuruluş onayına ve ürünü piyasaya sürmek için gereken sermaye yatırımına bağlı olduğu belirtilmektedir. Fermantasyon tesisleri için yüksek sermaye yatırımı ve düzenleyici kuruluşlar tarafından ise, kapsamlı ve uzun toksisite çalışmalarının yapılmasının gerektiği belirtilmektedir (Aruldass, Dufossé ve Ahmad, 2018). Yirmi yıl öncesinden bu yana çok sayıda girişimin, bu sınıftaki ürünlerin pazar görünümünü sürekli olarak iyileştirmeyi amaçlayan pek çok ilerlemenin gerçekleştiği bildirilmektedir. Buna rağmen; suş üretkenliği, yüksek ürün verimi ve düşük maliyet sağlayan substrat formülasyonları ile pigment renk çeşitliliği gibi alanlarda iyileştirmelere olan ihtiyacın halen sürdüğü ifade edilmektedir (Ogbodo ve Ugwuanyi, 2017).

Doğal renklendirici piyasasının büyüklüğü hakkında, resmi istatistiksel veri bulunmamasına rağmen, Dünya çapında 940 milyon dolar civarında bir değer tahmini

yapılmaktadır. Bunun yanısıra, renklendirici piyasasının yaklaşık %7 yıllık büyüme hızıyla, 2020 yılında; 7.79 milyar dolara ulaşmasının beklendiği de ifade edilmektedir. Bu pazarın %27'sinin; doğal renkler, % 20'sinin; doğala özdeş renklere ait olacağı öngörülürken, %41'inin de; yapay renklere ait olacağı belirtilmektedir. Doğal gıda renklendiricileri endüstrisinde, talep ve büyümedeki artışın ise; yıllık % 10-15 olacağı tahmin edilmektedir. 2013-2014 yılları arasında gıda endüstrisindeki doğal renklendiricilerin tüketiminde; %4.25 artışın görüldüğü bildirilmiştir. Doğala özdeş renklere olan sentetik  $\beta$ -karotenin; Avrupa renk pazarının %40'ını, Dünya pazarının ise %17'sini oluşturduğu ifade edilmektedir (Dikshit ve Tallapragada, 2018).

Dünya genelinde, 2006'daki  $\beta$ -karoten üretiminin yalnızca %2'sinin doğal kaynaklardan yapıldığı rapor edilmektedir (Ogbodo ve Ugwuanyi, 2017). Halen ticari  $\beta$ -karoten üretiminin %90'dan fazlasının kimyasal sentez yolu ile gerçekleştirildiği ifade edilmektedir (Vachali, Bhosale ve Bernstein, 2012; Ogbodo ve Ugwuanyi, 2017). Mikrobiyel yolla  $\beta$ -karoten üretiminin esas olarak mikroalgler, küfler ve mayalar tarafından gerçekleştirildiği, bunun yanı sıra bazı bakteri ve liken türlerinin de  $\beta$ -karoten üretebildikleri bilinmektedir. Mayalar, tek hücreli olmaları ve düşük maliyetli fermantasyon ortamlarında nispeten yüksek hızda üremeleri nedeniyle,  $\beta$ -karoten üretiminde alg, küf ve bakterilerle karşılaştırıldıklarında daha avantajlı kabul edilmektedirler (Malisorn ve Suntornsuk, 2008; Sanchez ve ark., 2013). Mayalar içerisinde *Rhodotorula* türlerinin başta  $\beta$ -karoten olmak üzere birçok karotenoid pigmentini yüksek verimde üretebildikleri ve bu amaçla çeşitli bilimsel çalışmalarda  $\beta$ -karoten üretimi amacıyla tercih edildikleri bilinmektedir (Banzatto, Freita ve Mutton, 2013; Korumilli ve Mishra, 2014). *Rhodotorula* cinsine ait mayalar kullanılarak, özellikle  $\beta$ -karoten üretim maliyetini düşürmeye yönelik, günümüzde de yoğun çalışmaların yapıldığı ifade edilmektedir (Korumilli, 2014).

*Rhodotorula glutinis*'in,  $\beta$ -karoten üretimi amacıyla endüstriyel uygulamalar için yüksek potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir. Bitkilerin yetiştirilmesi ile karşılaştırıldığında *R. glutinis*'in üretilmesinin, iklimden ve mevsimden bağımsız ve daha kısa bir süreçte gerçekleşebildiği ifade edilmektedir. Bunun yanısıra, *R. glutinis*'in farklı karbon ve azot kaynaklarını metabolize edebildiği ve bu nedenle  $\beta$ -karoten üretimi amacıyla, fermantasyon ortamlarında çeşitli biyoatıkların kültür ortamı bileşeni

olarak kullanılmasının da mümkün olabildiği belirtilmektedir. Ortamda, biyolojik olarak parçalanabilen endüstriyel atıkların/artıkların kullanılmasıyla zengin besin elementi içeren maya biyokütlesinin üretilmesinin de sağlandığı bildirilmektedir (Kot ve ark., 2016). Yapılan bazı çalışmalarda incelenen mayalar arasından *Rhodotorula* türlerinin, başta  $\beta$ -karoten olmak üzere birçok karotenoid pigmentini yüksek verimde üretmeleri nedeniyle, tercih edildikleri bildirilmektedir (Banzatto, Freita ve Mutton, 2013; Korumilli ve Mishra, 2014). Literatürde genel olarak mikrobiyel karotenoidlerin ekonomik üretimi için; yeni mikroorganizmalar izole edilmesi, daha üstün özelliklere sahip mikroorganizmaların geliştirilmesi ve üretim proseslerinin iyileştirilmesi kapsamında bir dizi çalışmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Ogbodo ve Ugwuanyi, 2017). *Rhodotorula* türleri ile  $\beta$ -karoten üretimi üzerine yapılan güncel araştırmaların,  $\beta$ -karoten üretimini artırmak için gerekli optimum fermantasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları ile,  $\beta$ -karoten üretiminin maliyetini düşürmek amacıyla gıda ve tarım atıklarının doğal substrat kaynağı olarak kullanılmaları üzerine yoğunlaştığı görülmektedir.

Bu tez araştırmasında ilk olarak; laboratuvarımızda önceki çalışmalarımızda farklı gıdalardan izole edilerek tanımlanmış olan çeşitli yerel *R. glutinis* suşları ile, yabancı kültür koleksiyonlarından sağlanmış olan; bazı *R. glutinis* ve *R. mucilaginosa* suşlarının,  $\beta$ -karoten üretimleri açısından karşılaştırmalı incelenmesi ve en yüksek  $\beta$ -karoten üretimini sağlayan suşun belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha sonra çalışmada, seçilen suşun üreme ve  $\beta$ -karoten üretimi üzerine çeşitli fermantasyon parametrelerinin etkileri incelenmiş ve bir istatistiksel tasarım yöntemi olan; yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, incelenen suşun  $\beta$ -karoten üretimini artırmak ve substrat maliyetini düşürmek amacıyla çeşitli doğal substratlar ile tarımsal kökenli atık ve artıkların fermantasyon ortamları olarak ve sentetik fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılabilirlikleri de araştırılmıştır.

Tez çalışması çerçevesinde ayrıca, çalışılan suş tarafından üretilen  $\beta$ -karotenin moleküler yapı analizi de, FT-IR spektroskopisi yöntemi ile ortaya konulmuştur.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Renklerin geçmişten günümüze insanlığı daima etkilediği ve başta gıda olmak üzere pek çok ürünün kabul edilebilirliğinde belirleyici en önemli kriterlerden biri olduğu bilinmektedir (Joshi, Sharma ve Girdher, 2013). Benzer şekilde doğal boyaların çok eski zamanlardan bu yana gıdalara eklendiği de ifade edilmektedir (Joshi, Sharma ve Girdher, 2013). Renklendiricilerin kullanımının sadece gıdalar ile sınırlı olmayıp farmasötikler, nutrasötikler ve kozmetikleri de kapsadığı bilinmektedir. Renklendirici maddeler doğal ve yapay olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır. Gıdalara yapay renklendiricilerin ilave edilmesinin, doğal renklendiricilere göre daha yeni bir uygulama olduğu bildirilmektedir (Ramesh ve Muthuraman, 2018). Zaman içerisinde renklendiricilere olan talebin giderek artması ve karşılanamaması sebebiyle, doğal boyaların yanısıra sentetik boyaların da gıdalarda yaygın olarak kullanılmaya başlandığı bilinmektedir (Joshi, Sharma ve Girdher, 2013). Doğal renklendiricilerin çoğu durumda yapay olanlardan daha sağlıklı ve güvenilir olduğu belirtilmektedir. Buna rağmen, üretim maliyetlerinin daha yüksek olmasının, küçük ölçekli sanayii için, doğal kaynaklardan renklendirici üretimini zorlaştırdığı da belirtilmektedir. Bunun ötesinde, gıdaların üretimlerinde doğal renklerin kullanılmasının üretimi karmaşıklaştırdığı ve bu nedenle endüstride kullanımları çok daha kolay olan; yapay renklendiricilerin tercih edildiği bildirilmektedir. Yapay renklendirici maddeler ucuz, duyuşsal olarak cezbedici, uzun süre kararlı ve bitki hasat mevsimlerinin tarımsal döngüsünden bağımsız olarak tanımlanmaktadır. Buna rağmen, yapay katkı maddelerinin potansiyel sağlık riskleri hakkındaki farkındalığın ve bu konudaki soruların gittikçe arttığı da ifade edilmektedir (Ramesh ve Muthuraman, 2018).

Doğal renk maddeleri olarak tanımlanan boyalar, pigmentler veya diğer bileşikler; çeşitli sebzeler, meyveler, tohumlar, algler, böcekler, hayvanlar veya minerallerden elde edilmektedirler. Bu doğal maddelerin, petrol bazlı ürün içermedikleri belirtilmektedir. Safran, kırmızıbiber (paprika), zerdeçal, pancar özü ve yaprakları doğal renklendiricilere örnek olarak verilmektedir (Ramesh ve Muthuraman, 2018).

Doğal boyaların çeşitli amaçlarla kullanılması ile ilgili ilk yazılı belgelerin, milattan 2600 yıl önce Çin'de bulunduğu rapor edilmektedir. Aztek ve Maya kültürlerinde, aynı

isimli bir böcekten elde edilen koşineal boyasının yaygın olarak kullanıldığı, İncil’de safrandan bahsedildiği, Japonya’da ise 8.yy’a ait kaynaklarda doğal pigmentlerin soya ve adzuki keki gibi bazı gıdalarda kullanıldığı ifade edilmektedir. Sentetik pigmentlerin ortaya çıkmasından önce, mevcut tek renk kaynağının doğal pigmentler olduğu, bunların yaygın olarak kullanıldıkları ve önemli bir pazar oluşturduğu bildirilmektedir. Doğal pigmentlerin; doğal liflerin (yün, pamuk, ipek), kürk ve derinin renklendirilmesinin yanısıra bazı kozmetik ürünlerin renklendirilmesinde ve mürekkep, suluboya ve yağlı boyaların üretimlerinde kullanıldıkları bilinmektedir. Sentetik bir pigment olan “mauvine”in ilk kez 1856 yılında Perkin tarafından keşfedildiği, daha sonra ucuz ve kullanışlı birçok sentetik boya çeşidinin daha bulunmasıyla doğal boyaların kullanımlarının giderek azaldığı belirtilmektedir (Büyüksırt, 2011; Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013; Rao, Xiao ve Li, 2017).

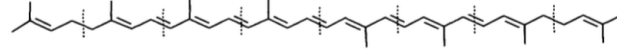
Renk maddeleri; doğal renk maddeleri, doğala özdeş renk maddeleri ve yapay renk maddeleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (Saldamlı ve Uygun, 2014; Caroch, Morales ve Ferreira, 2015; Ramesh ve Muthuraman, 2018). Gıda endüstrisinde renk maddelerinin kullanımlarının yaygın olması nedeniyle, bunlarla ilgili yasal düzenlemelerde, tüm dünyada oldukça hassas yaklaşımların bulunduğu ve bir renk maddesinin gıda endüstrisinde kullanılan miktarının; hiçbir şekilde toksik etki yaratmayacak düzeyde olması gerektiği ifade edilmektedir. Yapay renk maddelerinin aşırı tüketiminin olası toksik etkileri nedeniyle; alerjik reaksiyonlar, kanser, astım, karın ağrısı, mide bulantısı, karaciğer ve böbrek hasarları gibi ciddi sağlık tehditleri oluşturabildiği belirtilmektedir (Cardoso, Kanno ve Karp, 2017). Mutajenite ve potansiyel karsinojenite dâhil olmak üzere, istenmeyen toksik etkileri nedeniyle kullanımına izin verilen sentetik renklendirici sayısındaki azalmadan dolayı, doğal kaynaklardan elde edilmiş ve gıdalarda kullanılabilecek çeşitli pigmentlerin üretilmeleri konusunda çalışmaların arttığı bildirilmektedir (Cardoso ve ark., 2017). Günümüzde kimyasal olarak sentezlenen renk maddelerine, olası toksikolojik etkilerinden dolayı, ilgili düzenleyici kuruluşlar tarafından bazı kısıtlamalar getirilmektedir. Bu nedenle de, gıda endüstrisinde ve tüketicilerde, daha güvenilir olarak kabul edilen doğal renk maddelerine olan ilginin giderek arttığı rapor edilmektedir (Türkkan, 2007; Chandi ve Gill, 2011). Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bazı doğal renk maddeleri, Çizelge 2.1’de verilmektedir (Saldamlı ve Uygun, 2014).

Çizelge 2.1. Gıda endüstrisinde kullanılan bazı doğal renk maddeleri

<b>Renk maddeleri</b>	<b>Sınırlama</b>
Anatto ekstraktı	Yok
β-karoten	Yok
Pancar tozu	Yok
β-apo-8-karotenol	15 mg/lb
Kantaksantin	66 mg/lb
Karamel	Yok
Koşineal ekstraktı, karmin	Yok
Havuç yağı	Yok
Pamuk tohum unu, kavrulmuş	Yok
Demir glukonat	Siyah zeytinlerin boyanmasında
Meyve, sebze suları	Yok
Üzüm kabuğu ekstraktı (enosiyenin)	Alkolsüz içecekler
Paprika, paprika oleoresini	Yok
Riboflavin	Yok
Safran	Yok
Titanyum dioksit	% 1 maksimum
Turmerik (zerdeçal), turmerik oleoresini	Yok

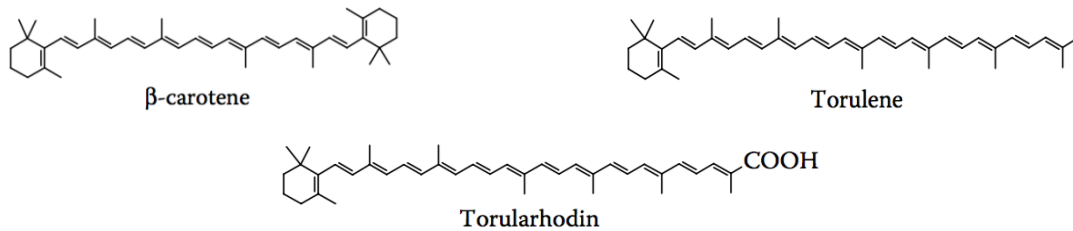
Doğal pigmentlerin; çeşitli bitkiler, böcekler ve mikroorganizmalar gibi kaynaklardan elde edildiği bildirilmektedir. Doğada yaygın olarak bulunan alg, mikroalg, bakteri, küf ve mayaların; violasein, fikosiyenin, monaskinler, flavinler, kinonlar ve karotenoidler gibi farklı renk spektrumlarında yer alan doğal renk pigmentlerini üretebildikleri bilinmektedir. Karotenoidlerin; doğal pigmentlerin en önemlilerinden birini temsil ettiği ve çeşitli bitkilerin, hayvanların ve mikroorganizmaların sarı, turuncu, kırmızı ve mor renklerinden sorumlu olduğu ifade edilmektedir (Cardoso ve ark., 2017). Karotenoidler doğal olarak oluşan, genel olarak yağda çözünebilen pigmentler olup, yüksek miktarda doymamış izopren türevlerini içeren tetraterpenoidler olarak tanımlanmaktadır (Petrik ve ark., 2013; Mata-Gómez ve ark., 2014). Karotenoidler sekiz izopren ünitesinden oluşan, kırk karbon atomlu bir hidrokarbon iskeleti içermektedirler. Karotenoidlerin iskeletini oluşturan uzun asiklik  $C_{40}H_{56}$  yapısında, konjuge çift bağlar bulunduğu belirtilmektedir (Şekil 2.1). Tüm karotenoidlerin; bu zincir yapısının

hidrojenasyon, dehidrojenasyon, siklizasyon, oksidasyon reaksiyonları, bunların kombinasyonları ya da bu temel karbon iskelet yapısının parçalanmasıyla veya bu yapıların biraraya gelmesiyle oluştuğu ifade edilmektedir (Pfander, 1992).



Şekil 2.1. Karotenoid oluşumunda yer alan temel asiklik C<sub>40</sub>H<sub>56</sub> yapısı

Karotenoidler genel olarak, sadece hidrokarbon yapısında olan karotenler (likopen, β-karoten ve α-karoten) ve bunların oksijenlenmiş türevleri olan ksantofiller (zeaksantin, spirilloksantin, myxoksantofil, anteroksantin ve torularhodin) olarak sınıflandırılmaktadırlar (Goodwin, 1980). Ayrıca tek ve çift bağları aynı yönde hizalanmış olanların; retrokarotenoidler (zeaksantin, spirilloksantin, myxoksantofil, anteroksantin ve torularhodin), karbon atomu kaybı olmadan oksidatif olarak parçalanmalarını; secokarotenoidler, oksidatif parçalanmayla karbon iskelet yapısı kısalanların ise; apokarotenoidler olarak sınıflandırıldıkları bildirilmektedir. Şekil 2.2’de gıdalarda renklendirici olarak kullanılan bazı karotenoidlerin açık formülleri verilmektedir (Dufosse, 2008).



Şekil 2.2. Bazı önemli karotenoidlerin açık kimyasal formülleri

Karotenoidlerdeki polien zincir yapısında (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) yer alan çift bağların, insan gözünün algıladığı renklerden sorumlu olduğu belirtilmektedir (Hernández-Almanza ve ark., 2014). Karotenoid yapısındaki kromoforu oluşturan uzun zincir yapısındaki konjuge çift bağların, görünür ışık spektrumunun belirli kısımlarını (400-500 nm) absorblaması sonucu sarı, portakal rengi ve kırmızı gibi farklı renkteki pigmentlerin oluştuğu bildirilmektedir (Acar ve Gökmen, 2014; Alcaíno, Baeza ve Cifuentes, 2016). Çoğu



karotenoidin, görünür ışık spektrumunun mordan yeşile kadar olan bölgesinde maksimum ışık absorpsiyonu gösterdiği, bu nedenle de bu pigmentlerin; insan gözü tarafından ışığın absorblanamadığı bölgede yer alan, kırmızıdan sarıya değişen renklerde pigmentler olarak algılandıkları belirtilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Bazı çiçeklerin, meyve ve sebzelerin sarıdan kırmızıya değişen renklerinden karotenoidlerin sorumlu olduğu ifade edilmektedir (Mapelli, Franzén ve Olsson, 2013). Karotenoidlerin bitkisel dokularda klorofiller ile birlikte kloroplast içerisinde, kristal veya amorf yapıda serbest halde veya yağlı ortamda çözünmüş olarak bulunabildikleri belirtilmektedir. Aynı zamanda karotenoid yapılarının yağ asitleriyle ester halinde veya şekerlerle ve proteinlerle birleşmiş halde bulunabildiği ve karotenoidlerin bu şekilde oluşturduğu bileşiklerle, renklerinin değişebildiği de bildirilmektedir (Acar ve Gökmen, 2014). Çoğu kuş ve deniz canlısının; karotenoid içeren besinlerle beslendikleri ve dokularında karotenoidlerin birikmesi sonucunda bu canlıların, kendilerine özgü karakteristik renklerinin oluştuğu bilinmektedir. Deniz canlılarındaki karotenoidlerin renk skalalarının, yaygın olarak proteinlerle kompleks oluşturdukları için, yeşil, mavi ve mora kadar değişebilen renklerde oldukları belirtilmektedir. Karotenoidlerin; bitkiler, algler ve fototrofik bakterilerde spesifik pigment-protein kompleksi olarak buldukları ve fotosentez sırasında ışığı toplamaktan sorumlu alıcı pigment olarak çalıştıkları ifade edilmektedir. Bunun yanısıra karotenoidlerin, yoğun ışık stresi altında enerji fazlalığını sönmüleyerek, ışığa karşı koruyucu olarak görev yaptıkları da belirtilmektedir. Meyveler ve çiçekler, böcekler ve hayvanlar için; bitkilerin tozlaşmalarında ve tohumlarının dağılmasında etkili bir sinyal olan renklerini veren karotenoidlerin; can alıcı bir ekolojik role sahip olduğu da bildirilmektedir (Alcaíno, Baeza ve Cifuentes, 2016).

Karotenoid pigmenti varlığının, ilk kez Guibort tarafından, 1827 yılında, yeşil yapraklarda belirlendiği, daha sonra ise Wackenroder'in, 1831 yılında, havuçtan izole ettiği kristal sarı pigmente karoten adını verdiği ifade edilmektedir (Bauernfeind, 1981; Nelis ve De Leenheer, 1989; Pfander, 1992; Frank ve ark., 2006; Ötles ve Çağindi, 2008). Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalarda ise sırasıyla; Willstätter ve Mieg isimli araştırmacıların karotenoidin temel yapısını; izoprenoid türevi bir bileşik olarak belirledikleri, Zeichmeister adlı araştırmacı tarafından polien kavramının geliştirildiği

ve Kuhn tarafından ise; karotenoidlerde renk oluşumu için çift bağ zincirlerindeki konjugasyon oluşumunun gerekli olduğunun, spektroskopik yolla belirlendiği rapor edilmektedir (Isler, 1971).

Karotenoidlerin üretiminde kimyasal sentezin, 1950 yılından beri kullanıldığı belirtilmektedir (Isler, 1971; Bogacz-Radomska ve Harasym, 2018). Bu tarihten 4 yıl sonra ise sentetik  $\beta,\beta$ -karotenin endüstriyel ölçekte üretildiği, yem ve gıda boyası olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Doğal karotenoidler içerisinde yalnızca birkaçının endüstriyel boyutta sentezlenebildiği ve bunlardan bazılarının; likopen, kantaksantin, astaksantin,  $\beta,\beta$ -karoten,  $\beta$ -apo-8-karotenol,  $\beta$ -apo-8'-karoten ve sitranaksantin olduğu ifade edilmektedir (Bogacz-Radomska ve Harasym, 2018). Karotenoidlerin kimyasal sentezinde Wittig reaksiyonunun ve Grignard bileşiklerinin kullanıldığı ifade edilmektedir. Wittig reaksiyonunun, aldehit veya ketonlardan aldehitler ürettiği ve trifenilfosfinin özel türevlerinin bu reaksiyonda anahtar rol oynadığı belirtilmektedir. Wittig reaksiyonunda karotenoid elde edilmesinde bir yöntemin; 15 karbon atomu içeren iki fosfonyum tuzu ve 10 karbon atomu içeren bir dialdehid molekülünün birleştirilmesi olduğu bildirilmektedir. Daha sonra reaksiyon ürünlerinin,  $\beta,\beta$ -karoten, likopen veya astaksantin içeren 40 karbon atomundan oluşan simetrik bileşikler meydana getiren bir izomerizasyon reaksiyonuna tabi tutulduğu ifade edilmektedir (Bogacz-Ramska ve Harasym, 2018). Karotenoidlerin kimyasal olarak sentezlerinin çevreye zarar veren atıklar oluşturması nedeniyle tüketici tepkisini çektiği ifade edilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Doğada; yüksek bitkilerde, alglerde ve fototrofik bakterilerde karotenoidlerin oluştuğu bilinmektedir. Karotenoidlerin, bitkilerde kloroplast ve kromoplastların zarlarında gömülü olduğu, bu pigmentlerin renklerinin klorofille maskelendiği, yine de karotenoidlerin çok sayıda çiçek ve meyvenin parlak renklerinden sorumlu oldukları belirtilmektedir. Genel olarak hayvanlarda bulunan karotenoidlerin, onların beslenmeleri ile ilgili olduğu ifade edilmektedir. Somon gibi deniz canlılarının ve flamingo gibi bazı kuşların renklerinin, algler veya karotenoidlerce zengin diyetleri nedeniyle oluştuğu belirtilmektedir (Cardoso ve ark., 2017). Karotenoid kaynağı olarak kabul edilen, çeşitli bitkisel ve hayvansal gıdalar arasında havuç, ıspanak gibi yeşil yapraklı sebzeler ile portakal, domates, dana ciğeri, süt, tereyağ, çedar peyniri ve

yumurta yer almaktadır (Furr ve Clark, 2003; Ötles ve Çagindi, 2008; Sliwka, Partali ve Lockwood, 2010; Kirti ve ark., 2014). Doğada karotenoidlerin, hem bitkisel ve hem de hayvansal yapılarda bulunabildiği, karotenoidlerin doğal olarak sentezlerinin ise sadece mikroorganizmaların ve fotosentetik bitkilerin sahip oldukları enzimlerle gerçekleşebildiği belirtilmektedir (Kahyaoğlu, 1999).

Doğal kaynaklardan karotenoid üretiminin endüstriyel olarak; bitkilerden katı-sıvı ekstraksiyonu ve/veya küf, alg, maya ve bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik proseslerle gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Mata-Gómez ve ark., 2014). Karotenoid üretimi için geliştirilen metotların; fizyokimyasal, kimyasal ve biyoteknolojik olarak sınıflandırılmaktadır. Bitki hücrelerinde karotenoidlerin, kloroplast organeli olan tilakoid membranlarda bulunduğu bildirilmektedir. Bitkisel materyallerden ekstraksiyonun, karotenoidlerin eldesinde fizyokimyasal yöntemeye dayanan, bilinen en eski yöntem olduğu belirtilmektedir. Bitkiler arasındaki en yaygın  $\beta$ -karoten kaynağı; havuç olarak bilinmektedir. Farklı basamaklardan oluşan proses basamakları; temizleme ve dilimleme, havuç suyu eldesi, protein çöktürme, sedimentasyon, santrifügasyon, organik çözücü ile ekstraksiyon, filtrasyon, deodorizasyon, evaporizasyon ve kristalizasyon olarak sıralanmaktadır. Bazı durumlarda, karotenoid ekstraksiyonunun etkinliğini artırmak için ham maddenin fermantasyona, kurutmaya veya tekrar parçalama işlemlerine tabi tutulduğu da ifade edilmektedir. Bu tip üretimde, bir kaç gram karotenoid elde etmek için kilogramlarca bitkisel materyalin işlenmesinin gerektiği de belirtilmektedir. 50 kg havuçtan sadece 2 g kristal formda  $\alpha$  ve  $\beta$ -karoten elde edilebildiği bildirilmektedir. Bu nedenle bitkilerdeki karotenoid biyosentezinin etkinliğini artırmak ile ilgili genetik modifikasyonlar üzerine büyük çaba sarfedildiği de vurgulanmaktadır (Bogacz-Radomska ve Harasym, 2018). Bitkilerden ekstraksiyon yolu ile doğal karotenoid üretiminde ve pazarlamasında, mevsimsel ve coğrafi özelliklere de bağımlı kalındığı için, mikrobiyel fermantasyon yoluyla doğal karotenoid üretiminin bir çok açıdan avantajlı olduğu ifade edilmektedir (Frengova, Simova ve Beshkova, 2006; Thakur ve Azmi, 2013; Hernández-Almanza ve ark., 2014).

Karotenoidlerin biyoteknolojik üretimlerinin; doğadaki mikroorganizma çeşitliliğine, çok sayıda ve çeşitte substrat ve tarımsal-endüstriyel atığın değerlendirilebilme olanağına, ayrıca; pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen ve ışık yoğunluğu gibi işlem

parametrelerinin kontrol edilebilmesine ve bunun yanısıra; farklı biyoproseslerde kullanıldıktan sonra biyokütlenin karotenoid ekstraksiyonu için tekrar değerlendirilebilmesine dayanan birçok avantaja sahip olduğu bildirilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Pigment üretimi için ideal bir mikroorganizmanın özellikleri arasında; çok çeşitli karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme, geniş pH ve sıcaklık aralıklarında gelişebilme, çeşitli minerallere toleranslı olma, pigment üretim miktarının iyi olması, toksik madde üretmeme, patojen olmama ve üretilen pigmentin biyokütleden kolay ayrılabilmesi sayılmaktadır (Kirti ve ark., 2014). Mevcut ve üzerinde halen çalışılan ticari mikrobiyel karotenoid üretim proseslerinde; bakteriler, algler, küfler ve mayalardan yararlanıldığı belirtilmektedir (Dufosse, 2009a). Bazı pigment üreten mikroorganizmalara örnek olarak; *Flavobacterium multivorum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sphingomonas sp.*, *Dunaliella sp.*, *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor circinelloides*, *Fusarium sporotrichioides*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Gordonia jacobea*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Rhodospirium paludigenum* ve *Rhodotorula glutinis* verilmektedir (Rao, Xiao ve Li, 2017). Çeşitli karotenoid türlerinin üretimlerinde kullanılan mikroorganizmalardan bazıları ise; Çizelge 2.2'de verilmektedir (Dufosse, 2009b; Türkcan ve Ökmen, 2012; Petrik ve ark., 2013; Sanchez ve ark., 2013; Hernández-Almanza ve ark., 2014; Kirti ve ark., 2014; Mata-Gómez ve ark., 2014; Cardoso ve ark., 2017).

Karotenoidler arasında en önemli olanların;  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, kriptoksantin, lutein, likopen, violaksantin, neoksantin, zeaksantin ve kantaksantin olduğu bildirilmektedir (Rao, Xiao ve Li, 2017).

$\beta$ -karoten, astaksantin, kantaksantin, likopen ve luteinin; en çok talep edilen ve en değerli karotenoidler oldukları ve gıda, yem ve kozmetik endüstrisi tarafından, yaygın olarak kullanıldıkları belirtilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Çizelge 2.2. Çeşitli karotenoidlerin üretimlerinde kullanılan bazı bakteri, fungus ve mikroalgler

<b>Karotenoid</b>	<b>Bakteri</b>	<b>Fungus</b>	<b>Mikroalg</b>
β-karoten	<i>Erythrobacter longus</i> <i>Brevibacterium</i> sp. <i>Mycobacterium marinum</i> <i>Streptomyces griseus</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Blakeslea trispora</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Phycomyces blakesleeanus</i> <i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>Dunaliella salina</i> <i>Coelastrella striolata</i> var. <i>multistriata</i> <i>Scenedesmus almeriensis</i> <i>Coccomyxa onubensis</i>
Likopen	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Chlorobium limicola</i>	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	<i>Chlorella</i> sp.
Astaksantin	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> <i>Pseudomonas</i> sp. SD-212 <i>Paracoccus</i> sp. <i>Brevibacterium</i> sp. 103	<i>Phaffia rhodozyma</i>	<i>Coelastrella striolata</i> var. <i>multistriata</i> <i>Haematococcus pluvialis</i>
Kantaksantin	<i>Paracoccus carotinifaciens</i> <i>Bradyrhizobium</i> spp. <i>Brevibacterium</i> sp. <i>Micrococcus roseus</i> <i>Dietzia natronolimnae</i>	<i>Cantharellus cinnabarinus</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Chlorella</i> sp. <i>Clamydomonas</i> sp. <i>Coelastrella striolata</i>

Çizelge 2.3’de, Gıda katkısı olarak kullanılan bazı karotenoid kaynakları verilmiştir (Mortensen, 2006; Cardoso ve ark., 2017; Dikshit ve Tallapragada, 2018; Ramesh ve Muthuraman, 2018).

Günümüzde; *Xanthophyllomyces dendrorhous*’dan elde edilen astaksantin ve *Blakeslea trispora* ile üretilen β-karoten gibi bazı pigmentlerin, FDA tarafından renklendirici olarak gıdalarda kullanımı güvenilir kabul edilmiş ve satışına onay verilmiştir. Gıda endüstrisinde kullanılmak üzere onaylanmış renklendirici sayısının kısıtlı olduğu, bazı

onaylı gıda renklendiricilerinin kimyasal isimleri (kantaksantin) ile bilinirken, diğerlerinin elde edildiği kaynakların (meyve suyu veya sebze suyu) isimleri ile anıldıkları belirtilmektedir (Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013).

Çizelge 2.3. Gıda katkıları olarak kullanılan bazı karotenoid kaynakları

<b>Doğal renk maddesi</b>	<b>Renk</b>	<b>Kaynak</b>
Kurkuminoidler (E100)	Sarı	<i>Curcuma longa</i>
Karmin (E120)	Turuncu kırmızı& pembe kırmızı	Dişi koşineal böceği
Klorofiller (E140)	Yeşil/Zeytin rengi	<i>Chlorella</i>
Klorofillerin bakır kompleksleri (E141)	Mavimsi yeşil	Çimen, ısırganotu, yonca
Karamel renkleri (E150a-d)	Soluk sarıdan koyu kahveye	Karamelize şeker
β-karoten (E160a)	Sarı/turuncu	Palm yağı
Safran (E160a)	Altın sarısı	<i>Crocus sativus</i>
Annatto, Biksin, Norbiksin (E160b)	Kırmızımsı-turuncu	Annatto tohumu ( <i>Bixa orellana</i> )
Paprika, kapsantin, kapsorubin (E160c)	Kırmızımsı turuncu	<i>Capsicum annum L.</i>
Likopen (E160d)	Turuncumsu kırmızı	Domates türleri ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )
Lutein (E161b)	Altın sarısı	Aynısafa çiçeği <i>Tagetas erecta</i>
Betanin (E162)	Pembe/Kırmızı	Pancar kökü
Antosiyaninler (E163)	Kırmızı-mor-mavi	Mürver, siyah üzüm kabuğu, siyah havuç, kırmızı lahana

Gıda endüstrisinde; önemli bir miktarı doğal ve doğala özdeş olmak üzere, bazıları halihazırda kullanımına izin verilmiş ve yasal olarak onaylanmış, çok sayıda gıda

renklendiricisinin bulunduğu belirtilmektedir. Bunlardan, Annatto (E160b), *Bixa Orellana* L. ağacından ekstrakte edilmiş, yasal izinli, doğal bir gıda renklendiricisidir. Annatto karışımının ana bileşenlerinin; sarıdan turuncuya değişen renkte, bixin ve norbixin karotenoidleri olduğu ifade edilmektedir. Çok sayıda gıda ürününde annatonun kullanıldığı ve bu ürünlerden bazılarının; kekler (250-1000 mg/kg hamur), bisküviler, pirinç, süt ürünleri, un, balık, alkolsüz içecekler, atıştırmalıklar ve et ürünleri olduğu bildirilmektedir.

Paprika'nın, Avrupa Birliği (AB) tarafından onaylı (E160c) ve turuncudan kırmızıya değişen renk gösteren diğer iki karotenoid olan; kapsantin ve kapsorubin karışımı olduğu belirtilmektedir. Gıdalarda kullanılan diğer karotenoidlerin;  $\beta$ -karoten, lutein, violaksantin, neoksantin, beta-kriptoksantin, fuksoksantin, likopen ve astaksantin olduğu rapor edilmektedir. Bunların alglerden, bitkilerden ve ayrıca böceklerden ekstrakte edildiği ve gıda endüstrisinde geniş bir renk spektrumunu temsil ettiği bildirilmektedir. Karotenoidlerin kullanıldıkları gıdalar arasında soslar, marineler, baharat karışımları, içecekler, kaplamalar ve süt ürünleri yer almaktadır (Carocho, Morales ve Ferreira, 2015).

Pigment üretimi için küfler yerine bakterilerin kullanılmasının, daha kısa yaşam döngüsü ve kolay genetik modifikasyon gibi üstünlüklere sahip olduğu belirtilmektedir. Buna rağmen küf pigmentleriyle kıyaslandığında, bakteri pigmentlerinin çoğunun hala araştırma ve geliştirme aşamasında olduğu da bildirilmektedir. Doğada pigment üreten bakterilerin yaygın olduğu ve bunların çeşitli ekolojik alanlarda bulunabildikleri, farklı sıcaklıklara sahip ve/veya yüksek miktarda tuz içeren ortamlarda yaşayabildikleri ifade edilmektedir. Aktinobakterilerde, diğer bakteri gruplarına nazaran pigment üretiminin daha çok görüldüğü belirtilmektedir. Diğer bakteri grupları ile karşılaştırıldığında pigment üretiminin daha çok görüldüğü aktinobakterilerden; *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Rhodococcus* ve *Kitasatospora* gibi cinslerin çeşitli pigmentleri ürettikleri bildirilmektedir. Küflere benzer olarak bakterilerin de; karotenoidler, melanin, violasein, prodigiosin, fikosiyenin, aktinorhodin ve zeaksantin gibi çeşitli pigmentleri ürettikleri ifade edilmektedir (Rao, Xiao ve Li, 2017).

Bazı bakteriler ve küfler gibi fotosentetik olmayan bazı organizmalarda, ışık ve bol oksijenin bulunduğu gelişme koşullarında, fotooksidatif hasara karşı koruyucu olarak karotenoidlerin bulunduğu ifade edilmektedir. Bakteriler başlıca kantaksantin üreticisi olarak rapor edilirlerken, küfler tarafından üretilen ana karotenoidler ise;  $\beta$ -karoten, torulen ve torularhodin olarak bildirilmektedir. Mikroalglerin ise; lutein,  $\beta$ -karoten ve astaksantin üreticisi oldukları belirtilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Termofilik halofilik bakteri türleri olan; *Halococcus morrhuae* ve *Halobacterium salinarum*'un, kırmızı turuncu pigmentli koloniler oluşturabildikleri ve *H. salinarum*'un, bakterioruberin ve astaksantin karotenoidlerini üretebildikleri rapor edilmiştir (Vandamme, 2011; Cardoso, Kanno ve Karp, 2017). Bunun yanısıra bazı *Flavobacterium* türlerinin; zeaksantin, *Haloferox alecandrinus*'un ise; kantaksantin üreticisi oldukları bildirilmektedir. Fotosentetik olmayan bakterilerde karotenoid üretiminin; besiyerinin kompozisyonunun yanısıra sıcaklık, karıştırma hızı ve havalandırmadan etkilendiği belirtilmektedir. Fermantasyon ortamındaki karbon ve azot kaynaklarının, inorganik tuzların, kimyasal ajanların ve metal iyonlarının karotenoid üretimini olumlu veya olumsuz etkileyebildiği ifade edilmektedir (Cardoso, Kanno ve Karp, 2017).

*Flavobacterium*'dan elde edilen zeaksantin, kümes hayvanlarının derisinin sarı rengini artırmak veya yumurtalarının sarı rengini belirginleştirmek için, yemlerinde katkı olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Karides ve sazan gibi balıklar ve bazı kabukluların, zeaksantin pigmentini kırmızı renkli bir pigment olan; astaksantine dönüştürdükleri rapor edilmektedir. Bu sarımsı turuncu pigmentlerin, FDA tarafından güvenilir kabul edilip onaylanmasının, sadece insan sağlığına fayda sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda üretimi sırasında çevreye toksik kimyasalların salınmasına neden olan sentetik renklendiricilerin kısıtlanması sonucu, doğadaki biyolojik çeşitliliğin de korunmasına fayda sağlayacağı bildirilmektedir (Aruldass, Dufossé ve Ahmad, 2018).

Mikroalglerin kolay ve hızlı geliştirilebilmeleri, yüksek miktarda karotenoid üretebilmeleri, biyoyararlılıklarının ve biyokullanılabilirliklerinin yüksek olması nedeniyle karotenoidlerin üretimlerinde, sıkça kullanıldıkları ifade edilmektedir. Endüstriyel anlamda, mikroalglerden karotenoid üretiminin, başta Hindistan olmak



üzere sırasıyla; Avustralya, ABD ve Çin tarafından gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Cardoso ve ark., 2017). Mikroalglerden; *Dunaliella salina*, *D. bardawil* ve *Haematococcus pluvialis*'in, ticari olarak karotenoid üretiminde yaygın olarak kullanıldıkları rapor edilmektedir. *D. salina*'nın kuru hücre ağırlığının % 3'ü oranında karotenoid içerdiği, toplam karotenoid içeriğinin % 86.5'nin  $\beta$ -karoten olduğu, bunun yanısıra hücrenin  $\alpha$ -karoten, lutein ve likopen de içerdiği bildirilmektedir (Türkcan ve Ökmen, 2012). Mikroalglerin, belirli stres koşullarında karotenoid üretebildikleri, karotenoid kompozisyonu ve verimi üzerine; kültür ortamının besin içeriği ve tuz derişimi gibi bazı çevresel koşulların etkili oldukları belirtilmektedir. Prokaryotik bir mikroalg olan ve siyanobakter olarak da tanımlanan *Spirulina*'nın, yüksek miktarda  $\beta$ -karoten, kriptoksantin ve zeaksantin ürettiği bildirilmektedir (Sujatha ve Nagarajan, 2013). Japonya'da geleneksel olarak yetiştirilen *Chlorella*'nın, endüstriyel olarak *Spirulina*'dan daha yüksek verimde karotenoid üretebilmesi nedeniyle son yıllarda önem kazandığı, üretilen mikroalg biyokütlelerinin, püskürtmeli yöntemle kurutularak, ticari karotenoid kaynakları olarak toz, tablet veya kapsül formlarında pazarlandıkları belirtilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Asya ülkelerinde ticari olarak üretilen birçok gıdada, karotenoid kullanımının yaygın olduğu bilinmektedir. Asya'da red koji üretiminin, yüzlerce yıldır sürdürüğü ve tipik kırmızımsı rengin üretimi için; *Monascus* cinsi bazı küf türleri tarafından pirincin fermentasyonunun kullanıldığı bildirilmektedir. *Monascus* türleri tarafından üretilen bu kırmızı pigmentin; şarap, kırmızı soya peyniri, et, et ve balık türevi ürünler için gıda renklendiricisi olarak kullanıldığı da belirtilmektedir (Cardoso ve ark., 2017). Gıdalarda *Monascus* pigmentinin kullanılmasıyla ilgili 50'den fazla patent yayınlandığı ifade edilmektedir. Bunun yanısıra, yüzyıllardır kullanılmasına rağmen çoğu mikrobiyel pigmentin, birçok ülkede halen yasak olduğu da rapor edilmektedir. Yüzyıllardır Asya'da gıda renklendiricisi olarak kullanılan *Monascus* pigmentinin mikotoksin varlığı nedeniyle Avrupa ve ABD'de yasak olmasının, buna en iyi örnek olduğu belirtilmektedir (Rao, Xiao ve Li, 2017).

*Blakeslea trispora*'nın, Avrupa ülkelerinde  $\beta$ -karoten ve likopenin endüstriyel üretimlerinde kullanıldığı bildirilmektedir. *B. trispora*'dan elde edilen  $\beta$ -karoten

açısından zengin küf misellerinden, hayvan yemi olarak yararlanıldığı da belirtilmektedir.

Karotenoid pigmenti üreten küfler arasında; *Gibberella fujikuroi*'nin de yer aldığı, bu küfün ortamda ışık olduğunda turuncu karotenoidleri üretebildiği ancak karanlıkta karotenoid üretemediği rapor edilmektedir (Vandamme, 2011; Cardoso, Kanno ve Karp, 2017). Literatürde çok sayıda küf pigmenti rapor edilmesine rağmen, bu pigmentlerin; toksisite, yasal izin, stabilite ile ilgili çok sayıda kriteri sağlaması ve petriden pazara getirilebilmesi için büyük çaplı bir yatırımın gerektiği belirtilmektedir (Rao, Xiao ve Li, 2017).

Bu durumların yanısıra aşağıda belirtilen bazı nedenlerden dolayı, mayaların karotenoid üretiminde genellikle tercih edildikleri bildirilmektedir.

- Büyük ölçekli ticari üretimlerde mayalar, tek hücreli olmaları ve daha yüksek gelişme hızları nedeniyle alg ve küflere göre daha elverişli kabul edilmektedirler (Frengova ve Beshkova, 2009).
- Klasik fermentörlerde maya hücreleri, istenen hücre yoğunluğunda ve büyük miktarlarda üretilebilmektedirler (Bhosale, 2001).
- Alg ve bakterilere kıyasla maya hücrelerinin, düşük maliyetli besiyerlerinde daha yüksek üreme hızına sahip oldukları belirtilmektedir (Malisorn ve Suntornsuk, 2008).
- Kuru biyokütle formundaki maya hücrelerinin, karotenoid kaynakları olarak, çeşitli farmasötik ürünlerde ve yem katkısı olarak kullanılabilir oldukları bildirilmektedir (Bhosale, 2001).

Karasal, tatlı su ve deniz habitatlarında dünya çapında dağılımı ve çok çeşitli substratlarda kolonize olabilme yeteneği sayesinde karotenojenik mayaların yaygın olduğu düşünülmektedir. *Phaffia rhodozyma*, *Rhodotorula sp.*, *Sporobolomyces roseus*, *Rhodospiridium sp.*, *Sporidiobolus* ve *Candida utilis* türlerinin, karotenoid üretebildikleri rapor edilmektedir (Manimala ve Murugesan, 2017).

1960'lı yıllarda maya ekolojisi üzerine yaptığı çalışmalar sırasında, Herman Phaff tarafından, önceden *P. rhodozyma* olarak bilinen, kırmızı bir maya olan; *Xhantamonas*

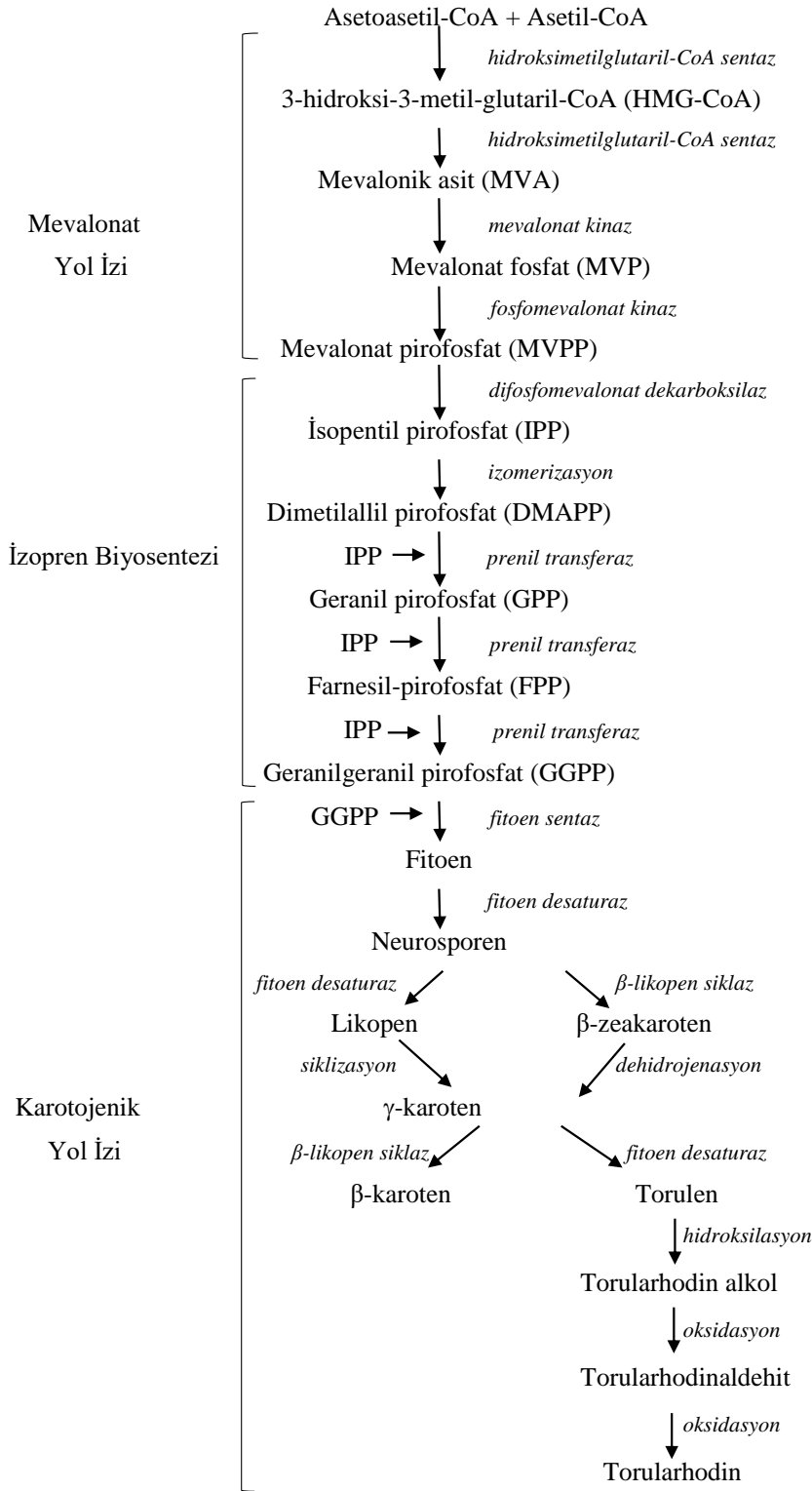
*dendrorhous*'un izole edildiği belirtilmektedir. Bu mayanın sentezlediği ana pigmentin, ticari olarak önemli bir karotenoid olan astaksantin olması nedeniyle *X. dendrorhous*'un, biyoteknolojik açıdan önemli bir tür olduğu ifade edilmektedir. *X. dendrorhous*'un, astaksantin sentezleyebilen tek kırmızı maya olduğu ve ürettiği toplam karotenoidin; %80-90'ının astaksantin oluşturduğu rapor edilmektedir. Bu özelliğin, ilgili mayanın biyolojisi ile ilgili araştırmaları olduğu kadar, fermantasyonla astaksantin üretimi için endüstriyel bir mikroorganizma olarak geliştirilmesini de teşvik ettiği bildirilmektedir (Manimala ve Murugesan, 2017). *Phaffia rhodozyma*'nın 1970'li yıllarda, bıldırcın ve tavukların yumurta sarılarına istenen karakteristik özelliklerin yanısıra renk vermesi amacıyla ve ayrıca somon, ıstakoz gibi hayvanların beslenmesi için, ticari açıdan önemli bir pigment kaynağı olarak önerildiği belirtilmiştir (Heer ve Sharma, 2017).

Diğer bir maya; *Sporobolomyces* türlerinde başlıca üretilen pigmentin,  $\beta$ -karoten olduğu belirtilmektedir. Bazı oksitlenmiş karotenoid türevlerinin, *Sporobolomyces* cinsine ait suşlar tarafından da üretilbildiği bildirilmektedir. *Sporobolomyces* cinsinin yaklaşık 20 türünün bulunduğu ve bunlardan en bilinenlerinin; *S. roseus* ve *S. salmonicolor* oldukları ifade edilmektedir. *S. roseus*'un torulen ve torularhodin gibi diğer bazı karotenoid pigmentlerini de üretebildiği belirtilmektedir (Manimala ve Murugesan, 2017).

Mayalardan karotenoid üretimi ile ilgili ilk çalışmaların 1950'li yıllarda başladığı ve bugüne kadar çok sayıda maya cinsinde karotenoid sentezinin tespit edildiği rapor edilmektedir (Moliné ve ark., 2014). Çoğu maya cinsi için karotenoid üretiminin; logaritmik evrenin sonunda başlayarak duraklama evresinde de devam ettiği bildirilmektedir. *Rhodotorula* cinsi dâhil olmak üzere mayalar tarafından gerçekleştirilen karotenoid biyosentezi yol izi, Şekil 2.3'de gösterilmektedir (Frengova ve Beshkova, 2009; Kot ve ark., 2016).

Karotenoidlerin, diğer bazı ikincil metabolitler; sesquiterpenoidler ve steroidlerde olduğu gibi, genel olarak geranil-geranil difosfat ve farnesil difosfat yapı taşlarından üretildiği bildirilmektedir (Cardoso ve ark., 2017). Simpson ve arkadaşlarının 1964 yılında, karotenoid biyosentezi için, biyosentetik bir yol izi tanımladıkları, daha

sonrasında ise; Goodwin'in, mayalar tarafından karotenoid biyosentezi için genel yol izini tekrar revize ettiği ve söz konusu biyosentezin; üç temel basamaktan oluştuğunu ifade ettiği bildirilmektedir.



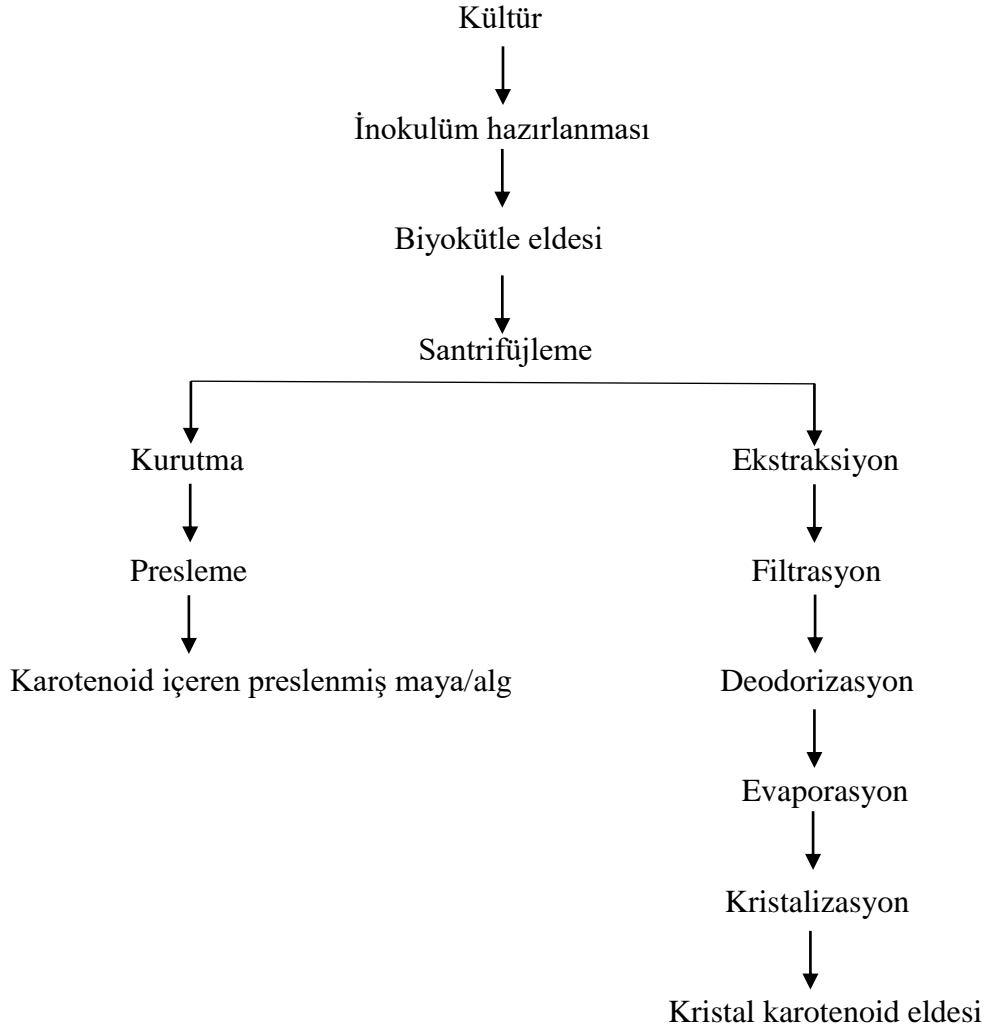
Şekil 2.3. *Rhodotorula* türlerinde karotenoid biyosentezi

Mayalarda, karotenoidlerin mevalonik asit yoluyla sentezlendiği bildirilmektedir. Bu ilk aşamada önce Asetil-CoA'nın, 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA)'ya, HMG-CoA sentazın kataliziyle dönüştüğü, daha sonra HMG-CoA'nın terpenoid biyosentetik yolunun ilk spesifik öncülü olan; C6 bileşiğinin, mevalonik asite (MVA) dönüştüğü belirtilmektedir. Daha sonra mevalonik asitin, mevalonat kinaz enzimi ile fosforilasyonunu takip eden dekarboksilasyon reaksiyonunun sonucunda isopentenil pirofosfata (IPP) çevrildiği bildirilmektedir.

İkinci basamakta IPP, dimetilallil pirofosfata (DMAPP) izomerize olduktan sonra, DMAPP'ye üç IPP molekülünün prenil transferaz enziminin katalizi ile ardışık olarak eklenmesiyle, 20 C atomlu geranil geranil pirofosfat (GGPP) bileşiğinin oluştuğu ifade edilmektedir. Bu aşamada, iki GGPP molekülünün kondensasyonu ile metabolik yoldaki C40 bileşiği, fitoen oluştuğu da belirtilmektedir. Karotenoid sentezinin üçüncü basamağında; fitoenin birinci veya ikinci çift bağının desatürasyonu ile likopenin oluştuğu belirtilmektedir. Likopenin, birçok siklik karotenoidin oluşumunda öncül madde olarak rol aldığı ifade edilmektedir. Pigment üreten tüm mayalar için likopen molekülünün bir ucunda siklizasyon oluşumu sonucunda ilk olarak  $\gamma$ -karotenin oluştuğu bildirilmektedir.  $\gamma$ -karotenin asiklik son grubunun siklizasyonu ile  $\beta$ -karoten oluştuğu, 3', 4' pozisyonlarındaki iki hidrojen atomunun uzaklaştırılarak desatürasyonu ile torulenin oluştuğu ifade edilmektedir. Torulenin hidroksilasyonu ve oksidasyonu sonucunda ise, torularhodinin oluştuğu belirtilmektedir (Frengova ve Beshkova, 2009; Moliné ve ark., 2014; Cardoso ve ark., 2017).

$\beta$ -karoten üretiminde biyosentez kadar önemli bir diğer basamağın ürün ayırma prosesi olduğu ifade edilmektedir. Hücre zarının parçalanması ve hücre içindeki bileşiğin ayrılması olan  $\beta$ -karotenin ekstraksiyonu işleminde, uygulanacak en uygun yöntemin belirlenmesinin, üretim prosesinin geliştirilmesindeki en önemli basamak olduğu belirtilmektedir.  $\beta$ -karotenin endüstriyel ölçekte üretiminin, *B. trispora* ve *D. salina* ile gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Prosesin; kültürlerden inokulum hazırlanması, biyokütle sentezi ve karotenoid ekstraksiyonu olmak üzere üç ana basamaktan oluştuğu belirtilmektedir. Biyokütleye uygulanacak teknolojik işlemlerin,  $\beta$ -karotenin istenen son ürün yapısına bağlı olarak belirlendiği bildirilmektedir. Şekil 2.4'de; mikrobiyel

kaynaklı  $\beta$ -karoten üretimi için kullanılan prosese ait özet akım şeması verilmektedir (Bogacz-Radomska ve Harasym, 2018).



Şekil 2.4. Mikrobiyel yolla karotenoid üretimi

Karotenoidler, bitki ve mikroorganizma hücreleri içerisinde biriken nonpolar moleküller olarak da tanımlanmaktadır. Bu nedenle genellikle üretimin; karotenoidlerin çözünmesini artırmak amacıyla biyokütleyle uygulanan ön işlemler ve izleyen; düşük polariteli uygun çözücüler ile katı sıvı ekstraksiyonu basamaklarını içerdiği belirtilmektedir. Bu aşamadan sonra, elde edilen çözeltinin kullanım amacına göre; son ürün olabileceği, çözücünün uzaklaştırılabileceği veya ek bir saflaştırma işlemi uygulanabileceği bildirilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Karotenoid üretimindeki ilk adımın; genellikle kurutma ve öğütme yoluyla biyokütleye bir ön işlem uygulanması olduğu ifade edilmektedir. Kurutmanın, işleme girecek materyalin hacmini azalttığı, biyokütleye çözücünün nüfuzunu kolaylaştırdığı ve çözücü ile su misellerinde çözünmüş kontaminantları azalttığı için, yaygın olarak tercih edildiği rapor edilmektedir. Öğütme basamağının ise; biyokütle matriksinin yüzey alanını artırdığı ve çözücüyle teması kolaylaştırdığı için önemli olduğu belirtilmektedir. Kalın hücre duvarlı organizmalar söz konusu olduğunda; hücrenin kimyasal ve mekanik parçalanmasının, kurutma işleminden önce yapılabileceği çünkü genellikle biyokütlenin önce kurutulduğunda iyi parçalanamayacağı bildirilmektedir (Cardoso ve ark., 2017).

Konsantre edilen ekstraktın saflaştırma işleminin, kullanım amacına bağlı olarak yapılabileceği ifade edilmektedir. Örneğin A vitamini öncül maddesi olarak kullanılacak olan  $\beta$ -karotenin saflaştırılması gerekirken, bir karotenoid karışımı olan paprika oleoresininin, renk ve tad katkısı olarak kullanıldığı ve ileri saflaştırılmaya gereksinim duyulmadığı bildirilmektedir. Genel olarak; renk katkısı olarak kullanılan karotenoidler için, ekstraktın konsantre edilmesinin yeterli olacağı belirtilmektedir. Bunun nedenleri olarak da; molekülün boyama gücünün yüksek olması ve bu nedenle formüle edilen ürüne düşük konsantrasyonda ilave edilecek olması, kullanılan kaynakların genel olarak güvenilir (GRAS) olmaları ve kullanılan konsantrede, karotenoidler ile birlikte ekstrakte edilen moleküllerin de zararsız olması sayılmaktadır (Cardoso ve ark., 2017).

Mikrobiyel pigmentler sentetik pigmentlerle karşılaştırıldığında; daha düşük verimle ve daha yüksek maliyetle üretildiklerinden ekonomik olmadıkları ifade edilmektedir. Endüstriyel talebi karşılamak ve mikrobiyel pigment üretim verimini artırmak için çeşitli geliştirmelerin yapılması gerektiği bildirilmektedir (Aruldass, Dufossé ve Ahmad, 2018). Mikrobiyel üretimde, daha ucuz substrat kaynaklarını kullanmaya yönelik çeşitli araştırmaların yapıldığı rapor edilmektedir (Kosseva, 2009; Korumilli ve Mishra, 2014; Cheng ve Yang, 2016; Aruldass, Dufossé ve Ahmad, 2018).

Bunun yanısıra fermantasyon ortamlarına karbon ve azot kaynakları takviyelerinin de, mikroorganizmaların gelişimini ve pigment üretimini arttırdığı ifade edilmektedir. Mayalar tarafından karotenoid üretiminin, düşük maliyetli tarımsal kökenli çeşitli

artıkların karbon kaynağı olarak kullanılması ve kültür koşullarının optimize edilmesi sayesinde, endüstriyel olarak uygulanılabilir hale gelebileceği ifade edilmektedir (Buzzini, 2000; Buzzini, 2001; Libkind ve van Broock, 2006).

Fermentasyon ortamı kompozisyonu ve çeşitli fiziksel faktörlerin maya hücre gelişimini ve karotenoid üretimini etkileyen önemli faktörler olduğu vurgulanmaktadır. Karotenoid biyosentezine etki eden çeşitli faktörler ışık, sıcaklık, havalandırma gibi ortam koşulları ile fermentasyon ortamındaki karbon ve azot kaynakları ile metal iyonları ve tuzları, çözücüler ve çeşitli doğal ve kimyasal ajanlar olarak rapor edilmektedir (Squina ve ark., 2002). Bunların yanısıra karotenoid sentezinin, hücreyi strese sokan veya hücre gelişimini inhibe eden bazı koşullarda da gerçekleştiği belirtilmektedir. Bu koşullara örnek olarak; yüksek ışık yoğunluğu, yüksek tuz derişimi, besin yetersizliği (özellikle azot ve fosfor eksikliği) ve ortamdaki inhibitörler verilmektedir (Sanchez ve ark., 2013).

Mikrobiyel karotenoid kaynakları arasında *Basidiomycota* sınıfındaki mayaların, karotenoid araştırmacılarının özel olarak ilgisini çektiği bildirilmektedir. Karotenoid biyosentezi; *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* ve *Phaffia* cinslerinin spesifik bir özelliği olarak rapor edilmektedir (Maldonade, Rodriguez-Amaya ve Scamparini, 2008; Chandi ve Gill, 2011; Nasrabadi ve Razavi, 2011). Bunların içerisinde de *Rhodotorula* cinsinin hızlı gelişme özelliğine sahip olduğu ve yüksek miktarda karotenoid üretebildiği ifade edilmektedir (Bhosale, 2001; Frengova ve Beshkova, 2009; Moliné, Libkind ve van Broock, 2012). *Rhodotorula* türlerinin  $\beta$ -karoten, torulen ve torularhodin sentezi yapabilen, başlıca karotenoid üreticileri oldukları bildirilmektedir (Frengova ve Beshkova, 2009). Önceden *Torula*, *Mycotorula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* ve hatta *Saccharomyces* olarak adlandırılan *Rhodotorula* cinsinin ilk kez 1928 yılında, yöresel peynirlerde bulunan mayalarla çalışan Kanadalı bir mikrobiyolog olan; Francis Charles Harrison tarafından keşfedildiği ve askospor üretmeyen kırmızı pigmentli mayalar olarak; *Rhodotorula* ismiyle tanımlandığı bildirilmektedir (Kot ve ark., 2016). Basidiomycota üyesi ve mutlak bir aerob olan bu cinsin önemli bir türü olan; *Rhodotorula glutinis* ise ilk kez, Georg Fresenius tarafından 1850 yılında, ekşi kremadan izole edildiği ve o dönemde; *Cry. glutinis* olarak tanımlandığı belirtilmektedir. *Rhodotorula* üyelerinin fermentasyon yeteneklerinin olmadığı, oval veya eliptik morfolojide olabildikleri, polar veya multilateral tomurcuklanma ile



çoğaldıkları, yalancı veya gerçek hif oluşturabildikleri, mutlak aerob oldukları ve sarı veya kırmızı pigment üretebildikleri belirtilmektedir. *Rhodotorula* cinsine ait türlerin çevrede yaygın olarak bulunabildikleri; sudan, topraktan, bitkilerden ve hayvanlardan izole edilebildikleri bildirilmektedir (Albertyn, Pohl ve Viljoen, 2014; Kot ve ark., 2016). *Rhodotorula* cinsine ait çoğu türün, inositolü genellikle asimile edemedikleri, inositolden yararlanabilenlerin ise, D-glukoronatı asimile edemedikleri rapor edilmektedir. Ayrıca bu cinsin, nişasta benzeri yapıları sentezleyemedikleri, diazonyum blue B ve üreaz reaksiyonlarının ise, pozitif olduğu belirtilmektedir (Fell ve Statzell-Tallman, 1998). Bunların yanısıra *Rhodotorula* cinsinin, koenzim Q-9 veya Q-10 ürettiği, hücre hidrolizatında ksiloz bulunmadığı ifade edilmektedir (Boekhout, 1998). *Rhodotorula* cinsinin en düşük gelişebilme sıcaklığının; 0.5-5°C, en yüksek gelişebilme sıcaklığının ise; 35°C olduğu, bunun yanısıra 0°C'nin altında ve 62.5°C'de kısa süreli canlı kalabildiği de rapor edilmektedir (Albertyn, Pohl ve Viljoen, 2014). Bu cinsine ait bazı türlerin gelişebildikleri minimum su aktivitesi (aw) değeri; 0.92 olarak bildirilirken, ortamda bulunan HCl ve organik asitlerin varlığında gelişebildikleri en düşük pH değerinin ise; 2.2 olduğu belirtilmektedir (Albertyn, Pohl ve Viljoen, 2014).

*Rhodotorula* cinsi içerisinde; *R. glutinis* ve *R. mucilaginosa*'nın, karotenoid üretiminde en çok çalışılan iki tür oldukları belirtilmektedir (Chattopadhyay, Chatterjee ve Sen, 2008; Mata-Gómez ve ark., 2014). Bunların yanısıra *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula acheniorum* gibi türlerle de, karotenoid üretimi ile ilgili bazı çalışmaların yapıldığı rapor edilmektedir (Dufosse, 2009b; Mata-Gómez ve ark., 2014). *R. glutinis* ve *R. mucilaginosa* türlerinin bazı meyveler (elma, çilek, üzüm, üzüksü ve tropik meyveler), alkollü içecekler (şıra, şarap), tahıllar (mısır, arpa), fırıncılık ürünleri (buğday unu, ekmek mayası, hamur) ve et ürünleri (beyaz et, sosis, domuz eti, balık ve diğer deniz ürünleri) olmak üzere çeşitli gıdalardan izole edilebildikleri rapor edilmektedir (Deak ve Beuchat, 1996).

Mayalarda karotenoid sentezinin, logaritmik evrenin sonunda başladığı ve üretimin, ortamdaki karbon kaynağına bağlı olarak duraklama evresinde de devam edebildiği ifade edilmektedir (Mata-Gómez ve ark., 2014). Karotenoid üretiminin, genelde hücre gelişiminin kısıtlandığı veya durduğu koşullarda artış gösterdiği rapor edilmektedir. Literatürde, kırmızı renkli mayalar tarafından üretilen karotenoid derişimi aralığı; 50-

800 µg/(g kuru hücre ağırlığı) olarak belirtilmektedir (Sanchez ve ark., 2013). *Rhodotorula* cinsinin karotenoid üretiminin düşük (<100 µg g<sup>-1</sup>), orta (101-505 µg g<sup>-1</sup>) ve yüksek (>500 µg g<sup>-1</sup>) olarak sınıflandırılabilirdiği de belirtilmektedir (Dufossé, 2006; Mata-Gómez ve ark., 2014).

*Rhodotorula* cinsine ait türlerin; β-karoten, torulen ve torularhodin gibi çeşitli karotenoid türlerini, farklı oranlarda sentezleyebildikleri bilinmektedir. Bu cinse ait olup, β-karoten ürettiği bilinen ve araştırmalarda en çok çalışılan türler arasında; *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, *R. minuta* ve *R. acheniorum*'un yer aldığı bildirilmektedir. Yabani *R. glutinis* suşları ile β-karoten üretiminin artırılması amacıyla yapılan bazı araştırmalarda; türün geliştirilmesi, mutasyona uğratılması, besiyeri optimizasyonu ile sıcaklık, pH, havalandırma ve karbon/azot oranı gibi çeşitli ortam parametrelerinin denendiği ifade edilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda; β-karoten derişiminin yaklaşık 70 mg/L'ye kadar arttırılabildiği belirtilmiştir (Dufosse, 2009b).

β-karotenin, karotenoidlerin büyük bir kısmının yer aldığı sekiz izopren ünitesinden oluşan tetraterpen yapılarının tipik bir örneği olduğu ve doğada en çok trans yapıda bulunduğu belirtilmektedir (Liaaen-Jensen, 2004). Kimyasal formülü C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>, molekül ağırlığı; 536.9 olarak belirtilen β-karotenin suda ve etil alkolde çözünmediği, bitkisel yağlarda ise çözünürlüğünün çok iyi olmadığı bilinmektedir. Bu maddenin kloroformdaki çözeltisinin maksimum spektrofotometrik absorpsiyonunun; 466 ile 496 nm arasında olduğu belirtilmektedir (Ötles ve Çağindi, 2008). β-karotenin genellikle havuç ve yeşil yapraklı bitkilerde bulunan açık sarı veya turuncu renkte bir pigment olduğu bilinmektedir (Kahyaoğlu ve Kıvanç, 2007). β-karoten içeriği yüksek bazı sebzeler sırasıyla; ebegümece, maydanoz, dereotu, ıspanak, ısırgan, turuncu havuç, nane ve karalahana olarak verilmektedir (Anonim, 2021).

Kristal yapıdaki karotenin yüksek A vitamini aktivitesine sahip olduğu ilk kez 1928 yılında; von Euler tarafından saptanmış olup, Moore isimli bir araştırmacı tarafından, 1930'da farelerle yapılan bir çalışmada ise; karotenin A vitaminine metabolize edildiği ve karaciğerde depolandığı belirlenmiştir (Isler, 1971). Günümüzde 750 karotenoid tanımlandığı, bunlardan insanlar tarafından da tüketilen 50'sinin A vitamini öncülü olduğu rapor edilmiştir (Kot ve ark., 2017; Manimala ve Murugesan, 2017).

Karotenoidler içerisinde  $\beta$ -karotenin, en yüksek provitamin A aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. Bunun nedeninin; diğer karotenoidlerden farklı olarak,  $\beta$ -karotenin zincir yapısının her iki ucunda da  $\beta$ -iyonon halkasının bulunmasının olduğu belirtilmektedir (Türkcan ve Ökmen, 2012).  $\beta$ -iyonon halkası bulunmayan karotenoidlerin, provitamin aktivitesi özelliği göstermedikleri ifade edilmektedir (Bogacz-Radomska ve Harasym, 2018).

Kimyasal yolla sentetik  $\beta$ -karoten üretiminin, Karrer ve Inhoffen isimli araştırmacılar ile eş zamanlı olarak Roche firması tarafından, 1950 yılında gerçekleştirildiği ve 1954 yılında ise ilk kez Roche firmasının, sentetik kristal  $\beta$ -karoteni gıda boyası olarak piyasaya sunduğu belirtilmiştir (Isler, 1971). Gıda üreticilerinin, sunset yellow, tartrazine ve quinoline yellow gibi sıklıkla kullanılan bazı yapay gıda renklendiricilerine alternatifler arama çabalarının giderek arttığı ifade edilmektedir (Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013). Doğal boyaların giderek artan bir hızda sentetik olanların yerini alabileceği çünkü yapay boya katkılarının tüketimine bağlı olarak gıdalarda istenmeyen lezzet oluşumu ve ayrıca tüketicilerde; alerjik ve intolerans reaksiyonları gibi, sağlık üzerinde olumsuz etkiler rapor edildiği bildirilmektedir (Heer ve Sharma, 2017).

Renklendirici pazarının hacmiyle ilgili yayınlanmış güvenilir bir istatistik olmadığı, buna rağmen küresel endüstri analistlerine göre; organik pigmentler ve boyalar için piyasa talebinin 2017 yılında; 10 milyon ton civarında olduğu belirtilmektedir (Rao, Xiao ve Li, 2017). Küresel karotenoid pazarının 2017'de 1.5 milyar dolara ulaştığı ve 2017-2022 dönemi için yıllık %5,7'lik bir bileşik büyüme hızıyla (CAGR) 2022'ye kadar 2 milyar dolara ulaşmasının beklendiği bildirilmiştir (Elfeky ve ark., 2019). Küresel pazar anketlerinin (2018-2024), gıda ve içecek, ilaç, kozmetik, hayvan yemi ve diyet takviyelerindeki karotenoidlerin pazar paylarının sırasıyla; %26.1, %9.2, %6.5, %34.8 ve %23.5 olacağı tahmin edilmektedir. Şu anda, mevcut karotenoid arzının yaklaşık %80-90'ının, kimyasal sentez ile karşılandığı ve doğal karotenoidlerin pazar payının, yüksek satış fiyatları nedeniyle sentetik karotenoidlere (%76) kıyasla çok daha az olduğu (%24) rapor edilmektedir (Ram ve ark., 2020). Küresel karotenoid pazarında büyüklüklerine göre ilk sırada  $\beta$ -karotenin geldiği, bunu sırasıyla; luteinin ve astaksantin izlediği rapor edilmiştir (Alcaíno, Baeza ve Cifuentes, 2016). 2016 yılında  $\beta$ -karoten, lutein, astaksantin, zeaksantin, kantaksantin, kapsantin, likopen, Annatto ve

$\beta$ -apo-8-karotenalin yıllık piyasa değerlerinin 22.5 ile 285 milyon dolar arasında değiştiği bildirilmektedir (Ram ve ark., 2020). Karotenoid pazarının sadece %37.9'unun doğal kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -karotenlerden oluştuğu ifade edilmiştir (Machado ve ark., 2019). Sarı veya turuncu renk veren sentetik ve doğal pigmentlerin kg fiyatları karşılaştırıldığında; 1 kg sentetik FD&C Yellow No. 5 (Tartrazine, E 102) fiyatı; 500 dolar, 1 kg safranın fiyatı ise; 1400 dolar olarak rapor edilmektedir (Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013). Mikrobiyel olarak üretilen  $\beta$ -karotenin; kilogram fiyatının yaklaşık olarak; 1000 dolar olduğu belirtilmektedir (Aruldass, Dufossé ve Ahmad, 2018). Mikrobiyel pigmentlerin pahalı olmasına rağmen, doğal ve güvenilir olmaları nedeniyle, sentetik boyalarla rekabet edebildiği bildirilmektedir. Üretimde, düşük maliyetli substratların kullanılması veya suş geliştirilmesi ile mikrobiyel pigmentlerin üretim maliyetlerinin düşürülmesi ile ilgili artan bir çaba olduğu da belirtilmektedir (Rao, Xiao ve Li, 2017).

Doğal karotenoidlerin endüstriyel üretimlerinin iki şekilde yapıldığı belirtilmektedir. Bunlar; küf, maya, bakteriler veya mikroalglerin kullanıldığı biyoteknolojik prosesler ve bitkilerden katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi olarak bildirilmektedir (Mata-Gómez ve ark., 2014). Dünyadaki  $\beta$ -karoten üretiminin sadece %2'sinin doğal kaynaklardan gerçekleştirildiği, bu oranın son yıllarda giderek artış gösterdiği ifade edilmektedir.  $\beta$ -karoten üretiminin, çok farklı alanlarda yaygın olarak kullanılması nedeni ile, giderek artış gösterdiği de ifade edilmektedir. Dünya çapında 2010 yılında 261 milyon dolarlık pazar payına sahip olduğu ve 2018'de 334 milyon dolar değerine ulaşacağı öngörülen  $\beta$ -karotenin, en çok tüketilen karotenoid olduğu rapor edilmektedir (Sanchez ve ark., 2013; Mata-Gomez ve ark., 2014; Rodrigues ve ark., 2019). Çizelge 2.4'de; ticari bazı  $\beta$ -karoten üreticileri ve kaynakları verilmektedir (Dufosse, 2009b).

Mayaların tek hücreli olmaları ve düşük maliyetli besin ortamlarında alg, küf ve bakterilere göre daha hızlı üreyebilmeleri nedeniyle, mikrobiyel yolla karotenoid üretiminde diğer mikroorganizmalara kıyasla tercih edildikleri bildirilmektedir (Malisorn ve Suntornsuk, 2008; Taskin ve Erdal, 2011; Thakur ve Azmi, 2013). Mayaların kullanıldığı,  $\beta$ -karoten üretimi ile ilgili yapılan bazı çalışmalar, Çizelge 2.5'de verilmektedir.

Çizelge 2.4. Çeşitli kaynaklardan elde edilen ticari bazı  $\beta$ -karoten ürünleri ve markaları

Marka	Üretici Firma	Kaynak
AL CARC 9004	Diana Naturals	Havuç
Altratene	Allied Industrial Corp.	Kimyasal sentez
Betanat	Vitatene	<i>Blakeslea trispora</i>
Betatene	Cognis Nutrition & Health	<i>Dunaliella salina</i>
CaroPure	DSM	Kimyasal sentez
CaroPure	DSM	<i>B. trispora</i>
Caroxan	Pot au Pin	Havuç
Lucarotin	BASF	Kimyasal sentez
Karotenoid karışımları	Global Palm Products	Palm yağı

Çizelge 2.5. Bazı mayaların kullanıldığı  $\beta$ -karoten sentezi ile ilgili yapılan çalışmalar

Maya	Referans
<i>Rhodotorula acheniorum</i> , <i>Rhodotorula aurantiaca</i> , <i>Rhodotorula bacarum</i> <i>Rhodotorula rubra</i>	(Perrier, Dubreucq ve Galzy, 1995)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Shih ve Hang, 1996)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Buzzini, 2000)
<i>Rhodotorula gracilis</i>	(Somashekar ve Joseph, 2000)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Bhosale ve Gadre, 2001a)
<i>Rhodotorula rubra</i>	(Squina ve ark., 2002)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	(Marova ve ark., 2004)
<i>Rhodotorula rubra</i>	(Frengova, Simova ve Beshkova, 2006)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Aksu ve Eren, 2007)
<i>Rhodotorula graminis</i>	(Maldonade, Rodriguez-Amaya ve Scamparini, 2008)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Malisorn ve Suntornsuk, 2009)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Latha ve Jeevaratnam, 2010)
<i>Rhodotorula acheniorum</i>	(Nasrabadi ve Razavi, 2011)
<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	(Marova ve ark., 2012)
<i>Rhodotorula rubra</i>	(Banzatto, Freita ve Mutton, 2013)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Schneider ve ark., 2013)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	(Valduga ve ark., 2014)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	(Bagy ve ark., 2016)

$\beta$ -karoten üretebilen mayalardan *Rhodotorula* cinsine ait türlerin gelişmelerinin üssel ve duraklama evrelerinde, glikojen ve karotenoid üretme kapasitesi gibi özel metabolik karaktere sahip oldukları belirtilmektedir (Hernández-Almanza ve ark., 2014). *Rhodotorula* cinsine ait türlerde; karotenoid üretimi ve kompozisyonunun suşa, kültür koşullarına ve karbon kaynağına bağlı olarak değişebildiği bildirilmektedir. Bir mayanın ticari bir pigment kaynağı olarak kullanılabilmesi için; ucuz karbon kaynaklarının ve kültür ortamlarının belirlenmesi, üretimi artırmak için uygun fizyolojik ve çevresel koşullarının saptanmasının gerektiği belirtilmektedir (Alcaíno, Baeza ve Cifuentes, 2016).

*Rhodotorula* türlerinde karotenoid üretiminin; fermantasyon ortamlarında kullanılan karbon ve azot kaynaklarının tür ve derişimleri ile ortamda bulunan mineral ve vitaminler, metal iyonları ve tuzları, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, ışık, havalandırma, bazı stres faktörleri, ışınlama, çalkalama, çözücüler ve bazı kimyasal bileşikler gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği rapor edilmektedir (Bhosale, 2004; Frengova ve Beshkova, 2009; Hernández-Almanza ve ark., 2014).

Fermantasyon ortamının bileşiminde bulunan karbon kaynağının, mayalar tarafından karotenoid üretiminde rol oynayan en önemli faktörlerden birisi olduğu ifade edilmektedir. Genel olarak mayaların glukoz, ksiloz, sellobiyoz, sakkaroz, gliserol, sorbitol, riboz, arabinoz, maltoz, laktoz gibi çeşitli karbon kaynaklarını içeren sentetik besiyerlerinde gelişebildikleri ve karotenoid sentezleyebildikleri belirtilmektedir (Latha ve ark., 2005; Frengova ve Beshkova, 2009; Nasrabadi ve Razavi, 2011; Marova ve ark., 2012; Bonadio, Freita ve Mutton, 2018). Ortamda bulunan karbon kaynağı türünün ve içeriğinin, karotenoid üretimini etkilediği ve bu parametrenin, karotenoid üretimini artırmak için araştırmalarda üzerinde en çok çalışılan faktörlerden birisi olduğu bildirilmektedir (Mata-Gómez ve ark., 2014; Kot ve ark., 2018).

Bu konuda yapılan bir çalışmada; incelenen *R. glutinis* DFR-PDY suşunun karotenoid üretimi üzerine glukoz, fruktoz, galaktoz, sakkaroz, maltoz, ksiloz, riboz ve arabinoz gibi farklı karbon kaynaklarının etkileri incelenmiş ve en yüksek karotenoid üretiminin, kullanılan monosakkaritler için sırasıyla; fruktoz, glukoz, galaktoz; disakkaritler için ise; sakkaroz olarak belirlendiği rapor edilmiştir (Latha ve ark., 2005). Anılan

çalışmada; fermantasyon ortamında galaktoz kullanıldığında fruktoz ve sakkaroz oranla, daha yüksek hücre gelişimi gözlemlendiği belirtilmiştir. Denenen disakkaritler içerisinde en yüksek hücre gelişiminin sakkaroz kullanıldığında, en düşük hücre gelişiminin ise; maltoz kullanıldığında elde edildiği ifade edilmiştir.

Karoten üretimi için kültür koşullarının optimizasyonu üzerine yapılan bir diğer çalışmada; *R. mucilaginosa* 16 mutant suşuyla karoten üretiminde, ortamda karbon kaynağı olarak glukoz, ksiloz, etanol, gliserol ve D-mannitol'ün kullanıldığı ve bunlardan glukozun, karotenoid üretimi için (4.59 mg/L), en iyi karbon kaynağı olarak belirlendiği bildirilmiştir (Aksan, 2005).

Aksu ve Eren (2005) tarafından, bir *R. mucilaginosa* suşu ile yapılan çalışmada ise; ortamda karbon kaynağı olarak glukoz, melas ve peynir altı suyunun denendiği belirtilmiştir. Denemelerin sonucunda; karotenoid üretimi için en iyi sonucun; 89 mg/L olarak, melas kullanıldığında elde edildiği ifade edilmiştir. Anılan çalışmada, aynı substratlar kaynakları kullanılarak bir *R. glutinis* suşu ile çalışıldığında ise; yine en yüksek karotenoid üretiminin (125 mg/L) melas kullanıldığında elde edildiği belirtilmiştir (Aksu ve Eren, 2007).

Alakraa (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Rhodospiridium toruloides* Y27012 suşunun karotenoid üretimine glukoz, ksiloz ve gliserolün etkilerinin incelendiği ve en yüksek karotenoid üretiminin (31.24 mg/L), fermantasyon ortamında glukoz kullanıldığında elde edildiği rapor edilmiştir.

Voaides ve Dima (2011) tarafından *Rhodotorula* cinsine ait olduğu belirlenen ve Rd 1, Rd 2 ve Rd 3 olarak kodlanmış olan suşlar ile yapılan bir başka çalışmada ise; glukoz, sakkaroz, gliserol ve fruktoz gibi farklı karbon kaynaklarının bu suşların hücre gelişimine ve karotenoid üretimine etkilerinin incelendiği bildirilmiştir. Çalışılan suşlar tarafından üretilen en yüksek karotenoid derişimlerinin, sakkaroz içeren bir ortamda; 488 µg/L ve 526 µg/L olarak sırasıyla; Rd 1 ve Rd 2 suşları ile, gliserol bulunan bir ortamda ise; Rd3 suşu ile (198 µg/L) elde edildiği bulgulanmıştır.

Mayaların karotenoid üretimi üzerine, karbon kaynağı türü kadar derişiminin de etkili olduğu ifade edilmektedir. Klasik sürekli fermantasyonda, besiyerinde başlangıçta yüksek miktarda şeker bulunmasının “Crabtree” etkisini artırarak pigment ve biyokütle miktarlarında azalmaya neden olduğu ve bu sorunun kesikli fermantasyon yöntemi uygulanarak çözülebildiği bildirilmiştir (Frengova ve Beshkova, 2009).

Govindaswamy, Vasudevan ve Divakar (1999) tarafından, bir *Rhodotorula gracilis* suşu ile yapılan bir çalışmada; glukoz derişimleri %2, %6 ve %10 olarak ayarlanan ortamlarda, ilgili suşun maksimum karotenoid üretimlerinin incelendiği ve en iyi sonucun %10 (w/v) glukoz derişiminde elde edildiği bildirilmiştir.

Karotenoid üretimi için ortamdaki önemli bir diğer bileşenin de azot kaynağı olduğu belirtilmektedir (Mihalcea ve ark., 2011; Zeni ve ark., 2011; Voaides ve Dima, 2012). Genel olarak maya hücrelerinde, azot kaynağı yetersizliği sonucunda, hücre gelişimi durduktan sonra, karotenoid üretiminin gerçekleştiği ifade edilmektedir (Sanchez ve ark., 2013).

Yapılan bir araştırmada; *R. glutinis* DFR-PDY suşunun karotenoid üretimi üzerine çeşitli azot kaynaklarının etkileri araştırılmış ve bu amaçla çalışmada sodyum nitrat, amonyum nitrat, amonyum tartarat, üre, kazein, pepton ve maya özütü gibi farklı azot kaynaklarının denendiği ifade edilmiştir (Latha ve ark., 2005). Adı geçen çalışmada; en yüksek karotenoid üretiminin (3.3 mg/L) sodyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı ortamda elde edildiği bildirilmiştir.

