

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ GIDA ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN MAYALARDAN LİPİT
ÜRETİMİ

Tezi Hazırlayan
Mehmet Ali BOZKURT

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Eylül 2021
NEVŞEHİR

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ GIDA ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN MAYALARDAN LİPİT
ÜRETİMİ

Tezi Hazırlayan
Mehmet Ali BOZKURT

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Eylül 2021
NEVŞEHİR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK'e, Öğr. Gör. Dr. Enver Ersoy ANDEDEN'e,

Aynı dönemde laboratuvarıda beraber çalıştığım arkadaşlarım İdris İŐNEL, Mustafa AKAR ve Mustafa GÜLTEKİN'e teşekkür ederim.

Ayrıca bugünlere gelmemi sağlayan aileme, hayatımı anlamlı kılan ve desteğini her an yanımda hissettiğim sevgili eşim İpek BOZKURT'a ve değerli zamanlarını çaldığım kızım Beril Elif'e ve oğlum Berken Deniz'e şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, ABAP20F36 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu tezin gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

ÇEŞİTLİ GIDA ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN MAYALARDAN LİPİT ÜRETİMİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Mehmet Ali BOZKURT

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2021

ÖZET

Biyodizel, biyolojik olarak parçalanabilen, yenilenebilir ve toksik olmayan alternatif bir yakıttır. Biyodizel üretiminde temel hammaddenin bitkisel yağlar olması ve bu yağların özellikle tarım ürünlerinden elde edilmesi, biyodizel üretimini kısıtlamaktadır. Biyodizel üretiminde tarım ürünleri dışında farklı kaynakların kullanılması, hem biyodizel üretiminde devamlılığı sağlayacak hem de gıda bitkilerinin enerji sektöründe heba edilmesini önleyecektir. Bu çalışmanın amacı, çeşitli gıda örneklerinden izole edilmiş maya türlerinin lipit içeriği, lipit verimi ve yağ asidi profili bakımından biyodizel üretim potansiyellerini belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda; çalışmada çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen 8 adet maya izolatu, pH 5,5, 30 °C sıcaklık 100 rpm (çalkalama hızı) ve 24 saat sürede hem optimal besiyerinde (azot varlığında) hem de lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu) inkübe edilerek lipit verimi ve % lipit miktarı bakımından karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada en yüksek % lipit miktarı ve lipit verimine sahip olan B37 ve B53 kodlu izolatlar sırasıyla *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae* türleri olarak DNA düzeyinde tanımlanmıştır. Tür tanımlaması yapılan *Pichia kudriavzevii* B37 ve *Saccharomyces cerevisiae* B53 suşlarına 30 °C sıcaklık 100 rpm ve 72 saat boyunca farklı pH (6-8-10) değerlerinde azot yokluğu stresi uygulanmıştır. *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolatu pH 6'da % 34,4 olarak en yüksek % lipit miktarına, pH 8'de ise 261,37 mg/L/gün olarak en yüksek lipit verimine sahip olduğu görülmüştür. *Saccharomyces*

cerevisiae B53 kodlu izolatın pH 10'da % 44,3 olarak en yüksek % lipit miktarına ve 730,60 mg/L/gün olarak en yüksek lipit verimine sahip olduğu görülmüştür. Maya hücrelerinden ekstre edilen lipitler transesterifikasyona uğratarak elde edilen metil esterleri gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir. *Pichia kudriavzevii* olduğu belirlenen B37 ve *Saccharomyces cerevisiae* olduğu belirlenen B53 kodlu izolatların kuru biyokütlesinden ekstre edilen lipitlerin transesterifikasyonu sonucunda sırasıyla % 96,02 ve % 96,28 oranında biyodizel verimi elde edilmiştir.

