

Atf İçin: Berikten D, Hoşgün EZ, 2022. Ksiloz ve Gliserol Ortamlarında Çeşitli Mayaların Lipit Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 142-151.

To Cite: Berikten D, Hoşgün EZ, 2022. Determination of Lipid Production Capacities of Various Yeasts in Xylose and Glycerol Media. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 142-151.

Ksiloz ve Gliserol Ortamlarında Çeşitli Mayaların Lipit Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Derya BERİKTEN^{1*}, Emir Zafer HOŞGÜN²

ÖZET: Biyodizel, fosil yakıtlara alternatif ve çevre dostu bir yakıt olarak dikkatleri üzerine çekmektedir. Biyodizelin, mikrobiyal yağlardan sürdürülebilir ve düşük maliyetli karbon kaynaklarının kullanılması ile daha ekonomik olarak üretilebileceği düşünülmektedir. Atık veya yan ürün olarak sıklıkla karşımıza çıkan gliserol ve ksiloz mikrobiyal lipitlerin düşük maliyetli üretimi için uygun karbon kaynakları arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, yedi farklı maya türünden (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans*, *P. cactophila*, *Yarrowia lipolytica*) oluşan 12 maya izolatının tek karbon kaynağı olarak ksiloz veya gliserolü kullanma ve kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda lipit biriktirme yetenekleri karakterize edilmiştir. İzolatların tamamının test edilen üretim ortamlarında lipit üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak izolatlardan *Y. lipolytica* (%81.34) ve *P. fermentans* 1 (%79.11) ksiloz içeren fermentasyon ortamında, *P. fermentans* 2 (%98.90) ve *Y. lipolytica* (%94.62) ise gliserol içeren fermentasyon ortamında en yüksek lipit miktarı elde edilen türlerdir. Her iki üretim ortamında da lipit miktarında en yüksek sonuçlar *Y. lipolytica* izolatı ile elde edilmiştir. Sonuçlar, tüm izolatların gliserol ve ksiloz üzerinde büyüme kabiliyetine sahip olduğunu ve özellikle *Y. lipolytica*'nın ikinci nesil biyodizel üretimi için kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Maya, lipit, ksiloz, gliserol, fermentasyon, biyodizel

Determination of Lipid Production Capacities of Various Yeasts in Xylose and Glycerol Media

ABSTRACT: Biodiesel attracts attention as an alternative and environmentally friendly fuel to fossil fuels. It is thought that biodiesel can be produced more economically by using sustainable and low-cost carbon sources from microbial oils. Glycerol and xylose, which are frequently encountered as waste materials or by-products, are suitable carbon sources for the low-cost production of microbial lipids. 12 yeast isolates from seven yeast species (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans*, *P. cactophila*, *Yarrowia lipolytica*) were characterized for their ability to use xylose or glycerol as the sole carbon source and to accumulate lipid in a chemically defined medium. All of the isolates were found to be capable of producing lipids in the production mediums tested. However, *Y. lipolytica* (81.34%) and *P. fermentans* 1 (79.11%) of the isolates are the species with the highest lipid content in fermentation medium containing xylose, and *P. fermentans* 2 (98.90%) and *Y. lipolytica* (94.62%) in fermentation medium containing glycerol. obtained species. In both production media, the highest results in lipid content were obtained with *Y. lipolytica* isolate. The results showed that all isolates have the ability to grow on glycerol and xylose, and especially *Y. lipolytica* has the potential to be used for second generation biodiesel production.

Keywords: Yeast, lipid, xylose, glycerol, fermentation, biodiesel

¹ Derya BERİKTEN ([Orcid ID: 0000-0002-8672-4813](https://orcid.org/0000-0002-8672-4813)), Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kütahya, Türkiye

² Emir Zafer HOŞGÜN ([Orcid ID: 0000-0002-3810-701X](https://orcid.org/0000-0002-3810-701X)), Eskişehir Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Eskişehir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Derya BERİKTEN, e-mail: derya.berikten@ksbu.edu.tr

GİRİŞ

Biyodizel, düşük toksisitesi, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve motorlu taşıtlarda kullanıldığında egzoz gazında düşük konsantrasyonlarda küçük partikül madde ve SO₂ içermemesi nedeniyle alternatif ve çevre dostu bir yakıt olarak dikkatleri üzerine çekmiştir (Areesirisuk ve ark., 2015). Biyodizel üretmek için çeşitli mikrobiyal yağlar kullanılabilir. Günümüzde biyodizel, genellikle bitkisel yağlarda bulunan triaçilgliseridlerden (TAG'ler) üretilmektedir. Biyodizel, mikrobiyal yağlardan sürdürülebilir ve daha ekonomik olarak üretilirse, fosil yakıtların yerini daha kolay alabileceği düşünülmektedir (Thanapimmetha ve ark., 2019).

Bir yağ asidi bileşimi olan mikrobiyal lipitler, birinci nesil biyodizel üretimi için alternatif bir hammadde kaynağıdır (Chang ve ark., 2013). Heterojen mikroorganizmalar grubu olan lipit üreten mikroorganizmalara örnek olarak algler, bakteriler, küfler ve mayalar verilebilir. Lipit üretiminde küfler ve mayalar, farklı karbon kaynaklarından beslenebildikleri ve büyüme sürelerinin kısa olması nedeniyle bu mikroorganizmalar arasında yaygın olarak tercih edilmektedir (Ma ve ark., 2018). Karmaşık kimyasal bileşime sahip lipitlerin kimyasal bileşimleri, mikrobiyal türlere ve büyüme koşullarına bağlıdır. Palmitik, stearik, oleik ve linoleik asitler, mikrobiyal lipitlerde bulunan tipik yağ asitleridir (Doan ve ark., 2021).