*Rhodotorula rubra* L18 suşu ile yapılan; şeker kamışı suyu, melası ve şurubunun ayrı ayrı fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada ise, üre ve ticari bir azot kaynağı (nitrofos KL) kullanımının, çalışılan suşun toplam karotenoid üretimine ve biyokütle oluşumuna etkileri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada; ürenin azot kaynağı olarak kullanıldığı şeker kamışı melası ortamında, biyokütle miktarının arttığı fakat karotenoid üretiminde önemli bir değişiklik gözlenmediği, ancak ürenin, artan biyokütle miktarına olumlu etkisinin dolaylı olarak toplam hacimsel karotenoid üretiminde bir miktar artış sağladığı da rapor edilmiştir (Banzatto, Freita ve Mutton, 2013).



Alakraa (2014) tarafından, *R. toruloides* Y27012 şuşu kullanılarak karotenoid ve tek hücre yağı üretimi üzerine gerçekleştirilen bir tez çalışmasında da; azot kaynağı olarak maya özütü, pepton ve amonyum sülfatın denendiği ve araştırmada en yüksek karotenoid üretimlerinin ise, kullanılan azot kaynakları için sırasıyla; 31.24 mg/L, 24.48 mg/L ve 11.72 mg/L olarak elde edildiği rapor edilmiştir.

Karotenoid üretimi üzerine azot kaynağı çeşidi kadar etkili bir diğer faktörün de; azot kaynağı derişimi olduğu belirtilmektedir (Ünver, 2010; Marova, Certik ve Breierova, 2011; Joshi, Sharma ve Girdher, 2013). *R. mucilaginosa* NRLL-2502 şuşu ve *R. mucilaginosa* izolatu ile  $\beta$ -karoten üretimi üzerine yapılan bir çalışmada, farklı amonyum sülfat derişimlerinin (0.5-5 g/L) karotenoid üretimine etkilerinin incelendiği bildirilmiştir (Aksu ve Eren, 2005). Çalışmada; amonyum sülfat derişiminin 2 g/L'ye kadar arttırılmasının, çalışılan her iki şuşun özgül üreme ve ürün oluşum hızlarını arttırdığı, amonyum sülfat derişiminin daha fazla artmasının ise; değerlerde önemli bir değişime yol açmadığı belirtilmiştir.

Bu konuyla ilgili olarak, lahana turşusundan izole edilmiş olan ve *Rhodotorula* cinsine ait olduğu belirlenen bir şuş ile yapılan bir diğer çalışmada; doğal substrat kaynağı olarak, 40 g/L elma posasının kullanıldığı bir ortamda azot kaynağı olarak besiyerine; farklı derişimlerde üre ve demir amonyum sülfatın eklendiği ve bunların karotenoid üretimi üzerine etkilerinin incelendiği belirtilmektedir (Joshi, Sharma ve Girdher, 2013). Bu çalışmada; fermantasyon ortamında demir amonyum sülfatın; (%) 0.1-0.5 derişim aralığında kullanıldığı ve en yüksek karotenoid derişiminin ise (46.42 mg/100g), ortamda kullanılan demir amonyum sülfat derişiminin; %0.5 olduğunda elde edildiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada denenen ürenin farklı derişimlerinin (%0.1-%0.5) ise, karotenoid üretimine önemli bir etkisinin olmadığı da rapor edilmiştir. Adı geçen çalışmada, demir amonyum sülfatın yüksek derişimlerinin, azotun yanısıra demir ve kükürt minerallerini de sağlayarak maya hücresinde pigment üretimini desteklemiş olabileceği ifade edilmiştir.

*R. glutinis* MT-5 şuşuyla gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, tavuk tüylerinden elde edilmiş doğal bir pepton kaynağı ile ticari tripton ve balık peptonunun, karotenoid üretimine etkilerinin karşılaştırıldığı ifade edilmektedir (Taskin ve ark., 2011).

Araştırmada; peptonun besiyerlerinde kullanılan en pahalı bileşiklerden birisi olduğu ve doğal pepton kullanımı ile karotenoid üretiminde maliyetin düşürülmesinin amaçlandığı belirtilmektedir. Anılan çalışmada sonuç olarak; tavuk tüyünden elde edilen peptonun biyokütle üretimini (14.2 g/L) ve karotenoid üretimini (92 mg/L) sadece maya ekstraktının bulunduğu kontrol ortamındakine göre sırasıyla; %53 ve %36 oranında artırdığı bildirilmiştir.

Besiyeri bileşimindeki karbon (C) ve azot (N) kaynaklarının karotenoid üretimini üzerine olan etkilerinin yanısıra, ortamdaki C/N oranının da, karotenoid üretimi üzerinde etkili bir diğer faktör olduğu belirtilmektedir (Alakraa, 2014; Hernández-Almanza ve ark., 2014). Fermantasyon ortamındaki C/N oranının, *Rhodotorula glutinis* (ATCC 15125) suşunun biyokütle, lipid ve karotenoid üretimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; farklı glukoz/amonyum sülfat oranlarının denendiği bildirilmiştir (Braunwald ve ark., 2013). Bahsedilen çalışmada; C/N oranı 70:1 olan ortam kontrol örneği olacak şekilde; glukoz ve azot miktarları, biri sabitken diğeri değiştirilerek, C/N oranları; 20:1 ve 120:1 C/N olacak şekilde elde edilen toplam dört besiyerinde, deneylerin gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçlara göre, genel olarak kontrol ortamında en yüksek karotenoid derişimlerinin belirlendiği bildirilmiştir. Denenen ortamlardan kontrol ortamına göre daha yüksek karotenoid derişiminin sadece; amonyum sülfat derişimi sabit tutulurken, glukoz derişiminin artırılmasıyla C/N oranının; 120:1 olduğu ortamda ve fermantasyonun 216. saatinde hesaplandığı rapor edilmiştir.

*R. gracilis* CFR-1AU suşunun karotenoid ve lipid oluşumuna, kullanılan fermantasyon ortamındaki, C/N oranının etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada; düşük C/N oranında daha yüksek karotenoid elde edildiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada; 10:1 C/N oranına sahip fermantasyon ortamında üretilen karotenoid miktarının, 160:1 C/N oranına sahip fermantasyon ortamında üretilenden yaklaşık; 15 kat daha fazla olduğu ifade edilmiştir (Somashekar ve Joseph, 2000). *R. toruloides* Y27012 şuşu ile yapılan bir çalışmada farklı C/N oranlarının karotenoid üretimi üzerine etkilerinin de incelendiği ve 20:1, 40:1 ve 60:1 olmak üzere farklı C/N oranlarının denendiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada, karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığı ve C/N oranının 20:1

olduğu fermantasyon ortamında, 31.24 mg/L ile en yüksek karotenoid üretiminin elde edildiği rapor edilmiştir (Alakraa, 2014).

Karotenoid üretimini etkileyen bir diğer önemli parametrenin de, sıcaklık olduğu ifade edilmektedir. Sıcaklığın, karotenoid sentezinde yer alan enzimlerin derişimlerini etkileyerek, mikroorganizma tarafından üretilen karotenoid derişimini kontrol ettiği bildirilmektedir. İnkübasyon sıcaklığının, mikroorganizma türüne bağlı olarak, sentezlenen karotenoid derişimini ve türünü etkilediği belirtilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda; *R. glutinis* türü için düşük sıcaklıklarda elde edilen  $\beta$ -karoten derişimi daha yüksek olarak belirtilirken, yüksek inkübasyon sıcaklıklarında ise, üretilen torulen derişiminin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Bhosale, 2004; Frengova ve Beshkova, 2009).

*Rhodotorula* cinsine ait mayaların, 5-26°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebildikleri bilinmektedir. *R. glutinis* DFR-PDY suşunun karotenoid üretimi üzerine farklı sıcaklıkların (15°C, 29-32°C/oda sıcaklığı, 37°C ve 42°C) etkilerinin incelendiği bir çalışmada; en yüksek karotenoid derişiminin, oda sıcaklığında (29-32°C); 3.5 mg/L olarak, elde edildiği bildirilmiştir (Latha ve ark., 2005). Yüksek miktarda  $\beta$ -karoten üreten *R. glutinis* 32 mutant suşuyla yapılan bir çalışmada; sıcaklığın ve ışığın suşun gelişimine ve karotenoid üretimine etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan suş için en iyi üreme ve karotenoid üretiminin görüldüğu sıcaklıkların sırasıyla; 30°C ve 20°C'ler olarak bulunduğu belirtilmiştir. Aynı araştırmada toplam karotenoid miktarı içerisindeki  $\beta$ -karoten oranının; 30°C sıcaklıkta; %66 (125 mg/L), 20°C sıcaklıkta ise; %92 (250 mg/L) olarak belirlendiği vurgulanmıştır (Bhosale ve Gadre, 2002). *R. glutinis* ve *R. muciliginosa* suşları ile  $\beta$ -karoten üretimi üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise; karoten üretimi için en uygun sıcaklığın çalışılan her iki suş için de; 30°C olarak belirlendiği ifade edilmiştir (Aksu ve Eren, 2007). Bir başka çalışmada ise, bir *R. glutinis* izolatının denenen farklı sıcaklıklarda (20°C, 25°C, 30°C, 35°C) biyokütle ve karotenoid derişimleri incelendiğinde en yüksek biyokütle (11.4 g/L) ve karotenoid derişimlerinin (5.79 mg/L), 25°C sıcaklıkta belirlendiği ifade edilmiştir (Ünver, 2010).

*Rhodotorula* cinsine ait türlerin karotenoid üretimlerini etkileyen bir diğer önemli parametrenin; ortamın başlangıç pH'ı olduğu ve en yüksek karotenoid üretimi için

optimum başlangıç pH'ının, türe bağlı olarak değişebildiği ifade edilmektedir. Literatürde, *R. gracilis* türünün karotenoid üretimi için optimum pH değerleri; 5.0-5.6 aralığında verilirken, *R. lactis*'in peynir altı suyu ortamında karotenoid üretimi için optimum pH'ın ise; 7.0 olduğu rapor edilmiştir (Goodwin, 1980). *Rhodotorula* cinsine ait türlerin gelişebildiği ve pigment oluşturabildiği başlangıç pH değerlerinin genellikle; 2.5-9.0 arasında değiştiği bildirilmektedir. *R. glutinis* DFR-PDY suşunun karotenoid üretimine etki eden parametrelerin incelendiği bir çalışmada, sentetik bir besiyerinde en yüksek karotenoid üretiminin, başlangıç pH değeri 5.5 olduğunda elde edildiği belirtilmiştir (Latha ve ark., 2005).

Shih ve Hang (1996) tarafından bir *R. rubra* suşu ile, fermantasyon ortamı olarak lahana turşusu salamurasının kullanıldığı ve 30°C'de gerçekleştirilen bir çalışmada ise, ortam başlangıç pH değeri 5.0 olduğunda, 48 saatlik fermantasyon sonunda, en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin; 1041  $\mu\text{g/L}$  ve biyokütle derişiminin ise; 7.97 g/L olarak elde edildiği belirtilmiştir. *Rhodotorula* cinsinin iki farklı türü *R. glutinis* ve *R. mucilaginosa* suşları ile  $\beta$ -karoten üretimi üzerine yapılan bir başka çalışmada ise; optimum  $\beta$ -karoten üretimi için başlangıç pH değerlerinin; *R. glutinis* için 6.0, *R. mucilaginosa* için ise; 7.0 olarak belirlendiği bildirilmiştir (Eren, 2003).

Aksan (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, *R. mucilaginosa* 16 mutant suşunun karotenoid üretimini artırmak için kültür koşullarının optimizasyonu da incelenmiş ve bu amaçla, 4.5-6.5 aralığında 8 farklı başlangıç pH değeri ile çalışıldığı bildirilmiştir. Denenen değerler arasında en yüksek karotenoid üretimlerinin (3.83 mg/L ve 3.81 mg/L) sırasıyla; pH 5.5 ve pH 6.0'da elde edildiği rapor edilmiştir.

Ünver (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise; koç boynuzu peptonu ve melas içeren bir fermantasyon ortamında, 30°C sıcaklık, 200 rpm çalkalama hızında, kesikli bir sistemde, *R. glutinis* YU-14 izolatının karotenoid üretimine 8 farklı başlangıç pH değerlerinin (pH 4.5-7.5) etkilerinin incelendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada; en yüksek biyokütle (11.4 g/L) ve karotenoid derişimlerinin (5.79 mg/L), başlangıç pH'ı 5.5 olan ortamda elde edildiği rapor edilmiştir.

Son yıllarda, karoten üretiminde doğal substrat kaynaklarının ve/veya tarımsal atık ve artıkların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmalarda artış görülmektedir (Marova, Certik ve Breierova, 2011; Joshi, Sharma ve Girdher, 2013; Thakur ve Azmi, 2013; Valduga ve ark., 2014; Panesar, Kaur ve Panesar, 2015; Ghilardi ve ark., 2020; Kot ve ark., 2020; Liang, Yang ve Du, 2021; Martins ve ark., 2021). Düşük maliyetli doğal substratların kullanılmasıyla, doğal pigment üretim proseslerinin daha ekonomik olarak gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır (Frengova ve Beshkova, 2009; Albertyn, Pohl ve Viljoen, 2014). Karotenoid üretiminde doğal substrat kaynaklarının kullanılması ile aynı zamanda, dolaylı olarak, sanayi atıkları ile tarımsal artıkların da giderilmesine ve çevre kirliliğinin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunulacağı da belirtilmektedir (Frengova, Simova ve Beshkova, 2006; Frengova ve Beshkova, 2009; Sanchez ve ark., 2013). Karoten üretimi için, fermantasyon ortamında alternatif karbon kaynağı olarak denenilen doğal substratlar arasında üzüm suyu, üzüm cıvresi, hurma suyu, şeker kamışı ve pancarı melası, şeker kamışı suyu, mısır şurubu, mısır hidrolizatı, peynir altı suyu, maş fasülyesi unu hidrolizatı, okalıptus ağacından elde edilen selülozik hidrolizatlar yer almaktadır (Bhosale ve Gadre, 2001b; Aksu ve Eren, 2005; Tinoi, Rakariyatham ve Deming, 2005; Marova ve ark., 2012; Panesar ve Kennedy, 2012; Korumilli ve Mishra, 2014). Mayaların kullanıldıkları proseslerde, karoten üretimi amacıyla kullanılan bazı doğal substratlar, Çizelge 2.6'da verilmektedir.

Tinoi ve ark. (2005) tarafından, azot kaynağı olarak; hidrolize maş fasülyesi atık ununun, karbon kaynağı olarak ise; tatlı patates ekstraktının kullanıldığı bir fermantasyon ortamında incelenen *R. glutinis* TISTR suşunun üremesi ve karotenoid üretimi üzerine etkili bazı deneysel parametrelerin optimizasyonu ile ilgili bir çalışma yapıldığı belirtilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada; belirlenen optimum koşullar altında, fermantasyonun yaklaşık 95. saatinde, incelenen suşun biyokütle derişiminin; 10.35 g/L ve suş tarafından üretilen karotenoid derişiminin ise; 3.48 mg/L olarak hesaplandığı rapor edilmiştir.

Libkind ve Broock (2006) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise; Patagonya habitatından izole edilmiş yerel *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Cryptococcus* ve *Cystofilobasidium* cinslerine ait türler arasından ilk olarak, en yüksek karotenoid üreten üç maya suşunun seçildiği ve daha sonra ise; seçilen bu maya suşlarının, mısır şurubu, şeker kamışı melası ve malt özütünün, karbon

kaynağı olarak kullanıldığı yarı-sentetik besiyerlerinde karotenoid üretimlerinin incelendiği bildirilmiştir.

Çizelge 2.6. Mayalar ile karoten üretiminde kullanılan bazı doğal substrat kaynakları

Maya	Doğal substrat	Referans
<i>R. glutinis</i>	Üzüm şırası, glukoz şurubu, şeker pancarı melası, soya fasulyesi unu özütü, mısır unu özütü	(Buzzini ve Martini, 1999)
<i>R. glutinis-Debaryomyces castellii</i> (karışık kültür)	Mısır şurubu	(Buzzini, 2000)
<i>R. glutinis</i> mutant 32	Şeker kamışı melası	(Bhosale ve Gadre, 2001b)
<i>R. rubra</i> , <i>R. glutinis</i>	Şeker kamışı suyu	(Squina ve ark., 2002)
<i>R. rubra</i> +yoğurt bakterileri (karışık kültür)	Peynir altı suyu filtratı	(Simova, Frengova ve Beshkova, 2004)
<i>R.mucilaginosa</i> , <i>Cryptococcus</i> sp.	Şeker kamışı melası, mısır şurubu, ham malt özütü	(Libkind ve van Broock, 2006)
<i>R. glutinis</i> DM28	Fermente kırmızı turp salamurası	(Malisorn ve Suntornsuk, 2009)
<i>R. glutinis</i> DFR-PDY	Peynir altı suyu, mango posası	(Latha ve Jeevaratnam, 2010)
<i>R. glutinis</i> MT-5	Yenidünya çekirdeği	(Taskin ve Erdal, 2011)
<i>R. glutinis</i>	Patates, marul, meyve suyu işleme tesisleri atık suları	(Schneider ve ark., 2012)
<i>R. rubra</i>	Şeker kamışı suyu, melası, şurubu	(Banzatto, Freita ve Mutton, 2013)
<i>R. glutinis</i>	Bira prosesi atık suyu	(Schneider ve ark., 2013)
<i>R. glutinis</i> , <i>R.mucilaginosa</i> , <i>Cystofilobasidium capitatum</i> , <i>S. roseus</i>	Öğütülmüş kahve atığı	(Petrik ve ark., 2014)

Bu çalışmada; en yüksek karotenoid derişiminin 301 µg/g olarak, *R. mucilaginosa* CRUB 0195 suşu ile çalışıldığında ve karbon kaynağı olarak da fermantasyon ortamında; mısır şurubu kullanıldığında elde edildiği rapor edilmiştir.

Elma posasının farklı derişimlerinin doğal substrat kaynağı olarak fermantasyon ortamında kullanıldığı bir başka çalışmada ise, lahana turşusundan izole edilmiş, *Rhodotorula* cinsine ait olduğu belirlenen bir suş ile karotenoid üretimi incelenmiştir (Joshi, Sharma ve Girdher, 2013). Anılan araştırmada sonuç olarak; elma posasının, çalışılan suş ile karoten üretiminde kullanılabileceği belirtilmiş ve çalışmada elde edilen en yüksek karoten derişiminin, fermantasyon ortamında 40 g/L derişiminde elma posası kullanıldığında; 46.42 mg/100 g olarak belirlendiği ifade edilmiştir.

Doğal substratların β-karoten üretimi için fermantasyon ortamlarında kullanıldığı bir diğer araştırmada; fermantasyonda şeker kamışı suyu, melası ve şurubunu içeren ortamların kullanıldığı belirtilmiştir (Banzatto, Freita ve Mutton, 2013). Bu fermantasyon ortamlarının hazırlanmasında; şeker kamışı melasının ve şeker kamışı şurubunun seyreltilip hidrolize edildiği ve şeker kamışı suyunun ise doğrudan hidrolize edilerek kullanıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada; üre ve Nitrofos KL olarak isimlendirilen ticari bir azot kaynağı ile desteklenerek hazırlandığı bildirilen ortamlarda, *R. rubra* L18 suşunun biyokütle ve karotenoid derişimlerinin incelendiği de belirtilmiştir. En yüksek karotenoid üretiminin, herhangi bir destek bileşeni olmayan, melas ortamında; 2.74 mg/L olarak belirlendiği, melasın üre ve nitrofos KL ile desteklendiği durumda ise sırasıyla; 2.55 ve 2.32 mg/L olarak hesaplandığı rapor edilmiştir.

Kahyaoğlu (1999) tarafından, *Phycomycetes blakesleeanus*, *Phycomycetes nitens*, *Blakeslea trispora* ve *Mucor mucedo* suşları kullanılarak, β-karoten üretimi için melas, şlempe ve peynir altı suyu gibi bazı endüstriyel atıkların değerlendirilmesi amacıyla yapılmış olan bir tez çalışmasında; en yüksek β-karoten üretiminin melas ortamında, *B. trispora* suşu ile elde edildiği bildirilmiştir. Anılan çalışmada; kullanılan söz konusu substratların β-karoten üretimi için endüstriyel olarak değerlendirilebilir nitelikte oldukları da ifade edilmiştir.

Şeker endüstrisi artığı olan ve yüksek derişimde sakkaroz içeren melasın ve bir süt endüstrisi artığı olan, yüksek derişimde laktoz içeren peynir altı suyunun, *R. glutinis* ve *R. mucilaginosa* türlerine ait iki suş ile  $\beta$ -karoten üretiminde substrat olarak değerlendirilmesine yönelik bir diğer çalışmada ise; fermantasyon ortamlarında farklı derişimlerde melas ve peynir altı suyu tozunun kullanıldığı ifade edilmiştir (Eren, 2003). Yapılan çalışmada melasın ortamda; 2.5-20 g/L derişim aralığında, peynir altı suyu tozunun ise; 3.3-13.2 g/L aralığında kullanıldıkları rapor edilmiştir. Bu çalışmada; incelenen *R. glutinis* suşu için melas derişiminin 12.5 g/L'ye kadar artmasıyla özgül üreme hızının arttığı, daha yüksek melas derişimlerinde ise, substrat inhibisyonundan dolayı özgül üreme hızının azaldığı belirtilirken, ürün ( $\beta$ -karoten) oluşum hızının ise arttığı bildirilmiştir. Denenen *R. mucilaginosa* suşu için ise; peynir altı suyu derişimi değiştirildiğinde, düşük derişimlerin  $\beta$ -karoten üretimini artırdığı, yüksek derişimlerin ise  $\beta$ -karoten üretimini inhibe ettiği ifade edilmiştir.

Ünver (2010) tarafından yapılan bir çalışmada; besiyeri bileşenleri olarak koçboynuzu peptonunun ve melasın farklı derişimlerinin, *R. glutinis* YU-14 suşu ile karotenoid üretimi için denendiği ve en yüksek karotenoid üretiminin; belirlenen optimum fermantasyon ortamı koşulları altında, %0.5 (w/v) koç boynuzu peptonu ve %3 (w/v) melas içeren ortamında; 5.79 mg/L olarak belirlendiği rapor edilmiştir.

Korumilli ve Mishra (2014) tarafından, bir *R. rubra* suşu ile ananas, nar ve portakal atıklarından elde edilen; meyve atığı ekstraktının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı bir araştırmada, karotenoid üretimi için pH, sıcaklık ve çalkalama hızının optimizasyonu üzerine bir çalışma yapılmıştır. Söz konusu çalışmada; incelenen *R. rubra* suşu ile karotenoid üretiminde, hazırlanan meyve atığı ekstraktının, karbon kaynağı olarak tek başına kullanılabileceği rapor edilmiştir. Adı geçen çalışmada, incelenen suş tarafından en yüksek karotenoid derişiminin; 2.77 mg/L olarak, başlangıç pH'nın 7, ortam sıcaklığının; 30°C ve çalkalama hızının; 120 rpm olduğu koşullarda üretildiği bildirilmiştir.

*R. glutinis* suşları tarafından üretilen  $\beta$ -karoten, torulen ve torularhodin oranlarının kullanılan suşun dışında, kültür koşullarına da bağlı olduğu belirtilmektedir. Yabani *R. glutinis* suşlarının  $\beta$ -karoten üretimlerinin genellikle çok düşük olduğu, üretilen torulen



ve torularhodinin ise  $\beta$ -karotene göre ticari öneminin daha az olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenlerle suşların geliştirilmesi, besiyeri içeriğinin optimizasyonu ve kültür koşullarının manipülasyonu ile yabancı *R. glutinis* suşlarının  $\beta$ -karoten üretimlerinin artırılmaya çalışılması için birçok çalışma yapıldığı rapor edilmektedir (Nasrabadi ve Razavi, 2011).

## **2.1. Kesikli Olarak Çalışan Fermantasyon Sistemlerinde İncelenen Parametreler ve Kullanılan Bazı Eşitlikler**

### **2.1.1. Mikroorganizma Özgül Üreme Hızı**

Endüstriyel mikrobiyolojik üretimlerde; üretilecek mikroorganizmanın veya oluşacak ürün miktarının önceden planlanması istenmektedir. Bakteriler, küf ve mayalar için farklı çoğalma modellerinin olduğu ve bunlar kullanılarak hücre sayıları ve ürün miktarlarının belirlenebildiği belirtilmektedir. Bakteriler, mayalar ve birçok küf gibi mikroorganizmaların çoğalması birbirini izleyen gelişim aşamalarından oluşmaktadır. Mikroorganizma gelişiminin ilk aşaması lag-faz; inokulasyondan itibaren ilk hücre bölünmesine kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır. Bu evreyi uyum yani hızlanma fazı izleyip, hemen ardından log faz yani eksponensiyel çoğalma fazı gelmektedir. Üssel üreme bölgesi de denilen bu bölgedeki mikroorganizma çoğalma hızı, sabit ve maksimuma ulaşmış olarak ifade edilmektedir (Dönmez, 2017). Üssel üreme bölgesinde mikroorganizma özgül üreme hızı ile ilgili bağıntı, Eş. 2.1’de verilmektedir.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen her bir deney için maya suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı,  $\mu$  ( $\text{sa}^{-1}$ ), Eşitlik 2.1 yardımıyla,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitlikte verilen  $X$ ; kuru ağırlık cinsinden ( $\text{g mo.L}^{-1}$ ) olarak mikroorganizma derişimini ve  $t$  (sa) ise; zamanı göstermektedir.

### **2.1.2. Mikroorganizma Özgül Ürün Oluşum Hızı**

Kesikli bir fermantasyon sisteminde, özgül ürün oluşum hızı değeri biyokütle derişimine bağlı bir fonksiyon olarak Eşitlik 2.2’de verilen kinetik bağıntı ile

açıklanmaktadır (Doran, 2013). Özgül ürün oluşum hızı; fermantasyonun herhangi bir zamanında, ürün oluşum hızı ve biyokütle derişimine bağlı olarak değişebilmektedir.

$$\gamma = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (2.2)$$

Bu tez çalışmasında, özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları;  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak hesaplanmıştır. Bu amaçla önce;  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren eğrilerden belirli zamanlara karşı gelen eğim değerleri hesaplanarak ürün oluşum hızları,  $dP/dt$  (mg  $\beta$ -karoten/L.sa) hesaplanmıştır. Daha sonra ise, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden, hesaplanan her bir ürün oluşum hızı ile ilgili zaman değerine karşı gelen mikroorganizma derişimleri de okunarak, Eşitlik 2.2 yardımıyla; özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları,  $\gamma$  (mg  $\beta$ -karoten/g mo.sa) hesaplanmıştır.

Bu çalışmada ayrıca, her deney için farklı zamanlarda hesaplanan özgül  $\beta$ -karoten üretim hızı değerleri de karşılaştırılarak, söz konusu deneydeki en yüksek özgül  $\beta$ -karoten üretim hızı değeri de ( $\gamma_m$ , mg  $\beta$ -karoten/g mo.sa) belirlenmiştir.

## **2.2. Deney Tasarımı Yöntemi ve Fermantasyon Koşullarının Optimizasyonu**

Gıda mühendisliğinde optimizasyon, proseslerde işlem verimi ve ürün kabulünün yüksek olması için kullanılan önemli bir araç olarak ifade edilmektedir. Bu araçlardan biri olarak yanıt yüzey yönteminin, optimizasyonu da içeren istatistiksel bir teknik olduğu bildirilmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010).

Faktöriyel dizaynları ve varyans analizleri yöntemiyle deney tasarımının, ilk kez Fisher tarafından 1930'lu yıllarda, tarım ve biyoloji araştırmaları için geliştirildiği bildirilmektedir (Makela, 2017). Literatürde, bir kerede sadece bir faktörün değerinin değiştirilerek diğer değişkenlerin değerlerinin sabit tutulduğu geleneksel optimizasyon yöntemlerinin; istenen sonuca ulaşabilmek için daha uzun süre ve daha fazla işgücü gerektirdiği belirtilmektedir. Ayrıca bu yöntemler ile çalışıldığında, değişkenler arasındaki interaksiyonların da gözardı edildiği ifade edilmiştir. Bunların sonucu olarak

bu yöntemlerle, istenen sonuç için gerekli optimum koşulların belirlenemeyeceği bildirilmiştir (Maldonado, Rodriguez-Amaya ve Scamparini, 2012; Thakur ve Azmi, 2014; Bagy ve ark., 2016). Entegre modelleme ve optimizasyon yöntemi olan Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology-RSM) ise, çoklu değişkenlerin veya faktörlerin verilen bir prosesteki etkilerinin hızlı ve en az sayıda deney ile analiz edildiği ve elde edilen sonuçların da istatistiksel olarak yüksek derecede önemli bulunduğu, etkili bir araç olarak ifade edilmektedir (Dhaliwal ve Chandra, 2015). Yanıt yüzey yönteminin ise, ilk kez 1951 yılında Box ve Wilson tarafından tanımlanarak geliştirildiği bilinmektedir (Turan ve Altundoğan, 2011).

Yanıt yüzey yöntemi; deneylerin dizayn edilmesi, faktörlerin etkilerinin değerlendirilmesi, daha az deney ile bağımlı değişken ve faktörler arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi ve istenen yanıtların elde edilmesi için; faktörlerin optimum koşullarının araştırılmasında kullanılan, güncel bir istatistiksel ve matematiksel teknik olarak açıklanmaktadır. Mikrobiyel fermantasyonla metabolitlerin üretiminde, yanıt yüzey yöntemi ile deney dizaynının, etkili bir yaklaşım olduğu bildirilmektedir. İkinci dereceden polinoma uygun en yaygın kullanılan yanıt yüzey yöntemi modelinin ise; Merkezi Karma Tasarım (MKT) yöntemi (Central Composite Design) olduğu rapor edilmektedir (Bagy ve ark., 2016).

Yanıt yüzey yönteminde MKT'nin, aynı anda çok sayıda farklı parametrenin denenmesi, her bir faktörün rolünün ayrı ayrı ve aynı zamanda kümülatif etkilerinin değerlendirilmesinin istendiği deney prosedürlerinin tasarlanmasında kullanıldığı ifade edilmektedir. Bu durum, tam ve kısmi faktöriyel yöntemleri gibi diğer deneysel tasarım türleri ile ortak bir özellik gösterirken, MKT'nin bu yöntemlerden farkının; deney sayısının azaltılmış olması olduğu belirtilmektedir (Said ve Amin, 2015). Kimyasal ve biyokimyasal proseslerde çok sayıda parametrenin etkili olduğu ve bu yöntemde yalnızca en önemli etkisi olanların, bağımsız değişkenler olarak seçildiği belirtilmektedir. Önemli parametrelerin tanımlanmasından sonra ise, faktörlerin yani parametrelerin seviyelerinin belirlendiği ifade edilmektedir (Baş ve Boyacı, 2007). Söz konusu bu tasarım oluşturulurken bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri;  $x_i$  olarak gösterilmekte ve Eşitlik 2.3 kullanılarak hesaplanmaktadır (Said ve Amin, 2015).

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad (2.3)$$

Eşitlik 2.3’de yer alan  $X_i$  sembolü, bağımsız değişkene ait gerçek değeri,  $X_0$  sembolü bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değerini ve  $\Delta X_i$  sembolü ise  $X_i$  ve  $X_0$  değerlerinin buldukları düzeylerin arasındaki farkı ifade etmektedir.

Aynı zamanda “Circumscribed Design” olarak da geçen, merkezi karma tasarım yöntemi; Gıda Mühendisliği Bilimi alanında en çok kullanılan dizayn olarak bilinmektedir. MKT’nin; yanıtın eğilimi hakkında iyi bir tahmin sağlamak için, merkez nokta ve yıldız noktalarını içeren bazı kombinasyonların da eklenmiş olduğu, her faktör için 5 farklı seviyeyi kapsayan bir faktöryel dizaynı içerdiği bildirilmektedir. MKT’de her faktör için; merkezden faktöryel noktaya olan uzaklığın  $\pm 1$  birim, merkezden yıldız noktasına uzaklığın ise  $\alpha > 1$  olmak üzere  $\pm \alpha$  kadar olduğu ve  $\alpha$ ’nın kesin değerinin, tasarım için istenen belirli özelliklere ve ilgili faktörlerin sayısına bağlı bulunduğu belirtilmektedir. Eğer dizayn “rotatable” ise;  $\alpha$  değerinin Eşitlik 2.4 ile hesaplanabileceği bildirilmektedir (Bevilacqua, Corbo ve Sinigaglia, 2010).

$$\alpha = [2^k]^{1/4} \quad (2.4)$$

Eşitlik 2.4’de,  $k$ ; deney tasarımında yer alan faktörlerin sayısı olarak tanımlanmakta olup yani bağımsız değişken sayısını sembolize etmektedir. Örneğin;  $\alpha$ ’nın 2 olduğu durum, 4 faktörlü deney tasarımını ifade etmektedir.

Tasarımdaki deney noktalarının sayısı ise, program tarafından; Eşitlik 2.5’de yer alan formül kullanılarak hesaplanmaktadır (Khuri, 2017). Bu eşitlikte  $N$  değeri; tasarımda gerçekleştirilecek tüm deney sayısını,  $k$  değeri; incelenen faktör sayısını belirtirken,  $n_0$  değeri ise; merkez noktada tekrar edilecek deney sayısını ifade etmektedir.

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad (2.5)$$

Merkezi karma tasarımın yönteminin, ikinci dereceden tasarımlar arasında en çok tercih edilen olduğu bildirilmektedir. Bu tasarım yönteminin ilk olarak  $3^k$  tam faktöryel

dizaynlarının deney sayısını azaltmak amacıyla ortaya çıktığı belirtilmektedir (Şekil 2.5). Bu tasarım ile gerçekleştirilen  $3^k$  tam faktöriyel deney dizaynının, üç farklı yaklaşım ile yapılandırıldığı ifade edilmektedir. İkinci dereceden tasarıma bir örnek olan bu dizayn yapısı (Eş 2.5) üç kısım olarak aşağıda açıklanmıştır (Khuri, 2017).

1. Faktör seviyelerinin -1, 1 olarak kodlandığı, tam (veya kısmi)  $2k$  faktöriyel tasarımı, tasarımın faktöriyel kısmı.
2. Her kontrol değişkeninin eksenini üzerinde tasarım merkezinden  $\alpha$  mesafesi uzaklıkta iki nokta seçilecek şekilde düzenlenmiş,  $2k$  noktadan oluşan eksensel (axial) kısım.
3. Tasarım merkezinde belirli sayıda tekrardan oluşan merkez nokta kısmı.

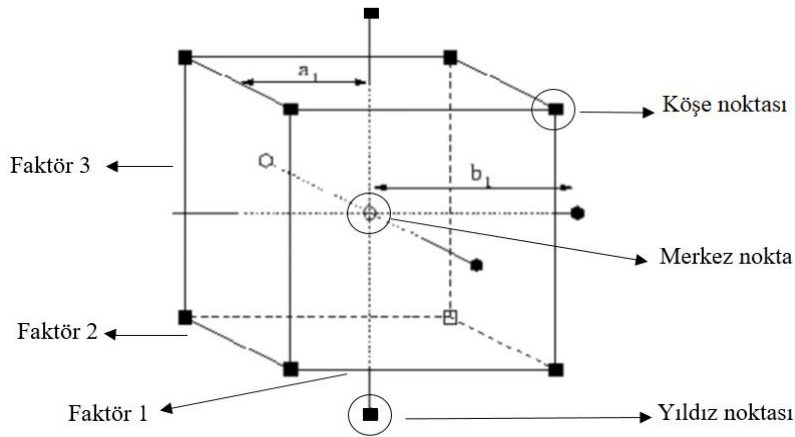
Merkezi karma tasarım kullanımı oldukça kolay bir yöntem olarak tanımlanmakta ve temel aşamaları aşağıda verilmektedir (Bevilacqua, Corbo ve Sinigaglia, 2010).

1. Bağımsız değişkenlerin yani, faktörlerin tanımlanması.
2. Faktörlerin seviyelerinin belirlenmesi. Bu aşamada, her faktör için; minimum ve maksimum değerleri sırasıyla; -2 ve +2 olarak kodlanarak, bir değer aralığı belirlenmektedir. Daha sonra bu değerlerin ortalaması; 0 olarak kodlanan değer, aralığın merkez noktası olarak kabul edilmektedir. Son olarak; -2 ile 0'ın ortalaması -1 değeri ve +2 ile 0'ın ortalaması +1 değeri olarak belirlenmektedir.
3. Dizaynın kombinasyon sayısının belirlenmesi. Farklı sayıda faktörün kombinasyonu ile oluşturulan tasarımlarda elde edilen deney sayısı, Eş. 2.5'deki denklem kullanılarak hesaplanmaktadır. Bu eşitlik kullanılarak elde edilen en az deney kombinasyon sayısının merkez noktada deney tekrarı yapılmadan tek bir deney yapıldığında hesaplandığı bildirilmektedir. Bu şekilde, 3 faktörlü tasarım için en az; 15 kombinasyon gerekirken, 4 faktörlü tasarım için en az; 25 kombinasyona ihtiyaç olduğu belirtilmektedir.

4. Köşe, yıldız ve merkez noktaları bir araya getirilerek tüm kombinasyonun yazılması.

3 faktörlü, bir merkezi karma tasarım, bir küpe benzetilerek açıklanmaktadır. Küpün köşeleri, “köşe noktaları” olarak da ifade edilebilirken, küpün merkezinin de tasarımın “merkez noktası” olarak kabul edilmektedir. Küpün bir küre içine teğet olacak şekilde yerleştirildiği farz edildiğinde, küpün “yıldız noktaları” kürenin merkezinden geçen ışının sınırları olarak bildirilmektedir (Bevilacqua, Corbo ve Sinigaglia, 2010).

Küpe ait köşe noktaları; tüm faktörlerin -1 veya +1 seviyelerinde olduğu ve birbirini takip eden ikili işlem kombinasyonları olarak tanımlanmaktadır. Merkez nokta ise; tüm faktörlerin aralıktaki ortalama değerlerine ayarlanması nedeniyle, MKT'nin tekrar edilebilirliğinin bir nevi kontrolü olarak kabul edilmektedir. Yıldız noktaları; bir faktörün minimum veya maksimum değerinde iken diğerlerinin merkez nokta değerinde tutulduğu kombinasyonlardır. 3 faktörlü bir Merkezi Karma Tasarım (CCD) modeli; Şekil 2.5’de verilmektedir (Bevilacqua, Corbo ve Sinigaglia, 2010)



Şekil 2.5. Üç faktörlü bir merkezi karma tasarım modeli

Yanıt yüzey yöntemi; yanıt ve bağımsız değişken arasındaki fonksiyonun matematiksel formunun tahminlenmesine dayanmaktadır. Yanıt, bağımsız değişkenin bir lineer fonksiyonuna uyumlu ise, birinci dereceden polinomiyal bir denklemlerle bir model

oluşturulabileceği belirtilmektedir. Yanıt yüzeyinde eğrilik varsa, ikinci derece veya daha yüksek dereceli polinomial denklemlerin model olarak kullanılacağı bildirilmektedir. İkinci dereceden polinomial denklemlerin en küçük kareler yöntemi ile tahminlenebildiği ve optimum noktanın belirlenebildiği belirtilmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010). Modelleme; bir cevabın gerçek davranışına yaklaşma amacına dayanmaktadır (Makela, 2017).

Bu deneysel metodla oluşturulan matematiksel model; bağımsız değişkenlerin tek başlarına ve birlikte etkilerini tanımlamaktadır. Yanıt ve girdiler arasındaki bu ilişki Eşitlik 2.6'da verilmiştir (Baş ve Boyacı, 2007).

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.6'da,  $y$ : bağımlı yanıt değişkeni,  $f$ : bağımsız değişkenler olan  $x_1, x_2, \dots, x_k$ 'nin fonksiyonunu,  $k$ : bağımsız değişken sayısını ve  $\varepsilon$ :  $f$  fonksiyonu tarafından hesap edilemeyen istatistiksel hata terimini belirtmektedir (Turan ve Altundoğan, 2011).

Deneyler sonucunda elde edilen yanıtlar ise, daha sonra herbir yanıtı polinomial modele uydurmaya içeren regresyon metodu kullanılarak analiz edilmektedir (Said ve Amin, 2015). Yaygın olarak kullanılan lineer regresyon analizinin, bağımlı değişken (yanıt) ile bir veya daha fazla bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak inceleyen istatistiksel bir teknik olduğu belirtilmektedir. Polinomial modeller de lineer olan herhangi bir model gibi oluşturduğu yanıt yüzeyin şekli ne olursa olsun lineer regresyon modeli olarak tanımlanmaktadır. Çoklu lineer regresyon modelinde, regresyon katsayılarının tahminlenmesinde en küçük kareler yönteminin kullanıldığı bildirilmektedir. En küçük kareler yöntemi uygulanırken; seçilen modelin matematiksel formunun uygun olduğu, dolayısıyla gerçek ortalama yanıtı temsil edebildiği, dene- melerde rastgele hatanın ( $\varepsilon$ ) birbirinden bağımsız normal dağılım gösterdiği ve varyansının sabit olduğu varsayılmaktadır. Rastgele hatanın birbirinden bağımsız olması ve varyansının sabit olması ile en iyi tahminleyici modellerin elde edilmesinin sağlanacağı belirtilmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010). Yanıt yüzeyin tahminlenmesinde kullanılan en küçük kareler yönteminin uygulandığı ikinci dereceden polinomial bir denklem, Eşitlik 2.7'de verilmektedir (Makela, 2017).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (2.7)$$

y'nin bağımlı değişkeni yani yanıtı;  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  ve  $\beta_{ij}$ 'nin sırasıyla; y değerinin ortalaması ile linear, ikili etkileşim ve karesel katsayılarını,  $\varepsilon$ 'nin ise model kalıntısını temsil ettiği bildirilmektedir (Makela, 2017). Modelin güvenilirliğinin testi için;  $R^2$  katsayısı ile modelin uygunluğunun ve ayrıca F-testi ile de uyumsuzluğunun değerlendirildiği, varyans analizi (ANOVA) uygulanması gerektiği belirtilmektedir (Said ve Amin, 2015). Bir faktörün tek başına veya diğer faktörlerle etkileşimi ile yanıt üzerine etkisinin önem derecesinin, regresyon katsayılarının yardımıyla belirlendiği ifade edilmektedir. Deney sonuçlarının regresyon analizi ile değerlendirilmesinin yanısıra bu sonuçların görselleştirilerek; üç boyutlu yanıt yüzey ve kontur grafikleri olarak da ifade edilebildiği belirtilmektedir. Oluşturulan bu grafiklerin yardımıyla, faktörlerin gerçekte test edilmemiş olan değerlerine ait kombinasyonlarında elde edilebilecek yanıtlar hakkında da tahmin yapılabileceği bildirilmektedir. Faktörlerin yanıt üzerine etkilerinin araştırıldığı bu deneylerin sonucunda elde edilen yanıt yüzey desenleri kullanılarak, istenen yanıt değerleri için; faktörlerin optimum değerlerinin bulunabileceği de rapor edilmektedir (Turan ve Altundoğan, 2011).

Bir ürünün piyasada rekabet edebilir olması için ürünün üretiminde optimizasyon teorisi ve tekniklerinin kullanılmasının gerektiği belirtilmektedir. Optimizasyon ile ürünün; üretimi ve kalitesi iyileştirilirken, maliyetinin minimize edilmesi sayesinde proses tasarımlarının verimli hale getirilmesinde kullanıldığı belirtilmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010). Fermantasyon işleminin gerçekleştirilmesinde istatistiksel deneysel tasarım tekniklerinin uygulanmasının; iyileştirilmiş ve birbirine daha uyumlu çıktı yanıtları, daha az proses değişkenliği, daha kısa fermantasyon süresi ve daha az maliyet ile sonuçlanabileceği ifade edilmiştir (Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013). Yüksek miktarda pigment üretiminin sağlanması için fermantasyon süreçlerinde optimizasyonunun önemli bir strateji olarak sınıflandırıldığı bildirilmektedir (Aruldass, Dufossé ve Ahmad, 2018). Pigment üretiminde, besiyeri ve proses optimizasyonunda yanıt yüzey yöntemi yaklaşımının gün geçtikçe önem kazandığı ve prosesi optimize etmek için gereken klasik yöntemlerden, daha az zahmetli ve kestirme bir yöntem olduğu ifade edilmektedir. Yanıt yüzey yönteminin; daha az sayıda deney ile besiyeri



bileşenlerinin ve fermantasyon koşullarının optimizasyonunda başarı ile uygulandığı belirtilmektedir. Bunun yanısıra üretim sürecindeki değişkenlerin aralarındaki etkileşimlerinin ve karesel etkilerinin araştırılması için de kullanıldığı bildirilmektedir (Venil, Zakaria ve Ahmad, 2013).

Yanıt yüzey yönteminin literatürde, mikrobiyel karotenoid üretimi üzerine gerçekleştirilen pek çok araştırmada istatistiksel yaklaşım olarak yaygın bir şekilde kullanıldığı belirtilmektedir. Bu araştırmalardan yanıt yüzey yöntemi ile karotenoid üretimlerinin optimizasyonlarının çalışıldığı mayalardan bazıları; *R. rubra*, *R. glutinis* ve *S. salmonicolor* olarak rapor edilmektedir (Buzzini, 2000; Buzzini ve ark., 2005; Malisorn ve Suntornsuk, 2008; Chandi ve ark., 2010; Maldonade, Rodriguez-Amaya ve Scamparini, 2012; Valduga ve ark., 2014).

Buzzini (2000) tarafından, ana karbonhidrat kaynağı olarak; konsantre üzüm şırası kullanılarak *R. glutinis* DBVPG 3853 ile karotenoid üretiminin optimizasyonunun yapıldığı bir çalışmada; öncelikle faktöriyel dizayn ile karbonhidrat kaynağı, maya özütü, tuz konsantrasyonları ve pH olmak üzere farklı deneysel parametrelerin 2 seviyede (-1,+1) denendiği ve bunlardan en önemli ikisinin; pH ve maya özütü olarak belirlendiği bildirilmiştir. Daha sonra pH ve maya özütünün bağımsız değişkenler olarak kabul edildiği ve ikinci dereceden polinomial bir modelin elde edildiği merkezi karma tasarım ile oluşturulan deneylerin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir.

Chandi ve ark. (2010) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, *R. glutinis* 1151 suşu ile yüksek miktarda karotenoid üretimi için, domates atığı esaslı bir besiyerine yanıt yüzey yönteminin uygulandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada; yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, domates ekstraktı, malt ekstraktı, pepton ve glukozun bağımsız değişkenler olarak belirlendiği ve her birinin 5 farklı seviyede değiştirilerek toplam 32 farklı kombinasyonunun denendiği belirtilmiştir.

*R. glutinis* KU550702 ile yapılan bir çalışmada; çalışılan suşun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine sıcaklık, inkübasyon süresi, farklı fermantasyon yöntemleri ve işlem görmemiş soğan atığı,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve L-asparajin gibi çeşitli fermantasyon ortamı bileşenlerinin, etkilerinin incelendiği bildirilmiştir (Bagy ve ark., 2016). Bu çalışmada söz konusu

parametrelerin incelenen suşun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine tek tek etkilerinin; Plackett-Burman dizaynı kullanılarak belirlendiği, daha sonra bu parametrelerin karşılıklı etkileşimlerinin ve optimum seviyelerinin ise; yanıt yüzey yöntemi uygulanarak araştırıldığı rapor edilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Maya Kùltürleri

Bu araştırmada, laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli gıdalardan izole edilerek tanımlanmış olan 7 adet yerel/endojen *R. glutinis* suşu ile, yabancı kùltür koleksiyonlarından sağlanmış olan; 2 adet *R. mucilaginosa* ve bir adet *R. glutinis* suşu olmak üzere toplam; 10 adet maya suşu kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan maya suşları ve izole edildikleri kaynaklar, izelge 3.1'de verilmektedir. Tüm kùltürler, kullanılıncaya kadar, -70°C'de, bir derin dondurucuda, gliserin içeren bir ortamda krioviallerde muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.1.  $\beta$ -karoten üretiminde kullanılan maya suşları ve izolasyon kaynakları

Maya Suşu	İzolasyon Kaynağı
<i>Rhodotorula glutinis</i> AF0-2	Zeytin
<i>Rhodotorula glutinis</i> AF1-4	Zeytin
<i>Rhodotorula glutinis</i> 23	Meyveli yoğurt
<i>Rhodotorula glutinis</i> 13	Kuru kayısı
<i>Rhodotorula glutinis</i> 37.1	Bal
<i>Rhodotorula glutinis</i> 37.2	Bal
<i>Rhodotorula glutinis</i> 12.0	Rafine şeker
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125	Hava
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NBRC 0870	Üzüm şırası
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NCAIM Y 01318	Gıda/bilinmiyor

##### 3.1.2. Besiyerleri

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen deneyler sırasında kullanılan maya suşlarının aktifleştirilmeleri ve stok kùltür olarak saklanmaları amacıyla; Yeast Extract Malt Extract (YM) sıvı ve katı besiyerlerinden yararlanılmıştır. YM broth besiyerinin bileşimi (g/L); glukoz; 10, maya özütü; 3, malt özütü; 3 ve pepton; 5 olacak şekilde

bileşenlerinden hazırlanırken, YM agar besiyerinde ise bu bileşime agar (15 g/L) eklenmiştir.

Tez çalışması deneylerinde, kültür ortamı ve ana fermantasyon ortamı olarak bileşimi (g/L); glukoz; 15, maya özütü; 2.5, malt özütü; 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 ve MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0.25 olan bir besiyerinden yararlanılmıştır (Aksu ve Eren, 2005).

### **3.1.3. Doğal Substrat Kaynakları**

Bu tez çalışmasının bazı deneylerinde, çalışılan suş ile β-karoten üretimi amacıyla, çeşitli doğal substrat kaynakları ve bunlardan hazırlanan ortamlardan yararlanılmıştır. Deneylerde, gıda endüstrisi artıkları olarak; şeker pancarı küspesi ve üzüm posasından hazırlanan özütler ile kestane kabuklarından elde edilen hidrolizat, tarımsal kaynaklı doğal substratlar olarak; armut ve elma posaları ile yer elmasından hazırlanan özütler ve laboratuvarında elde edilen üzüm suyu, tarımsal artık olarak ise; fındık kabuklarından elde edilen hidrolizat kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan şeker pancarı küspesi, Çorum ilinde bulunan Safi Katı Yakıt San. ve Ticaret A.Ş.'e (küspenin sağlandığı dönemde; Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş.) ait şeker fabrikasından temin edilmiştir. Bu tez çalışmasında bazı deneylerde kullanılan beyaz üzüm posası ise; Ankara Kavaklıdere Şarapları A.Ş.'nin Akyurt'da bulunan fabrikasından sağlanmıştır.

Deneylerde kullanılan fındık ve kestane kabuğu hidrolizatları; Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi (BAİBÜ), Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden, hazırlanmış olarak temin edilmişlerdir. Hidrolizatların hazırlanmasında kullanılmış olan fındık kabuklarının, Düzce'deki yerel üreticilerden, kestane kabuklarının ise; Bursa'da bulunan Kafkas Pasta Şekerleme Sanayi ve Ticaret A.Ş' ye ait işletmeden sağlandığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, bazı deneylerde fermantasyon ortamı hazırlanmasında kullanılan armut, üzüm, elma ve yer elması örnekleri ise, Ankara piyasasından satın alınmışlardır.

### **3.1.4. Deney Düzenegi**

Bu araştırmada, kesikli sistemde gerçekleştirilen fermantasyon çalışmaları, sıcaklığın ve çalkama hızının kontrol edilebildiği su banyolarında, 300 mL'lik erlenlerde, 100 mL çalışma hacminde, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında yapılmıştır. alışmalar; laboratuvarımızda bulunan, Grant SS40-D (Birleşik Krallık), Nüve ST-402 (Türkiye) ve Haake SWB 20 (Almanya) modellere ait çalkalamalı su banyolarında gerçekleştirilmiştir.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Fermantasyon Ortamı İçin İnokülüm Hazırlanması ve İnokülüm Başlangıç Derişiminin Belirlenmesi**

Deneyler sırasında fermantasyon ortamları için inokülüm (aşı kùltürü) hazırlanması amacıyla; YM sıvı besiyerinde 28°C'da 24-48 saat geliştirilen taze kùltürlerden, YM agar besiyerlerine inokülasyonlar yapılmış ve aşılan ortamlar, 28°C'da, 72 saat inkübe edilerek aktifleştirilmişlerdir. Geliştirilen kùltürler daha sonra, standart çaplı bir öze kullanılarak, 2 öze dolusu olacak şekilde bileşimi daha önce; Bölüm 3.1.2'de verilen, 50 mL hacmindeki kùltür ortamlarına ayrı ayrı inoküle edilmişlerdir. Ortamlar, çalkalamalı bir su banyosunda 28°C sıcaklıkta, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır (şekil EK 1.1). Süre sonunda geliştirilen kùltürlerden, 300 mL'lik erlenlerde bulunan 100 mL hacmindeki fermantasyon ortamlarına, ortamın mL'sinde yaklaşık  $1 \times 10^7$  hücre olacak şekilde, %5 (v/v) oranında inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon deneylerinde, inokülasyon başlangıç derişiminin belirlenebilmesi amacıyla ilk olarak kùltür ortamından alınan örneğin, %0.85'lik (v/v) steril serum fizyolojik içerisinde seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra uygun dilüsyonlardan, petri kutularındaki YM agar besiyerlerine, yüzeğe yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Petrilerin, 28°C'da 72 saat inkübasyonunun ardından, oluşan kùltürlerde koloni sayımları yapılarak, fermantasyon ortamlarına aşılan suşlara ait inokülasyon başlangıç derişimleri; kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

### 3.2.2. $\beta$ -Karoten Derişiminin Tayini

Bu tez çalışmasında, fermantasyon ortamında üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin belirlenmesinde, aseton ekstraksiyonunu temel alan bir yöntem kullanılmıştır (Perrier ve ark. 1995; Eren, 2003). Bu amaçla ilk olarak, fermantasyon ortamından belirli zaman aralıklarında 5 mL kültür örneği alınarak örneğe, 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme işlemi uygulanmıştır (Şekil EK 1.1, Şekil EK 1.2). Daha sonra üstte kalan sıvı kısım ayrılarak, kalan peletin üzerine iki damla, % 37'lik HCl asit çözeltisi eklenmiş ve vortekste kısa süre kuvvetli şekilde karıştırılmıştır (Şekil EK 1.3). Bir sonraki aşamada; hazırlanan bu hücre peleti üzerine, 2.5 mL saf aseton ilave edilerek vorteks ile karıştırma işlemi yaklaşık 15 sn sürecek şekilde tekrarlanmıştır. Daha sonra örnek oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda yaklaşık 24 saat bekletilmiştir. Aseton ekstraksiyonu işleminin sonunda, tüpler santrifüjlenerek, üstte kalan renkli süpernatant kısmı (Şekil EK 1.4a/b) temiz bir tüpe ayrılmış ve süpernatantın absorbands değeri bir spektrofotometrede (Boeco S-30, Almanya), 455 nm dalga boyunda, saf aseton olan köre karşı ölçülmüştür (Delgado-Vargas ve Paredes-Lopez, 2003). Örnekteki  $\beta$ -karoten derişiminin hesaplanabilmesi amacıyla; önceden hazırlanmış olan; bir çalışma doğrusundan yararlanılmıştır (Şekil EK 2). Bu çalışma doğrusunun oluşturulmasında ise; saf bir  $\beta$ -karoten (Sigma-Aldrich Inc., ABD) örneğinden yararlanılmıştır.

### 3.2.3. Biyokütle Derişiminin Tayini

Bu tez çalışmasında, deneylerde kullanılan maya suşunun biyokütle derişiminin belirlenmesi; spektrofotometrik bir yolla, kuru hücre ağırlığı üzerinden gerçekleştirilmiştir (Rodrigues ve ark., 2019). Bu amaçla önceden oluşturulmuş; absorbands-yaş ağırlık ( $X_y$ ) ve yaş ağırlık-kuru ağırlık ( $X$ ) çalışma doğrularından yararlanılmıştır (Şekil EK 3.1, Şekil EK 3.2). Biyokütle derişiminin tayininde, fermantasyon ortamlarından yaklaşık 24 saatte bir 5'er mL örnekler alınarak bu örnekler 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, şeker derişiminin tayini amacıyla ayrılırken, kalan pelette  $\beta$ -karoten (bkz. Bölüm 3.2.2) ve biyokütle tayinleri gerçekleştirilmiştir. Hücre peletinden  $\beta$ -karotenin ekstraksiyonundan sonra kalan pelet, saf su ile uygun derişimlere seyreltilmiş ve absorbandsı, saf suya karşı, bir spektrofotometrede (Boeco, Almanya), 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen veriler, önceden hazırlanmış olan çalışma

doğrularından yararlanılarak, biyokütle derişimlerinin (g/L) hesaplanmasında kullanılmışlardır.

Doğal substrat kaynaklarının fermantasyon ortamlarında ya da fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, biyokütle derişimlerinin tayini; kuru hücre ağırlığının (g/L) ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; fermantasyon ortamlarından, yaklaşık 24 saate bir alınan 5 mL kültür örneğinde  $\beta$ -karoten tayini için gerekli işlemler (bkz. Bölüm 3.2.2) yapıldıktan sonra kalan pelet, sıcaklığı 80°C'ye ayarlanmış bir etüvde, sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur. Daha sonra kurutulan pelet tartılarak, incelenen örnekteki biyokütle derişimi, kuru hücre ağırlığı (g/L) cinsinden hesaplanmıştır. Tez çalışmasının doğal substrat kaynakları ile gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde, ortamdaki gelebilecek pelet miktarının belirlenmesi amacıyla; hazırlanan her bir fermantasyon ortamından 5 mL örnek alınarak, kültür inokulasyonu yapılmadan önce, aynı koşullarda santrifügasyon işlemi uygulanmış ve elde edilen peletler, 80°C'deki sabit sıcaklıkta, sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuşlardır. Hesaplamalar sırasında, denenen her bir fermantasyon ortamı için bulunan pelet miktarı, hesaplanan biyokütle miktarından düşülmüştür.

#### **3.2.4. Şeker Derişimi Tayinleri**

Bu tez çalışmasında, fermantasyon deneylerinde ortamdaki ve araştırmada kullanılan farklı doğal substrat kaynaklarındaki bazı şekerlerin derişimleri, çeşitli yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir. Şeker derişimlerinin tayinlerinde, önceden hazırlanmış olan; glukoz, fruktoz, galaktoz ve sakkaroz çalışma doğrularından (Şekil EK 4.1-4.4) yararlanılmıştır.

Deneylerde, substrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamlarda, toplam şeker derişiminin tayininde; fenol-sülfürik asit yöntemi (EK 5), glukoz, fruktoz, galaktoz ve maltoz derişimlerinin tayinlerinde ise; dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi (EK 6) kullanılmıştır (Dubois ve ark., 1956; Miller, 1959). Deneylerde ortamdaki maltoz derişiminin hesaplanmasında, glukoz için hazırlanan çalışma doğrusundan yararlanılmıştır.

Bu araştırmada, fermantasyon ortamı olarak doğal substrat kaynaklarından yararlanılan deneylerde şeker derişimleri, incelenen şekere özđü, uygun enzimatik test kitleri (Megazyme-İrlanda) kullanılarak geręekleřtirilmiřtir. Söz konusu deneylerde fermantasyon ortamlarının glukoz derişimleri; D-glukoz enzimatik test kiti, fruktoz derişimleri; D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kiti ve ksiloz derişimleri ise; D-ksiloz enzimatik test kiti yardımıyla, spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür. şeker derişimlerinin enzimatik yolla analizlerinde; spektrofotometrik ölçümler 340 nm dalga boyunda olacak şekilde, kit protokolünde verilen yöntem ile kitte bulunan tampon ve diğer çözeltiler kullanılarak geręekleřtirilmiřtir.

### 3.2.5. pH ölçümü

Bu tez çalışmasında, deneyler sırasındaki pH ölçümleri; Hanna HI 221 model (İtalya) bir pH metre kullanılarak geręekleřtirilmiřtir.

### 3.2.6. Moleküler Yapı Analizi

Bu tez çalışmasında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten örneklerinin moleküler yapı analizi, Bölümümüzde bulunan bir Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrometresi (Shimadzu FT-IR-8101, Japonya) kullanılarak geręekleřtirilmiřtir. FT-IR analizinde, potasyum bromür (KBr) disk (pelet) yöntemi çalışmamıza uyarlanarak kullanılmıştır (Saha ve ark., 2015). Analizde ilk aşamada; 100 mg KBr hidrolik bir pres (Shimadzu, Japonya) yardımıyla sıkıştırılarak pelet haline getirilmiştir. Elde edilen KBr peleti üzerine  $\beta$ -karoten içeren örnek ekstraktından 1-2 damla damlatılıp, ardından FT-IR spektrometresindeki okumanın yapıldığı hazneye yerleştirilmiştir. Spektrometredeki taramalar; 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında, 4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte ve 40 tekrarlı olarak geręekleřtirilmiřtir. Bu deneyler sırasında; kontrol amaçlı olarak, saf bir  $\beta$ -karoten örneği (Sigma, C9750) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, saf  $\beta$ -karoten ile elde edilen spektrum ve benzer konudaki literatürde yer alan bazı çalışmalardaki veriler ile de karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Moh ve ark., 1999; Latha ve Jeevaratnam, 2010; Korumilli ve Mishra, 2014; Masek ve ark., 2015).



### 3.2.7. $\beta$ -Karoten Üretiminde Kullanılacak Olan Maya Suşunun Belirlenmesi

Bu tez araştırmasında kullanılacak olan maya suşunun seçimi amacıyla ilk olarak, laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan çalışmalarda, çeşitli gıdalardan izole edilerek tanımlanmış olan 7 adet yerel/endojen *Rhodotorula glutinis* suşu ile, yabancı kültür koleksiyonlarından sağlanmış olan; 2 adet *Rhodotorula mucilaginosa* ve bir adet *R. glutinis* suşu olmak üzere toplam 10 adet suşun (bkz. Çizelge 3.1),  $\beta$ -karoten üretim kapasiteleri, bir deney planı yapılarak, karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Deneyler kesikli fermantasyon sisteminde; sıcaklığın ve çalkalama hızının kontrol edilebildiği çalkalamalı su banyolarında, uygun hacimdeki erlenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamları için aşı kültürlerinin hazırlanması; daha önce Bölüm 3.2.1’de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Geliştirilen her bir kültürden, 300 mL’lik erlenlerde bulunan ve bileşimi önceden Bölüm 3.1.2’de verilmiş olan 100 mL’lik fermantasyon ortamlarına, %5 (v/v) oranında inokülasyonlar yapılmıştır. İnoküle edilen erlenler 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında ve 28°C’da inkübasyona bırakılmışlardır. Bu aşamada incelenen her bir suş için, başlangıç inokülasyon derişimleri de belirlenmiştir (bkz. Bölüm 3.2.1).

Fermantasyon süresince belirli zaman aralıklarında, fermantasyon ortamlarından 5 mL’lik örnekler alınarak,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri analiz edilmiş, bunun yanısıra, fermantasyon ortamındaki substrat derişimi de tayin edilmiştir. Çalışmanın bu kısmında daha sonra; incelenen her bir suş için hesaplanmış olan  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimlerinin fermantasyon süresince derişimlerini gösteren grafikler (Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond-USA) çizilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, çalışılan koşullarda en yüksek  $\beta$ -karoten üretiminin belirlendiği suş, bu tez çalışmasının sonraki deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

### 3.2.8. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Farklı Karbon Kaynaklarının Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışmasının bu bölümünde; fermantasyon ortamında temel substrat kaynağı olarak farklı karbonhidrat kaynaklarının kullanılmasının, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun,  $\beta$ -karoten üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla; glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz ve sakkaroz kullanılmıştır. Deneylerde; bileşimi daha önce Bölüm

3.1.2’de verilen ana fermantasyon ortamındaki glukoz, başlangıç derişimi (15 g/L) sabit kalacak şekilde, etkisi incelenecek olan karbonhidrat ile değiştirilmiştir.

Deneylerde, ilk olarak *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun aşı kültürü, daha önce Bölüm 3.2.1’de verildiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kültürden; farklı karbonhidrat türü içeren; fermantasyon ortamlarına, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125’in başlangıç aşılama derişimi; yaklaşık  $2.0 \times 10^7$  kob/mL olacak şekilde, %5 (v/v) oranında ayrı ayrı inokülasyonlar yapılmıştır. Fermantasyon ortamları 28°C’da, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında inkübasyona bırakılmışlardır. Fermantasyon süresince kültürlerden yaklaşık olarak 24 saatte bir, 5 mL’lik örnekler alınarak bu örneklerdeki  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimleri tayin edilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak,  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiş ve bu grafiklerden yararlanılarak denenen her bir fermantasyon ortamı için en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi, maya özgül üreme ( $\mu$ ) ve özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma$ ) hesaplanmıştır. Bu aşamada elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretiminin en yüksek olduğu karbonhidrat türü belirlenmiştir. Çalışmanın daha sonraki aşamalarında yapılan deneylerde, bu karbonhidrat kaynağı kullanılmıştır.

### **3.2.9. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkilerinin İncelenmesi**

Tez çalışmasının bu bölümünde, toplam sekiz farklı azot kaynağının, incelenen maya suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla denenen organik azot kaynakları; maya özütü, üç farklı pepton türü (et kaynaklı pepton; Pepton M, kazein kaynaklı pepton; Pepton C, soya kaynaklı pepton; Pepton S) ve üre, inorganik azot kaynakları ise; amonyum sülfat  $[(NH_4)_2SO_4]$ , sodyum nitrat ( $NaNO_3$ ) ve amonyum klorürdür ( $NH_4Cl$ ). Çalışmanın bu aşamasında kullanılan azot kaynakları ve bileşimlerindeki azot yüzdeleri Çizelge 3.2’de verilmektedir.

Çalışmada; organik azot kaynaklarının etkilerinin incelendiği deneylerde, ana fermantasyon ortamındaki (bkz. Bölüm 3.1.2) amonyum sülfat derişimi sabit tutularak, seçilen her bir organik azot kaynağı, fermantasyon ortamındaki maya özütünün yerine

ilave edilirken, inorganik azot kaynaklarının etkilerinin incelendiği deneylerde ise, fermantasyon ortamındaki maya özütünün derişimi sabit tutularak, inorganik azot kaynaklarının her biri amonyum sülfat ile yer değiştirilmiştir.

Çizelge 3.2. *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşu ile β-karoten üretiminde kullanılan fermantasyon ortamlarında denenen çeşitli organik ve inorganik azot kaynakları ile azot içerikleri

Azot Kaynağı	Azot İçeriğı, % (w/w)
Maya Özütü	10.50
Pepton M	14.00
Pepton C	13.00
Pepton S	8.00
Üre	46.20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	21.19
NaNO <sub>3</sub>	16.47
NH <sub>4</sub> Cl	26.17

Fermantasyon ortamlarında denenen farklı organik azot kaynakları amonyum sülfat ile, farklı inorganik azot kaynakları ise maya özütü ile birlikte kullanılmışlardır. Farklı azot kaynaklarının fermantasyon ortamına eklenmesinde, ana fermantasyon ortamındaki azot kaynaklarının [maya özütü (2.5 g/L) ve amonyum sülfat (1 g/L)] toplam azot içeriğı olan 0.474 g/L değeri temel alınarak hesaplamalar yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre ortama eklenecek olan her bir azot kaynağının derişimi hesaplanmıştır.

Fermantasyon ortamındaki maya özütünün başlangıç derişimi sabit tutulduğunda, ortama eklenen inorganik azot kaynaklarının ve benzer şekilde ortamdaki amonyum sülfatın başlangıç derişimi sabit tutulduğunda, ortama eklenen organik azot kaynaklarının başlangıç derişimleri; Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretiminde kullanılan fermantasyon ortamlarında denenen azot kaynağı kombinasyonları ve ortamdaki başlangıç derişimleri

Fermantasyon ortamındaki azot kaynağı kombinasyonu	Organik azot kaynağı	Başlangıç derişimi (g/L)	İnorganik azot kaynağı	Başlangıç derişimi (g/L)
A	Maya özütü	2.50	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
B	Et kaynaklı pepton	2.10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
C	Kazein kaynaklı pepton	2.02	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
D	Soya kaynaklı pepton	3.28	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
E	Üre	0.57	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
F	Maya özütü	2.50	NaNO <sub>3</sub>	1.29
G	Maya özütü	2.50	NH <sub>4</sub> Cl	0.81

Farklı azot kaynaklarının *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği deneylerde ilk olarak, daha önce Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde inokülüm hazırlanmıştır. Geliştirilen suş, fermantasyon ortamındaki diğer bileşenlerin tür ve derişimlerinin sabit olduğu, substrat olarak; 15 g/L fruktoz içeren ve denenen farklı azot kaynaklarının bulunduğu 100 mL hacmindeki fermantasyon ortamlarına ayrı ayrı, başlangıç aşılama derişimi yaklaşık  $1.0 \times 10^7$  kob/ml olacak şekilde, %5 (v/v) oranında inoküle edilmiştir. Daha sonra erlenler, 28°C’da, 100 vuru/dak sabit karıştırma hızında, çalkalamalı su banyolarında inkübasyona bırakılmışlardır. Fermantasyon süresince kültürlerden yaklaşık 24 saatte bir örnekler alınarak, örneklerdeki  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimleri tespit edilmiş ve bunların zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir.

Elde edilen verilerden yararlanarak, incelenen maya suşu için en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri, özgül üreme ve özgül ürün oluşum hızları hesaplanmış ve bulunan sonuçlar değerlendirilerek, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi için, fermantasyon ortamında kullanılacak olan en uygun azot kaynağı karışımının seçimi

gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının daha sonraki aşamalarında, seçilen azot kaynağı kombinasyonu fermantasyon ortamlarında kullanılmıştır.

### **3.2.10. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşu İle $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Bazı Bağımsız Değişkenlerin Etkilerinin İncelenmesi Amacıyla Deney Tasarım Planı Oluşturulması**

Tez çalışmasının bu kısmında, bazı fermantasyon parametrelerinin *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretimine etkilerinin belirlenebilmesi için, istatistiksel bir tasarım yöntemi olan; yanıt yüzey yönteminden (Response Surface Methodology; RSM) yararlanılarak, bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Oluşturulan deney tasarımı, merkezi karma tasarım yöntemine (CCD; Central Composite Design) göre gerçekleştirilmiş olup bu amaçla, Design Expert® 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programının deneme sürümü kullanılmıştır. Deney tasarımı; -2, -1, 0, +1, +2 olarak kodlanmış beş farklı düzeyde gerçekleştirilerek, merkezde altı tekrarlı, 24 farklı kombinasyona sahip toplam 30 deneysel noktadan oluşmuştur. Tasarımdaki yıldız (star) noktası olan  $\alpha$  değeri, işlem aralığının genişliğini ifade etmektedir.  $\alpha$  değeri, Bölüm 2.2’de verilen Eşitlik 2.4’e göre hesaplanırken, tasarımdaki deney noktaları hesaplanan  $\alpha$  değerine göre beş düzeyde kodlanarak oluşturulmuştur. Tasarımdaki deney noktalarının sayısı (N) ise, program tarafından; Eşitlik 2.5’de (bkz. Bölüm 2.2) yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Tasarımdaki bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri ( $x_i$ ), bağımsız değişkene ait gerçek değerler ( $X_i$ ), bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değerler ( $X_0$ ) ve düzeyler arasındaki farklar ( $\Delta X$ ) kullanılarak; Eşitlik 2.3’e (bkz. Bölüm 2.2) göre hesaplanmışlardır.

Deney tasarımında, fermantasyon ortamının başlangıç fruktoz ( $X_1$ ) ve kazein peptonu ( $X_2$ ) derişimleri ile başlangıç pH’ı ( $X_3$ ) ve ortam sıcaklığı ( $X_4$ ), bağımsız değişkenler olarak belirlenmişlerdir. Deneylerde, azot kaynağı olarak fermantasyon ortamında yalnızca kazein peptonunun derişimi değiştirilmiş, ortamdaki amonyum sülfatın derişimi ise; 1 g/L olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Deney tasarımıında kullanılan bağımsız değişkenler ve çalışma aralıklarının belirlenmesinde, literatürde benzer konuda yapılan çeşitli araştırmaların sonuçlarında elde edilen veriler dikkate alınmış olup, her bir bağımsız değişken için beş farklı düzeyde çalışılmıştır. Söz konusu bağımsız değişkenler ve seçilen çalışma aralıkları izelge 3.4’de gösterilmiştir

Çizelge 3.4. Deney tasarımıında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Simge	Değişken seviyeleri				
		-2	-1	0	+1	+2
Fruktoz başlangıç derişimi (g/L)	X <sub>1</sub>	10	30	50	70	90
Kazein peptonu başlangıç derişimi (g/L)	X <sub>2</sub>	0	2.5	5	7.5	10
Başlangıç pH değeri	X <sub>3</sub>	3	4.5	6	7.5	9
Ortam sıcaklığı (°C)	X <sub>4</sub>	24	26	28	30	32

Bu tez çalışmasında, kullanılan deney tasarım planına göre gerçekleştirilen her bir deney için, bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak; maksimum β-karoten derişimi, maya özgül üreme hızı ve maksimum β-karoten üretim hızı değerleri hesaplanmıştır. Araştırmada; bağımsız değişkenlerin, yanıtlar üzerindeki etkilerini gösteren model eşitliklerin türetilmesi için seçilen bağımlı değişkenler izelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Deney tasarımıında kullanılan bağımlı değişkenler ve simgeleri

Bağımlı değişkenler	Simge
Maksimum β-karoten derişimi (mg/L)	Y <sub>1</sub>
Maya özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub>
Maksimum β-karoten üretim hızı [mg β-karoten/(L.sa)]	Y <sub>3</sub>

Tez çalışmasının bu aşamasında, yanıt yüzey yöntemi için kullanılan program (Design Expert® 10.0.6) kullanılarak elde edilen deney tasarım planındaki her bir deney verilen işletme koşullarına göre gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen her bir deneyde,

fermantasyon süresince, belirli zaman aralıklarında fermentasyon ortamlarından örnekler alınarak, bu örneklerdeki;  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimleri analiz edilmiştir. Her deney için;  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimlerinin zamana karşı derişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuştur.

Elde edilen bu verilerden ve grafiklerden yararlanılarak, incelenen suş için, her bir deney koşulundaki en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ), özgül üreme hızı ( $Y_2$ ), en yüksek  $\beta$ -karoten oluşum hızı ( $Y_3$ ) belirlenmiştir. İncelenen suşa ait üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı,  $Y_2$ ,  $\mu$ ,  $\ln X$  değerlerinin zamanla derişimlerini gösteren grafikler kullanılarak Bölüm 2.1’de verilen Eşitlik 2.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışılan suşa ait  $\beta$ -karoten oluşum hızı değeri,  $Y_3$ ,  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla derişimlerini gösteren eğride belirli zamanlara karşı gelen eğim değerlerinin belirlenmesiyle hesap edilmiştir. Çalışmada ayrıca Bölüm 2.1’deki Eşitlik 2.2 yardımıyla  $\gamma$ , özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları da hesaplanmıştır.

### **3.2.11. Çalışmada Seçilen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmeleri**

Araştırmanın bu aşamasında, Design Expert® 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Mineapolis, USA) programı kullanılarak, çoklu regresyon analizi yardımıyla, çalışmadaki bağımsız derişkenlerin bağımlı derişkenler üzerindeki etkilerini gösteren karesel model eşitlikler türetilmişlerdir. Söz konusu eşitliklerin türetilmesi amacıyla, bu çalışmada en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ), özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) ve en yüksek  $\beta$ -karoten oluşum hızı ( $Y_3$ ) bağımlı derişkenler (yanıtlar) olarak seçilmiştir.

Bu araştırmada, bağımsız derişkenler olarak seçilen; fermentasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ), başlangıç pH’ı ( $X_3$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ), her bir bağımlı derişken üzerindeki etkilerini gösteren model denklemlerin türetilmeleri için çoklu regresyon analizi yapılmıştır. Eşitliklerin türetilmesinde, söz konusu program tarafından önerilen ikinci dereceden (quadratic-karesel) bir model denklem kullanılmıştır. Daha sonra ise gerçekleştirilen her bir modelleme çalışması için aynı program yardımıyla, varyans (ANOVA) analizleri de yapılmıştır. Modellerin gerçek cevaplara uygunluklarına ise; her bir modelin % 95

güven aralığında önemli ( $p < 0.05$ ) bulunması, uyum eksikliğinin önemsiz ( $p > 0.05$ ) olması ve ilgili modele ait belirtme katsayısı değerinin ( $R^2$ ) ise; 0.75'den büyük olması durumu dikkate alınarak, yapılan bir inceleme sonucunda karar verilmiştir. Tüm yanıtlar için uyumlu bulunan, en yüksek belirtme katsayılarının elde edildiği, türetilen karesel denklem modeli; Eşitlik 3.1'de verilmiştir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (3.1)$$

Eş. 3.1'de,  $y$ ; yanıt,  $X_i$  ve  $X_j$ ; bağımsız değişkenler,  $\beta_0$ ; sabit katsayı,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$  ve  $\beta_{ii}$  ise sırayla; lineer, ikili etkileşim ve karesel etkilerini gösteren regresyon katsayılarını temsil etmektedir (Makela, 2017).

Bu aşamada ayrıca, değişkenlerin yanıtlar üzerinde karesel, tek tek ve ikili etkileri de varyans analizi ile incelenerek, değişkenlerin önemli olup olmadıklarına karar verilmiştir. Bu nedenle program ile oluşturulan ANOVA tablosu kullanılarak %95 güven düzeyinde,  $p$  değerlerinin 0.05'den küçük olarak belirlendiği katsayılar (doğrusal- $\beta_i$ , karesel- $\beta_{ii}$  ve  $\beta_{ij}$ -ikili etkileşim) önemli olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, varyans analizlerinin tamamlanmasından sonra; her bir yanıt için elde edilen deneysel sonuçların, söz konusu program yardımıyla, model eşitlikler kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile karşılaştırıldıkları grafikler çizilmiştir. Bunun yanısıra, seçilen dört bağımsız değişkenin her bir yanıt üzerindeki etkilerini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey ve kontur grafikleri de, kullanılan program yardımıyla oluşturulmuştur.

### **3.2.12. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşu İle $\beta$ -karoten Üretiminin Optimizasyonu**

*R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretiminin optimizasyonunda Design Expert® 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Mineapolis, USA) programında yer alan; nümerik optimizasyon uygulamasından yararlanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak, çalışma için seçilen bağımlı ve bağımsız değişkenler ile bu değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri tanımlanmıştır (Çizelge 3.6).



Çizelge 3.6. Optimizasyonda kullanılan bağımsız (X) ve bağımlı (Y) değişkenler için belirlenen hedefler ile minimum ve maksimum değerler

Değişken	Simge	Hedef	Minimum değer	Maksimum değer
Fruktoz başlangıç derişimi (g/L)	X <sub>1</sub>	Çalışılan aralıkta	10	90
Pepton başlangıç derişimi (g/L)	X <sub>2</sub>	Çalışılan aralıkta	0	10
Başlangıç pH'ı	X <sub>3</sub>	Çalışılan aralıkta	3	9
Sıcaklık (°C)	X <sub>4</sub>	Çalışılan aralıkta	24	32
Maksimum β-karoten derişimi (mg/L)	Y <sub>1</sub>	Maksimum	1.75	5.50
Maya özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub>	Belirtilmedi	0.020	0.070
Maksimum β-karoten üretim hızı [mg β-karoten/(L.sa)]	Y <sub>3</sub>	Belirtilmedi	0.017	0.036

Araştırmada kullanılan bağımsız değişkenler için minimum ve maksimum değerler; deney tasarım planında kullanılan ilgili değişkene ait en düşük ve yüksek değerler seçilerek, hedef ise; çalışılan aralıkta (beş düzeyde kodlanmış değer aralığı) olarak belirlenmiştir.

Bağımlı değişkenler için minimum ve maksimum değerler ise; maya özgül üreme hızı (Y<sub>2</sub>) ve maksimum β-karoten üretim hızı (Y<sub>3</sub>) için hedef belirtmeksizin, deney tasarım planı kapsamında gerçekleştirilen toplam 30 deney sonucunda elde edilen, ilgili değişkene ait en yüksek ve en düşük değerler seçilerek oluşturulmuştur. Bağımlı değişkenlerden; maksimum β-karoten derişimi (Y<sub>1</sub>) için en düşük değer, deneyler sonucu elde edilen değer olarak tanımlanırken, en yüksek değer ise, hedef maksimum olarak seçilerek, deneyler sırasında elde edilen değerlerin bir miktar üzerinde bir değer olarak tanımlanmıştır (bkz. Çizelge 3.6).

Gerçekleştirilen nümerik optimizasyonda, çalışma için seçilen bağımlı ve bağımsız değişkenler ile bu değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri yukarıda anlatıldığı şekilde tanımlandıktan sonra, kullanılan program tarafından hesaplanan ve her bir bağımlı ve bağımsız verinin değerini içeren farklı çözüm (solutions) önerileri ile her çözüme ait istenen hedefe ulaşma oranları (desirability) elde edilmiştir (Çizelge Ek 9). Çalışmanın bu aşamasında daha sonra, kullanılan optimizasyon programı tarafından üretilen çözümler içerisinde istenen hedefe ulaşma oranı en yüksek olanlardan (desirability; 1.000) uygun bir tanesi seçilerek (bkz. Çizelge Ek 9), çözümde verilen işletme koşullarında (bağımsız değişken değerleri), paralel olarak bir deney gerçekleştirilmiştir. Söz konusu deney; optimum olarak belirtilen koşullarda, 100 mL'lik çalışma hacminde, 300 mL'lik erlenlerde ve sabit çalkalama hızındaki (100 vuru/dak) bir su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon deneyi sırasında, yaklaşık 24 saatte bir fermantasyon ortamlarından 5 mL'lik örnekler alınarak, kültür ortamlarındaki  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimleri ölçülmüştür. Daha sonra, elde edilen verilerden hesaplanan değerlerin zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler çizilmiş (Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA) ve istenen yanıtların optimum koşullarda elde edilen deneysel değerleri belirlenmiştir. Çalışmanın optimizasyon aşamasında daha sonra, elde edilen bu deneysel değerler, programdaki ileri analiz (post analysis) sekmesinin içerisinde bulunan tabloya girilmiştir. Programdaki doğrulama (confirmation) menüsünün yardımıyla, elde edilen deneysel değerlerin, programın hesaplamış olduğu %95 güvenilirlik aralığındaki; maksimum ve minimum değerler arasında olup olmadığı belirlenmiştir. Bu aşamada, nümerik optimizasyon sekmesi kullanılarak, her bir yanıt için, istenen hedefe ulaşma oranı grafikleri de elde edilmiştir.

### **3.2.13. Çeşitli Doğal Substrat Kaynaklarının *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Tez çalışmasının bu aşamasında, çeşitli doğal substrat kaynaklarının fermantasyon ortamında veya fermantasyon ortamı olarak kullanılmalılarının, incelenen *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun,  $\beta$ -karoten üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu deneylerde, gıda endüstrisi artıklarından olan; şeker pancarı küspesi ve üzüm posasından hazırlanan özütler ile kestane kabuklarından elde edilmiş olan hidrolizat; armut ve elma posaları ile yer elmasından hazırlanan özütler ve üzüm suyu, tarımsal

artık olarak ise; fındık kabuklarından elde edilen hidrolizat kullanılmıştır. Çalışmada, her bir doğal substrat kaynağı yapısına uygun olarak bazı ön işlemlerden geçirilerek fermantasyon ortamları hazırlanmıştır. Araştırmanın bu aşamasında deneyler, optimizasyon çalışması sonucunda elde edilen; optimum fermantasyon koşullarında (pH 3.82; 27.4°C) gerçekleştirilmiştir. Kesikli sistemde gerçekleştirilen fermantasyon çalışmaları, sıcaklığın ve çalkama hızının kontrol edilebildiği su banyolarında, 250 mL'lik erlenlerde 100 mL çalışma hacminde, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında sürdürülmüştür. Deneylerde, fermantasyon ortamlarından, yaklaşık 24 saatte bir örnekler alınarak;  $\beta$ -karoten, biyokütle ve şeker derişimleri ölçülmüş ve bunların zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. Çalışmada, doğal substratların kullanıldığı deneylerde biyokütle derişimi; kuru ağırlık üzerinden tayin edilerek (bkz Bölüm 3.2.3) hesaplanmıştır. Elde edilen verilerinden yararlanılarak çizilen grafiklerden, incelenen her bir doğal substrat kaynağı için, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi, mikroorganizma özgül üreme, ürün oluşum ve özgül ürün oluşum hızları belirlenmiştir.

### **3.2.13.1. Şeker Pancarı Küspesi Özütünün Hazırlanması**

Deneylerde kullanılan şeker pancarı küspesi özütünün (ŞPKÖ) hazırlanmasında, Israilides ve ark. (1998) tarafından kullanılan yöntem çalışmamıza uyarlanarak kullanılmıştır. Özütün hazırlanmasında; şeker pancarı küspesine, küspe:saf su oranı; 3:1 (w/v) olacak şekilde 70°C'ye ısıtılmış olan saf su ilave edilerek karıştırılmış, 30 dk bekletilmiş ve ardından bir blender (Isolab, Türkiye) yardımıyla parçalama işlemi yapılmıştır. Daha sonra küspe, temiz bir tülbent yardımıyla sıkılarak süzölmüş, elde edilen süzöntü, 4100 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı tekrar tülbent yardımıyla süzölerek, özüt elde edilmiştir.

Hazırlanan şeker pancarı küspesi özütünden, deneylerde kullanılmak üzere iki farklı fermantasyon ortamı hazırlanmıştır. İlk ortam, özüt içerisine herhangi bir başka bileşen ekmeden hazırlanırken; ikinci ortam ise; özüte ana fermantasyon ortamında (bkz. Bölüm 3.1.2) kullanılan fruktoz dışındaki diğer besiyeri bileşenleri eklenerek hazırlanmıştır. Açıklandığı şekilde hazırlanan her iki ortam da; otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve başlangıç pH'ları 3.82'e ayarlanmıştır. Şeker pancarı küspesi

özütünün kullanıldığı bu deneylerde, fermantasyon ortamlarının toplam şeker derişimlerinin saptanmasında; fenol sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır (EK 5).

### **3.2.13.2. Üzüm Posası Özütünün Hazırlanması**

Bu çalışmada kullanılan beyaz üzüm posası, Chardonnay cinsine ait üzümlerin beyaz şaraba işlenmeleri sırasında çıkan bir artıktır. Deneylerde kullanılacak olan beyaz üzüm posası özütünün (ÜPÖ) hazırlanmasında, daha önce ŞPKÖ'nün hazırlanmasında izlenen yöntemden yararlanılmıştır (Israilides ve ark., 1998). Özütün hazırlanmasında, üzüm posası:saf su oranı 2:1 (w/v) olacak şekilde çalışılmıştır. Bileşenli ve bileşensiz olarak iki şekilde hazırlanan ÜPÖ, otoklav sterilizasyonundan sonra, başlangıç pH değerleri, 3.82 olacak şekilde ayarlanmıştır. ÜPÖ fermantasyon ortamlarındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin belirlenmesinde; D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kitinden (Megazyme-İrlanda) yararlanılmıştır (bkz. Bölüm 3.2.4).

### **3.2.13.3. Fındık ve Kestane Kabuğu Hidrolizatlarının Hazırlanması**

Bu tez çalışmasında kullanılan fındık (FKH) ve kestane (KKH) kabuğu hidrolizatları, Bolu, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden, hazırlanmış olarak temin edilmişlerdir. Bu hidrolizatların hazırlanışları Ek 7'de verilmiştir.