Pichia kudriavzevii B37 ve *Saccharomyces cerevisiae* B53 kodlu izolatların yağ asidi dağılımı *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolat için palmitik asit (% 15,61), palmitoleik asit (% 9,73), stearik asit (% 15,52), oleik asit (% 37,14) ve linoleik asit (% 14,96) olarak bulunmuştur. *Saccharomyces cerevisiae* B53 kodlu izolatta ise palmitik asit (% 12,00), palmitoleik asit (% 41,49), stearik asit (% 9,62) ve oleik asit (% 33,17) olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan *Pichia kudriavzevii* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerinin yüksek lipit içeriğine ve lipit verimine sahip olmasının yanı sıra elde edilen lipitlerin büyük bölümünün C16 ve C18 metil esterlerinden oluşması bu mayaların sentezlediği lipitlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Maya, Biyodizel, Mikrobiyal Lipit, Pichia kudriavzevii,*

Saccharomyces cerevisiae

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Sayfa Adeti: 57

LIPID PRODUCTION OF YEASTS ISOLATED FROM SOME FOOD PRODUCTS

(M. Sc. Thesis)

Mehmet Ali BOZKURT

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

September 2021

ABSTRACT

Biodiesel is a biodegradable, renewable and non-toxic alternative fuel. The fact that the basic raw material in biodiesel production is vegetable oils and that these oils are obtained from agricultural products, limits the production of biodiesel. The use of different sources other than agricultural products in biodiesel production will both ensure continuity in biodiesel production and prevent food crops from being wasted in the energy sector. The aim of this study is to determine the biodiesel production potential of yeast strains isolated from various food samples in terms of lipid content, lipid yield and fatty acid profile. In accordance with this purpose; In this study, 8 yeast isolates isolated from various food products were incubated at pH 5,5, 30 °C temperature 100 rpm (shaking speed) and 24 hours both in optimal medium (in the presence of nitrogen) and in lipid production medium (lack of nitrogen) to increase lipid yield and Compared in terms of % lipid content.

In this study, B37 and B53 coded isolates with the highest lipid content and lipid yield were identified at the DNA level as *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* species, respectively. Nitrogen deficiency stress was applied to *Pichia kudriavzevii* B37 and *Saccharomyces cerevisiae* B53 strains, which were identified as species, at 30 °C temperature, 100 rpm and different pH (6-8-10) values for 72 hours. *Pichia kudriavzevii* B37 coded isolate was found to have the highest lipid content of 34,4% at pH 6, and the highest lipid yield at pH 8 as 261,37 mg/L/day. It was observed that *Saccharomyces*

cerevisiae B53 coded isolate had the highest lipid content of 44,3% at pH 10 and the highest lipid yield of 730,60 mg/L/day. The methyl esters obtained by transesterification of lipids extracted from yeast cells were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry. As a result of the transesterification of lipids extracted from the dry biomass of B37 coded isolates, which were determined to be *Pichia kudriavzevii* and B53 coded isolates, which were determined to be *Saccharomyces cerevisiae*, biodiesel yields of 96,02% and 96,28% were obtained, respectively.

Fatty acid distribution of isolates coded *Pichia kudriavzevii* B37 and *Saccharomyces cerevisiae* B53 For isolate coded *Pichia kudriavzevii* B37 palmitic acid (15,61%), palmitoleic acid (9,73%), stearic acid (15,52%), oleic acid (37%) ,14) and linoleic acid (14,96%). Palmitic acid (12,00%), palmitoleic acid (41,49%), stearic acid (9,62%) and oleic acid (33,17%) were found in *Saccharomyces cerevisiae* isolate coded B53. The fact that *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* species used in the study have high lipid content and lipid yield, as well as the fact that most of the lipids obtained are composed of C16 and C18 methyl esters showed that the lipids synthesized by these yeasts have the potential to be used as raw materials in the production of biodiesel.

Keywords: *Yeast, Biodiesel, Microbial Lipid, Pichia kudriavzevii,*

Saccharomyces cerevisiae

Thesis Advisor: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Number of Pages: 57

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	I
TEZ BİLDİRİM SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XII
RESİMLER LİSTESİ.....	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	XIV
1. BÖLÜM	
GİRİŞ.....	1
2. BÖLÜM	
2.1. Mayalar.....	3
2.2. Mikrobiyal Yağlar.....	5
2.3. Biyodizel Nedir?.....	6
2.3.1. Biyodizelin Çevresel Özellikleri.....	7
2.3.2. Biyodizel Üretim Süreçleri.....	8
2.3.3. Dünya’da ve Türkiye’de Biyodizel.....	9
3. BÖLÜM	
MATERYAL ve YÖNTEM	
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	11
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	12