Mikrobiyal lipitlerin üretimi için düşük maliyetli karbon kaynaklarının kullanılması, üretim maliyetin düşürülmesi açısından önemlidir. Bu sayede yenilenebilir enerji üretimi, fosil yakıt üretimi ile rekabet edebilir hale gelebilecektir (Hashem ve ark., 2021). Son yıllarda lignoselülozik biyorafineri sayısının artmasıyla birlikte mikrobiyal lipit üretimi için lignoselülozik hidrolizatlar, ham gliserol, melas, atık pişirme yağı, atık su ve hayvan veya bitki yemi atıkları gibi düşük maliyetli substratların değerlendirilmesi önem kazanmıştır (Díaz-Fernández et al 2019). Ayrıca, biyo-dizel ve oleokimyasal üretim tesisleri ile biyo-etanol ve/veya alkollü içecek üretim tesisleri tarafından önemli miktarlarda gliserol içeren su atık olarak üretilebilmektedir. Bu nedenle, ham gliserol, miktarı giderek artan, ilgi çekici bir endüstriyel atık haline gelmiştir (Diamantopoulou ve ark., 2020). Ksiloz ve glikoz doğal ortamlarda yaygın olarak bulunan, lignoselülozik biyokütlenin ve yenilenebilir hammadde kaynağı olan selüloz ile hemiselülozun hidrolizi sonucu açığa çıkan temel şekerlerdir. Ayrıca, bu şekerler düşük maliyetli olmaları nedeniyle sıvı yakıt üretimi için alternatif hammadde kaynağıdır. Şekerleri lipitlere dönüştürmek için düşük maliyetli işlemler tercih edilmektedir (Yamada ve ark., 2017). Bu karbonhidratlar, topraktan veya diğer doğal kaynaklardan izole edilen yağ üreticisi mayalar tarafından fermente edilerek bileşimi bitkisel yağ benzeyen ve biyodizele dönüştürülebilir bazı mikrobiyal yağları üretmek için kullanılabilirler (Pan ve ark., 2009; Li ve ark., 2011).

Son yıllarda, genetik stabilite, çevresel adaptasyon ve özel biyoteknolojik nitelikler gibi önemli özelliklere sahip olmalarından dolayı lipit üretimi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik üretim süreçlerinde farklı ortamlardan izole edilen yeni mayalara olan ilgi önemli ölçüde artmıştır (Maina ve ark., 2017; Filippousi ve ark., 2019). Ayrıca bu yabancı tip mayalarla çeşitli fermantasyon süreçlerinde elde edilen ilginç sonuçlar (Berikten ve ark., 2021; Filippousi ve ark., 2019; Taccari ve ark., 2012), yeni izole edilen mayalarla yapılan tarama çalışmalarının lipit üretimi açısından çok önemli olduğunu düşündürmektedir. Son birkaç yılda, lipit üreticisi mayalar tarafından gliserol veya ksilozdan lipit birikimine odaklanan makaleler yayınlanmıştır (Diamantopoulou ve ark., 2020; Díaz-Fernández ve ark., 2019; Yamada ve ark., 2017; Sriwongchai ve ark., 2013), ancak yeni izole edilmiş yağ üreticisi maya türlerinin bu iki substratta karşılaştırmalı taramasına ilişkin sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, biyodizel endüstrisinin bir yan ürünü olan gliserol ve lignoselülozik biyorafineri yan ürünü olan ksilozun biyodizel üretiminde kullanılabilirliğinin artırılmasına yönelik olarak bu ucuz karbon

kaynaklarını metabolize ederek lipit üretme potansiyeli olan yeni türlerin tespit edilmesi için yabancı tip mayaların taranması ve lipit üretimlerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Mikroorganizmalar

Bu çalışmada çeşitli boza örneklerinden izole edilmiş olan ve önceki bir çalışmamızda (Berikten ve ark., 2021) ITS ve 26S rDNA'nın D1/D2 bölgelerinin dizilenmesi yoluyla tanımlanan 12 maya izolatu (*Rhodotorula mucilaginosa* 1-2-3-4, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* 1-2-3, *Pichia cactophila*, *Yarrowia lipolytica*) kullanılmıştır.

Mayaların gliserol ve ksiloz ortamında yağ üretim potansiyellerinin taranması

Maya izolatları, Sudan Black B boyama tekniği (Kitcha ve Cheirsilp, 2011) ile kalitatif analiz yoluyla tek karbon kaynağı olarak gliserol veya ksiloz içeren katı besiyerinde gelişen kolonilerinden lipit üretme yetenekleri açısından taranmıştır. Taze maya kültürleri, gliserol petripleri [g/L. Yeast nitrogen base amino asitler, ammonium sulfate içermeyen (YNB w/o aa-AS) - 1.67, gliserol - 50, NH₄NO₃ - 5, agar - 20] (Sriwongchai ve ark., 2013) ve ksiloz petripleri [g/L: ksiloz - 20, (NH₄)₂SO₄ - 5, KH₂PO₄ - 1, MgSO₄·7H₂O -0.5, yeast extract - 0.5, Agar - 20] (Pan ve ark., 2009) üzerine bir öze dolusu ekilmiştir. Petri kapları 30 °C'de iki gün inkübe edildikten sonra her iki ortamda büyüyen maya kültürlerinden hazırlanan preparatlar Sudan Black B tekniği ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar, faz kontrast mikroskopunda 100X'lik objektif altında incelenmiştir. Hücre içinde mavi veya grimsi renkli lipit globüllerinin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif sonuç alınan maya suşları lipit üretimi için kullanılmıştır.