FKH ve KKH, iki farklı şekilde hazırlanarak, deneylerde fermantasyon ortamları olarak kullanılmışlardır. Birincisinde; hidrolizatlara başka bir bileşen ilave edilmezken; ikinci ortamın hazırlanmasında ise, hidrolizatlara ana fermantasyon ortamındaki (bkz. Bölüm 3.1.2) fruktoz dışında yer alan diğer bileşenler eklenmişlerdir. Hazırlanan tüm ortamlar otoklavda, 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra, başlangıç pH değerleri 3.82'ye ayarlanmış ve fermantasyon deneylerinde kullanılmışlardır. FKH ve KKH hidrolizatlarının ksiloz derişimlerinin tayinlerinde; D-ksiloz enzimatik test kiti (Megazyme-İrlanda) kullanılırken, glukoz derişimlerinin analizinde ise; D-glukoz (Megazyme-İrlanda) enzimatik test kitinden yararlanılmıştır. Ayrıca fındık kabuğu hidrolizatında, EK 6'da verilen; dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile indirgen şeker derişimi de tayin edilmiştir.

#### **3.2.13.4. Armut ve Elma Posası Özütlerinin Hazırlanmaları**

Bu tez çalışmasında, Ankara piyasasından sağlanan Deveci çeşidi armutlar ile Fuji çeşidi elmaların posalarından hazırlanan armut (APÖ) ve elma posası özütleri de (EPÖ), fermantasyon ortamları olarak kullanılmışlardır. Özütlerin hazırlanmasında literatürdeki bazı yöntemlerden yararlanılmıştır (Tinoi, Rakariyatham ve Deming, 2005; Korumilli ve Mishra, 2014). Aynı ayrı her iki özütün hazırlanmasında ilk olarak, yıkanan meyveler kesilip sap ve çekirdek kısımları ayrılmış ve daha sonra, laboratuvarımızda bulunan bir katı meyve sıkacağından (Bosch-Vitajoice2 MES25A0, Çin Halk Cumhuriyeti) geçirilerek, elde edilen meyve suyu ayrılmış ve meyvelerin posaları elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu posalar, yaklaşık 90°C'ye ısıtılmış saf su ile, 2:1 (w/v) oranında olacak şekilde karıştırılarak, 30 dk bekletilmişlerdir. Ardından posalar temiz bir tülbentle süzöldükten sonra elde edilen süzüntüye, 4100 rpm'de 15 dk bir santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Deneylerde armut ve elma posası özütleri, doğrudan ve içerisine ana fermantasyon ortamında yer alan fruktoz dışındaki diğer bileşenler eklenerek hazırlanmış ve kullanılmışlardır. Hazırlanan bu fermantasyon ortamları otoklavda, 121°C'de 15 dakika tutularak sterilize edilmişler ve başlangıç pH değerleri 3.82'ye ayarlanmıştır. Armut ve elma posalarından hazırlanan özütlerin glukoz ve fruktoz derişimlerinin belirlenmesinde; D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kitinden (Megazyme-İrlanda) yararlanılmıştır. Elma posası özütünün indirgen şeker derişimi tayini ise; DNS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (EK 6).

#### **3.2.13.5. Üzüm Suyunun Hazırlanması**

Bu araştırmada kullanılan üzüm suyunun (ÜS) hazırlanmasında, Ankara piyasasından sağlanan İzmir çeşidi üzümler kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak, yıkanan üzümlerin taneleri saplarından ayrılarak ayıklanmışlar ve taneler, laboratuvarımızda bulunan bir katı meyve sıkacağından geçirilmişlerdir. Elde edilen üzüm suyu, daha sonra 4100 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Deneylerde üzüm suyu, doğrudan ve içerisine ana fermantasyon ortamında yer alan fruktoz dışındaki diğer bileşenler eklenmiş şekilde iki ayrı fermantasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlar otoklavda, 115°C'de 10 dakika sterilize edildikten sonra başlangıç pH değerleri, daha önce tespit edilmiş olan; optimum değere ayarlanmıştır. Üzüm suyu kullanılan fermantasyon

ortamlarındaki glukoz ve fruktoz derişimleri; D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kitinden (Megazyme-İrlanda) yararlanılarak tespit edilmiştir.

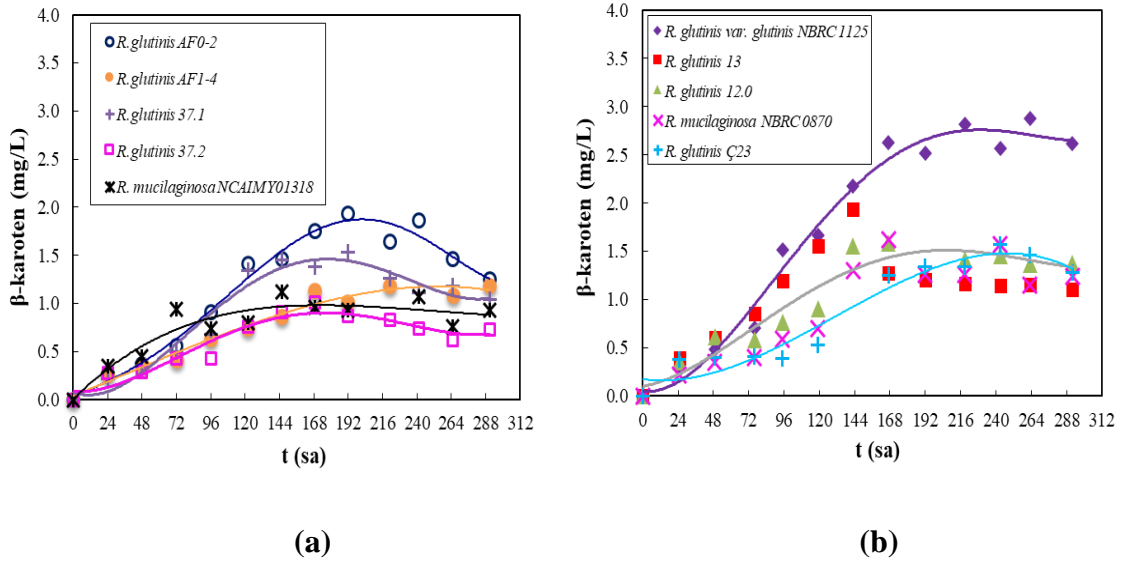
### **3.2.13.6. Yer Elması Hidrolizatının Hazırlanması**

Deneylerde kullanılan yer elması örnekleri Ankara piyasasından sağlanmıştır. Yer elması hidrolizatının (YEH) hazırlanmasında, literatürden alınan bir yöntem, modifiye edilerek kullanılmıştır (Chekroun ve ark., 1996; Karasu-Yalçın, 2007). Çalışmada ilk olarak yer elmaları soyularak rendelendikten sonra, 1:2 (w/v) oranında olacak şekilde saf su eklenerek etüvde 90°C'de, zaman zaman karıştırılarak 1 saat bekletilmişlerdir. Daha sonra bu karışım, bir tülbent yardımıyla süzölmüştür. Elde edilen yer elması özütünün içerisine, 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mL/100 mL) eklendikten sonra tekrar aynı sıcaklıktaki etüvde, 1 saat tutularak hidrolizat elde edilmiştir. Hazırlanan YEH ortamı bileşensiz olarak ve içerisine ana fermantasyon ortamındaki karbon kaynağı dışındaki diğer bileşenlerin eklenmesi ile hazırlanarak, otoklavda, 115°C'de 10 dakika tutularak sterilize edilmişlerdir. Daha sonra, fermantasyon ortamlarının başlangıç pH'ları; 3.82'ye ayarlanmıştır. Yer elması hidrolizatı ile çalışılan deneylerde, fermantasyon ortamlarının indirgen şeker derişimleri; DNS yönteminden yararlanılarak tayin edilmişlerdir (EK 6).

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. $\beta$ -karoten Üretiminde Kullanılacak Olan Maya Suşunun Seçilmesi Deneylerine İlişkin Sonuçlar

Bu tez çalışmasında,  $\beta$ -karoten üretiminde kullanılacak olan maya suşunun seçilebilmesi amacıyla; uygun koşullarda aktifleştirilen *Rhodotorula* cinsine ait toplam 10 suş (bkz. Çizelge 3.1), bileşimi daha önce verilmiş olan fermantasyon ortamı ve koşullarında (bkz. Bölüm 3) ayrı ayrı geliştirilerek,  $\beta$ -karoten üretimleri açısından incelenmişlerdir. Araştırılan suşlar içerisinde  $\beta$ -karoten üretimi yüksek olan bir suşun saptanabilmesi amacıyla yapılan deneylerde, maya suşları tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin fermantasyon süresince değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.1’de verilmiştir. Bu suşlara ait başlangıç inokülasyon derişimleri ile ana fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ise; Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.



Şekil 4.1. *Rhodotorula* cinsine ait çeşitli maya suşları ile yapılan çalışmalarda  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Söz konusu grafikler incelendiğinde,  $\beta$ -karoten üretimleri araştırılan 10 suş arasında,  $\beta$ -karoten üretimi en yüksek olan suşun; *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu olduğu belirlenmiştir. Bu suş tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 2.88 mg/L olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.b). *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -

karoten üretiminin 168. saate kadar hızla arttığı, 168. saatten sonra ise çok fazla değişmediği ve en yüksek  $\beta$ -karoten üretimine (2.88 mg/L) ise; 263. saatte ulaşıldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Yüksek  $\beta$ -karoten üretimine sahip suşun seçimi amacıyla yapılan deneyde incelenen maya suşlarının başlangıç inokülasyon derişimleri ve fermantasyon sırasında belirlenen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri

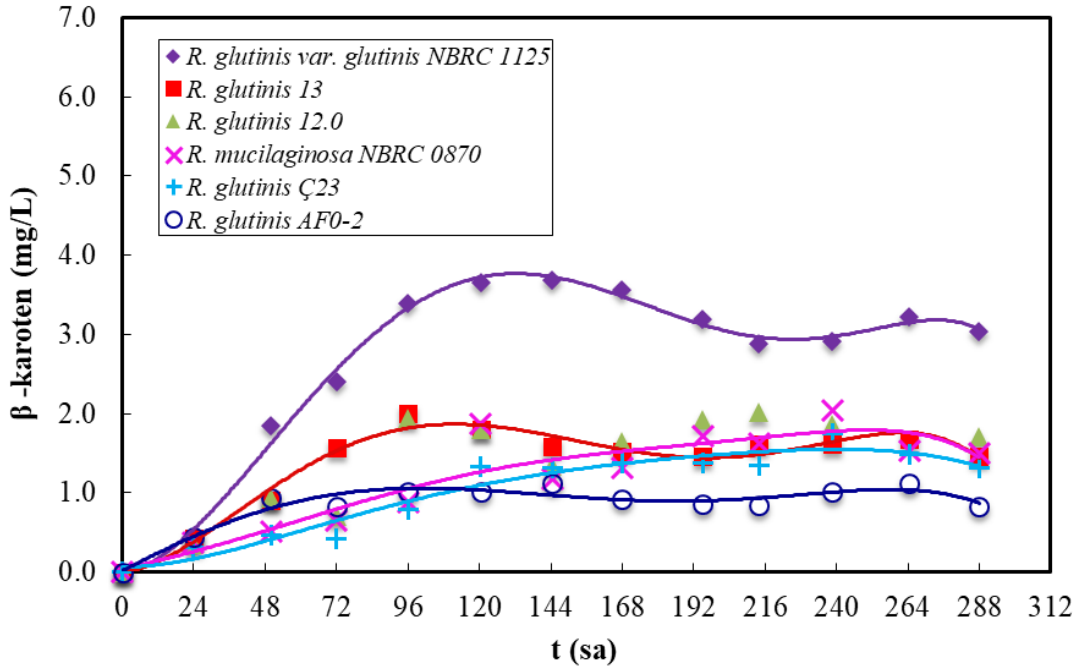
Suş	Başlangıç inokülasyon derişimi (kob/mL)	En yüksek $\beta$ -karoten derişimi (mg/L)
<i>R. glutinis</i> AF0-2	$6.3 \times 10^7$	1.93
<i>R. glutinis</i> AF1-4	$7.3 \times 10^7$	1.19
<i>R. glutinis</i> 37.1	$6.0 \times 10^7$	1.54
<i>R. glutinis</i> 37.2	$5.3 \times 10^7$	1.01
<i>R. glutinis</i> 13	$9.2 \times 10^7$	1.94
<i>R. glutinis</i> 12.0	$9.2 \times 10^7$	1.59
<i>R. glutinis</i> Ç23	$6.3 \times 10^6$	1.57
<i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125	$1.7 \times 10^7$	2.88
<i>R. mucilaginosa</i> NBRC 0870	$1.4 \times 10^8$	1.62
<i>R. mucilaginosa</i> NCAIM Y 01318	$1.0 \times 10^8$	1.12

Bu deneylerde, *R. glutinis* 13 ve *R. glutinis* AF0-2 suşlarının da diğerleri ile karşılaştırıldıklarında nispeten daha yüksek miktarda  $\beta$ -karoten üretebildikleri belirlenmiş ve bu suşların en yüksek  $\beta$ -karoten üretimleri sırasıyla; 1.94 ve 1.93 mg/L olarak, fermantasyonun 143. ve 192. saatlerinde tespit edilmiştir. *R. glutinis* 13 suşunun  $\beta$ -karoten üretiminin; en yüksek olarak tespit edildiği 143. saatten sonra, azalarak nispeten sabitlendiği belirlenmiştir. *R. glutinis* AF0-2 suşunda ise  $\beta$ -karoten üretiminin, fermantasyonun 243. saatinden sonra giderek azaldığı tespit edilmiştir.



Bu çalışmada denenen diğer iki suş olan; *R. mucilaginosa* NBRC 0870 ve *R. glutinis* 12.0 suşlarının en yüksek  $\beta$ -karoten üretimleri 167. saatte sırasıyla; 1.62 ve 1.59 mg/L olarak belirlenmiştir. *R. glutinis* Ç23 suşu ile elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ise 240. saatte; 1.57 mg/L olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan diğer suşlar olan; *R. glutinis* 37.1, *R. glutinis* 37.2, *R. glutinis* AF1-4 ve *R. mucilaginosa* NCAIM Y01318'in denenen diğer suşlara göre nispeten daha az  $\beta$ -karoten üretebildikleri belirlenmiştir. Söz konusu suşlar ile elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ise sırasıyla; 1.54, 1.01, 1.19 ve 1.12 mg/L olarak saptanmıştır.

Tez çalışmasının bu bölümünde sonraki aşamada,  $\beta$ -karoten üretimi en yüksek bulunan suş olan *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 ile, birbirlerine nispeten yakın değerlerde sonuçlar veren 5 suşun (*R. glutinis* 13, *R. glutinis* 12.0, *R. mucilaginosa* NBRC 0870, *R. glutinis* Ç23, *R. glutinis* AF0-2)  $\beta$ -karoten üretimleri açısından aynı deney seti içerisinde bir kez daha değerlendirilmelerine karar verilmiştir. Bu denemeye ait, incelenen suşların  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.2'de, suşların başlangıç inokülasyon derişimleri ve fermantasyon süresince elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ise; Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Seçilen bazı maya suşları ile yapılan çalışmalarda,  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Çizelge 4.2.  $\beta$ -karoten üretimi yüksek suşlar ile gerçekleştirilen deneylerde kullanılan suşların başlangıç inokülasyon derişimleri ve bu suşlar ile elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri

Suş	Başlangıç inokülasyon derişimi (kob/mL)	En yüksek $\beta$ -karoten derişimi (mg/L)
<i>R. glutinis</i> 13	$9.6 \times 10^7$	2.00
<i>R. glutinis</i> 12.0	$4.4 \times 10^7$	2.01
<i>R. glutinis</i> Ç23	$3.7 \times 10^6$	1.74
<i>R. glutinis</i> AF0-2	$5.6 \times 10^7$	1.11
<i>R. mucilaginosa</i> NBRC 0870	$4.1 \times 10^7$	2.04
<i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125	$1.2 \times 10^7$	3.68

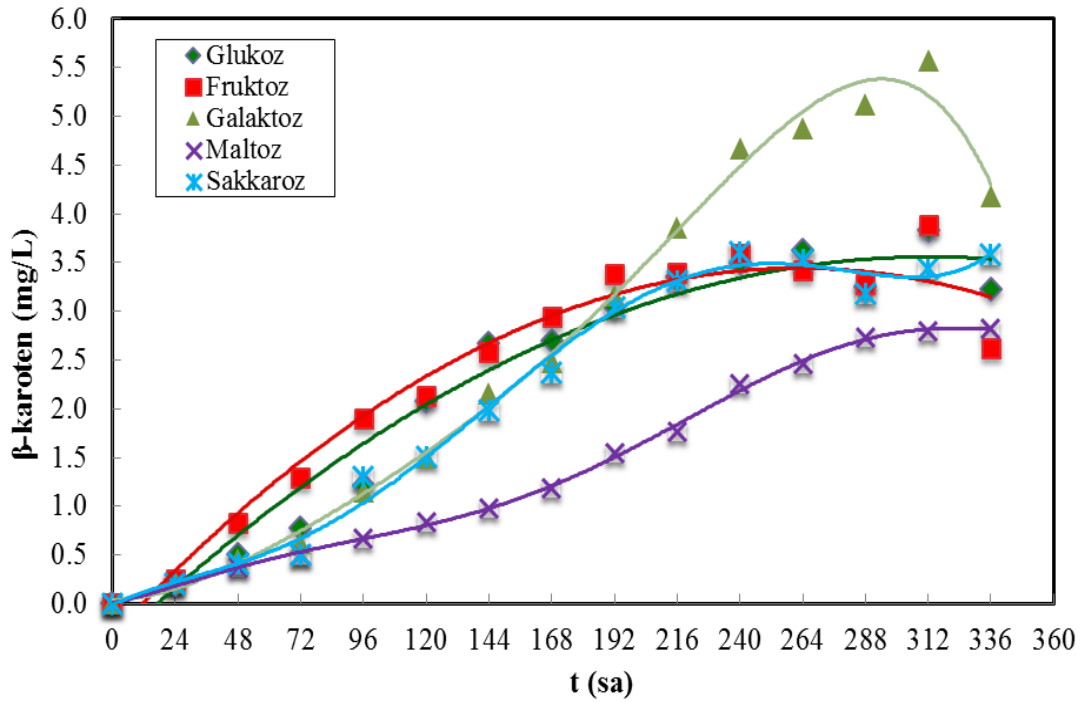
Yapılan bu denemenin sonucunda da; en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi (3.68 mg/L) *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile çalışıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.2). Bu suşun  $\beta$ -karoten üretiminin fermantasyonun 144. saatine kadar arttığı daha sonra ise çok fazla değişmediği belirlenmiştir. *R. mucilaginosa* NBRC 0870, *R. glutinis* 12.0 ve *R. glutinis* 13 suşlarının en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ise; sırasıyla 2.04 mg/L, 2.01 mg/L ve 2.00 mg/L olarak tespit edilmiştir. *R. glutinis* Ç23 suşu için ise bu değer; 1.74 mg/L  $\beta$ -karoten olarak tayin edilmiştir.

Yapılan bu deneyde fermantasyon süresince en düşük  $\beta$ -karoten üretimi, AF0-2 suşu ile elde edilmiştir. AF0-2 suşu ile en yüksek  $\beta$ -karoten üretimine (1.11 mg/L) fermantasyonun 144. saatinde ulaşıldığı ve daha sonra ise, suşun  $\beta$ -karoten üretiminin çok fazla değişmediği belirlenmiştir. Araştırmanın bu aşamasında yapılan deneylerde, en yüksek  $\beta$ -karoten üretiminin, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile çalışıldığında elde edildiği belirlenmiş ve tez çalışmasının ilerleyen deneylerinin, bu suş ile yürütülmesine karar verilmiştir.

#### 4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşunun $\beta$ -karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar

Fermantasyon ortamında kullanılacak olan en uygun karbon kaynağının belirlenmesi amacıyla, farklı karbonhidrat kaynaklarının *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde; fermantasyon ortamlarında substrat olarak glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz ve sakkaroz olmak üzere beş farklı karbonhidrat kullanılmıştır. Bu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun başlangıç aşılama derişimi;  $2.0 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir.

Farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değışimleri, Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.3'deki sonuçlar incelendiğinde; farklı karbonhidratlar içeren fermantasyon ortamlarında, fermantasyon süresince en düşük  $\beta$ -karoten üretiminin; substrat olarak maltoz içeren ortamda elde edildiği tespit edilmiştir. Söz konusu fermantasyon

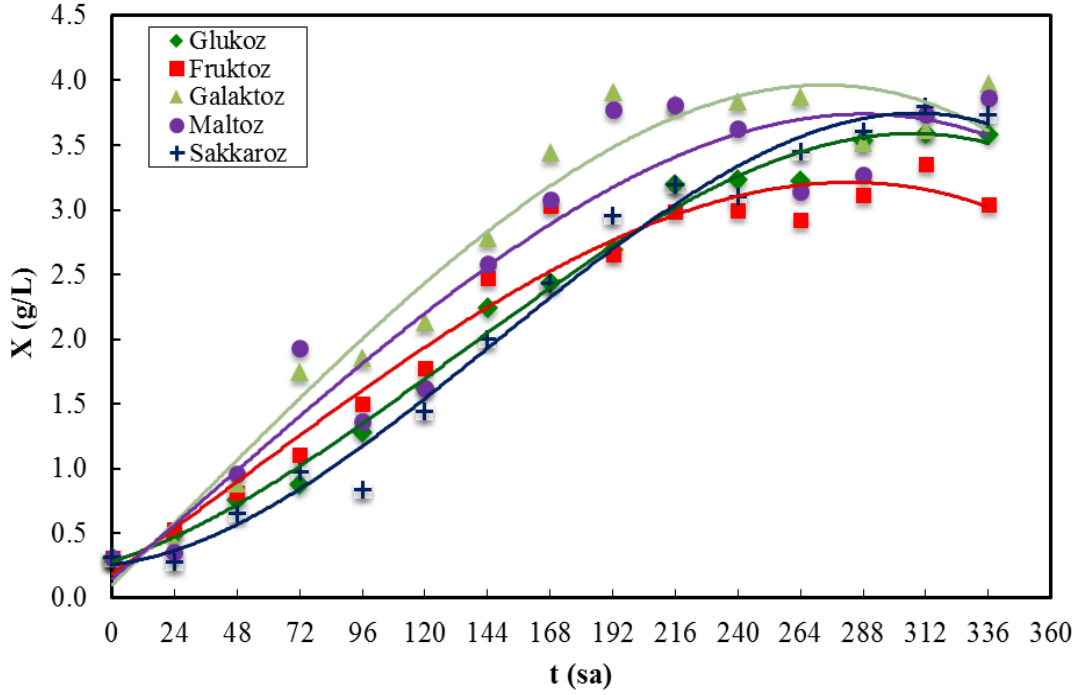
ortamında; *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 336. saatte, 2.82 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Substrat olarak glukoz içeren fermantasyon ortamındaki  $\beta$ -karoten üretiminin zamanla değişimi incelendiğinde;  $\beta$ -karoten üretiminin zamanla arttığı ve en yüksek derişimine (3.83 mg/L), 312. saatte ulaştığı belirlenmiştir.

Fruktoz içeren ortamda ise;  $\beta$ -karoten üretiminin 192. saate kadar hızla arttığı, daha sonra ise çok fazla değişmediği saptanmıştır. Bu ortamda elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi 312. saatte 3.88 mg/L olarak tayin edilmiştir. Substrat olarak galaktoz veya sakkaroz içeren fermantasyon ortamlarındaki  $\beta$ -karoten üretimlerinin ise; 192. saate kadar benzer bir eğilimde devam ettiği, bu saatten sonra ise galaktoz içeren ortamdaki üretimin artmaya devam ederken, sakkaroz içeren ortamda ise  $\beta$ -karoten derişiminin çok fazla değişmediği tespit edilmiştir. Bu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 5.57 mg/L olarak, bileşiminde galaktoz bulunan fermantasyon ortamında, 312. saatte elde edilmiştir. Sakkarozun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ise; 3.60 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.4'de verilmiştir. Bu çalışmada denenen tüm substrat türleri için biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerinin, birbirlerine benzer bir eğilim gösterdikleri bulunmuştur.

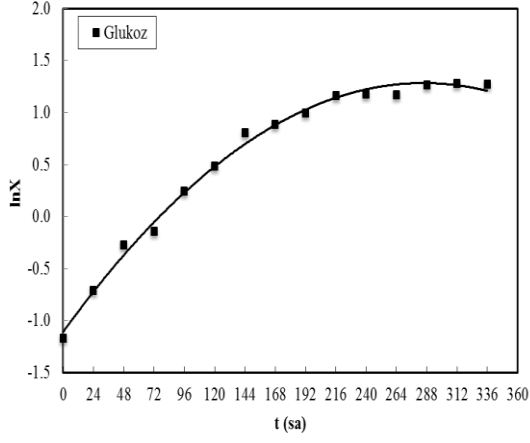
Galaktoz ve maltozun substrat olarak kullanıldığı ortamlarda, biyokütle derişimlerindeki artışın, 192. saate kadar devam ettiği, daha sonra ise çok fazla değişmediği belirlenmiştir. Biyokütle derişimindeki artışın; fruktozun kullanıldığı ortamda 216., glukozun bulunduğu ortamda 288. ve sakkarozun bulunduğu ortamda ise 264. saate kadar devam ettiği daha sonra ise, çok fazla değişmediği saptanmıştır. Substrat olarak galaktoz, maltoz, sakkaroz, glukoz ve fruktozun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri sırasıyla; 3.98, 3.87, 3.80, 3.60 ve 3.35 g/L olarak belirlenmiştir.



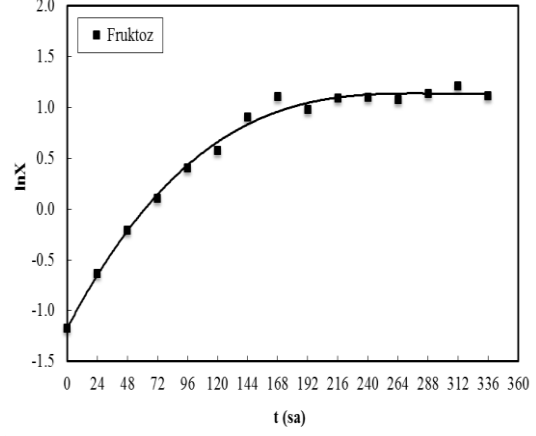
Şekil 4.4. Farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Tez çalışmasının bu aşamasında ayrıca, farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen kuru hücre ağırlıklarından yararlanılarak  $\ln X$  değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra, hesaplanan  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuş ve bu grafiklerden yararlanılarak, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun farklı substratlar içeren fermantasyon ortamlarındaki özgül üreme hızları,  $\mu$  ( $\text{sa}^{-1}$ ), bulunmuştur (Şekil 4.5 a-e).

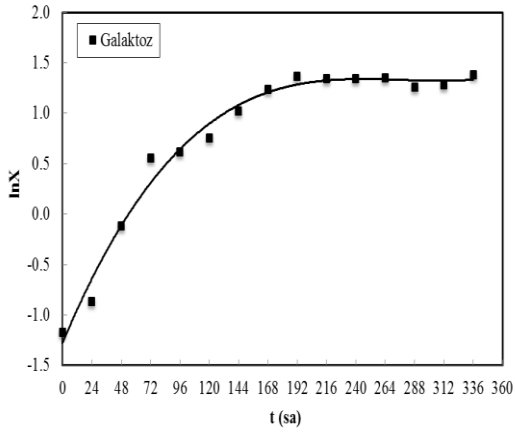
Her deney için maya suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı,  $\mu$  ( $\text{sa}^{-1}$ ), Bölüm 2.1'de verilen Eşitlik 2.1'in yardımıyla,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ); substrat olarak glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz ve sakkaroz içeren fermantasyon ortamları için sırasıyla; 0.013, 0.016, 0.009, 0.013 ve 0.015  $\text{sa}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Bu değerler dikkate alındığında görülebileceği gibi; en yüksek maya özgül üreme hızı, fermantasyon ortamında substrat olarak fruktoz kullanıldığında elde edilmiştir.



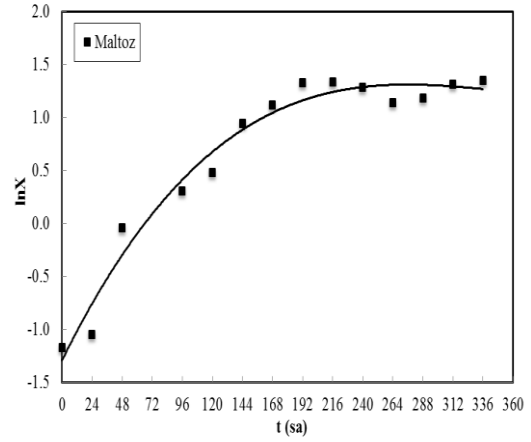
(a)



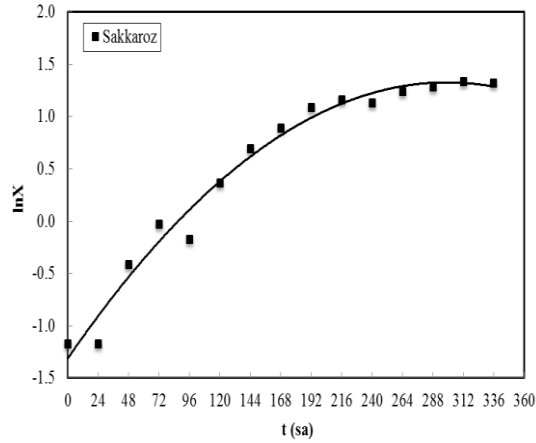
(b)



(c)



(d)



(e)

Şekil 4.5. *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun farklı karbonhidratlar içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin  $\ln$  değerlerinin zamanla değişimleri. (a): Glukoz, (b): Fruktoz, (c): Galaktoz, (d): Maltoz, (e): Sakkaroz

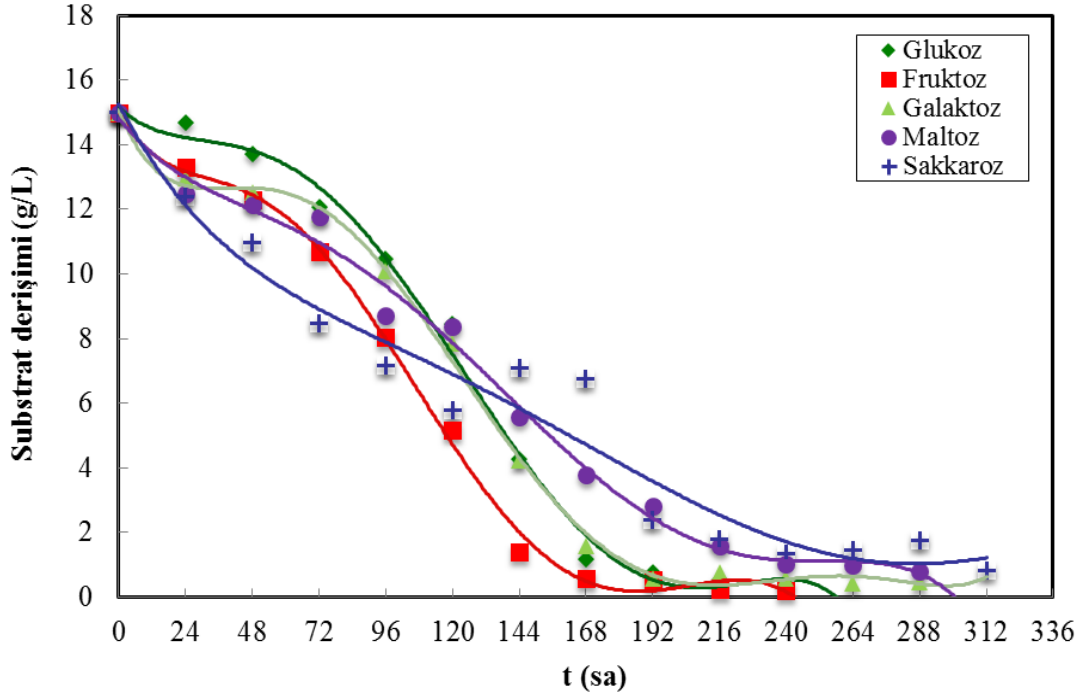
Bu çalışmada, fermantasyon ortamlarında fruktoz, sakkaroz, glukoz, maltoz ve galaktozun substrat olarak kullanıldığı deneylerde, çalışılan suşa ait en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) sırasıyla; 0.0460, 0.0216, 0.0204, 0.0149 ve 0.0114 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplanması, daha önce Bölüm 2.1’de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre denenen substratlar içerisinde en yüksek özgül  $\beta$ -karoten oluşum hızının, fruktozun substrat olarak kullanıldığı ortamda elde edildiği saptanmıştır. En yüksek özgül ürün oluşum hızları; fruktoz ve maltoz için 24. saatte, sakkaroz için 72. saatte, glukoz ve galaktoz için ise; 96. saatte belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından  $\beta$ -karoten üretim hızı açısından da, fruktozun en uygun substrat olduğunu doğrular nitelikte bulunmuştur.

Bu çalışmada, denenen tüm substratlar dikkate alındığında, fermantasyonun 192. saatine kadar, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin ve ürün oluşum hızının, bileşiminde fruktoz bulunan fermantasyon ortamında elde edildiği belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.3). Fermantasyon ortamında substrat olarak; galaktoz içeren ortamda, 192. saatten sonra  $\beta$ -karoten üretiminde bir artış görülmekle birlikte, bu artışın geç başlaması ve bu saate kadar olan üretim hızının da diğer substratlara göre daha yavaş olması, bir dezavantaj olarak düşünülmüştür.

Fermantasyon ortamında substrat olarak kullanılacak olan karbonhidrat kaynağının seçiminde, bu araştırma kapsamında incelenen tüm karbonhidratların birim fiyatları üzerinden de bir karşılaştırma yapılmıştır. Örneğin; deneylerde çalışılan suş için en yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin elde edildiği galaktoz ve fruktozun birim satış fiyatlarının sırasıyla; 4963 ve 735 TL/kg olduğu belirlenmiştir. Buna göre, galaktozun hammadde olarak maliyeti fruktozun maliyetinin yaklaşık olarak 5 katıdır. Hammadde birim fiyatının daha düşük olması ve yukarıda kinetik analiz sonuçlarında da açıklandığı gibi fruktozun bu çalışmada incelenen tüm substratlar içerisinde en iyi sonuçları vermesi, daha sonraki çalışmalar için temel substrat olarak seçilmesinde önemli bir tercih nedeni olmuştur.

Araştırmanın bu bölümünde ayrıca, fermantasyon boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde, fermantasyon ortamında kalan substrat derişimleri de belirlenmiştir.

Bu deneyler için, ortamda kalan substrat derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Fermantasyon ortamındaki substrat derişimlerinin belirlenmesinde, daha önce Bölüm 3.2.4'de açıklanan yöntemlerden yararlanılmıştır.



Şekil 4.6. Farklı karbonhidratların kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.6 incelendiğinde; ortamdaki fruktoz ve glukozun yaklaşık olarak; fermantasyonun 240. saatinde, galaktoz ve maltozun fermantasyonun 288. saatinde ve sakkarozun ise; fermantasyonun 312. saatinde tamamen tüketildikleri görülmektedir. Fermantasyonun ilk 4 günü dikkate alındığında en hızlı tüketilen substratın sakkaroz olduğu, 4. günden sonra ise fruktoz tüketiminin diğer substratlar ile karşılaştırıldığında oldukça hızlı olduğu belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan maya suşu için en uygun substrat kaynağının fruktoz olarak belirlenmesinden sonra, çalışmanın bundan sonra gerçekleştirilecek olan deneylerinde, fermantasyon ortamlarında substrat olarak fruktoz kullanılmıştır.

Literatürde, *Rhodotorula* cinsine ait maya türlerinin karotenoid üretimine fermantasyon ortamındaki farklı karbonhidrat kaynaklarının etkisi ile ilgili olarak yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Aksan, 2005; Latha ve ark., 2005; Selim ve ark., 2013;



Alakraa, 2014). *R. glutinis* DFR-PDY suşunun farklı karbon kaynakları içeren fermantasyon ortamlarında karotenoid üretimi üzerine Latha ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, en yüksek karotenoid üretimlerinin sırasıyla; fruktoz, glukoz, galaktoz, ksiloz monosakkaritleri ve sakkaroz ile maltoz disakkaritlerini içeren ortamlarda belirlendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada incelenen suşa ait en yüksek biyokütle derişimlerinin ilk olarak galaktoz daha sonra ise sırasıyla; sakkaroz, glukoz, fruktoz, ksiloz ve maltoz içeren fermantasyon ortamlarında elde edildiği rapor edilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında farklı karbon kaynakları içeren fermantasyon ortamlarında, çalışılan suş ile elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri açısından en iyi karbon kaynakları sırasıyla; galaktoz, fruktoz, glukoz, sakkaroz ve maltoz olarak belirlenmiştir. İncelenen bu suş ile elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri ise sırasıyla; galaktoz, maltoz, sakkaroz, glukoz ve fruktoz içeren fermantasyon ortamlarında tespit edilmiştir. *R. glutinis* DFR-PDY suşu ile gerçekleştirilen söz konusu çalışma ve yaptığımız tez çalışmasında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, en yüksek karotenoid üretimleri açısından; galaktoz ve en yüksek biyokütle derişimleri açısından ise; maltoz içeren ortamların dışında, sonuç sıralamalarının paralellik gösterdiği söylenebilir.

Benzer konuda yapılan bir başka çalışmada, fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak glukoz, ksiloz, etanol, gliserol ve D-mannitol'ün kullanıldığı ve glukozun; *R. mucilaginosa* 16 mutant suşuyla karotenoid üretiminde (4.59 mg/L) en iyi karbon kaynağı olarak belirlendiği bildirilmiştir (Aksan, 2005). *Rhodospodium toruloides* Y27012 suşunun karotenoid üretimine glukoz, ksiloz ve gliserolün etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada da, en yüksek karotenoid üretimlerinin sırasıyla bileşimlerinde; ksiloz (32.96 mg/L), glukoz (31.24 mg/L) ve gliserol (12.76 mg/L) bulunan fermantasyon ortamlarında elde edildiği rapor edilmiştir (Alakraa, 2014).

*Rhodotorula* cinsine ait bazı maya suşlarının karotenoid üretimleri üzerine, bazı şekerlerin ve tarım endüstrisi ürünlerinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada; öncelikle glukoz başlangıç derişimi 25 g/L olan bir ortamda, suşların karotenoid üretimlerinin karşılaştırıldığı ve en yüksek karotenoid üretiminin (2.33 mg/L) bir *Rhodotorula glutinis* suşu ile elde edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada daha sonra, seçilen *R. glutinis* suşunun, glukozun yerine sakkaroz, laktoz, maltoz ve fruktoz ilave edilen farklı

ortamlarda, çalkalamalı bir su banyosunda 30°C’de 6 gün boyunca inkübe edildiği ve karotenoid üretimlerinin incelendiği belirtilmiştir (Selim ve ark., 2013). Bu ortamlarda elde edilen en yüksek karotenoid derişimleri incelendiğinde; en yüksek değerin 2.17 mg/L olarak fruktoz bulunan ortamda tespit edildiği ve bu değeri 1.70, 0.73 ve 0.49 mg/L ile sırasıyla; maltoz, sakkaroz ve laktoz bulunan ortamların takip ettiği rapor edilmiştir.

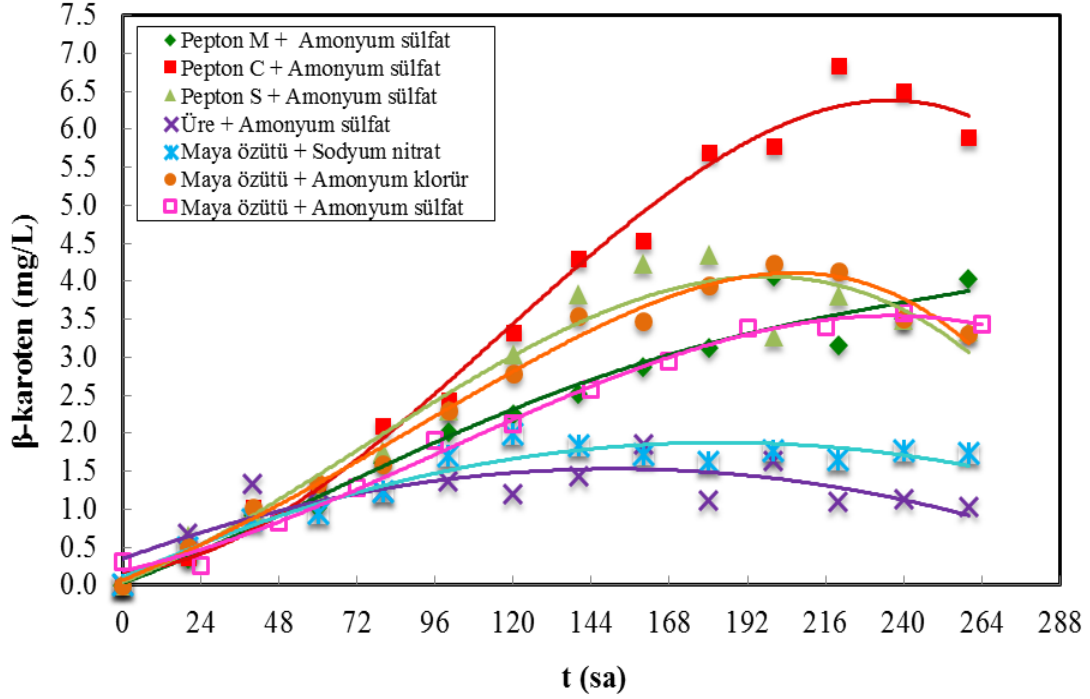
Ayrıca bahsedilen bu ortamlarda çalışılan suş ile elde edilen en yüksek biyokütle derişiminin de (11.96 g/L), karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı ortamda belirlendiği ifade edilmiştir. Fruktoz, maltoz, sakkaroz ve laktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlarda ise, en yüksek biyokütle derişimlerinin sırasıyla; 11.71, 10.06, 5.80 ve 3.37 g/L olarak belirlendiği bildirilmiştir. Bu araştırmada laktoz haricinde ortamlardaki tüm substratların fermantasyonun 144. saatinde neredeyse tamamen tüketildiği de rapor edilmiştir. Literatürdeki bu çalışma ile gerçekleştirdiğimiz tez çalışması sonuçları karşılaştırıldığında, tez çalışmasında farklı substrat içeren tüm fermantasyon ortamlarında çalışılan suş ile daha az substrat tüketimine rağmen daha yüksek β-karoten derişimlerine ulaşıldığı bulgulanmıştır.

#### **4.3. Farklı Azot Kaynaklarının *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşunun β-karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar**

Farklı azot kaynağı kombinasyonlarının, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun β-karoten üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı deneylerde, organik ve inorganik olmak üzere toplam sekiz çeşit azot kaynağı kullanılmıştır. Tez çalışmasının bu bölümünde kullanılan organik ve inorganik azot kaynakları ile azot içerikleri daha önce Bölüm 3.2.9, Çizelge 3.2’de verilmiştir. Bu deneyler için fermantasyon ortamlarının hazırlanışları Bölüm 3.2.9’da anlatılmış, bu ortamlarda denenen azot kaynağı kombinasyonları ve ortamdaki başlangıç derişimleri ise, Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Bu deneylerde *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun başlangıç aşılama derişimi;  $1.3 \times 10^7$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon ortamında farklı azot kaynağı kombinasyonlarının kullanıldığı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten derişimlerinin zamanla değışimleri, Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Deneylerde, en yüksek β-karoten derişimi (6.84 mg/L) fermantasyon

ortamında kazein kaynaklı pepton ile  $(NH_4)_2SO_4$  birlikte kullanıldığında, 220. saatte elde edilmiştir.



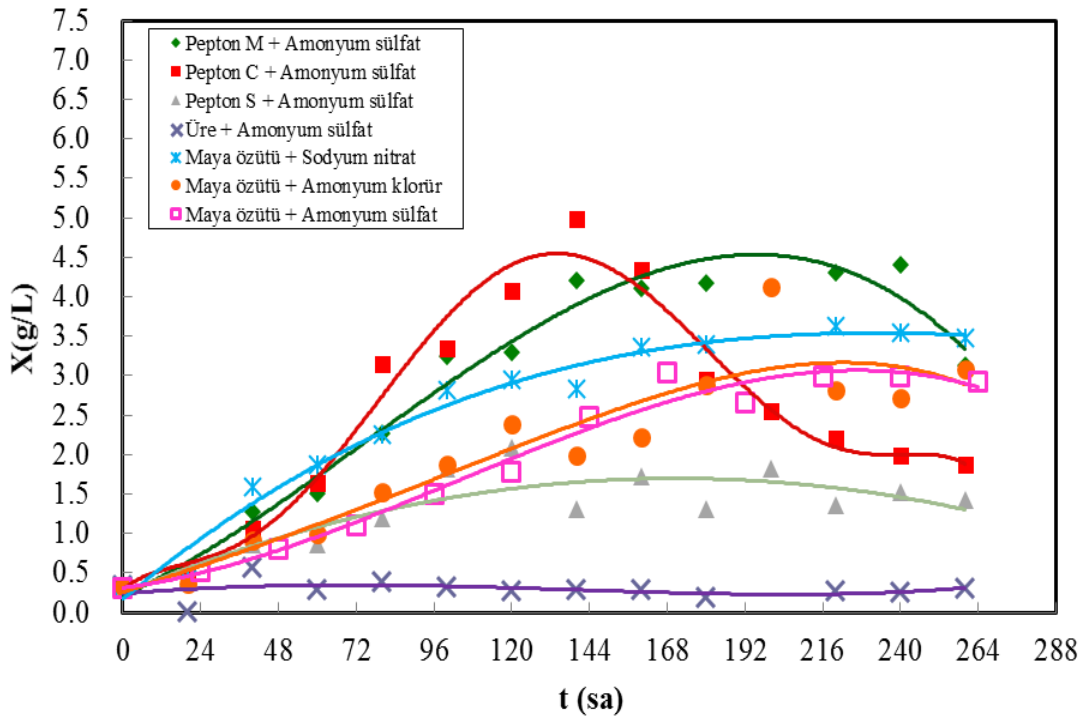
Şekil 4.7. Farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Azot kaynağı karışımları olarak; soya kaynaklı pepton ve  $(NH_4)_2SO_4$ , maya özütü ve  $NH_4Cl$ , et kaynaklı pepton ve  $(NH_4)_2SO_4$  karışımlarının bulunduğu fermantasyon ortamlarında en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ise sırasıyla; 4.36, 4.23 ve 4.06 mg/L olarak elde edilmiştir. En yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri; fermantasyon ortamlarında azot kaynağı karışımları olarak maya özütü ve  $NH_4Cl$  (4.23 mg/L), et kaynaklı pepton ve  $(NH_4)_2SO_4$  karışımları (4.06 mg/L) kullanıldığında 200. saatte, soya kaynaklı pepton ve  $(NH_4)_2SO_4$  karışımı (4.36 mg/L) kullanıldığında ise; 180. saatte tayin edilmiştir.

Maya özütü ve  $(NH_4)_2SO_4$ 'ın azot kaynağı karışımı olarak birlikte kullanıldığı çalışmada elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ise; 240. saatte, 3.59 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadaki en düşük  $\beta$ -karoten derişimleri ise; bileşimlerinde azot kaynağı karışımları olarak; üre ve  $(NH_4)_2SO_4$  ile maya özütü ve  $NaNO_3$  içeren

fermantasyon ortamları kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.7). Bu azot kaynağı kombinasyonları için elde edilmiş olan en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ise sırasıyla; 160. ve 120. saatlerde 1.85 ve 1.99 mg/L olarak belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamlarında farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



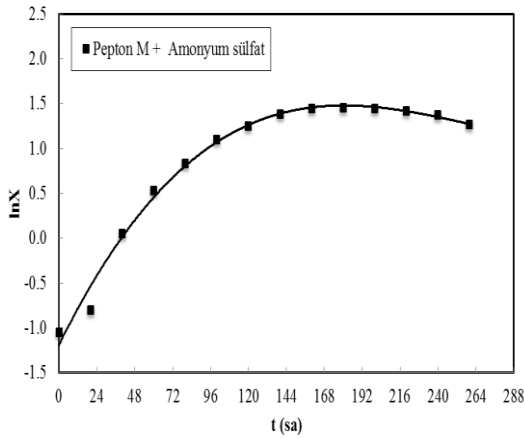
Şekil 4.8. Farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamları incelendiğinde; en yüksek biyokütle derişiminin (4.98 g/L) kazein kaynaklı pepton ile  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın birlikte kullanıldığı fermantasyon ortamında, fermantasyonun 140. saatinde elde edildiği belirlenmiştir. Et kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren fermantasyon ortamında en yüksek biyokütle derişimi 240. saatte, 4.41 g/L olarak elde edilmiştir. Maya özütü ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'ün birlikte kullanıldığı ortamdaki en yüksek biyokütle derişimi ise; 4.12 g/L olarak 200. saatte tayin edilmiştir.

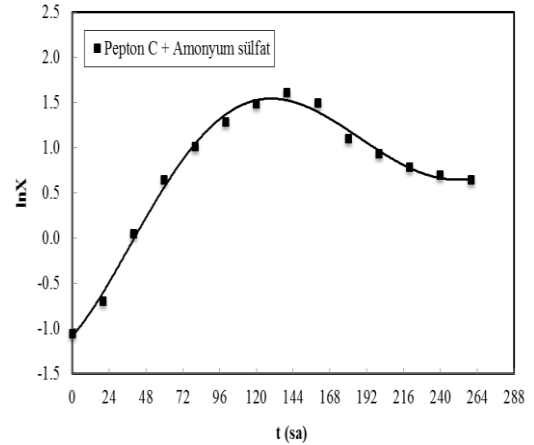
Ayrıca, maya özütü ve  $\text{NaNO}_3$ , maya özütü ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile, soya kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri ise sırasıyla; 3.63 g/L, 3.03 g/L ve 2.08 g/L olarak bulunmuştur. Üre ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın azot kaynağı olarak birlikte kullanıldığı fermantasyon ortamında ise, biyokütle derişiminde zamanla önemli bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Çalışmada fermantasyon ortamındaki azot kaynağı karışımlarının *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun özgül üreme hızına etkisini incelemek amacıyla, elde edilen biyokütle derişimlerinin  $\ln$  değerleri hesaplanarak bu değerlerin zamanla değişimini gösteren grafikler (Şekil 4.9) çizilmiş ve mayanın üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları hesaplanmıştır.

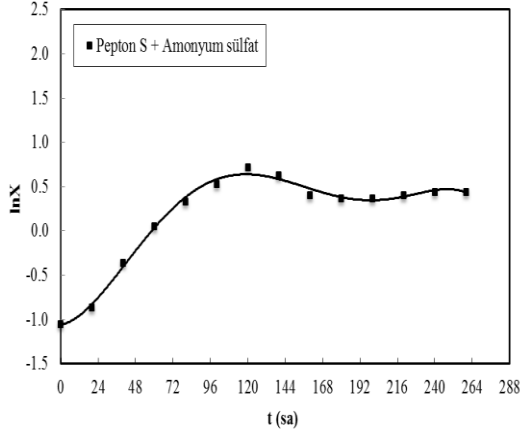
*R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun özgül üreme hızı ( $\mu$ ), kazein kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  karışımı içeren fermantasyon ortamında;  $0.050 \text{ sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Fermantasyon ortamında amonyum sülfat ile birlikte kullanılan organik azot kaynakları ile elde edilen özgül üreme hızları, et kaynaklı pepton için;  $0.033 \text{ sa}^{-1}$ , soya kaynaklı pepton için;  $0.018 \text{ sa}^{-1}$  ve maya özütü için;  $0.016 \text{ sa}^{-1}$  olarak belirlenmiştir.



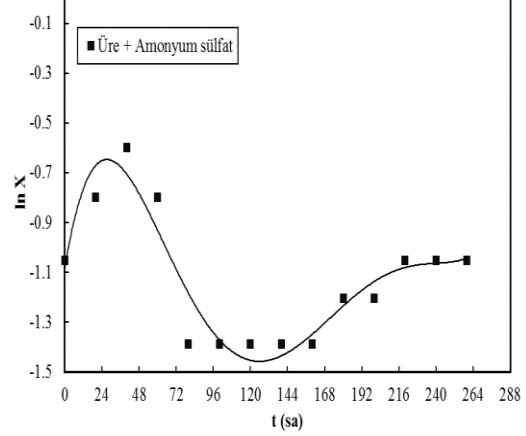
(a)



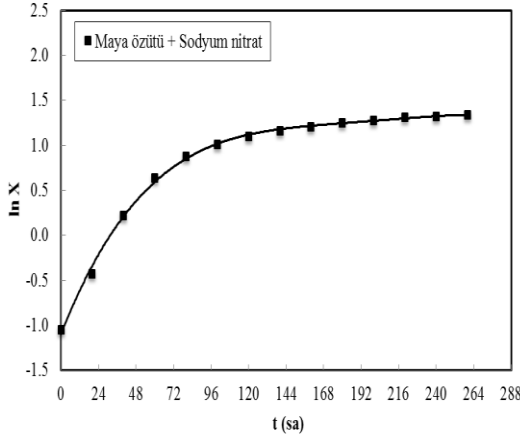
(b)



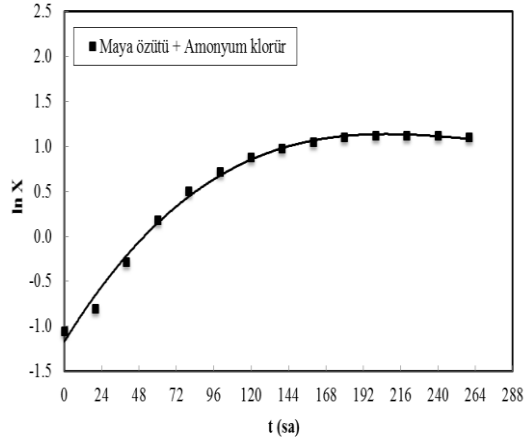
(c)



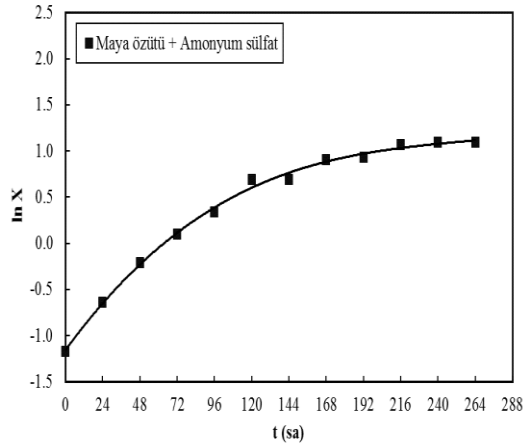
(d)



(e)



(f)



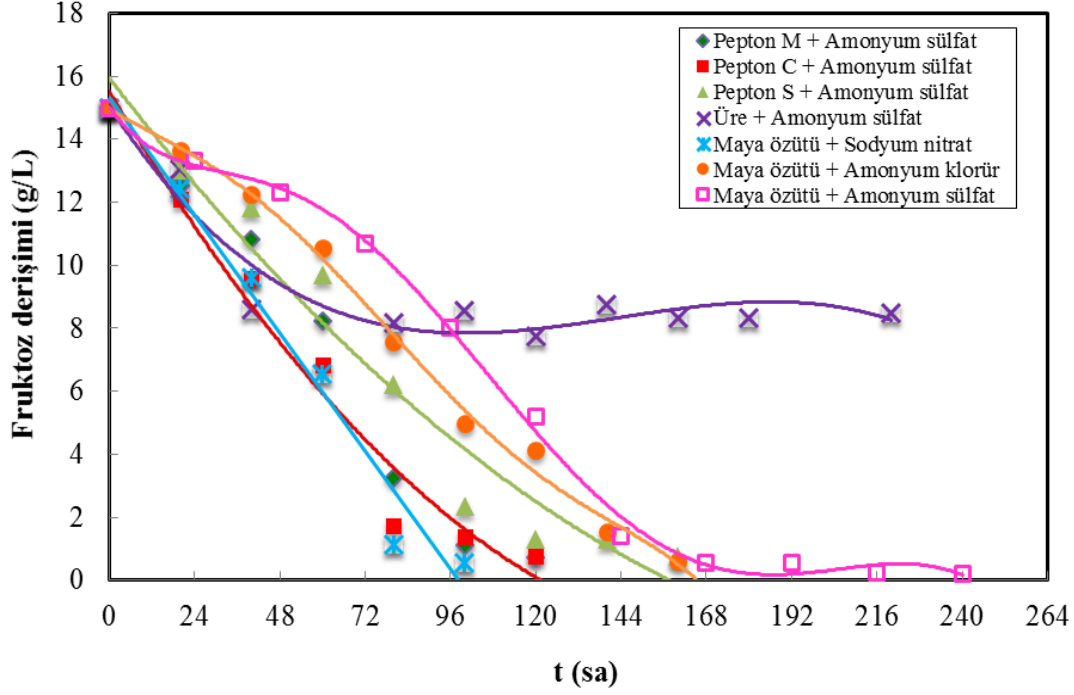
(g)

Şekil 4.9. *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun farklı azot karışımları içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin ln değerlerinin zamanla değişimleri. (a): et kaynaklı pepton +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (b): kazein kaynaklı pepton +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (c): soya kaynaklı pepton +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (d): Üre +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (e): maya özütü +  $\text{NaNO}_3$ , (f): maya özütü +  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , (g): maya özütü +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Organik azot kaynağı maya özütü ile denenen inorganik azot kaynakları ile elde edilen özgül üreme hızları ise,  $\text{NaNO}_3$  için; 0.030,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  için; 0.020 ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  için; 0.016  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değerler incelendiğinde; en yüksek özgül üreme hızının bileşiminde organik azot kaynağı olarak; kazein kaynaklı pepton, inorganik azot kaynağı olarak ise;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın olduğu ortamda elde edildiği tespit edilmiştir. Üssel üreme bölgesindeki en düşük özgül üreme hızı ise; üre ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın birlikte kullanıldığı fermantasyon ortamında; 0.005  $\text{sa}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

Çalışmanın bu bölümünde ayrıca, incelenen maya suşu için, farklı azot karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, özgül ürün oluşum hızları da belirlenmiştir. Bu amaçla;  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.7), farklı zamanlara ait eğim değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra, zamana karşı biyokütle derişimlerinin çizildiği grafiklerden, aynı zamana karşı gelen biyokütle derişimleri tespit edilmiştir. Özgül ürün oluşum hızları,  $\gamma$  (mg  $\beta$ -karoten/g mo.sa), elde edilen eğim değerlerinin aynı zamana karşı gelen biyokütle derişimlerine bölünmesi ile, bulunmuştur.  $\beta$ -karoten üretimi için belirlenen en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ); maya özütü ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , soya kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , kazein kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , maya özütü ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , et kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , üre ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ve maya özütü ve  $\text{NaNO}_3$  azot karışımları için sırasıyla; 0.056, 0.048, 0.047, 0.046, 0.041, 0.030 ve 0.027 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Çeşitli azot kaynağı karışımlarını içeren fermantasyon ortamlarında yapılan deneylerde, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi sırasında, kullanılan ortamlardaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri de incelenmiştir (Şekil 4.10.). Şekil 4.10'a göre; fermantasyon ortamındaki fruktozun, ortamda azot kaynağı olarak maya özütü ve  $\text{NaNO}_3$  karışımı kullanıldığında; fermantasyonun 100. saatinde, kazein kaynaklı pepton ile  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ve et kaynaklı pepton ile  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  karışımları kullanıldıklarında ise; 120. saatinde tamamen tükendiği belirlenmiştir. Ortam bileşiminde azot kombinasyonları olarak; soya kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , maya özütü ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ile maya özütü ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bulunduğu ise; fermantasyonun yaklaşık 160. saatinde fruktozun tamamen tükendiği saptanmıştır.



Şekil 4.10. Farklı azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Azot kaynağı olarak fermantasyon ortamında üre ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  karışımı kullanıldığında ise; ortamdaki fruktozun yaklaşık yarısının 80. saate kadar tüketildiği, daha sonra ise maya tarafından tüketilmediği belirlenmiştir.

Farklı azot kaynağı karışımlarının, fermantasyon ortamlarında kullanılmalarının, *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde elde edilen bazı sonuçlar, Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3’de görülebileceği gibi; bu çalışmada elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri ile özgül üreme hızı değerleri; kazein kaynaklı pepton ile amonyum sülfat karışımının birlikte kullandığı ortamlarda sırasıyla; 6.84 mg/L, 4.98 g/L ve  $0.050 \text{ sa}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan suşa ait belirlenen en yüksek özgül ürün oluşum hızı ise;  $0.048 \text{ sa}^{-1}$  olarak, soya kaynaklı pepton ile amonyum sülfat karışımının birlikte kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edilmiştir.



Çizelge 4.3. *R. glutinis var. glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine farklı azot kaynağı karışımlarının etkilerinin incelendiği deneylerde elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme ve özgül ürün oluşum hızı değerleri

Azot kaynağı karışımı	En yüksek $\beta$ -karoten derişimi (mg/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Özgül üreme hızı ( $\text{sa}^{-1}$ )	En yüksek özgül ürün oluşum hızı (mg $\beta$ -karoten/g mo.sa)
Et kaynaklı pepton + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.06	4.41	0.033	0.041
Kazein kaynaklı pepton + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.84	4.98	0.050	0.047
Soya kaynaklı pepton + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.36	2.08	0.018	0.048
Üre + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.85	0.56	0.005	0.030
Maya özütü + $\text{NaNO}_3$	1.99	3.63	0.030	0.027
Maya özütü + $\text{NH}_4\text{Cl}$	4.23	4.12	0.020	0.056
Maya özütü + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.59	3.03	0.016	0.046

Bu bölümde gerçekleştirilmiş çalışmanın sonucunda; en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi, biyokütle derişimi ve maya özgül üreme hızının elde edildiği kazein kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  karışımının, bundan sonraki çalışmalarda fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Literatürde, çeşitli azot kaynaklarının, *Rhodotorula* cinsine ait maya türlerinin karotenoid üretimi üzerine etkilerinin incelendiği bazı araştırmalar yer almaktadır (Latha ve ark., 2005; Chandi ve Gill, 2011; Ferrao ve Garg, 2011; Voaides ve Dima, 2012; Elfeky ve ark., 2019).

*R. glutinis* DFR-PDY suşunun, karotenoid üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; inorganik; sodyum nitrat, amonyum nitrat, amonyum tartarat ve organik; üre, kazein, pepton ve maya özütünün, azot kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Adı geçen suş ile elde edilen en yüksek karotenoid derişimlerinin sodyum nitrat, kazein asit hidrolizatı, üre ve maya özütü bulunan ortamlarda sırasıyla; 3.3, 2.4, 2.2 ve 2.1 (mg/L) olarak elde edildiği bildirilmiştir (Latha ve ark., 2005). Söz konusu çalışma ile karşılaştırıldığında, tez çalışmamızdaki benzer deneylerde, bileşiminde kazein kaynaklı pepton ve amonyum sülfat karışımı bulunan ortamda; daha yüksek  $\beta$ -karoten derişimi (6.84 mg/L) elde edilmiştir.

Voaides ve Dima (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, *Rhodotorula* sp. ile karotenoid üretimine, farklı inorganik azot kaynaklarının ve aminoasitlerle desteklenmiş karışımlarının etkileri incelenmiştir. Amonyum nitratın kontrol olarak kullanıldığı bu çalışmada; amonyum klorür, amonyum sülfat, % 0.1 treonin eklenmiş amonyum nitrat ve % 0.1 glutamik asit eklenmiş amonyum nitrat bulunan farklı ortamların Rd1, Rd2 ve Rd3 olarak isimlendirilen suşların, karotenoid üretimleri üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Denenen tüm ortamlar içerisinde en yüksek karotenoid derişiminin Rd3 suşu ile elde edildiği belirtilmiştir. Rd3 suşu ile elde edilen en yüksek karotenoid derişimlerinin ise; amonyum klorür, % 0.1 glutamik asit eklenmiş amonyum nitrat, % 0.1 treonin eklenmiş amonyum nitrat, amonyum sülfat ve amonyum nitrat bulunan ortamlar olarak sıralanmıştır. Rd3 suşu ile yapılan deneylerde, inorganik azot kaynakları arasında en yüksek karotenoid derişiminin amonyum klorür bulunan ortamda elde edildiği bildirilmiştir. Rd1 ve Rd2 suşları ile elde edilen en yüksek karotenoid derişimlerinin ise; öncelikle % 0.1 treonin eklenmiş amonyum nitrat, daha sonra % 0.1 glutamik asit eklenmiş amonyum nitrat ortamında bulunduğu rapor edilmiştir. Sonuçlara Rd1 ve Rd2 suşları açısından yaklaşıldığında ise, amonyum nitrat bulunan ortamların aminoasitle desteklenmesiyle daha yüksek karotenoid derişimleri elde

edildiği bulgulanmıştır. Tez çalışmamızda yüksek karotenoid derişimi eldesi için en iyi inorganik azot kaynağı olarak seçilmiş olan amonyum sülfat, bu çalışmada 3. sırada yer almıştır.

Yapılan bir başka araştırmada, *R. glutinis* (AS 2.703) suşu ile lipid ve karotenoid üretimi üzerine bileşiminde 60 g/L glukoz bulunan fermantasyon ortamlarında; farklı azot kaynakları ile farklı C/N ve C/S oranlarının etkileri incelenmiştir (Elfeky ve ark., 2019). Bu araştırmada denenen tüm C/N oranlarında, en yüksek karotenoid derişimlerinin bileşimlerinde sırasıyla; amonyum sülfat, maya özütü ve pepton bulunan ortamlarda belirlendiği rapor edilmiştir. Ayrıca tüm azot kaynakları için; C/N oranı düştükçe, daha yüksek karotenoid derişimlerinin elde edildiği de belirtilmiştir. Bunun yanısıra bu çalışmada, lipid ve karotenoid üretimlerinin birlikte optimize edilmek istendiği ifade edilmiştir. Bu amaçla; besiyerinde yüksek glukoz konsantrasyonunda, özellikle azot ve sülfür derişiminin sınırlandırılmasıyla, incelenen suşun lipid birikiminin arttığı bildirilmiştir. Bu suş ile karotenoid üretiminin aksine, lipid üretiminin yüksek C/N oranında gerçekte olduğu belirtilmiştir. Lipogenezis ve karotogenezis metabolik yollarının her ikisi için de asetil Co-A'nın ortak başlangıç molekülü olarak paylaşılması bu iki maddenin üretimindeki rekabetin nedeni olarak ifade edilmektedir. Bu çalışmada lipid üretiminin yüksek olduğu yüksek C/N oranında karotenoid üretimini de artırmak amacıyla farklı C/S oranlarının da denendiği belirtilmektedir. En yüksek pigment derişiminin (0.947 mg/L), amonyum sülfatın azot kaynağı ve C/N ile C/S oranlarının sırasıyla; 146 ve 120 olduğu ortamda elde edildiği bildirilmiştir. Yüksek C/N oranlarında C/S oranlarından bağımsız olarak fermantasyonun 3. gününden itibaren ortamdaki karotenoid sentezinin azalırken lipid sentezinin 6. güne kadar artmaya devam ettiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada son olarak optimum bulunan besiyerine  $Al_2(SO_4)_3$  ilave edilmesinin, içeriğindeki torulen miktarı %98 olacak şekilde toplam pigment derişiminin 2.2 mg/L'ye yükseldiği ve lipid derişiminin ise %50 azaldığı rapor edilmiştir (Elfeky ve ark., 2019).

*Rhodotorula graminis* RC04 suşu ile  $\beta$ -karoten üretimine besiyeri bileşenlerinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise; farklı inorganik tuzlar, organik azot kaynakları ve aminoasitlerin denendiği ifade edilmiştir (Ferrao ve Garg, 2011). Bu çalışmada inorganik tuzlar olarak; amonyum klorür, amonyum nitrat, amonyum sülfat, sodyum

nitrat, sodyum nitrit, potasyum nitrat ve kalsiyum nitrat, organik azot kaynağı olarak ise; pepton, tripton, et kaynaklı pepton, maya özütü, jelatin ve üre, aminoasitler olarak da; glisin, lizin, serin, tirozin, histidin ve treoin kullanıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, izolatın gelişmesi ve  $\beta$ -karoten üretimi açısından en iyi substratların kompleks yani organik azot kaynakları olduğu ve bunların arasından maya özütünün en iyi olduğu bildirilmiştir. Bunlara ilaveten, izolatın en iyi geliştiği ve en yüksek  $\beta$ -karoten üretiminin belirlendiği inorganik tuzun; potasyum nitrat olduğu ve aminoasitlerin ilavesinin  $\beta$ -karoten üretimini desteklemesine rağmen, aminoasitler ile yapılan denemelerde en düşük verimlerin saptandığı bildirilmiştir.

#### **4.4. Deney Tasarım Planının Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar**

Tez çalışmasının bu aşamasında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimine, bazı fermentasyon parametrelerinin etkilerinin incelenerek fermentasyon için optimum koşulların belirlenebilmesi amacıyla, Design Expert 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı kullanılarak, merkezi karma tasarım yöntemine göre bir deney tasarım planı oluşturulmuştur.

Deney tasarımında bağımsız değişkenler olarak kullanılan fermentasyon parametreleri ve bu değişkenler için belirlenen beş farklı seviyedeki değerleri; Bölüm 3.2.10'da bulunan, Çizelge 3.4'de sunulmuştur. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan deney tasarım planında, bağımsız değişkenlerin beş farklı seviyedeki değerlerinin çeşitli kombinasyonlarıyla oluşturulan deneysel koşullar ve bu koşullardaki bağımsız değişkenlere ait gerçek ve kodlanmış değerler sırasıyla; Çizelge 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

Oluşturulan tasarıma göre deneyler, merkez noktada aynı koşulları içeren 6 tekrarlı deney, yıldız ve faktöriyel noktalarda ise (bkz. Şekil 2.5); 24 farklı kombinasyon deneyi olmak üzere; toplam 30 deney olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan program tarafından oluşturulan deney tasarım planına göre gerçekleştirilen deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun fermentasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimi ortalama  $1.2 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde, seçilen bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri

Deney No	X <sub>1</sub> (g/L)	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> (°C)
1	30	2.5	4.5	26
2	70	2.5	4.5	26
3	30	7.5	4.5	26
4	70	7.5	4.5	26
5	30	2.5	7.5	26
6	70	2.5	7.5	26
7	30	7.5	7.5	26
8	70	7.5	7.5	26
9	30	2.5	4.5	30
10	70	2.5	4.5	30
11	30	7.5	4.5	30
12	70	7.5	4.5	30
13	30	2.5	7.5	30
14	70	2.5	7.5	30
15	30	7.5	7.5	30
16	70	7.5	7.5	30
17	10	5	6	28
18	90	5	6	28
19	50	0	6	28
20	50	10	6	28
21	50	5	3	28
22	50	5	9	28
23	50	5	6	24
24	50	5	6	32
25	50	5	6	28
26	50	5	6	28
27	50	5	6	28
28	50	5	6	28
29	50	5	6	28
30	50	5	6	28

**X<sub>1</sub>**: Fruktoz başlangıç derişimi, **X<sub>2</sub>**: Kazein peptonu başlangıç derişimi, **X<sub>3</sub>**: pH, **X<sub>4</sub>**: Sıcaklık

Çizelge 4.5. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde, seçilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri

Deney No	X <sub>1</sub> (g/L)	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> (°C)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

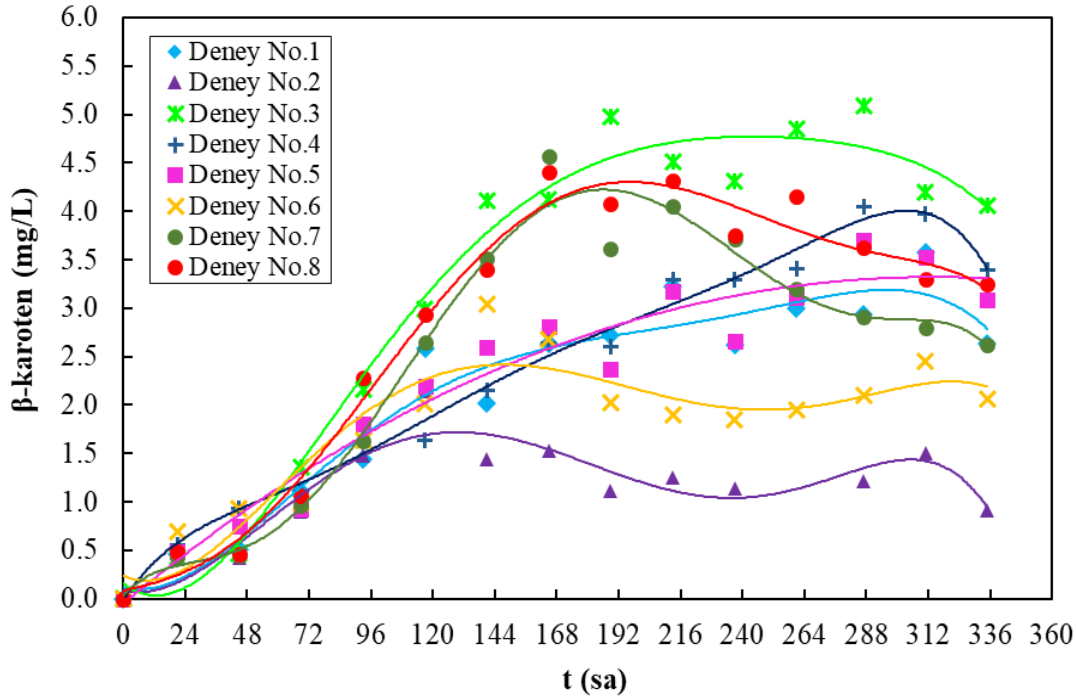
X<sub>1</sub>: Fruktöz başlangıç derişimi, X<sub>2</sub>: Kazein peptonu başlangıç derişimi, X<sub>3</sub>: pH, X<sub>4</sub>: Sıcaklık

Bu deneylerde; fermantasyon ortamlarının seçilen azot kaynağı ve substrat başlangıç derişimleri sırasıyla, kazein kaynaklı pepton için; 0-10 g/L ve fruktoz için; 10-90 g/L aralığında değiştirilirken, başlangıç pH değeri; 3-9 ve ortam sıcaklığı ise; 24-32°C aralığında değiştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon süresince belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak;  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimleri analiz edilmiş ve her birinin zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuştur. Oluşturulan bu grafiklerden yararlanılarak, her bir deney için yanıtlar; en yüksek  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri ile, en yüksek özgül üreme hızı ve  $\beta$ -karoten oluşum hızı değerleri hesaplanmıştır.

Tez çalışmasının bu aşamasında ilk olarak Çizelge 4.3'de yer alan 1-8 numaralı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler, başlangıç fruktoz derişimleri; 30 ve 70 g/L, başlangıç kazein peptonu (Cp) derişimleri; 2.5 ve 7.5 g/L ve başlangıç pH'ları; 4.5 ve 7.5 olacak şekilde hazırlanan fermantasyon ortamlarında, 26°C'da gerçekleştirilmiştir. Deneylerde; fermantasyon ortamlarına aşılana *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun başlangıç inokülasyon derişiminin;  $1.4 \times 10^6$  kob/mL olduğu tespit edilmiştir. 1-8 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Bu deneylerde, incelenen suş tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 287. saatte, 3 numaralı deneyde; 5.09 mg/L olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada 3, 7 ve 8 numaralı deneylerde incelenen suş tarafından  $\beta$ -karoten üretiminin 165. saate kadar hızla arttığı belirlenmiştir.

7 ve 8 numaralı deneylerde en yüksek  $\beta$ -karoten üretimleri sırasıyla; 4.57 ve 4.41 mg/L olarak, 165. saatte belirlenmiştir. Diğerleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek miktarlarda  $\beta$ -karoten üretimlerinin gözlendiği 3, 7 ve 8 numaralı deneylerdeki ortak fermantasyon parametresi; başlangıç kazein peptonu derişimi olup bu değer, 7.5 g/L'dir. Söz konusu bu deneylerde  $\beta$ -karoten için en yüksek derişim 3 numaralı deneyde saptanmış olmakla birlikte, 7 ve 8 numaralı deneylerdeki en yüksek derişimlere, fermantasyon sürecinde daha kısa sürede ulaşıldığı görülmüştür (Şekil 4.11). Düşük derişimde  $\beta$ -karoten üretiminin gözlendiği 2 ve 6 numaralı deneylerde, kazein peptonu başlangıç derişiminin; 2.5 g/L olduğu görülmektedir. Bu deneylerde *R. glutinis* var.

*glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri sırasıyla; 2.14 ve 3.04 mg/L olarak tespit edilmişlerdir.



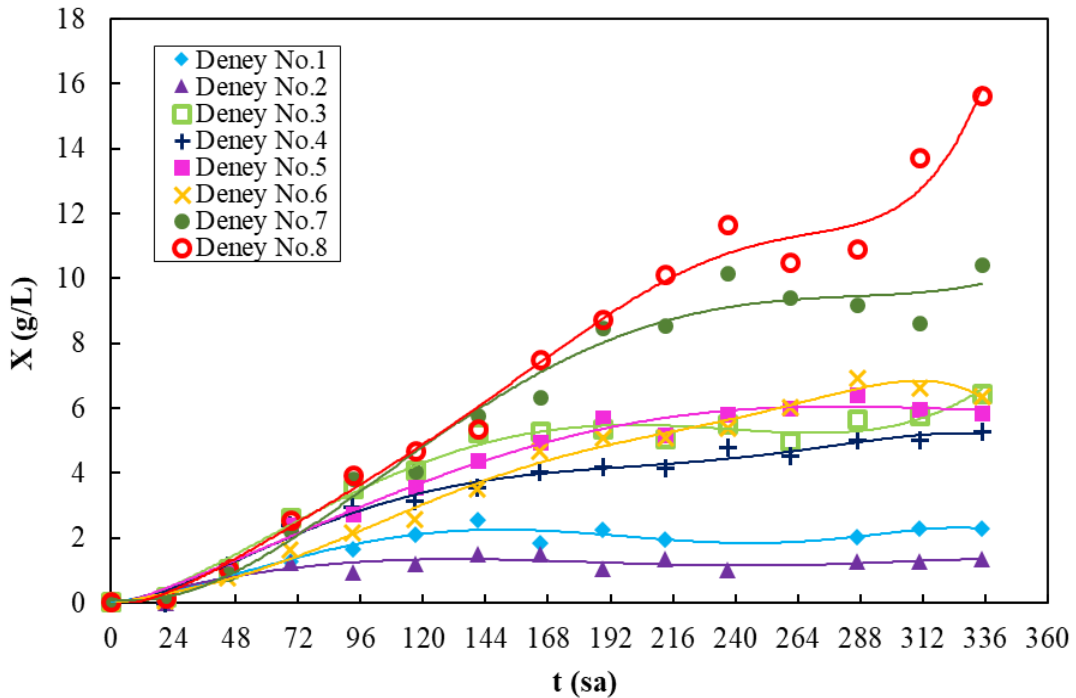
Şekil 4.11. 26°C’da gerçekleştirilen 1-8 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

26°C’de, fruktoz derişimleri dışındaki diğer fermantasyon parametrelerinin aynı olduğu deneylerde, düşük karbon kaynağı derişimlerinde (30 g/L) nispeten daha yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri elde edildiği bulgulanmıştır. Bu durumun tersine, kullanılan azot kaynağı (kazein peptonu) dışındaki fermantasyon parametrelerinin aynı olduğu deneylerde ise, daha yüksek azot kaynağı derişimlerinin (7.5 g/L),  $\beta$ -karoten derişimini de artırdığı belirlenmiştir. pH dışında diğer fermantasyon parametreleri aynı olan 1-5, 2-6 ve 4-8 nolu deneylerde, pH’ın 4.5’den 7.5’a artmasıyla,  $\beta$ -karoten derişimlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu 8 deney içerisinde bu durumun tersi sadece düşük karbon derişimi (30 g/L) ve yüksek azot derişimine (7.5) sahip olan 3 ve 7 nolu deneylerde belirlenmiş ve düşük pH değerine sahip 3 numaralı deneyde daha yüksek  $\beta$ -karoten derişimi elde edilmiştir. Aynı fruktoz derişimine sahip ortamlardan, başlangıç kazein peptonu derişimi ve pH değerlerinin ikisinin de düşük olduğu 1 ve 2 numaralı deney ortamlarında, en düşük  $\beta$ -karoten derişimleri belirlenmiştir. 30 g/L başlangıç fruktoz



derişimi bulunan ortamlar arasında en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi, başlangıç kazein peptonu derişiminin 7.5 g/L, başlangıç pH'nın 4.5 olduğu ortamda elde edilirken başlangıç pH'nın artmasıyla bu değerin düştüğü tespit edilmiştir. Başlangıç fruktoz derişimi 30 g/L ve başlangıç kazein peptonu derişimi 2.5 g/L olan ortamlardan başlangıç pH'ı 7.5 olan ortamda daha yüksek  $\beta$ -karoten derişimi hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda; incelenen suş tarafından 26°C'de yüksek  $\beta$ -karoten üretimi için; düşük karbon kaynağı derişimi (30 g/L), yüksek azot kaynağı derişimi (7.5 g/L) ve düşük (pH 4.5) pH değerlerinin daha uygun olduğu ve ideal ortam koşullarına örnek gösterdiği söylenebilir.

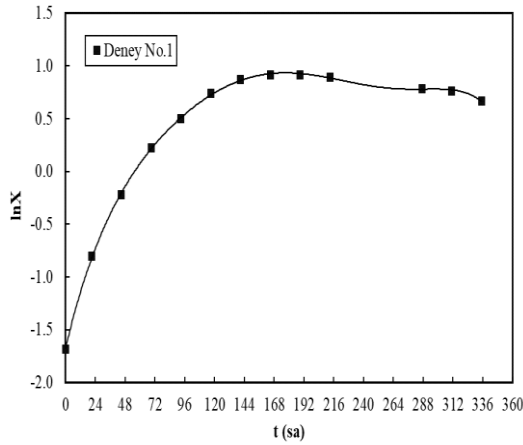
26°C'da gerçekleştirilen deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri ise; Şekil 4.12 gösterilmiştir. Bu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşuna ait en yüksek biyokütle derişimi 15.63 g/L olarak, 8 numaralı deneyde belirlenmiştir. Biyokütle derişiminin nispeten yüksek olarak saptandığı bir diğer deney olan; 7 numaralı deneydeki en yüksek biyokütle derişimi ise; 10.45 g/L olarak tespit edilmiştir.



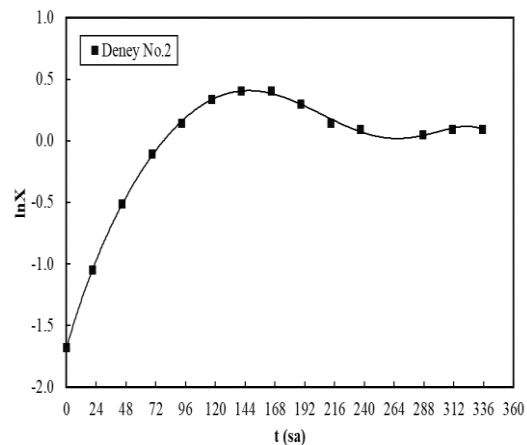
Şekil 4.12. 26°C'da gerçekleştirilen 1-8 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Fermentasyon boyunca, en düşük  $\beta$ -karoten derişimlerinin elde edildiği 2 numaralı deneydeki biyokütle derişimlerinin de, diğer deneyler ile karşılaştırıldığında, yine daha düşük değerlerde oldukları belirlenmiştir. 1 ve 2 numaralı deneylerde kullanılan fermentasyon parametrelerinden; ortamdaki başlangıç fruktoz ve kazein peptonu derişimlerinin sırasıyla; 30 ve 2.5 g/L olarak, deney planında denenen nispeten düşük değerlerinde olmalarının, düşük biyokütle derişimi değerleri için açıklayıcı olabileceği düşünölmektedir.

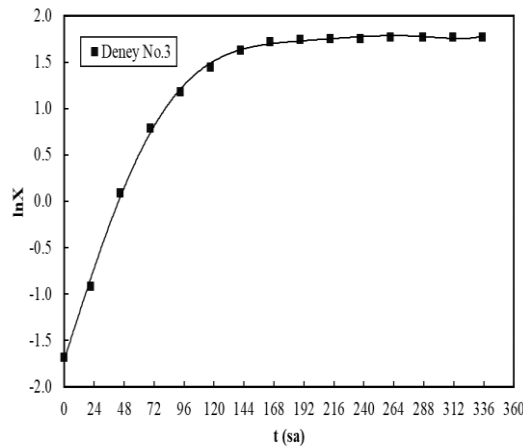
Çalışmanın bu döneminde ayrıca, her deney için elde edilen kuru hücre ağırlıklarından hesaplanan  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler hazırlanmış ve bu grafiklerden yararlanılarak, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun özgül üreme hızları da bulunmuştur (Şekil 4.13a-h).