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Gıda Örnekleri.....	12
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Besiyeri Hazırlanması.....	13
3.2.2. Örnek Alımı ve İzolasyon.....	13
3.2.3. Alınan Örneklerin Gram Boyama İşlemi.....	13
3.2.4. İzolatların Mikroskopta İncelenmesi.....	14
3.2.5. Çalışmada Kullanılacak Maya Kültürlerinin Üretimi Ve Saklanması	14
3.2.6. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	15
3.2.7. Optimal Besiyeri	15
3.2.8. Lipit Üretim Besiyeri.....	15
3.3. Azot Yokluğu Stresinin Uygulanması.....	15
3.4. Biyokütle Veriminin Saptanması.....	16
3.5. Toplam Lipit Miktarının Saptanması.....	17
3.6. Lipit Veriminin Saptanması.....	17
3.7. Moleküler Tanımlama.....	18
3.8. Moleküler Tanımlaması Yapılan B37 ve B53 Kodlu İzolatlara Farklı pH'larda Azot Yokluğu Stresi Uygulanması.....	19
3.9. Yağ Asidi Analizi.....	19
4. BÖLÜM	
BULGULAR	
4.1. İzolatların Kaynakları.....	21
4.2. Maya İzolatları.....	21
4.3. İzolatların Gram Boyaması ve Mikroskobik Tanımlama.....	21

4.4. Azot Yokluğu Stresi Altında Maya İzolatlarının Lipit Verimi Bakımından Seçilimi.....	22
4.5. Moleküler Tanımlama Sonuçları.....	24
4.6. B37 ve B53 Kodlu İzolatlara Farklı pH'larda Azot Stresi Uygulama Sonuçları	25
4.7. Yağ Asidi Analiz Sonuçları.....	25
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	27
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	41

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Dünya’da biyodizel üretimi.....	10
Tablo 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar.....	11
Tablo 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar.....	12
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan optimal besiyeri içeriği.....	15
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyeri içeriği.....	15
Tablo 3.5. Moleküler tanımlama konsantrasyon değerleri.....	18
Tablo 4.1. İzolatların kodları ve izole edildikleri gıda kaynakları.....	21
Tablo 4.2. İzolatların biyokütle verimleri, % lipit miktarları ve lipit verimleri.....	23
Tablo 4.3. B37 - ITS1 - ITS4: <i>Pichia kudriavzevii</i>	24
Tablo 4.4. B53 - ITS1 - ITS4: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Tablo 4.5. B37 ve B53 kodlu izolatların farklı pH değerlerinde biyokütle verimi, toplam lipit miktarı, % lipit miktarı ve lipit verimi.....	25
Tablo 4.6. <i>Pichia kudriavzevii</i> B37’den ekstre edilen yağ asitlerinin transesterifikasyon sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı.....	26
Tablo 4.7. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> B53’den ekstre edilen yağ asitlerinin transesterifikasyon sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı.....	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Biyodizel üretim yöntemleri.....8



RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. Gram boyama yapılan izolatlar.....	14
Resim 4.1. B37 Kodlu izolatın mikroskop görüntüsü.....	22
Resim 4.2. B53 Kodlu izolatın mikroskop görüntüsü.....	22



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	Yüzde
BEPA	Biyokütle Enerjisi Potansiyeli Atlası
YAME	Yağ asidi metil esteri
µg	Mikrogram
mg	Miligram
L	Litre
g	Gram
mL	Mililitre
TAG	Triaçilgliserol
µL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
Rpm	Revolutions Per Minute/ dakikada devir sayısı
CH₄	Metan
KOH	Potasyum hidroksit
NaOH	Sodyum hidroksit
HCl	Hidroklorik Asit
(NH₄)₂SO₄	Amonyum Sülfat
KH₂PO₄	Potasyum Fosfat
CO	Karbon monoksit
CO₂	Karbon dioksit
EtOH	Etil alkol (Etanol)
H₂SO₄	Sülfirik asit
H₃PO₄	Fosforik asit
MeOH	Metil alkol (Metanol)

TSE	Türkiye Standartları Enstitüsü
SCO	Tek hücre yağları
ÖTV	Özel tüketim vergisi
PDA	Potato Dextrose Agar
N+	Azot varlığı
N-	Azot yokluğu
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)