Lipit üretimi

İnokulum kültür, Yeast Ekstrakt Pepton Dekstroz (YPD) agar üzerindeki geliştirilen maya kolonilerden bir öze dolusu hücre alınıp 125 ml YPD broth'a (inokulum ortamı) aktarılacak ve 150 rpm, 28 °C'de 72 saat inkübe edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum kültürlerinden 1 mL, gliserol fermentasyon ortamı [g/L. Yeast nitrogen base amino asitler, ammonium sulfate içermeyen (YNB w/o aa-AS) - 1.67, gliserol - 50, NH₄NO₃ - 5] (Sriwongchai ve ark., 2013) ve ksiloz fermentasyon ortamı [g/L: ksiloz - 40, (NH₄)₂SO₄ - 5, KH₂PO₄ - 1, MgSO₄·7H₂O -0.5, yeast extract - 0.5] (Pan ve ark., 2009) olarak hazırlanan 50 şer mL'lik ortamlara ilave edilmiştir. Karışımlar 28 °C'de 180 rpm'de çalkalanarak 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar Merck Millipore'dan satın alınmıştır. Hücre kuru ağırlığı, lipit ekstraksiyonu ile lipit kuru ağırlığı ve fermentasyon sonrasında besiyerinde kalan gliserol ve ksiloz konsantrasyonu tayini aşağıdaki yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Maya kuru ağırlığının belirlenmesi

Kültürlerin 2 mL'si 5000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet iki kez 5 mL distile su ile yıkanmıştır ve 60 °C'de sabit ağırlığa gelene kadar (yaklaşık olarak 24 saat) kurutulmuştur. Kuru hücre ağırlığı gravimetrik olarak belirlenmiştir (Pan ve ark., 2009).

Lipit bileşiklerinin ekstraksiyonu

Toplam lipitler, tam lipit ekstraksiyonuna izin veren hızlı bir prosedür ile elde edilmiştir. 50 mL hücre kültürleri 5000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Maya peletleri iki kez distile su ile yıkandıktan sonra, içerisine 10 mL 4 M HCl ilave edilerek 60 °C'de 1-2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra asitle hidrolize edilmiş maya peletleri, 20 mL kloroform/metanol solüsyonu (1:1) ile oda sıcaklığında 2-3 saat karıştırılmıştır. Karışımlar, sulu ve organik fazları ayırmak için 2000xg'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

Lipitleri içeren alt fazlar, bir pastör pipeti ile alınarak kurumaya bırakılmıştır. Kuru lipit ağırlığı gravimetrik olarak belirlenmiştir (Pan ve ark., 2009).

Gliserol ve ksiloz konsantrasyonunun belirlenmesi ve lipit üretim parametrelerinin hesaplanması

Kültür ortamındaki kalan gliserol ve ksiloz konsantrasyonu yüksek basınç sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ile miktarlarının belirlenmesi çalışmalarında dörtlü pompa, refraktif indeks dedektör, otomatik enjeksiyon ünitesi ve kolon fırınından oluşan Agilent 1100 serisi HPLC sistemi kullanılmıştır. Analizler 60 °C de Aminex HPX 87H kolonda (300 mm x 7.8 mm, Biorad, Hercules/USA) gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL dir. Hareketli faz olarak 0,6 mL/dk akış hızında 0.005 M H₂SO₄ kullanılmıştır. Analiz süresi toplam 60 dakikadır. Gliserol (Sigma Aldrich, %99) standardı 0.2-8 mg/mL derişim aralığında, ksiloz (Sigma Aldrich, %99) standardı ise 0.2-4 mg/mL derişim aralığında hazırlanarak kalibrasyon doğruları hazırlanmış ve bu kalibrasyon doğrularına bağlı olarak örneklerin gliserol ve ksiloz derişimleri hesaplanmıştır (Sluiter ve ark., 2008).

Besiyerinde kullanılmadan kalan ksiloz ve gliserol miktarları kullanılarak mikroorganizmaların metabolize ettikleri ksiloz ve gliserol miktarları hesaplanmıştır. Biyokütle (g/L) ve lipit miktarı (g/L) ile bu sonuçlar kullanılarak lipit yüzdeleri hesaplanmıştır. Lipit miktarı (g/L)x1 g gliserol/ kalan gliserol miktarı (g/L) ve lipit miktarı (g/L)x1 g ksiloz/ kalan ksiloz miktarı (g/L) kullanılarak lipit verimi hesaplanmıştır.