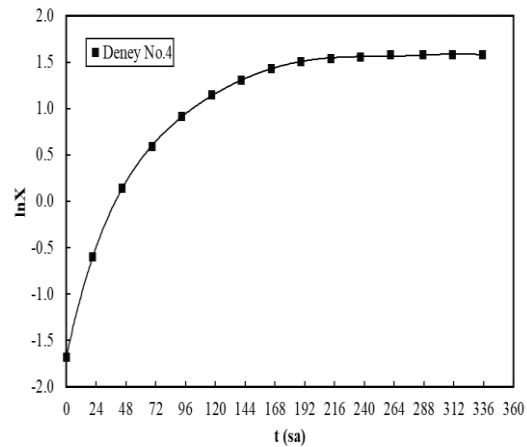
(a)



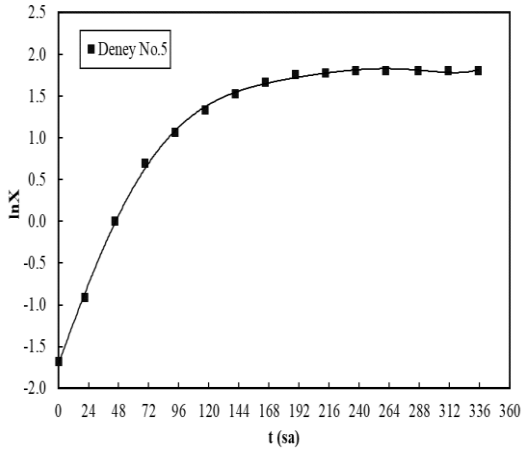
(b)



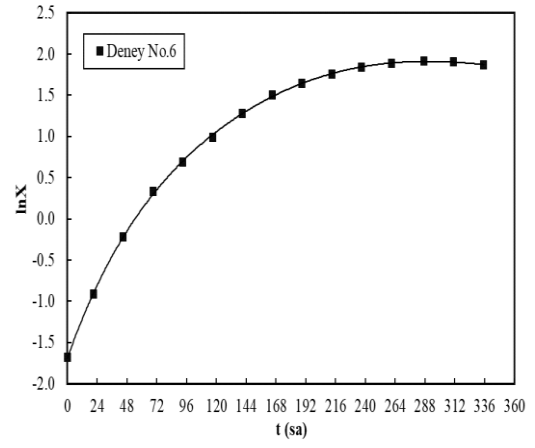
(c)



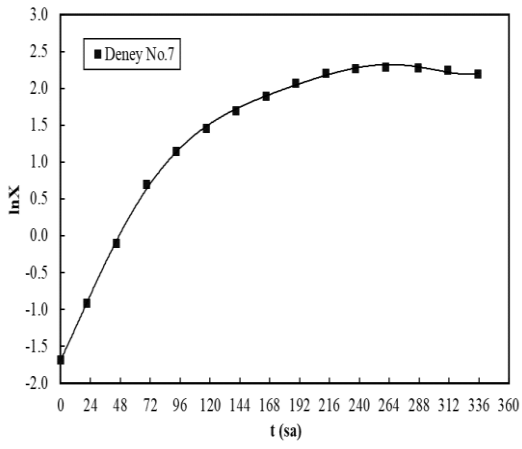
(d)



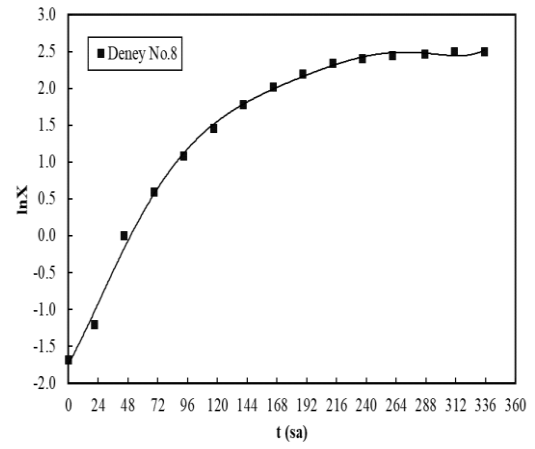
(e)



(f)



(g)

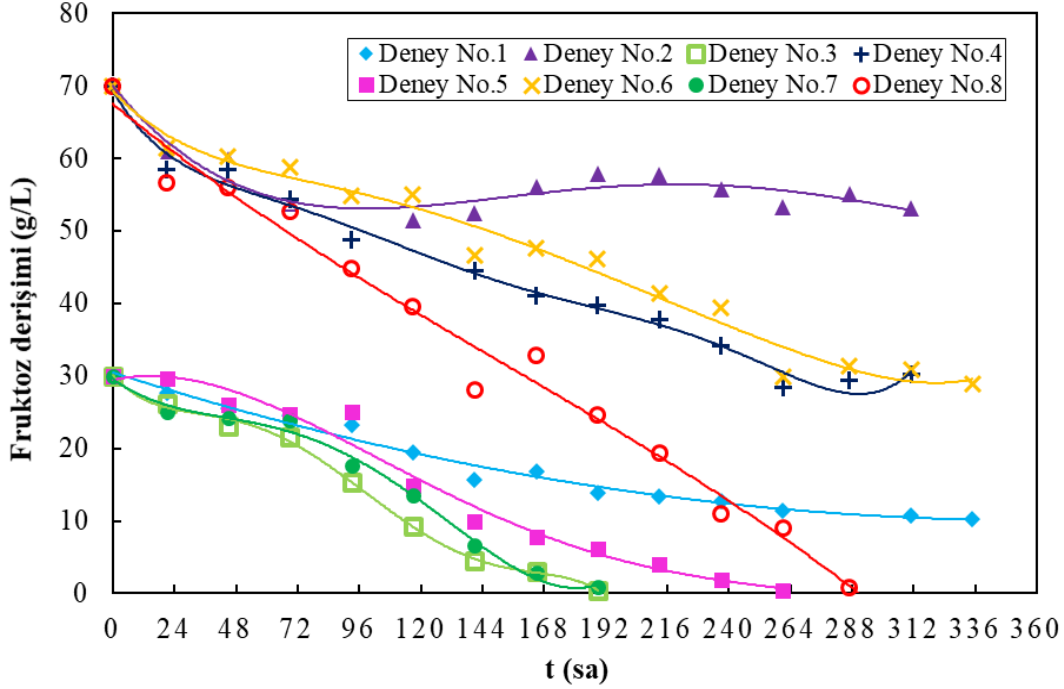


(h)

Şekil 4.13. 26°C’da gerçekleştirilen 1-8 numaralı (a-h) deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri

26°C’da gerçekleştirilen 1-8 numaralı deneyler için, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ) sırasıyla; 0.044, 0.025, 0.055, 0.021, 0.038, 0.050, 0.033 ve 0.038 sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 26°C’daki en yüksek özgül üreme hızı (0.055 sa<sup>-1</sup>), fermantasyon ortamındaki fruktoz ve pepton başlangıç derişimlerinin sırasıyla; 30 ve 7.5 (g/L), pH’nın ise 4.5 olduğu, 3 numaralı deneyde elde edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak, maksimum özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları da hesaplanmıştır. 1-8 numaralı deneyler için en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) sırasıyla; 0.024, 0.021, 0.033, 0.027, 0.022, 0.023, 0.032 ve 0.031 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. 26°C’da elde edilen sonuçlara

göre en yüksek özgül  $\beta$ -karoten oluşum hızının 3 numaralı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir. 26°C’da gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.14’de verilmiştir.



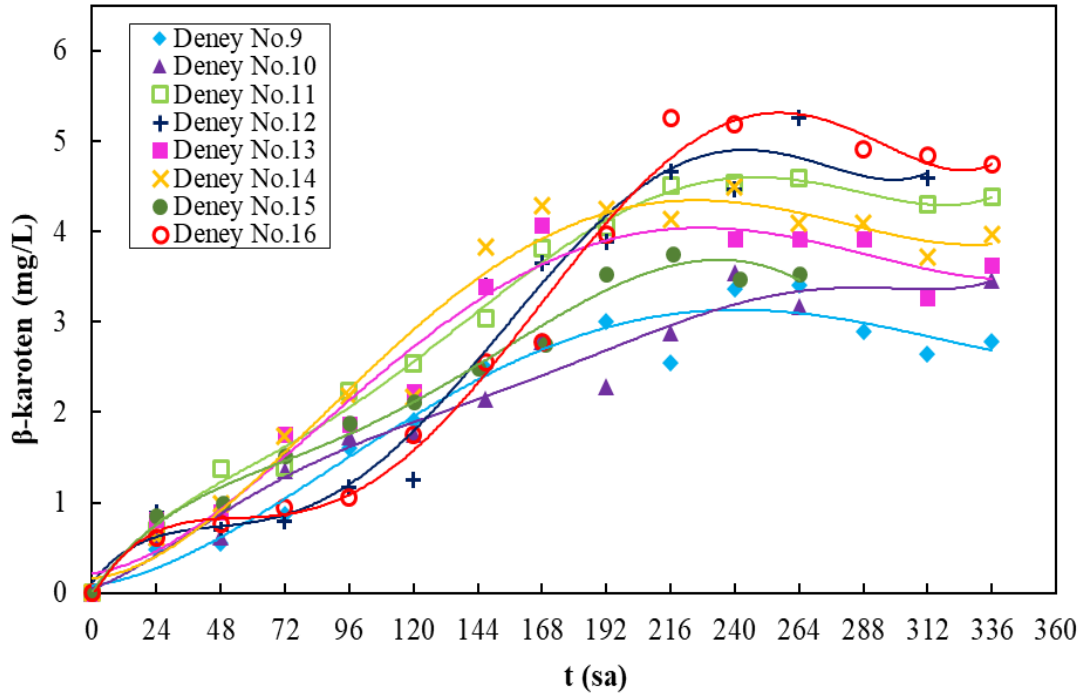
Şekil 4.14. 26°C’da gerçekleştirilen 1-8 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Başlangıç fruktoz derişiminin 30 g/L olduğu deneylerde, 7.5 g/L başlangıç kazein peptonu derişimine sahip olan deney 3 ve 7’deki fruktozun, 2.5 g/L başlangıç kazein peptonu derişimine sahip olan deney 1 ve 5’e oranla, çok daha kısa sürede tüketildikleri belirlenmiştir. Bu grupta, hem başlangıç pH değeri (pH 4.5) ve hem de başlangıç kazein peptonu derişimi düşük (2.5 g/L) olan deney 1’de, ortamdaki fruktozun fermantasyon boyunca tamamen tüketilemediği de belirlenmiştir. Başlangıç fruktoz derişiminin 70 g/L olduğu 2, 4, 6 ve 8 numaralı deneyler birbirleri ile karşılaştırıldıklarında ise, başlangıç pH’ı (4.5) ve kazein peptonu derişimi (2.5 g/L) olan deney 2’de; ortamdaki substratın çok az tüketilebildiği belirlenmiştir (Şekil 4.14). Bu deneyde fermantasyon sonunda ortamda kalan fruktoz derişimi; 53.1 g/L olarak tayin edilmiştir. Her iki substrat derişiminde de, başlangıç pH’ı (4.5) ve kazein peptonu derişiminin (2.5 g/L) düşük olduğu ortamlarda daha az fruktoz harcandığı belirlenmiştir. Başlangıç fruktoz

derişiminin 70 g/L olduğu deneylerde en hızlı substrat tüketimi; başlangıç pH'ı 7.5 ve başlangıç kazein peptonu derişiminin; 7.5 olarak, denenen en yüksek değerlerinde olduğu, deney 8'de belirlenmiştir. Deney 8'de fermantasyon süresince ortamdaki substratın hızla azalarak, tamamen tüketildiği de bulunmuştur. Deney 4 ve 6'daki işletme koşullarının, substrat tüketimlerini olumsuz etkilediği ve fermantasyon süresince ortamdaki substratın yavaş tüketildiği ve sonunda ise, ortamda kullanılmadan kalan fruktoz derişimlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

30°C'da gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişiminin; 30 ve 70 g/L, kazein peptonu başlangıç derişiminin; 2.5 ve 7.5 g/L ve başlangıç pH'larının ise; 4.5 ve 7.5 olacak şekilde değiştii görülmektedir (Çizelge 4.4). Deneylerde; fermantasyon ortamlarına aşıl原因 *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi;  $6 \times 10^6$  kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada da, fermantasyon ortamlarındaki  $\beta$ -karoten, biyokütle ve substrat derişimleri tayin edilmiş ve her birinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuştur.

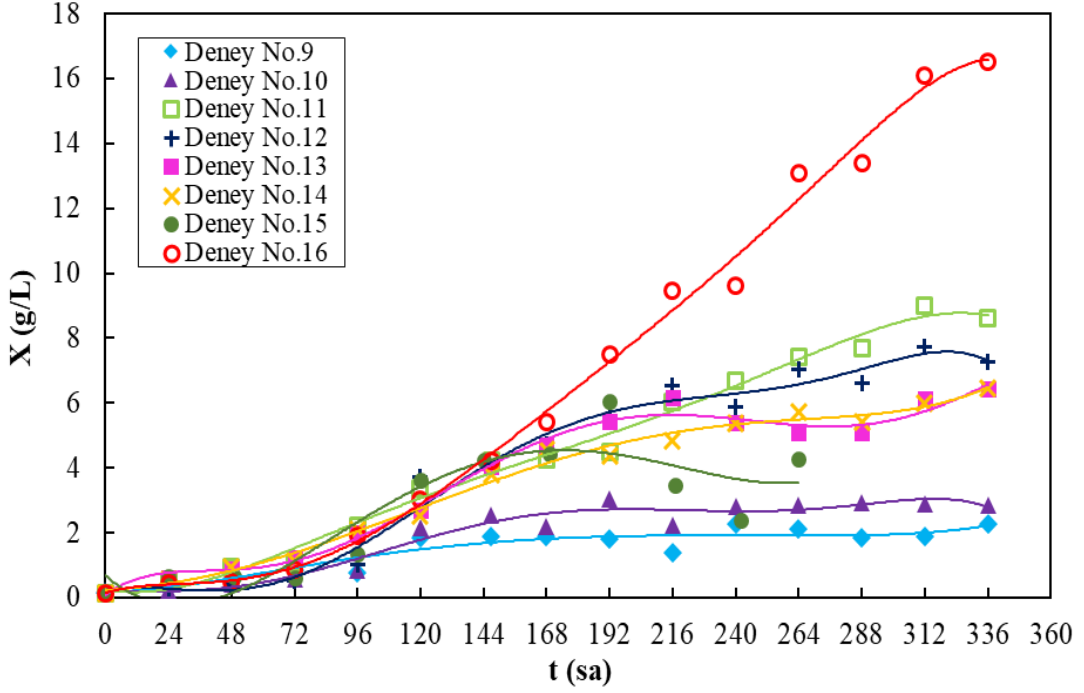
Ortam sıcaklığı 30°C olan 9-16 numaralı deneyler için  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.15'de verilmektedir. 30°C'da *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri; 5.26 mg/L olarak 12 ve 16 numaralı deneylerde sırasıyla; fermantasyonun 264. ve 216. saatlerinde elde edilmiştir. Söz konusu deneylerde, başlangıç fruktoz ve kazein peptonu derişimleri aynı olup sırasıyla; 70 g/L ve 7.5 g/L'dir (bkz. Çizelge 4.4). Başlangıç fruktoz ve pepton derişimleri sırasıyla; 30 ve 7.5 g/L, başlangıç pH'ı 4.5 olan deney 11'de tayin edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 4.59 mg/L olarak fermantasyonun 264. saatinde belirlenmiştir. Deney 12'den farklı olarak daha düşük fruktoz başlangıç derişimine (30 g/L) sahip olan deney 11'de daha düşük  $\beta$ -karoten derişimi (4.59 mg/L) elde edilmiştir. Başlangıç kazein peptonu derişimleri; 2.5 g/L, pH'ları; 7.5 ve fruktoz derişimleri ise sırasıyla; 30 ve 70 g/L olan 13 ve 14 numaralı deneylerde,  $\beta$ -karoten üretimlerinin fermantasyon boyunca değişimlerinin benzer oldukları görülmüş, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri 13. ve 14. deneyler için sırasıyla; 3.93 ve 4.50 mg/L olarak tayin edilmiştir.



Şekil 4.15. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

30°C’da gerçekleştirilen deneylerde nispeten en düşük  $\beta$ -karoten derişimlerinin; 9 ve 10 numaralı deneylerde, başlangıç kazein peptonu derişiminin 2.5 g/L ve başlangıç pH’ının ise 4.5 olduğu fermantasyon ortamlarında elde edildiği belirlenmiştir.

Farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında, 30°C’da gerçekleştirilen deneylerde incelenen suşun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri ise; Şekil 4.16’da gösterilmiştir. 30°C’daki en yüksek biyokütle derişimi, 16 numaralı deneyde, 16.50 g/L olarak 336. saatte elde edilmiştir. 11 ve 12 numaralı deneylerdeki en yüksek biyokütle derişimleri 312. saatte sırasıyla; 8.99 ve 7.71 g/L olarak tespit edilmiştir. 13 ve 14 numaralı deneylerdeki biyokütle derişimlerinin fermantasyon süresince birbirlerine benzer şekilde değiştikleri ve en yüksek değerlerine (6.45 g/L), fermantasyonun sonunda ulaştıkları belirlenmiştir.

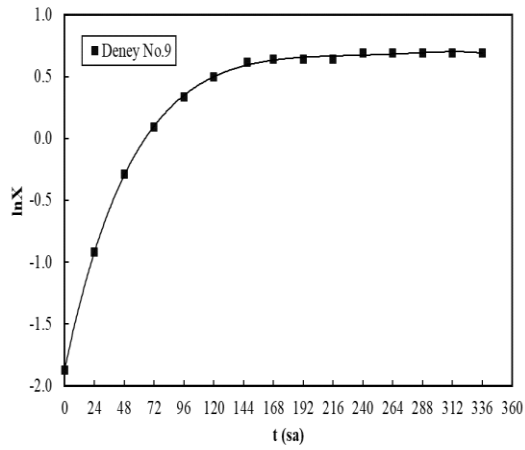


Şekil 4.16. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

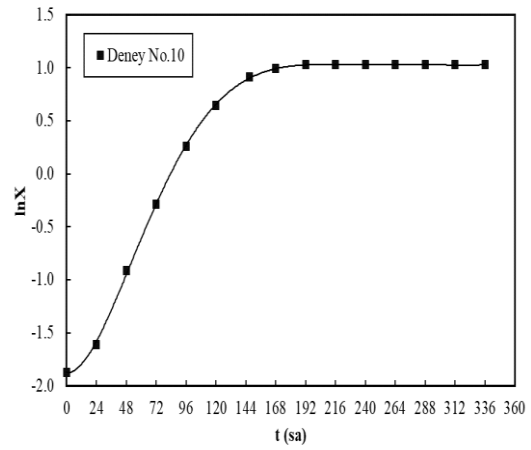
Bu çalışmadaki nispeten düşük biyokütle derişimlerinin; 9 ve 10 numaralı deneylerde elde edildikleri ve fermantasyonun sonunda bu deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin sırasıyla; 2.28 ve 2.85 g/L olduğu tespit edilmiştir.

*R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun özgül üreme hızları,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden hesaplanmıştır (Şekil 4.17a-h). 30°C’da, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ); 9-16 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.028, 0.028, 0.050, 0.030, 0.020, 0.056, 0.038 ve 0.070  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre, 30°C’daki en yüksek özgül üreme hızı 16 numaralı deneyde elde edilmiştir.

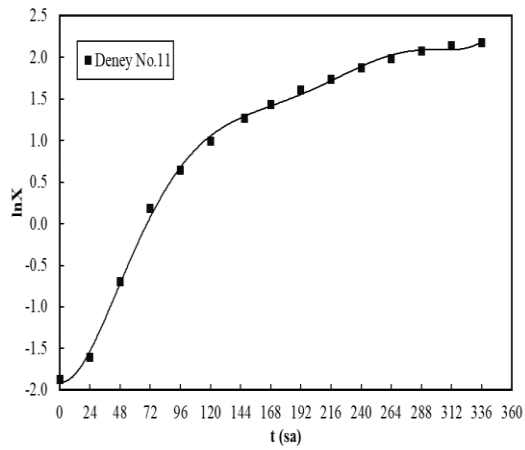
Bu çalışmada ayrıca,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak, maksimum özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları da ( $\gamma_m$ ) hesaplanmıştır. 9-16 numaralı deneyler için  $\gamma_m$  değerleri sırasıyla; 0.021, 0.017, 0.023, 0.027, 0.026, 0.028, 0.026 ve 0.036 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak bulunmuştur.



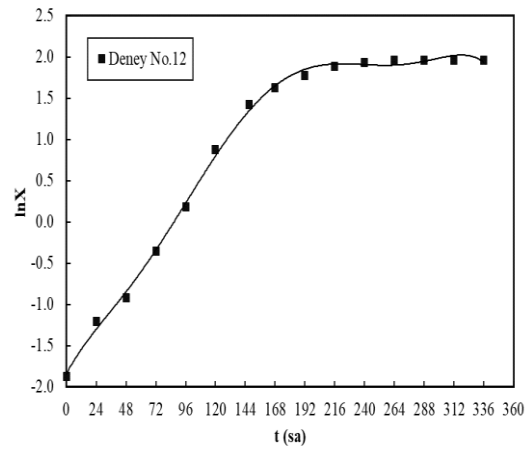
(a)



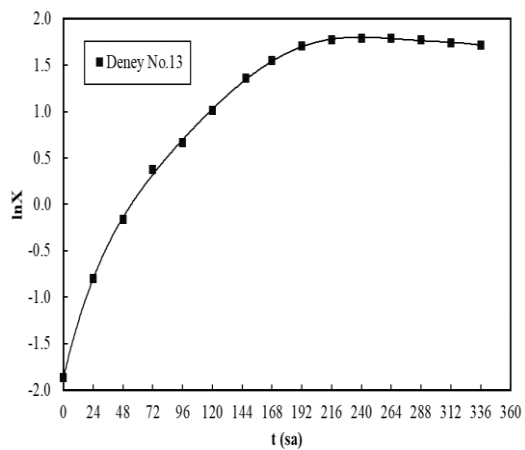
(b)



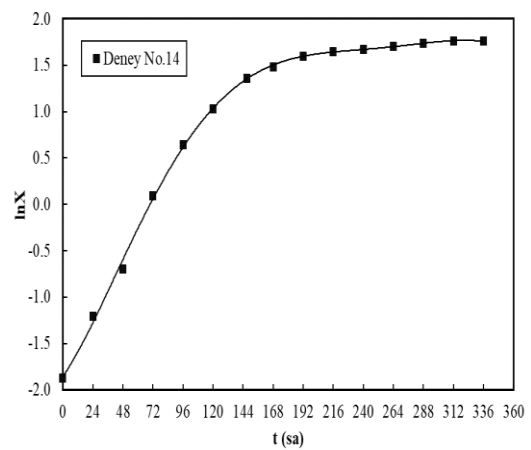
(c)



(d)

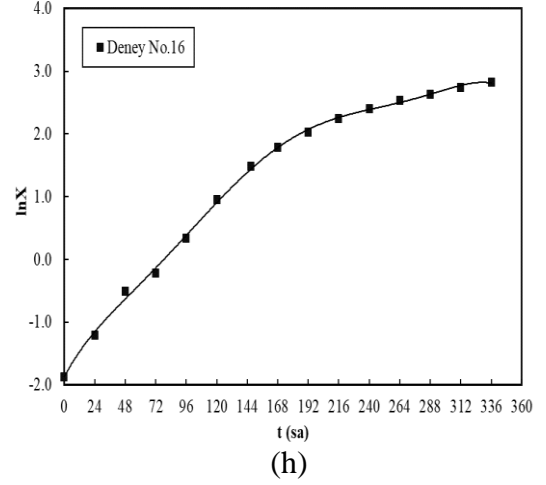
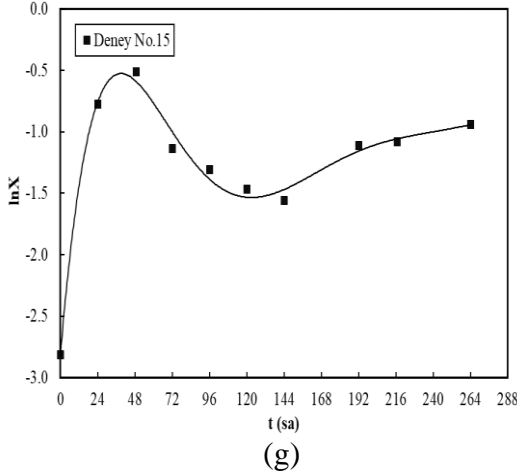


(g)



(f)





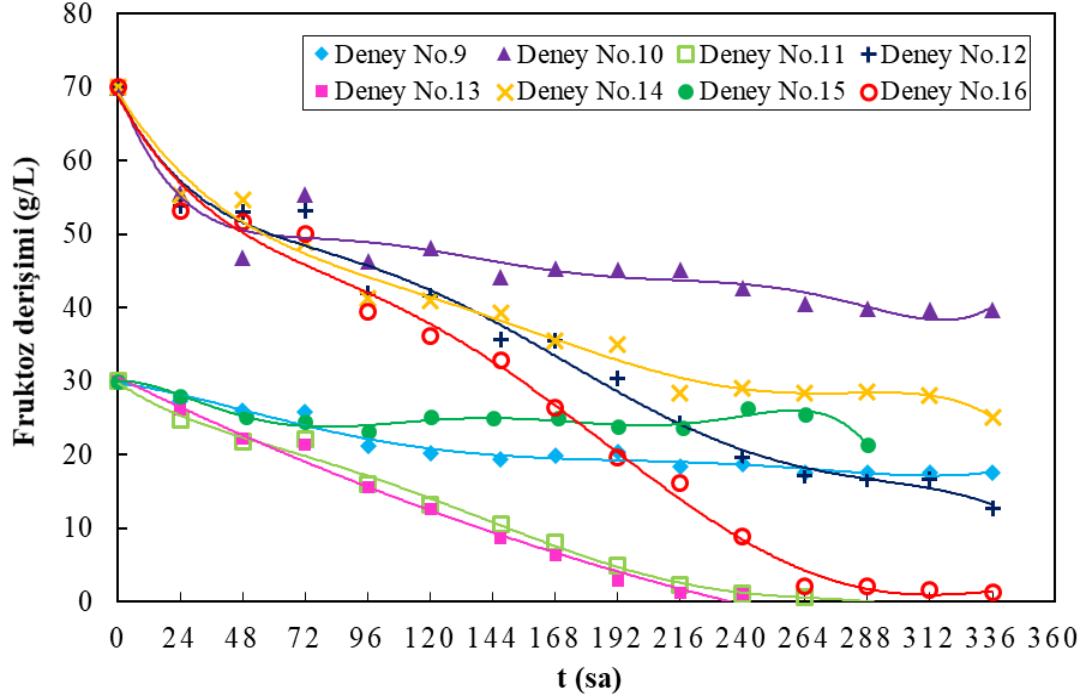
Şekil 4.17. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 (a-h) numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri

30°C’da elde edilen sonuçlara göre en yüksek özgül β-karoten oluşum hızının; 16 numaralı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir.

30°C’da yapılan deneylerde, fermantasyon ortamlarında bulunan fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.18’de verilmiştir. İlgili grafik incelendiğinde, ortamdaki fruktozun 13, 11 ve 16 numaralı deneylerde sırasıyla; 240, 264 ve 336. saatlerde tamamen tükendiği belirlenmiştir.

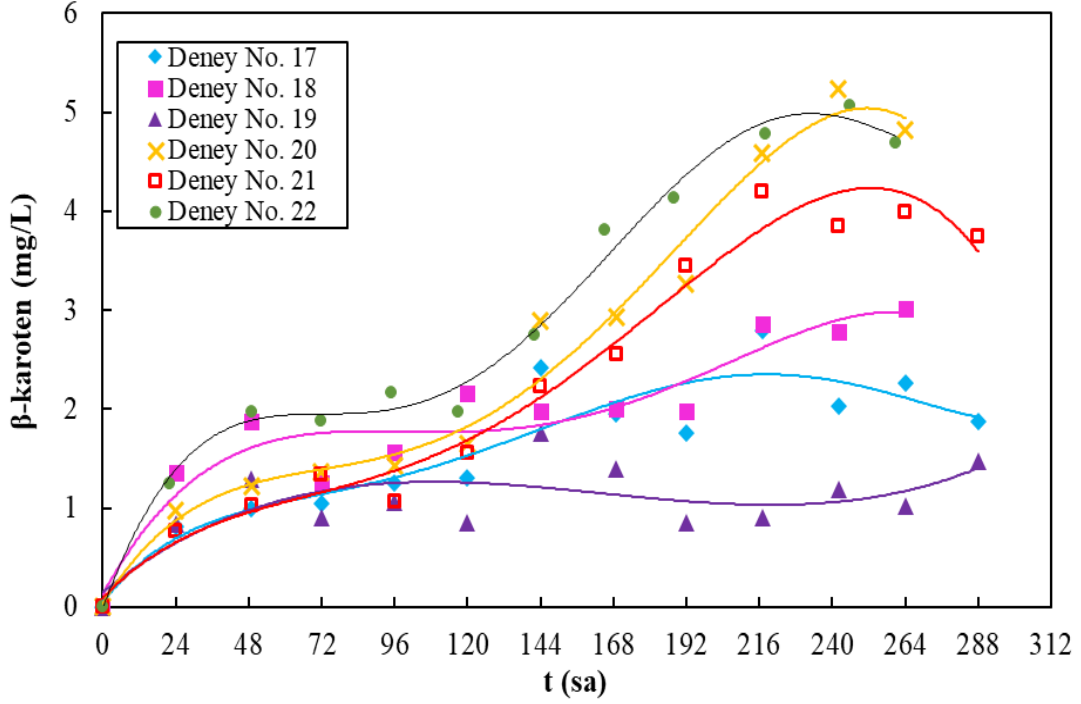
Başlangıç fruktoz derişimi; 70 g/L olan, 10 numaralı deneyde, fermantasyon sonunda ortamda tüketilmeden kalan fruktoz derişiminin; 39.7 g/L olduğu tespit edilmiştir. Başlangıç fruktoz derişimi; 30 g/L olan, 15 numaralı deneyde ise bu değer, 21.4 g/L olarak belirlenmiştir.

Deneme planındaki, 28°C’da gerçekleştirilen; 17-22 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimleri; 10, 50 ve 90 g/L, kazein peptonu başlangıç derişimleri; 0, 5 ve 10 g/L ve başlangıç pH’ları ise; 3, 6 ve 9 değerleri arasında değişmektedir (Çizelge 4.3). Bu deneylerde; *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun fermantasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişiminin;  $1.3 \times 10^7$  kob/mL olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. 30°C’da gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.19’da, ortam sıcaklığı 28°C olan 17-22 numaralı deneyler için, β-karoten derişimlerinin zamanla değişimleri verilmektedir. Şekil 4.19 incelendiğinde, 28°C’da, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek β-karoten derişiminin; 5.24 mg/L olarak fermantasyonun 242. saatinde, 20 numaralı deneyde elde edildiği görülmektedir. Söz konusu deneyde, fermantasyon ortamı bileşimindeki kazein peptonu derişimi; 10 g/L’dir. 28°C sıcaklıkta gerçekleştirilen bu çalışmada, 22, 21 ve 18 numaralı deneyler için tespit edilen en yüksek β-karoten derişimleri ise sırasıyla; 5.07 mg/L, 4.20 mg/L ve 3.02 mg/L olarak, fermantasyonun 246., 217. ve 264. saatlerinde belirlenmiştir. Deneme planında, 10 g/L olarak; incelenen en düşük fruktoz derişimini içeren fermantasyon ortamında yapılan 17 numaralı deneyde, 28°C’da elde edilen en yüksek β-karoten derişimi; 2.80 mg/L olarak tespit edilmiştir. Aynı sıcaklıkta, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından fermantasyon boyunca üretilen en düşük β-karoten derişimleri ise; kazein peptonunun fermantasyon ortamına katılmadığı; 19 numaralı deneyde tayin edilmiştir. Bu deney için fermantasyon süresince tayin edilen en yüksek β-karoten derişimi; 1.75 mg/L, en düşük β-karoten derişimi ise; 0.84 mg/L’dir.

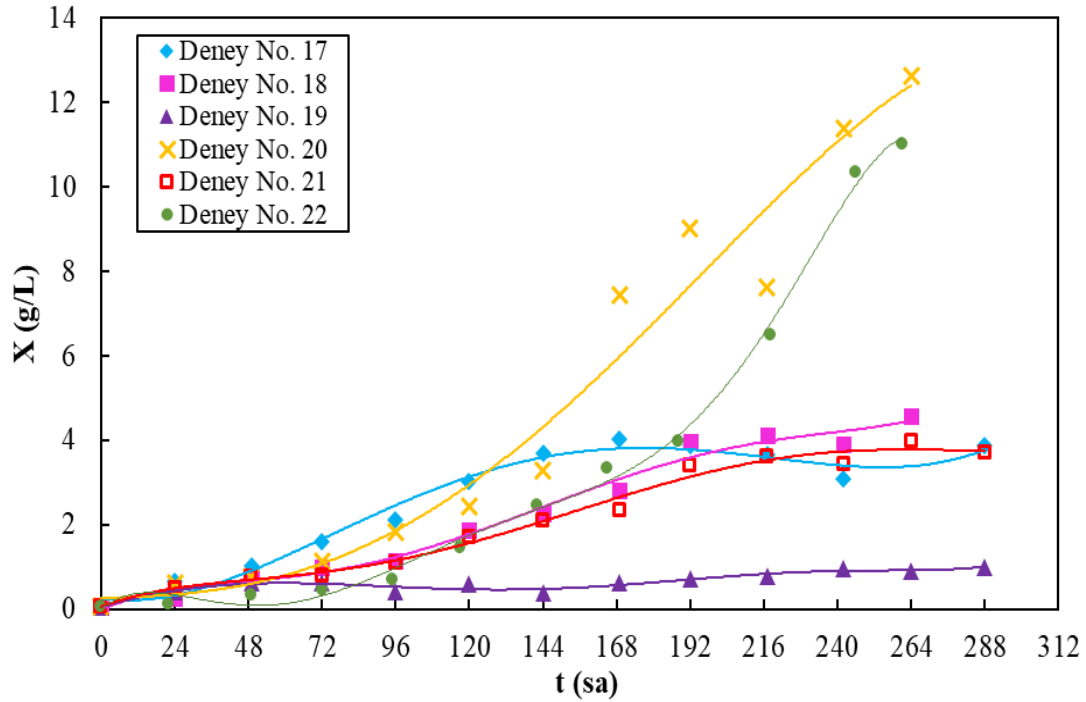


Şekil 4.19. 28°C’da gerçekleştirilen, 17-22 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Genel olarak bu gruptaki her bir deneyde değişkenlerden üçü merkez nokta değerinde tutulurken diğer bir parametre içinse çalışma aralığındaki uç değerlerin seçildiği görülmektedir. Çalışmadaki merkez nokta değerleri başlangıç fruktoz ve kazein peptonu derişimleri, başlangıç pH ve sıcaklık için sırasıyla; 50 g/L, 5 g/L, pH 6 ve 28°C olarak belirlenmiştir. 17 ve 18 numaralı deneyler karşılaştırıldığında sırasıyla; 10 g/L ve 90 g/L fruktoz derişimlerinde, 2.80 ve 3.02 mg/L en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ile birbirine yakın değerler belirlenmiştir. Bu sonuca göre; diğer parametrelerin merkez nokta değerlerinde iken fruktoz derişiminin  $\beta$ -karoten derişimi üzerinde pek etkili olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Hiç pepton ilave edilmemiş deney 19 ve seçilen aralık için, en yüksek derişimde pepton ilave edilmiş deney 20 ortamlarında elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri sırasıyla; 1.75 ve 5.24 mg/L olarak bulunmuştur. Bu sonuca bağlı olarak; ortamdaki yüksek pepton derişiminin  $\beta$ -karoten üretimini desteklediği bulgulanmıştır.

21 ve 22 numaralı deneylerde sadece başlangıç pH'ları farklıdır. Fermantasyon ortamı pH'ı 3 olan 21 numaralı deney ile pH'ın 9 olduğu 22 numaralı deneyde elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri sırasıyla; 4.20 ve 5.07 mg/L olarak belirlenmiştir. Diğer parametrelerin merkez nokta değerlerinde olduğu bu durumda, başlangıç pH'ındaki artışın çalışılan suşun  $\beta$ -karoten üretimini bir miktar desteklediği öngörülmektedir.

28°C'da gerçekleştirilen deneylerde biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



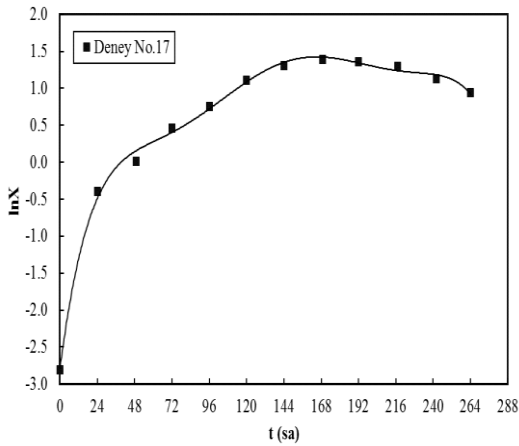
Şekil 4.20. 28°C'da gerçekleştirilen 17-22 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu grup içerisinde gerçekleştirilen deneylerde en yüksek biyokütle derişimi, en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin de elde edildiği; 20 numaralı deneyde, 12.64 g/L olarak 264. saatte elde edilmiştir. 22 numaralı deneyde elde edilen en yüksek biyokütle derişimi ise; 11.03 g/L olarak tayin edilmiştir.

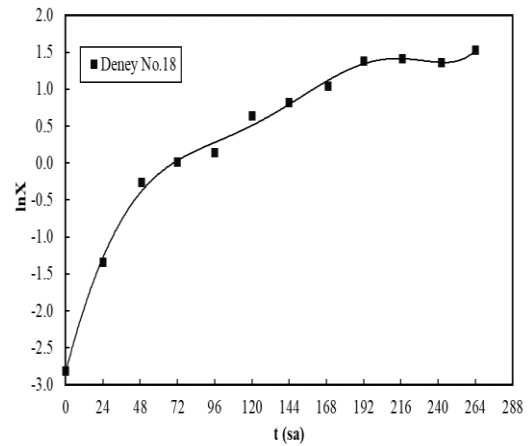
Bu çalışmada, 18, 17 ve 21 numaralı deneylerde, fermantasyon boyunca saptanan biyokütle derişimlerinin birbirlerine yakın oldukları ve en yüksek derişimlerin ise

sırasıyla; 4.59, 4.04 ve 3.97 g/L olduğu tespit edilmiştir. Bu deneylerde fermantasyon boyunca en düşük biyokütle derişimlerinin, ortam bileşiminde peptonun bulunmadığı; 19 numaralı deneyde elde edildiği saptanmıştır (bkz. Şekil 4.20). Bu deney için en yüksek biyokütle derişimi; 1.01 g/L olarak fermantasyonun sonunda tayin edilmiştir.

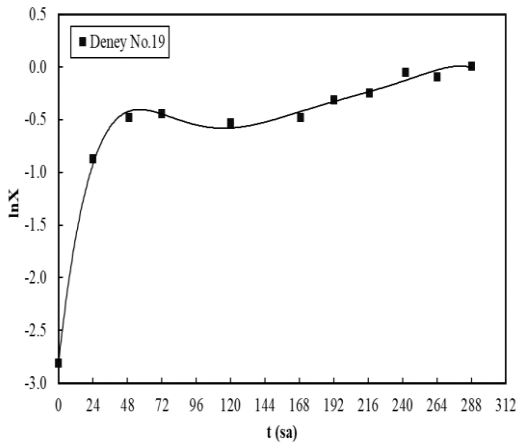
Bu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun özgül üreme hızları,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden hesaplanmıştır (Şekil 4.21a-f). *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ); 17-22 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.040, 0.048, 0.035, 0.033, 0.029 ve 0.045  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. En yüksek özgül üreme hızı, bu grupta yapılan deneylerde, 18 numaralı deneyde belirlenmiştir.



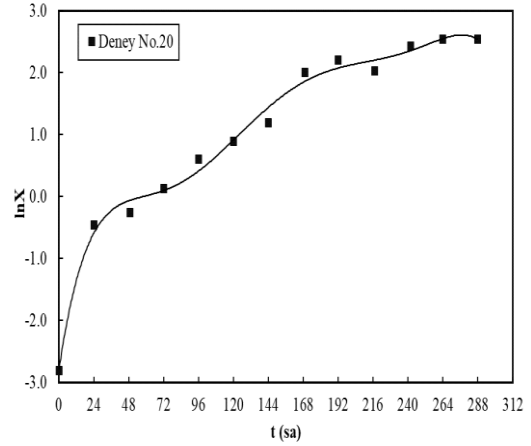
(a)



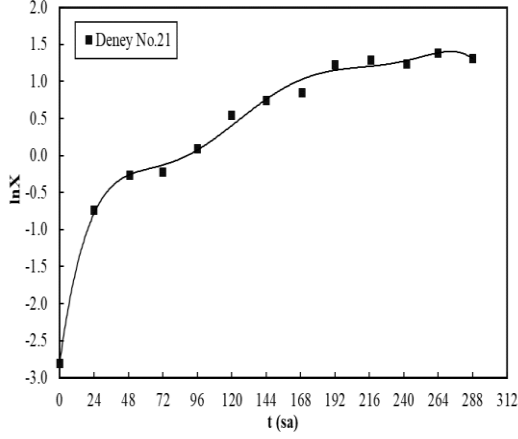
(b)



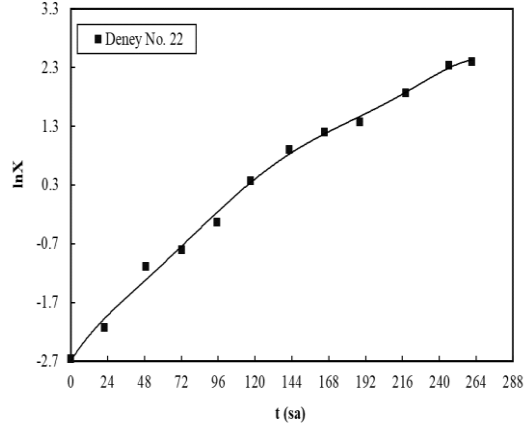
(c)



(d)



(e)



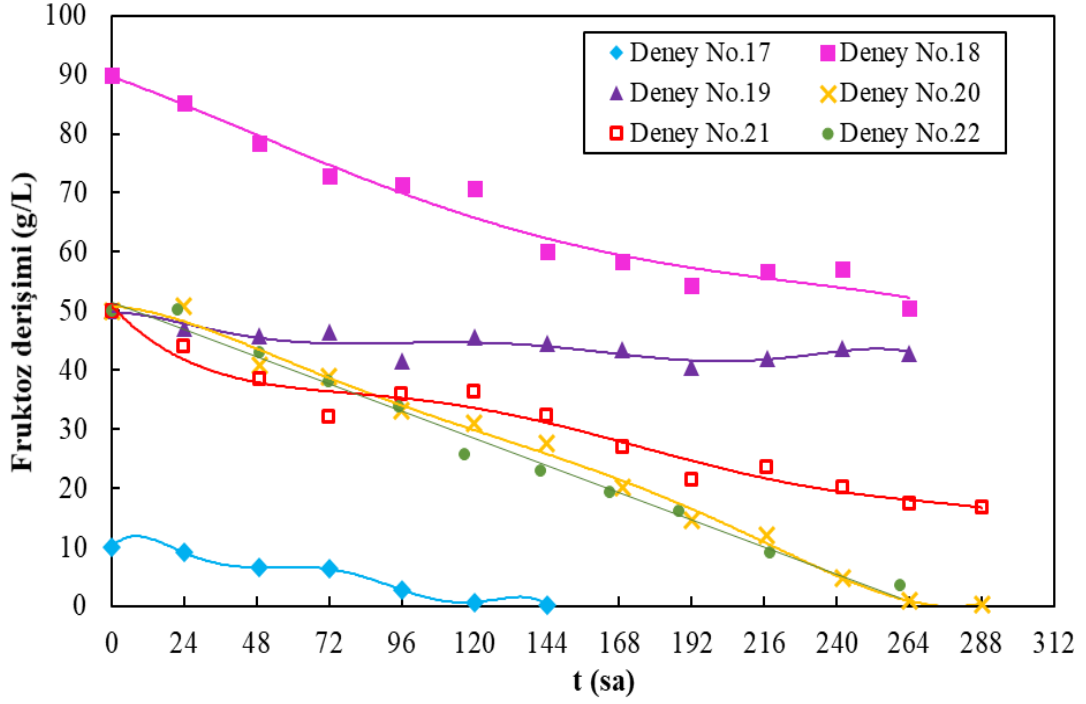
(f)

Şekil 4.21. 28°C’da gerçekleştirilen 17-22 (a-f) numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada ayrıca,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak, ürün oluşum hızları ve özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları da hesaplanmıştır. 17-22 numaralı deneyler için, en yüksek ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.021, 0.025, 0.018, 0.027, 0.026 ve 0.028 mg  $\beta$ -karoten/L.sa olarak belirlenmiştir.

Bunun yanısıra aynı grafiklerden yararlanılarak en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) sırasıyla; 0.0306, 0.1487, 0.0634, 0.0401, 0.0441 ve 0.3487 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre en yüksek ürün oluşum [0.028 (mg  $\beta$ -karoten/(L.sa)] ve en yüksek özgül ürün oluşum hızlarının [0.3487 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa)] 22 numaralı deneyde, fermantasyonun 22. saatinde elde edildiği tespit edilmiştir.

Bu grupta yapılan deneyler için fermantasyon ortamlarında bulunan fruktoz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik, Şekil 4.22’de verilmiştir.

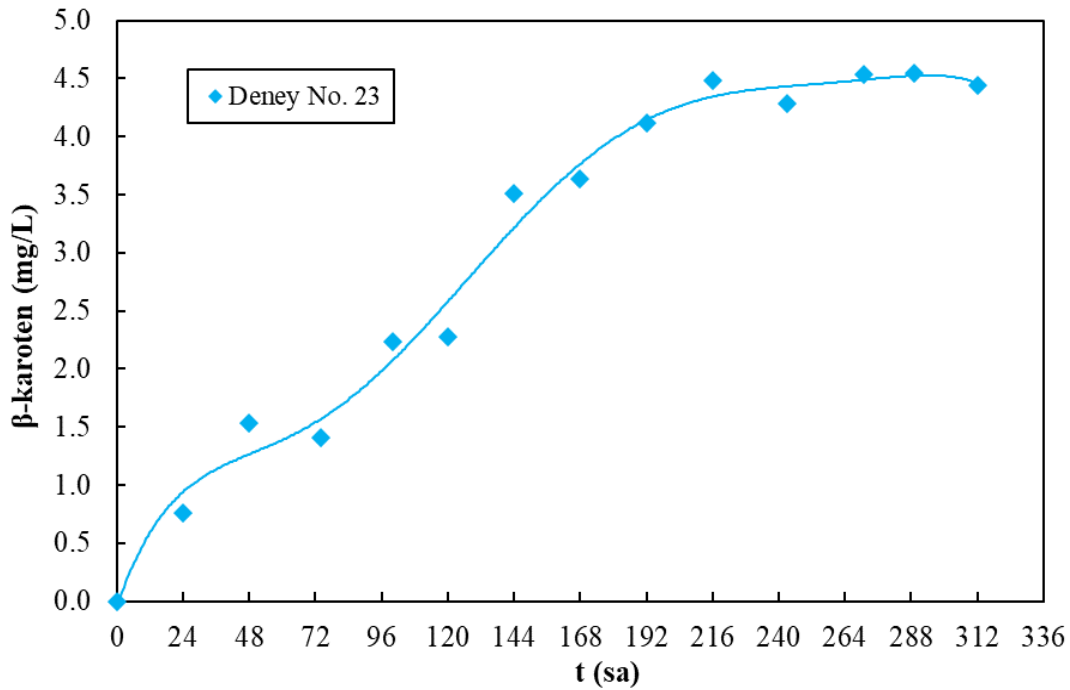


Şekil 4.22. 28°C’da gerçekleştirilen 17-22 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.22 incelendiğinde en kısa sürede gerçekleşen substrat tüketiminin, fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L olduğu 17 numaralı deneyde olduğu belirlenmiştir. Bu deneyde; fermantasyonun 144. saatinde ortamdaki substratın tamamen tüketildiği saptanmıştır. Ortam bileşimindeki fruktoz başlangıç derişiminin 50 g/L olduğu; 20 ve 22 numaralı deney koşullarında da substratın, fermantasyonun 264. saatinde tamamen tüketildiği tespit edilmiştir.

Bu gruptaki deneylerde, ortam bileşimindeki fruktoz başlangıç derişiminin en yüksek (90 g/L) olduğu 18 numaralı deney koşullarında ise; fermantasyon sonunda ortamdaki fruktozun büyük bir kısmının (53.1 g/L) tüketilmeden kaldığı belirlenmiştir. 21 numaralı deneyde ise; fermantasyon sonunda ortamda tüketilmeden kalan fruktoz derişiminin; 16.7 g/L olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon ortamı bileşiminde peptonun yer almadığı, 19 numaralı deney koşullarında, ortamdaki fruktozun nerdeyse hiç tüketilemediği belirlenmiştir.

Deney tasarımı planında yer alan; 23 ve 24 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi;  $2.1 \times 10^7$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. Ortam sıcaklığının 24°C olduğu, 23 numaralı deneyde, fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi; 50 g/L, pepton başlangıç derişimi; 5 g/L ve başlangıç pH'ı 6.0'dır (Çizelge 4.3). Bu deneyde, fermantasyon parametrelerinin incelenen çalışma aralıklarındaki, sıcaklık için en düşük olan değeri kullanılmıştır. 24°C'da gerçekleştirilen bu deneyde çalışılan suş tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değışimi, Şekil 4.23'de gösterilmiştir.

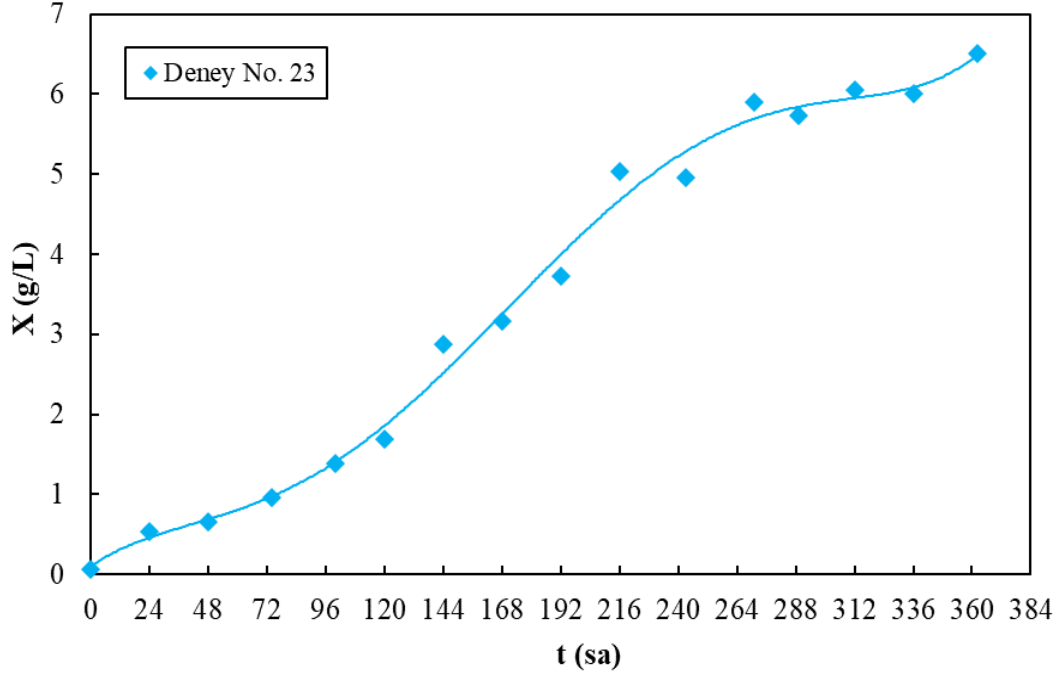


Şekil 4.23. 24°C'da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değışimi

Şekil 4.23 incelendiğinde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin, yaklaşık fermantasyonun 216. saatine kadar arttığı, daha sonra ise çok fazla değışmediği belirlenmiştir. Söz konusu deneyde incelenen suş tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin 4.55 mg/L olduğu tespit edilmiştir.



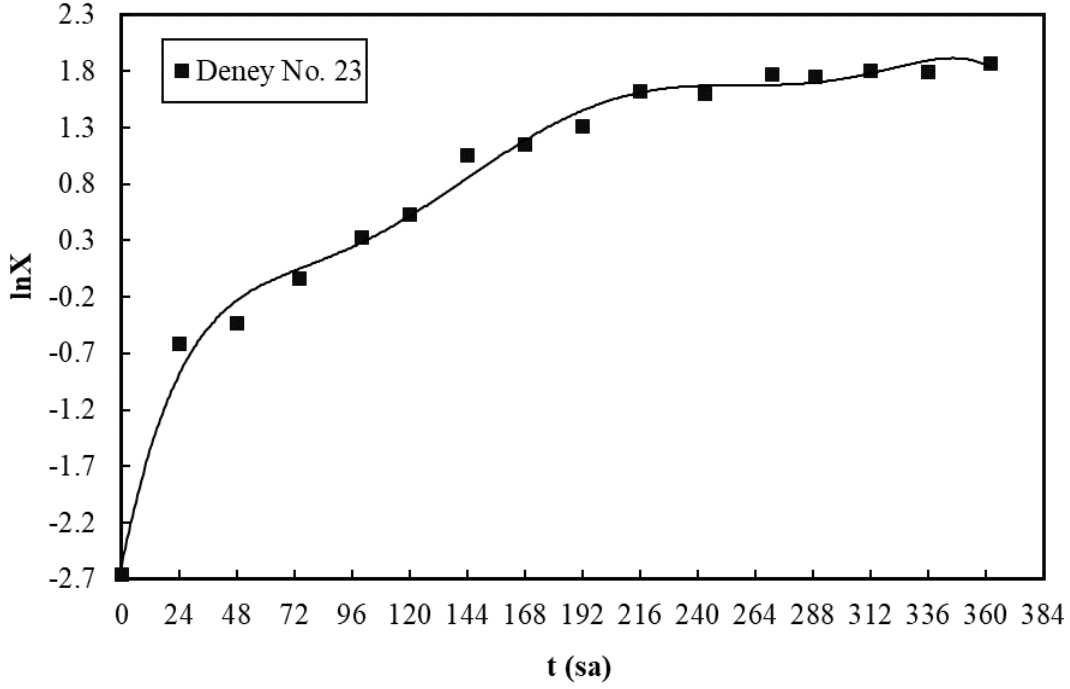
Bu deneyde, incelenen suşun biyokütle derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik ise; Şekil 4.24’de verilmiştir. Söz konusu grafik incelendiğinde; çalışılan suşa ait biyokütle derişiminin fermantasyon süresince arttığı ve en yüksek biyokütle derişiminin ise; 6.51 g/L olduğu belirlenmiştir



Şekil 4.24. 24°C’da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi

İncelenen suşa ait özgül üreme hızları,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafikten hesaplanmıştır (Şekil 4.25). 24°C’da, bu suşa ait üssel üreme bölgesindeki maksimum özgül üreme hızı ( $\mu$ ); 0.029 sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

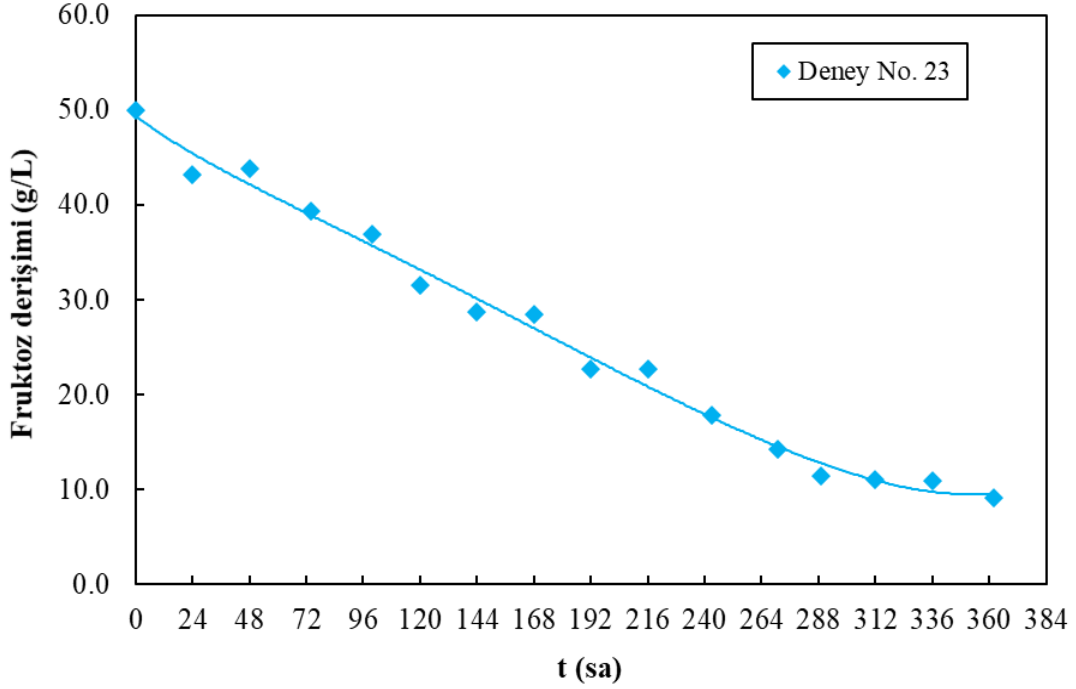
Bu çalışmada ayrıca,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak, en yüksek ürün oluşum ve özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) da hesaplanmıştır. 23 numaralı deney için en yüksek ürün oluşum hızı; 0.025 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak bulunmuş ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı ise; fermantasyonun 24. saatinde; 0.059 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.25. 24°C’da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin lnX değerlerinin zamanla değişimi

Bu deneyde, fermantasyon ortamında bulunan fruktoz derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik, Şekil 4.26’da verilmiştir. Söz konusu grafik incelendiğinde, ortamdaki fruktozun fermantasyon süresince tüketildiği ve fermantasyonun sonunda ortamda kalan fruktoz derişiminin ise; 9.2 g/L olduğu belirlenmiştir.

Deney tasarım planında yer alan 24 numaralı deney 32°C’da, fruktoz başlangıç derişimi; 50 g/L, pepton başlangıç derişimi; 5 g/L ve başlangıç pH’ı 6.0 olan bir fermantasyon ortamında gerçekleştirilmiştir. 24 numaralı deneyde, incelenen fermantasyon parametrelerinden sıcaklık; seçilen aralıkta en yüksek değeri olan 32°C’dir.

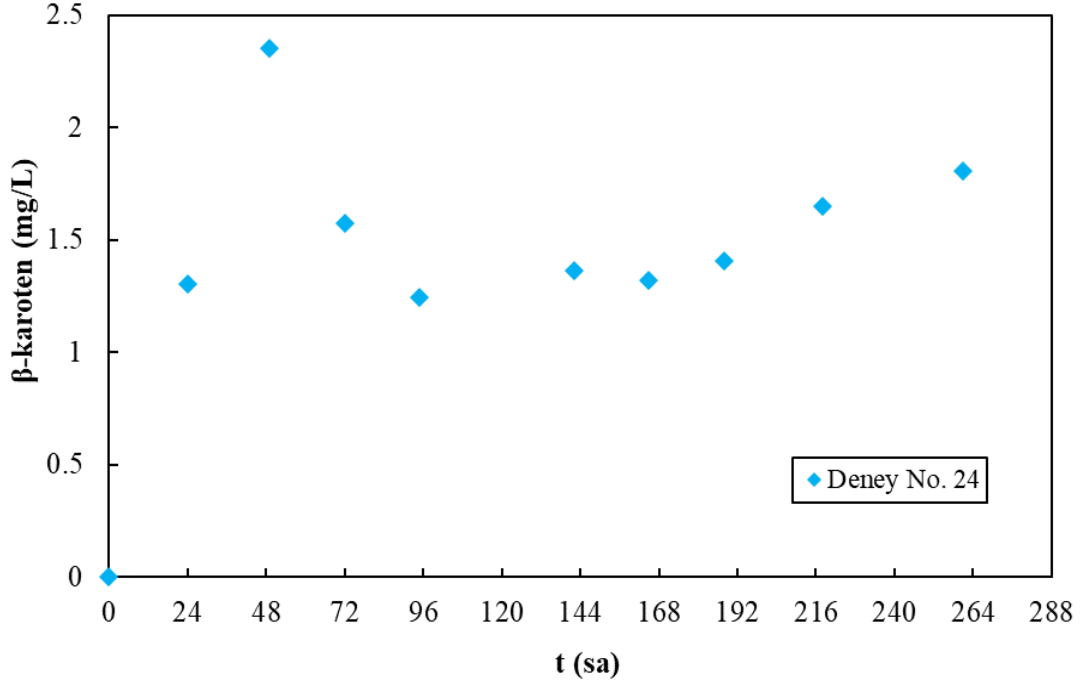


Şekil 4.26. 24°C’da gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi

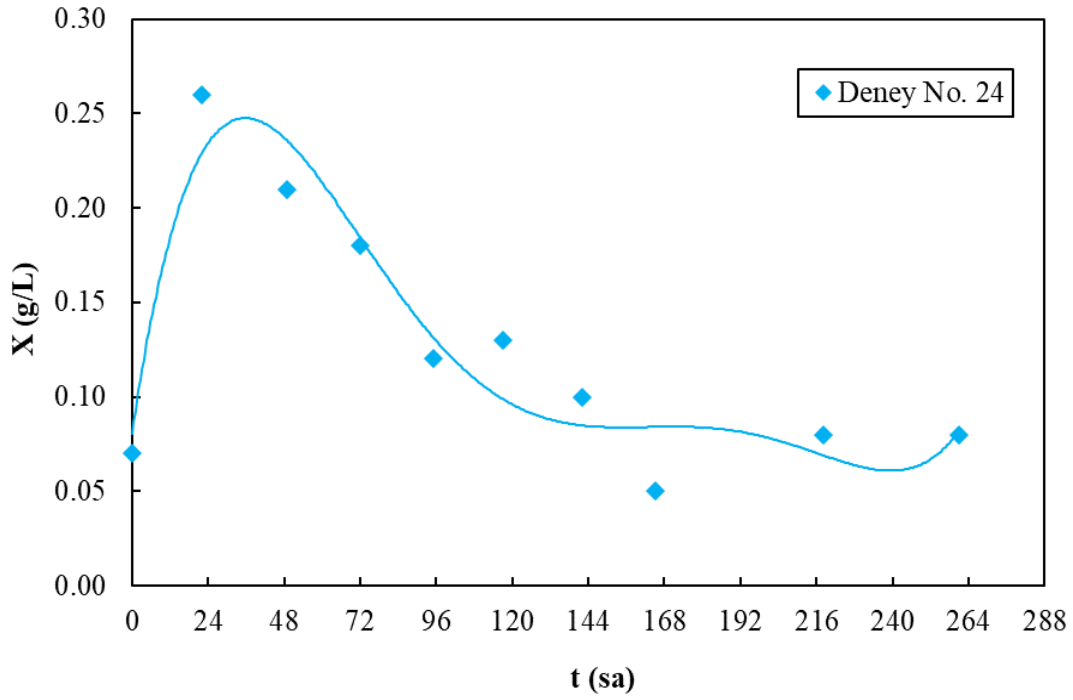
Söz konusu koşullarda yapılan deney için,  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik; Şekil 4.27’de verilmiştir. Bu deneyde, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 2.35 mg/L olarak fermantasyonun 49. saatinde elde edilmiştir. Bu saatten sonra ise  $\beta$ -karoten derişiminde bir azalma olduğu ve daha sonra ise; derişimin çok fazla değişmediği tespit edilmiştir.

Sıcaklık dışında diğer parametrelerin merkez nokta değerlerinde olduğu 23 ve 24 numaralı deneyler karşılaştırıldığında, çalışılan suşun  $\beta$ -karoten üretimini düşük sıcaklıkta (24°C) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

32°C’da gerçekleştirilen bu deneyde, biyokütle derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik; Şekil 4.28’de sunulmuştur. Söz konusu şekil incelendiğinde, çalışılan suş için en yüksek biyokütle derişimine (0.26 g/L), fermantasyonun 22. saatinde ulaşıldığı görülmektedir. Bu deneyde, biyokütle derişiminin düşük olmasının, çalışılan ortam sıcaklığının (32°C) maya gelişimini olumsuz etkilemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



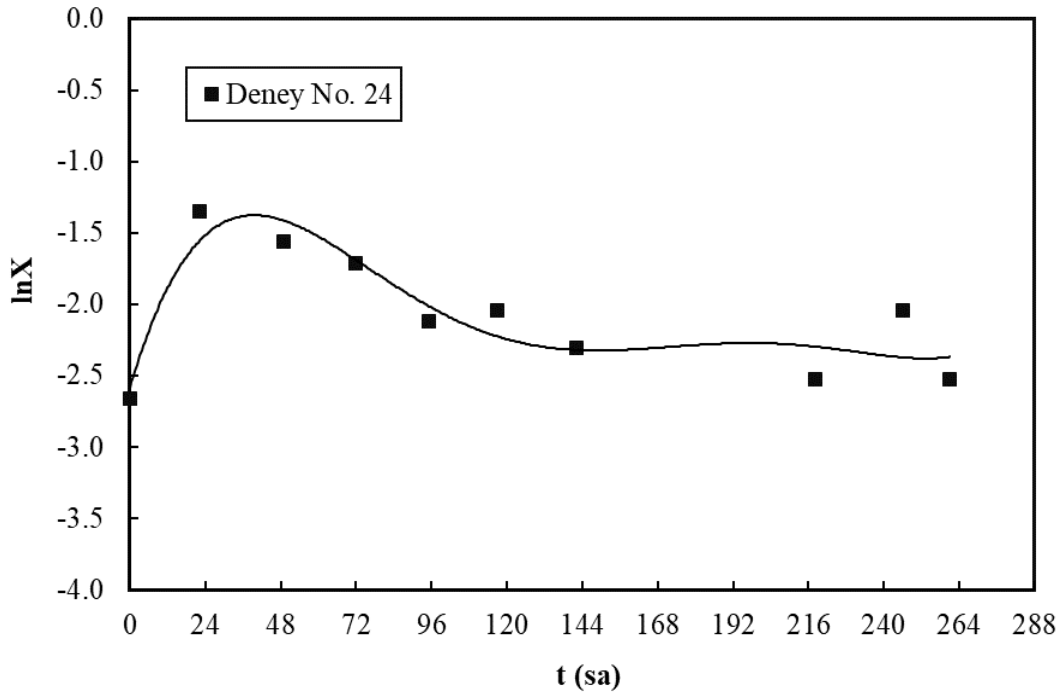
Şekil 4.27. 32°C’da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimi



Şekil 4.28. 32°C’da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi

Bu deneyde de, incelenen suşun özgül üreme hızının hesaplanabilmesi için,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimini gösteren bir grafik çizilmiştir (Şekil 4.29). *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu için üssel üreme bölgesindeki en yüksek özgül üreme hızı ( $\mu$ );  $0.052 \text{ sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

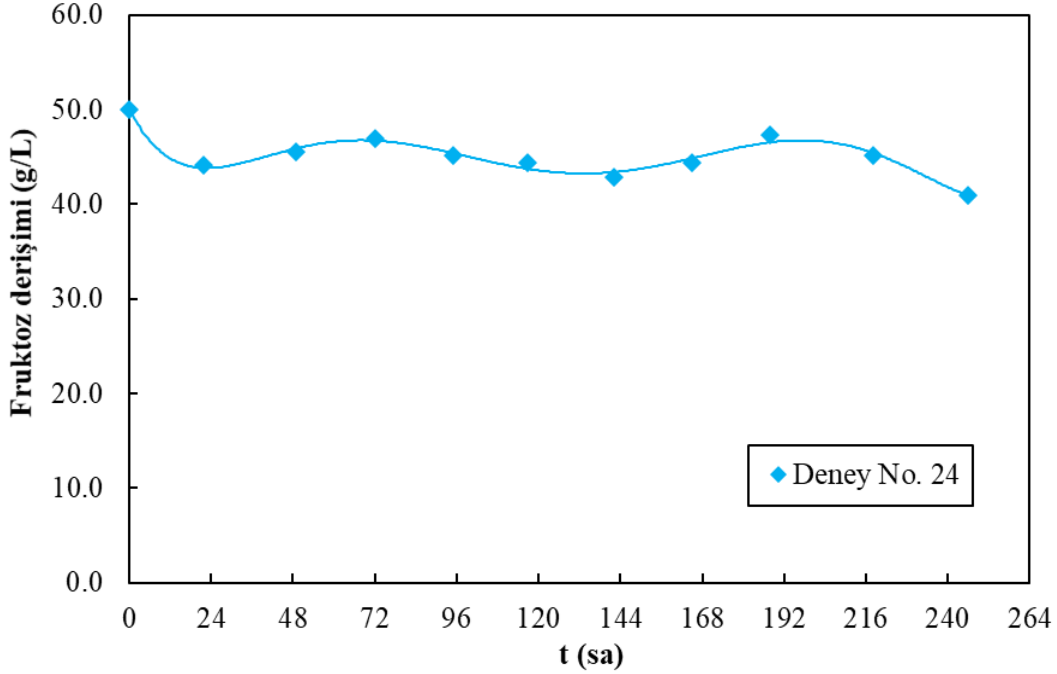
Bu çalışmada ayrıca,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak en yüksek ürün oluşum ve özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları da hesaplanmıştır. 24 numaralı deney için en yüksek ürün oluşum hızı fermantasyonun 22. saatinde  $0.021 \text{ mg } \beta\text{-karoten}/(\text{L}\cdot\text{sa})$  olarak belirlenirken, özgül ürün oluşum hızı ( $\gamma_m$ ) ise;  $0.1885 \text{ mg } \beta\text{-karoten}/(\text{g mo}\cdot\text{sa})$  olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.29. 32°C'da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimi

32°C'da gerçekleştirilen bu deneyde, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik ise; Şekil 4.30'da verilmiştir. Söz konusu grafik incelendiğinde, ortamdaki fruktozun, fermantasyon süresince çok az tüketildiği belirlenmiştir. Başlangıç fruktoz derişimi  $50 \text{ g/L}$  olan ortamda, fermantasyon sonunda

tüketilmeden kalan şeker derişimi; 41 g/L olarak tespit edilmiştir. Deneme planında incelenen en yüksek sıcaklık olan 32°C'nin, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üreme ve substrat kullanma kapasitesini olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

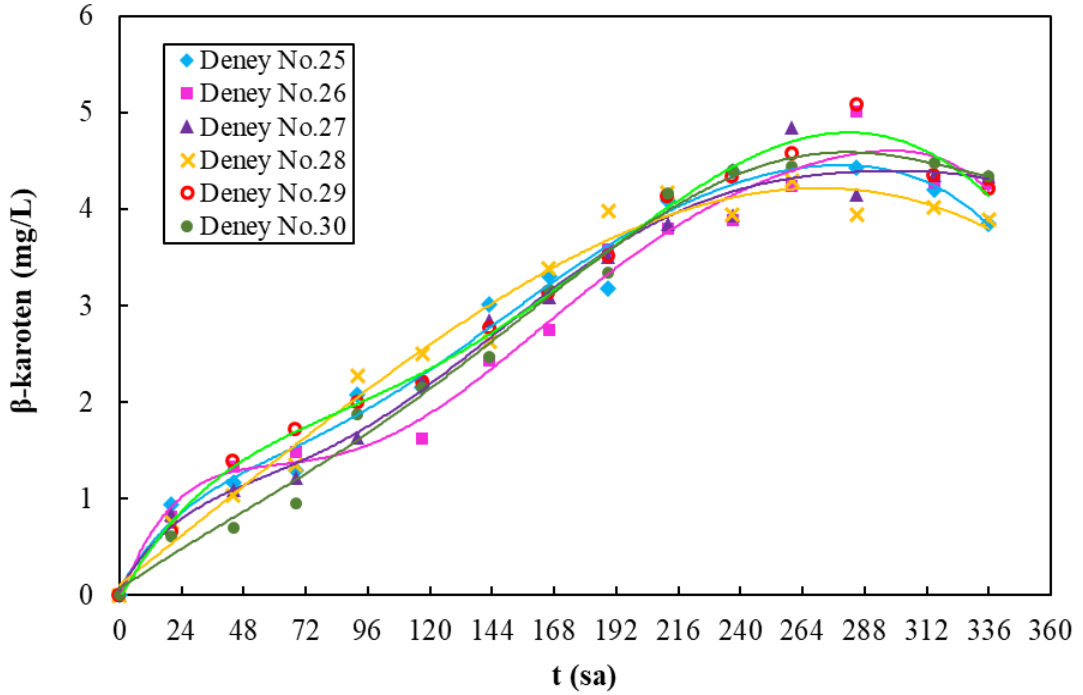


Şekil 4.30. 32°C'da gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi

Çizelge 4.4'de verilmiş olan deney tasarım planındaki 25-30 numaralı olarak sunulan deneyler, merkez nokta olarak adlandırılan koşullarda yapılan deneylerdir. Bu deneyler, fruktoz başlangıç derişimi; 50 g/L, pepton başlangıç derişimi; 5 g/L ve başlangıç pH'ı 6 ve ortam sıcaklığı 28°C olan fermantasyon koşullarında, altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmişlerdir. 25-30 numaralı deneylerde; *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun fermantasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimi;  $2.6 \times 10^7$  kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Bu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.31'de sunulmuştur. Şekil 4.31 incelendiğinde, merkez noktada gerçekleştirilen 6 deneyde elde edilen  $\beta$ -karoten

derişimlerinin, fermantasyonun yaklaşık 288. saatine kadar arttıkları, daha sonra ise bir miktar azaldıkları belirlenmiştir. Söz konusu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi, fermantasyonun 285. saatinde 5.08 mg/L olarak tayin edilmiştir.

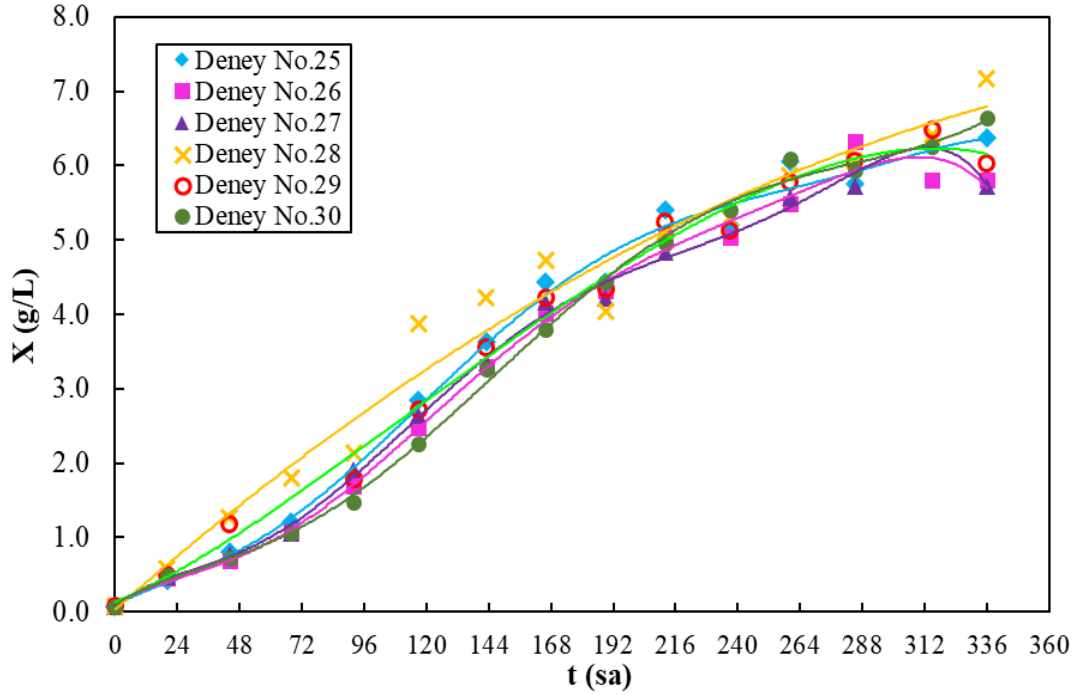


Şekil 4.31. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

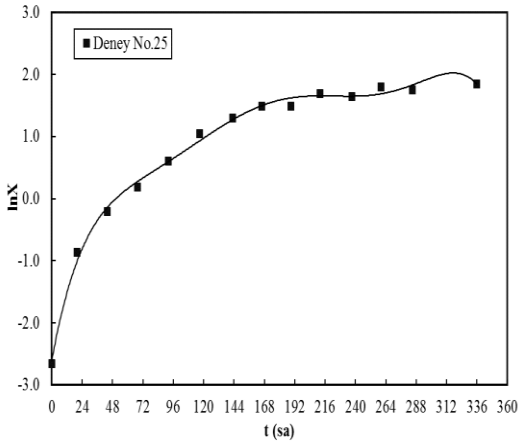
25-30 numaralı deneyler için, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.32’de sunulmuştur. Merkez nokta koşullarında yapılan bu deneylerde *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşuna ait en yüksek biyokütle derişimlerinin; 6.33-7.17 g/L arasında değiştikleri tespit edilmiştir.

Çalışmanın bu kısmında ayrıca, deneyler sonucunda elde edilen kuru hücre ağırlıklarından yararlanılarak hesaplanan  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler de oluşturulmuş ve bu grafiklerden, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun özgül üreme hızları hesaplanmıştır (Şekil 4.33a-f). 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneyler için, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125

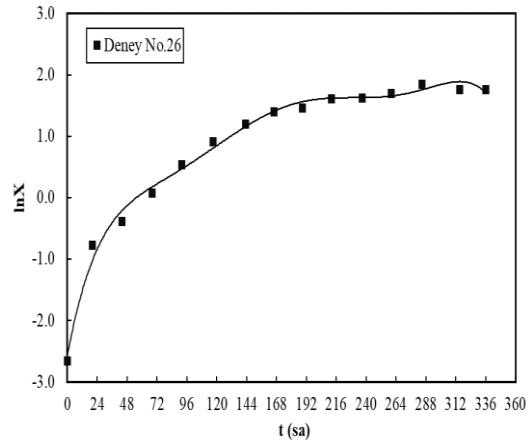
suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ) sırasıyla; 0.025, 0.025, 0.025, 0.030, 0.030 ve 0.025  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Merkezdeki koşullarda yapılan bu deneylerdeki en yüksek özgül üreme hızı ( $\mu$ ) değeri; 0.030  $\text{sa}^{-1}$  olarak, 28 ve 29 numaralı deneylerde elde edilmiştir.



Şekil 4.32. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

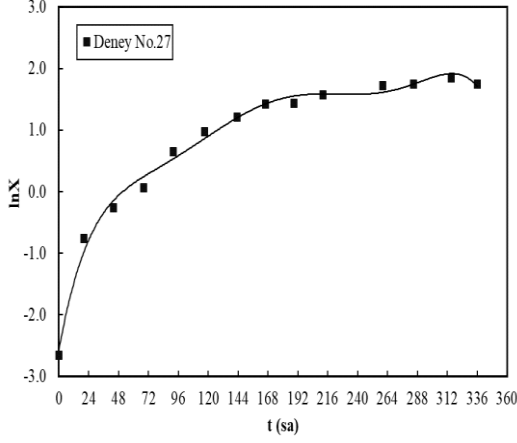


(a)

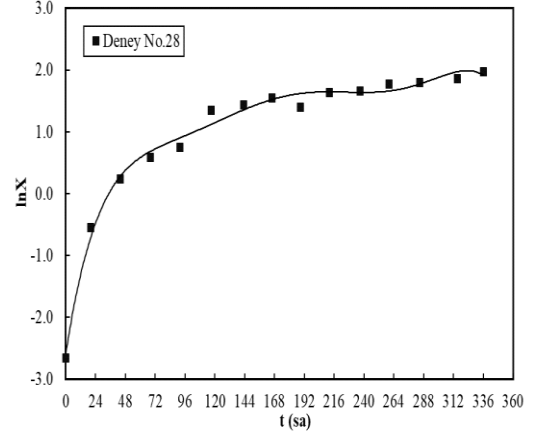


(b)

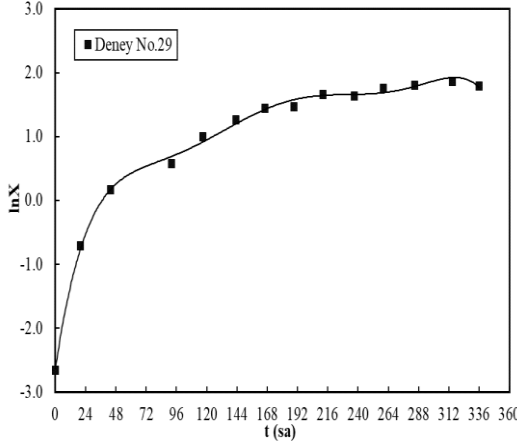




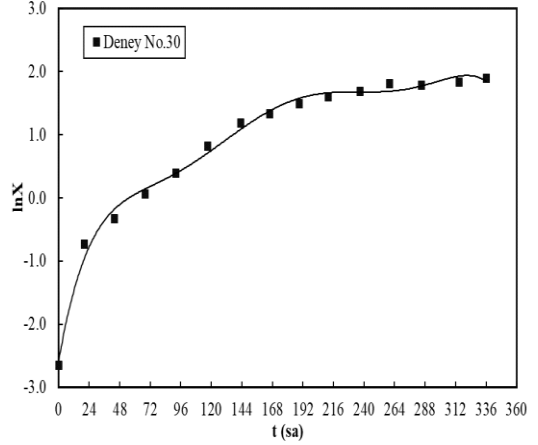
(c)



(d)



(e)



(f)

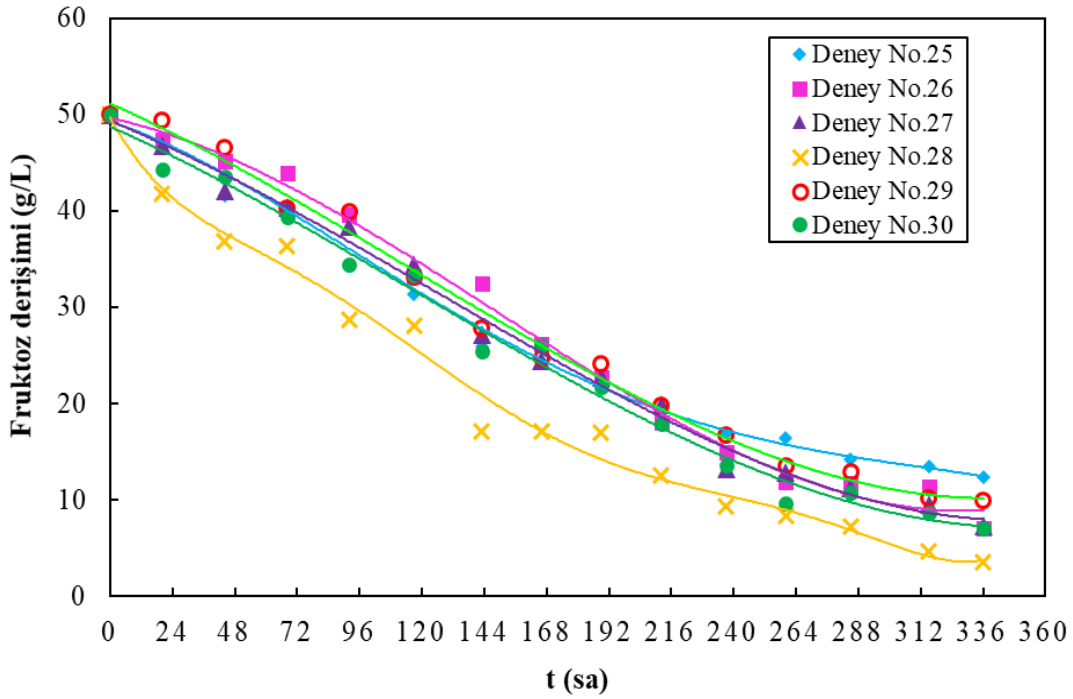
Şekil 4.33. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı (a-f) deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada ayrıca,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak en yüksek ürün oluşum hızları (Y3) ve maksimum özgül  $\beta$ -karoten oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) da hesaplanmıştır.

25-30 numaralı deneyler için Y3 değerleri sırasıyla; 0.023, 0.019, 0.021, 0.023, 0.022 ve 0.020 mg  $\beta$ -karoten/L.sa olarak hesaplanırken maksimum özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) ise sırasıyla; 0.0675, 0.0675, 0.0562, 0.0427, 0.0648 ve 0.0356 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak belirlenmiştir.

Bu deneylere ait en yüksek ürün oluşum ve maksimum özgül  $\beta$ -karoten oluşum hızlarının birbirlerine oldukça yakın oldukları gözlemlenmiştir. Belirlenen en yüksek özgül  $\beta$ -karoten oluşum hızı 25 ve 26 numaralı deneylerde; 0.0675 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak, fermantasyonun yaklaşık olarak 24. saatinde tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.34’de verilmiştir. Şekil 4.34 incelendiğinde, tüm deneylerde fermantasyon süresince ortamdaki fruktozun tüketildiği ve süre sonunda fermantasyon ortamlarında kalan fruktoz derişimlerinin ise; 3.50-12.30 g/L arasında değiştiiği belirlenmiştir.



Şekil 4.34. 28°C’da gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Yapılan tüm deneyler ve merkezde tekrar edilen deneyler, merkez noktasındaki koşulların yüksek  $\beta$ -karoten derişimi için uygun olduğunu kanıtlar nitelikte sonuçlar vermiştir. Araştırmanın sonraki kısmında, tüm bu deney sonuçlarının istatistiksel olarak yorumlanarak anlamlandırılması için bazı analizler yapılarak istenen tüm yanıtlar için modeller oluşturulmuştur.

#### 4.5. Çalışmada Seçilen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmelerine İlişkin Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan deney tasarım planındaki tüm deneyler gerçekleştirilerek çeşitli yanıt değerleri elde edilmiş ve ve elde edilen bu bağımlı değişkenler (yanıtlar) üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren model eşitlikler türetilmiştir. Bu model eşitliklerin türetilmesinde bağımsız değişkenler olarak; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ), başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ve sıcaklık ( $X_4$ ) seçilirken, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ), özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) ve en yüksek  $\beta$ -karoten oluşum hızı ( $Y_3$ ) bağımlı değişkenler olarak (yanıtlar) olarak belirlenmiştir. Bu aşamada gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlerin değerleri, Çizelge 4.6'da sunulmuştur. Söz konusu çizelge incelendiğinde, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin ( $Y_1$ ); 1.75-5.26 mg/L, özgül üreme hızlarının ( $Y_2$ ); 0.020-0.070 sa<sup>-1</sup> ve maksimum  $\beta$ -karoten oluşum hızlarının ( $Y_3$ ) ise; 0.017-0.036 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) aralığında değiştikleri saptanmıştır.

Seçilen bağımsız değişkenlerin her bir bağımlı değişken üzerindeki etkilerini gösteren model denklemlerin türetilmelerini için, Design Expert 10.0.6.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı kullanılarak çoklu regresyon analizi yapılmıştır. Söz konusu eşitliklerin türetilmesinde, ilgili program tarafından önerilen ikinci dereceden bir model denklem kullanılmıştır. Daha sonra ise, gerçekleştirilen her bir modelleme çalışması için aynı program yardımıyla, varyans (ANOVA) analizleri de yapılmıştır.

Modellerin gerçek cevaplara uygunluklarına ise; her bir modelin önemli ( $p < 0.01$ ) bulunması, uyum eksikliğinin önemsiz ( $p > 0.05$ ) olması ve ilgili modele ait belirleme katsayısı değerinin ( $R^2$ ) ise; 0.75'den büyük olması durumu dikkate alınarak, yapılan bir inceleme sonucunda karar verilmiştir.

Yukarıda belirtilen analizlerin tamamlanmasından sonra ise; her bir yanıt için elde edilen deneysel sonuçların, söz konusu program yardımıyla, model eşitlikler kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile karşılaştırıldıkları grafikler de çizilmiştir (Şekil 4.41, 4.48, 4.55).

Çizelge 4.6. Merkezi karma tasarım yöntemine gerçekleştirilen deneylerde elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ( $Y_1$ ), özgül üreme hızları ( $Y_2$ ) ve en yüksek  $\beta$ -karoten oluşum hızları ( $Y_3$ )

Deney No	$Y_1$ (mg/L)	$Y_2$ (sa <sup>-1</sup> )	$Y_3$ [mg $\beta$ -karoten/(L.sa)]
1	3.23	0.044	0.024
2	2.14	0.025	0.021
3	5.09	0.055	0.033
4	4.05	0.021	0.027
5	3.53	0.038	0.022
6	3.04	0.050	0.023
7	4.57	0.033	0.032
8	4.41	0.038	0.031
9	3.41	0.028	0.021
10	3.55	0.028	0.017
11	4.59	0.050	0.023
12	5.26	0.030	0.027
13	3.93	0.020	0.026
14	4.50	0.056	0.028
15	3.76	0.038	0.026
16	5.26	0.070	0.036
17	2.80	0.040	0.021
18	3.02	0.048	0.025
19	1.75	0.035	0.018
20	5.24	0.033	0.027
21	4.20	0.029	0.026
22	5.07	0.045	0.028
23	4.55	0.029	0.025
24	2.35	0.052	0.021
25	4.43	0.025	0.023
26	5.01	0.025	0.019
27	4.85	0.025	0.021
28	4.30	0.030	0.023
29	5.08	0.030	0.022
30	4.48	0.025	0.020

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ); en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model denklem Eş. 4.1'de verilmiştir. Söz konusu modelleme çalışması ile ilgili varyans analizi sonuçları ise; Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

$$Y_1 = - 40.81563 - 0.19746X_1 + 1.84600X_2 + 0.070139X_3 + 3.19073X_4 + 2.3 \times 10^{-3} X_1X_2 + 5.70833 \times 10^{-3} X_1X_3 + 8.84375 \times 10^{-3} X_1X_4 - 0.061X_2X_3 - 0.033750X_2X_4 - 8.33333 \times 10^{-3} X_3X_4 - 9.47917 \times 10^{-4} X_1^2 - 0.037267X_2^2 + 0.023148X_3^2 - 0.061042X_4^2 \quad (4.1)$$

Çizelge 4.7'de yer alan varyans analizi sonuçları incelendiğinde, bağımsız değişkenlerin maksimum  $\beta$ -karoten derişimine etkilerini gösteren model önemli bulunmuştur. Ayrıca, maksimum  $\beta$ -karoten derişimi üzerine; pepton başlangıç derişiminin lineer etkisi ile fruktoz başlangıç derişiminin karesel etkisinin de önemli oldukları belirlenmiş olup, buna ek olarak, fruktoz başlangıç derişimi ile sıcaklığın ikili etkileşiminin de önemli olduğu ( $p < 0.05$ ) tespit edilmiştir. Bunların sonucunda,  $\beta$ -karoten üretimi için modeldeki önemli terimler;  $X_2$ ,  $X_1^2$ ,  $X_1X_4$  olarak belirlenmiştir.