1. BÖLÜM

GİRİŞ

Enerjinin, tüm ülkelerde ekonomik ve sosyal kalkınma ile yaşam kalitesinin gelişmesi bakımından temel bir ihtiyaç olduğu aşikârdır. Dünyada ülkelerin giderek kalkınmasıyla ortaya çıkan enerji talebindeki artış ve bu talebin giderek azalan fosil enerji kaynakları ile karşılanamaması, insanlığı yeni ve yenilenebilir enerji kaynakları aramaya yönlendirmiştir. Dünyada ve ülkemizde alternatif enerji kaynakları arasında bulunan biyodizel, son dönemlerde önemi oldukça artan yenilenebilir enerji kaynaklarından biridir. Biyodizel, bitkisel ve hayvansal yağlar ile atık yağlar gibi yerli ve yenilenebilir kaynaklardan üretilen bir dizel alternatiftir [1]. Üretiminde kullanılan temel hammaddenin bitkisel yağlar olması ve bu yağların özellikle tarım ürünü ağırlıklı olması, biyodizel üretimini kısıtlamaktadır.

Mikroorganizmalar, bitkiler ile kıyaslandığında; kısa yaşam döngüsüne sahip olmaları, daha az çaba gerektirmeleri, mevsimlerden daha az etkilenmeleri, küçük alanda daha büyük ölçekte üretilibilmeleri gibi çeşitli avantajlara sahiptir [2]. Bu avantajlarla birlikte dünya genelinde fosil yakıt kaynaklarının hızla tükenmesi ve fosil yakıtların çevresel zararlarından dolayı, çevre dostu bir enerji kaynağı olan biyodizelin üretilmesi için mikrobiyal yağların kullanılması ideal bir stratejidir.

Maya, mantar ve mikroalgler bileşimi bitkisel yağlara benzeyen triasilgliseritleri (TAGs)'leri sentezleyebilirken, bakterilerin çoğu spesifik yağları sentezleyebilmektedirler. TAG'ler biyodizel üretimi için ana materyallerdir ve birçok mikroorganizma tarafından hücre içinde yüksek miktarlarda üretilmektedir. Biyodizel üretimi için diğer önemli kaynak materyali ise mayalardır. *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus curvatis* gibi bazı mayaların kuru ağırlıklarının %20'sinden daha fazla lipit üretimi yapabildiği bilinmektedir [3,4]. Mayalar glikoz, ksiloz, gliserol, nişasta, lignosellüloz, tarıma dayalı sanayi atıkları gibi çeşitli karbon kaynaklarını lipit üretimi için kullanabilirler. Fakat her durumda lipit üretimi karbon haricindeki bir besin elementinin sınırlandırılması ile oluşturulan koşullar altında gerçekleşmektedir [5].

Genellikle yağ üreten mayalar, *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalarla kıyaslandığında daha yavaş geliştikleri görülür. Bu sebeple, lipit üretimi yapan mayalardan lipit üretimi açısından maksimum verim alabilmek için uzun bir süreye ihtiyaç vardır [6].

Yağlı mikroorganizmaların karbon seviyesinin yüksek olduğu durumlarda ve besiyeri içeriğinde herhangi bir element sınırlandığında yağlı mikroorganizmalar depo yağı olan triaçilgliserollerini üretmeye başlarlar. Yağ üretimini besiyerine ilave edilen çeşitli elementlerin oranı tetikleyebilir. Yağlı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda yağ üretiminin artırılması amacıyla özellikle azot sınırlaması sıklıkla kullanılmaktadır. Bazı inorganik tuzların (fosfat, magnezyum, demir veya sülfat) ve vitaminlerin de azotun dışında yağ üretim metabolizmasını etkilediği belirtilmiştir [7].

Bu çalışmada çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen mayaların mikrobiyal lipit üretim kapasitelerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla çeşitli gıda ürünlerinden maya izalasyonu gerçekleştirilerek izole edilen mayalar farklı pH değerlerinde azot varlığı/azot yokluğu stresi içeren iki farklı besiyerinde biyokütle artışı ve lipit verimi açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra hücre içi mikrobiyal lipit üretme verimi ve % lipit miktarı en yüksek olan 2 adet maya izolatının seçilerek tür tanımlamasının yapılması ve yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilecek verilerle bu mayaların biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilme potansiyelinin var olup olmadığı ortaya konulacaktır.