İstatiksel Analiz

Mikrobiyal lipit üretiminde yapılan analizlerin sonuçları en az üç deneyin ortalaması olarak ve standart sapmaları (\pm) ile birlikte verilmiştir. Yöntemlerin ve uygulanan proseslerin karşılaştırılmasında alınan verilere, Statgraphics 3.1 istatistik programı kullanılarak tekyönlü ANOVA testi uygulanmış ve gruplar arasındaki farklılıkların anlamlılık testleri, $\alpha=0.95$ güven aralığında en küçük anlamlı fark (Least Significant Differences) testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

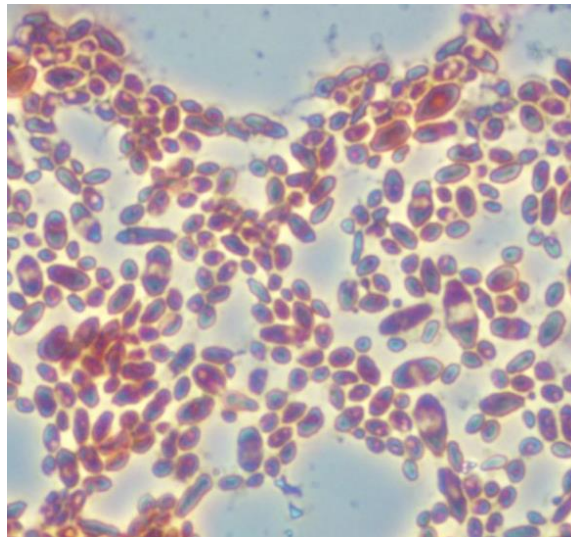
Yağ üreticisi mayaların belirlenmesi

Maya izolatları gliserol ve ksiloz içeren katı besiyeri ortamda geliştirildikten sonra ve lipit üreten türlerin seçilmesi için Sudan Black B boyaması yapılmıştır. Sudan Black B boyaması sonucunda (Şekil 1) test edilen 12 maya izolatının tamamının her iki ortamda da lipit ürettikleri belirlenmiştir (Çizelge 1). Gerçekleştirilen boyama yöntemine göre *Rhodotorula mucilaginosa* 2 ksiloz ortamı için *Pichia fermentans* 3 ve *Yarrowia lipolytica* ise gliserol ortamı için hücreleri içerisinde en çok lipit damlası gözlenen türler olarak belirlenmiştir. Bu teknik, hücresel lipit içeriği hakkında kesin bir bilgi vermese de kısmen test edilen maya kolonilerinin lipit biriktirme yeteneği hakkında hızlı bir şekilde fikir sahibi olunmasını sağlamaktadır. Kitcha ve Cheirsilp (2011) yapmış oldukları çalışmada 889 adet maya izolatının lipit üretim yeteneğine sahip olup olmadıklarını Sudan Black B boyaması ile belirlemişler ve 23 izolatın potansiyel lipit üreticisi olduklarını ortaya koyarak bizim çalışmamızda olduğu gibi hızlı bir tarama gerçekleştirmişlerdir.

Çizelge 1. Sudan Black B boyama ile lipit üretiminin değerlendirilmesi

Maya türü	Yağ damlaları/Ksiloz ortamı	Yağ damlaları/Gliserol ortamı
<i>Pichia fermentans</i> 1	++	+
<i>Pichia fermentans</i> 2	+/-	++
<i>Pichia fermentans</i> 3	++	+++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	++	++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	+++	++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 4	+	++
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+/-	+
<i>Clavispora lusitaniae</i>	++	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+++
<i>Pichia cactophila</i>	+	++

(Not: hücre içerisindeki yağ damlacıklarının yoğunluğu +/- nadir, + sınırlı, ++ az yoğun, +++ çok yoğun)

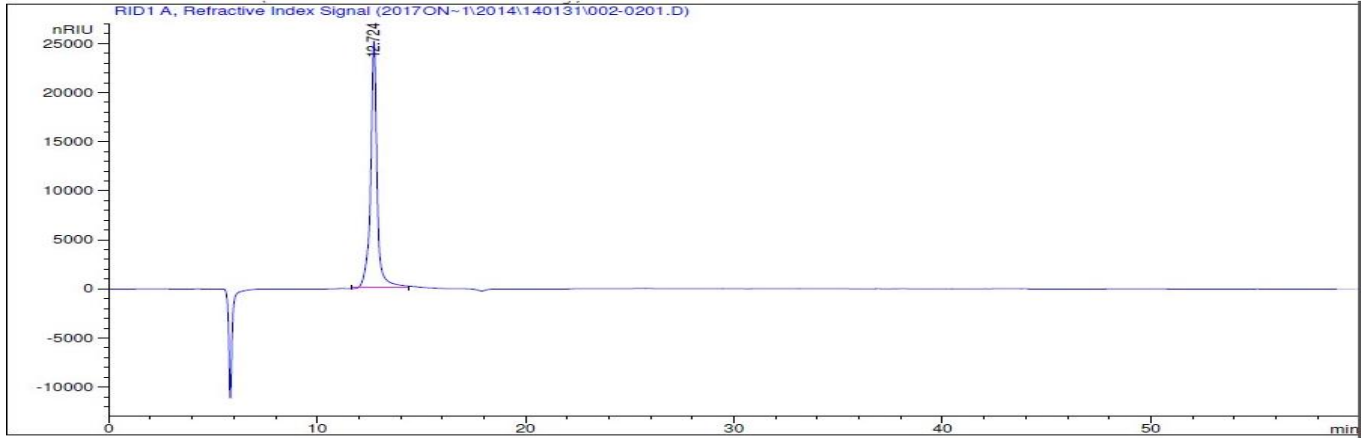


Şekil 1. *Pichia cactophila*'nın gliserol ortamında lipit üretiminin Sudan Black B boyama ile mikroskopik görüntüsü [Faz kontrast mikroskopu (Nikon Eclipse 80i) ve immersiyon objektifi (100x)]