Bu denkleme göre, maksimum  $\beta$ -karoten derişimi için önemli bulunan; pepton derişiminin lineer etki katsayısı ve fruktoz ile sıcaklık ikili etkileşim katsayısının işaretleri pozitif iken, fruktozun karesel etki katsayısının işareti negatif bulunmuştur.

Seçilen dört bağımsız değişkenin, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerindeki etkilerini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.35-4.40'da verilmiştir. Söz konusu grafiklerin çizimi, her bir grafik üzerinde yer almayan bağımsız değişkenlerin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç pH değeri 6.0 olan fermantasyon ortamlarında, 28°C'da, fermantasyon ortamındaki fruktoz ve pepton başlangıç derişimlerinin maksimum  $\beta$ -karoten derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.35'de verilmiştir.

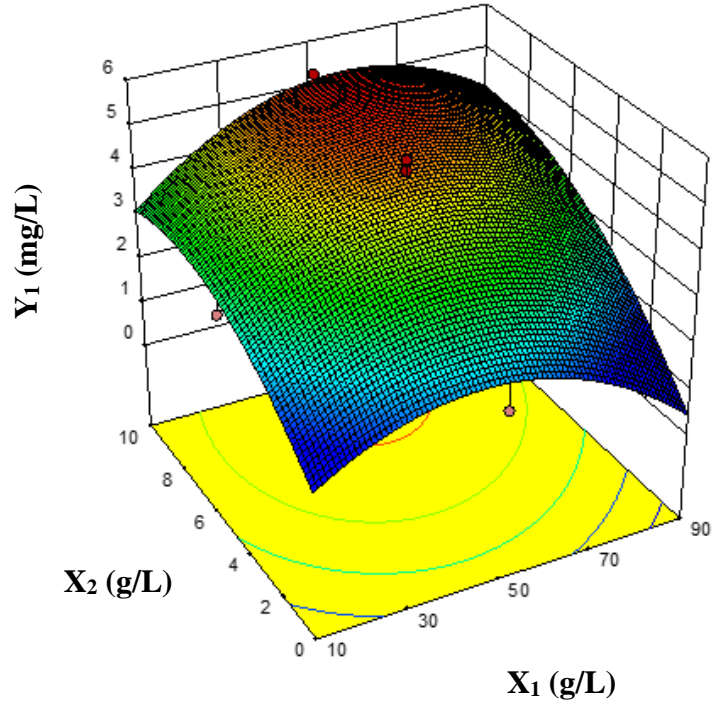
Çizelge 4.7. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ), en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerindeki etkilerine ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F	P	
Model	14	1.59	4.31**	0.0040	Önemli
$X_1$	1	0.012	0.033	0.8584	
$X_2$	1	11.54	31.27**	<0.0001	
$X_3$	1	0.49	1.32	0.2684	
$X_4$	1	0.002	0.005	0.9473	
$X_1X_2$	1	0.21	0.57	0.4606	
$X_1X_3$	1	0.47	1.27	0.2771	
$X_1X_4$	1	2.00	5.43*	0.0342	
$X_2X_3$	1	0.84	2.27	0.1527	
$X_2X_4$	1	0.46	1.24	0.2839	
$X_3X_4$	1	0.010	0.027	0.8714	
$X_1^2$	1	3.94	10.69**	0.0052	
$X_2^2$	1	1.49	4.03	0.0630	
$X_3^2$	1	0.074	0.20	0.6598	
$X_4^2$	1	1.64	4.43	0.0525	
Uyum eksikliği	10	0.50	4.59	0.0533	Önemsiz
Hata	5	0.11			
Genel	29				

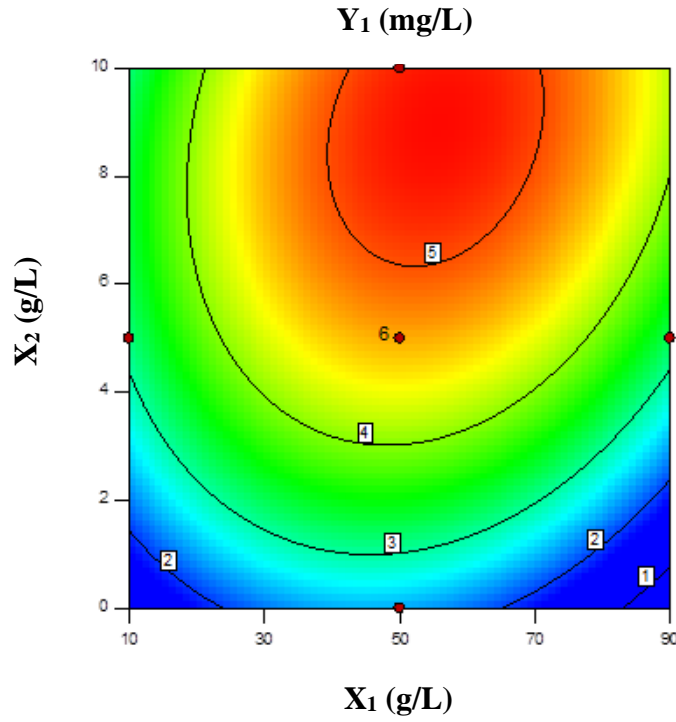
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Şekil 4.35 a'daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin, bileşiminde pepton bulunmayan fermantasyon ortamlarında; fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L' den 50 g/L'ye artmasıyla önce arttığı; 50 g/L'den daha yüksek olan fruktoz başlangıç derişimlerinde ise giderek azaldığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan fruktoz başlangıç derişim aralığındaki sabit bir fruktoz başlangıç derişimi için genel olarak, ortamdaki başlangıç pepton derişiminin artması ile maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin de arttığı belirlenmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.35. Maksimum  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_3 = 6.0$ ,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

Bu grafikten, fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi; 55.3 g/L, pepton başlangıç derişimi; 8.9 g/L ve başlangıç pH'ı 6 olduğunda, 28°C'da, fermantasyon sonucunda elde edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin; 5.23 mg/L olacağı tespit edilmiştir.

Şekil 4.35 b'deki kontur grafiğı incelendiğinde, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin, bileşiminde, yaklaşık 30-80 g/L başlangıç derişim aralığında fruktoz ve 6 g/L'den daha yüksek başlangıç derişiminde pepton içeren fermantasyon ortamlarında elde edildiğı belirlenmiştir.

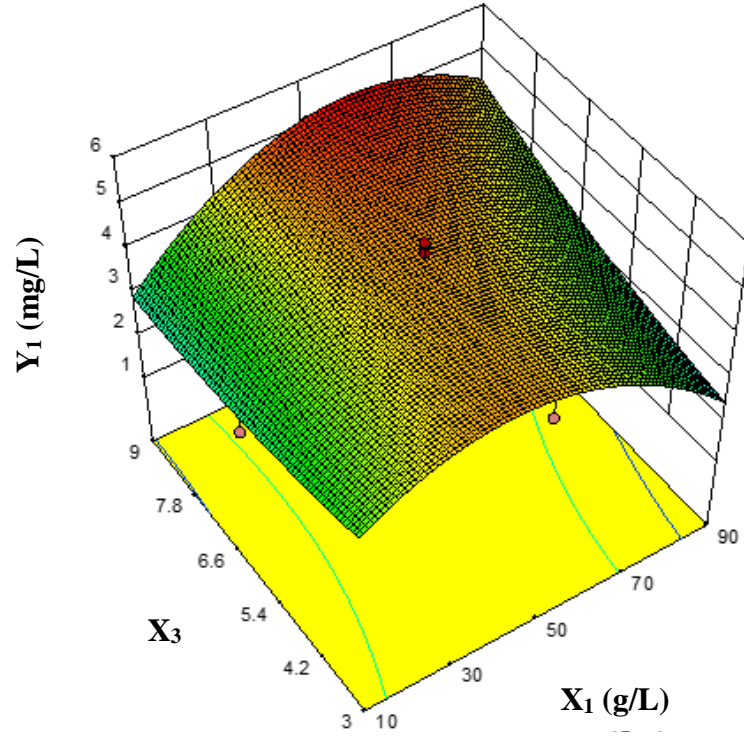
Peptonun başlangıç derişiminin 5 g/L olarak sabit tutulduğu fermantasyon ortamlarında, 28°C'da, fruktoz başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının maksimum  $\beta$ -karoten derişimi üzerindeki etkilerini gösteren grafikler ise Şekil 4.36'da verilmiştir.

Şekil 4.36 a'daki yanıt yüzey grafiğı incelendiğinde, başlangıç pH'ı 3 olan fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilecek olan deneylerden elde edilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin, ortamın başlangıç fruktoz derişiminin 10 g/L'den 50 g/L'ye kadar artmasıyla önce arttığı, 50 g/L'den daha yüksek olan başlangıç fruktoz derişimlerinde ise azaldığı bulunmuştur.

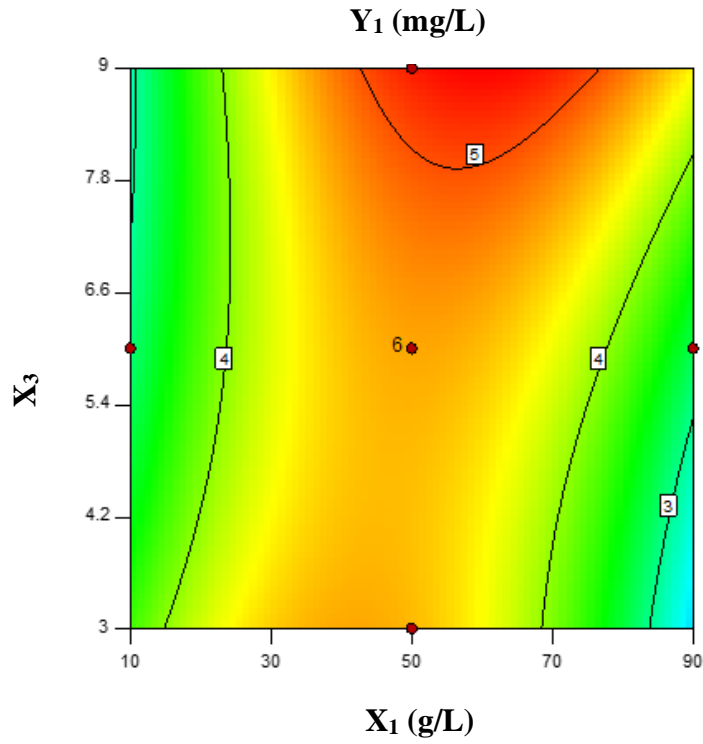
Başlangıç pH'ının 9 olduğu fermantasyon ortamlarında ise, fermantasyon sonucunda elde edilebilecek olan maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, başlangıç fruktoz derişiminin 10 g/L'den 70 g/L'ye kadar artmasıyla önce arttığı, daha yüksek başlangıç fruktoz derişimlerinde ise azaldığı tespit edilmiştir.

Fruktozun başlangıç derişiminin 90 g/L değerinde sabit olduğu fermantasyon ortamlarında üretilebilecek olan maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin ise, fermantasyon ortamlarının başlangıç pH değerinin artmasıyla arttığı saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişimi 10 g/L olan fermantasyon ortamlarında, ortamın başlangıç pH değerindeki değişikliklerin, fermantasyon sonucunda elde edilebilecek olan maksimum  $\beta$ -karoten miktarını ise değıştirmedeğı belirlenmiştir.





(a)

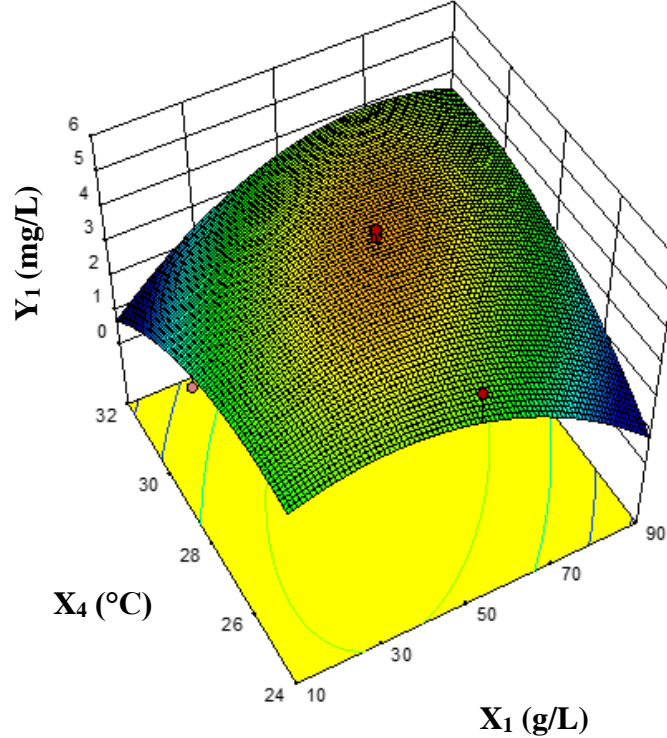


(b)

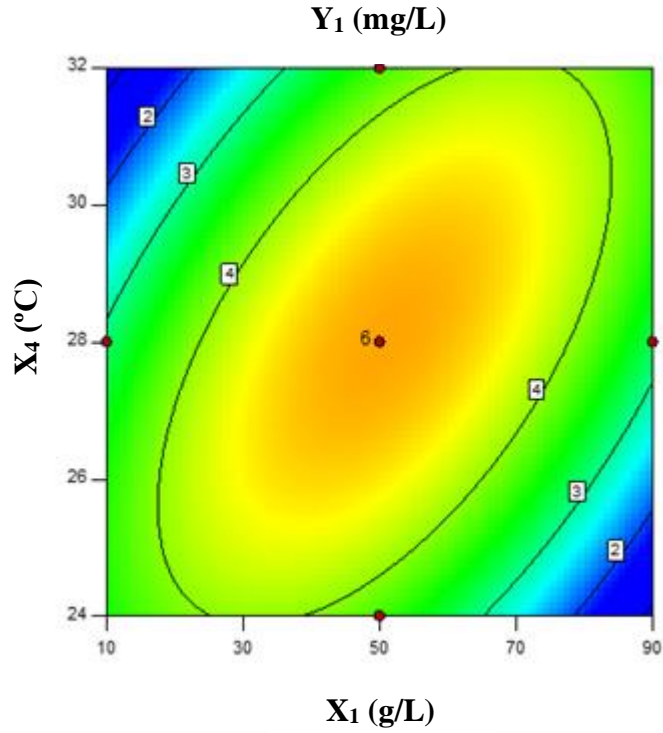
Şekil 4.36. Maksimum  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$  g/L,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

Şekil 4.36 b’de yer alan kontur grafiği incelendiğinde, başlangıç pH’ı yaklaşık 7.8-9.0 ve başlangıç fruktoz derişimi ise yaklaşık 43-76 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin de yüksek değerlere ulaşacağı tespit edilmiştir. Söz konusu grafikten, fruktoz başlangıç derişimi 90 g/L ve başlangıç pH’ı 3 olan bir fermantasyon ortamında elde edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin 2.46 mg/L olacağı belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamı pepton başlangıç derişiminin 5 g/L, başlangıç pH’ının ise 6 olduğu fermantasyon koşullarında, fruktoz başlangıç derişimi ve sıcaklığın elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.37’de sunulmuştur. Söz konusu grafiklerden yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, bağımsız değişkenlerden fruktoz başlangıç derişimi 90 g/L olan fermantasyon ortamlarında, farklı sıcaklıklarda yapılacak olan deneylerden elde edilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, sıcaklığın 24°C’den 28°C’a artmasıyla yaklaşık 3.5 ve 28°C’den 32°C’a artmasıyla ise; yaklaşık 1.1 kat arttığı tespit edilmiştir.



(a)



(b)

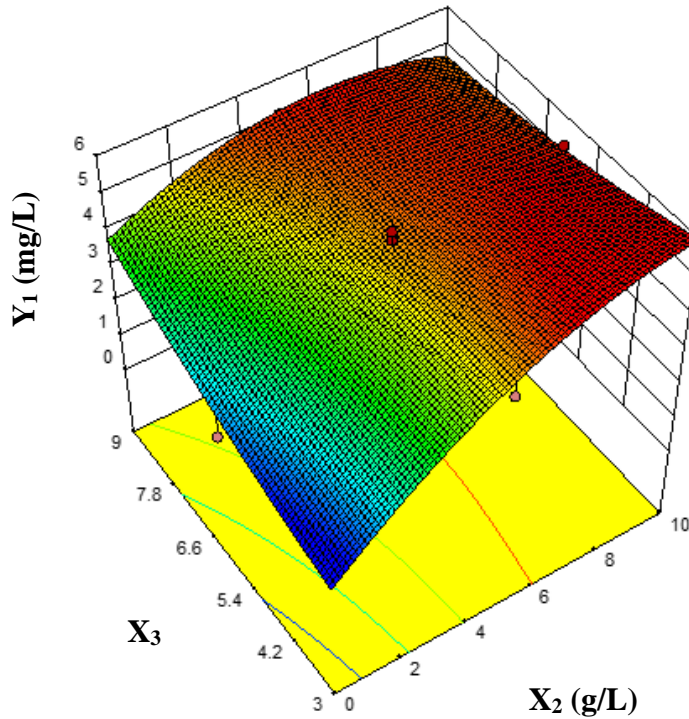
Şekil 4.37. Maksimum  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişiminin ( $X_1$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$  g/L,  $X_3 = 6.0$ )

Ayrıca, 32°C’da elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L’den yaklaşık 70 g/L’ye kadar artmasıyla önce arttığı, daha sonra ise, bir miktar azaldığı da belirlenmiştir. Şekil 4.37 b’de sunulan kontur grafiği incelendiğinde ise, fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L olduğu fermantasyon ortamlarında elde edilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, sıcaklığın artmasıyla bir miktar azaldığı, fruktoz başlangıç derişiminin 90 g/L olduğu fermantasyon ortamlarında ise; sıcaklığın artmasıyla arttığı bulunmuştur. Söz konusu grafikten ayrıca, 24°C’da, fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişimi 85 g/L olduğunda elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin ise 1.4 mg/L olduğu da belirlenmiştir.

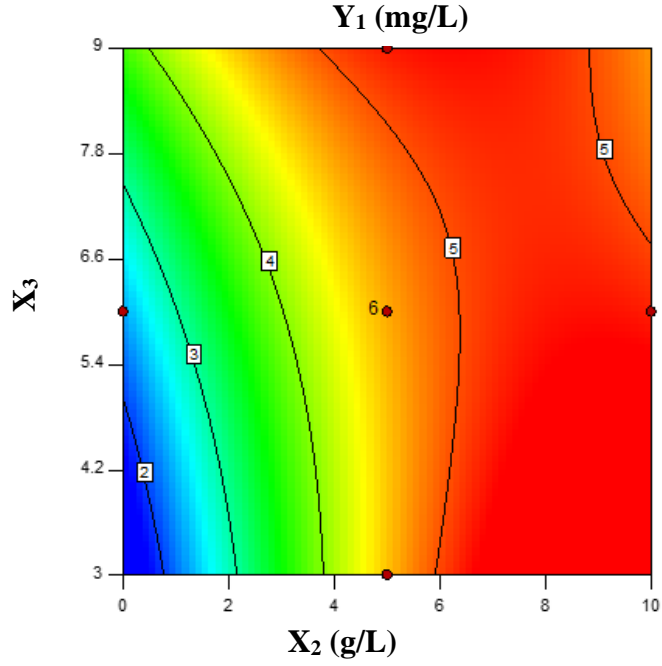
Sıcaklığın 28°C ve fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişiminin ise; 50 g/L olduğu işletme koşullarında, ortamın pepton başlangıç derişimi ile başlangıç pH’ının maksimum  $\beta$ -karoten derişimleri üzerindeki etkilerini gösteren grafikler, Şekil 4.38’de

verilmiştir. Şekil 4.38 a’da gösterilen yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, başlangıç pH’ı 3 olan fermantasyon ortamlarında, fermantasyon sonucunda elde edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin, ortamdaki pepton başlangıç derişiminin artmasıyla arttığı belirlenmiştir. Fermantasyon ortamının başlangıç pH’ının 3 ve başlangıç pepton derişiminin ise; 10 g/L olduğu koşullarda, maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin yüksek ve yaklaşık 6 mg/L olduğu tespit edilmiştir.

Başlangıç pH’ı 3 olan ve bileşiminde pepton bulunmayan bir fermantasyon ortamında ise elde edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin düşük ve yaklaşık 1.4 mg/L olduğu bulunmuştur (Şekil 4.38 b). Bileşiminde pepton bulunmayan fermantasyon ortamlarında ise, elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin başlangıç pH değerinin artmasıyla arttığı belirlenmiştir. Şekil 4.38 b’deki kontur grafiği incelendiğinde, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin, başlangıç pH ve pepton derişimleri sırasıyla yaklaşık, 3-6 ve 6.5-10 g/L aralıklarında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilebileceği tespit edilmiştir.



(a)



(b)

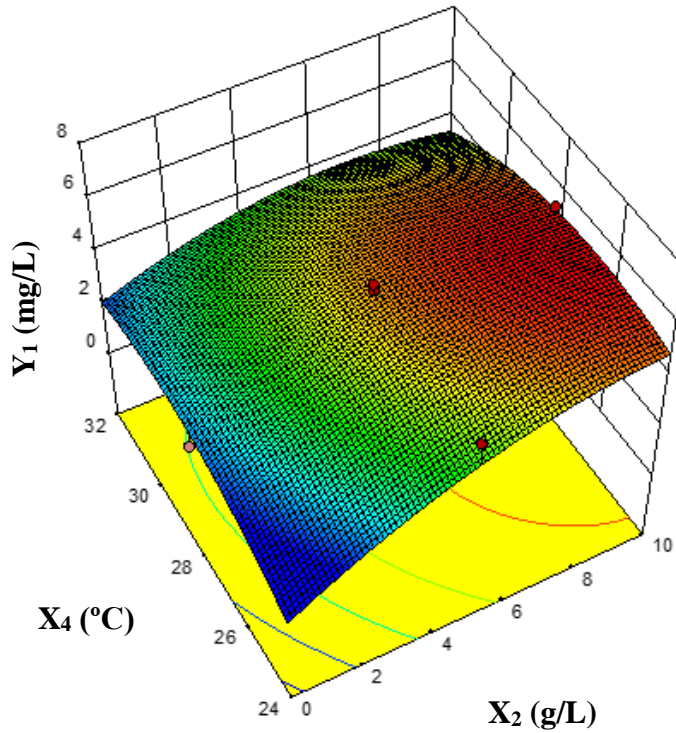
Şekil 4.38. Maksimum  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamı pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'nın etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

Ayrıca, pepton başlangıç derişimi 6.2-8.8 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamları için bu çalışmada incelenen başlangıç pH aralığındaki tüm değerler için elde edilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin 5 mg/L'den yüksek olduğu da belirlenmiştir. Söz konusu grafikten ek olarak, başlangıç pH değeri 3-5 aralığında değişen ve bileşiminde pepton içermeyen fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin ise 2 mg/L'den daha düşük oldukları da bulunmuştur.

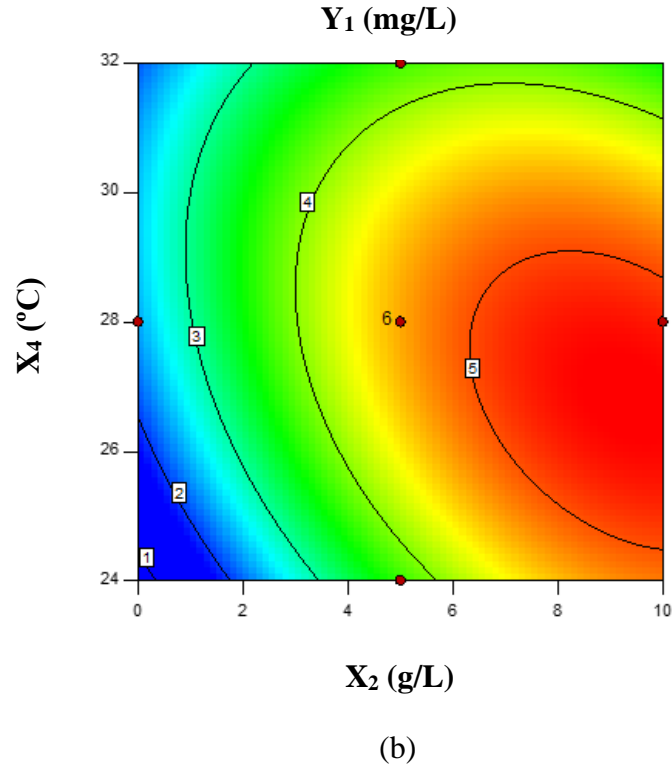
Fruktoz başlangıç derişimi ve başlangıç pH'nın sabit ve merkezi noktadaki değerlerinde oldukları fermantasyon ortamlarında, pepton başlangıç derişiminin ve sıcaklığın maksimum  $\beta$ -karoten derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.39'da sunulmuştur. Bu çalışmadaki en düşük sıcaklık değeri olan  $24^\circ\text{C}$ 'da elde edilen maximum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, fermantasyon ortamındaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.39 a). Bu

grafikten ayrıca, başlangıç pepton derişimi 10 g/L değerinde sabit olan fermantasyon ortamlarında, üretilen maximum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, sıcaklığın 24°C'dan 32°C'a artmasıyla azaldığı da belirlenmiştir. Şekil 4.39 b'deki kontur grafiği incelendiğinde, 24-32°C aralığındaki tüm sıcaklık değerlerinde, pepton başlangıç derişimi düşük olan fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin de düşük oldukları tespit edilmiştir.

Ayrıca, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin de 25-29°C sıcaklık aralığında, pepton başlangıç derişimi yaklaşık 8.5-10 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edildikleri de belirlenmiştir. Söz konusu grafikten ek olarak, 24°C'da, bileşiminde pepton bulunmayan bir fermantasyon ortamında elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin oldukça düşük (0.77 mg/L) bir değerde olduğu da bulunmuştur.



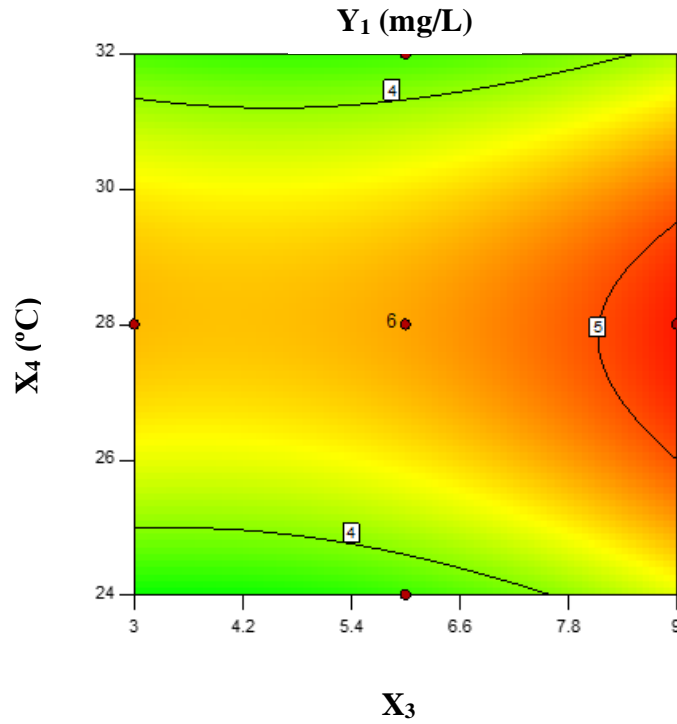
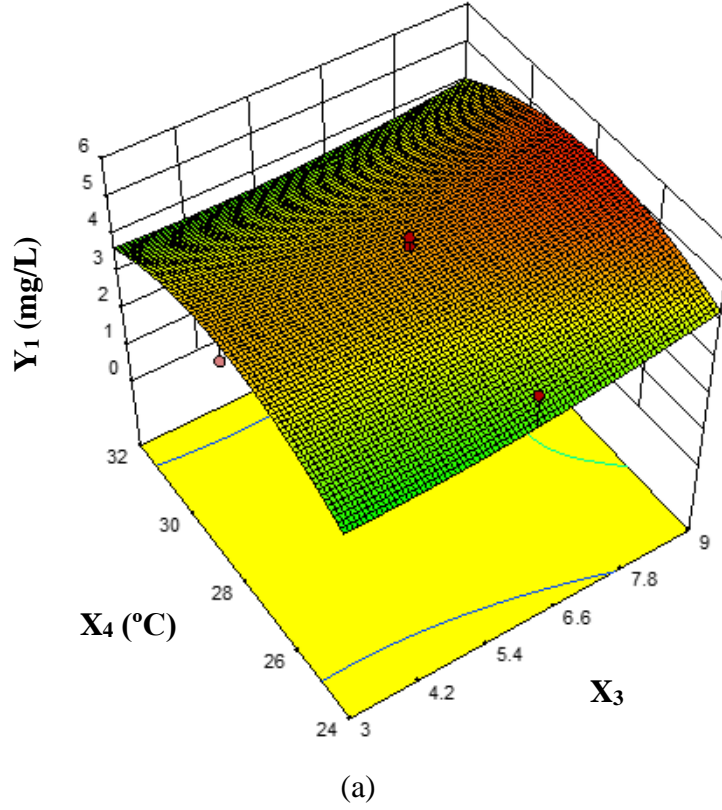
(a)



Şekil 4.39. Maksimum  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_3 = 6.0$ )

Fruktoz ve pepton başlangıç derişimlerinin sırasıyla; 50 ve 5 g/L olduğu fermantasyon ortamlarında, başlangıç pH'ı ve sıcaklığın elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişimleri üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, sırasıyla Şekil 4.40 a ve b'de sunulmuştur.

Şekil 4.40 a'da yer alan yanıt yüzey grafiğinden, incelenen tüm ortam başlangıç pH değerlerinde elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, sıcaklığın 24°C'dan 28°C'a artmasıyla önce arttıkları, 28°C'da en yüksek değerlerine ulaştıkları ve bu sıcaklıktan daha yüksek olan sıcaklıklarda ise azaldıkları belirlenmiştir. Ayrıca, çalışılan tüm sıcaklıklar için elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten derişimlerinin, ortamın başlangıç pH değerinin artmasıyla arttıkları da tespit edilmiştir.



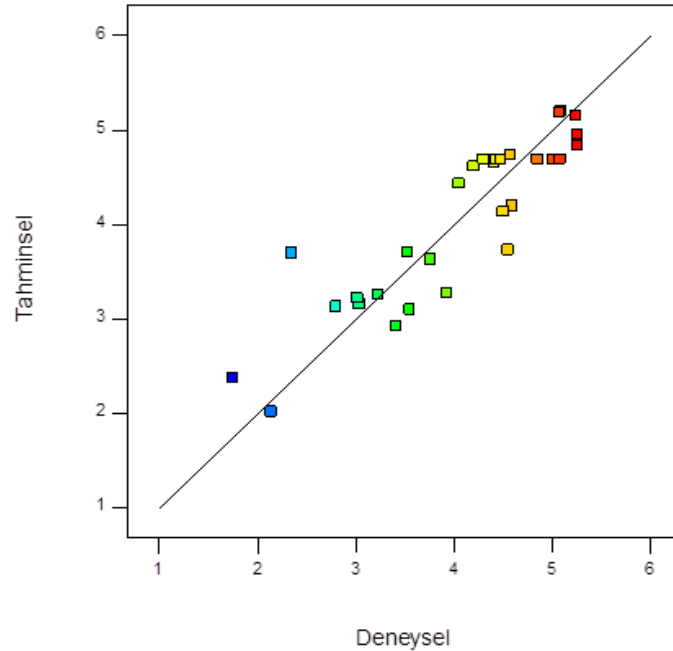
Şekil 4.40. Maksimum  $\beta$ -karoten derişimi ( $Y_1$ ) üzerine; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_2 = 5$  g/L)



Buna ek olarak, başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamlarında, ortamların fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri merkez noktalarındaki değerlerde sabit tutulduklarında, 28 ve 32°C'da üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten miktarları da sırasıyla; 5.18 ve 4.11 mg/L olarak tayin edilmiştir. Şekil 4.40 b'deki kontur grafiğinden, ortam başlangıç pH'ı ve sıcaklık için seçilen değişim aralıklarında gerçekleştirilecek fermantasyon çalışmaları sonucunda elde edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten derişimleri içerisindeki en düşük değerin; 3.56 mg/L olarak 24°C'da, başlangıç pH'ı 3.0 olan fermantasyon ortamında elde edildiği tespit edilmiştir.

Söz konusu grafikten, ayrıca, 26-29°C sıcaklık aralığında, başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamlarında elde edilebilecek en yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin, 5 mg/L'den daha yüksek oldukları da belirlenmiştir.

En yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin ( $Y_1$ ); deneysel değerleri ile Eş. 4.1'in kullanılması ile hesaplanmış olan tahminsel değerlerinin karşılaştırıldığı grafik; Şekil 4.41'de verilmiştir.



Şekil 4.41. Maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin ( $Y_1$ ); deneysel değerleri ile, Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8014x + 0.805$ ,  $R^2 = 0.801$ )

İlgili şekil incelendiğinde de görülebileceği gibi; deneysel ve tahminsel değerlerin büyük ölçüde birbirlerine yakın oldukları saptanmıştır. Bu grafik için belirleme katsayısı;  $R^2 = 0.801$  olarak hesaplanmıştır.

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ), başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ); mikroorganizmanın özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerindeki etkilerini ifade eden ikinci dereceden model denklem; Eş. 4.2'de verilmiştir.

$$\begin{aligned} Y_2 = & + 1.22126 - 6.39271 \times 10^{-3}X_1 - 2.0892 \times 10^{-2}X_2 - 4.6236 \times 10^{-2}X_3 - 6.2354 \\ & \times 10^{-2}X_4 - 5.75 \times 10^{-5}X_1X_2 + 3.29167 \times 10^{-4}X_1X_3 + 1.31250 \times 10^{-4}X_1X_4 \\ & - 2.66667 \times 10^{-4}X_2X_3 + 8.25 \times 10^{-4}X_2X_4 + 7.08333 \times 10^{-4}X_3X_4 + 1.08854 \\ & \times 10^{-5}X_1^2 + 2.96667 \times 10^{-4}X_2^2 + 1.15741 \times 10^{-3}X_3^2 + 8.69792 \times 10^{-4}X_4^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

Mikroorganizmanın özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) ile ilgili modele ait varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.8'de sunulmuştur. Bu modele ait belirleme katsayısı,  $R^2 = 0.919$  olarak hesaplanmıştır. Sözkonusu katsayısının 1'e yakın olması, eşitlik ile hesaplanan tahminsel değerler ile deneyler sonucu elde edilen gerçek değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.8'de yer alan varyans analizi sonuçları incelendiğinde, türetilen modelin önemli olduğu bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Varyans analizi sonuçlarına göre, elde edilen modelin uyum eksikliğinin ise önemsiz olduğu belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ). Çizelge 4.8'deki sonuçlar incelendiğinde, özgül üreme hızı üzerine, fermantasyon ortamı başlangıç pH'ının ve sıcaklığın lineer etkilerinin önemli olduğu, diğer bağımsız değişkenlerin lineer etkilerinin ise önemsiz oldukları tespit edilmiştir ( $p > 0.05$ ).

Ayrıca, özgül üreme hızı üzerine fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ile başlangıç pH'ının, fruktoz başlangıç derişimi ile sıcaklığın ve pepton başlangıç derişimi ile sıcaklığın ikili etkileşimlerinin de önemli oldukları belirlenmiştir. Buna ek olarak, fruktoz başlangıç derişiminin ve sıcaklığın karesel etkilerinin de önemli oldukları saptanmıştır.

Çizelge 4.8. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ) özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerindeki etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları

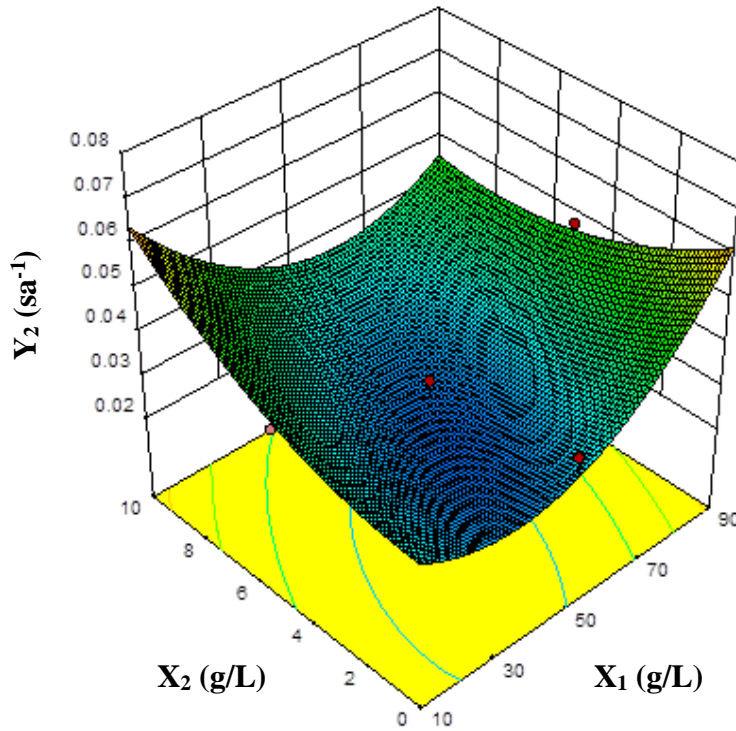
Varyans Kaynağı	SD	KO	F	P	
Model	14	$2.833 \times 10^{-4}$	12.23**	< 0.0001	Önemli
$X_1$	1	$3.267 \times 10^{-5}$	1.41	0.2535	
$X_2$	1	$7.350 \times 10^{-5}$	3.17	0.0951	
$X_3$	1	$3.682 \times 10^{-4}$	15.90**	0.0012	
$X_4$	1	$1.602 \times 10^{-4}$	6.92**	0.0189	
$X_1X_2$	1	$1.322 \times 10^{-4}$	5.71*	0.0304	
$X_1X_3$	1	$1.560 \times 10^{-3}$	67.37**	< 0.0001	
$X_1X_4$	1	$4.410 \times 10^{-4}$	19.04**	0.0006	
$X_2X_3$	1	$1.600 \times 10^{-5}$	0.69	0.4189	
$X_2X_4$	1	$2.722 \times 10^{-4}$	11.75**	0.0037	
$X_3X_4$	1	$7.225 \times 10^{-5}$	3.12	0.0977	
$X_1^2$	1	$5.200 \times 10^{-4}$	22.45**	0.0003	
$X_2^2$	1	$9.430 \times 10^{-5}$	4.07	0.0619	
$X_3^2$	1	$1.860 \times 10^{-4}$	8.03**	0.0126	
$X_4^2$	1	$3.320 \times 10^{-4}$	14.33**	0.0018	
Uyum eksikliği	10	$3.141 \times 10^{-5}$	4.71	0.0505	Önemsiz
Hata	5	$6.667 \times 10^{-6}$			
Genel	29				

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

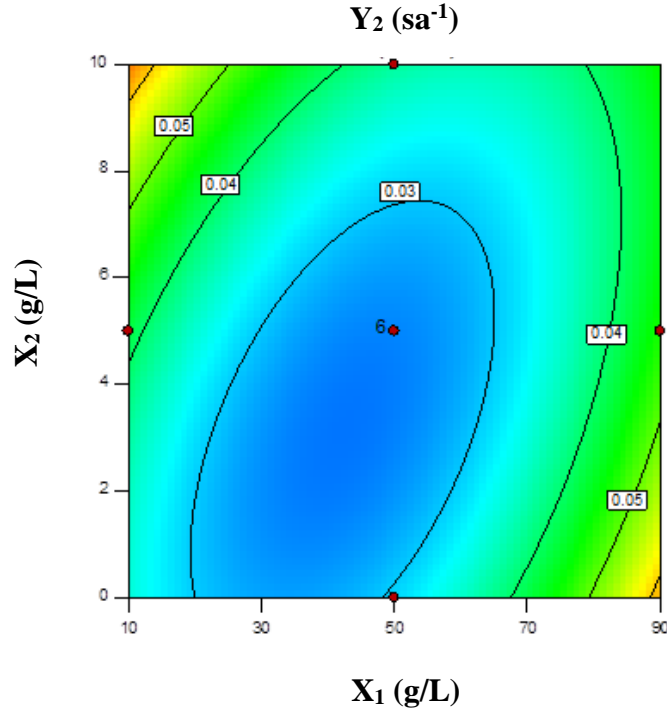
Bunlara ek olarak, fruktoz başlangıç derişiminin, başlangıç pH'ının ve sıcaklığın karesel etkileri de önemli olarak saptanmıştır. Özet olarak, model denklemdeki  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_2X_3$ ,  $X_3X_4$  ve  $X_2^2$  dışındaki tüm terimler özgül üreme hızına etkileri açısından önemli olarak tespit edilmiştir. Bu terimlerin katsayıları ve işaretlerine göre, özgül üreme hızına etkileri de yorumlanabilmektedir. Bu açıdan, başlangıç pH'ı ve sıcaklık değerlerinin negatif lineer katsayı değerleri nedeniyle; özgül üreme hızına olumsuz etkileri bulunurken, pozitif karesel katsayı değerleriyle ise olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir.

Bunun sonucunda, özgül üreme hızını; belirli bir değere kadar başlangıç pH'ı ve sıcaklıktaki artış ile, azaldığı, belli bir eşik değerinden sonra ise arttığı düşünülmektedir. Fruktoz başlangıç derişimi ile pepton başlangıç derişiminin ikili etkileşimi ile ilgili olarak ise; negatif katsayı nedeniyle özgül üreme hızına etkileri açısından parametrelerden biri yüksek tutulurken diğzerinin düşük tutulmasının olumlu etkisi olabileceği söylenebilir. Modeldeki önemli bulunan terimler arasından en büyük etkinin, yüksek katsayı değeri nedeniyle başlangıç pH'ı olduğu saptanmıştır.

Mikroorganizma özgül üreme hızı üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz ile pepton başlangıç derişimleri, başlangıç pH'ı ve sıcaklığın etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.42-4.47'de sunulmuştur. Söz konusu grafikler, grafikler üzerinde belirtilmemiş olan bağımsız değişkenlerin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak çizilmişlerdir. Başlangıç pH'ı 6 olan fermantasyon ortamlarında, 28°C'da elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin ortamdaki fruktoz ile peptonun başlangıç derişimleri ile değişimlerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.42'de gösterilmiştir.



(a)



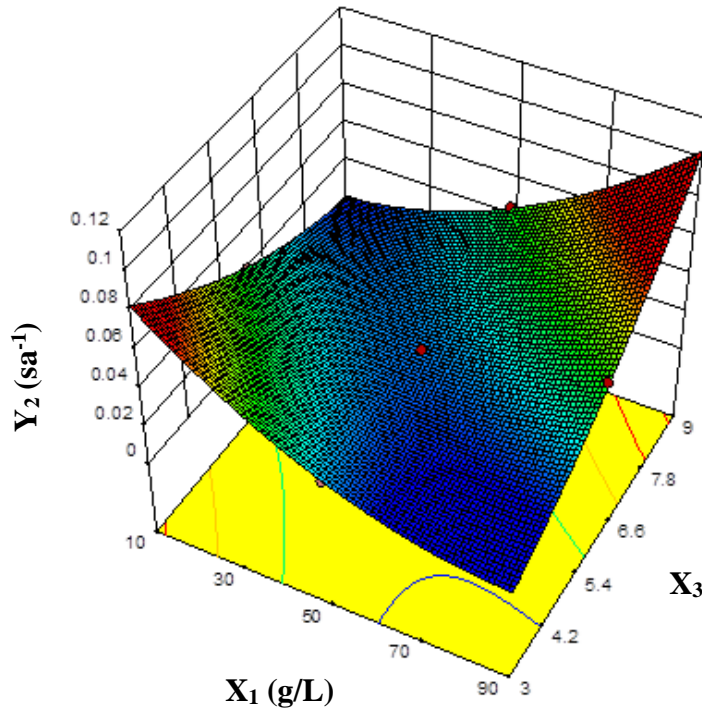
(b)

Şekil 4.42. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_3 = 6.0$ ,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

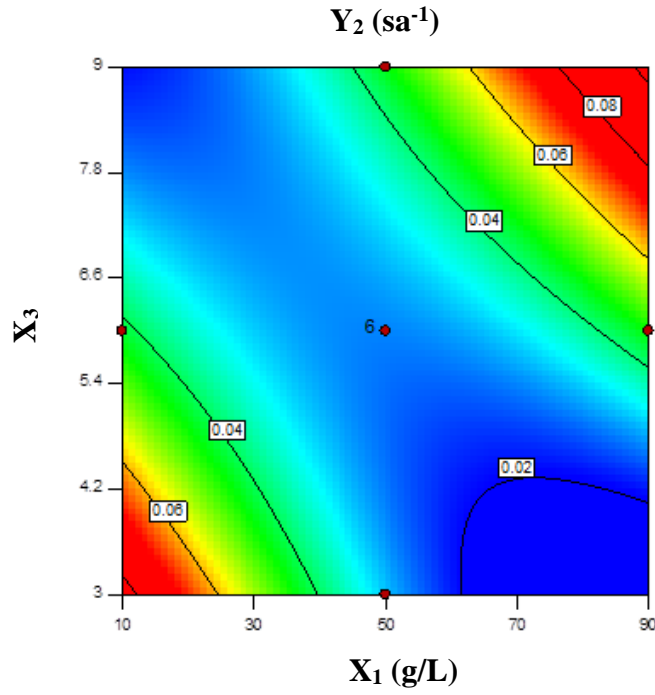
Şekil 4.42 a'daki yanıt yüzey grafiği incelediğinde, bileşiminde pepton içermeyen fermantasyon ortamlarında, ortamdaki fruktoz başlangıç derişiminin artmasıyla, mikroorganizma özgül üreme hızının arttığı belirlenmiştir. Fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L olduğu fermantasyon ortamlarında, ortamdaki pepton başlangıç derişiminin artmasıyla özgül üreme hızının da arttığı tespit edilmiştir. Söz konusu grafikten ayrıca, fermantasyon ortamlarındaki çok yüksek fruktoz ve pepton başlangıç derişimlerinin mikroorganizmanın özgül üreme hızını azalttığı da görülmüştür. Şekil 4.42 b'deki kontur grafiğinde yer alan sonuçlar incelendiğinde, fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri sırasıyla 30-40 ve 0-4 g/L aralıklarında değişen fermantasyon ortamlarında, mikroorganizma özgül üreme hızlarının 0.03  $\text{sa}^{-1}$ 'den daha düşük değerlerde oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, pepton içermeyen ve fruktoz başlangıç derişimi 90 g/L olan ve ek olarak pepton ile fruktoz başlangıç derişimlerinin eşit ve 10

g/L olan fermantasyon ortamlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının  $0.06 \text{ sa}^{-1}$ 'den daha yüksek değerde oldukları da bulunmuştur.

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin ve başlangıç pH'ının, mikroorganizma özgül üreme hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise sırasıyla; Şekil 4.43 a ve b'de sunulmuştur. Yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, mikroorganizma özgül üreme hızının, fruktoz başlangıç derişimi 90 g/L ve başlangıç pH'ı 9 olan fermantasyon ortamında en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir. Mikroorganizma özgül üreme hızının, başlangıç pH değeri 3.0 olan fermantasyon ortamlarında, ortamdaki fruktozun başlangıç derişiminin azalmasıyla ve başlangıç pH değeri 9.0 olan fermantasyon ortamlarında ise ortamdaki fruktozun başlangıç derişiminin artmasıyla arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, mikroorganizma özgül üreme hızının başlangıç fruktoz derişimi 10 g/L olan fermantasyon ortamlarında, başlangıç pH değerinin azalması ve başlangıç fruktoz derişimi 90 g/L olan fermantasyon ortamlarında ise, başlangıç pH değerinin artmasıyla arttığı da tespit edilmiştir.



(a)

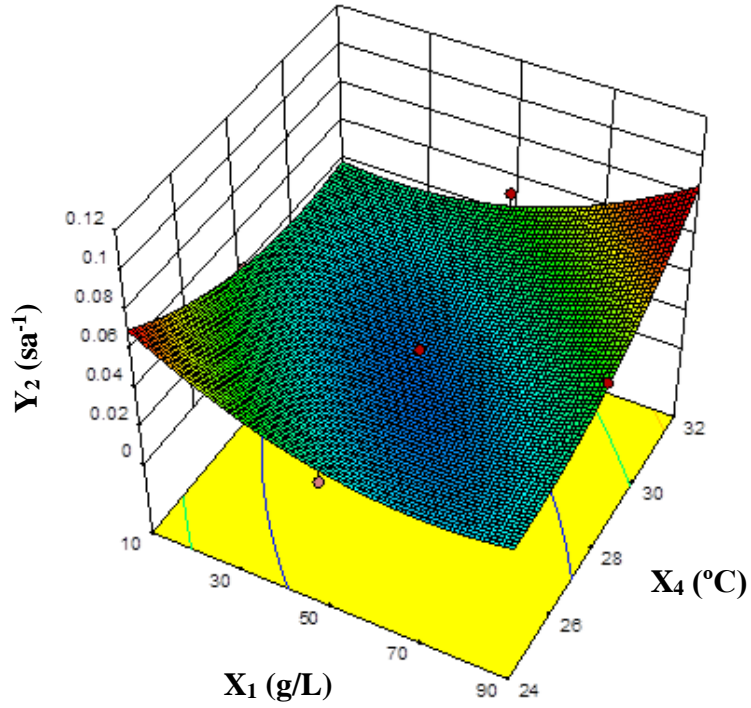


(b)

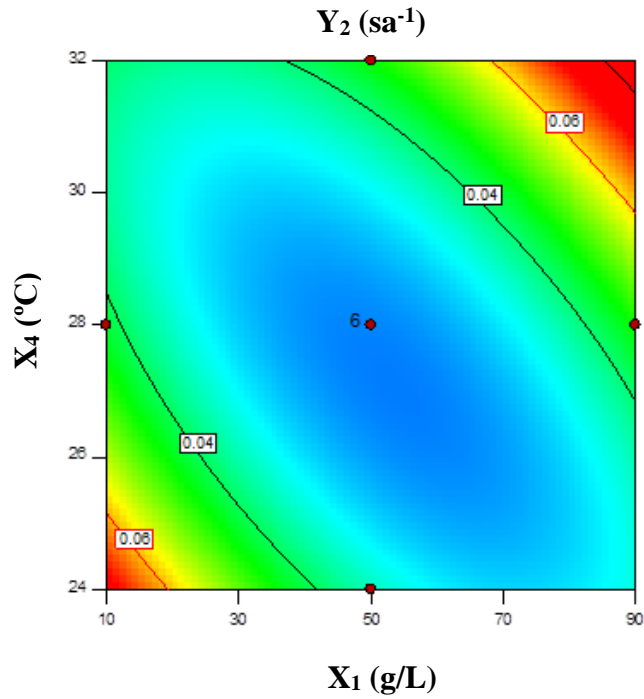
Şekil 4.43. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve başlangıç pH'nın ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$  g/L,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

Mikroorganizma özgül üreme hızının, pepton başlangıç derişimi 5 g/L, fruktoz başlangıç derişimi 90 g/L ve başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamında,  $28^\circ\text{C}$ 'da en yüksek değerine ulaştığı ve bu değer in ise;  $0.103 \text{ sa}^{-1}$  olduğu bulunmuştur.

Fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişiminin ve sıcaklığın mikroorganizma özgül üreme hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.44'de verilmiştir. Şekil 4.44 a'daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, mikroorganizma özgül üreme hızının,  $32^\circ\text{C}$ 'da fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişiminin artması;  $24^\circ\text{C}$ 'da ise, fruktoz başlangıç derişiminin azalmasıyla arttığı belirlenmiştir. Şekil 4.44 b'deki kontur grafiği incelendiğinde, en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin, başlangıç sıcaklık ve başlangıç fruktoz derişimi yüksek olan fermantasyon ortamlarında elde edildiği belirlenmiştir.



(a)



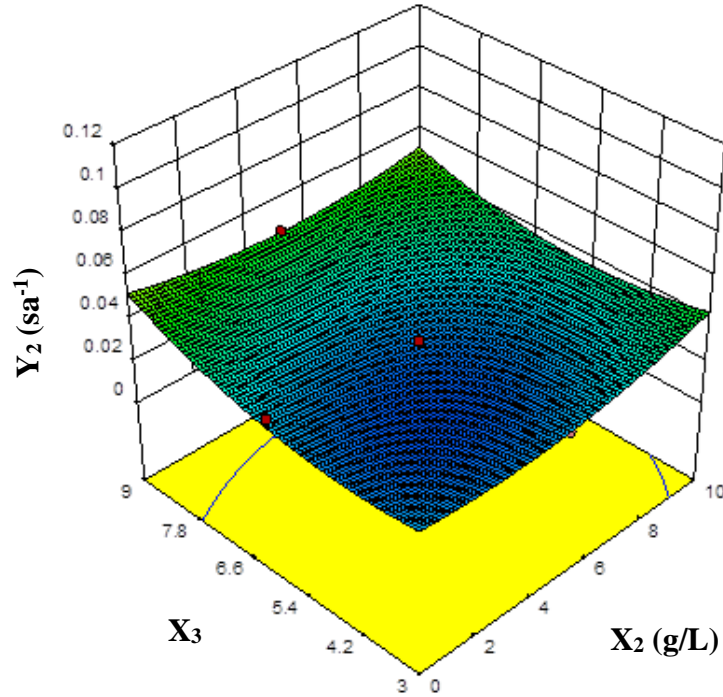
(b)

Şekil 4.44. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin ( $X_1$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$  g/L,  $X_3 = 6.0$ )

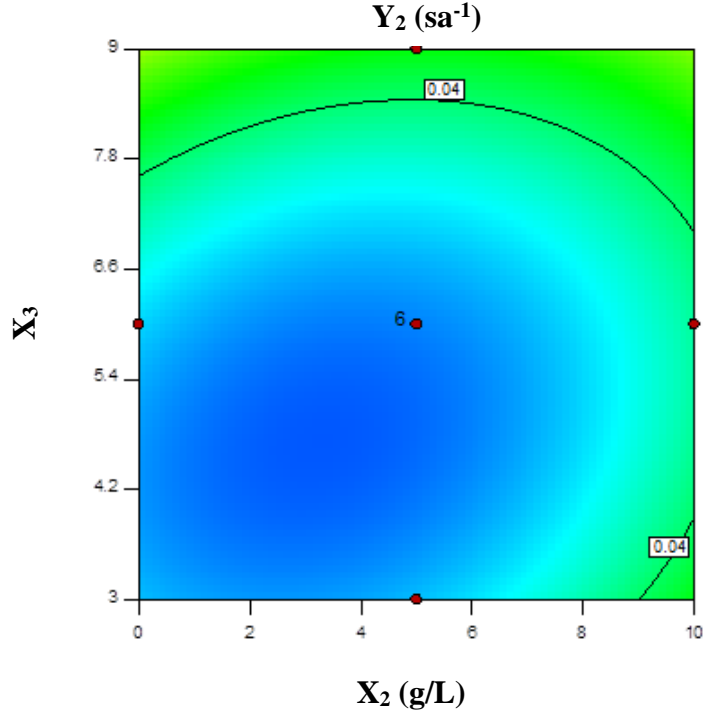


Söz konusu grafikten, mikroorganizma özgül üreme hızının en yüksek değerinin ( $0.086 \text{ sa}^{-1}$ ),  $32^\circ\text{C}$ 'da, fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri sırasıyla; 90 ve 5 g/L ve başlangıç pH'ı 6.0 olan fermantasyon ortamında elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, fruktoz başlangıç derişimi 10-40 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızının sıcaklığın artmasıyla azaldığı da belirlenmiştir. Şekil 4.44 b'de yer alan kontur grafiği incelendiğinde ise, mikroorganizma özgül üreme hızının, 90 g/L başlangıç derişiminde fruktoz içeren ortamlarda sıcaklığın  $24^\circ\text{C}$ 'dan  $32^\circ\text{C}$ 'a artması ile arttığı bulunmuştur.

Fermantasyon ortamındaki pepton başlangıç derişiminin ve başlangıç pH'ının mikroorganizma özgül üreme hızına etkileri ile ilgili yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.45'de sunulmuştur. Şekil 4.45 a'da yer alan yanıt yüzey grafiğinden, bileşiminde pepton bulunmayan fermantasyon ortamında başlangıç pH'ının artmasıyla mikroorganizma özgül üreme hızının da arttığı belirlenmiştir. Başlangıç pH değeri 9.0 olan fermantasyon ortamlarında, denenen tüm pepton başlangıç derişimlerinde hesaplanan mikroorganizma özgül üreme hızlarının çok fazla değişmedikleri tespit edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.45. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

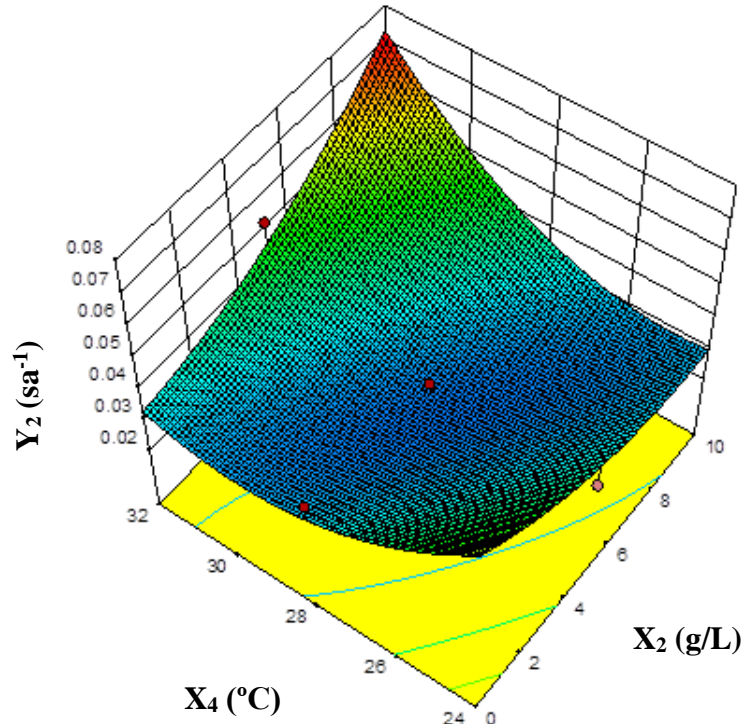
Başlangıç pH'ının 3.0 olduğu fermantasyon ortamlarında ise, ortamın pepton başlangıç derişiminin artmasıyla mikroorganizma özgül üreme hızının da bir miktar arttığı bulunmuştur. Bu çalışmada,  $28^\circ\text{C}$ 'da, fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri sırasıyla; 50 ve 10 g/L ve başlangıç pH'ı ise 9.0 olan fermantasyon ortamında, mikroorganizma özgül üreme hızının;  $0.052\text{ sa}^{-1}$  olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.45 b'deki kontur grafiğinden yararlanılarak  $28^\circ\text{C}$ 'da, fruktoz başlangıç derişimi 50 g/L, pepton başlangıç derişimi 3.2 g/L ve başlangıç pH'ı ise 4.6 olan bir fermantasyon ortamında elde edilecek mikroorganizma özgül üreme hızının;  $0.024\text{ sa}^{-1}$  olduğu bulunmuştur. Söz konusu grafikten ayrıca, başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamlarında, bu çalışmada denenen tüm pepton başlangıç derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin,  $0.040\text{ sa}^{-1}$ 'den daha yüksek oldukları da belirlenmiştir.

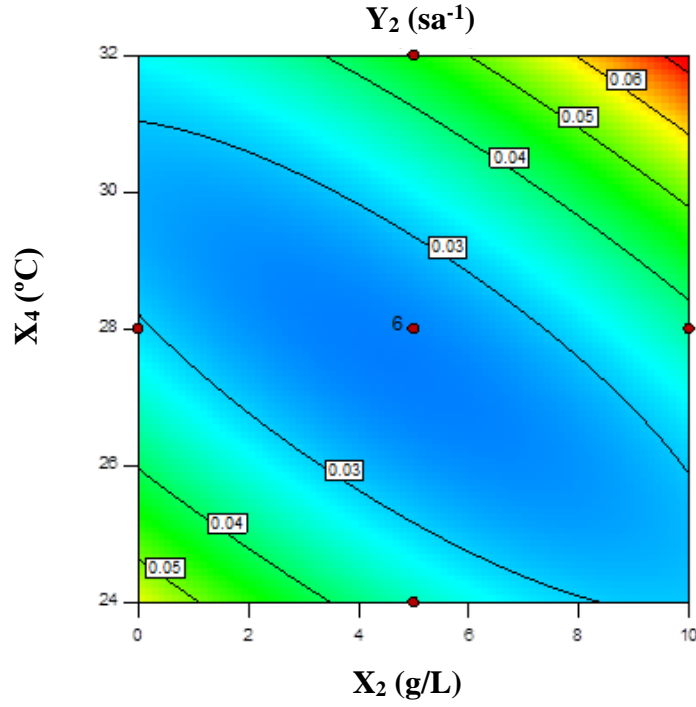
Fermentasyon ortamının pepton başlangıç derişiminin ve sıcaklığın mikroorganizma özgül üreme hızı üzerine etkileri ise, Şekil 4.46'da verilen yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde sunulmuştur. Şekil 4.46 a'daki üç boyutlu grafik incelendiğinde, 32°C'da, fermentasyon ortamındaki pepton başlangıç derişiminin artmasıyla mikroorganizma özgül üreme hızının da belirgin bir şekilde artış gösterdiği saptanmıştır.

Bu grafikten ayrıca, pepton başlangıç derişimi 10 g/L olan fermentasyon ortamlarında, sıcaklığın 24°C'dan 32°C'a artmasıyla mikroorganizma özgül üreme hızının da oldukça arttığı tespit edilmiştir. Bileşiminde pepton bulunmayan fermentasyon ortamlarında ise, mikroorganizma özgül üreme hızının sıcaklığın artmasıyla azaldığı bulunmuştur.

Şekil 4.46 b'deki kontur grafiği incelendiğinde, mikroorganizma özgül üreme hızının, 32°C'da, pepton ve fruktoz başlangıç derişimleri sırasıyla; 10 ve 50 g/L ve başlangıç pH'ı 6.0 olan fermentasyon ortamlarında en yüksek değerine ulaştığı ve bu değer ise; 0.073 sa<sup>-1</sup> olduğu saptanmıştır.



(a)

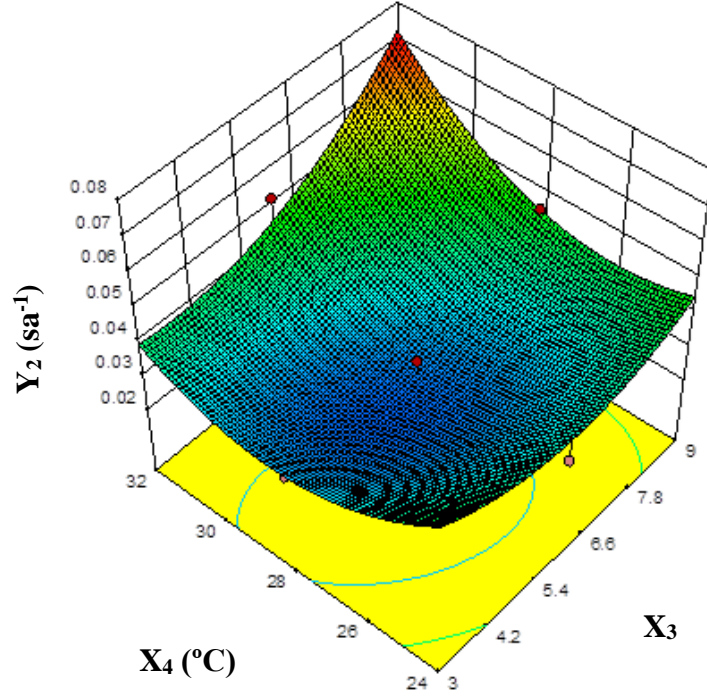


(b)

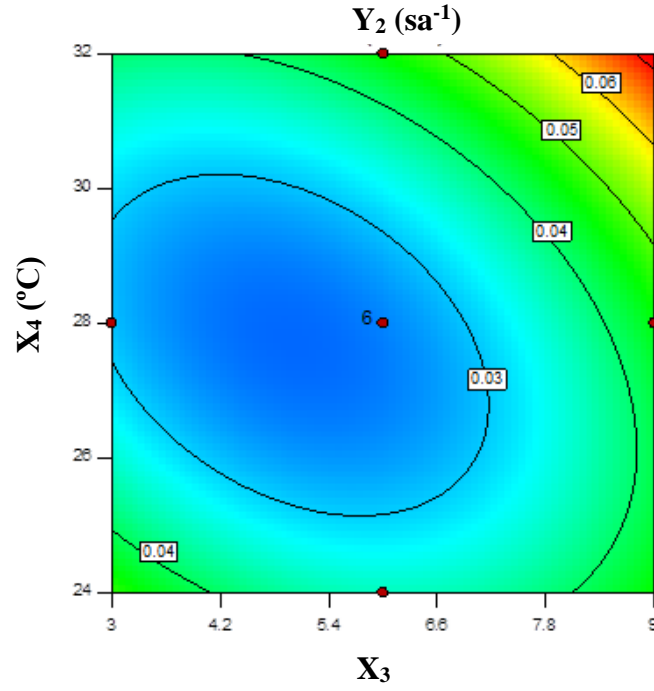
Şekil 4.46. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_3 = 6.0$ )

Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının ve sıcaklığın mikroorganizma özgül üreme hızı üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.47'de verilmiştir. Şekil 4.47 a'daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamlarındaki mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin, sıcaklığın 24°C'dan 32°C'a artmasıyla artış gösterdikleri belirlenmiştir.

Ayrıca, 32°C'da, fermantasyon ortamlarının başlangıç pH değerlerinin artırılmasıyla, mikroorganizma özgül üreme hızlarının da oldukça arttığı tespit edilmiştir. Söz konusu grafikten, en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızınının, başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamında 32°C'da elde edildiği bulunmuştur. Şekil 4.47 b'deki kontur grafiğinden ise, bu koşullardaki mikroorganizma özgül üreme hızı değerinin; 0.072 sa<sup>-1</sup> olduğu belirlenmiştir.



(a)

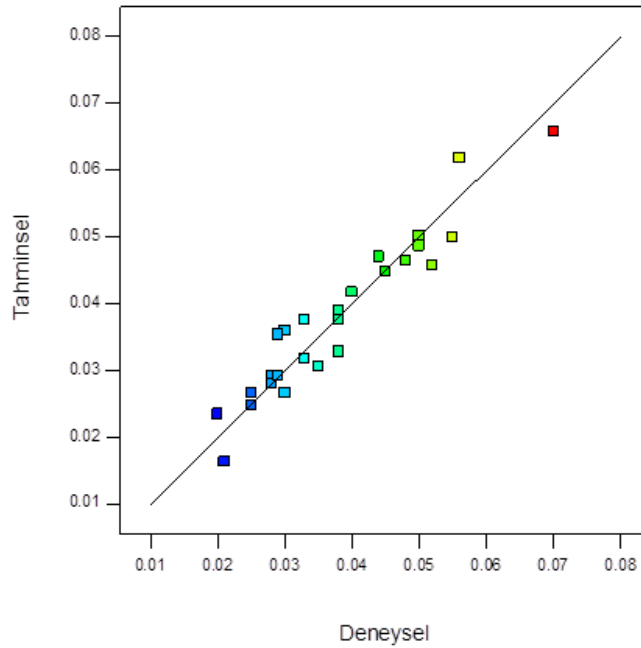


(b)

Şekil 4.47. Mikroorganizma özgül üreme hızı ( $Y_2$ ) üzerine; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) ve sıcaklığının ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_2 = 5$  g/L)

Ayrıca, 27.6°C’da, fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri sırasıyla; 50 ve 5 g/L olan fermantasyon ortamında, başlangıç pH’ı 4.95 olduğunda elde edilebilecek mikroorganizma özgül hızının da; 0.025 sa<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. Başlangıç pH değeri 3.0 olan fermantasyon ortamlarındaki mikroorganizma özgül üreme hızlarının ise, 24°C ve 32°C’da sırasıyla, 0.046 ve 0.039 sa<sup>-1</sup> oldukları da saptanmıştır.

Mikroorganizma özgül üreme hızlarının (Y<sub>2</sub>); Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan değerleri ile gerçekleştirilen deneyler ile elde edilen sonuç değerlerinin karşılaştırıldığı grafik; Şekil 4.48’de verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde de görülebileceği gibi; deneysel ve tahminsel değerlerin birbirilerine yakın değerlerde oldukları tespit edilmiştir. Bu grafik için belirleme katsayısı; R<sup>2</sup> = 0.919 olarak hesaplanmıştır. Söz konusu grafiğe ait regresyon katsayısının 1’e yakın olması; eşitlik kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerin, gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuç değerleri ile yüksek derecede uyumlu olduklarını göstermektedir.



Şekil 4.48. Mikroorganizma özgül üreme hızlarının (Y<sub>2</sub>); deneysel değerleri ile, Eş 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.9171x + 0.0031$ ,  $R^2 = 0.919$ )

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X<sub>1</sub>), pepton başlangıç derişimi (X<sub>2</sub>) ve başlangıç pH’ı (X<sub>3</sub>) ile sıcaklığın (X<sub>4</sub>); maksimum β-karoten üretim hızı (Y<sub>3</sub>)

üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden modele ait denklem, Eş. 4.3'de verilmiştir. Türetilen modele ait varyans analizi sonuçları ise; Çizelge 4.9'de sunulmuştur.

$$Y_3 = + 0.33314 - 1.43146 \times 10^{-3}X_1 + 4.10583 \times 10^{-3}X_2 - 0.025182X_3 - 0.015157X_4 + 1.375 \times 10^{-5}X_1X_2 + 4.37500 \times 10^{-5}X_1X_3 + 3.28125 \times 10^{-5}X_1X_4 - 1.66667 \times 10^{-5}X_2X_3 - 1.625 \times 10^{-4}X_2X_4 + 5.20833 \times 10^{-4}X_3X_4 + 2.03125 \times 10^{-6}X_1^2 + 1.04 \times 10^{-4}X_2^2 + 7.88889 \times 10^{-4}X_3^2 + 1.93750 \times 10^{-4}X_4^2 \quad (4.3)$$

Çizelge 4.9. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ı ( $X_3$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ), maksimum  $\beta$ -karoten oluşum hızı ( $Y_3$ ) üzerindeki etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F	P	
Model	14	3.523x10 <sup>-5</sup>	5.85**	0.0008	Önemli
X <sub>1</sub>	1	4.507x10 <sup>-6</sup>	0.75	0.4004	
X <sub>2</sub>	1	2.100x10 <sup>-4</sup>	34.91**	< 0.0001	
X <sub>3</sub>	1	5.104x10 <sup>-5</sup>	8.48*	0.0107	
X <sub>4</sub>	1	1.204x10 <sup>-5</sup>	2.00	0.1776	
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	7.562 x10 <sup>-6</sup>	1.26	0.2799	
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	2.756x10 <sup>-5</sup>	4.58*	0.0492	
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	1	2.756x10 <sup>-5</sup>	4.58*	0.0492	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	6.250x10 <sup>-8</sup>	0.010	0.9202	
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	1	1.056x10 <sup>-5</sup>	1.76	0.2050	
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	1	3.906x10 <sup>-5</sup>	6.49*	0.0223	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	1.811x10 <sup>-5</sup>	3.01	0.1033	
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	1.159x10 <sup>-5</sup>	1.93	0.1855	
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	8.642x10 <sup>-5</sup>	14.36**	0.0018	
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1	1.647x10 <sup>-5</sup>	2.74	0.1188	
Uyum eksikliği	10	7.693x10 <sup>-6</sup>	2.88	0.1269	Önemsiz
Hata	5	2.667x10 <sup>-6</sup>			
Genel	29				

\*p<0.05, \*\*p<0.01, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Model eşitlikle ilgili belirleme katsayısı değeri ise;  $R^2 = 0.845$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer, modelin deneysel verilerle uyumluluk derecesini ifade etmektedir. Varyans analizinin sonuçları incelendiğinde, modelin önemli olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Önerilen modele ait uyum eksikliğinin ise, önemsiz olduğu saptanmıştır.

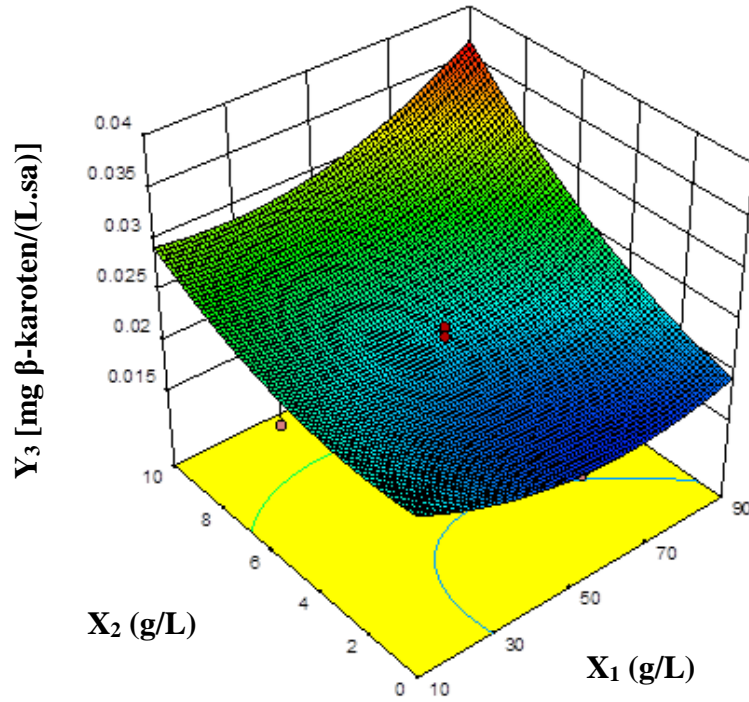
Bağımsız değişkenlerin maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı üzerindeki lineer etkileri incelendiğinde, pepton başlangıç derişimi ile başlangıç pH'nın önemli, fruktoz başlangıç derişimi ve sıcaklığın ise önemsiz oldukları bulunmuştur. Ayrıca, fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ile başlangıç pH'nın, fruktoz başlangıç derişimi ile sıcaklığın ve başlangıç pH'ı ile sıcaklığın ikili etkileşimlerinin, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı üzerindeki etkilerinin de önemli oldukları saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Bunlara ek olarak, varyans analizi sonuçlarına göre, fermantasyon ortamı pepton başlangıç derişiminin diğer tüm bağımsız değişkenler ile olan ikili etkileşimlerinin ise önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca başlangıç pH'nın karesel etkisinin de önemli olduğu bulunmuştur. Varyans analizine göre;  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_1X_4$ ,  $X_3X_4$  ve  $X_3^2$  model denklemdeki önemli terimler olarak bulunmuştur. Bu terimler katsayı işaretlerine göre değerlendirildiğinde;  $X_3$ 'ün lineer terimi dışındaki tüm terimler pozitif olduğu için, ürün oluşum hızını artıracak şekilde olumlu etki etmektedir. Söz konusu bu terimler katsayı değerlerine göre incelendiğinde ise; ürün oluşum hızına en yüksek etkili olan terim;  $X_3$  yani başlangıç pH'ı olarak belirlenmiştir. Ürün oluşum hızının;  $X_3$  terimi yani başlangıç pH'nın lineer artışı ile azalacağı ve  $X_3^2$  terimi yani başlangıç pH'nın karesel artışı ile, kritik bir pepton derişimi değerine ulaştıktan sonra, bu değer artacağı öngörülmektedir. Ayrıca başlangıç pH'nın ayrı ayrı başlangıç fruktoz derişimi ve sıcaklık ile ikili etkileşimleri ve başlangıç fruktoz derişimi ve sıcaklık arasındaki ikili etkileşimin pozitif katsayı değerleriyle; ürün oluşum hızını artırmak için birbirini destekler niteliktedir.

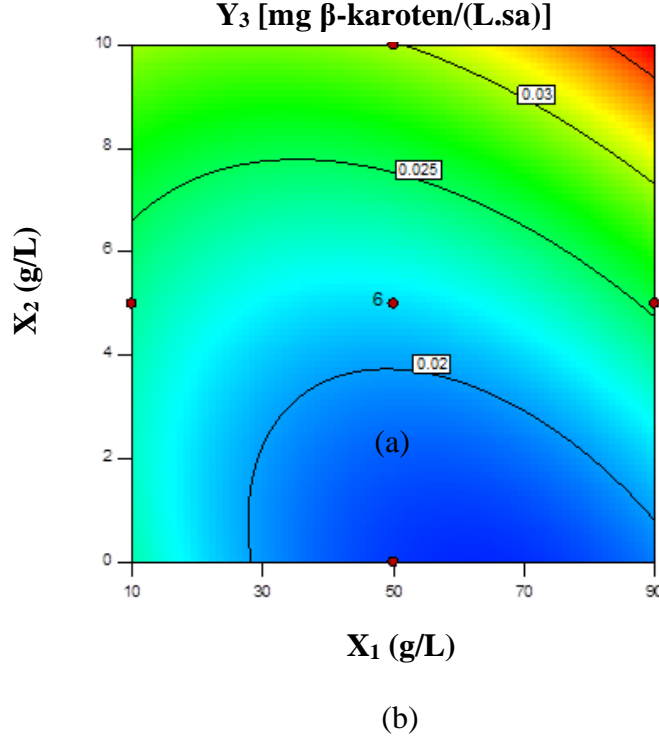
Gerçekleştirilen çalışmada incelenen bağımsız değişkenlerin maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızına ( $Y_3$ ) etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.49-4.54'de verilmiştir. Söz konusu grafiklerin her biri, ilgili grafik üzerinde yer almayan bağımsız değişkenlerin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak çizilmiştir.



Fermantasyon ortamının fruktoz ve pepton başlangıç derişimlerinin çalışılan suşun maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızına etkilerinin gösterildiğı yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.49'de sunulmuştur. Şekil 4.49 a'da yer alan yanıt yüzey grafiğı incelendiğinde, fermantasyon ortamlarında denenen tüm fruktoz başlangıç derişimlerinde, ortamdaki pepton başlangıç derişiminin artmasıyla maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının da arttığı tespit edilmiştir. Söz konusu grafikten, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı değerlerinin düşük pepton başlangıç derişimindeki fermantasyon ortamlarında, ortamın fruktoz başlangıç derişiminin artmasıyla çok fazla değişmedikleri, yüksek pepton başlangıç derişimindeki ortamlarda ise, fruktoz başlangıç derişiminin artmasıyla artış gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmadaki en yüksek  $\beta$ -karoten üretim hızı, 0.037 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak, 28°C'da, fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri sırasıyla; 90 ve 10 g/L olan fermantasyon ortamında elde edilmiştir.



(a)



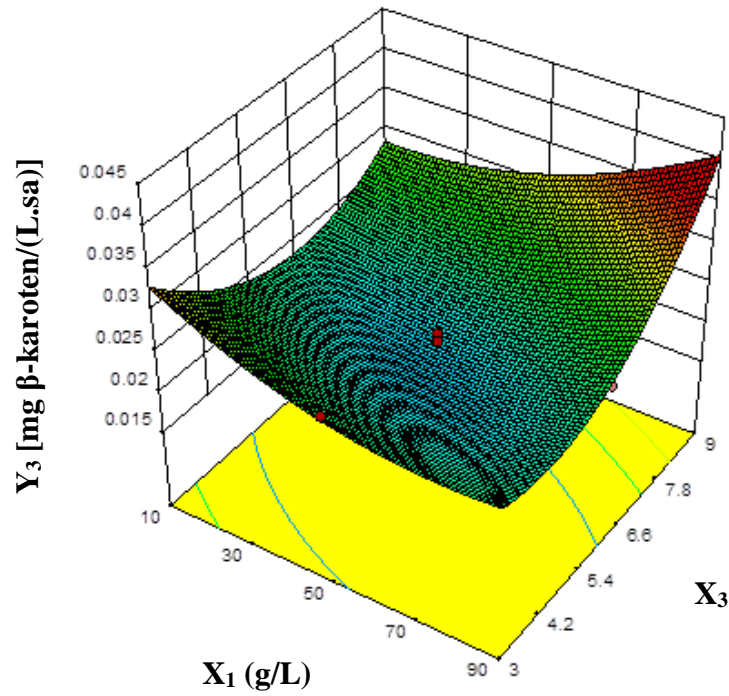
Şekil 4.49. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_3 = 6.0$ ,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

$28^\circ\text{C}$ 'da, başlangıç pH'ı 6.0 olan fermantasyon ortamlarında, fruktoz ve pepton başlangıç derişimlerinin maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarına etkilerini gösteren kontur grafiğinden (Şekil 4.49 b), fruktozun başlangıç derişiminin 90 g/L olduğu fermantasyon ortamlarında peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının da arttığı tespit edilmiştir.

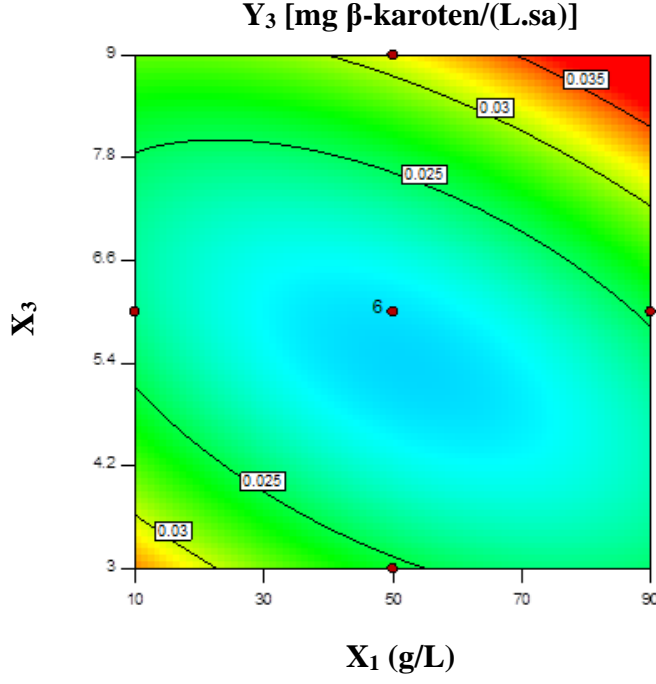
Benzer şekilde, fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L olduğu fermantasyon ortamlarında da, pepton başlangıç derişiminin artmasıyla maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının da arttığı belirlenmiştir. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının, aynı zamanda, pepton başlangıç derişimi 10 g/L olan fermantasyon ortamlarında, fruktoz başlangıç derişiminin artmasıyla arttığı da saptanmıştır. İlgili kontur grafiği incelendiğinde, pepton başlangıç derişimi 7.2 g/L'den daha düşük olan fermantasyon ortamlarında, tüm fruktoz başlangıç derişimleri için elde edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten üretim

hızlarının 0.030 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) değerinden daha düşük oldukları belirlenmiştir. Tüm bağımsız değişkenlerin, merkez noktalarındaki değerlerinde oldukları fermantasyon ortamında elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının ise, 0.021 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olduğu tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişiminin ve sıcaklığın merkez noktalarındaki değerlerinde oldukları fermantasyon çalışmalarında, fruktoz başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı üzerindeki etkileri ise, Şekil 4.50'de verilen yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde gösterilmiştir. Şekil 4.50 a'daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, en yüksek  $\beta$ -karoten üretim hızının, fruktoz başlangıç derişimi 90 g/L ve başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamında elde edilebileceği bulunmuştur. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının, fruktoz başlangıç derişimi 90 g/L olan fermantasyon ortamlarında, başlangıç pH değerinin artmasıyla arttığı, başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamlarında da fruktoz derişiminin artmasıyla arttığı tespit edilmiştir.



(a)



(b)

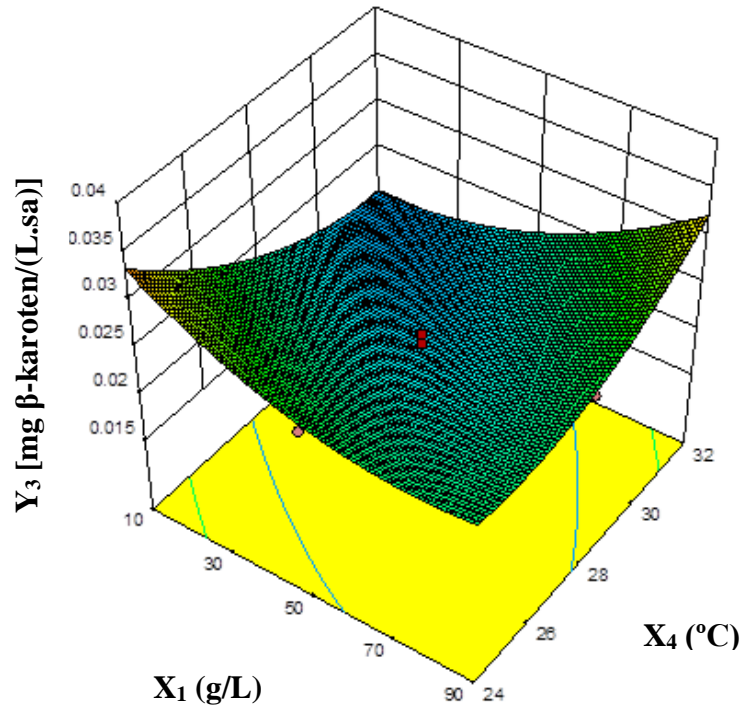
Şekil 4.50. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve başlangıç pH'nın ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$  g/L,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının, fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L olduğu çalışmalarda başlangıç pH değerinin 3.0'dan yaklaşık 6.0'a kadar artmasıyla önce azaldığı daha sonra ise, pH'nın 6.0'dan 9.0'a artmasıyla arttığı belirlenmiştir.

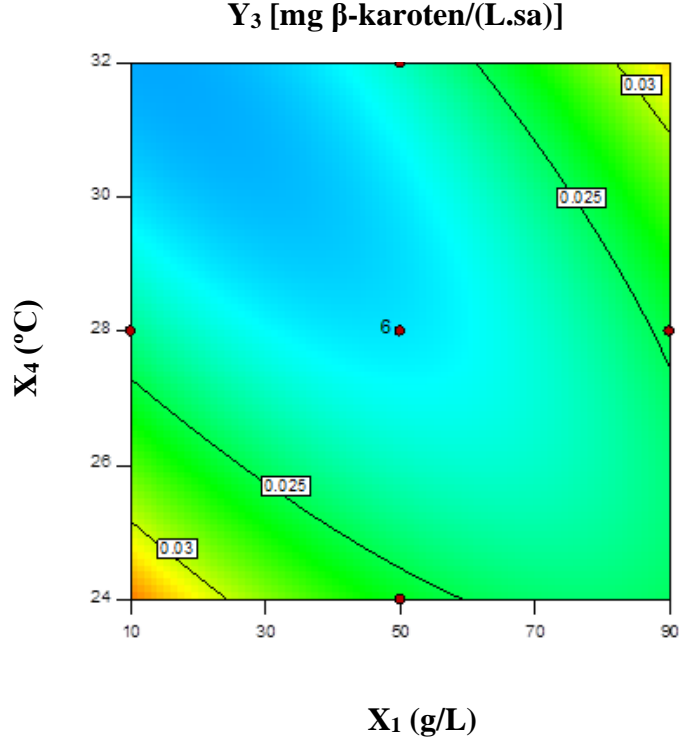
Başlangıç pH'nın 3.0 olduğu fermantasyon ortamlarında ise, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının fruktoz başlangıç derişiminin azalmasıyla arttığı tespit edilmiştir.  $28^\circ\text{C}$ 'da, pepton başlangıç derişimi 5 g/L olan fermantasyon ortamlarında fruktoz başlangıç derişiminin ve başlangıç pH'nın maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızına etkileri ise, Şekil 4.50 b'deki kontur grafiğinde sunulmuştur. Bu grafik detaylı olarak incelendiğinde, en yüksek  $\beta$ -karoten üretim hızı [0.041 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa)] fruktoz başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ı sırasıyla; 90 g/L ve 9.0 olan fermantasyon ortamında elde edilmiştir. Başlangıç pH değerlerinin 5.2-5.7 arasında değiştiği fermantasyon ortamlarında, incelenen tüm fruktoz başlangıç derişimlerinde elde

edilebilecek maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının, 0.025 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa)'den daha düşük oldukları tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin ve sıcaklığın maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.51'de sunulmuştur. İlgili yanıt yüzey grafiği (Şekil 4.51 a) incelendiğinde, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının, pepton ve fruktoz başlangıç derişimleri sırasıyla; 5 ve 90 g/L ve başlangıç pH'ı 6.0 olan fermantasyon ortamlarında, bağımsız değişkenlerden sıcaklığın artmasıyla bir miktar arttığı tespit edilmiştir. Fruktoz başlangıç derişiminin 10 g/L olduğu fermantasyon ortamlarında ise, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının, sıcaklığın artmasıyla azaldığı görülmüştür. 32°C'da fermantasyon ortamındaki fruktozun başlangıç derişiminin artmasıyla maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının da arttığı bulunmuştur. 24°C'da ise, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının ortamdaki fruktoz başlangıç derişiminin artmasıyla bir miktar azaldığı tespit edilmiştir.