2. BÖLÜM

2.1. Mayalar

Mayalar, mantarlar ailesinin geniş bir bölümünü oluşturan tek hücreli mikroorganizmalardır. Hücre yapısının büyük bir bölümü lipit, nükleik asitler, protein, ve polisakkaritten meydana gelmektedir. Maya hücrelerinin % 75'ini genel olarak su, geri kalanını ise enzimler, yağlar, proteinler, peptidler, vitaminler, aminoasitler ve karbonhidratlar oluşturmaktadır [8].

Mayalar, diğer mikroorganizmalara kıyasla farklı hücre duvar yapısına sahiptirler. Maya hücre duvarı kitin, glukan ve mannoproteinden oluşmaktadır [9].

Uygun şekilde sterilizasyon ve pastörize edilememiş gıdalarda çeşitli mikrofloralar gelişmektedir.

Gelişim aktivitelerini tamamlayabilmeleri için maya hücreleri, uygun besinlere ve gerekli ortam şartlarına ihtiyaç duymaktadırlar.

Maya hücrelerinin gelişimi için en önemli etkenler:

- ✓ Uygun besi ortamı
- ✓ Oksijen ve karbondioksit
- ✓ Su
- ✓ Sıcaklık
- ✓ pH

[10].

İnsanlar isteyerek veya farkında olmadan mikroorganizmaların doğal aktivitelerini gıda üretiminde uzun yıllardır kullanmaktadırlar. Başlıca örnekler ekme, bira, şarap, peynir, olarak gösterilebilir tarihsel kaynaklar da bu konuyu doğrulamaktadır. Bahsi geçen gıdaların üretiminde temel süreçler biraz değişse de, mayalar mevcut şartlarda her zaman biyoteknolojik verimin artmasını sağlayan bir araç olmuştur. Yeni teknolojiler ile birlikte biyoteknoloji uzmanları tarafından geliştirilen yöntemler ile yeni ve yararlı gıdalar ortaya çıkmıştır. Modern gıda endüstrisinin gelişiminde biyoteknolojinin büyük rolü vardır. [11]. Tek hücreli mikroorganizma türü olan mayalara gıda biyoteknolojisi dışında genetik mühendisleri de ilgi göstermektedirler. Hastalıkların tedavisinde ya da önlenmesinde

kullanılan pek çok farmasotik ajanın üretilmesinde genetik mühendisliği ile geliştirilen mayalar yer almaktadır. Ayrıca rekombinant DNA teknolojisinde mayalar önemli bir role sahiptir [12].

Mayaların yüksek miktarda yağ biriktirme kapasitesi, yüksek büyüme hızları ve TAG depo yağlarının bitkisel yağlara benzemeleri sebebiyle şimdiye kadar yapılan çalışmalar mayalar üzerinde yoğunlaşmıştır [13].

Mayalardan yaklaşık olarak %80-90 oranında TAG formunda mikrobiyal lipit elde edilmektedir. Bu lipitlerin bünyelerinde herhangi bir toksin ve allerjen bulunmamaktadır. Kültür ortamında sınırlandırılmış azot miktarına bağlı olarak *Rhodotorula gracilis*'in hücre ağırlığının % 65'i kadar lipit depo ettiği rapor edilmiştir. *Cryptococcus curvatus* gibi çeşitli mayalar tarafından karbon kaynakları kullanılarak yüksek miktarda TAG depo yağları üretilebilmekte ve azotun sınırlandırılmış olduğu ortamda kuru biyokütle ağırlığı üzerinden % 60'a kadar lipit verimi elde edilmektedir. Elde edilen lipitin % 90'ından fazlasını palm yağına benzer yağ asidi kompozisyonuna sahip TAG'lar oluşturmaktadır. Yoğunlaştırılmış kültür ortamında yetiştirilen *Saccharomyces cerevisiae* kuru biyoküttelede % 7-10 oranında ergosterol üretmektedir [14].

Yağ verimi yüksek mayalar, kakao yağına benzer nitelikte lipit üretmektedir. Maya türlerinden *Candida curvata*'dan elde edilen lipit, kakao yağından elde edilen lipitle erime sıcaklığı açısından benzer özellik göstermektedir [14].