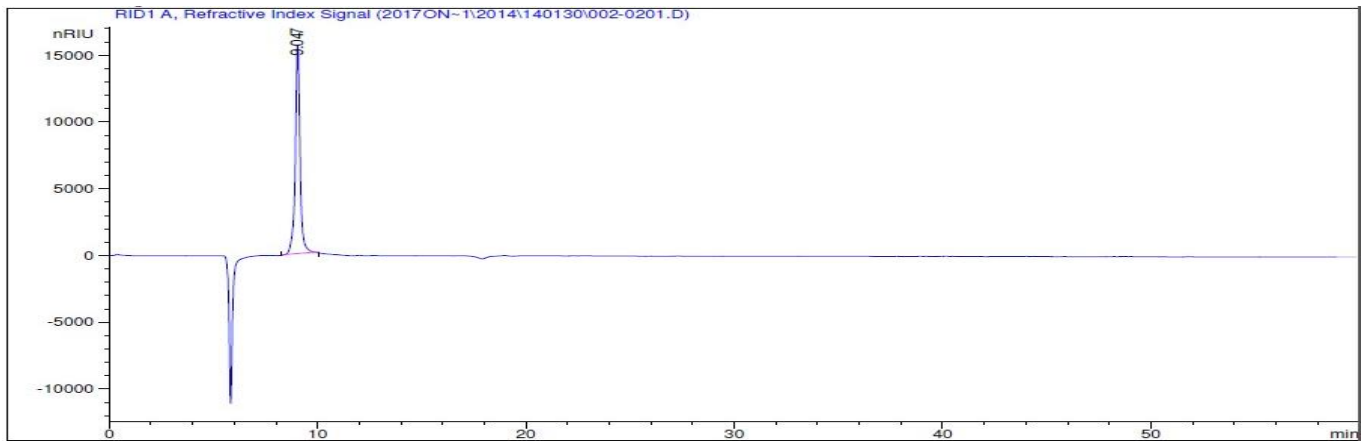
Lipit üretiminin değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan 12 maya izolatının lipit taraması ile tamamının her iki ortamda da lipit ürettiklerinin belirlenmesi sonucunda lipit üretiminin karakterizasyonu için fermantasyon ortamlarına gelişimleri ile hazırlanmış olan hücreler kullanılarak lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir maya kültürü iki farklı besiyeri ortamından elde edilen hücrelerin biyokütleleri, lipit yüzdeleri, lipit içeriği ve lipit verimi dahil olmak üzere Çizelge 2-3'te listelenen bir dizi parametre için karakterize edilmiştir.

Lipit üretimi sonrasında hücrelerin ayrılması neticesinde arta kalan besiyeri numunelerinde kalan gliserolün ve ksilozun analizi NREL metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Gliserol ve ksiloz standartları için elde edilen HPLC kromatogramları ve kalibrasyon denklemleri Şekil 2 ve 3'te verilmiştir. HPLC ile elde edilen sonuçlara göre besiyeri içerisinde mikroorganizmaların metabolize etmedikleri ksiloz ve gliserol miktarları belirlenmiştir. Mikroorganizmaların kullandıkları ksiloz ve gliserol miktarı, lipit kuru ağırlığı ve maya kuru ağırlıkları kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve Çizelge 2'de ksiloz fermantasyon ortamında, Çizelge 3'te ise gliserol fermantasyon ortamında üretilen tüm suşların biyokütle ve lipit karakterizasyon parametreleri verilmiştir.



Şekil 2. Gliserol standartı için HPLC kromatogramı (Gliserol RT=12.7, kalibrasyon denklemi $y=199317x - 7851$)



Şekil 3. Ksiloz standartı için HPLC kromatogramı (Ksiloz RT=9.05, kalibrasyon denklemi $y=229300x - 3288$)

Lignoselülozik malzemelerin hidrolizinin birincil bileşeni olan ksilozun lipit üretiminde kullanımı, ksilozun tam olarak metabolize edilememesinden dolayı araştırılması devam eden önemli bir sorun haline gelmiştir. Yağ üreticisi mayalar, ksiloz ve glikozu aynı anda kullanabildikleri için endüstriyel uygulamalarda önemli beklentilere sahiptirler (Pan ve ark., 2009). İzolatlardan *Yarrowia lipolytica* (%81.34) ve *Pichia fermentans* 1 (%79.11) ksiloz içeren fermentasyon ortamında en yüksek lipit yüzdesi elde edilen türlerdir. Tarama ile lipit üretimleri belirlenen 12 maya izolatından ksiloz fermentasyon ortamında az veya çok lipit eldesinin gerçekleştirilmiş olması taramanın doğruluğunun göstergesidir. *Yarrowia lipolytica* 'dan %81.34 ile en yüksek lipit içeriği elde edilirken *Pichia fermentans* 2'den 0.84 g/L olarak en yüksek lipit verimi belirlenmiştir.