(a)

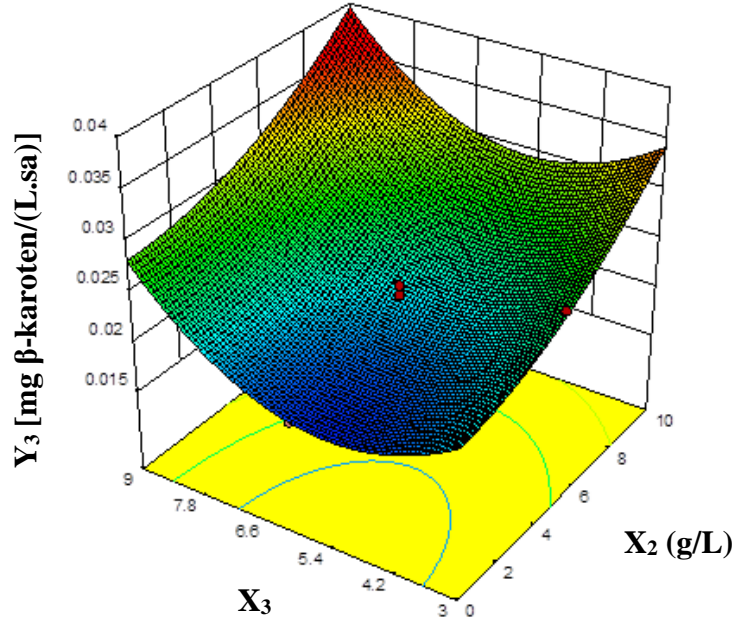


(b)

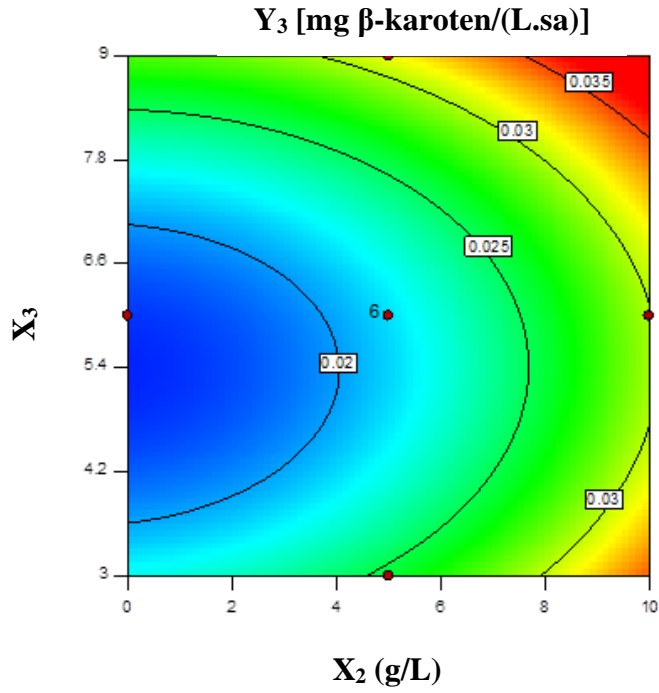
Şekil 4.51. Maksimum β-karoten üretim hızı (Y<sub>3</sub>) üzerine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin (X<sub>1</sub>) ve sıcaklığın (X<sub>4</sub>) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X<sub>2</sub> = 5 g/L, X<sub>3</sub> = 6.0)

Şekil 4.51 b'de yer alan kontur grafiğinden, başlangıç pepton derişimi 5 g/L ve başlangıç pH'ı 6.0 olan fermantasyon ortamlarında, bu çalışmada incelenen fruktoz başlangıç derişimi (10-90 g/L) ve sıcaklık (24-32°C) aralıklarında elde edilebilecek maksimum β-karoten üretim hızı değerlerinin, 0.020-0.033 mg β-karoten/(L.sa) aralığında değiştikleri bulunmuştur.

28°C'da, fruktoz başlangıç derişimi 50 g/L olan fermantasyon ortamlarında, pepton başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının maksimum β-karoten üretim hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, sırasıyla; Şekil 4.52 a ve b'de verilmiştir. Yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, maksimum β-karoten üretim hızlarının, tüm başlangıç pH değerlerinde, fermantasyon ortamındaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla arttığı görülmüştür.



(a)



(b)

Şekil 4.52. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişimi ( $X_2$ ) ve başlangıç pH'ının ( $X_3$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_4 = 28^\circ\text{C}$ )

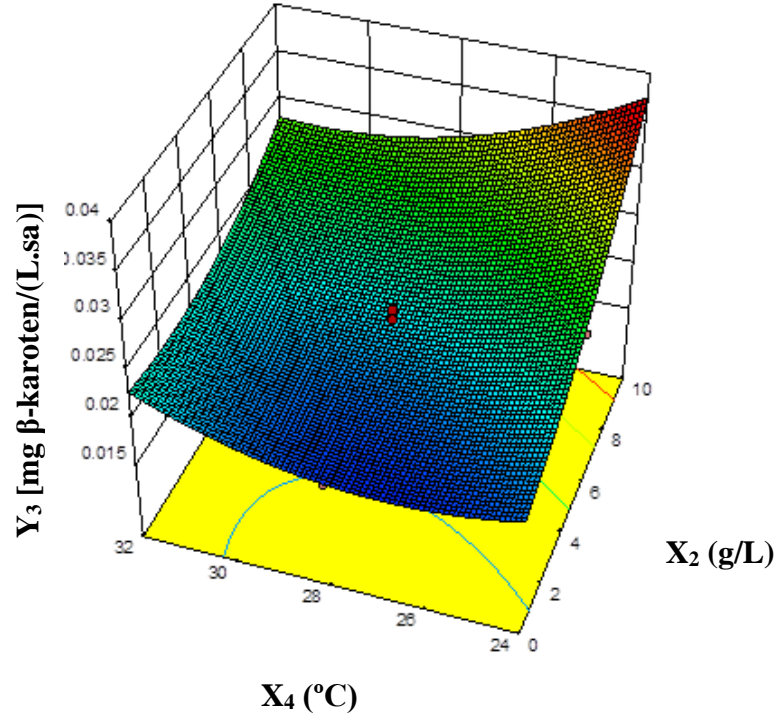
Farklı işletme koşulları için hesaplanan maksimum üretim hızı değerleri içerisindeki en yüksek hız değerinin, pepton başlangıç derişimi 10 g/L ve başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamında elde edildiği bulunmuştur. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının, bu çalışmada incelenen derişim aralığındaki tüm pepton başlangıç derişimlerinde, ortamın başlangıç pH'ının, pH 6.0 değerine kadar artmasıyla önce azaldığı; 6.0'dan daha yüksek olan pH değerlerinde ise arttığı tespit edilmiştir.

Fruktoz başlangıç derişiminin ve sıcaklığın merkez noktasındaki değerlerinde oldukları koşullarda çizilen kontur grafiğinden (Şekil 4.52 b) elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten üretim hızı değeri; pepton başlangıç derişimi 10 g/L ve başlangıç pH'ı 9.0 olan fermantasyon ortamında, 0.04 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak belirlenmiştir. Pepton başlangıç derişiminin 10 g/L ve başlangıç pH'ının 3.0 olduğu fermantasyon ortamında elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı ise, 0.034 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak tespit edilmiştir. Bileşiminde pepton bulunmayan ve başlangıç pH'ı 5.0, 7.0 ve 9.0 olan fermantasyon ortamlarında elde edilen bazı maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı değerleri ise, sırasıyla; 0.018, 0.020 ve 0.028 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.

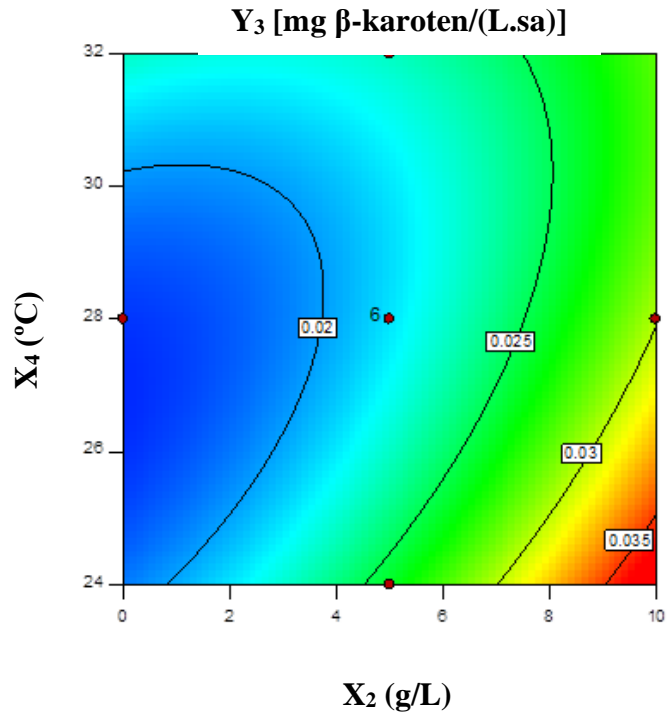
Fruktoz başlangıç derişiminin 50 g/L ve başlangıç pH'ının 6.0 olduğu fermantasyon ortamlarında, pepton başlangıç derişiminin ve sıcaklığın maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.53'de sunulmuştur. Şekil 4.53 a'da sunulan yanıt yüzey grafiği incelendiğinde düşük sıcaklıklarda ve yüksek pepton başlangıç derişimindeki fermantasyon ortamlarında maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının da yüksek oldukları görülmüştür. Bileşiminde pepton bulunmayan ortamda ise, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının, sıcaklığın 24°C'dan 32°C'a artmasıyla çok fazla değişmediği tespit edilmiştir. 32°C'da, fermantasyon ortamındaki pepton başlangıç derişiminin 10 g/L'ye kadar artması ile maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının da bir miktar arttığı belirlenmiştir. Pepton başlangıç derişiminin 10 g/L olduğu fermantasyon koşullarında ise, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının; ortam sıcaklığının 24°C'dan 32°C'a artmasıyla azaldığı saptanmıştır.

Ayrıca, düşük pepton başlangıç derişimindeki fermantasyon ortamlarında, tüm sıcaklıklarda maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının da düşük oldukları bulunmuştur.





(a)

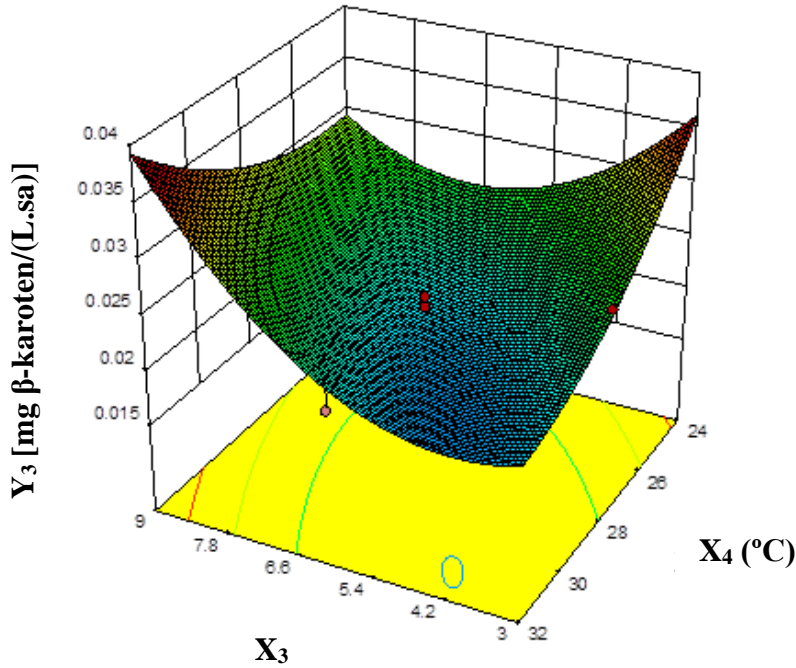


(b)

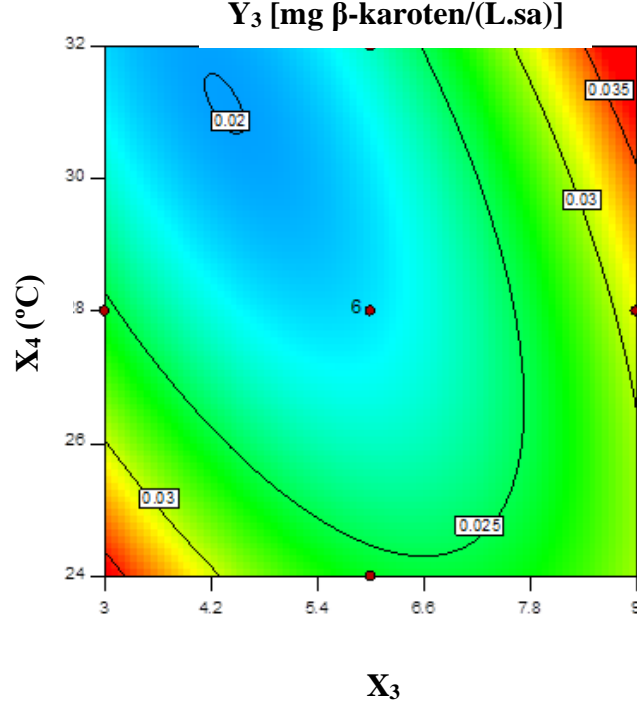
Şekil 4.53. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerine; fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişiminin ( $X_2$ ) ve sıcaklığın ( $X_4$ ) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 50$  g/L,  $X_3 = 6.0$ )

Şekil 4.53 b’de sunulan kontur grafiğindeki sonuçlar incelendiğinde ise, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı değerlerinin; 0.018-0.038 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) aralığında değiştikleri tespit edilmiştir.

Fruktoz ve pepton başlangıç derişimleri sırasıyla; 50 ve 5 g/L olan fermantasyon ortamlarında, başlangıç pH’ı ve sıcaklığın maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.54’de verilmiştir. Şekil 4.54 a’da verilen yanıt yüzey grafiğindeki değerler incelendiğinde, 24°C’da, başlangıç pH’ı 3.0 ve 32°C’da, başlangıç pH’ı 9.0 olan fermantasyon ortamlarında maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının da yüksek değerlerde oldukları belirlenmiştir. 32°C’da, elde edilen maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının fermantasyon ortamlarının başlangıç pH’ının artmasıyla arttığı saptanmıştır. 24°C’da ise, maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının fermantasyon ortamlarının başlangıç pH’ının 3.0’dan 6.0’a kadar artmasıyla önce azaldığı, pH 6.0’da en düşük değerine ulaştıktan sonra ise daha yüksek pH değerlerinde tekrar arttığı bulunmuştur. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızlarının, fermantasyon ortamı başlangıç pH’ının 3.0 olduğu durumda sıcaklığın azalması ve başlangıç pH’ının 9.0 olduğu durumda ise, sıcaklığın artmasıyla arttığı belirlenmiştir.



(a)

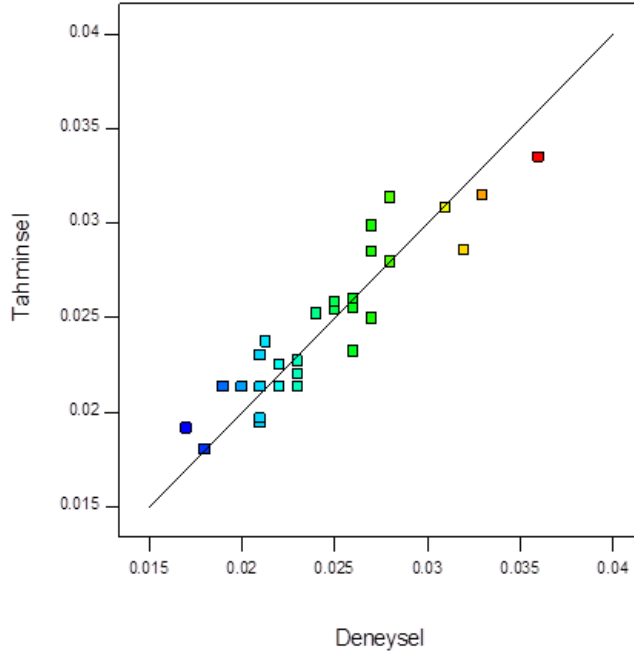


(b)

Şekil 4.54. Maksimum β-karoten üretim hızını (Y<sub>3</sub>) üzerine; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının (X<sub>3</sub>) ve sıcaklığının (X<sub>4</sub>) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X<sub>1</sub> = 50 g/L, X<sub>2</sub> = 5 g/L)

Şekil 4.54 b'deki kontur grafiğinde gösterilen değerler incelendiğinde, 31°C'da, başlangıç pH'ı 4.5 olan bir fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek β-karoten üretim hızının, 0.020 mg β-karoten/(L.sa)'dan daha düşük olduğu belirlenmiştir. 24°C'da, başlangıç pH'ının 3 ve 32°C'da, başlangıç pH'ının 9 olduğu fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum β-karoten üretim hızlarının ise, sırasıyla; 0.036 ve 0.039 mg β-karoten/(L.sa) oldukları tespit edilmiştir.

Deney tasarım planına göre gerçekleştirilen deneylerde elde edilen en yüksek β-karoten üretim hızlarının (Y<sub>3</sub>); deneysel sonuç değerleri ile Eş. 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırıldığı grafik; Şekil 4.55'de verilmiştir. Söz konusu grafik incelendiğinde, tahminsel ve deneysel sonuçların birbirine yaklaşık değerlerde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.55. Maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının ( $Y_3$ ); deneysel değerleri ile, Eş 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8456x + 0.0037$ ,  $R^2 = 0.845$ )

#### 4.6. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşu Tarafından $\beta$ -Karoten Üretimini Optimizasyonuna İlişkin Sonuçlar

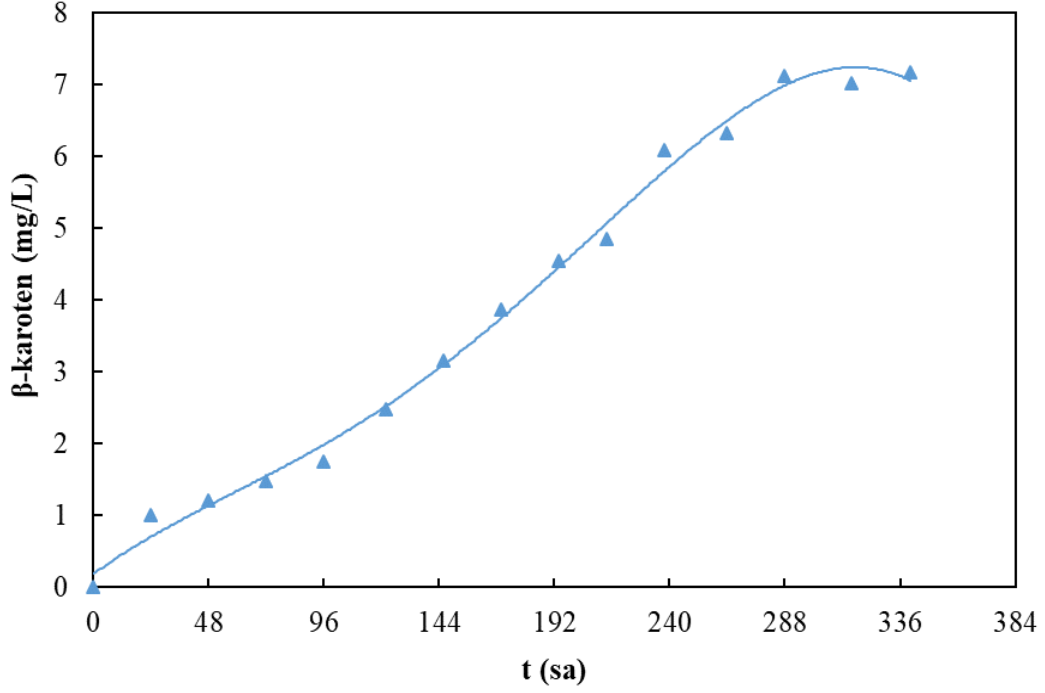
Çalışmanın bir önceki aşamasında bağımlı değişkenler ile yanıt değerleri arasındaki ilişkinin açıklandığı model eşitliklerin türetilmesinden sonra bu kısımda; hedeflenen yanıt değerleri elde etmek için tüm bağımlı değişkenlerin numerik optimizasyonu yapılarak, optimum değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon için, Design Expert 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı kullanılmıştır. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretiminin optimizasyonunda, tüm bağımlı değişkenler için istenilen hedeflerin belirlenmesinde, kullanılan programda yer alan, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonundan yararlanılmıştır. İncelenen suş ile  $\beta$ -karoten üretimi için istenilen hedefler doğrultusunda gerekli optimum koşullar ve bu koşullarda elde edileceği öngörülen yanıt değerleri, kullanılan program tarafından 100 farklı optimum çözüm olarak üretilmiştir. Bu çözümler; Çizelge Ek 9'da sunulmuştur. Söz konusu çizelgede verilen optimum çözümlere ait istenilen hedefe ulaşma oranlarının, 0.965 ve 1.000 aralığında değiştikleri tespit edilmiştir.

Araştırmanın bu bölümünde, farklı optimum koşullarda elde edilen ve sonuçları Çizelge Ek 9'da verilen çözümler içerisinde, istenilen hedefe ulaşma oranının 1.000 olduğu bir çözüm seçilmiş ve söz konusu bu koşullarda bir fermantasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Anılan çizelgede seçilen çözüme göre (çözüm no. 70), fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin; 49.459 g/L, pepton başlangıç derişiminin; 8.371 g/L, başlangıç pH'ının; 3.815 ve sıcaklığın; 27.402°C olduğu optimum çalışma koşullarında, istenen hedefe ulaşma oranının 1.000 olduğu ve bu koşullarda gerçekleştirilecek bir fermantasyon çalışmasının sonucunda; maksimum  $\beta$ -karoten derişiminin; 5.598 mg/L, mikroorganizma özgül üreme hızının; 0.033 sa<sup>-1</sup> ve maksimum  $\beta$ -karoten üretim hızının ise; 0.030 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak elde edilecekleri öngörülmüştür.

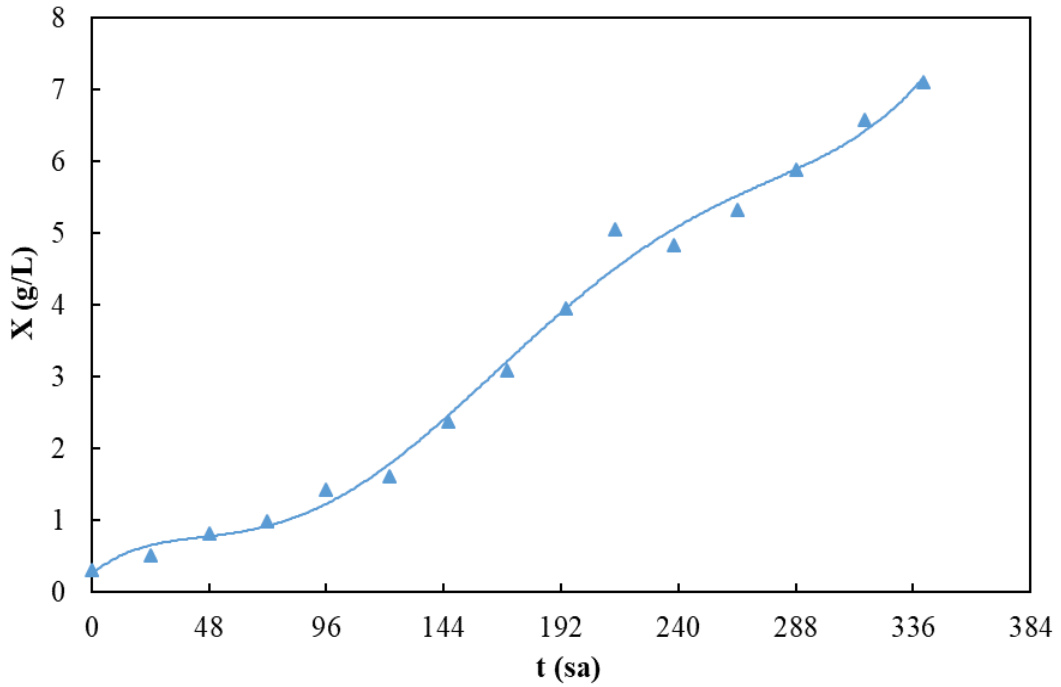
*R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretimi için seçilen optimum koşullarda, fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ile sıcaklığın ( $X_4$ ) istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu üzerindeki etkilerini gösteren bir örnek grafik, Şekil Ek 10'da sunulmuştur.

Bu çalışmada, bağımsız değişkenlerin seçilen optimum koşullarında, bir çalkalamalı su banyosunda, 100 mL çalışma hacminde fermantasyon ortamı içeren erlenler kullanılarak, 100 vuru/dak çalkalama hızında iki paralel deney gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamlarına aşılacak olan *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun başlangıç aşılama derişimi;  $3.9 \times 10^7$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda, her bir yanıtı ait elde edilen değerlerin ortalamaları hesaplanmış ve bu değerlerin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. Optimizasyon çalışmasında, program tarafından belirlenen optimum çalışma koşullarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimi, Şekil 4.56'da sunulmuştur. Optimum çalışma koşullarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten miktarının fermantasyon boyunca arttığı ve en yüksek derişimin; 7.18 mg/L olarak fermantasyonun sonunda tayin edildiği belirlenmiştir.

Optimum çalışma koşullarında elde edilen biyokütle derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik ise; Şekil 4.57'de verilmiştir.



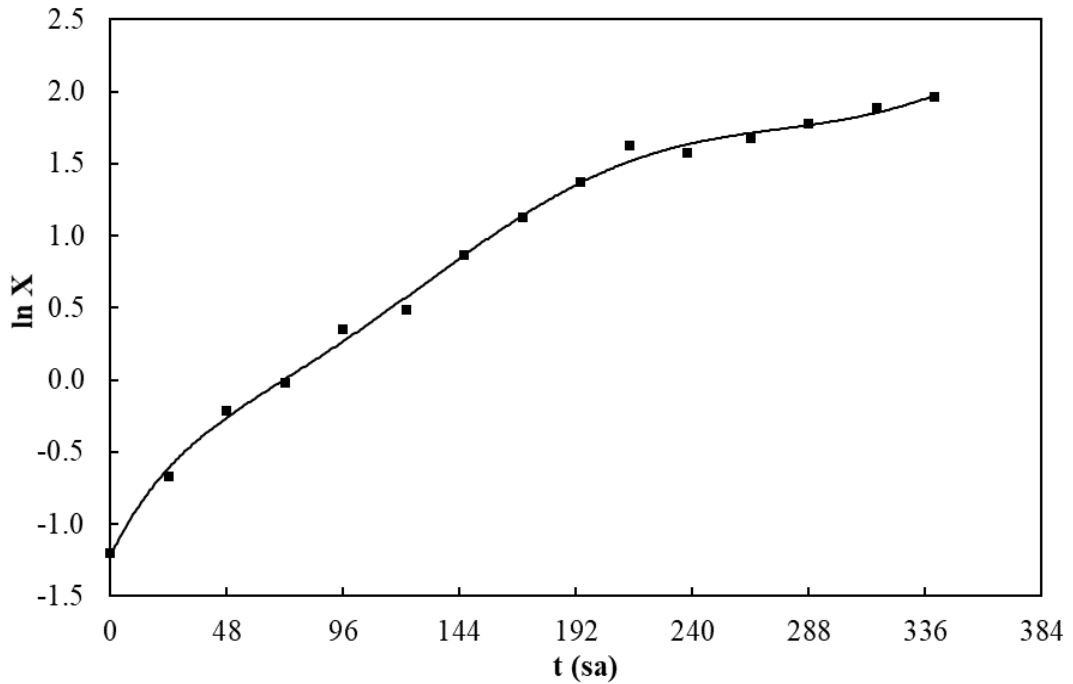
Şekil 4.56. Optimum çalışma koşullarında *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimi



Şekil 4.57. Optimum çalışma koşullarında *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi

Grafik incelendiğinde, biyokütle derişiminin de fermantasyon boyunca arttığı görülmektedir. Optimum fermantasyon koşullarında elde edilen en yüksek biyokütle derişimi, fermantasyonun sonunda 7.10 g/L olarak saptanmıştır.

Optimizasyon deneyinden elde edilen biyokütle derişim sonuçlarından yararlanılarak, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun özgül üreme hızı da hesaplanmıştır. Optimizasyon çalışmasında mikroorganizmanın özgül üreme hızının hesaplanması için önce biyokütle derişimlerinin lnX değerlerinin zamanla değişimini gösteren bir grafik çizilmiştir; daha sonra ise, üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı hesaplanmıştır. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu için lnX değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafik, Şekil 4.58’de sunulmuştur. Bu çalışmada, mikroorganizma özgül üreme hızı ( $\mu$ ); 0.025 sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.

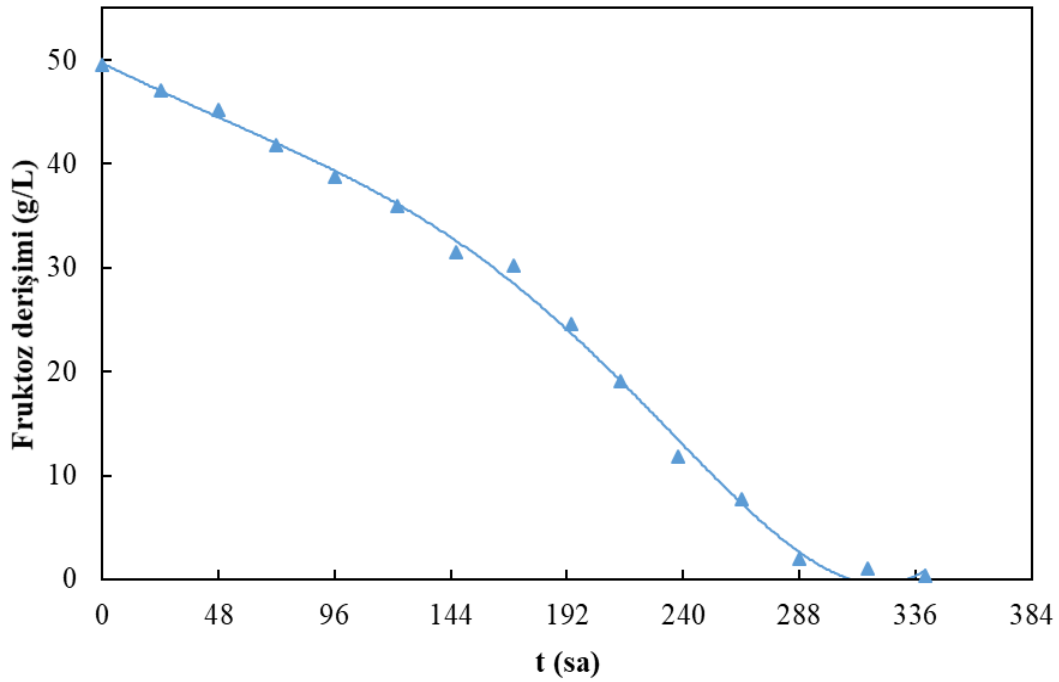


Şekil 4.58. Optimum çalışma koşullarında *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu için lnX değerlerinin zamanla değişimi

Optimizasyon çalışmasında ayrıca, maksimum ürün oluşum hızı da ( $Y_3$ , deneysel) hesaplanmıştır. Bu amaçla önce,  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimini gösteren

grafik (Şekil 4.56) kullanılarak, farklı zamanlardaki ürün oluşum hızı değerleri hesaplanmış, daha sonra ise, en yüksek ürün oluşum hızı [ $0.0313 \text{ mg } \beta\text{-karoten}/(\text{L}\cdot\text{sa})$ ] değeri belirlenmiştir. Bu çalışmada, ek olarak, farklı zamanlardaki özgül ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. Söz konusu optimizasyon koşullarında elde edilen en yüksek özgül ürün oluşum hızı ( $\gamma_m$ ) değeri ise,  $0.0334 \text{ mg } \beta\text{-karoten}/(\text{g mo}\cdot\text{sa})$  olarak tespit edilmiştir.

Optimum fermantasyon koşullarında, ortamdaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi ise; Şekil 4.59'da gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde, fruktoz derişiminin fermantasyon süresince azaldığı ve fermantasyonun sonunda da tamamen tükendiği belirlenmiştir.



Şekil 4.59. Optimum çalışma koşullarında fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi

Optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar, optimizasyon programının ileri analiz (post analysis) kısmı yardımıyla değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme için, öncelikle, söz konusu optimizasyon



programını kullanarak, % 95 güven aralığında, tüm bağımlı değişkenlerin daha önce türetilen model eşitliklerinden (Eş. 4.1-4.3), optimum koşullarda elde edilmesi gereken minimum ve maximum değerleri belirlenmiştir. Daha sonra ise, optimum koşullarda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen yanıtlara ait deneysel sonuçların, bu bağımlı değişkenlerin optimizasyon programını kullanarak belirlenen en yüksek ve en düşük değerleri arasında olup olmadıkları araştırılmıştır. Yapılan analiz sonucunda, tüm bağımlı değişkenlere ait deneysel sonuçların, her bir değişken için program tarafından model eşitliklerden yararlanılarak hesaplanan değer aralıklarında oldukları tespit edilmiştir.

Bu çalışma için optimum koşullarda, her yanıt için kullanılan optimizasyon programının doğrulama menüsü kullanılarak belirlenmiş olan bağımlı değişkenlerin, deneysel ve teorik değerleri ile minimum ve maksimum değerleri karşılaştırmalı olarak; Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Bağımlı değişkenlerin deneysel değerleri ve optimizasyon programı kullanılarak hesaplanan teorik değerleri ile minimum ve maksimum değerleri

Bağımlı değişken	Simge	Deneysel değer	Teorik değer	Minimum değer	Maksimum değer
Maksimum $\beta$ -karoten derişimi (mg/L)	Y <sub>1</sub>	7.18	5.598	3.96	7.23
Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub>	0.025	0.033	0.021	0.046
Maksimum $\beta$ -karoten üretim hızı [mg $\beta$ -karoten/(L.sa)]	Y <sub>3</sub>	0.031	0.030	0.023	0.036

Çizelge 4.10'daki sonuçlar incelendiğinde, tüm bağımlı değişkenler için elde edilen deneysel sonuçların kabul edilebilir sınırlar arasında oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, Design Expert 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programının

doğrulama menüsü yardımıyla, optimum koşullarda gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen değerlerin, %95 güven aralığında oldukları da doğrulanmıştır.

Tez çalışmasının bu kısmında gerçekleştirilen deneyin sonucunda; istenen maksimum  $\beta$ -karoten derişimini elde etmek için, seçilen çözümdeki parametre değerleri optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasının bundan sonraki deneyleri belirlenmiş olan bu optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Park ve ark. (2005), bir *Rhodotorula glutinis* suşu ile şeker kamışı melasında karotenoid üretimini artırmak için deney tasarımında iki kademeli bir optimizasyon stratejisi kullanılarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. İlk aşamada, beş fermantasyon parametresinin (pH, şeker kamışı melası derişimi, üre,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl) karotenoid üretime etkisinin, kesikli bir faktöryel tasarım kullanılarak değerlendirildiği bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda denenen üç parametrenin, biyokütle ve karotenoid üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. İkinci aşamada, biyokütle verimi ve karotenoid üretimini daha da artırmak için, ilk aşamada etkisi önemli bulunan üç faktörü optimize etmek için; yüzey merkezli bir kompozit tasarım (face centered central composite design) kullanıldığı ifade edilmiştir. Bu iki aşamalı optimizasyon stratejisiyle karotenoid derişiminin ortalama; 1.39 mg/L'den 3.46 mg/L'ye olacak şekilde yaklaşık; 2.5 kat artırıldığı belirtilmiştir.

Chandi ve ark. (2010) tarafından bir *R. glutinis* suşu ile maksimum karotenoid elde etmek için yapılan bir diğer çalışmada ise; domates atığı, malt özütü, maya özütü, pepton ve glukoz olmak üzere beş besiyeri bileşeninin optimum derişimlerinin belirlenmesinde; cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır. Domates atığı ve maya özütünün daha yüksek derişimlerinin karotenoid üretimini desteklediği belirtilmiştir. Karotenoid sentezinin aksine yüksek maya özütü derişiminin biyokütle oluşumunu olumsuz etkilerken, besiyerindeki yüksek glukoz miktarının biyokütle oluşumunu desteklediği belirtilmiştir. Oluşturulan model ile, maksimum karotenoid derişimi için ortam bileşenlerinin optimal derişimlerinin, domates ekstraktı ile malt özütü, maya özütü, pepton ve glukoz için sırasıyla; 660 mL/L ile 1.5, 4.5, 7.4 ve 10 g/L olarak hesaplandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada belirlenen optimum besiyeri konsantrasyonlarında elde

edilen maksimum karotenoid derişiminin (2.92 mg/L), modelde öngörülen değer (3.10 mg/L) ile korelasyon içinde bulunduğu rapor edilmiştir.

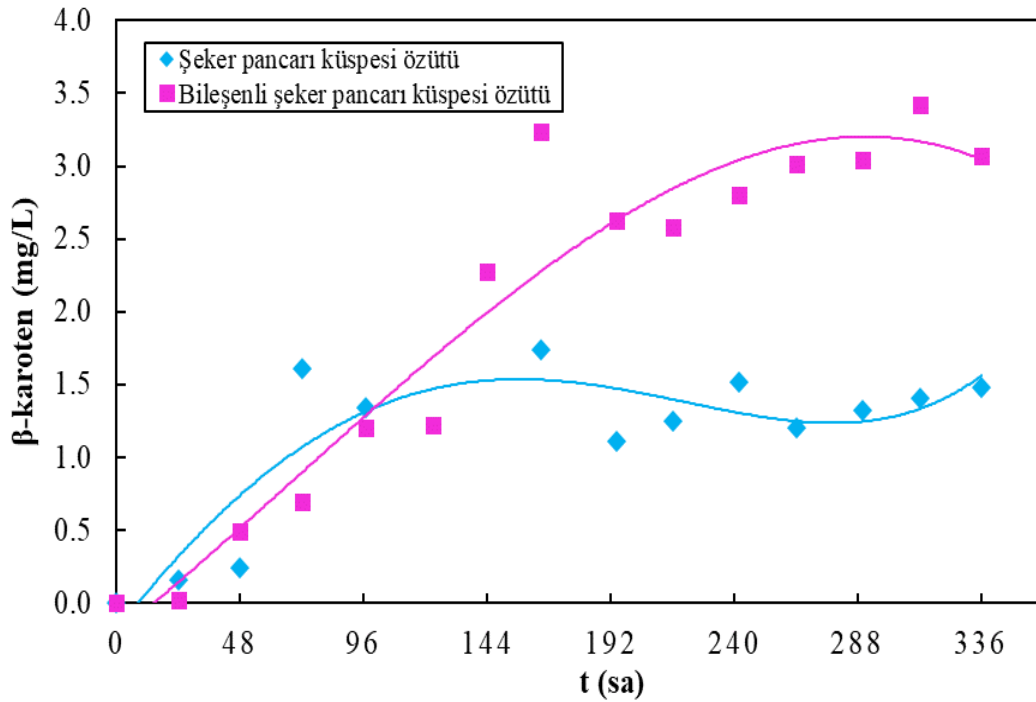
Maldonade ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, bir *Rhodotorula mucilaginosa* suşu ile maksimum karotenoid üretimi için, sıralı istatikselsel yöntemlerin kullanıldığı bildirilmiştir. Bu amaçla bağımsız değişken olarak seçilen pH, glukoz, maya özütü, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>'ın farklı seviyelerinin belirlenmesinde 2<sup>4</sup> faktöryel deney tasarımının kullanıldığı ifade edilmiştir. Bu deneylerin sonucunda karotenoid üretiminde en etkili değişkenin maya özütü olduğu ve üretime olumlu bir etkisi olduğu, pH'nın ise önemli bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Söz konusu araştırmada, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bileşeninin karotenoid üretime olumsuz bir etkisi olduğu belirlenirken, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O'nun biyokütle oluşumu üzerinde pozitif, karotenoid üretimi üzerinde ise negatif etkisi olduğu belirtilmiştir. Anılan alışmada; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>'ın karotenoid üretimi üzerine istatikselsel olarak önemli bir etkisinin olmadığı da ifade edilmiştir. Ayrıca, glukozun mikrobiyel gelişme için gerekli olması nedeniyle biyokütle oluşumu üzerine pozitif etkisi olmasına rağmen karotenoid üretimi için önemli bir etkisinin tespit edilmediği de belirtilmiştir. Her iki bağımlı değişken değeri (biyokütle ve karotenoid derişimleri) için de; glukoz ve maya özütü dışında bağımsız değişkenlerin etkileşimlerinin önemli bir etkisinin belirlenmediği de bildirilmiştir. Anılan çalışmada karotenoid üretiminin optimizasyonu amacıyla, iki faktörlü iki seviyede bir dizayndan elde edilen tam karesel bir denklem ile açıklanan ikinci dereceden merkezi karma deney tasarımı kullanılarak glukoz ve maya özütünün karotenoid üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı belirtilmiştir. Yapılan optimizasyon sonucunda maksimum karotenoid üretiminin; 5 g/L maya özütü ve 20 g/L glukoz bulunan ortamda elde edildiği ve karotenoid oluşumunun maya özütü derişimindeki değişimlere, glukoz derişiminden daha hassas olduğu da ifade edilmiştir.

#### **4.7. Çeşitli Doğal Substrat Kaynaklarının *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 Suşunun β-karoten Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesine İlişkin Sonuçlar**

Doğal substrat kaynağı olarak, çeşitli tarımsal artıkların, fermantasyon ortamı veya fermantasyon ortamındaki temel substrat yerine kullanılmalarının, incelenen *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun β-karoten üretimi üzerine etkilerini inceleyen deneylere ilişkin sonuçlar aşağıda verilmektedir.

#### 4.7.1. Şeker Pancarı Küspesi Özütü İle Yapılan Çalışmalar

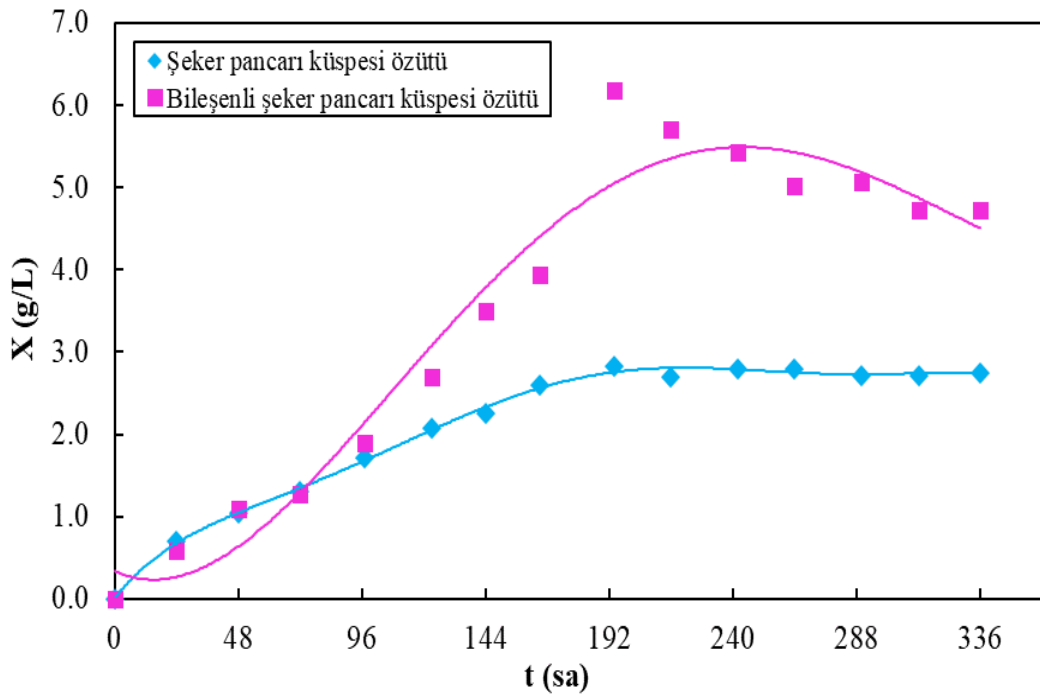
Şeker pancarı küspesi özütü (ŞPKÖ) ile gerçekleştirilen deneylerde, bileşensiz ŞPKÖ ve içerisine karbon kaynağı dışındaki bileşenler eklenmiş ŞPKÖ ortamlarının toplam şeker başlangıç derişimleri sırasıyla; 12.4 ve 14.3 g/L olarak tayin edilmiştir. Bu deneyler için, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun, başlangıç inokülasyon derişimi;  $1.8 \times 10^7$  kob/mL olarak hesaplanmıştır. Bileşenli ve bileşensiz olarak hazırlanmış olan fermentasyon ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun ürettiği  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.60'da gösterilmiştir.



Şekil 4.60. Bileşenli ve bileşensiz şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada, elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri; bileşensiz ŞPKÖ fermentasyon ortamında; 165. saatte 1.74 mg/L olarak belirlenirken, ana fermentasyon ortamındaki karbon kaynağı dışındaki diğer bileşenleri de içeren, ŞPKÖ'nün kullanıldığı fermentasyon ortamında ise; 312. saatte 3.42 mg/L olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.60).

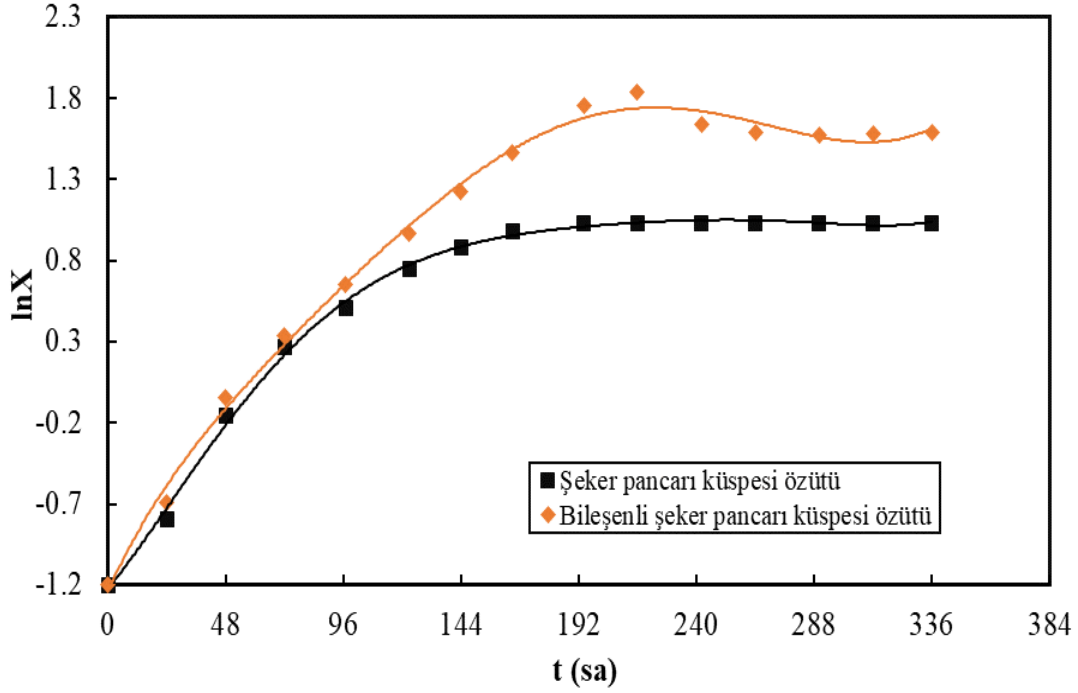
Bu deneylerde, her iki fermantasyon ortamında elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.61’de verilmiştir. İlgili grafik incelendiğinde, biyokütle derişimlerinin her iki ortamda da önce, fermantasyonun 194. saatine kadar arttığı, daha sonra ise, bileşensiz ŞPKÖ ortamında bu değerin çok fazla değişmediği, bileşenli ŞPKÖ ortamında ise; biyokütle derişiminin bir miktar azaldığı saptanmıştır. Her iki ortamda da en yüksek biyokütle derişimleri; fermantasyonun 194. saatinde belirlenmiş olup, bu değerler bileşensiz ve bileşenli ŞPKÖ ortamları için sırasıyla; 2.82 g/L ve 6.18 g/L olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.61. Bileşenli ve bileşensiz şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu deneylerde çalışılan suşun her iki ortamdaki özgül üreme hızlarının hesaplanmalarında, Şekil 4.61’deki veriler kullanılarak  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiş ve üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızları hesaplanmıştır. Bileşenli ve bileşensiz ŞPKÖ ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu için  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini

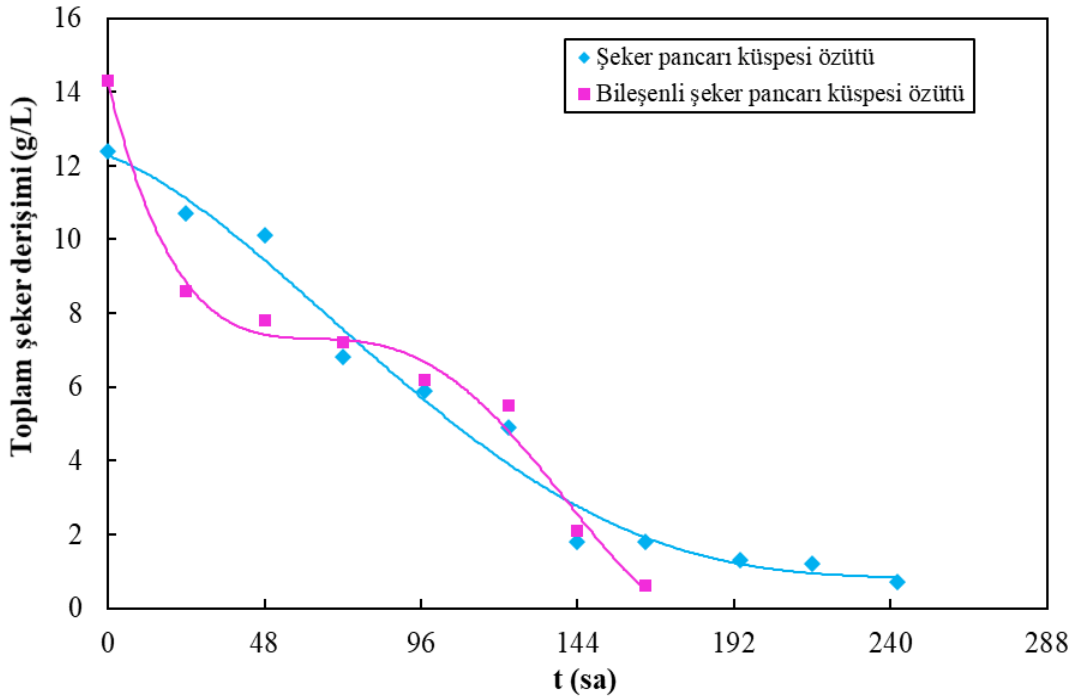
gösteren grafik, Şekil 4.62’de sunulmuştur. Bileşensiz ve bileşenli ŞPKÖ ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde mikroorganizma özgül üreme hızları ( $\mu$ ) sırasıyla; 0.025 ve 0.029 sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.62. Bileşenli ve bileşensiz şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri

Şeker pancarı küspesi özütü ile yapılan çalışmada ayrıca, maksimum ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla önce,  $\beta$ -karoten derişiminin zamanla değişimlerini gösteren grafik (Şekil 4.60) kullanılarak, bileşenli ve bileşensiz ŞPKÖ ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun farklı zamanlardaki ürün oluşum hızı değerleri hesaplanmış ve en yüksek ürün oluşum hızları ise sırasıyla; 0.0097 ve 0.0192 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada, farklı zamanlardaki özgül ürün oluşum hızı değerleri de hesaplanmıştır. En yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) bileşensiz ve bileşenli ŞPKÖ ortamlarında sırasıyla; 0.0081 ve 0.0138 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak elde edilmiştir.

Şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı deneylerde fermantasyon ortamlarındaki toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.63’de gösterilmiştir. Bu deneylerde fermantasyon ortamlarındaki toplam şeker derişimleri fenol sülfürik asit yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu amaçla toplam şeker analizi için daha önceden hazırlanmış olan sakkaroz çalışma doğrusundan yararlanılmıştır. İlgili grafik incelendiğinde bileşenli ŞPKÖ içeren fermantasyon ortamındaki toplam şekerin, bileşensiz ŞPKÖ ortamına göre, daha kısa sürede tüketildiği görülmektedir.



Şekil 4.63. Şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamlarındaki toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri

Ülkemizin şeker pancarından şeker üretiminde Dünya’da sayılı ülkelerden biri olduğu ve Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2008 verilerine göre ülkemizde yaklaşık 16 milyon ton şeker pancarı üretildiği bildirilmektedir (Aldemir ve Karşlı, 2012). 2019/2020 dönemi için verilen rakamlara göre Türkiye şeker fabrikalarındaki toplam melas üretimi; 283 bin ton iken yaş küspe üretimi ise; 2 milyon ton olarak verilmiştir (Anonim, 2020). Şeker üretimi sırasında yüksek miktarlarda şeker küspesi oluştuğu bilinmektedir. Şeker pancarı küspesi genel olarak hayvan yemi olarak

değerlendirilmektedir. Çalışmanın bu kısmında söz konusu bu gıda sanayii artığının, katma değeri yüksek bir ürün olan  $\beta$ -karoten üretiminde değerlendirilebilirliğinin araştırılması da amaçlanmıştır.

Şeker pancarı özütü ile yapılan çalışmada,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri başta olmak üzere, özgül üreme hızı, ürün oluşum ve özgül ürün oluşum hızları ile ilgili tüm sonuçlar için en yüksek değerlerin; bileşenli olan ortamda elde edildiği belirlenmiştir. İncelenen suş tarafından ortamdaki şekerin, bileşenli ŞPKÖ ortamında daha kısa sürede tüketildiği bulgulanmıştır.

Rubio ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada kullanılan *R. glutinis* suşunun yüksek şeker içeren melası kullanabilecek kadar yüksek invertaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bir *Rhodotorula glutinis* suşu ile  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz (E.C. 3.2.1.55) enzimi üretiminde, şeker pancarı melası ve küspesinin karbon kaynağı olarak denendiği bir çalışmada; küspenin özgül üreme hızını en az desteklediği belirtilmiştir (Martínez ve ark., 2006). Selüloz ve hemiselüloz içeren küspede, sadece 3.7 g/L indirgen şeker bulunması nedeni ile suşun asimile edilebileceği karbon kaynağının melasa göre çok daha az olmasının, bunun nedeni olduğu ifade edilmiştir.

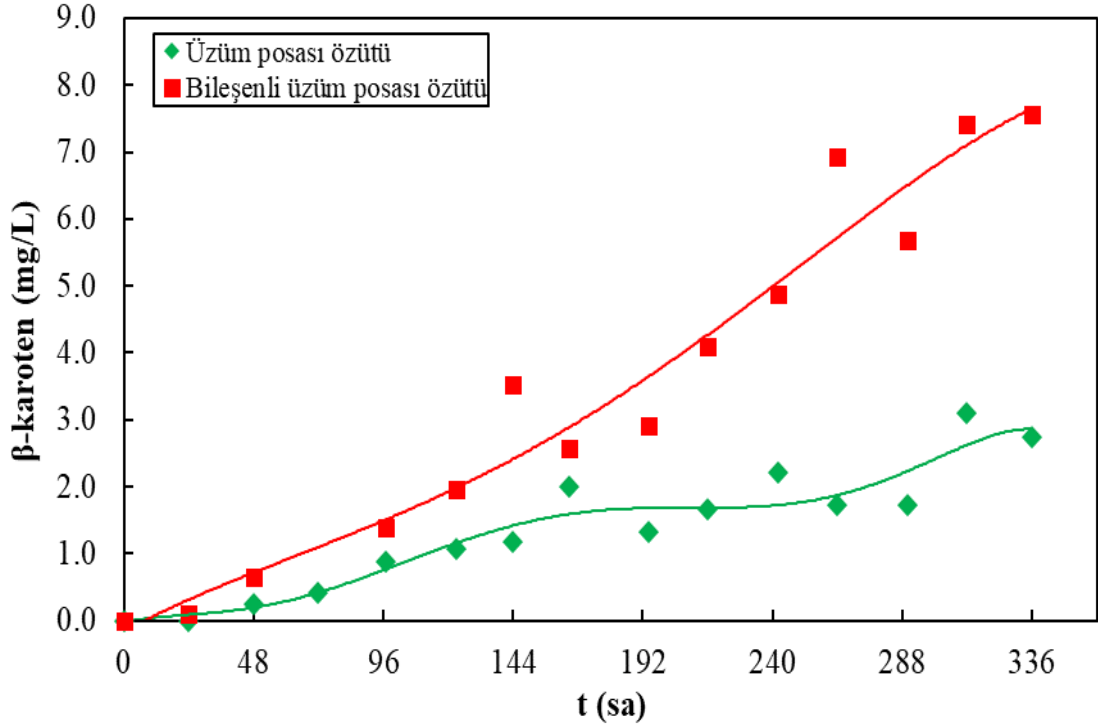
Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında fermantasyonun 192. saatinden sonra biyokütle ve  $\beta$ -karoten derişimlerinin de pek fazla değişmemesinin nedeni; Şekil 4.63'da görüleceği üzere ortamda toplam şeker derişiminin nerdeyse tükenmesiyle ortamda asimile edilecek karbon kaynağı kalmamasının sonucu olarak açıklanabilir.

#### **4.7.2. Üzüm Posası Özütü İle Yapılan Çalışmalar**

Bu çalışmada bir diğer doğal substrat kaynağı olarak, beyaz üzüm posasından elde edilen özüt kullanılmıştır. Üzüm posası özütünün başlangıç glukoz ve fruktoz derişimleri sırasıyla; 68.3 ve 50.2 g/L olarak tayin edilmiştir. Bileşenli ÜPÖ içeren fermantasyon ortamının başlangıç glukoz ve fruktoz derişimleri ise sırasıyla; 66.4 ve 52.5 g/L olarak bulunmuştur. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun, hazırlanan fermantasyon ortamları için başlangıç inokülasyon derişimi ise;  $1.8 \times 10^7$  kob/mL olarak hesaplanmıştır. Üzüm posası özütü ile hazırlanan fermantasyon ortamları kullanılarak



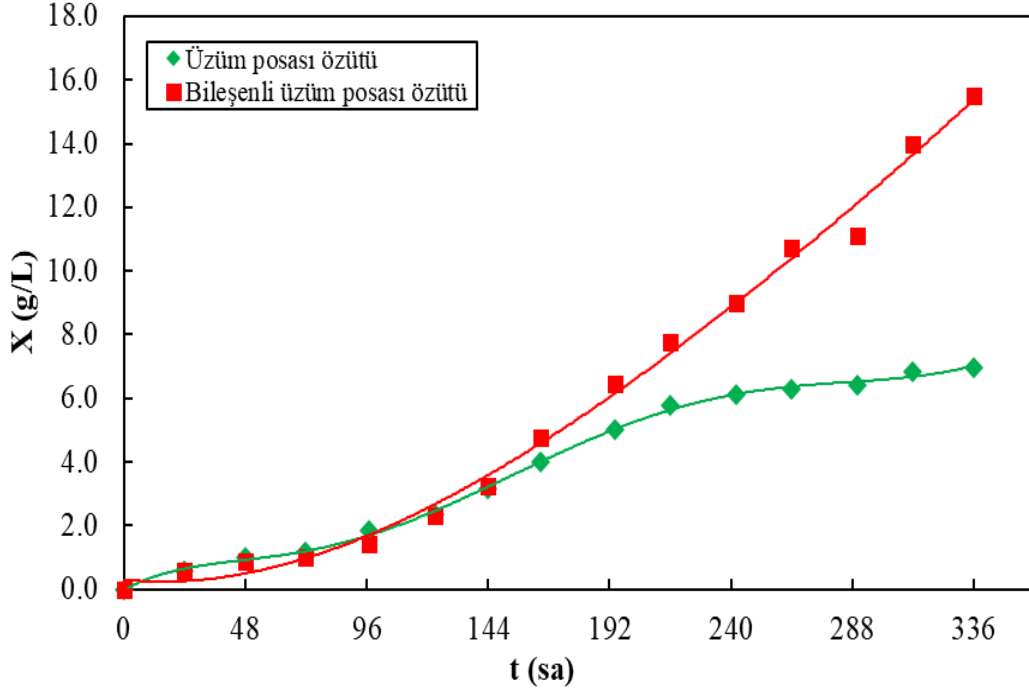
gerçekleştirilen bu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.64’de sunulmuştur.



Şekil 4.64. Bileşenli ve bileşensiz üzüm posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Bileşenli ÜPÖ’nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, diğer ortama göre daha yüksek  $\beta$ -karoten derişimlerinin elde edildiği ve bu ortamdaki en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin, fermantasyonun sonunda, 7.57 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Yalnızca ÜPÖ içeren ortamda elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ise, fermantasyonun 312. saatinde; 3.09 mg/L olarak tayin edilmiştir.

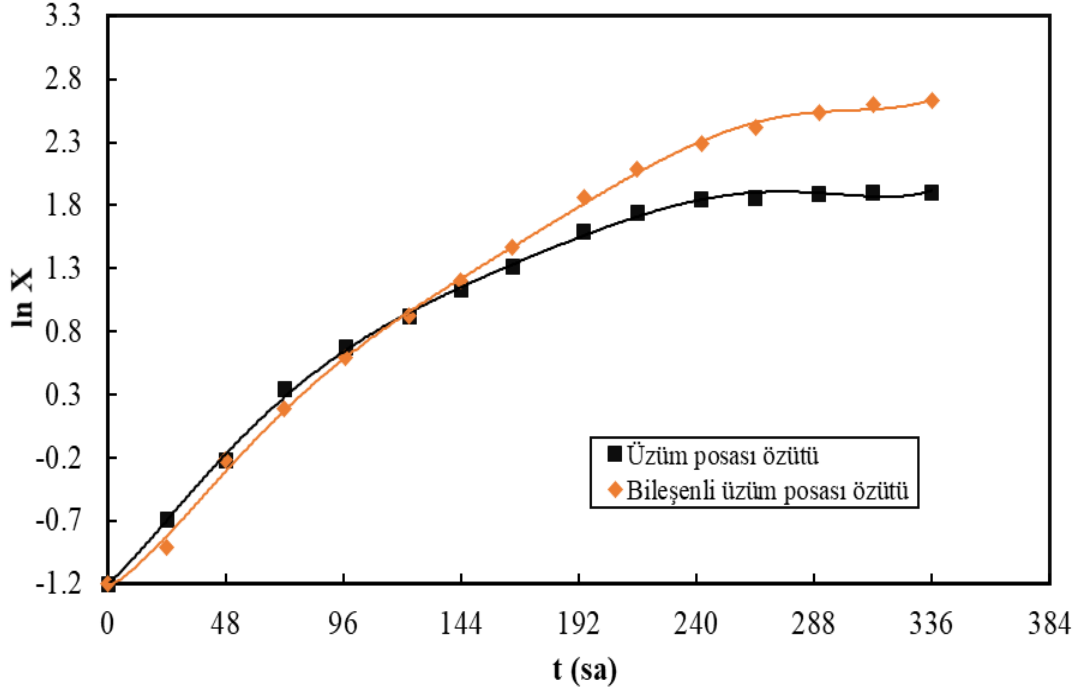
Üzüm posası özütü ile çalışılan deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.65’deki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.65. Bileşenli ve bileşensiz üzüm posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

ÜPO'nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, incelenen suşun biyokütle derişiminin fermantasyon süresince arttığı ve en yüksek değerin fermantasyonun sonunda; 15.5 g/L olduğu tespit edilmiştir. Bileşenli ÜPÖ'nün kullanıldığı fermantasyon ortamında ise, çalışılan suşun biyokütle derişiminin fermantasyonun 216. saatine kadar arttığı, daha sonra ise zamanla çok fazla değişmediği belirlenmiştir. Üzüm posası özütü ile yapılan bu deneylerde, ortama eklenen diğer bileşenlerin üremeyi ve  $\beta$ -karoten üretimini teşvik ettikleri belirlenmiştir.

Çalışmada incelenen suşa ait özgül üreme hızları,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.66). Bu deneylerde, ÜPÖ ve bileşenli ÜPÖ'nün kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, çalışılan suşa ait üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ) sırasıyla; 0.025 ve 0.033  $\text{sa}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

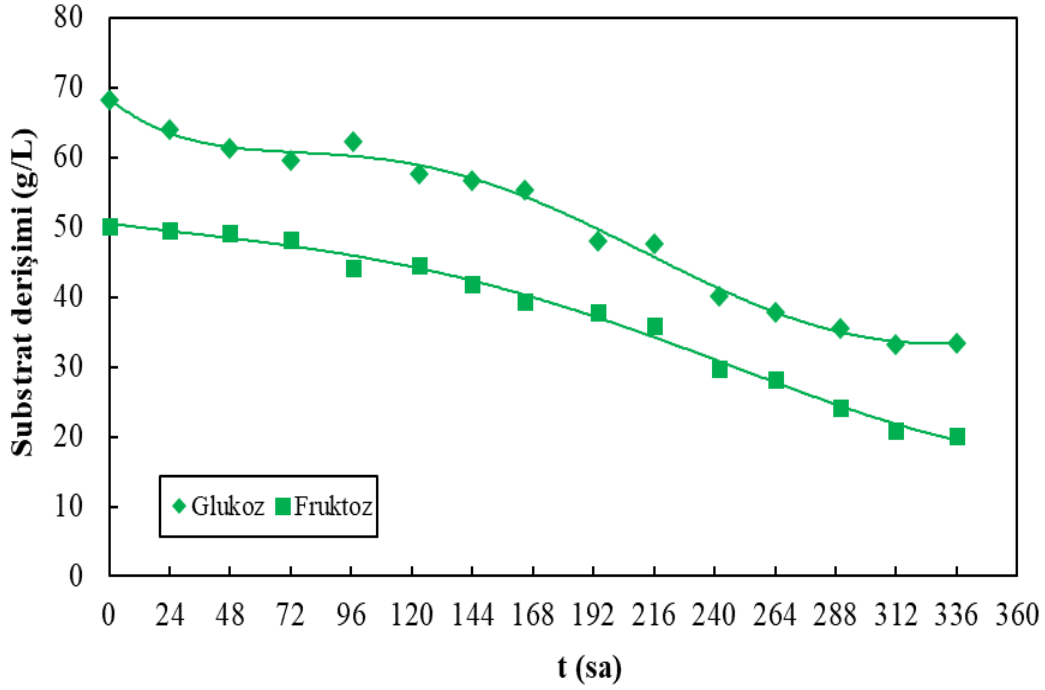


Şekil 4.66. Bileşenli ve bileşensiz üzüm posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri

Bu deneylerde ayrıca, maksimum ürün oluşum ve maksimum özgül ürün oluşum hızları da belirlenmiştir. Bu amaçla önce, Şekil 4.64’de verilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik kullanılmış ve farklı zamanlardaki ürün oluşum hızı değerleri hesaplanarak en yüksek ürün oluşum hızı değerleri bulunmuştur. ÜPÖ ve bileşenli ÜPÖ’nün kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, elde edilen en yüksek ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0122 ve 0.0305 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak belirlenirken, en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) ise sırasıyla; 0.0049 ve 0.0153 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, ÜPÖ ve bunun bileşenli ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri sırasıyla; Şekil 4.67 ve Şekil 4.68’de verilmiştir. Şekil 4.67’de yer alan grafik incelendiğinde, fermantasyonun ilk günlerinde glukoz tüketiminin fruktoza oranla bir miktar daha fazla olduğu, daha sonra ise; fermantasyon süresince her iki şekerin de kullanılan maya suşu tarafından tüketilerek giderek azaldığı belirlenmiştir.

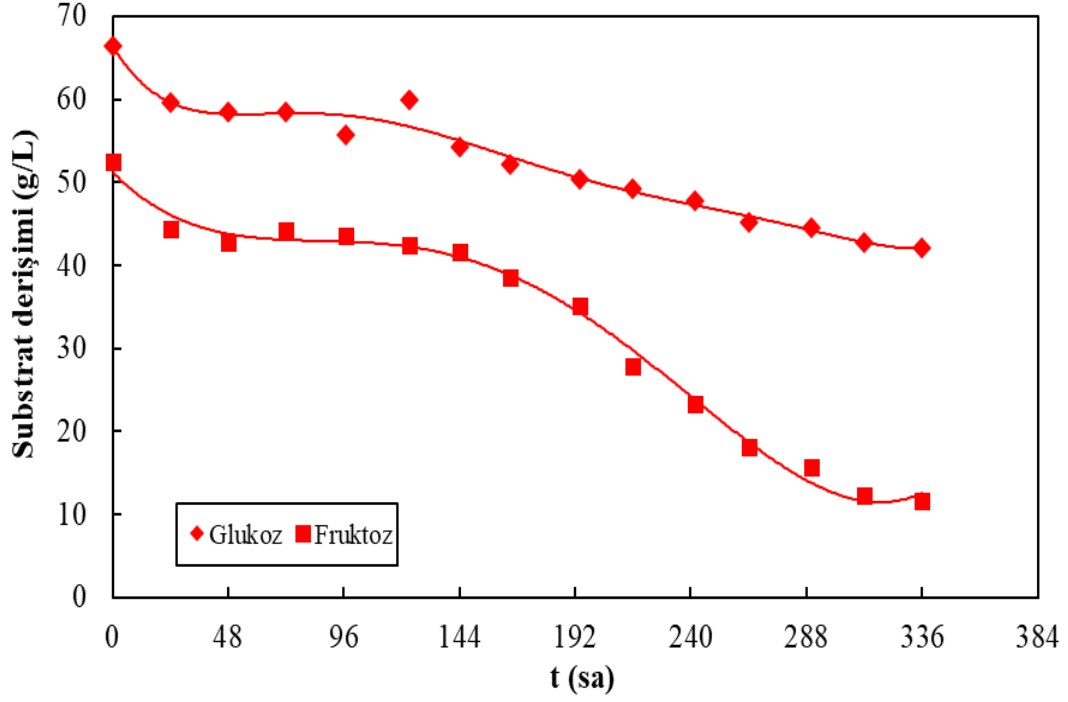
Fermantasyon sonunda ortamda harcanmadan kalan glukoz ve fruktoz derişimlerinin sırasıyla; 33.4 ve 20.1 g/L olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.67. Üzüm posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamlarındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Bileşenli üzüm posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri incelendiğinde ise, fermantasyonun başlangıcında her iki şekerin de kullanılmaya başlandığı, fermantasyonun ilerlemesiyle fruktozun, ortamda bulunan glukozu göre daha fazla tüketildiği saptanmıştır (Şekil 4.68). Bu deneylerde fermantasyonun sonunda, tüketilmeden kalan glukoz ve fruktoz derişimlerinin sırasıyla; 42.1 ve 11.7 g/L olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda önceki deneylerimizde belirlenen; çalışılan *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun fruktofilik karakterde olmasının, ortamdaki fruktozun, glukozu kıyasla daha fazla tüketilmesinin nedeni olduğu düşünülmektedir.

Bunun yanısıra, bileşenli ÜPÖ içeren fermantasyon ortamının, diğer ÜPÖ ortamına göre hem üremeyi ve hem de  $\beta$ -karoten üretimini teşvik etmesi nedeniyle de; fruktoz tüketiminin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.68. Bileşenli üzüm posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamlarındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Üzüm meyvesinin dünya çapında yaklaşık olarak; 7.2 milyon hektar bir alanda, 77 milyon ton üretim miktarı ile en fazla üretilen meyvelerin başında geldiği rapor edilmektedir. Dünya ülkeleri arasında Türkiye'nin, 467 bin hektar bağ alanı ile 5. sırada, yaklaşık 4.2 milyon ton üzüm üretimi ile ise 6. sırada yer aldığı bildirilmektedir. Türkiye'deki üzüm üretiminin yaklaşık; 2.2 milyon tonu sofralık, 1.6 milyon tonu kurutmalık ve 445 bin tonu şaraplık olarak değerlendirildiği belirtilmektedir (Bekar, 2016). Şarap fabrikalarında üzümün suyu sıkılıp, suyu alındıktan sonra, üzüm çeşidine ve işleme göre % 15–25 oranında arta kalan üzüm posasına cibre denildiği ifade edilmektedir. Çeşide göre değişmekle birlikte hasat edilen her ton üzüm için 75–110 kg posa elde edildiği belirtilmektedir. Elde edilen posa ya da cibrenin pek çok amaçla kullanılabilirdiği bildirilmektedir (Çıtak, Sönmez ve Öktüren, 2006). Beyaz üzüm posası; yüksek miktarda suda çözünebilir karbonhidratlar içerirken, kırmızı üzüm posası içeriğinin; diyet lifler ve fenolik bileşiklerce zengin olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenle beyaz üzüm posasının mikrobiyal prosesler için daha uygun bir karbon kaynağı olduğu bildirilmiştir (Bayrak ve Büyükkileci, 2018). Ülkemizde üzümün yüksek miktarda üretilmesi ve şaraba işlenmesi ile yüksek miktarda posa üretildiği

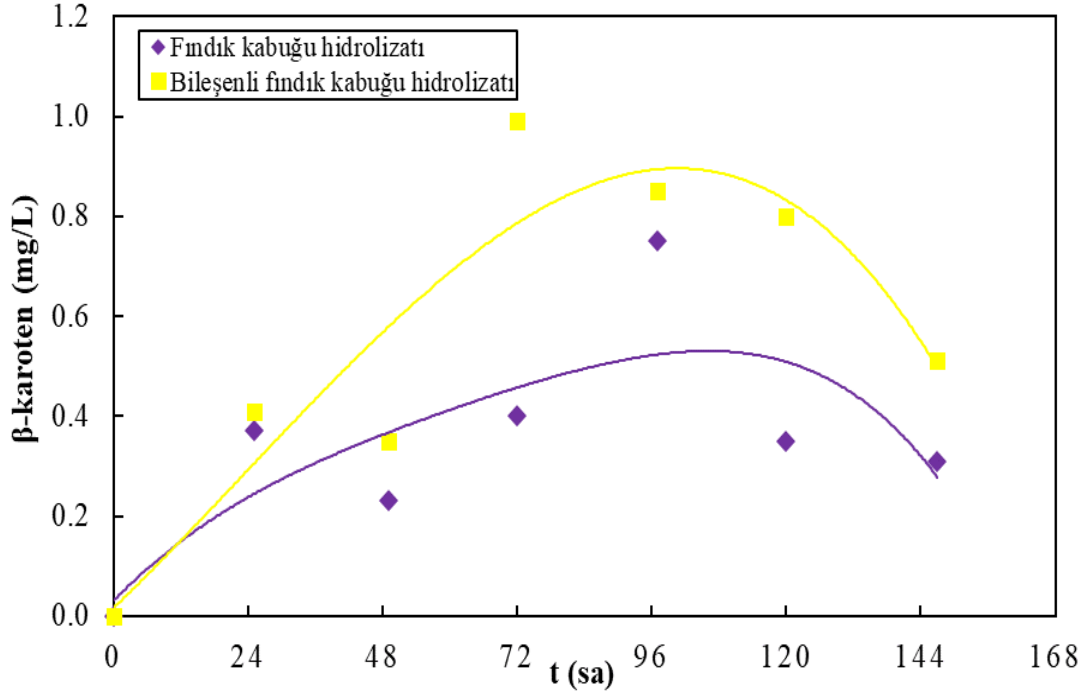
bildirilmektedir (Bekar, 2016). Bu nedenle çalışmanın bu bölümünde, beyaz üzüm posasının doğal substrat kaynağı olarak değerlendirilebilirliği incelenmek istenmiştir. Çalışılan suş ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, ÜPÖ'nün belirli bileşenler ile desteklendiğinde,  $\beta$ -karoten üretimi için değerlendirilebilir bir kaynak olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

#### 4.7.3. Fındık Kabuğu Hidrolizatı İle Yapılan Çalışmalar

Tez çalışmasının bu bölümünde incelenen bir diğer doğal substrat kaynağı ise fındık kabuğu hidrolizatıdır (FKH). Bu deneylerde kullanılan FKH'nın indirgen şeker, glukoz ve ksiloz başlangıç derişimleri sırasıyla; 37.8, 1.03 ve 51.2 g/L olarak saptanmıştır. Bileşenli FKH ortamındaki indirgen şeker, glukoz ve ksiloz başlangıç derişimleri ise sırasıyla; 39.8, 0.76 ve 55.8 g/L olarak tayin edilmiştir. Deneyler, daha önce belirlenmiş olan optimal koşullarda gerçekleştirilmiş olup FKH ortamları için *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun başlangıç aşılama derişimi;  $4.4 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir.

Fındık kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretiminin fermantasyon boyunca değişimi Şekil 4.69'da verilmektedir. Fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimlerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun nedeninin; fındık kabuğu hidrolizatının içerdiği inhibitör maddeler olabileceği düşünülmektedir (Eryasar-Orer ve Karasu-Yalcin, 2019). Çalışılan suşun FKH ve bileşenli FKH ortamlarındaki en yüksek  $\beta$ -karoten üretimleri sırasıyla; 0.75 ve 0.99 mg/L olarak fermantasyonun 97. ve 72. saatlerinde tayin edilmiştir.

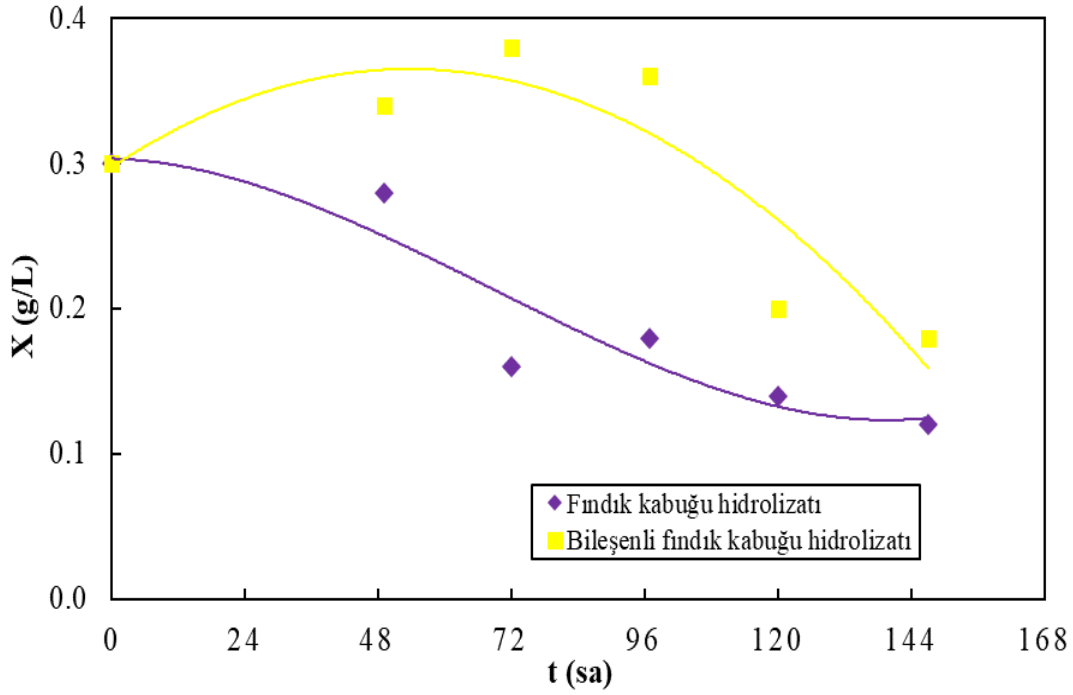
Bu deneylerde, çalışılan suşun biyokütle derişimlerinin fermantasyon süresince değişimleri Şekil 4.70'de gösterilmiştir. Biyokütle derişiminin, FKH'nın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde fermantasyon süresi boyunca azaldığı, bileşenli FKH içeren ortamda ise biyokütle derişiminin 72. saate kadar arttığı, daha sonra ise azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.69. Bileşenli ve bileşensiz fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Bileşenli FKH ortamında, en yüksek biyokütle derişimi; 0.38 g/L olarak tayin edilmiştir. Şekil 4.69 ve 4.70'deki grafiklerin incelenmesinden de görülebileceği gibi, FKH'nın fermantasyon ortamı olarak kullanılmasının, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üremesini ve  $\beta$ -karoten üretimini desteklemediği bulunmuştur. Bu nedenle de FKH'nın kullanıldığı deneylerde mikroorganizma özgül üreme hızı değerleri hesaplanmamıştır.

Bileşensiz ve bileşenli FKH'nın kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, maksimum ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0067 ve 0.0096 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak hesaplanmış, maksimum özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) ise sırasıyla; 0.0269 ve 0.0266 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak bulunmuştur.

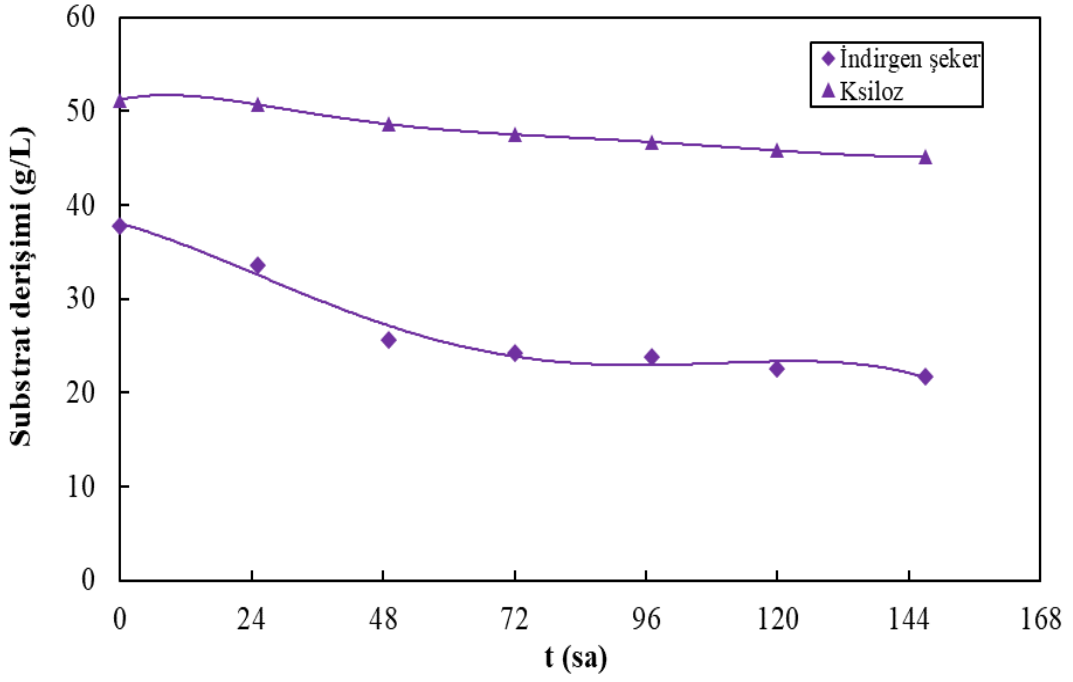


Şekil 4.70. Bileşenli ve bileşensiz fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

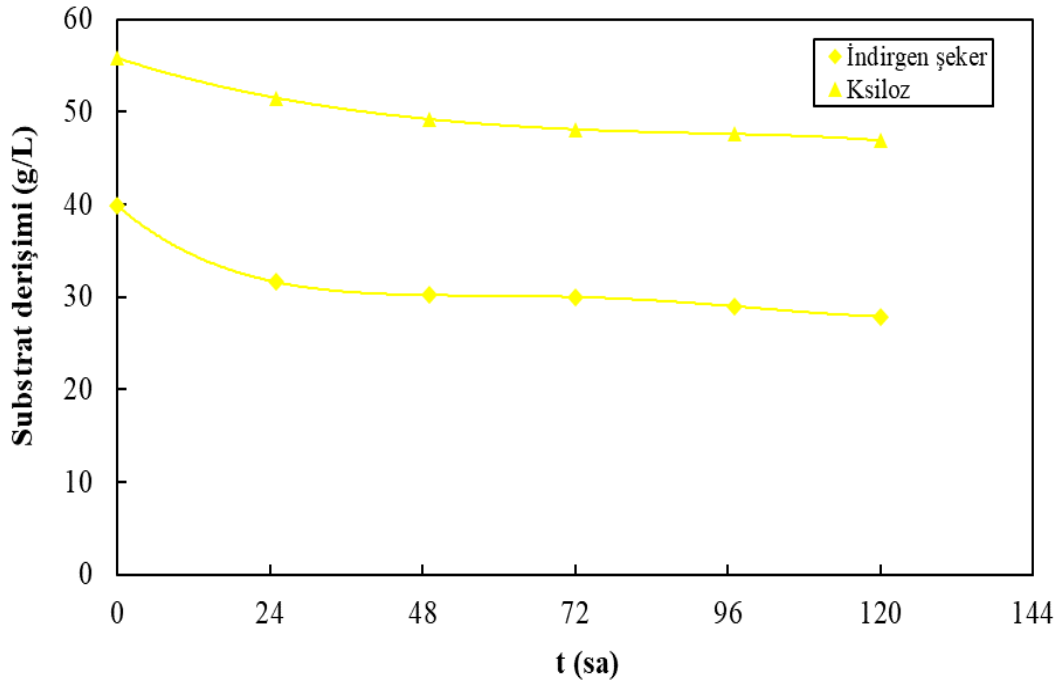
Bu çalışmada FKH ve bileşenli FKH ortamlarındaki şeker derişimlerinin, fermantasyon süresince değişimlerini gösteren grafikler sırasıyla; Şekil 4.71 ve 4.72’de verilmiştir. Ortamlardaki başlangıç glukoz derişimleri çok düşük çıktığı için, fermantasyon süresince takip edilmemiştir. Söz konusu grafikler incelendiğinde; her iki ortamda da çalışılan suşun ksilozu oldukça az tükettiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışılan her iki ortamda, fermantasyonun sonunda ksilozun çok fazla tüketilemediği de saptanmıştır. Bileşensiz ve bileşenli FKH ortamlarında, fermantasyon sonunda tüketilmeden kalan indirgen şeker derişimleri sırasıyla; 21.8 ve 27.2 g/L, ksiloz derişimleri ise sırasıyla; 45.1 ve 45.7 g/L olarak tayin edilmiştir.

Araştırmada çalışılan suşun, fermantasyon ortamı olarak fındık kabuğu hidrolizati ile kullanıldığında, gerek  $\beta$ -karoten üretiminin ve gerekse biyokütle gelişiminin bundan olumlu etkilenmediği tespit edilmiştir.