Dört günlük inkübasyon sonrasında besiyerinde kullanılmadan kalan ksiloz analizi yapılmıştır ve analiz sonucu çoğu mikroorganizmanın besiyerine ilave edilmiş olan ksilozun çok az kısmını kullanabildiklerini göstermiştir (Çizelge 2). Yalnızca *Clavispora lusitaniae* besiyerine konulan ksilozun büyük bir bölümünü (34.84g/L) kullanmıştır. Ancak, kullanılan ksilozu lipitlere dönüştürmede yüksek bir oran (%7.69) elde edilememiştir. İleride ksiloz ortamında lipit üretimi için seçilecek olan mayalarda yapılacak optimizasyon çalışmaları ile ksiloz kullanım oranının artırılabilirliği düşünülmektedir. Bunun yanında besiyeri ortamında fermentasyon sonrasında karbon kaynağının kalmış olması hücresel lipitlerin lipit dışı yapıların sentezinde henüz kullanılmadığını da göstermektedir (Fakas ve ark., 2007). Lipit katsayısına bakıldığında *Pichia fermentans* 1'in 0.79 g /g ksiloz ile en yüksek 1 g ksiloz başına üretilen lipit miktarını verdiği görülmüştür. Bu miktar benzer 20 yağ üreticisi mayanın ksiloz üzerindeki lipit

üretimlerinin karakterize edildiği bir çalışmada en yüksek lipit kat sayısı olarak elde edilen 0.15 g/g ksiloz miktarının oldukça üzerindedir (Pan ve ark., 2009).

12 izolattan *Pichia fermentans* 2 (%98.90) ve *Yarrowia lipolytica* (%94.62) gliserol içeren fermentasyon ortamında en yüksek lipit katsayısı ile yüksek lipit yüzde değeri elde edilen türlerdir. Çizelge 3, gliserol fermentasyon ortamında üretilen tüm suşların biyokütle ve lipit verim parametrelerini göstermektedir. Tarama ile lipit üretimleri belirlenen 12 maya izolatından elde edilen en düşük lipit yüzdesinin (%19.18) olması taramanın doğruluğunun göstergesidir. *Pichia fermentans* 2 'nin %98.90 lipit içeriği ve 12,86 g/L lipit verimi (12 g/L biyokütle) verdiği belirlenmiştir. Gliserol ortamında yüksek lipit birikimi ve ayrıca yüksek lipit verimi, atık ham gliserol ile yapılacak lipit üretim çalışmalarında *Pichia fermentans* 2'nin kullanılabilirliğini göstermiştir.

Gliserolden lipit üretiminde çalışmada test edilen mayaların kullanılabilirliğini göstermek için, çalışmanın lipit üretim sonuçları ile tek karbon kaynağı olarak ham gliserol kullanan diğer mikroorganizmalar karşılaştırılmıştır. *Yarrowia lipolytica* ATCC 20460'ın fermentasyondan sonra biyokütlesi, lipit içeriği ve lipit miktarı sırasıyla 11.6 g/L, %31 ve 3.6 g/L olarak belirlenmiştir (Sestric ve ark., 2014). Fermentasyondan sonra *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509'un biyokütlesi, lipit içeriği ve lipit miktarı sırasıyla 29.2 g/L, %26.0 ve 7.7 g/L olmuştur (Leiva-Candia ve ark., 2015). *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159'un biyokütlesi, lipit içeriği, lipit miktarı ve lipit verimi sırasıyla 8.17 g/L, %53, 4.3 g/L ve %7 dir (Saenge ve ark., 2011). 8 günlük fermentasyondan sonra *Trichosporon fermentans* ve *Trichosporon cutaneum*'un biyokütlesi, lipit içeriği, lipit miktarı ve lipit verimi sırasıyla 16.0 g/L, %32.4, 5.2 g/L, %16.5 ve 17.4 g/L, %32.2, 5.6 g/L, %17.0 olmuştur (Liu ve ark., 2017). Bu çalışmada kullanılan 12 izolatın biyokütle ve lipit verim parametreleri, yukarıdaki çalışmalardaki suşlarınkilere yakın veya daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu çalışmadaki suşlar ile tek karbon kaynağı olarak ham gliserolün kullanılacağı lipit üretim çalışmalarında üretim parametrelerinin optimizasyonu sonrasında verimli sonuçların alınabileceğini göstermiştir.

Çizelge 2. Ksiloz üretim ortamında lipit karakterizasyon sonuçları

Maya türü	Kuru hücre ağırlığı (mg)	Biyokütle (g/L)	Lipit kuru ağırlıkları (mg)	Lipit verimi (g/L)	Kullanılan ksiloz miktarı (g/L)	% lipit	Lipit katsayısı (g lipit/g ksiloz)
<i>Pichia fermentans</i> 1	2±0.14	1±0.07	34±1.94	0.79±0.05	1.00±0.09	79.11 ^b ±1.04	0.79 ^e ±0.026
<i>Pichia fermentans</i> 2	14±0.73	7±0.36	36±0.76	0.84±0.02	17.45±1.26	11.97 ^d ±0.37	0.05 ^c ±0.002
<i>Pichia fermentans</i> 3	10±0.53	5±0.27	27±0.86	0.63±0.02	19.80±0.65	12.57 ^d ±0.26	0.03 ^b ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	10±1.10	5±0.55	47±3.43	1.09±0.08	18.03±0.96	21.92 ^f ±0.82	0.06 ^{cd} ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	8±0.62	4±0.31	33±1.42	0.77±0.03	14.13±0.62	19.22 ^e ±0.66	0.054 ^{cd} ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3	7±0.70	3.5±0.35	34±2.99	0.79±0.07	14.95±1.23	22.61 ^f ±0.27	0.053 ^{cd} ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 4	15±0.50	7.5±0.25	39±1.87	0.91±0.04	14.38±0.91	12.09 ^d ±0.18	0.06 ^e ±0.001
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	9±0.65	4.5±0.32	3±0.33	0.07±0.01	17.65±0.78	1.55 ^a ±0.06	0.004 ^a ±0.0001
<i>Clavispora lusitaniae</i>	26±0.83	13±0.42	43±2.37	1±0.06	34.84±1.46	7.69 ^c ±0.18	0.03 ^b ±0.001
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4±0.22	2±0.11	22±1.96	0.51±0.05	4.42±0.30	25.55 ^e ±0.87	0.12 ^f ±0.002
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2±0.05	1±0.03	35±2.38	0.81±0.06	13.80±0.52	81.34 ^b ±3.34	0.06 ^{cd} ±0.002
<i>Pichia cactophila</i>	14.6±1.12	7.3±0.56	11±0.44	0.26±0.01	18.46±1.02	3.51 ^b ±0.3	0.01 ^a ±0.0001

Not: ortalama değerler ± standart sapmaları ile verilmiştir. Aynı parametrenin farklı etkilerindeki farklı harfler ortalama değerler arasında anlamlı bir (p<0.05) fark olduğunu göstermektedir.

Yağ üreticisi mayalar tek hücre yağlarının (SCO) üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu biyoproseslerin ekonomik hale getirilmesi, karbon veya azot kaynakları olarak sıfır veya negatif değerli atık substratların kullanımında daha elverişli hale gelmektedir. Çalışmamızda kullanılan hem ksiloz hem de gliserol çeşitli üretim süreçlerinde ortaya çıkan değerli atıklar arasında yer almaktadır. Lipit yüzdeleri açısından değerlendirildiğinde her iki üretim ortamında da en yüksek sonuçlar *Yarrowia lipolytica* izolatu ile elde edilmiştir. *Y. lipolytica* türünün yağ üreticisi (oleaginous) olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Sestric ve ark., 2014; Ageitos ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar hem bunu doğrulamış hem de bu mikroorganizma ile karbon kaynağı olarak ksiloz ve gliserol içeren ortamlarda gerçekleştirilecek lipit üretim çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

Çizelge 3. Gliserol üretim ortamında lipit karakterizasyon sonuçları

Maya türü	Kuru hücre ağırlığı (mg)	Biyokütle (g/L)	Lipit kuru ağırlıkları (mg)	Lipit verimi (g/L)	Kullanılan gliserol miktarı (g/L)	% lipit	Lipit katsayısı (g lipit/g gliserol)
<i>Pichia fermentans</i> 1	27±0.67	13.5±0.34	52±1.66	2.97±0.10	27.13±0.95	22.01 ^{abc} ±0.15	0.11 ^a ±0.0003
<i>Pichia fermentans</i> 2	24±1.85	12±0.92	225±15.30	12.86±0.87	16.82±0.74	107.19 ^b ±0.97	0.76 ^d ±0.018b
<i>Pichia fermentans</i> 3	19±1.05	9.5±0.52	60±3.42	3.43±0.20	12.80±0.87	36.09 ^e ±0.07	0.27 ^b ±0.003
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	13±0.59	6.5±0.29	56±2.24	3.2±0.13	7.37±0.55	49.24 ^f ±0.25	0.44 ^c ±0.015
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	26±1.17	13±0.59	59±6.49	3.37±0.37	12.35±0.93	25.88 ^c ±1.69	0.27 ^b ±0.01
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3	25±1.75	12.5±0.88	42±3.74	2.4±0.21	17.94±1.61	19.18 ^d ±0.37	0.13 ^a ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 4	21±2.31	10.5±1.16	56±3.08	3.2±0.18	13.27±0.70	30.60 ^a ±1.70	0.24 ^b ±0.001
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	31±0.84	15.5±0.42	63±2.71	3.6±0.15	32.89±1.25	23.22 ^{bc} ±0.37	0.11 ^a ±0.001
<i>Clavispora lusitanae</i>	28±0.92	14±0.46	55±2.64	3.14±0.15	25.20±1.59	22.44 ^{abc} ±0.34	0.13 ^a ±0.002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27±0.89	13.5±0.45	49±4.31	2.8±0.25	20.93±1.32	20.72 ^{ab} ±1.14	0.13 ^a ±0.003
<i>Yarrowia lipolytica</i>	6.80 ±0.68	3.40±0.34	56±1.18	3.20±0.07	1.84±0.15	94.62 ^e ±7.52	1.74 ^e ±0.107
<i>Pichia cactophila</i>	28±0.76	14±0.38	75±5.47	4.29±0.31	17.40±0.66	30.59 ^d ±1.41	0.25 ^b ±0.009

Not: ortalama değerler ± standart sapmaları ile verilmiştir. Aynı parametrenin farklı etkilerindeki farklı harfler ortalama değerler arasında anlamlı bir ($p<0.05$) fark olduğunu gösterir.

SONUÇ

Bu çalışmada, tek karbon kaynağı olarak gliserolu veya ksilozu metabolize eden yağ üreticisi mayaların belirlenmesi ve lipit üretimlerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Test edilen 12 maya suşunun tamamının potansiyel lipit üreticileri oldukları belirlenmiştir. Biyodizel endüstrisinin bir yan ürünü olan ham gliserol ve lignoselülozik biyorafineri yan ürünü olan ksilozun biyodizel üretiminde kullanılabilirliğin artırılması için bu karbon kaynaklarını metabolize ederek lipit üretme potansiyeli olan mikroorganizmaların taranması oldukça önemlidir. Potansiyel lipit üreticisi mayaların taranması, tanımlanması ve lipit üretiminin karakterizasyonu, mikrobiyal biyodizel üretiminin ilk aşamasıdır. Yabani tip mayalar kullanılarak yapılmış olan bu tarama çalışması ile bu iki ucuz karbon kaynağının katma değeri yüksek bir ürüne mikrobiyal dönüşümünün ilk ve en önemli basamağı gerçekleştirilerek, bu dönüşümde kullanılacak yeni türlerin tespitine çalışılmıştır. Ksiloz ve gliserolden lipit üretimini artırmak için, gelecekteki araştırmaların mayalar tarafından lipit üretimi için fermantasyon koşullarının optimizasyonu ve lipit üretici türlerin verimini arttırmak için mutogenez, genetik mühendisliği çalışmalarına yoğunlaşması gerektiğini düşünmekteyiz. Bu çalışmadan elde edilen tüm sonuçlar, biyodizel üretiminde kullanılacak mikrobiyal lipitleri sentezleyecek alternatif mikroorganizmaların