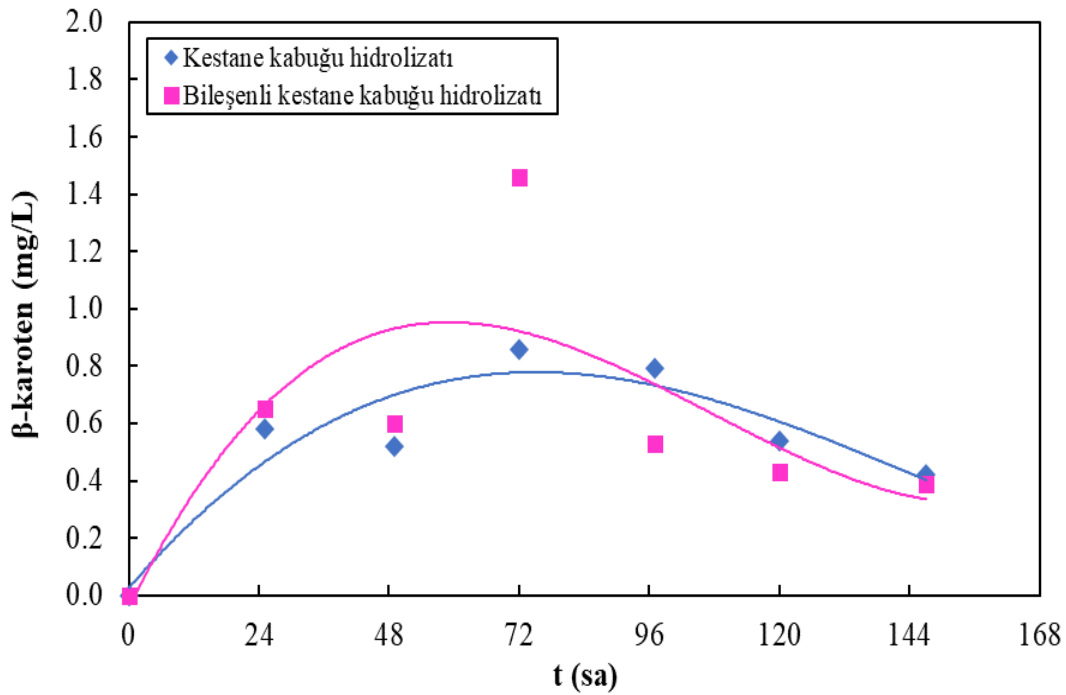
Şekil 4.71. Fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki indirgen şeker ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.72. Bileşenli fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki indirgen şeker ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri

#### 4.7.4. Kestane Kabuğu Hidrolizati ile Yapılan Çalışmalar

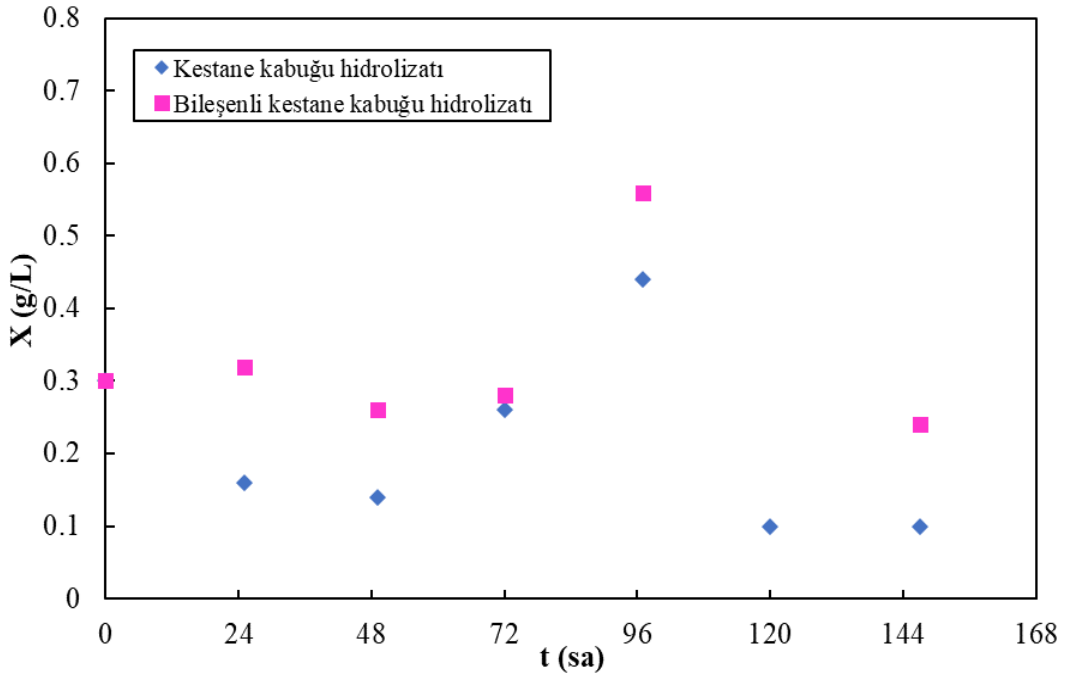
Kestane kabuğu hidrolizati (KKH) ortamlarının kullanıldığı deneylerde, maya başlangıç aşılama derişimi;  $4.4 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir. KKH'dan hazırlanan ortamdaki glukoz ve ksiloz başlangıç şeker derişimleri sırasıyla; 54.3 ve 22.8 g/L olarak tespit edilmiştir. Bileşenli KKH ortamındaki glukoz ve ksiloz başlangıç şeker derişimleri ise sırasıyla; 54.7 ve 26 g/L olarak belirlenmiştir. Kestane kabuğu hidrolizati ile hazırlanan fermantasyon ortamlarında incelenen suşun  $\beta$ -karoten derişimlerinin fermantasyon süresince değişimleri; Şekil 4.73'de verilmektedir.



Şekil 4.73. Bileşenli ve bileşensiz kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

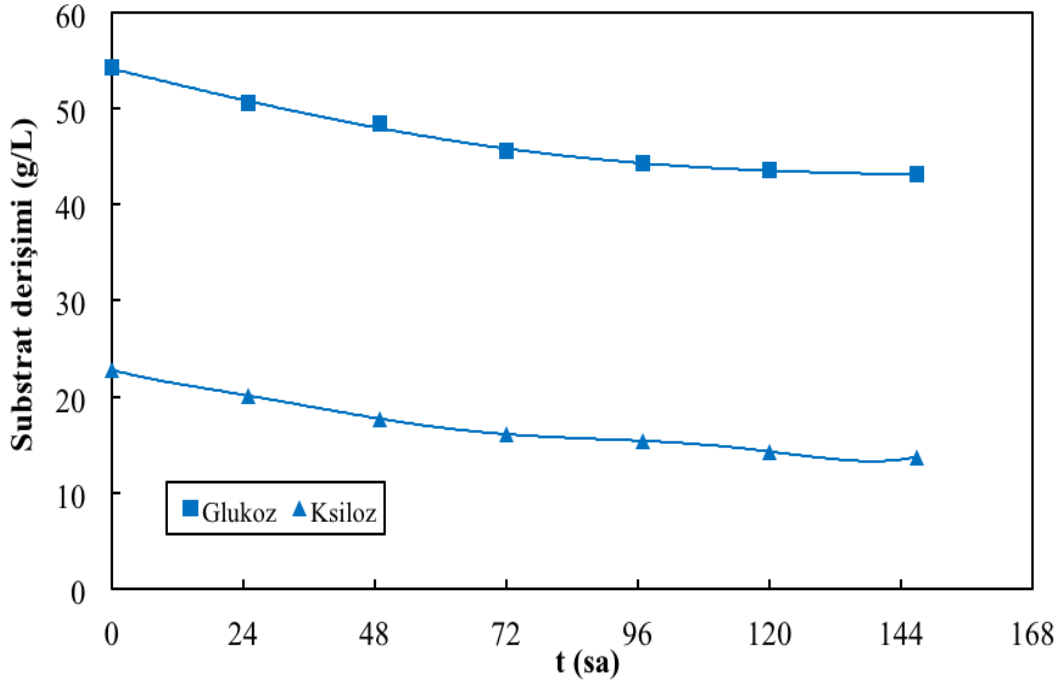
KKH ve bileşenli KKH'nın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi her iki ortam için de 72. saate ve sırasıyla; 0.86 ve 1.46 mg/L olarak tayin edilmiştir. Elde edilen verilerden de görülebileceği gibi bu ortamların, incelenen suşun  $\beta$ -karoten üretimi için uygun olmadıkları saptanmıştır.

Bu deneylerde, incelenen suşa ait biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.74’de verilmektedir. İlgili grafikten de görülebileceği gibi KKH ortamlarının her ikisinin de çalışılan; *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üremesini desteklemediği belirlenmiştir. Bu nedenle de, deneylerin bu kısmında çalışılan maya suşuna ait özgül üreme hızları hesaplanmamıştır. KKH ve bileşenli KKH ortamları için hesaplanan maksimum ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0138 ve 0.0260 mg β-karoten/(L.sa) olarak hesaplanırken, aynı ortamlar için maksimum özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) ise sırasıyla; 0.0573 ve 0.0403 mg β-karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

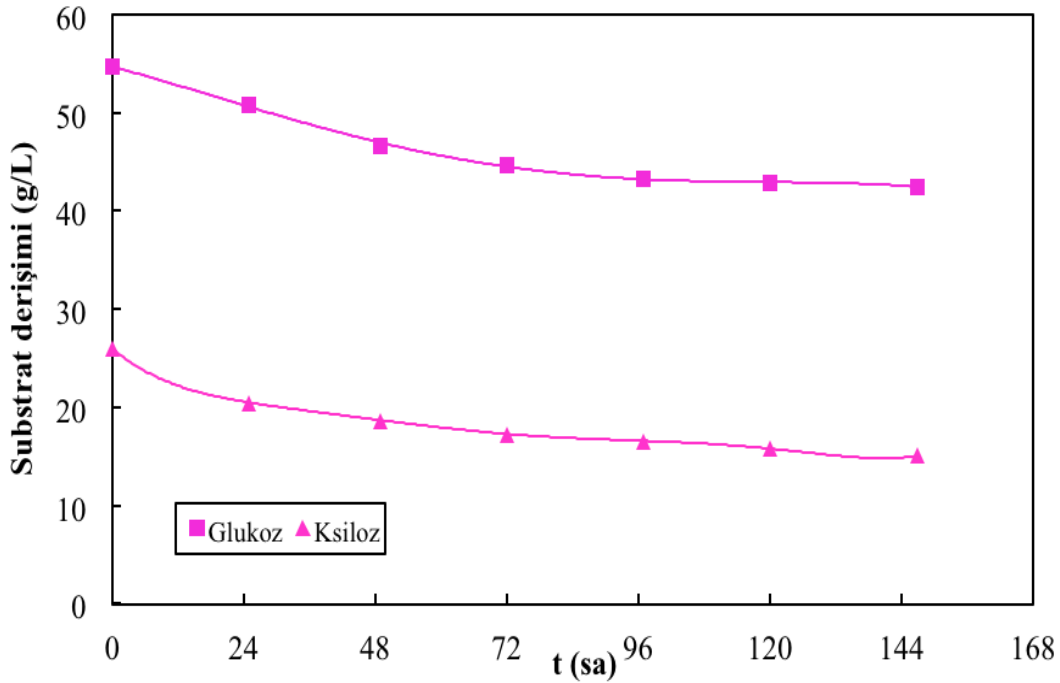


Şekil 4.74. Bileşenli ve bileşensiz kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.75 ve 4.76’de, KKH ve bileşenli KKH ortamı kullanılarak yapılan deneylerde bazı şekerlerin fermantasyon süresince değişimleri verilmektedir.



Şekil 4.75. Kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri



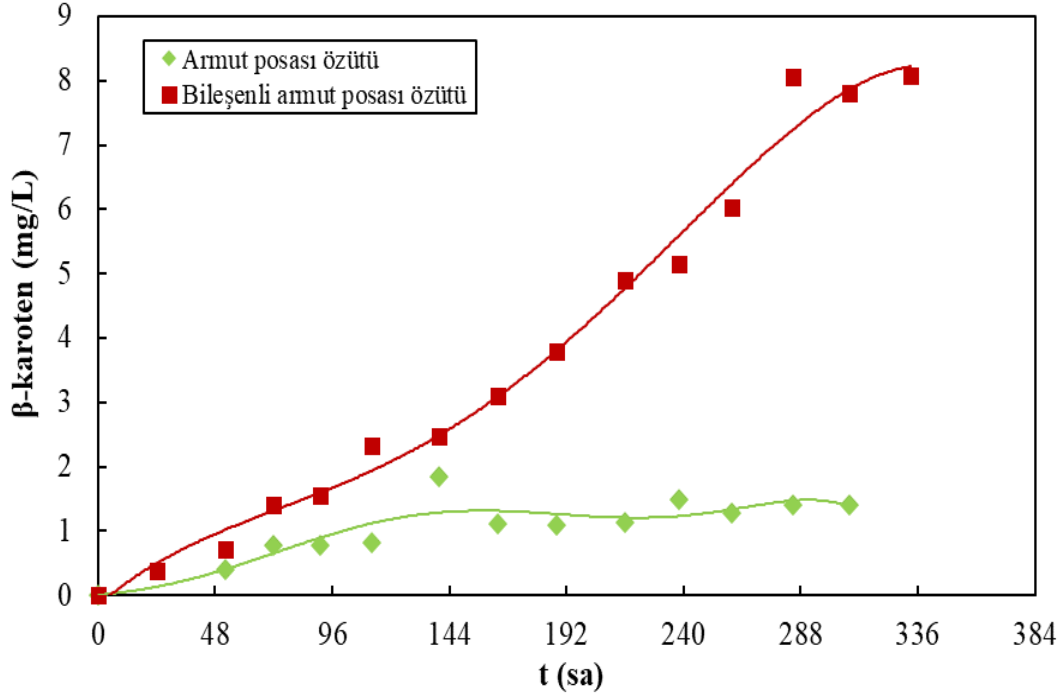
Şekil 4.76. Bileşenli kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri

KKH ortamındaki glukoz derişiminin, fermantasyon boyunca giderek azalmakla birlikte, çalışılan *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından tamamen tüketimelediği ve fermantasyon sonunda ortamda kalan glukoz derişiminin; 43.2 g/L olduğu belirlenmiştir. Aynı ortamdaki ksiloz tüketiminin de glukoz tüketimine benzer bir değişim gösterdiği saptanmıştır. Bu deneylerde, başlangıç derişimi 22.8 g/L olan ksilozun fermantasyon sonundaki derişimi; 13.8 g/L olarak tayin edilmiştir. Bileşenli KKH ortamında, ortamda bulunan ksilozun ilk 24 saat içerisinde daha hızlı tüketilmesine rağmen ilerleyen süreçte ksiloz tüketiminin yavaşladığı belirlenmiştir. Fermantasyon sonunda ortamda tüketilmeden kalan ksiloz derişimi; 15.1 g/L olarak hesaplanmıştır. Bu ortamdaki glukoz tüketiminin de fermantasyon süresince yavaş olduğu ve fermantasyon sonunda ortamda kalan glukoz derişiminin ise; 42.5 g/L olduğu saptanmıştır. Genel olarak KKH ve bileşenli KKH ortamları karşılaştırıldığında, glukoz ve ksiloz tüketimleri açısından her iki ortamda fazla bir fark olmadığı da belirlenmiştir.

#### 4.7.5. Armut Posası Özüü ile Yapılan alışmalar

Armut posası özüü (APÖ) ile yapılan deneylerde, hazırlanan fermantasyon ortamlarının başlangıç aşılama derişimleri;  $3.5 \times 10^7$  kob/mL olarak tayin edilmiştir. Söz konusu deneylerde bileşenli APÖ fermantasyon ortamında başlangıç glukoz ve fruktoz derişimleri sırasıyla; 6.6 ve 39.3 g/L olarak belirlenmiştir. Bileşenli APÖ için ise bu değerler sırasıyla 8.3 ve 43.3 g/L olarak tayin edilmişlerdir. Her iki ortamdaki glukoz başlangıç derişimleri düşük bulunduğu için, bu deneylerde fermantasyon süresince, yalnızca ortamlardaki fruktoz derişimlerinin değişimleri incelenmiştir. Bileşenli ve bileşenli APÖ'nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.77'de verilmektedir.

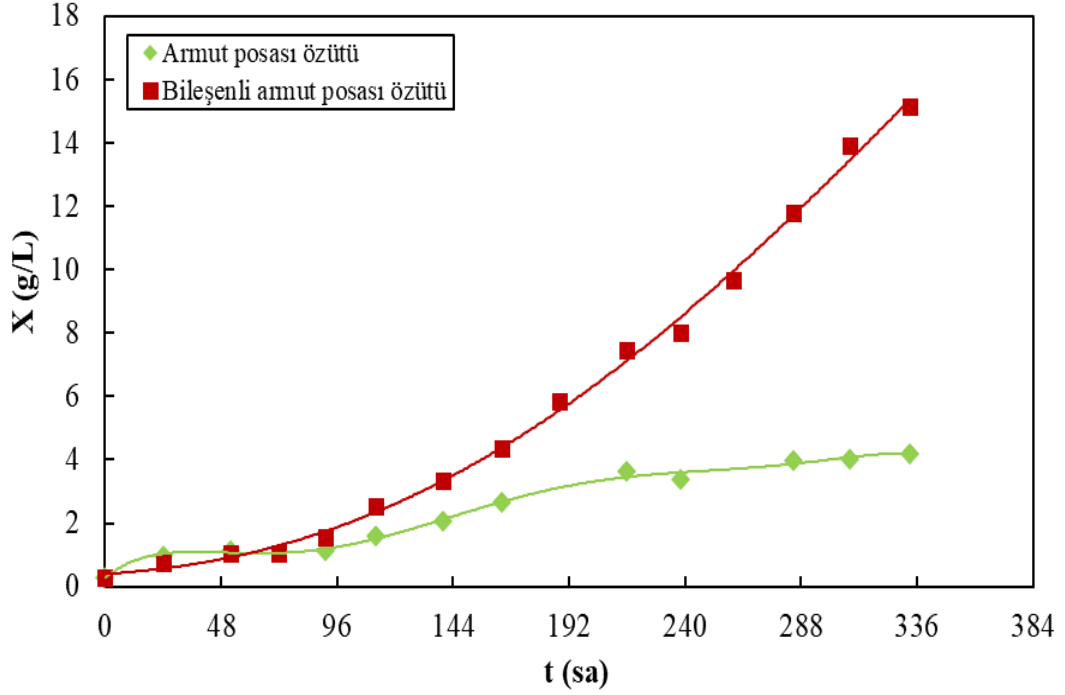
İlgili Şekil incelendiğinde; armut posası özüüne ana fermantasyon ortamındaki fruktoz dışındaki bileşenlerin ilave edilmesinin, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimini oldukça olumlu etkilediği görölmüştür.



Şekil 4.77. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

Bileşenlerin eklenmediği, sadece APÖ özütünden oluşan ortamda elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi, fermantasyonun 140. saatinde, 1.85 mg/L olarak tayin edilmiştir. Bileşenli APÖ'nün kullanıldığı ortamda ise; çalışılan suş tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişiminin fermantasyonun süresince hızla arttığı ve en yüksek değerine; 8.07 mg/L olarak, fermantasyonun sonunda ulaştığı saptanmıştır.

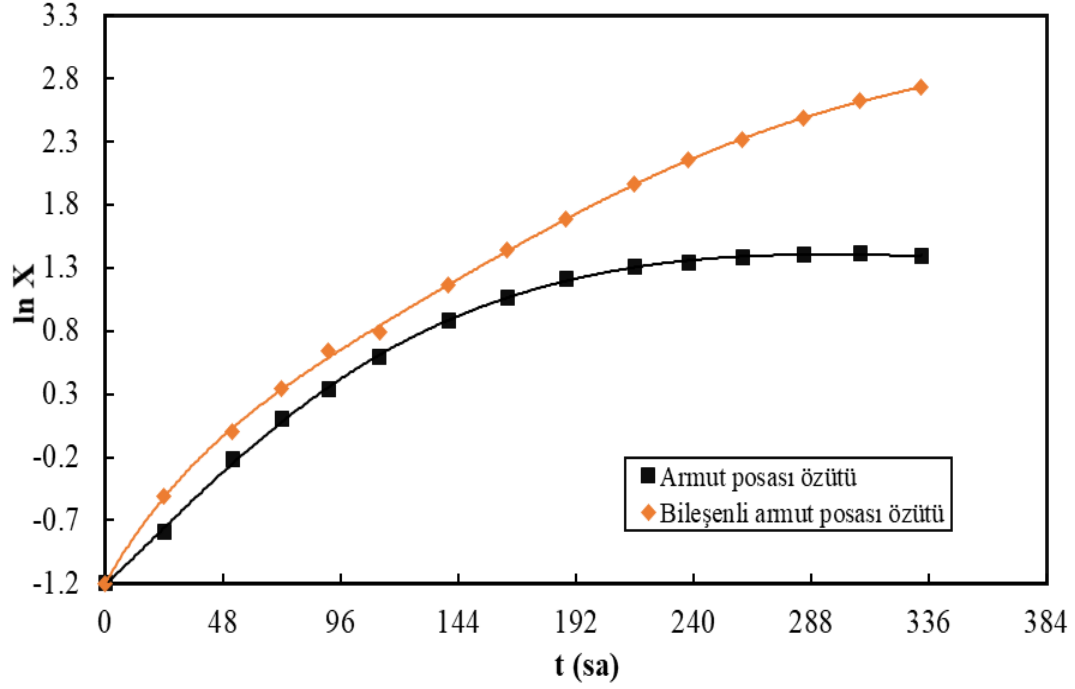
Şekil 4.78'de, APÖ ile bileşenli APÖ'nün fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri verilmektedir. İlgili grafik incelendiğinde, bileşenli ortamda biyokütle derişiminin özellikle 96. saatten sonra hızla arttığı ve en yüksek değerine de (15.14 g/L) fermantasyonun sonunda ulaştığı saptanmıştır. APÖ fermantasyon ortamı olarak kullanıldığında ise, biyokütle derişimindeki artışın oldukça yavaş olduğu ve bu ortam için tayin edilen en yüksek biyokütle derişiminin, fermantasyonun sonunda 4.20 g/L olduğu belirlenmiştir.



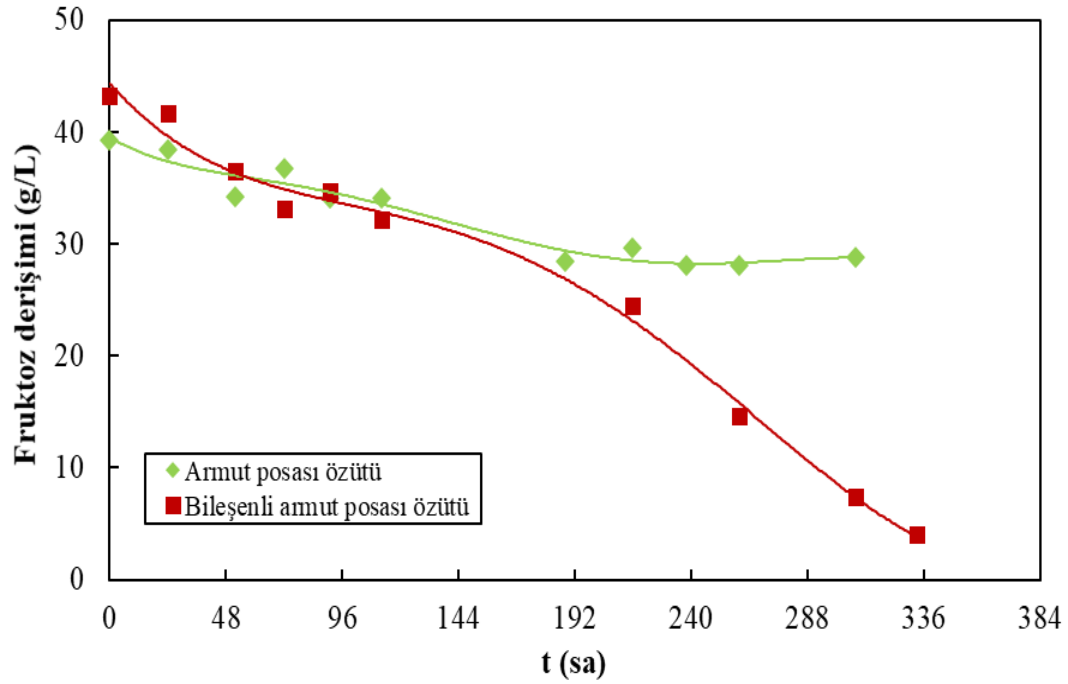
Şekil 4.78. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu deneylere ait ln X grafiği, Şekil 4.79’da verilmektedir. APÖ ve bileşenli APÖ ortamlarında, çalışılan suş için hesaplanan özgül üreme hızları sırasıyla; 0.025 ve 0.030 sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde ayrıca incelenen maya suşu için, en yüksek ürün ve özgül ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. APÖ ve bileşenli APÖ ortamlarında, en yüksek β-karoten oluşum hızları sırasıyla; 0.0147 ve 0.0183 mg β-karoten/(L.sa) olarak hesaplanırken, en yüksek özgül ürün oluşum hızları ise sırasıyla; 0.0167 ve 0.0235 mg β-karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmışlardır.

APÖ’ nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.80’de gösterilmektedir. İlgili grafikte, APÖ’ nün kullanıldığı fermantasyon ortamında fruktozun, bileşenli APÖ ortamındakine göre çok daha az tüketildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.79. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.80. Bileşenli ve bileşensiz armut posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri



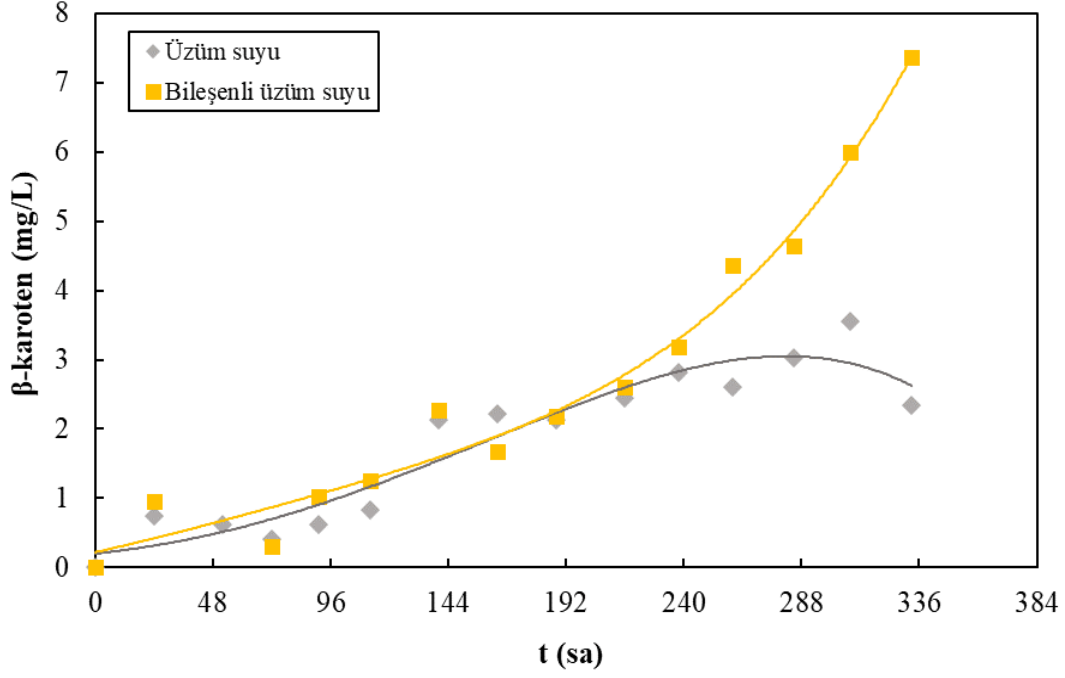
APÖ ortamında fermantasyon sonunda tüketilmeden kalan fruktoz miktarı; 28.8 g/L olarak belirlenirken, bileşenli ortamda ise bu değer; 4.0 g/L' dir. APÖ ortamında, incelenen suşun fruktoz tüketiminin 188. saate kadar yavaş olarak devam ettiği, daha sonra ise çok fazla değişmediği belirlenirken, bileşenli ortamda ise; fruktozun özellikle 112. saatten sonra hızlı bir şekilde tüketildiği saptanmıştır.

#### 4.7.6. Üzüm Suyu ile Yapılan Çalışmalar

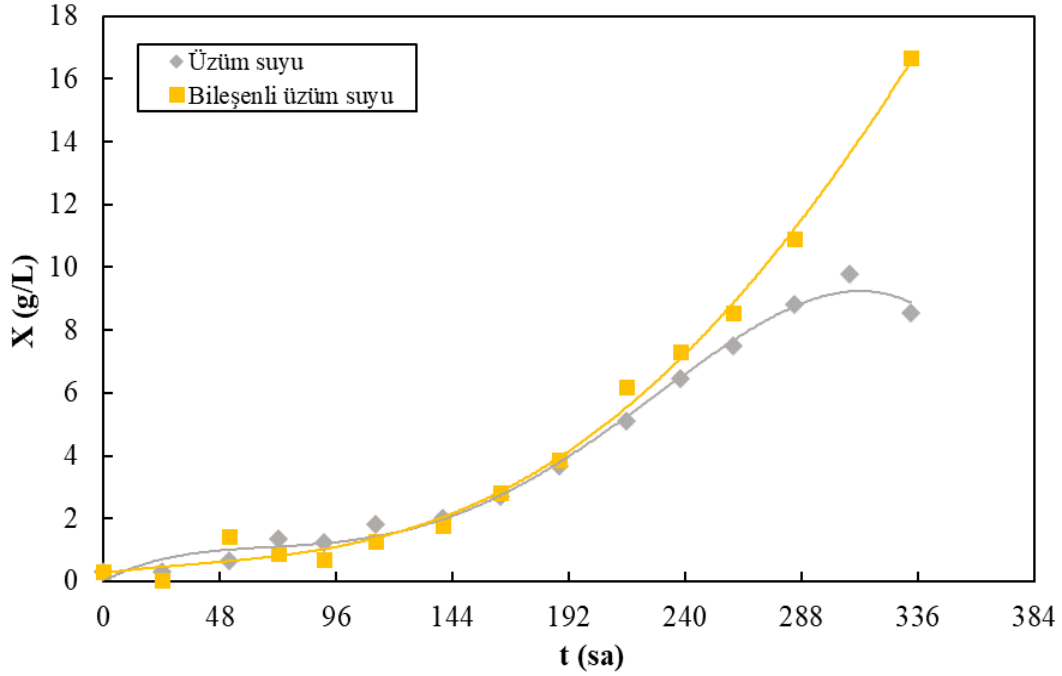
Üzüm suyu (ÜS) ile hazırlanan fermantasyon ortamlarında çalışılan suşun başlangıç aşılama derişimleri;  $3.5 \times 10^7$  kob/mL olarak tayin edilmiştir. ÜS ortamındaki glukoz ve fruktozun başlangıç derişimleri sırasıyla; 112.0 ve 123.1 g/L olarak belirlenirken, bileşenli ÜS ortamında ise bu değerler sırasıyla; 102.5 ve 108.7 g/L olarak tayin edilmiştir.

Üzüm suyunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, çalışılan suşun  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla derişimleri, Şekil 4.81'de verilmiştir. İlgili grafik incelendiğinde, her iki ortamda da  $\beta$ -karoten derişimlerinde, fermantasyonun 188. saatine kadar, bir miktar artış olduğu, daha sonra ise bileşenli ÜS ortamındaki  $\beta$ -karoten üretiminin fermantasyonun sonuna kadar hızla arttığı, ÜS ortamında ise bir miktar artış gösterdikten sonra çok fazla değişmediği bulunmuştur. Bileşenli ÜS ortamında çalışılan suş tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 7.37 mg/L olarak fermantasyonun sonunda tespit edilirken, ÜS ortamında elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi ise; 3.55 g/L olarak tayin edilmiştir.

ÜS ve bileşenli ÜS ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde, çalışılan suşun biyokütle derişimlerinin zamanla derişimleri, Şekil 4.82'de verilmektedir. Bu deneylerde her iki ortamdaki biyokütle derişimlerinin fermantasyon süresince arttığı, ancak fermantasyonun sonunda, bileşenli ÜS ortamındaki biyokütle derişiminin (16.66 g/L), ÜS ortamındaki (9.78 g/L) ile kıyaslandığında çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir.  $\beta$ -karoten üretiminde olduğu gibi, bileşen eklenmiş ÜS ortamının, incelenen suşun üremesini de olumlu yönde desteklediği saptanmıştır.

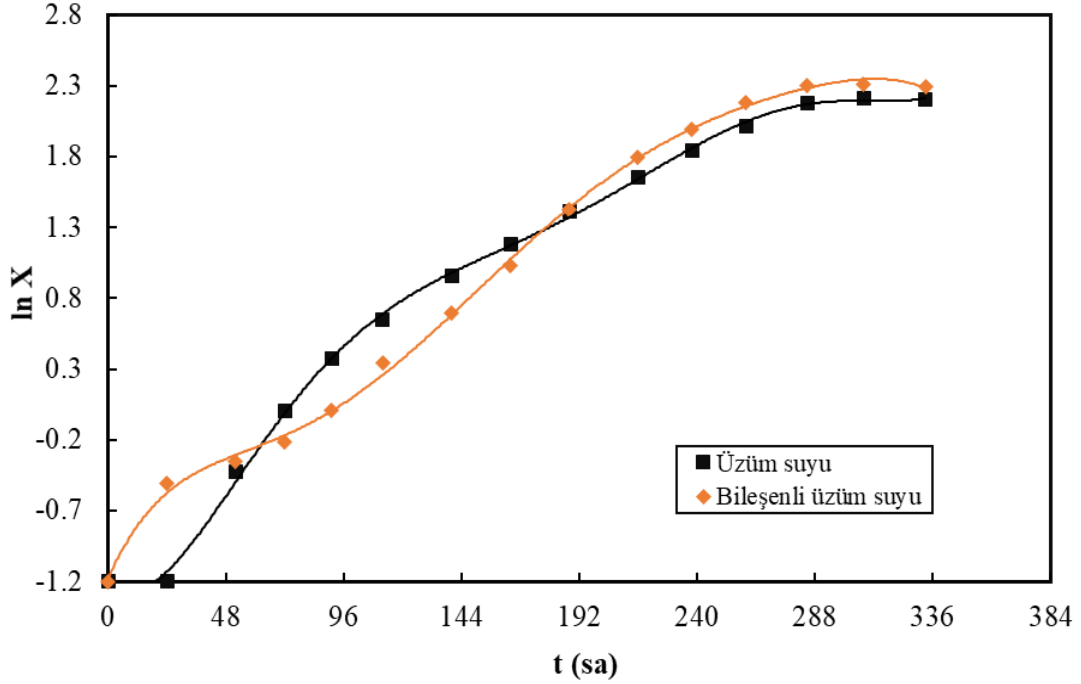


Şekil 4.81. Bileşenli ve bileşensiz üzüm suyunun kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.82. Bileşenli ve bileşensiz üzüm suyunun kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

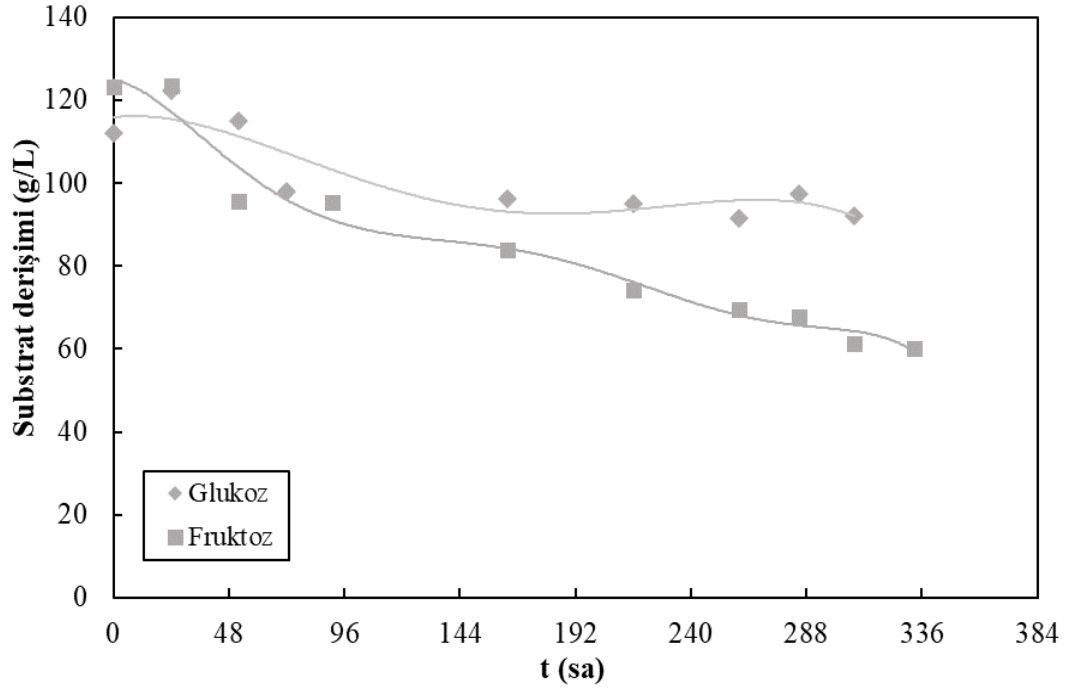
Çalışmada, deneylerden elde edilen kuru hücre ağırlıklarından yararlanılarak hesaplanan  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.83'de verilmektedir. Bu grafikten, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üzüm suyu bulunan her iki ortamda da özgül üreme hızları ( $\mu$ ); 0.025 sa<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir.



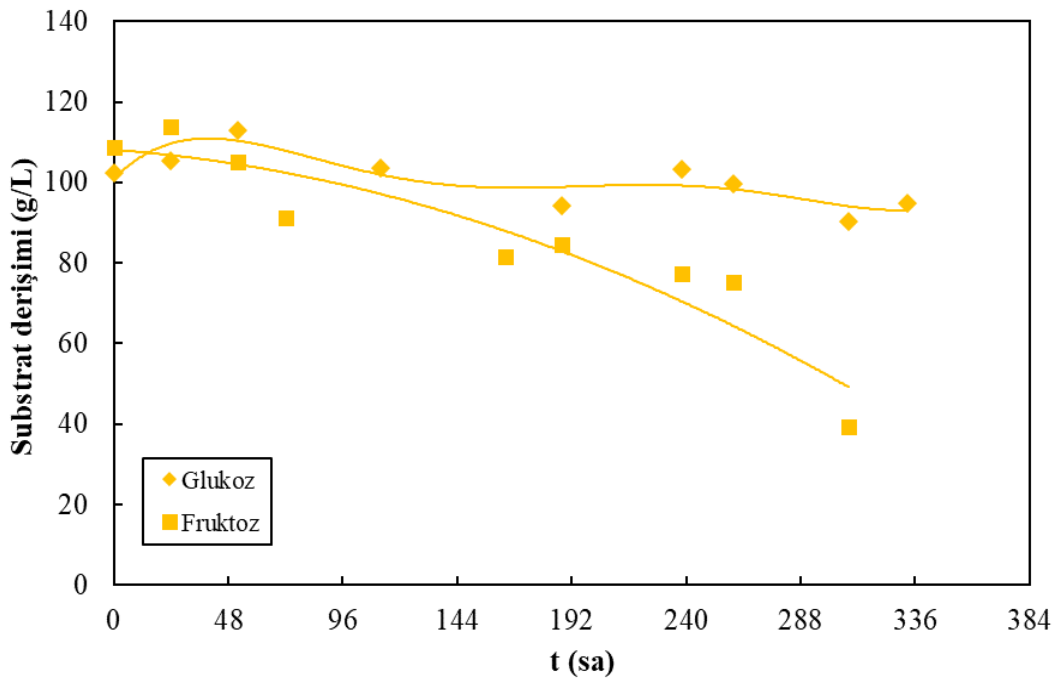
Şekil 4.83. Bileşenli ve bileşensiz üzüm suyunun kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri

Çalışmanın bu aşamasında ayrıca,  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak çalışılan suş için maksimum  $\beta$ -karoten üretim ve özgül  $\beta$ -karoten üretim hızları da hesaplanmıştır. ÜS ve bileşenli ÜS ortamlarında elde edilen en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0282 ve 0.0570 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak tespit edilmiştir. ÜS ve bileşenli ÜS ortamları için en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) ise sırasıyla; 0.0148 ve 0.0309 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

ÜS ve bileşenli ÜS'nun kullanıldığı ortamlarda bulunan, glukoz ve fruktozun derişimlerinin fermantasyon süresince değişimleri sırasıyla; Şekil 4.84 ve Şekil 4.85'de verilmiştir.



Şekil 4.84. Üzüm suyunun kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.85. Bileşenli üzüm suyunun kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Fermentasyon sonunda ÜS ortamında çalışılan suş tarafından tüketilmeden kalan glukoz ve fruktoz derişimleri sırasıyla, 92.2 ve 61.2 g/L iken, bileşenli ÜS ortamında ise bu değerler sırasıyla; 90.4 ve 39.3 g/L olarak hesaplanmıştır. Her iki ortamda da, fruktoz tüketiminin glukoz ile kıyaslandığında daha fazla olduğu belirlenmiştir.

TÜİK verilerine göre üzümün; 3.650 bin ton ile, Türkiye’de karpuzdan sonra en fazla üretilen ikinci meyve olduğu rapor edilmiştir (TC. Ekonomi Bakanlığı, 2017). 2008 yılında Türkiye’de meyve suyuna işlenen üzüm miktarı 16.9 bin ton olarak bildirilmiştir (Sülük, Tosun ve Ekinci, 2018). 2015 yılında ise; 1.421 ton üzüm suyunun ihraç edildiği rapor edilmiştir (TC. Ekonomi Bakanlığı, 2016). Bu durumların yanısıra Dünya pazarının şu anda ve muhtemel gelecekteki eğiliminin, tüketilenden çok daha fazla şarap üretimi yönünde olduğu ve bunun sonucu olarak özellikle Akdeniz bölgesinde büyük miktarda üzüm şırası ihtiyaç fazlası üretim olduğu belirtilmektedir (Buzzini ve Martini, 1999). Bu çalışmada, ihtiyaç fazlası olan üzüm suyunun doğal substrat olarak  $\beta$ -karoten üretiminde değerlendirilebilirliğinin de incelenmesi amaçlanmıştır.

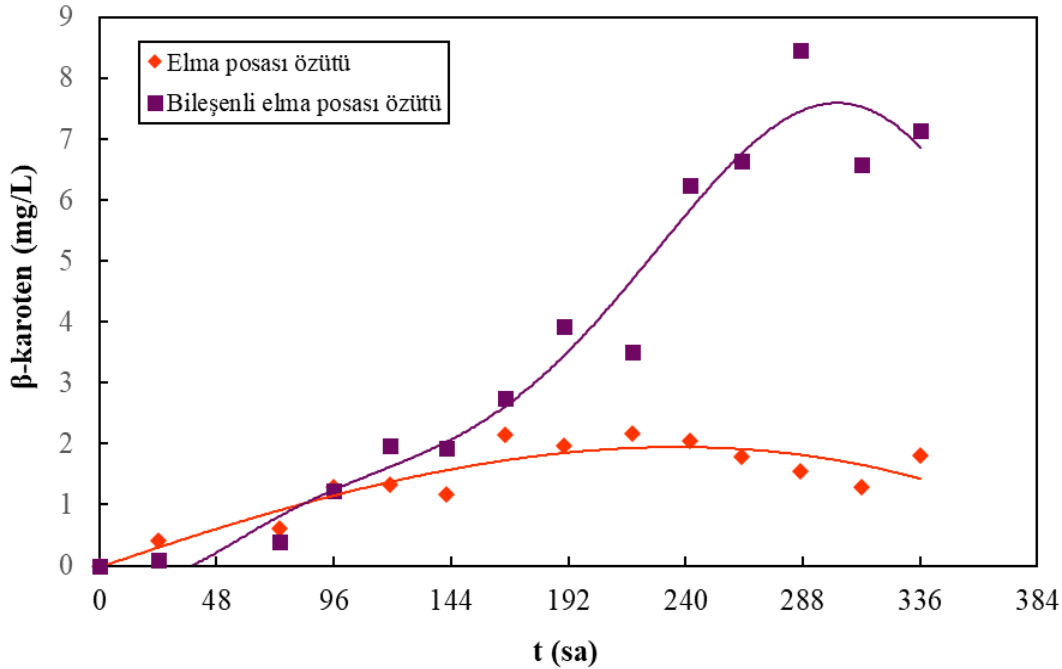
Buzzini ve Martini (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, *R. glutinis* DBVPG 3852 suşu ile karotenoid üretimi için bazı tarım sanayii atıklarının fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılması denenmiştir. Söz konusu araştırmada bu amaçla konsantre üzüm şırası, üzüm şırası, glukoz şurubu, şeker pancarı melası, soya fasulyesi unu özütü, mısır unu özütünün denendiği bildirilmiştir. Anılan çalışmada, karbon kaynaklarının toplam karbonhidrat miktarının 40 g/L olacak şekilde,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L, maya özütü 3.0 g/L olan fermentasyon ortamına ilave edilerek denendiği ve en yüksek karotenoid üretiminin (5.96 mg/L), bileşiminde konsantre üzüm şırası bulunan ortamda elde edildiği rapor edilmiştir.

Yan ve ark., (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, rekombinant endüstriyel bir şarap mayası olarak tanımlanan *Saccharomyces cerevisiae* T73-63 ve FY-09 suşları ile  $\beta$ -karoten, ergosterol ve yağ asiti üretimleri için Merlot cinsi üzüm suyunun, fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada; üzüm suyunun, bu mayalar ile yüksek düzeyde karotenoid üretimini sağlayacak şekilde mevalonat iz yolunun aktifleşmesine yol açtığı belirtilmiştir.

#### 4.7.7. Elma Posası Özütü İle Yapılan Çalışmalar

Bu çalışmada bir diğer doğal substrat kaynağı olarak; elma posası özütü (EPÖ) ile çalışılmıştır. Elma posası özütü ile hazırlanan fermantasyon ortamları için başlangıç maya aşılama derişimi;  $3.5 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiş olup deneyler, önceden saptanmış olan optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. EPÖ ortamındaki başlangıç glukoz, fruktoz ve indirgen derişimleri sırasıyla; 32.2, 63.8 ve 111.2 g/L olarak hesap edilmiştir. Bileşenli EPÖ ortamındaki başlangıç glukoz, fruktoz ve indirgen derişimleri ise sırasıyla; 29.0, 58.4 ve 97.2 g/L olarak tayin edilmiştir.

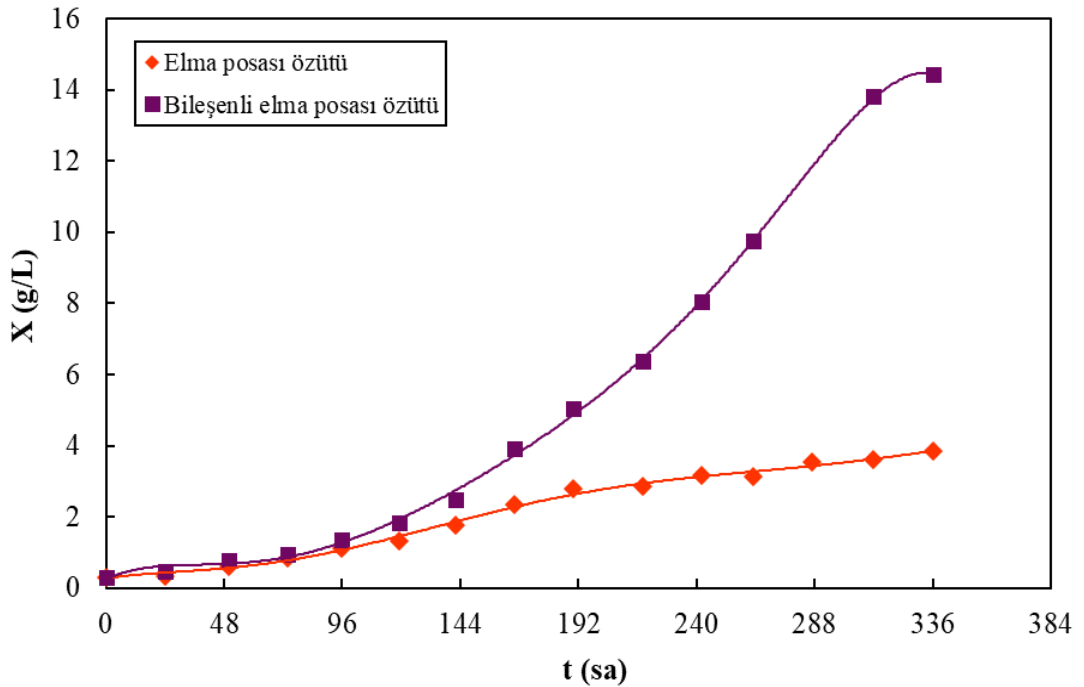
EPÖ ve bileşenli EPÖ fermantasyon ortamlarında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.86'de verilmektedir. İlgili grafik incelendiğinde; EPÖ ve bileşenli EPÖ ortamlarında fermantasyonun başlangıcında,  $\beta$ -karoten üretimlerinin düşük olduğu, fermantasyonun 96. saatinden sonra ise bileşenli EPÖ ortamındaki  $\beta$ -karoten üretiminin hızlı bir şekilde artarken, EPÖ ortamında ise üretimin genel olarak düşük olduğu belirlenmiştir.



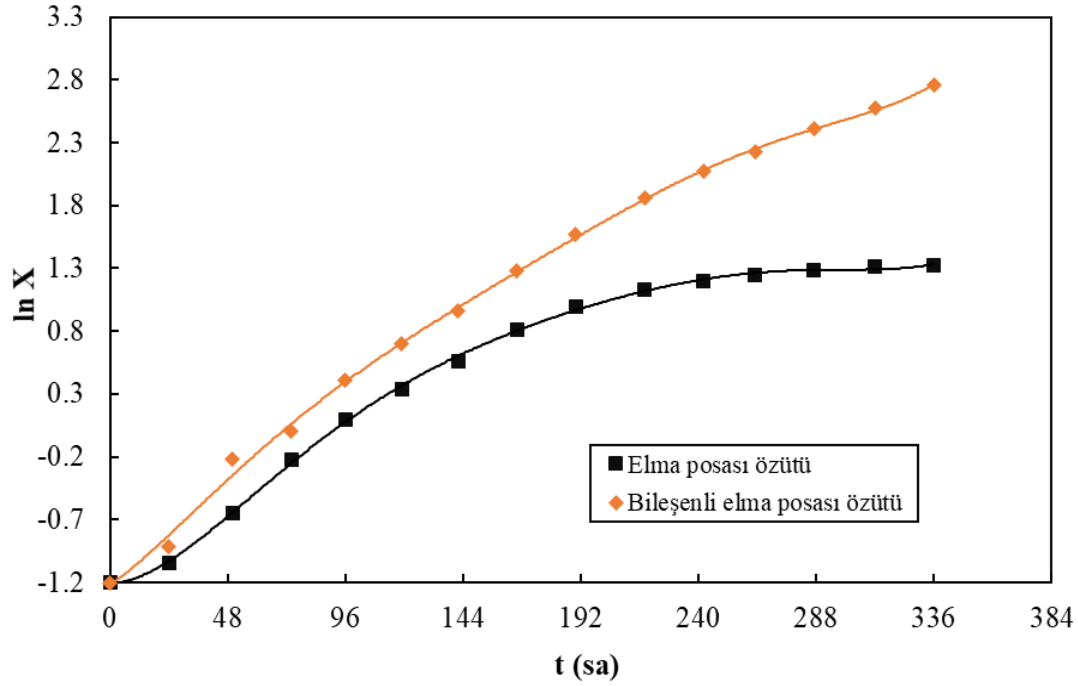
Şekil 4.86. Bileşenli ve bileşensiz elma posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

EPÖ ve bileşenli EPÖ ortamlarında *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten üretimleri sırasıyla; 2.16 ve 8.46 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Doğal substrat olarak EPÖ ile çalışılan deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.87’de verilmiştir. İlgili grafik incelendiğinde, fermantasyonun ilk günlerinde; 119. saate kadar EPÖ ve bileşenli ortamındaki biyokütle derişimlerinin yakın değerlerde oldukları, daha sonra ise bileşenli EPÖ ortamındaki biyokütle miktarının hızla arttığı belirlenmiştir. EPÖ ortamında ise, fermantasyon süresince çalışılan suşun biyokütle derişimindeki artışın, bileşenli ortam ile karşılaştırıldığında, çok yüksek olmadığı bulunmuştur EPÖ ve bileşenli EPÖ ortamlarında elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri sırasıyla; 3.84 ve 14.44 g/L olarak, fermantasyon sonunda belirlenmiştir. Bu deneylere ait  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.88’de verilmektedir. İlgili grafikten yararlanılarak üssel üreme bölgelerindeki maya özgül üreme hızları da ( $\mu$ ) hesaplanmış ve bu değerler EPÖ ve bileşenli EPÖ ortamları için sırasıyla; 0.019 ve 0.025 sa<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.



Şekil 4.87. Bileşenli ve bileşensiz elma posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

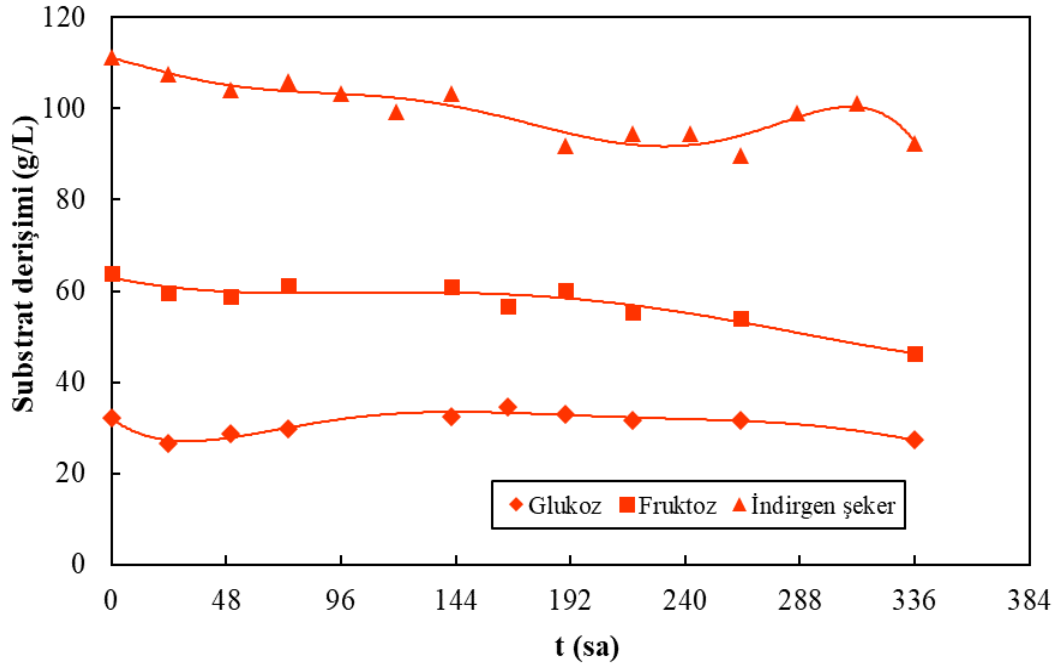


Şekil 4.88. Bileşenli ve bileşensiz elma posası özütünün kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun ln X değerlerinin zamanla değişimleri

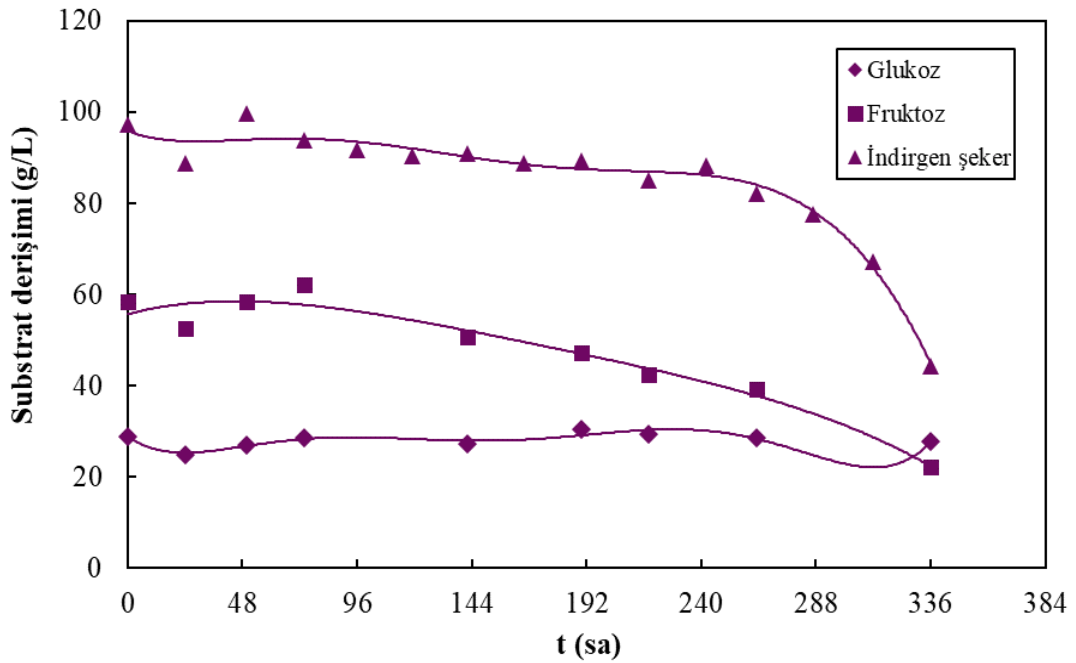
EPÖ ve bileşenli EPÖ ortamlarında, incelenen suş için hesaplanan en yüksek ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0217 ve 0.0669 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak tespit edilirken, en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) ise, sırasıyla; 0.0300 ve 0.0235 mg  $\beta$ -karoten/(g mo.sa) olarak tayin edilmiştir.

Bu deneylerde, EPÖ'nün kullanıldığı ortamlardaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin fermantasyon süresince değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.89 ve Şekil 4.90'da verilmektedir. EPÖ'nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz tüketiminin oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Aynı ortam için fruktoz tüketiminin ise daha fazla olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte fermantasyon sonunda ortamda tüketilemeden kalan fruktozun; 46.2 g/L olduğu da belirlenmiştir. Bileşenli EPÖ ortamında ise glukoz tüketimi için bileşen katılmamış EPÖ ortamındakine benzer bir eğilim gözlenirken, bu ortamdaki fruktoz tüketiminin EPÖ ortamındakine göre daha fazla olduğu saptanmıştır.





Şekil 4.89. Elma posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda, fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.90. Bileşenli elma posası özütünün kullanıldığı çalışmalarda, fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin zamanla değişimleri

Bileşenli EPÖ ortamında, fermantasyon sonunda, ortamda tüketilemeden kalan fruktozun; 22.1 g/L olduğu da belirlenmiştir. Her iki ortam için tayin edilen indirgen şeker derişimleri incelendiğinde de; bileşenli ortamdaki şeker tüketiminin, yalnızca EPÖ' nün kullanıldığı ortama göre daha yüksek olduğu da saptanmıştır.

FAO'nun 2013 yılı verilerine göre; Dünya'da 5.2 milyon hektarlık bir alanda, 80.8 milyon ton elma üretimi yapıldığı belirtilmektedir. Türkiye'nin bu sıralamada; 3.12 milyon ton elma üretimi ile 5. olarak yer aldığı bildirilmektedir (TC. Ekonomi Bakanlığı, 2017). Ülkemizde hazırlanmış olan Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı Temel Ekonomik Göstergeler Tarım üretimi ile ilgili tabloda yer alan verilere göre, elma üretiminin; 2020 yılında 4.300 bin ton olduğu rapor edilmiştir (TC. Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı, 2020). Dünya genelinde, yıllık işlenen elma miktarı ise; 12 milyon ton ve tahmini yıllık elma atığının da; 3-4 milyon ton olduğu rapor edilmektedir. Meyve suyu sanayiinin başlıca hammaddelerinden biri olan elmanın, üzümünden sonra en çok üretimi yapılan meyve olduğu ifade edilmektedir. Türkiye'de 2008 yılında, elma suyuna işlenen elma miktarının yaklaşık; 334 bin ton olduğu bildirilmiştir (Erdoğan, 2010). Meyve Suyu Endüstrisi Derneği (MEYED) verilerine göre meyve suyuna işlenen meyve miktarının; 958 bin ton olduğu 2015 yılında; elmanın % 47.8 pay (458 bin ton) ile birinci sırada yer aldığı rapor edilmektedir (TC. Ekonomi Bakanlığı, 2016). Elmanın meyve suyuna işlenmesiyle, yaklaşık % 25-35 civarında posa elde edildiği rapor edilmektedir. Elma posası ve kabuğunun; sellüloz, mineral ve fenolik bileşiklerce bir zengin yapı gösterdiği belirtilmektedir (Aktaş, Özdemir ve Basmacıoğlu-Malayoğlu, 2013).

Elma posası özütünün, 1998 yılından 2006 yılına kadar; çeşitli *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma* gibi küf ve *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida* ve *Xhantamonas* gibi maya türleri ile yapılan enzim, aroma bileşiği, tek hücre yağı, heteropolisakarit ve sitrik asit üretimi gibi bir çok biyoteknolojik uygulamada kullanılan çok yönlü bir substrat olduğu bildirilmektedir (Vendruscolo ve ark., 2008).

Attri ve Joshi (2005) tarafından bir *Micrococcus* sp. suşu ile pigment üretimi için besiyeri bileşenlerinin ve fermantasyon koşullarının optimize edilmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Bu araştırmada ilk olarak, farklı oranlarda elma posası, glukoz,

maya özütü ve pepton bileşenleri içeren besiyerlerinin denendiği daha sonra farklı pH, sıcaklık ve inkübasyon sürelerinin incelenen suş ile karotenoid üretimine etkilerinin incelendiği belirtilmiştir. Bu denemelerde; elma posasının 20 g/L, glukozun 0.5 g/L, maya özütünün 1.25 g/L ve peptonun 1.25 g/L olduğu besiyerinde, en iyi biyokütle ve karotenoid sonuçlarının alındığı ve bu besiyerinin optimum elma posası besiyeri olarak seçildiği belirtilmiştir. Elma posasının 20 g/L'den daha yüksek miktarlara çıktığı ve azot kaynaklarının besiyerindeki konsantrasyonunun giderek azaldığı deneylerde; biyokütle ve dolayısıyla da karotenoid derişimlerinin giderek azaldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada daha sonra; optimum elma posası besiyerinde farklı karbon (glukoz, fruktoz, laktoz, maltoz), azot kaynakları (demir amonyum sülfat, amonyum sülfat, sodyum nitrat, pepton, potasyum nitrat) ve bunların farklı konsantrasyonlarının denendiği bildirilmiştir. En yüksek biyokütle ve karotenoid derişimlerinin; % 0.2 fruktoz ve % 0.2 sodyum nitrat bulunan ortamlarda elde edildiği ifade edilmiştir.

Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında da bu çalışmayla uyumlu olarak sadece elma posası bulunan ortamda daha düşük miktarlar biyokütle ve  $\beta$ -karoten derişimleri elde edilmiştir. Bu sonucun azot kaynağı yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmekte olup, kazein peptonu ve amonyum sülfat içeren bileşenli elma posası besiyeri ile tez çalışmasının bu bölümündeki en yüksek  $\beta$ -karoten derişimine ulaşılması bu düşünceyi desteklemiştir.

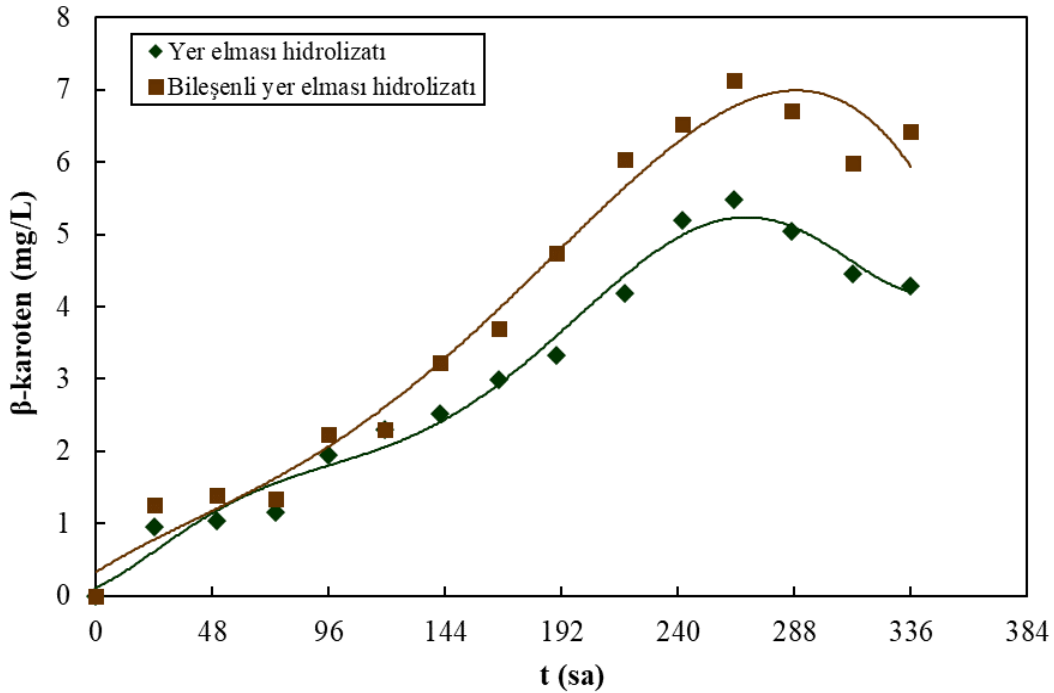
Elma posası bazlı bir besiyerinde, lahana turşusundan izole edilmiş olan bir *Rhodotorula* sp. ile karotenoid üretimi için farklı parametrelerin optimize edildiği bir başka çalışma, Joshi ve ark., (2013) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada elma posasının 10-60 g/L aralığında değiştiği ve farklı konsantrasyonlarda; pepton, maya özütü ve dekstroz içeren besiyerlerinin denendiği ve 40 g/L elma posası içeren besiyerinde en yüksek karotenoid üretiminin elde edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada 10-60 g/L aralığında değişen elma posası besiyerlerinde, demir amonyum sülfatın %0.1-%0.5 aralığında değişen farklı konsantrasyonlarının karotenoid üretimine etkilerinin de incelendiği belirtilmiştir. Bu denemelerin sonucunda elma posası konsantrasyonunun 20 g/L'nin üzerine artırılmasıyla biyokütle veriminin azalırken

karotenoid derişiminin arttığı, 40 g/L elma posası konsantrasyonunda demir amonyum sülfat derişimindeki artışın karotenoid üretimini desteklediği bildirilmiştir. Bu durumun nedeni olarak; demir amonyum sülfatta, azot ile birlikte demir ve sülfürün bulunmasının, *Rhodotorula* cinsi maya hücrelerinin daha yüksek derişimde pigment üretmesini desteklemesi olarak ifade edilmiştir.

#### 4.7.8. Yer Elması Hidrolizati İle Yapılan Çalışmalar

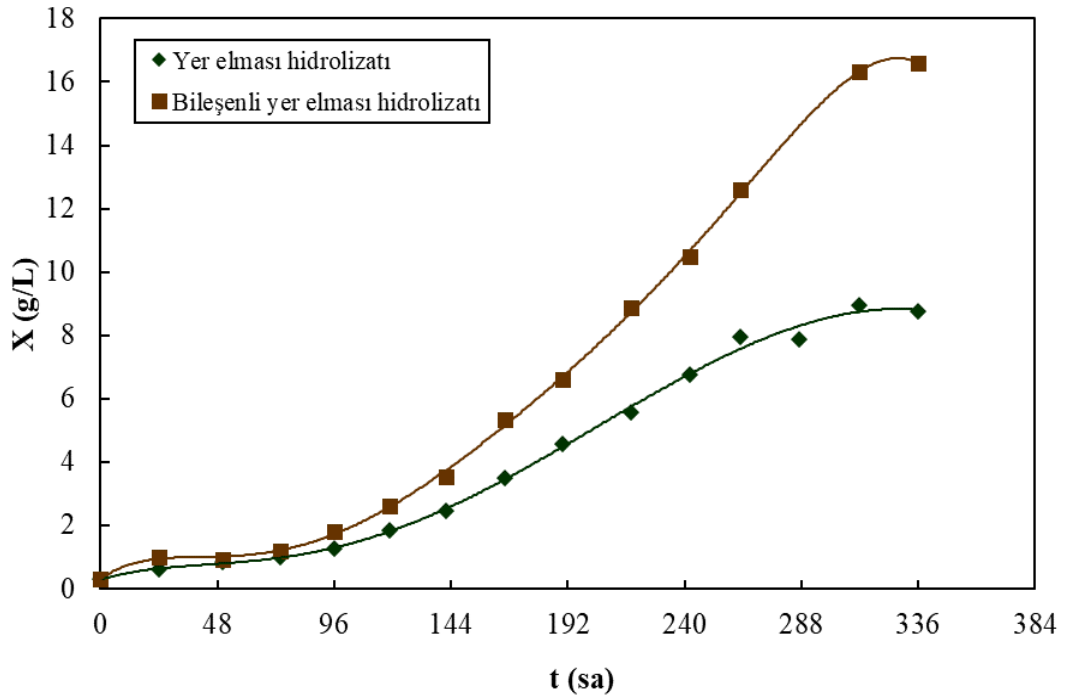
Yer elması hidrolizati (YEH) ile gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde, başlangıç aşılama derişimi;  $3.5 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir. YEH ortamındaki başlangıç indirgen şeker, glukoz ve fruktoz derişimleri sırasıyla; 50.7, 9.2 ve 35.7 g/L olarak hesap edilmiştir. Bileşenli YEH ortamındaki başlangıç indirgen şeker, glukoz ve fruktoz derişimleri ise sırasıyla; 50.1, 9.2 ve 35.1 g/L olarak tayin edilmiştir. Bileşensiz ve bileşenli YEH'in kullanıldığı deneylerde, incelenen suşun  $\beta$ -karoten üretimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.91'de verilmektedir.



Şekil 4.91. Bileşenli ve bileşensiz yer elması hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten derişimlerinin zamanla değişimleri

İlgili grafik incelendiğinde de görülebileceği gibi, her iki ortamdaki  $\beta$ -karoten üretimleri fermantasyon süresince artmış, bileşensiz ve bileşenli YEH ortamları için en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri fermantasyonun 263. saatinde, sırasıyla; 5.48 ve 7.14 mg/L olarak tayin edilmiştir. Bu saatten sonra ise; her iki ortamdaki  $\beta$ -karoten derişimlerinde, azalma belirlenmiştir. Yer elması hidrolizatının kullanıldığı deneylerde, bileşen katılmadan hazırlanan ortamın da, bileşenli ortam kadar incelenen suşun  $\beta$ -karoten üretimini desteklediği belirlenmiştir.

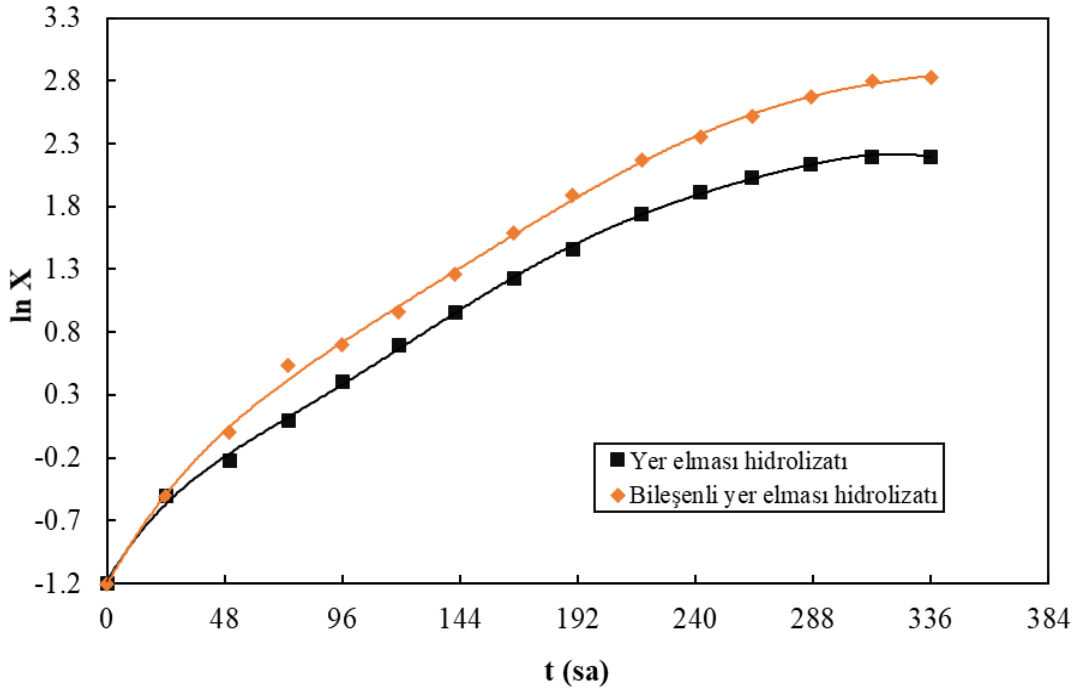
YEH'nın denendiği fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.92'de verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde, her iki ortamdaki biyokütle derişimlerinin zamanla arttıkları ve YEH ile bileşenli YEH ortamlarında, incelenen suş için tayin edilen en yüksek biyokütle derişimlerinin sırasıyla; 8.96 ve 16.60 g/L'ye ulaştıkları bulunmuştur.



Şekil 4.92. Bileşenli ve bileşensiz yer elması hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

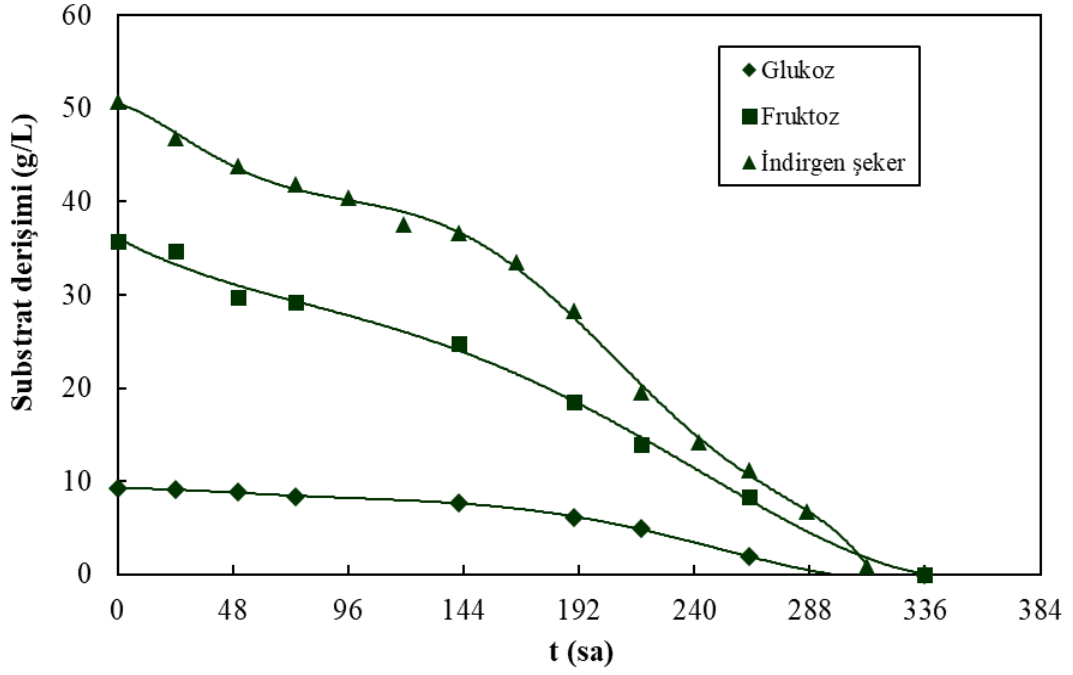
YEH'nın kullanıldığı deneylerde,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.93'de gösterilmektedir. Bu grafik yardımıyla, bileşensiz ve bileşenli YEH ortamları için maya özgül üreme hızları ( $\mu$ ) sırasıyla; 0.029 ve 0.033  $\text{sa}^{-1}$  olarak tayin edilmişlerdir.

Çalışmanın bu kısmında ayrıca, maksimum ürün oluşum ve maksimum özgül ürün ulaşım hızları da belirlenmiştir. YEH bileşenli YEH ortamlarında elde edilen en yüksek ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0366 ve 0.0447  $\text{mg } \beta\text{-karoten}/(\text{L}\cdot\text{sa})$  olarak bulunmuş olup, en yüksek özgül ürün oluşum hızları ( $\gamma_m$ ) ise, sırasıyla; 0.0359 ve 0.0482  $\text{mg } \beta\text{-karoten}/(\text{g mo}\cdot\text{sa})$  olarak hesaplanmıştır.

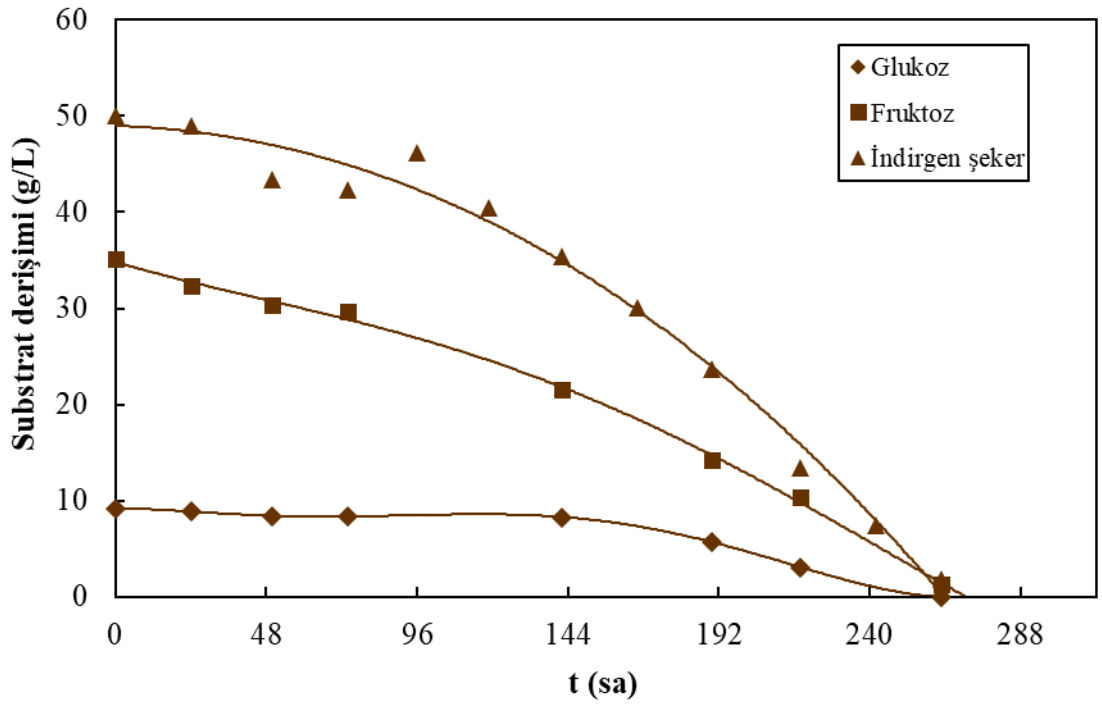


Şekil 4.93. Bileşenli ve bileşensiz yer elması hidrolizatının kullanıldığı ortamlarda, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri

Bu deneylerde, YEH ve bileşenli YEH ortamlarına ait glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.94 ve Şekil 4.95'de sunulmuştur. YEH' nin tek başına ve bileşenli olarak kullanıldığı deneylerde, fermantasyon süresince ortamdaki glukoz tüketiminin fruktoz tüketimine kıyasla daha yavaş olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.94. Yer elması hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda, fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.95. Bileşenli yer elması hidrolizatının kullanıldığı çalışmalarda fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve indirgen şeker derişimlerini

Her iki ortam için fermantasyon sonunda hem glukozun hem de fruktozun tamamen tüketildikleri de bulunmuştur. YEH ve bileşenli YEH ortamlarında, indirgen şeker derişimi dikkate alındığında, bileşenli ortamda bulunan indirgen şekerin nispeten daha kısa sürede tükendiği de belirlenmiştir.

Literatürde Wang ve ark., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, *Rhodospiridium toruloides* 2F5 suşunun inülaз ürettiği ve inülini substrat olarak kullanarak hücre yağı üretebildiği bulgulanmıştır ve bunun sonucunda yer elması gibi inulin içeren ucuz karbon kaynaklarını kullanabileceği rapor edilmiştir.

Karetkin ve ark., (2016) tarafından bazı bitkisel hammaddeler (şeker pancarı melası, ayçiçeği küspesi, yer elması kökleri) kullanılarak bir *Rhodotorula rubra* suşunun biyokütle ve karotenoid üretimleri incelenmiştir. Hammaddenin çeşidine, uygulanan önışlemlere bağılı olarak toplam karbonhidrat içeriğinin değıştığı ve bu duruma göre de elde edilen biyokütle ve karotenoid içeriğinin değıştığı bildirilmiştir. Bu suş tarafından mikrobiyel karotenoid sentezi için en iyi potansiyelin sırasıyla; şeker pancarı melası, deproteinize ayçiçeği küspesi ve yer elması köklerinin hidrolizatları olduğu rapor edilmiştir.

#### **4.7.9. Çeşitli Doğal Substrat Kaynaklarının Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanıldığı Çalışmaların Genel Değerlendirmesi**

Çeşitli doğal substrat kaynaklarının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından, denenen ortamlarda üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri ile biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları, ürün ve özgül ürün oluşum hızları, Çizelge 4.11'de verilmektedir.

İncelenen tüm doğal substrat kaynakları dikkate alındığında, ana fermantasyon ortamındaki karbon kaynağı dışındaki diğere bileşenlerin eklenmesi ile hazırlanan ortamların, doğal substratların tek başlarına kullanılmaları ile hazırlanan ortamlara göre *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimini daha fazla teşvik ettikleri saptanmıştır.



Çizelge 4.11. Doğal substratların kullanıldığı ortamlarda elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme, ürün ve özgül ürün oluşum hızları

Doğal substrat kaynağı	$\beta$ -karoten (mg/L)	Biyokütle derişimi (g/L)	Maya özgül üreme hızı ( $sa^{-1}$ )	Ürün oluşum hızı [mg $\beta$ -karoten / (L.sa)]	Özgül ürün oluşum hızı [mg $\beta$ -karoten / (g mo.sa)]
Şeker pancarı küspesi özütü	1.52	2.82	0.025	0.0097	0.0081
Bileşenli şeker pancarı küspesi özütü	3.42	6.18	0.029	0.0192	0.0138
Üzüm posası özütü	3.09	6.98	0.025	0.0122	0.0049
Bileşenli üzüm posası özütü	7.57	15.55	0.033	0.0305	0.0153
Kestane kabuğu hidrolizatı	0.86	0.44	*	0.0067	*
Bileşenli kestane kabuğu hidrolizatı	1.46	0.56	*	0.0096	*
Fındık kabuğu hidrolizatı	0.75	0.28	*	0.0138	*
Bileşenli fındık kabuğu hidrolizatı	0.99	0.38	*	0.0260	*
Armut posası özütü	1.49	4.04	0.025	0.0147	0.0167
Bileşenli armut posası özütü	8.07	15.14	0.03	0.0183	0.0235
Üzüm suyu	3.55	9.78	0.025	0.0282	0.0148
Bileşenli üzüm suyu	7.37	16.66	0.025	0.0570	0.0309
Elma posası özütü	2.16	3.84	0.019	0.0217	0.0300
Bileşenli elma posası özütü	8.46	14.44	0.025	0.0669	0.0235
Yer elması hidrolizatı	5.48	8.96	0.033	0.0366	0.0359
Bileşenli yer elması hidrolizatı	7.14	16.66	0.029	0.0447	0.0482

\*:İncelenen suş bu ortamlarda üreyemediği için bu değerler hesaplanamamıştır.

Denenen substrat kaynakları içerisinde, çalışılan suş ile elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri; 8.46 ve 8.07 mg/L olarak sırasıyla; bileşenli elma ve armut posası özütleri ile çalışılan fermantasyon ortamlarında belirlenmiştir. Bunun yanısıra, bileşen

eklenmemiş fermantasyon ortamları içerisinde  $\beta$ -karoten derişimini (5.48 mg/L) en fazla destekleyen doğal substrat kaynağının ise; yer elması hidrolizatı olduğu tespit edilmiştir. Yer elması hidrolizatı ile hazırlanan ortamın fruktoz başlangıç derişimi yaklaşık; 36 g/L olup, bu değer optimizasyon çalışmasında kullanılan ortamın fruktoz başlangıç derişiminden (50 mg/L) daha düşüktür. Bu durum YEH'in tek başına bir ortam olarak kullanılması açısından umut vericidir. Çalışmanın bu bölümünde, kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarından hazırlanan ortamların çalışılan *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimini olumsuz etkiledikleri belirlenmiştir. Çalışılan suş ile  $\beta$ -karoten üretimi açısından, denenen iki doğal substrat kaynağı ile hazırlanan hidrolizat ortamlarının uygun olmadıkları bulgulanmıştır.

Bileşen eklenerek çalışılan doğal substratlar arasından; üzüm posası özütü (7.57 mg/L), üzüm suyu (7.37 mg/L) ve yer elması hidrolizatı (7.14 mg/L) ortamlarında da nispeten yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri elde edilmiştir. Bu araştırmada, sentetik fermantasyon ortamı kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışması sonucunda, çalışılan suş ile elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimi; 7.18 mg/L olarak bulunmuştur.

Doğal substrat kaynakları ile yapılan deneylerde, çalışılan suş ile elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri; karbon kaynağı dışında diğer bileşenlerin de eklendiği yer elması özütü, üzüm suyu, üzüm posası ve armut posası özütlerinin kullanıldığı ortamlarda sırasıyla; 16.66, 16.66, 15.55 ve 15.14 g/L olarak elde edilmiştir. Doğal substratlarla çalışıldığında, bileşenli olarak hazırlanan ortamların incelenen suşun üremesini,  $\beta$ -karoten üretiminde olduğu gibi, daha fazla desteklediği saptanmıştır. Bileşen ilavesinin, yalnızca doğal substratlar ile hazırlanan ortamlarda elde edilen, en yüksek biyokütle derişimlerinin belirlendiği ortamlar sıralamasını ise, değiştirmedeği bulgulanmıştır. Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında elde edilen en yüksek biyokütle derişimi (7.10 g/L) ile karşılaştırıldığında ise, bileşenli doğal substrat ortamlarının incelenen suşun üremesini çok daha fazla teşvik ettiği saptanmıştır. Sentetik ortamdaki fruktoz yerine kullanılan söz konusu bu doğal substratların, çalışılan suşun gelişimini yapay besin ortamından daha çok desteklediği saptanmıştır.  $\beta$ -karoten üretimine benzer şekilde, kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları ile hazırlanan fermantasyon ortamlarının, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun üremesini inhibe ettiği de belirlenmiştir. Optimum koşul deneyindeki biyokütle derişimi (7.10 g/L) ile

karşılaştırıldığında bileşen ilave edilmeyen ortamlarda elde edilen biyokütle derişimlerinden; ÜS ve YEH ortamlarında bir miktar daha yüksek, ÜPÖ ortamında yakın, diğer ortamlarda ise daha düşük değerler elde edilmiştir.

Bu deneylerde, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu için hesaplanan özgül üreme hızları incelendiğinde (bkz. Çizelge 4.11) en yüksek değer (0.033 sa<sup>-1</sup>); bileşen içeren üzüm posası özütü ve bileşensiz yer elması özütünden hazırlanan ortamlarda elde edildiği tespit edilmiştir. Ürün oluşum hızları açısından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise; en yüksek değerlerin; bileşenli elma posası özütü, bileşenli üzüm suyu ve bileşenli yer elması hidrolizatı ortamlarında sırasıyla; 0.0570, 0.0669 ve 0.0447 mg β-karoten/(L.sa) olarak hesaplandıkları görülmektedir. Söz konusu değerlerin, optimizasyon çalışmasında elde edilenden (0.025 sa<sup>-1</sup>) daha yüksek oldukları da bulunmuştur.

#### **4.8. β-karotenin Moleküler Yapı Analizine İlişkin Sonuçlar**

Bu tez çalışmasında, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen bazı β-karoten örneklerinin moleküler yapı analizleri yapılarak, saf bir β-karoten (Sigma) örneğinkine ile karşılaştırması da gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; daha önce Bölüm 3.2.6'da açıklanan yöntem kullanılarak, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrometresi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışılan suş tarafından, elma posası özütü ile hazırlanan fermantasyon ortamında üretilen β-karoten örneği ile, saf bir β-karoten örneğine ait, FT-IR spektrometresi ile elde edilmiş olan; IR spektrumları EK 8'de verilmiştir.

Çizelge 4.12'de FT-IR analizi sonucunda elde edilen IR spektrumları sonuçları ile, literatürde yapılmış olan bazı çalışmalarda, çeşitli β-karoten örnekleri için elde edilmiş; bazı fonksiyonel gruplara özgü dalga boyları verilmektedir. Bu tez çalışmasında, standart olarak kullanılan saf β-karoten örneğine ait IR pikleri ile, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen β-karoten örneğine ait piklerin uyumlu oldukları saptanmıştır.

Çizelge 4.12. Saf  $\beta$ -karoten, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 ile üretilen ve bazı literatür çalışmalarından alınan  $\beta$ -karoten örneklerine ait FT-IR analizi sonuçları

Fonksiyonel Gruplar	Dalga Boyları (cm <sup>-1</sup> )					
	Saf $\beta$ -karoten (Masek ve ark., 2015)	Saf $\beta$ -karoten (Korumilli ve Mishra, 2014)	<i>R. glutinis</i> DFR-PDY (Latha ve Jeevaratnam, 2010)	Saf $\beta$ -karoten (Moh ve ark., 1999)	<i>R. glutinis</i> var. <i>glutinis</i> NBRC 1125	$\beta$ -karoten (Sigma)
CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> gerilmeleri	2922-2862	2912-2860	2955-2920	3050-2900	3434	3029-2863
C-H eğilmesi	1445-1360	1446-1365	1463-1377	1455	1457-1370	1453-1366
C-H gerilme	1033	1021			1080	1173
=C-H düzlem dışı bükülme	962	965		956		967
C-C gerilme	980-930	900-700		727	547	882-828

Latha ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *R. glutinis* DFR-PDY suşu tarafından üretilen karotenoid fraksiyonlarının, FT-IR ve NMR spektroskopileri kullanılarak tanımlandığı rapor edilmiştir. Raporda  $\beta$ -karoten olduğu belirlenen karotenoid fraksiyonunun IR bantlarının incelendiği ve sırasıyla alifatik CH<sub>3</sub> ve CH<sub>2</sub> gruplarının asimetric gerilmelerinin; 2955 ve 2920 cm<sup>-1</sup> bantlarına ve aynı grupların simetric gerilmelerinin ise; 2869 ve 2851 cm<sup>-1</sup> bantlarına neden olduğu bildirilmiştir.

CH<sub>3</sub> gruplarının asimetric ve simetric eğilmelerinin sırasıyla; 1463 ve 1377 cm<sup>-1</sup> bantlarında gözleendiği de belirtilmiştir.

Bir başka araştırmada, elde edilen bir meyve atığı ekstraktında, bir *R. rubra* suşu ile karotenoid üretiminin optimizasyonu üzerinde çalışıldığı ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada elde edilen karotenoid örneği ile, kontrol amaçlı olarak kullanılan saf bir  $\beta$ -karoten örneğinin, FT-IR analizi ile moleküler yapı analizinin gerçekteşirildiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada, saf  $\beta$ -karoten örneğinde saptanan başlıca piklerin; 2912 ve 2860 cm<sup>-1</sup> (asimetric ve simetric CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> titreşimleri), 1446 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>), 1365 cm<sup>-1</sup> (dimetil grupları), 1021 cm<sup>-1</sup> (düzlem içi -CH grupları) ve 965 cm<sup>-1</sup> (düzlem dışı trans konjuge alken grupları) oldukları rapor edilmiştir. 700-900 cm<sup>-1</sup> dalga boyu arasındaki piklerin ise C-C iskelet yapısındaki gerilme titreşimleri olduğu ifade edilmiştir (Korumilli ve Mishra, 2014).

$\beta$ -karotenin FT-IR spektrumunun incelendiği bir diğer çalışmada ise; CH<sub>3</sub> ve CH<sub>2</sub> gruplarının asimetric ve simetric gerilme titreşimleri için; 2922 ve 2862 cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub> makaslaması için 1445 cm<sup>-1</sup>, dimetil grubu bölünmesi için 1360 cm<sup>-1</sup>, düzlem içinde CH grupları için 1033 cm<sup>-1</sup> ve düzlem dışında trans konjuge alken gruplarının deformasyon modu için; 962 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında piklerinin saptandığı bildirilmiştir (Masek ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında elde edilen  $\beta$ -karoten örneğinin moleküler yapı analizi sonuçları, yukarıda verilen literatür örneklerinde elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında da, uyumlu bulgular içerdigi belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında bazı fermantasyon parametrelerinin *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine etkileri incelenerek, bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Ayrıca söz konusu suş ile  $\beta$ -karoten üretiminde doğal substrat kaynaklarının fermantasyon ortamı olarak değerlendirilebilirliği de incelenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen genel bulgular aşağıda özetlenmiştir.

1. Tez çalışmasının ilk aşamasında, laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalar sırasında izole edilmiş ve tanımlanmış olan *R. glutinis* türüne ait 7 farklı yerel ve *R. muciliginosa* (2 adet) ile *R. glutinis* (1 adet) türlerine ait 3 kültür koleksiyonu suşunun  $\beta$ -karoten üretimleri, çalkalamalı su banyolarının kullanıldığı kesikli sistemlerde, uygun bir fermantasyon ortamında, sabit sıcaklık, başlangıç pH'sı, çalkalama hızı ve inokülüm derişiminde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda incelenen suşlar arasından  $\beta$ -karoten üretimi en yüksek olan suşun; bir kültür koleksiyonu suşu olan *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 ile, birbirlerine nispeten yakın değerlerde sonuçlar veren 5 suş  $\beta$ -karoten üretimleri açısından tekrar aynı koşullarda deneysel olarak karşılaştırılmışlardır. Gerçekleştirilen bu denemenin sonucunda da en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin yine, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile çalışıldığında elde edildiği saptanmış ve araştırmaya bu suş ile devam edilmesine karar verilmiştir.
2. Çalışmada; farklı karbonhidrat kaynaklarının seçilen *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı deneylerde; glukoz, fruktoz, galaktoz, maltoz ve sakkaroz olmak üzere beş karbonhidrat türü, fermantasyon ortamında ayrı ayrı kullanılmışlardır. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda çalışılan suş ile elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten üretiminin, fermantasyon ortamında karbon kaynağı türü olarak; fruktoz kullanıldığında gerçekleştiği belirlenmiştir.

3. Çalışmada bir sonraki aşamada, farklı azot kaynaklarının incelenen suşun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine etkileri incelenerek, üretimi en iyi destekleyen azot kaynağının belirlenebilmesi amacıyla, farklı organik ve inorganik azot kaynakları fermantasyon ortamında bulunan amonyum sülfat ve maya özütü ile birlikte kullanılarak çeşitli denemeler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda; en yüksek  $\beta$ -karoten ve biyokütle derişimleri ile, maya özgül üreme hızının, fermantasyon ortamında kazein kaynaklı pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  karışımı kullanıldığında elde edildiği belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra gerçekleştirilecek olan deneylerde, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak söz konusu azot karışımının kullanılmasına karar verilmiştir.
4. Tez çalışmasında daha sonra, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun  $\beta$ -karoten üretimi üzerine, bazı fermantasyon parametrelerinin etkilerinin araştırılması ve  $\beta$ -karoten üretimi için optimum fermantasyon koşullarının saptanması amacıyla çeşitli deneyler yapılmış ve bir modelleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada bağımsız değişkenler olarak; fermantasyon ortamının karbon ve azot kaynağı başlangıç derişimleri, sıcaklık ve başlangıç pH'ı seçilirken, bağımlı değişkenler olarak ise; maksimum  $\beta$ -karoten derişimi (mg/L), özgül üreme hızı ( $\text{sa}^{-1}$ ) ve maksimum ürün oluşum hızı (mg  $\beta$ -karoten/L.sa) belirlenmiştir. Seçilen bağımsız değişkenlerin *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşuna ait belirlenen bazı bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri, Design Expert 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı yardımıyla, yanıt yüzey metodu kapsamında, dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan 30 deney çerçevesinde araştırılmıştır. Gerçekleştirilen bu deneyler sonucunda; incelenen bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak belirlenen; maksimum  $\beta$ -karoten derişimi, mikroorganizmanın özgül üreme hızı ve maksimum  $\beta$ -karoten oluşum hızı değerleri üzerindeki etkilerini gösteren model eşitlikler, Design Expert 10.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı yardımıyla türetilmiştir. Bu aşamada daha sonra, türetilen model denklemlerin gerçek değerler ile uyumluluğu program yardımıyla test edilmiş ve türetilen model denklemlerin gerçek değerler ile uyumlu oldukları belirlenmiştir. Araştırmanın bu bölümünde ayrıca belirtilen programdan yararlanılarak, seçilen bağımlı değişkenlerin

belirlenen hedefler doğrultusunda sağlanabilmeleri için fermantasyon koşullarının nümerik optimizasyonu da yapılmıştır. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretimi için program tarafından belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için öngörülen değerler, 100 farklı çözüm olarak bulunmuştur. Bu çözümler arasından seçilen, optimum fermantasyon ortamı karbon ve azot kaynağı başlangıç derişimleri, başlangıç pH'ı ve sıcaklık değerlerini içeren bir çözüm seçilerek, optimum işletme koşullarında bazı deneyler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ise, gerçekleştirilen bu deneylerden elde edilen bağımlı değişkenlerin deneysel değerleri ile, ilgili program tarafından hesaplanan teorik değerler karşılaştırılarak, incelenen tüm bağımlı değişkenler için elde edilen deneysel sonuçların, doğrulama menüsü yardımıyla kabul edilebilir sınırlar içerisinde olup olmadıkları incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda elde edilen deneysel verilerin, kabul edilebilir sınırlar içerisinde oldukları saptanmıştır. Optimizasyon çalışmasının sonucunda elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten değeri; 7.18 mg/L, mikroorganizma özgül üreme hızı; 0.025 sa<sup>-1</sup> ve en yüksek ürün oluşum hızı ise; 0.031 mg  $\beta$ -karoten/(L.sa) olarak tespit edilmiştir.

5. Bu tez çalışmasında daha sonra, çeşitli doğal substratların sentetik fermantasyon ortamındaki karbon kaynağı (fruktoz) yerine (bileşenli) ve doğrudan fermantasyon ortamları (bileşensiz) olarak kullanılmalarının, incelenen suşun  $\beta$ -karoten üretimi üzerindeki etkilerini inceleyen deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla gıda endüstrisi artıkları olarak; şeker pancarı küspesi ve üzüm posasından hazırlanan özütler ile kestane kabuklarından elde edilen hidrolizat, tarımsal kaynaklı doğal substratlar olarak; armut ve elma posaları ile yer elmasından hazırlanan özütler ve üzüm suyu, tarımsal artık olarak ise; fındık kabuklarından elde edilen hidrolizat kullanılmıştır. Gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucunda çalışılan suş ile bileşenli olarak hazırlanan fermantasyon ortamlarında, daha yüksek  $\beta$ -karoten üretimlerinin elde edildiği tespit edilmiştir. Bunlardan elma, armut ve üzüm posası özütleri, üzüm suyu ve yer elması hidrolizatından hazırlanan fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişimleri sırasıyla; 8.46, 8.07, 7.57, 7.37 ve 7.14 mg/L olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu deneyler sonucunda; *R. glutinis* var.



*glutinis* NBRC 1125 suşu ile, elma, armut, üzüm posası özütleri ve üzüm suyu ile hazırlanan bileşenli fermantasyon ortamlarında elde edilen  $\beta$ -karoten üretimlerinin (7.37-8.46 mg/L) sentetik ortamda elde edilene (7.18 mg/L) göre daha yüksek oldukları bulunmuştur. Yer elması hidrolizatından hazırlanan fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin (7.14 mg/L) ise; sentetik ortamda üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten miktarına oldukça yakın olduğu saptanmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerde, ortama herhangi bir bileşen eklenmeden doğrudan doğal substrattan hazırlanan fermantasyon ortamlarında, incelenen suş tarafından üretilen en yüksek  $\beta$ -karoten derişiminin; 5.48 mg/L olarak, yer elması hidrolizati ile çalışıldığında elde edildiği belirlenmiştir. Doğal substratlarla çalışıldığında elde edilen bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; bileşenli elma ve armut posası özütü ortamları ile bileşen ilave edilmemiş yer elması hidrolizati ortamı, çalışılan suş ile  $\beta$ -karoten üretimini desteklenmesi açısından umut veren fermantasyon ortamları olarak belirlenmiştir.

6. Çalışmada, *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu tarafından üretilen  $\beta$ -karoten örneğinin moleküler yapı analizi amacıyla gerçekleştirilen FT-IR analizlerinde elde edilen spektrumların, saf  $\beta$ -karoten örneği ve literatürde yapılan bazı çalışmalarda verilen FT-IR spektrumu değerleri ile büyük ölçüde uyumlu oldukları bulunmuştur.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasıyla kullanılan *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşunun sentetik ve çeşitli doğal substratların kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, optimize edilmiş işletme koşullarında, iyi bir  $\beta$ -karoten üreticisi olduğu ve gelecekte bu amaçla yapılacak çeşitli çalışmalarda değerlendirilebileceği kapsamlı bir şekilde ortaya konulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Acar, J., Gökmen, V., Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri. Gıda Kimyası, Saldamlı, İ. (Ed.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 557-585, **2014**.
- Aksan, E., Çeşitli mayalardan karotenoidlerin elde edilmesi ve sucukta renklendirici olarak kullanım olanaklarının araştırılması, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2005**.
- Aksu, Z., Eren, A.T., Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source, Process Biochemistry, 40(9) (**2005**) 2985-2991.
- Aksu, Z., Eren, A.T., Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*, Biochemical Engineering Journal, 35(2) (**2007**) 107-113.
- Aktaş, B., Özdemir, P., Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., Bazı agro-endüstriyel yan ürünlerin doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilmesi, Hayvansal Üretim, 54(2) (**2013**) 30-35.
- Alakraa, F., *Rhodospodidium toruloides* Y27012 mayasından karotenoid ve tek hücre yağı üretimi ve optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2014**.
- Albertyn, J, Pohl, C, Viljoen, B. *Rhodotorula*. Encyclopedia of Food Microbiology (Second ed.), Batt, C. A. and Tortorello, M. L. (Eds.), Vol. 3, Academic Press, USA, **2014**.
- Alcaíno, J, Baeza, M, Cifuentes, V., Carotenoid distribution in nature. Carotenoids in Nature, Stange, C. (ed.), in Subcellular Biochemistry, Haris, J. R. (ed.), Vol. 79, Springer, Chapter 1, UK, **2016**.
- Aldemir, R., Karslı, M. A., Yaş şeker pancarı posası silajının arpa yerine kullanımının koyunlarda duodenuma geçen toplam protein üzerine etkisi: I. Besin madde sindirimi ve mikrobiyal protein sentezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 23(2) (**2012**) 89-98.
- Anonim, (2020) Türk Şeker Yan Ürünler Üretim Raporu, <http://www.turkseker.gov.tr/?ModulID=10&MenuID=45> (Erişim tarihi: 21 Mayıs 2021)
- Anonim, (2021) Ulusal gıda kompozisyon veri tabanı, Bileşenlere göre karşılaştırma-beta karoten, <http://www.turkomp.gov.tr/> (Erişim tarihi: 21 Mayıs 2021)
- Arathi, B. P., Sowmya, P. R. R., Vijay, K., Baskaran, V., Lakshminarayana, R., Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects-A review, Trends in Food Science & Technology, 45(1) (**2015**) 105-117.

- Aruldass, C. A., Dufossé, L., Ahmad, W. A., Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms-a review, *Journal of Cleaner Production*, 180 (2018) 168-182.
- Attri, D, Joshi, V. Optimization of apple pomace based medium and fermentation conditions for pigment production by *Micrococcus* species, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64 (2005) 598-601.
- Bagy, M M K, Abd-Alla, M H, Nafady, N A, Morsy, F M, Mahmoud, G. A. E., Bioconversion of plant wastes to  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula glutinis* KU550702, *European Journal of Biological Research*, 6(4) (2016) 226-241.
- Banzatto, D., Freita, L. A., Mutton, M. J. R., Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup, *Food Science and Technology*, 33 (2013) 14-18.
- Baş, D., Boyacı, I. H., Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 78(3) (2007) 836-845.
- Bauernfeind, J. C., Natural food colors, Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, Bauernfeind, J. C. (ed), Academic Press, New York, 1-45, 1981.
- Bayrak, E., Büyükkileci, A. O., Utilization of white grape pomace for lactic acid production, *Gıda/The Journal of Food*, 43(1) (2018) 129-138.
- Bekar, T., Bağcılıkta atık teknolojisi, *Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.*, 6(1) (2016) 17-24.
- BeMiller, J. N. Carbohydrate Analysis, Part II. Compositional Analysis of Foods. *Food Analysis* (4th ed), Nielsen S. S. (ed), Springer, 147-174, 2010.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Design of experiments: a powerful tool in food microbiology, *Current Research, Technology And Education Topics In Applied Microbiology And Microbial Biotechnology*, 2 (2010) 1419-1429.
- Bhosale, P., Studies on yeast *Rhodotorula*, its carotenoids and their applications, Doctor of Philosophy Thesis, Pune University, Pune, 2001.
- Bhosale, P., Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(4) (2004) 351-361.
- Bhosale, P., Gadre, R.,  $\beta$ -carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(6) (2001a) 327-332.
- Bhosale, P., Gadre, R., Production of  $\beta$ -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(4) (2001b) 423-427.
- Bhosale, P., Gadre, R., Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced  $\beta$ -carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*, *Letters in Applied Microbiology*, 34(5) (2002) 349-353.

- Boekhout, T., Diagnostic descriptions and key to presently accepted heterobasidiomycetous genera. The Yeasts-A Taxonomic Study, (4th ed), Kurtzman, C. P. (Ed.), Elsevier 627-634, **1998**.
- Bogacz-Radomska, L., Harasym, J.,  $\beta$ -Carotene-properties and production methods, Food Quality and Safety, 2(2) (**2018**) 69-74.
- Bonadio, M. P., Freita, L. A., Mutton, M. J. R., Carotenoid production in sugarcane juice and synthetic media supplemented with nutrients by *Rhodotorula rubra* 102, Brazilian Journal of Microbiology, 49(4) (**2018**) 872-878.
- Braunwald, T, Schwemmlin, L, Graeff-Hönninger, S, French, W T, Hernandez, R, Holmes, W E, Claupein, W. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*, Applied Microbiology and Biotechnology, 97(14) (**2013**) 6581-6588.
- Buzzini, P., An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 24(1) (**2000**) 41-45.
- Buzzini, P., Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*-*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup, Journal of Applied Microbiology, 90(5) (**2001**) 843-847.
- Buzzini, P., Martini, A., Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin, Bioresource Technology, 71(1) (**1999**) 41-44.
- Buzzini, P., Martini, A., Gaetani, M., Turchetti, B., Pagnoni, U. M., Davoli, P., Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis, Enzyme and Microbial Technology, 36(5-6) (**2005**) 687-692.
- Büyüksırt, T., Mikroorganizmalardan tüketilebilir renk maddesi üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, **2011**.
- Cardoso, L. A. C., Karp, S. G., Vendruscolo, F., Kanno, K. Y. F., Zoz, L. I., Carvalho, J. C., Biotechnological production of carotenoids and their applications in food and pharmaceutical products, Carotenoids, 8 (**2017**) 125-141.
- Cardoso, L. A. C., Kanno, K. Y. F., Karp, S G., Microbial production of carotenoids A review, African Journal of Biotechnology, 16(4) (**2017**) 139-146.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I. C., Natural food additives: Quo vadis?, Trends in Food Science & Technology, 45(2) (**2015**) 284-295.
- Chandi, G. K., Gill, B. S., Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: a review, International Journal of Food Properties, 14(3) (**2011**) 503-513.

- Chandi, G. K., Singh, S. P., Gill, B. S., Sogi, D. S., Singh, P., Optimization of carotenoids by *Rhodotorula glutinis*, Food Science and Biotechnology, 19(4) (2010) 881-887.
- Chattopadhyay, P., Chatterjee, S., Sen, S. K., Biotechnological potential of natural food grade biocolorants, African Journal of Biotechnology, 7(17) (2008) 2972-2985.
- Chekroun, M. B., Amzile, J., Mokhtari, A., El Haloui, N., Prevost, J, Fontanillas, R. Comparison of fructose production by 37 cultivars of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 24(1) (1996) 115-120.
- Cheng, Y. T., Yang, C. F., Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 61 (2016) 270-275.
- Çıtak, S, Sönmez, S, Öktüren, F., Bitkisel kökenli atıkların tarımda kullanılabilme olanakları, Derim, 23(1) (2006) 40-53.
- Deak, T., Beuchat, L. R., Handbook of food spoilage yeasts, USA, CRC press, 1996.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses, CRC Press, Boca Raton, 2003.
- Dhaliwal, M, Chandra, N. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa*, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 6(3) (2015) 1161-1165.
- Dikshit, R, Tallapragada, P., Comparative study of natural and artificial flavoring agents and dyes, in Natural and artificial flavoring agents and food dyes, Grumezescu, A. M., Holban, A. M. (ed.), Vol. 7, Elsevier, London, Chapter 3, 2018.
- Doran, P M., Bioprocess Engineering Principles, Academic Press Inc., Oxford, 2013.
- Dönmez, S., Endüstriyel Mikrobiyoloji-Kavramlar, Kurallar ve Uygulamalar, Sidas Yayıncılık, İzmir, 2017.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry, 28 (3), (1956), 350-356.
- Dufossé, L., Microbial production of food grade pigments, Food Technology and Biotechnology, 44(3) (2006) 313-323.
- Dufosse, L., Pigments from microalgae and microorganisms: sources of food colorants. Food Colorants Chemical and Functional Properties, (ed: Socaciu, C.), CRC Press, London, Chapter 5.4, 2008.
- Dufosse, L., Microbial and microalgal carotenoids as colourants and supplements, in Carotenoids, Nutrition and Health, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds), Springer, Basel, 83-98, 2009a.

- Dufosse, L., Applied microbiology: Industrial microbial pigments, in Encyclopedia of Microbiology (Third ed.), Academic Press, San Diego, 457-471, **2009b**.
- Elfeky, N, Elmahmoudy, M, Zhang, Y, Guo, J, Bao, Y. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* with a combined cultivation mode of nitrogen, sulfur, and aluminium stress, Applied Sciences, 9(12) (**2019**) 2444-2463.
- Erdal, P, Ökmen, G. Gıdalarda kullanılan mikrobiyal kaynaklı pigmentler, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2) (**2013**) 56-68.
- Erdoğan, S., Elma posası tozunun antioksidan aktivitesi ile fenolik bileşenlerinin belirlenerek ekmek yapımında kullanım olanaklarının araştırılması, Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, **2010**.
- Eren, A. T., *Rhodotorula* türü mayalar ile  $\beta$ -karoten üretiminin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2003**.
- Eryasar, K, Karasu-Yalcin, S., Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*, 3 Biotech, 6 (202), (**2016**) 1-7.
- Eryasar-Orer, K, Karasu-Yalcin, S., Bioproduction of Xylitol From Chestnut Shell Hydrolysate: Optimization of Fermentation Parameters, Chiang Mai Journal Of Science, 46(5) (**2019**) 822-838.
- Fell, J, Statzell-Tallman, A., *Rhodotorula* FC Harrison, in The Yeasts, (4th ed), Kurtzman, C. P. (Ed.), Elsevier, 800-827, **1998**.
- Ferrao, M, Garg, S., Studies on effect of media components on growth and  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula graminis* RC04, Journal of Cell and Tissue Research, 11(1) (**2011**) 2551.
- Frank, H A, Young, A, Britton, G, Cogdell, R. J., The photochemistry of carotenoids, Springer Science & Business Media, Vol. 8, **2006**.
- Frengova, G I, Beshkova, D M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36(2) (**2009**) 163.
- Frengova, G I, Simova, E D, Beshkova, D M.  $\beta$ -Carotene-rich carotenoid-protein preparation and exopolysaccharide production by *Rhodotorula rubra* GED8 grown with a yogurt starter culture, Zeitschrift für Naturforschung C, 61(7-8) (**2006**) 571-577.
- Furr, H C, Clark, R M. Carotenoids/Physiology, Encyclopedia of food sciences and nutrition (Second ed.), Craft Technologies, Wilson, NC, USA, **2003**.
- Ghilardi, C., Negrete, P. S., Carelli, A. A., Borroni, V., Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*, Bioresources and Bioprocessing, 7(1) (**2020**) 1-11.

- Goodwin, T., Biosynthesis of carotenoids, in *The biochemistry of the carotenoids*, Goodwin, T. (ed.), Springer, 33-76, **1980**.
- Govindaswamy, V., Vasudevan, V., Divakar, S., Optimisation of growth parameters for the production of carotenoids by *Rhodotorula gracilis*, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 208(2) (**1999**) 121-124.
- Heer, K, Sharma, S., Microbial pigments as a natural color: a review, *Int J Pharm Sci Res*, 8(5) (**2017**) 1913-1922.
- Hernández-Almanza, A., Montanez, J. C., Aguilar-Gonzalez, M. A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C. N., *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry, *Food Bioscience*, 5 (**2014**) 64-72.
- Isler, O. Introduction. In *Carotenoids*, Springer-Basel, **1971**, 11-29.
- Israilides, C. J., Smith, A., Harthill, J. E., Barnett, C., Bambalov, G., Scanlon, B. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(5) (**1998**) 613-617.
- Joshi, V., Sharma, R., Girdher, A., Production and evaluation of biocolour (carotenoids) from *Rhodotorula* using apple pomace: effect of composition of different nitrogen sources and methods of cell disruption, *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 3(2) (**2013**) 127.
- Kahyaoglu, M., Endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla  $\beta$ -karoten üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, **1999**.
- Kahyaoglu, M., Kıvanç, M., Endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla beta karoten üretimi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 17(2) (**2007**) 61-66.
- Karetkin, B. A., Chervyakova, O. P., Baurin, D. V., Panfilov, V. I., Optimisation of pretreatment condition of plant raw composed media for carotenoids biosynthesis by yeast *Rhodotorula rubra*, *International Multidisciplinary Scientific Geoconference, SGEM, Sofia, Vol. 3*, **2016**.
- Karasu-Yalçın, S. *Yarrowia lipolytica* ile sitrik asit üretimine etki eden çeşitli parametrelerin incelenmesi ve bazı endojen maya suşlarının sitrik asit üretim kapasitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
- Khuri, A. I., Response surface methodology and its applications in agricultural and food sciences, *Biometrics & Biostatistics International Journal*, 5(5) (**2017**) 1-11.
- Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., Jyoti, S., Colorful world of microbes: carotenoids and their applications, *Advances in Biology*, (**2014**).
- Koç, B, Kaymak-Ertekin, F., Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları, *Gıda*, 35(1) (**2010**) 1-8.

- Korumilli, T. Studies on pigment production by microorganisms using raw materials of agro-industrial origin, Doctor of Philosophy Thesis, India National Institute Of Technology, **2014**.
- Korumilli, T, Mishra, S. Carotenoid production by *Rhodotorula* sp. on fruit waste extract as a sole carbon source and optimization of key parameters, Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE), 33(3) (**2014**) 89-99.
- Kosseva, M. R., Processing of food wastes, Advances in food and nutrition research, 58 (**2009**) 57-136.
- Kot, A. M., Błażej, S., Kurcz, A., Gientka, I., Kieliszek, M., *Rhodotorula glutinis*-potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries, Applied Microbiology and Biotechnology, 100(14) (**2016**) 6103-6117.
- Kot, A M, Błażej, S, Kurcz, A, Bryś, J, Gientka, I, Bzducha-Wróbel, A, Reczek, L. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*, Electronic Journal of Biotechnology, 27 (**2017**) 25-31.
- Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., Bryś, J., Torulene and torularhodin:“new” fungal carotenoids for industry?, Microbial Cell Factories, 17(1) (**2018**) 1-14.
- Kot, A. M., Błażej, S, Kieliszek, M, Gientka, I, Piwowarek, K, Brzezińska, R. Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 26 (**2020**).
- Latha, B., Jeevaratnam, K., Purification and characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source, Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 5(3) (**2010**) 166-174.
- Latha, B., Jeevaratnam, K., Murali, H., Manja, K., Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source, 4, (**2005**) 353-357.
- Liaaen-Jensen, S., Basic carotenoid chemistry, Oxidative Stress and Disease, 13 (**2004**) 1-30.
- Liang, C. M., Yang, C. F., Du, J. S., Lipid Production and Waste Reutilization Combination Using Yeast Isolate *Rhodotorula mucilaginosa* LP-2, BioEnergy Research (**2021**) 1-12.
- Libkind, D, van Broock, M. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(7) (**2006**) 687-692.
- Machado, W., Silva, L., Vanzela, E., Del Bianchi, V., Production of carotenoids by *Rhodotorula toruloides* isolated from Brazilian tropical savannah, International Food Research Journal, 26(4) (**2019**).



- Makela, M., Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review, *Energy Conversion and Management*, 151 (2017) 630-640.
- Maldonado, I. R., Scamparini, A. R., Rodriguez-Amaya, D. B., Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1) (2007) 65-70.
- Maldonado, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B., Scamparini, A. R., Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem, *Food Chemistry*, 107(1) (2008) 145-150.
- Maldonado, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B., Scamparini, A. R., Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1) (2012) 109-115.
- Malisorn, C, Suntornsuk, W. Optimization of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine, *Bioresource Technology*, 99(7) (2008) 2281-2287.
- Malisorn, C., Suntornsuk, W., Improved  $\beta$ -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation, *Biochemical Engineering Journal*, 43(1) (2009) 27-32.
- Manimala, M., Murugesan, R., Carotenoid pigment production from Yeast: Health benefits and their industrial applications, *International Journal of Chemical Studies*, 5(6) (2017) 392-395.
- Mapelli, V, Franzén, C, Olsson, L. Systems biology methods and developments for *Saccharomyces cerevisiae* and other industrial yeasts in relation to the production of fermented food and food ingredients. In *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*,(eds: McNeil, B., Archer, D., Giavasis, I., Harvey, L.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 42-80, 2013.
- Marova, I., Certik, M., Breierova, E., Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts-application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds, *Remote Sensing of Biomass: Principles and Applications/Book*, (ed: Darko Matovic), InTech., 345-384, 2011.
- Marova, I., Haronikova, A., Petrik, S., Dvorakova, T., Breierova, E., Production of enriched biomass by red yeasts of *Sporobolomyces* sp. grown on waste substrates, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* (2012) 534-551.
- Marova, I, Breierova, E, Koci, R, Friedl, Z, Slovak, B, Pokorna, J., Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts, *Annals of Microbiology*, 54(1) (2004) 73-86.

- Martínez, C, Gertosio, C, Labbe, A, Pérez, R, Ganga, M A. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes alpha-L-arabinofuranosidase, *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4) (2006) 408-413.
- Martins, L. C., Palma, M., Angelov, A., Nevoigt, E., Liebl, W., Sá-Correia, I., Complete Utilization of the Major Carbon Sources Present in Sugar Beet Pulp Hydrolysates by the Oleaginous Red Yeasts *Rhodotorula toruloides* and *R. mucilaginosa*, *Journal of Fungi*, 7(3) (2021) 215.
- Masek, A., Chrzescijanska, E., Diakowska, K., Zaborski, M. Application of  $\beta$ -carotene, a natural flavonoid dye, to polymeric materials as a natural antioxidant and determination of its characteristics using cyclic voltammetry and FTIR spectroscopy, *Int. J. Electrochem. Sci*, 10(4) (2015) 3372-3386.
- Mata-Gómez, L C, Montañez, J C, Méndez-Zavala, A, Aguilar, C N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview, *Microbial Cell Factories*, 13(1) (2014) 12.
- Mihalcea, A, Ungureanu, C, Ferdes, M, Chirvase, A A, Tanase, C. The influence of operating conditions on the growth of the yeast *Rhodotorula rubra* ICCF 209 and on torularhodin formation, *Culture*, 11 (2011) 12.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31 (1959) 426.
- Moh, M, Man, Y C, Badlishah, B, Jinap, S, Saad, M, Abdullah, W., Quantitative analysis of palm carotene using Fourier transform infrared and near infrared spectroscopy, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(2) (1999) 249.
- Moliné, M, Libkind, D, van Broock, M., Production of torularhodin, torulene, and  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula* yeasts. In *Microbial carotenoids from fungi*, Springer, Vol 898, Chapter 19, 275-283, 2012.
- Moliné, M, Libkind, D, de Garcia, V, Giraud, M R., Production of pigments and photo-protective compounds by cold-adapted yeasts, In *Cold-adapted Yeasts*, Springer, Chapter 9, 193-224, 2014.
- Mortensen, A., Carotenoids and other pigments as natural colorants, *Pure and Applied chemistry*, 78(8) (2006) 1477-1491.
- Nasrabadi, M R N, Razavi, S H. Optimization of  $\beta$ -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate, *Food Science and Biotechnology*, 20(2) (2011) 445-454.
- Nelis, H, De Leenheer, A., Microbial production of carotenoids other than  $\beta$ -carotene. In *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*, Springer, 43-80, 1989.
- Ogbodo, U O, Ugwuanyi, J O., Production, Use, and Prospects of Microbial Food Colorants. In *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*, Academic Press, Chapter 7, 189-216, 2017.

- Ötles, S, Çagindi, Ö. Carotenoids as Natural Colorants. In (C. Socaciu Ed.), Food colorants: chemical and functional properties, CRC Press, London, 51-67, **2008**.
- Ötleş, S, Atlı, Y. Karotenoidlerin insan sağlığı için önemi, Mühendislik Bilimleri Dergisi, 3 (**1997**) 249.
- Panesar, P S, Kennedy, J F. Biotechnological approaches for the value addition of whey, Critical Reviews in Biotechnology, 32(4) (**2012**) 327-348.
- Panesar, R, Kaur, S, Panesar, P S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review, Current Opinion in Food Science, 1 (**2015**) 70-76.
- Park, P, Cho, D, Kim, E, Chu, K. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(4) (**2005**) 429-434.
- Peris Tortajada, M. Carbohydrates and Starch. Handbook of Food Analysis (Second Ed),. Nollet, L. M. L (Ed), Marcel Dekker, USA 383-408, **2004**.
- Perrier, V, Dubreucq, E, Galzy, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula strains*, Archives of Microbiology, 164(3) (**1995**) 173-179.
- Petrik, S, Obruča, S, Benešová, P, Márová, I. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains, Biochemical Engineering Journal, 90 (**2014**) 307-315.
- Petrik, S, Marova, I, Haronikova, A, Kostovova, I, Breierova, E. Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production—a comparative screening study, Annals of Microbiology, 63(4) (**2013**) 1537-1551.
- Pfander, H., Carotenoids: an overview, in Methods in Enzymology, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.), Springer, Basel, **1992**.
- Ram, S, Mitra, M, Shah, F, Tirkey, S R, Mishra, S. Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges, Journal of Functional Foods, 67 (**2020**) 103867.
- Ramesh, M, Muthuraman, A. Flavoring and coloring agents: Health risks and potential problems. In Natural and artificial flavoring agents and food dyes, Handbook of Food Bioengineering, (Eds: Grumezescu, A. M. and Holban, A. M.), Academic Press, Vol. 7, Chapter 1, 1-28, **2018**.
- Rao, N M P, Xiao, M, Li, W-J. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications, Frontiers in Microbiology, 8 (**2017**) 1113.
- Rodrigues, T. V. D., Amore, T. D., Teixeira, E. C., Medeiros Burkert, J. F. Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts, Food Technol. Biotechnol., 57 (3) (**2019**) 388-398.

- Rubio, M. C., Runco, R, Navarro, A R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*, *Phytochemistry*, 61(6) (2002) 605-609.
- Said, K A M, Amin, M A M. Overview on the response surface methodology (RSM) in extraction processes, *Journal of Applied Science & Process Engineering*, 2(1) (2015).
- Saldamlı, İ, Uygun, Ü. Gıda katkı maddeleri. *Gıda Kimyası* (4 ed.), 2014.
- Saha, N., Samanta, A. K., Chaudhuri, S., Dutta, D. Characterization and antioxidant potential of a carotenoid from a newly isolated yeast, *Food Science and Biotechnology*, 24 (1) (2015) 117-124.
- Sanchez, S, Ruiz, B, Rodríguez-Sanoja, R, Flores-Cotera, L. Microbial production of carotenoids. In *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Elsevier, 194-233, 2013.
- Schneider, T, Graeff-Hönninger, S, French, W T, Hernandez, R, Claupein, W, Holmes, W E, Merkt, N. Screening of industrial wastewaters as feedstock for the microbial production of oils for biodiesel production and high-quality pigments, *Journal of Combustion*, (2012).
- Schneider, T, Graeff-Hönninger, S, French, W, Hernandez, R, Merkt, N, Claupein, W. Pham, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents, *Energy*, 61 (2013) 34-43.
- Selim, A, Kassem, M, Bayoumy, S M, El-Sawah, M, Ali, D F. Effect Of Some Sugars And Agro-Industrial By-Products On Carotenoids Production By Some Yeast Strains Of *Rhodotorula* spp, *Journal of Plant Production*, 4(7) (2013) 1097-1107.
- Shih, C, Hang, Y. Production of Carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut Brine, *LWT-Food Science and Technology*, 29(5-6) (1996) 570-572.
- Simova, E, Frengova, G, Beshkova, D. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(3) (2004) 115-121.
- Sliwka, H-R, Partali, V, Lockwood, S F. *Hydrophilic carotenoids: carotenoid aggregates*: CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2010.
- Somashekar, D, Joseph, R. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5) (2000) 491-493.
- Squina, F, Yamashita, F, Pereira, J, Mercadante, A. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *Rhodotorula glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice, *Food Biotechnology*, 16(3) (2002) 227-235.
- Sujatha, K, Nagarajan, P. Optimization of growth conditions for carotenoid production from *Spirulina platensis* (Geitler), *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 2 (2013) 325-328.

- Sülük, K, Tosun, İ, Ekinci, K. Elma İşleme Atıklarının Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bertaraf Yöntemlerinin İncelenmesi, International Journal of Science and Technology Research, 2 (2018) 98-108.
- Taskin, M, Erdal, S. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* MT-5 in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate, Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(8) (2011) 1440-1445.
- Taskin, M, Sisman, T, Erdal, S, Kurbanoglu, E B. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5, European Food Research and Technology, 233(4) (2011) 657-665.
- TC. Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı. (2020). Temel Ekonomik Göstergeler 4. Çeyrek Tarım Üretimi Temel Ürünler Tablosu. Retrieved from <https://www.sbb.gov.tr/temel-ekonomik-gostergeler/#1594716589132-d3a64e97-2238>
- TC. Ekonomi Bakanlığı. (2016). Sektör Raporları-Meyve Suları. [https://ticaret.gov.tr/data/5b8700a513b8761450e18d81/Meyve\\_Sulari.pdf](https://ticaret.gov.tr/data/5b8700a513b8761450e18d81/Meyve_Sulari.pdf)
- TC. Ekonomi Bakanlığı. (2017). Sektör Raporları-Yaş Meyve ve Sebze [https://ticaret.gov.tr/data/5b8700a513b8761450e18d81/Yas\\_Meyve\\_ve\\_Sebze.pdf](https://ticaret.gov.tr/data/5b8700a513b8761450e18d81/Yas_Meyve_ve_Sebze.pdf)
- Thakur, M, Azmi, W. Nutraceutical beta-carotene from natural non-conventional sources and its applications, Annals Of Phytomedicine-An International Journal, 2(1) (2013) 59-73.
- Thakur, M, Azmi, W. Production of  $\beta$ -carotene by filamentous fungus *Mucor azygosporus* MTCC 414 in synthetic medium by applying response surface methodology, Ann Phytomed, 3 (2014) 93-100.
- Tinoi, J, Rakariyatham, N, Deming, R. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate, Process Biochemistry, 40(7) (2005) 2551-2557.
- Turan, M D, Altundoğan, H S. Hidrometalurjik araştırmalarda yanıt yüzey yöntemlerinin (yyy) kullanımı, Bilimsel Madencilik Dergisi, 50(3) (2011) 11-23.
- Türkcan, O, Ökmen, G. Mikrobiyal Karotenoidler, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5(1) (2012) 115-122.
- Türkkan, E. *Rhodotorula glutinis*'den elde edilen karotenoidlerin bazı gıda patojenleri üzerine antibakteriyal etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007.
- Ünver, Y. Koç boynuz peptonu ve melas kullanılarak *Rhodotorula glutinis* izolatu tarafından karotenoid üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2010.

- Vachali, P, Bhosale, P, Bernstein, P S. Microbial Carotenoids. Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, (ed: Barredo, José-Luis), Springer, New York, vol. 898, Chapter 2, 41-59, **2012**.
- Valduga, E, Ribeiro, A H R, Cence, K, Colet, R, Tiggemann, L, Zeni, J, Toniazzo, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2) (**2014**) 207-213.
- Vandamme, E J. Natural Colors... but of course, SIM-News, 61(5) (2011) 121-128.
- Vendruscolo, F, Albuquerque, P M, Streit, F, Esposito, E, Ninow, J L. Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications, Critical Reviews in Biotechnology, 28(1) (**2008**) 1-12.
- Venil, C K, Zakaria, Z A, Ahmad, W A. Bacterial pigments and their applications, Process Biochemistry, 48(7) (**2013**) 1065-1079.
- Voaides, C, Dima, R. Effect of carbon source on carotenoid production by *Rhodotorula* sp, Archiva Zootechnica, 14(3) (**2011**) 75.
- Voaides, C, Dima, R. The effect of nitrogen source on carotenoids production by *Rhodotorula* sp, Romanian Biotechnol Lett, 17(5) (2012) 7570-7576.
- Wang, Z. P., Fu, W. J., Xu, H. M., Chi, Z. M., Direct conversion of inulin into cell lipid by an inulinase-producing yeast *Rhodospiridium toruloides* 2F5, Bioresource Technology, 161 (**2014**) 131-136.
- Yan, G. L., Liang, H.Y., Duan, C.Q., Han, B. Z., Enhanced production of  $\beta$ -carotene by recombinant industrial wine yeast using grape juice as substrate, Current Microbiology, 64(2) (2012) 152-158.
- Zeni, J, Colet, R, Cence, K, Tiggemann, L, Toniazzo, G, Cansian, R L, Valduga, E. Screening of microorganisms for production of carotenoids, CyTA-Journal of Food, 9(2) (2011) 160-166.

## EKLER

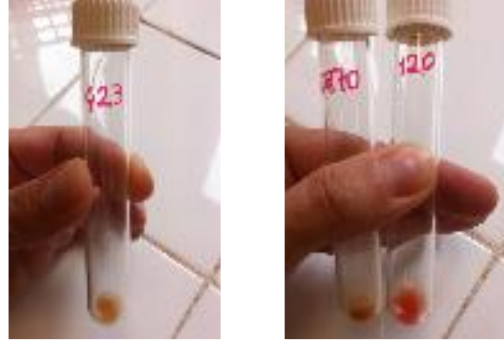
### EK 1. DENEMELERDE KULLANILAN FARKLI *Rhodotorula* KÜLTÜRLERİ



Şekil Ek 1.1. *Rhodotorula* kültürleri



Şekil Ek 1.2. Fermantasyon ortamlarından alınan kültür örnekleri



Şekil Ek 1.3. Farklı *Rhodotorula* suşları için, santrifüjleme sonrası elde edilen peletler



a)

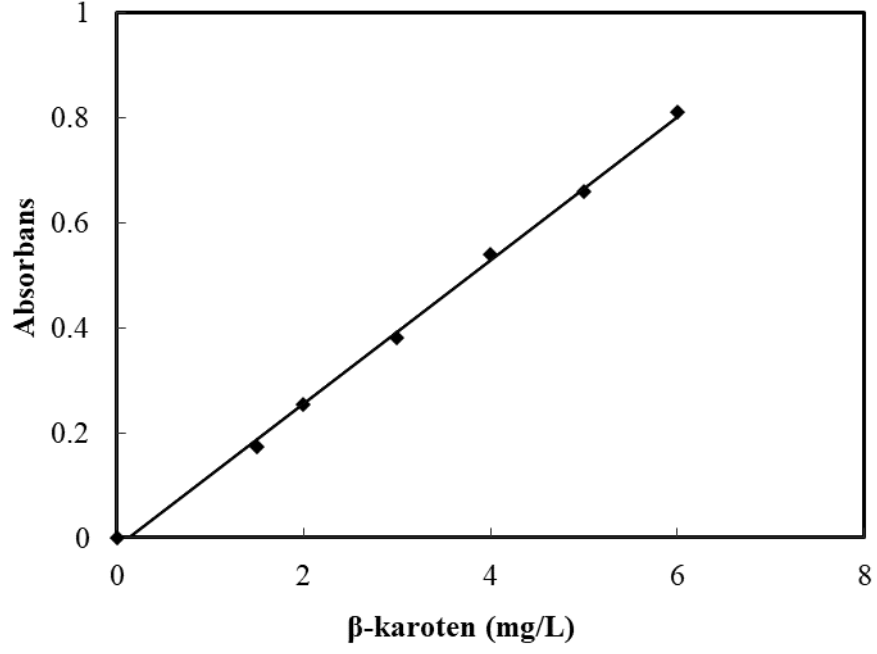


b)

Şekil Ek 1.4. (a): İki farklı *Rhodotorula* suşu için, aseton ekstraksiyonu sonrası örnek görüntüleri, (b): Ekstraksiyon ve santrifüj sonrası elde edilen pelet örneği



**EK 2.  $\beta$ -KAROTEN DERİŞİMİNİN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇALIŞMA DOĞRUSU**

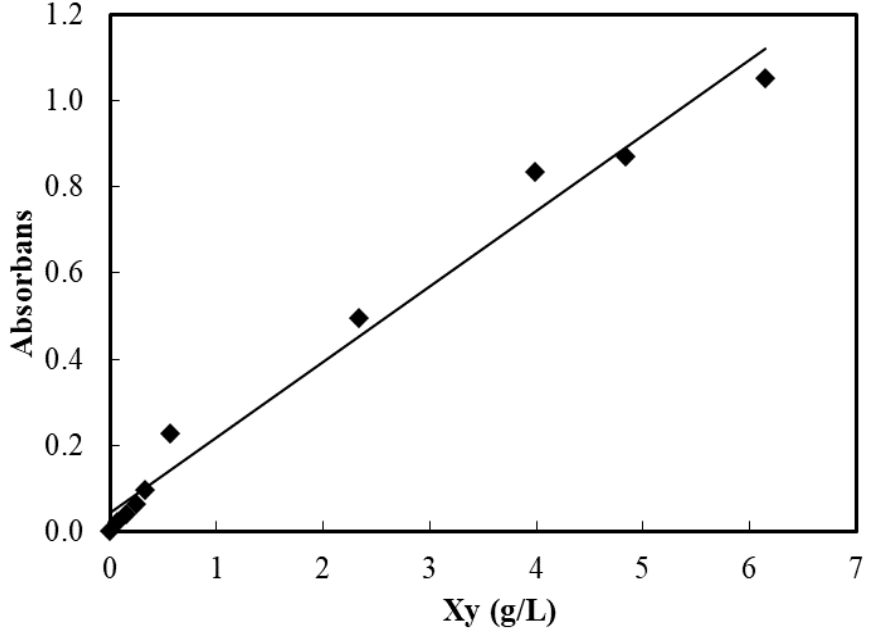


Şekil Ek 2.1.  $\beta$ -karoten çalışma doğrusu ( $\lambda = 455$  nm;  $y = 0.1362x - 0.0167$ ;  $R^2 = 0.998$ )

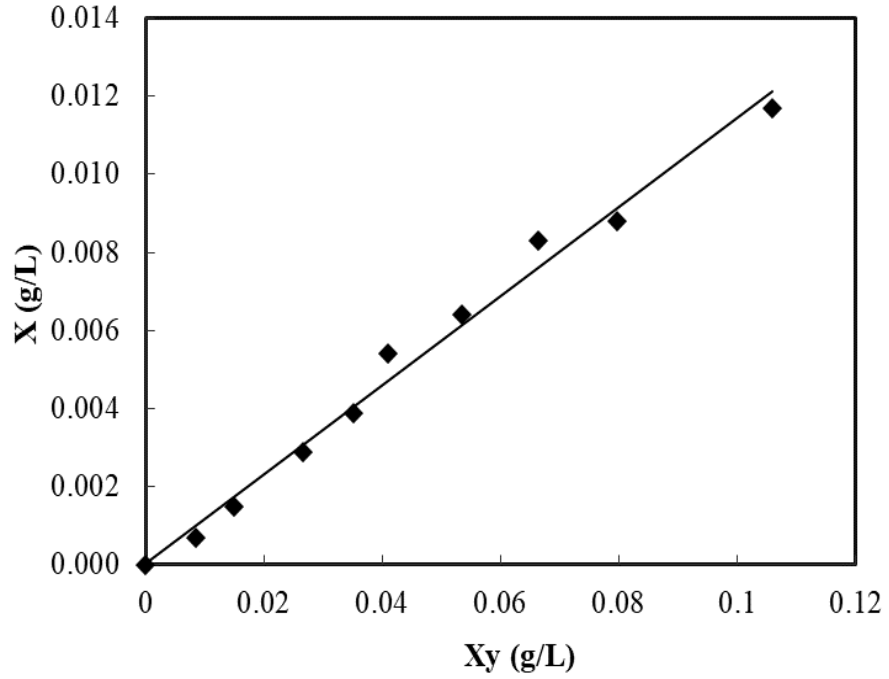
### **EK 3. BİYOKÜTLE DERİŞİMİNİN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇALIŞMA DOĞRULARININ OLUŞTURULMASI**

Bu tez çalışmasında, fermantasyon ortamından alınan kültür örneklerinin biyokütle derişimlerinin belirlenmesinde, yaş ağırlık-kuru ağırlık temelinde dayalı, spektrofotometrik bir yöntem kullanılmıştır. Deneylerde, biyokütle derişimlerinin kuru ağırlık üzerinden belirlenmesinde absorbans-yaş ağırlık ( $X_y$ ) ve yaş ağırlık-kuru ağırlık ( $X$ ) çalışma doğrularından yararlanılmıştır. Bunun için ilk olarak absorbans-yaş ağırlık çalışma doğrusu oluşturulmuştur. Bu amaçla, aktifleştirilen maya suşu, bileşimi Bölüm 3.1.2’de verilen kültür ortamına yaklaşık iki öze dolusu aşılandıktan sonra, bir su banyosunda, 28°C’de, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, yaklaşık 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, bu kültür ortamından 10’ar mL’lik örnekler alınarak, 5000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmişlerdir. Elde edilen peletten belirli miktarlarda tartılarak, 100 mL damıtık su içerisinde bir seri hücre süspansiyonları hazırlanmış ve daha sonra bu örneklerin, bir spektrofotometrede (Boeco, S30, Almanya), 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Tartılan peletlerin yaş ağırlık değerlerine karşı, hücre süspansiyonlarının ölçülen absorbans değerleri kullanılarak yaş ağırlık-absorbans çalışma doğrusu elde edilmiştir (bkz. Ek Şekil 3.1).

Yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusunun oluşturulmasında ise; yukarıda belirtildiği şekilde kültür ortamından alınan örneklerin santrifüjlenmesi ile elde edilen peletlerden belirli miktarlarda tartımlar yapılarak, yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Yaş ağırlıkları belirlenen pelet örnekleri daha sonra, etüvde yaklaşık 80°C’de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuşlardır. Kurutulan örnekler tartılarak, kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Ölçülen yaş ve kuru ağırlık değerlerinden yararlanılarak, yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusu (bkz. Ek Şekil 3.2) oluşturulmuştur.

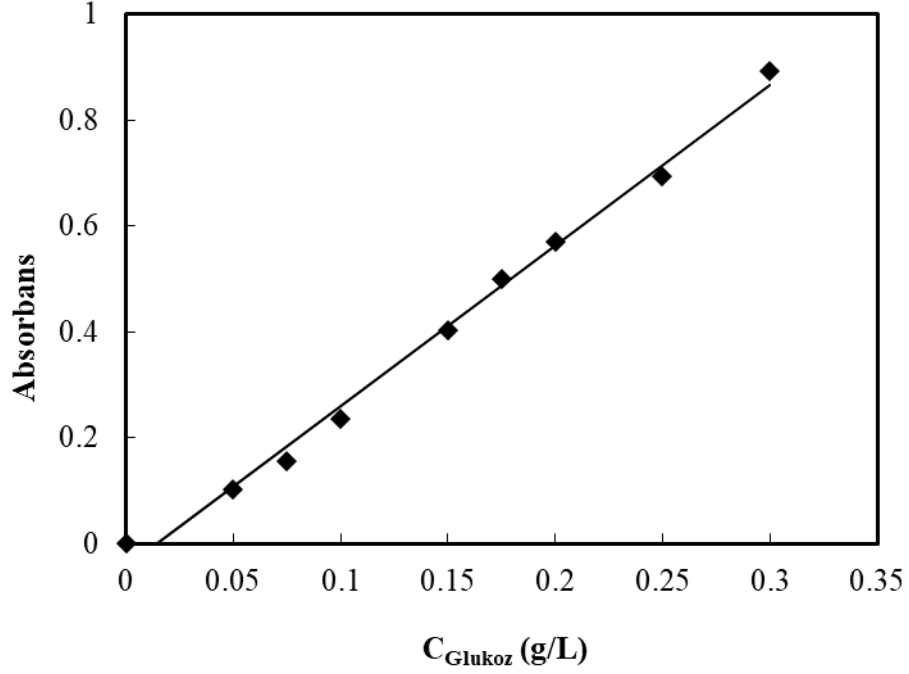


Şekil Ek 3.1. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu için oluşturulmuş, absorbans-yaş ağırlık çalışma doğrusu ( $\lambda = 600$  nm;  $y = 0.175x + 0.044$ ;  $R^2 = 0.982$ )

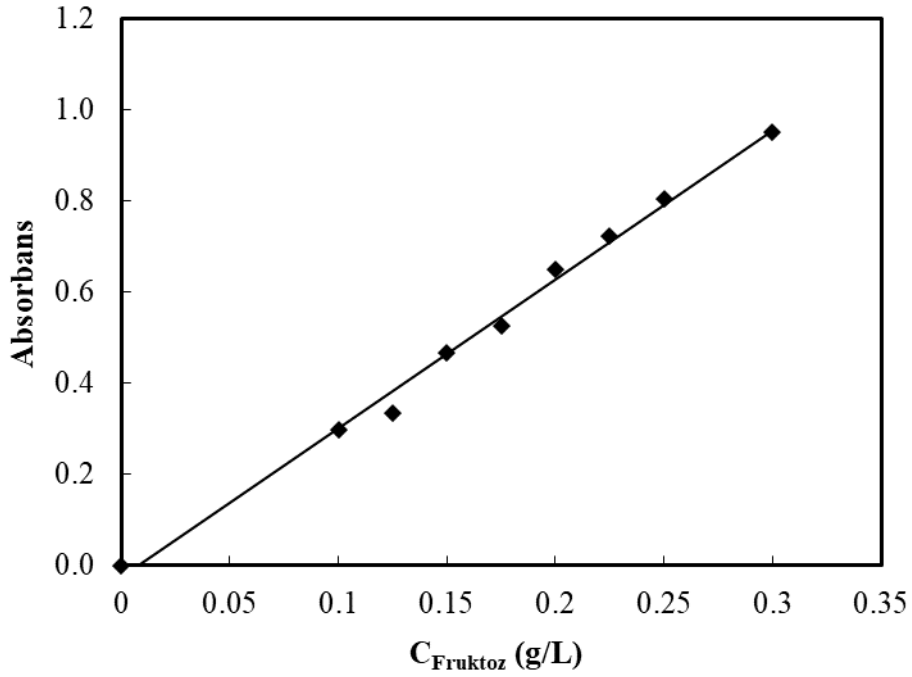


Şekil Ek 3.2. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu için oluşturulmuş, kuru ağırlık-yaş ağırlık çalışma doğrusu ( $y = 0.11417x + 0.00003$ ;  $R^2 = 0.988$ )

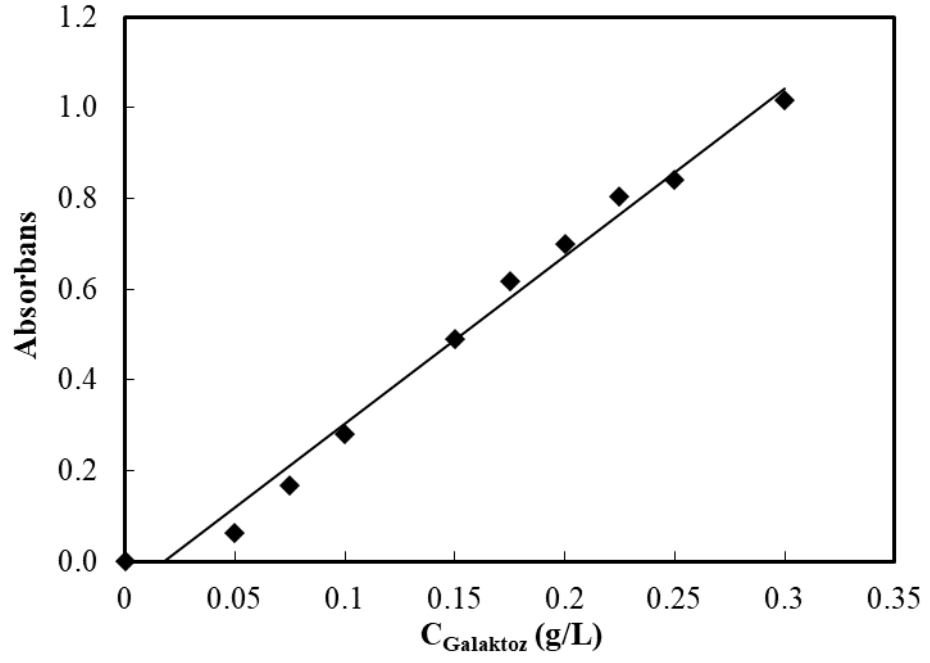
#### EK 4. FERMANTASYON ORTAMLARINDAKİ ÇEŞİTLİ ŞEKERLERİN TAYİNLERİNDE KULLANILAN ÇALIŞMA DOĞRULARI



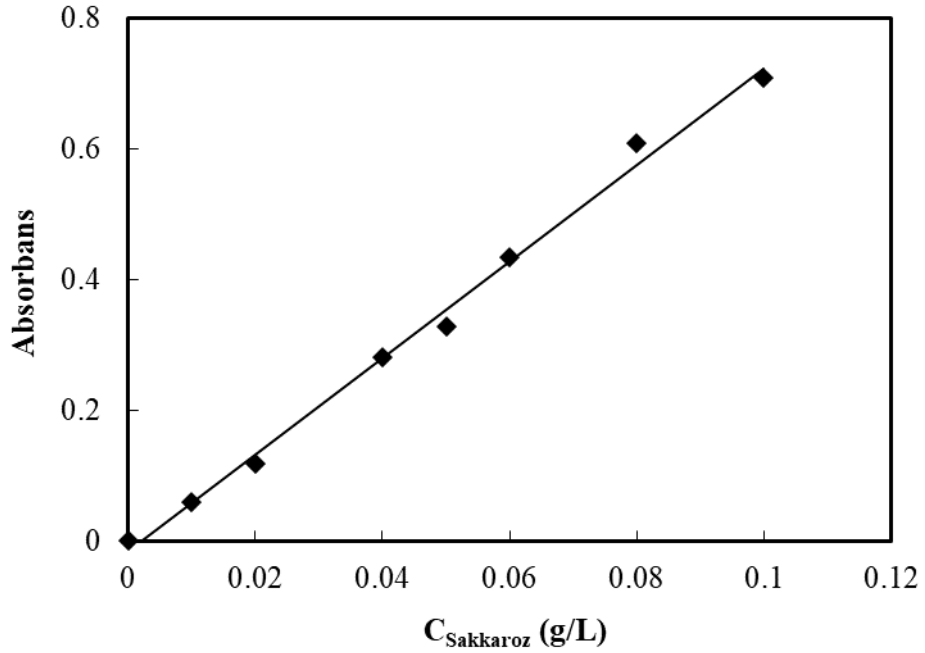
Şekil Ek 4.1. Glukoz çalışma doğrusu ( $y = 3.0295x - 0.0429$ ;  $R^2 = 0.993$ )



Şekil Ek 4.2. Fruktoz çalışma doğrusu ( $y = 3.2676x - 0.0257$ ;  $R^2 = 0.994$ )



Şekil Ek 4.3. Galaktoz çalışma doğrusu ( $y = 3.6904x - 0.0645$ ;  $R^2 = 0.987$ )



Şekil Ek 4.4. Sakkaroz çalışma doğrusu ( $y = 7.3804x - 0.0155$ ;  $R^2 = 0.995$ )

## **EK 5. FENOL SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİ**

Fenol sülfürik asit yöntemi, karbonhidrat analizlerinde kullanılan kimyasal metotlardan birisidir. Bu yöntemin, tüm çözünebilir şekerlerin kolorimetrik ölçümünde kullanılabildiği ve farklı şeker çeşitlerinin bulunduğu çözeltilerde; toplam çözünebilir şeker miktarının tayininde tercih edildiği belirtilmektedir (Dubois ve ark., 1956). Bu yöntemin işleyiş mekanizması; şekerlerin, sıcaklık ve konsantrasyon sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) ile birlikte furfural ve hidroksetilfurfural olmak üzere furan türevlerine parçalanması ve oluşan bu maddelerin fenolik bileşikler ile kondensasyonu sonucu, karbonhidrat derişimine bağı olarak sarıdan kahveye değıren renklerin oluşması olarak özetlenmektedir (Peris Tortajada, 2004; BeMiller, 2010). Toplam şeker derişiminin tayininde; uygun derişimlere seyreltilen örnek çözeltilerinden belirli bir hacimde (2 mL) alınarak üzerine %5'lik (w/v) fenol çözeltilisinden; 1 mL ve derişik sülfürik asit çözeltilisinden ise; 5 mL ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin ara ara vortekste karıştırılmasının ardından bir su banyosunda, oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Kontrol olarak örnek yerine saf su içeren çözeltiliye aynı işlemler uygulanmıştır. Süre sonunda örneklerin absorpsiyon okumaları, bir spektrofotometrede, 490 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

## **EK 6. DİNİTROSALİSİLİK ASİT YÖNTEMİ**

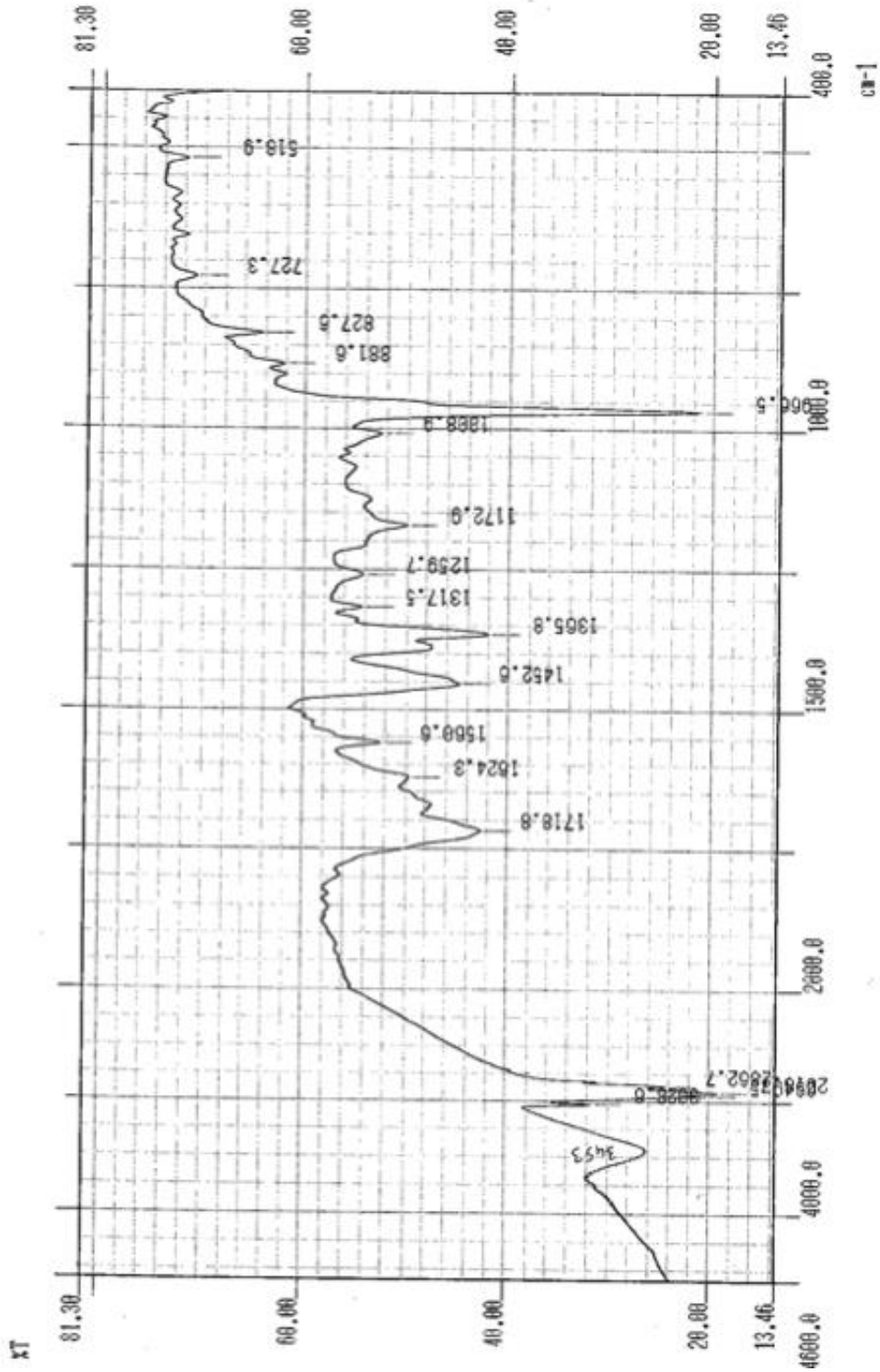
Dinitrosalisik asit yöntemi, karbonhidrat analiz metodlarından kimyasal yolla tespit esasına dayanan, kolorimetrik tekniklerden birisi olarak belirtilmektedir. Bu yöntem, indirgen şekerlerin tespitinde kullanılmaktadır. Yöntemin prensibinin; şekerlerin indirgen gruplarının, alkali çözeltili içerisinde 3,5-dinitrosalisilatın kırmızımsı monoamin türevine indirgenmesine dayandığı bildirilmektedir (Peris Tortajada, 2004; BeMiller, 2010). Yöntemde, DNS çözeltilisinin hazırlanmasında, önce 50 mL saf su içerisinde 1g DNS (Sigma) çözüldürülüp, üzerine 30 g sodyum potasyum tartarat (Merck) ve 20 mL 2N NaOH (Sigma) eklenerek bir miktar daha çözümleri için karıştırılmaktadır. Daha sonra çözünen karışım, saf su ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlanmaktadır. İndirgen şeker tayini yapılacak olan örnekler uygun derişimlere seyreltikten sonra, bir cam tüpe 1mL örnek ve 1 mL DNS çözeltilisi aktarılarak karıştırılmakta ve daha sonra 5 dk kaynar su banyosunda tutulmaktadır. Sonrasında örnekler, soğuk bir su banyosuna hızla alınarak soğutulmaktadır. Kontrol olarak örnek yerine saf su bulunan çözeltiliye de

aynı işlemler uygulanmıştır. Uygulanan işlemler sonunda absorbans okumaları; 540 nm dalga boyunda, bir spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir (Miller, 1959).

## **EK 7. FINDIK VE KESTANE KABUĞU HİDROLİZATLARININ HAZIRLANIŞI**

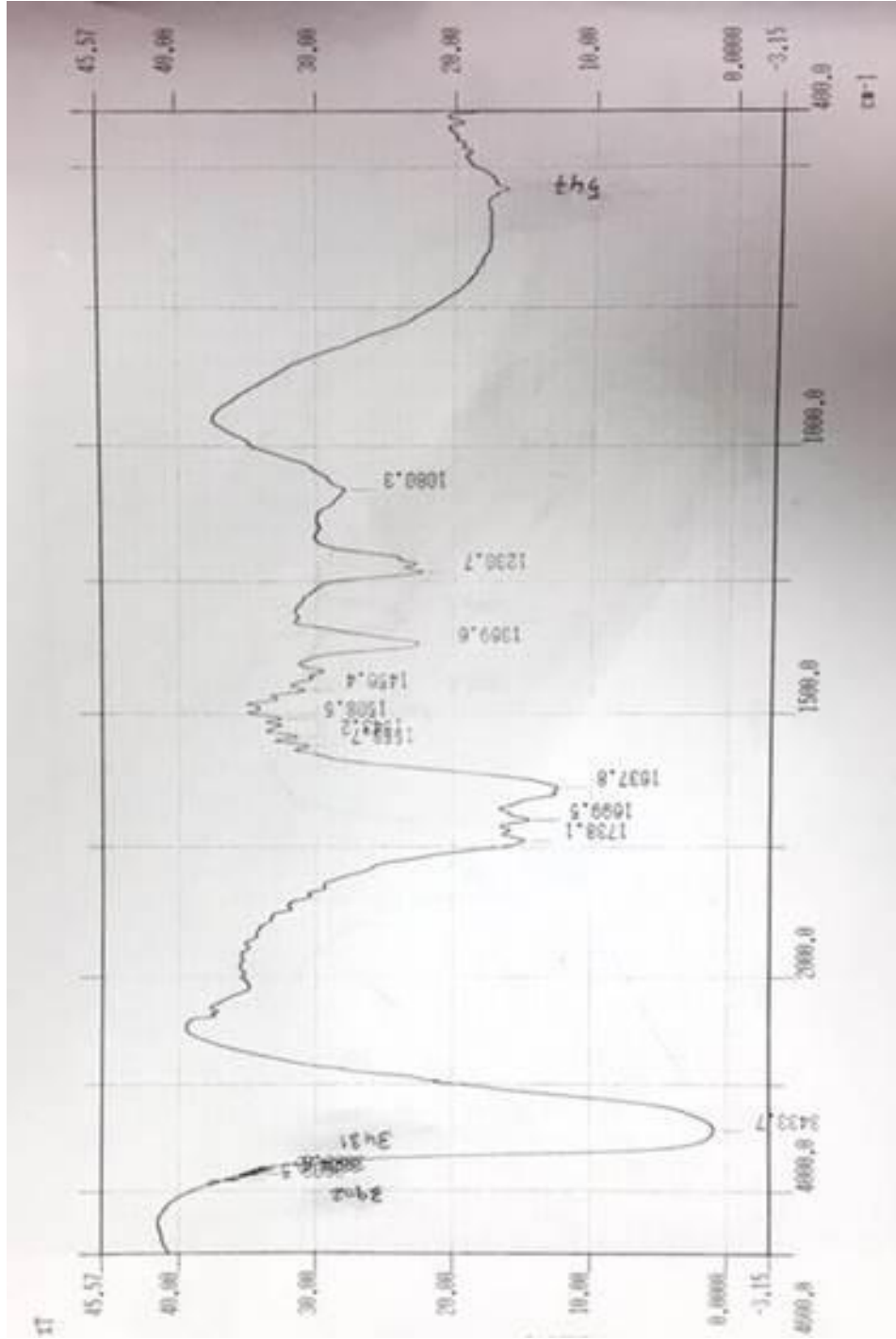
Bolu Abant İzzet Baysal Gıda Mühendisliği Bölümünde hazırlanmış olan fındık ve kestane kabuğu hidrolizatlarının üretilmesinde; modifiye bir yöntem kullanıldığı ifade edilmiştir. Bu yöntemde, öğütülmüş fındık ve kestane kabuklarına ayrı ayrı olarak önce bir asit hidrolizi uygulandığı, daha sonra ise elde edilen hidrolizata, bileşiminde bulunan bazı inhibitör bileşiklerden arındırılabilmesi amacıyla çeşitli işlemler yapıldığı belirtilmiştir (Eryasar ve Karasu-Yalcin, 2016; Eryasar-Orer ve Karasu-Yalcin, 2019).

**EK 8. İNCELENEN SUŞ TARAFINDAN ÜRETİLEN  $\beta$ -KAROTEN ÖRNEĞİ İLE SAF  $\beta$ -KAROTEN ÖRNEĞİNE AİT FT-IR SPEKTRUMLARI**



Şekil Ek 8.1. Saf ticari bir  $\beta$ -karoten örneğine ait FT-IR spektrumu





Şekil Ek 8.2. Elma posası özütü ile hazırlanan fermantasyon ortamında üretilen  $\beta$ -karoten örneğine ait FT-IR spektrumu

## Ek 9. OPTİMİZASYON ÇALIŞMASINDA BAĞIMLI DEĞİŞKENLER (YANITLAR) İÇİN BELİRLENEN HEDEFLER VE ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER

Çizelge Ek 9. Optimizasyon çalışması sonucunda program tarafından hesaplanan optimum işletme koşulları ve bağımlı değişkenlerin (yanıtların) bu koşullardaki teorik değerleri

The screenshot shows the OptiSLang software interface. The 'Criteria' tab is active, displaying a table of constraints and a table of solutions. The constraints table lists variables A:X1, B:X2, C:X3, D:X4, Y1, Y2, and Y3 with their respective goals, limits, and weights. The solutions table lists 7 solutions with their corresponding values for X1, X2, X3, X4, Y1, Y2, and Y3, along with a 'Desirability' score. Solution 1 is marked as 'Selected'.

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:X1	is in range	10	90	1	1	3
B:X2	is in range	0	10	1	1	3
C:X3	is in range	3	9	1	1	3
D:X4	is in range	24	32	1	1	3
Y1	maximize	1.75	5.5	1	1	3
Y2	none	0.02	0.07	1	1	3
Y3	none	0.017	0.036	1	1	3

Solutions								
Numbe	X1	X2	X3	X4	Y1	Y2	Y3 Desirability	
1	53.848	9.705	4.061	27.641	5.653	0.034	0.031	1.000
2	45.258	9.716	4.273	27.486	5.623	0.040	0.031	1.000
3	51.868	9.225	3.503	27.184	5.788	0.035	0.033	1.000
4	42.122	9.664	4.025	24.379	5.553	0.047	0.042	1.000
5	51.248	9.946	4.445	25.745	5.553	0.032	0.036	1.000
6	54.764	9.088	4.028	27.765	5.588	0.031	0.030	1.000
7	53.887	7.844	3.080	26.920	5.530	0.030	0.032	1.000

The screenshot shows the OptiSLang software interface with a detailed table of solutions. The table lists 27 solutions with their corresponding values for X1, X2, X3, X4, Y1, Y2, and Y3, along with a 'Desirability' score. Solution 1 is marked as 'Selected'.

Solutions	X1	X2	X3	X4	Y1	Y2	Y3	Desirability
8	56.839	9.097	3.870	28.732	5.502	0.034	0.028	1.000
9	34.912	9.391	3.445	27.249	5.783	0.057	0.035	1.000
10	37.281	9.690	3.287	28.233	5.691	0.058	0.033	1.000
11	51.657	9.608	3.124	28.463	5.826	0.042	0.032	1.000
12	42.840	9.182	3.572	26.022	5.832	0.045	0.037	1.000
13	47.849	9.737	4.466	27.920	5.523	0.039	0.030	1.000
14	45.750	9.750	4.556	26.575	5.611	0.037	0.033	1.000
15	56.618	9.157	4.021	26.762	5.552	0.027	0.032	1.000
16	33.802	8.348	3.200	26.565	5.772	0.058	0.036	1.000
17	53.928	9.491	4.639	27.161	5.521	0.030	0.031	1.000
18	50.582	9.709	4.881	26.630	5.507	0.032	0.032	1.000
19	49.378	9.969	3.909	27.587	5.741	0.039	0.032	1.000
20	59.372	9.845	4.078	26.652	5.542	0.026	0.034	1.000
21	45.398	9.383	3.170	26.958	5.977	0.045	0.036	1.000
22	42.006	9.857	4.746	26.920	5.522	0.040	0.032	1.000
23	40.392	8.770	4.012	25.895	5.645	0.044	0.035	1.000
24	52.773	8.972	3.045	27.104	5.848	0.035	0.034	1.000
25	60.836	9.794	3.081	27.842	5.784	0.031	0.034	1.000
26	49.906	9.515	3.792	27.014	5.773	0.036	0.033	1.000
27	36.266	8.016	3.574	26.100	5.615	0.051	0.035	1.000

File Edit View Display Options Design Tools Help Tips

Notes for MyDesign.tun ce

Criteria Solutions Graphs

Solutions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
28	29.992	8.212	3.126	25.353	5.733	0.070	0.041	1.000																															
29	43.793	9.565	3.169	26.889	6.013	0.047	0.036	1.000																															
30	29.278	9.398	3.329	24.931	5.882	0.074	0.045	1.000																															
31	35.428	8.254	3.573	25.809	5.657	0.054	0.036	1.000																															
32	46.066	8.234	3.984	27.685	5.531	0.036	0.028	1.000																															
33	57.109	9.823	3.235	29.193	5.633	0.041	0.030	1.000																															
34	53.831	8.914	4.438	27.404	5.510	0.030	0.029	1.000																															
35	46.182	9.883	3.708	27.639	5.791	0.043	0.033	1.000																															
36	60.513	8.999	3.454	28.320	5.571	0.030	0.030	1.000																															
37	48.629	9.045	3.148	24.930	5.652	0.042	0.041	1.000																															
38	49.799	9.848	4.261	27.224	5.662	0.036	0.032	1.000																															
39	47.593	9.081	3.927	26.435	5.698	0.036	0.033	1.000																															
40	32.936	8.047	3.203	27.765	5.535	0.057	0.032	1.000																															
41	46.468	9.028	3.917	25.443	5.607	0.038	0.036	1.000																															
42	45.845	9.277	4.626	26.772	5.560	0.035	0.031	1.000																															
43	41.542	8.929	3.158	29.040	5.526	0.051	0.029	1.000																															
44	53.954	9.684	4.183	26.966	5.638	0.031	0.032	1.000																															
45	40.635	8.885	3.574	28.552	5.512	0.048	0.029	1.000																															
46	44.161	9.113	3.272	25.839	5.883	0.045	0.038	1.000																															
47	52.308	8.924	3.268	28.035	5.752	0.036	0.031	1.000																															

File Edit View Display Options Design Tools Help Tips

Notes for MyDesign.tun ce

Criteria Solutions Graphs

Solutions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
48	49.241	9.693	3.792	28.837	5.539	0.043	0.029	1.000																															
49	42.624	9.347	3.296	26.199	5.953	0.048	0.038	1.000																															
50	35.765	9.739	3.787	26.542	5.795	0.054	0.036	1.000																															
51	46.868	9.894	4.119	24.924	5.587	0.039	0.039	1.000																															
52	42.782	9.894	3.318	27.568	5.920	0.050	0.034	1.000																															
53	50.212	8.927	4.526	27.612	5.508	0.033	0.029	1.000																															
54	42.488	8.923	4.190	26.611	5.634	0.040	0.032	1.000																															
55	51.158	9.121	3.439	28.711	5.638	0.040	0.029	1.000																															
56	57.807	9.251	3.059	29.440	5.572	0.040	0.029	1.000																															
57	30.052	8.711	3.919	25.714	5.589	0.060	0.037	1.000																															
58	49.726	9.250	3.547	28.744	5.610	0.041	0.029	1.000																															
59	37.212	9.280	3.593	27.212	5.763	0.052	0.034	1.000																															
60	60.524	9.916	3.435	28.932	5.599	0.037	0.031	1.000																															
61	24.569	9.945	3.348	24.579	5.881	0.087	0.049	1.000																															
62	62.573	9.501	3.350	27.881	5.629	0.028	0.032	1.000																															
63	47.057	8.596	4.177	27.945	5.513	0.036	0.028	1.000																															
64	48.620	8.342	3.423	27.800	5.662	0.037	0.030	1.000																															
65	41.093	8.882	3.844	26.395	5.722	0.044	0.034	1.000																															
66	66.842	9.565	3.017	28.834	5.545	0.030	0.031	1.000																															
67	59.204	9.506	3.260	29.213	5.580	0.038	0.030	1.000																															

File Edit View Display Options Design Tools Help Tips

Notes for MyDesign tim cc

Criteria Solutions Graphs

Solutions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
68	51.596	9.431	3.309	29.398	5.536	0.045	0.029	1.000																														
69	34.501	9.835	3.129	26.223	6.068	0.064	0.041	1.000																														
70	49.459	8.371	3.815	27.402	5.598	0.033	0.030	1.000																														
71	48.260	9.858	3.887	26.387	5.794	0.038	0.035	1.000																														
72	42.211	9.896	3.652	25.720	5.894	0.047	0.039	1.000																														
73	46.457	9.483	4.296	26.715	5.660	0.037	0.032	1.000																														
74	49.884	8.662	3.203	27.423	5.789	0.037	0.032	1.000																														
75	60.200	9.850	4.232	27.733	5.524	0.030	0.031	1.000																														
76	51.821	8.293	3.074	26.215	5.630	0.034	0.035	1.000																														
77	62.682	6.547	9.000	28.254	5.370	0.061	0.036	0.965																														
78	62.707	6.540	9.000	28.261	5.370	0.061	0.036	0.965																														
79	62.655	6.537	9.000	28.249	5.370	0.061	0.036	0.965																														
80	62.681	6.530	9.000	28.260	5.370	0.061	0.036	0.965																														
81	62.775	6.543	9.000	28.256	5.370	0.061	0.036	0.965																														
82	62.582	6.536	9.000	28.243	5.370	0.061	0.036	0.965																														
83	62.784	6.528	9.000	28.271	5.370	0.061	0.036	0.965																														
84	62.611	6.556	9.000	28.236	5.370	0.061	0.036	0.965																														
85	62.703	6.558	9.000	28.235	5.370	0.061	0.036	0.965																														
86	62.657	6.552	9.000	28.267	5.370	0.061	0.036	0.965																														
87	62.520	6.527	9.000	28.253	5.370	0.061	0.036	0.965																														

File Edit View Display Options Design Tools Help Tips

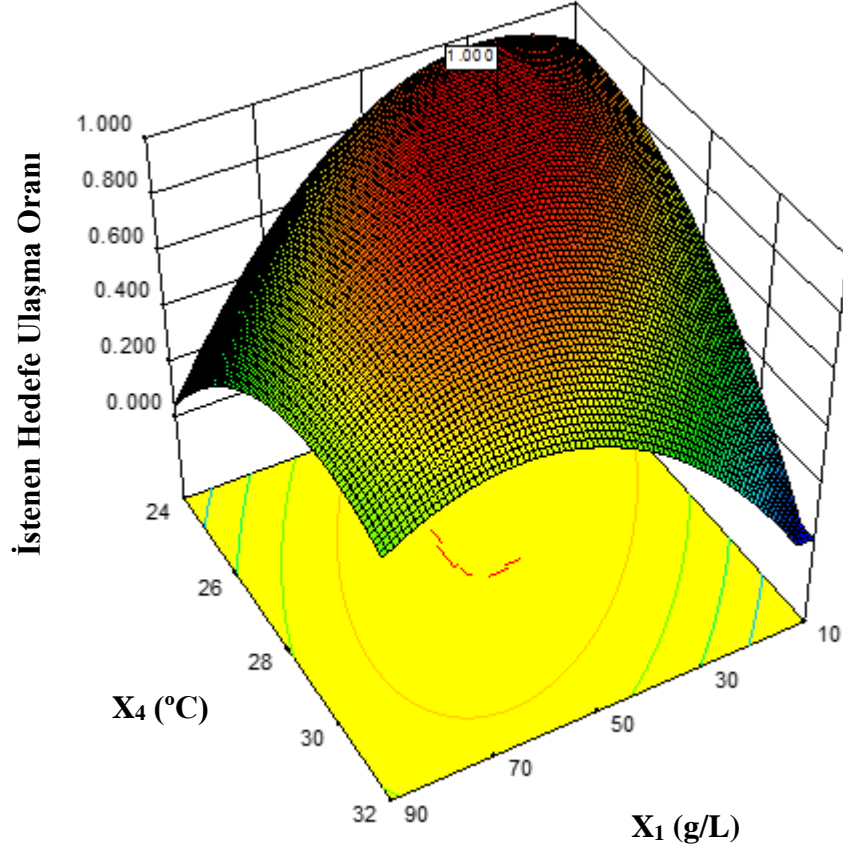
Notes for MyDesign tim cc

Criteria Solutions Graphs

Solutions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
84	62.611	6.556	9.000	28.236	5.370	0.061	0.036	0.965																														
85	62.703	6.558	9.000	28.235	5.370	0.061	0.036	0.965																														
86	62.657	6.552	9.000	28.267	5.370	0.061	0.036	0.965																														
87	62.520	6.527	9.000	28.253	5.370	0.061	0.036	0.965																														
88	62.684	6.540	9.000	28.277	5.370	0.061	0.036	0.965																														
89	62.590	6.565	9.000	28.255	5.370	0.061	0.036	0.965																														
90	62.770	6.540	9.000	28.283	5.370	0.061	0.036	0.965																														
91	62.553	6.525	9.000	28.286	5.370	0.061	0.036	0.965																														
92	62.291	6.565	9.000	28.224	5.370	0.060	0.036	0.965																														
93	62.544	6.492	9.000	28.284	5.370	0.061	0.036	0.965																														
94	62.465	6.479	9.000	28.257	5.370	0.061	0.036	0.965																														
95	63.272	6.546	9.000	28.310	5.370	0.062	0.036	0.965																														
96	63.406	6.524	9.000	28.287	5.369	0.062	0.036	0.965																														
97	63.146	6.536	9.000	28.195	5.369	0.061	0.036	0.965																														
98	63.508	6.483	9.000	28.402	5.369	0.063	0.037	0.965																														
99	63.473	6.635	9.000	28.217	5.369	0.062	0.037	0.965																														
100	63.025	6.355	9.000	28.302	5.368	0.062	0.036	0.965																														

100 Solutions found

## EK 10. OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN ÖRNEK BİR GRAFİK



Şekil Ek 10. *R. glutinis* var. *glutinis* NBRC 1125 suşu ile  $\beta$ -karoten üretiminde, istenen hedefe ulaşma oranının, fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ve sıcaklık ( $X_4$ ) ile değişimi ( $X_2=5$  g/L,  $X_3=6.0$ )

## **EK 11. TEZDEN TÜRETİLMİŞ BİLDİRİLER**

Mıdık, F., Bozdemir, M. T., Özbaş, Z. Y. 2017. “A Comparative Study on Beta-carotene Production of Some *Rhodotorula* Strains”, 10th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica, Sofya, Bulgaristan, 2017. (Oral Presentation)

Mıdık, F., Bozdemir, M. T., Özbaş, Z. Y. 2017. “Mikrobiyel karatenoid üretimi”, 10. Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya, 9-11 Kasım 2017. (Poster)

Mıdık, F., Bozdemir, M. T., Özbaş, Z. Y. 2016. “Mikrobiyel Fabrika Hücresi: *Rhodotorula glutinis*”, Türkiye 12. Gıda Kongresi, Edirne, 5-7 Ekim 2016. (Poster)