bulunması için yağ üreticisi mikroorganizmaların taranmasının önemli olduğunu ve çalışmada kullanılmış olan 12 maya suşunun bu anlamda potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG, 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1219-1227.
- Areesirisuk A, Yen TB, Chiu CH, Liu CH, Guo JH, 2015. Optimization on yeast lipid production of *psuedozyma* sp. with response surface methodology for biodiesel manufacturing. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 2(1): 13-18.
- Berikten D, Hoşgün EZ, Gökdal Otuzbiroğlu A, Bozan B, Kıvanç M, 2021. Lipid Production from Crude Glycerol by Newly Isolated Oleaginous Yeasts: Strain Selection, Molecular Identification and Fatty Acid Analysis. *Waste and Biomass Valorization*, 12: 5461–5470.
- Chang YH, Chang KS, Hsu CL, Chuang LT, Chen CY, Huang FY, Jang HD, 2013. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. *Fuel*, 105: 711-717.
- Diamantopoulou P, Filippousi R, Antoniou D, Varfi E, Xenopoulos E, Sarris D, Papanikolaou S, 2020. Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiology Letters*, 1;367(10): fnaa063.
- Díaz-Fernández D, Aguiar TQ, Martín VI, Romaní A, Silva R, Domingues L, Revuelta JL, Jiménez A, 2019. Microbial lipids from industrial wastes using xylose-utilizing *Ashbya gossypii* strains. *Bioresource Technology*, 293: 122054.
- Doan HT, Nguyen PTM, Tran TT, Nguyen TK, Tran MD, Nguyen DB, 2021. Optimizing lime pretreatment of rice straw for biolipid production using oleaginous microorganisms. *Chemosphere*, 269: 129390.
- Fakas S, Galiotou-Panayotou M, Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G, 2007. Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1321–1327.
- Filippousi R, Antoniou D, Tryfinopoulou P, Nisiotou AA, Nychas GJ, Koutinas AA, Papanikolaou S, 2019. Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid. *Journal of Applied Microbiology*, 127(4): 1080-1100.
- Hashem AH, Suleiman WB, Abu-Elrish GM, El-Sheikh HH, 2021. Consolidated Bioprocessing of Sugarcane Bagasse to Microbial Oil by Newly Isolated Oleaginous Fungus: *Mortierella wolfii*. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1): 199-211.
- Kitcha S, Cheirsilp B, 2011. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as carbon source. *Energy Procedia*, 9: 274-282.
- Leiva-Candia DE, Tsakona S, Kopsahelis N, Garcia IL, Papanikolaou S, Dorado MP, Koutinas AA, 2015. Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for

- integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource Technology*, 190: 57–65.
- Li S, Feng S, Li Z, Xu H, Yu Y, Qiao D, Cao Y, 2011. Isolation, identification and characterization of oleaginous fungi from the soil of Qinghai Plateau that utilize D-xylose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(15): 2075-2081.
- Liu L, Hu Y, Lou W, Li N, Wu H, Zong M, 2017. Use of crude glycerol as sole carbon source for microbial lipid production by oleaginous yeasts. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 182: 495–510.
- Ma Y, Gao Z, Wang Q, Liu Y, 2018. Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges. *Bioresource technology*, 263: 631-641.
- Maina S, Pateraki C, Kopsahelis N, Paramithiotis S, Drosinos EH, Papanikolaou S, Koutinas AA, 2017. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. *Engineering in Life Sciences*, 17: 333–344.
- Miao Z, Tian X, Liang W, He Y, Wang G, 2020. Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production. *Renewable Energy*, 161: 91-97.
- Pan LX, Yang DF, Shao L, Li W, Chen GG, Liang ZQ, 2009. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food technology and Biotechnology*, 47(2): 215-220.
- Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T, 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46: 210–218.
- Sestric R, Munch G, Cicek N, Sparling R, Levin DB, 2014. Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource Technology*, 164: 41–46.
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, 2008. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. laboratory analytical procedure (LAP), Technical Report NREL/TP-510-42623.
- Sriwongchai S, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Bajwa KP, Lee H, 2013. Screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains. *Journal of Microbiology. Biotechnology and Food Sciences*, 2(5): 2344-2348.
- Taccari M, Canonico L, Comitini F, Mannazzu I, Ciani M, 2012. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technology*, 110: 488-495.
- Thanapimmetha A, Peawsuphon N, Chisti Y, Saisriyoot M, Srinophakun P, 2019. Lipid production by the yeast *Lipomyces starkeyi* grown on sugars and oil palm empty fruit bunch hydrolysate. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 209715996: 1-14.
- Yamada R, Yamauchi A, Kashihara T, Ogino H, 2017. Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis. *Biochemical Engineering Journal*, 128: 76-82.