Kuru ağırlıklarının % 70'i oranında lipit depo etme özelliğine sahip bazı maya türleri *Rhodotorula sp*, *Rhodospiridium sp* ve *Lypomyces sp*'dir [15].

Maya türlerinden *Trichosporon Pullulans*'ın aerobik koşullarda iyi bir yağ üretimi gerçekleştirdiği saptanmıştır. Normalde yağ üreten mikroorganizma olarak görülmeyen *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida utilis*'in oldukça yüksek miktarda yağ ürettiği saptanmıştır. *Pichia farinosa* % 7-9, *Candida utilis* ve *Geotrichum candidum* % 4-14, *Hansenula anomala* % 9-16 oranında yağ ürettikleri bulunmuştur [16].

Yapılan çalışmalarda, yağ üretiminde en umut verici mikroorganizmanın *Rhodotorula gracilis* olduğu görülmüştür. Besiyerindeki sindirilebilir azot miktarı kısıtlandığında *Rhodotorula gracilis*'te yağ birikiminin arttığı gözlenmiştir. Diğer umut verici yağ üreticiler ise *Lipomyces lipofer* ve *Lipomyces starkeyi* olarak bulunmuştur. *Lipomyces*

lipofer ile yapılan çalışmalarda % 40, *Lipomyces starkeyi* ile yapılan çalışmalarda ise % 50-63 oranında yağ birikimi gözlenmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda ise inositol içermeyen besiyerinde geliştirildiğinde yağ içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı görülmüştür [16].

Günümüzde ise yapılan analizler sonucunda mikroorganizmaların ve özellikle de mayaların çok farklı yağ asitlerini sentezleyebildikleri ve uygun koşullarda toplam biyokütlelerinin % 70'ine varan oranlarda yağ depolayabildikleri belirlenmiştir. Mayalar arasında *Saccharomyces cerevisiae* kolay bulunabilirliği ve metabolizmasının ortaya konulmuş olmasından dolayı mikrobiyel yağ üretim çalışmalarının temelini teşkil etmektedir [17].

2.2. Mikrobiyal yağlar

Mikroorganizmalar, günümüz dünyasında pek çok amaçla kullanılabilir. Bu amaçlar arasında rekombinant protein eldesi, antibiyotik, insülin üretimi, organik asitlerin, polisakkaritlerin üretimi, etil alkol eldesi gibi çeşitli maddelerin sentezi yer almaktadır [18,19]. Biyodizel yakıtların hammaddesi olarak kullanılan lipitlerin üretiminde de mikroorganizmaların rolünün büyüklüğü yadsınamaz bir gerçektir. Bu canlıların ürettiği lipitlere tek hücre yağı (SCO) da denilmektedir [20].

Mikrobiyal yağlar ya da tek hücre yağları; bakteri, maya, mantar ve mikroalglerden elde edilmektedir. Biyodizel; bitkilerden, hayvanlardan, alglerden, mayalardan ve bakterilerden elde edilen yağların, bir katalizör (enzim, asit veya baz) eşliğinde kısa zincirli bir alkol ile (etanol veya metanol) transesterleşmesi sonucunda ortaya çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. Geleneksel biyodizel esas olarak soya yağı, kanola yağı, ayçiçeği yağı, palm yağı ve atık yağlardan elde edilmektedir. Ancak yağlı bitkilerin ekilmesi için çok büyük alanlara ihtiyaç duyulması ve biyodizel üretimi için bitkisel yağlar kullanıldığında maliyetin tüm üretim maliyetinin %70-85'ini bulması nedeniyle; araştırmacılar mikroalg, maya, bakteri ve mantar gibi daha ucuz yağ kaynak materyallerine yönelmişlerdir [21].

Mikrobiyal yağlar, bitkisel ve hayvansal yağlarla kıyaslandığında, mikroorganizmaların kısa yaşam döngüsüne sahip olup kolay üretilibilmeleri, daha az iş gücü ve mekan gereksinimi olması, mevsimsel ve iklimsel koşullara ihtiyaç duymamaları açısından daha avantajlı bir şekilde biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilir [22].

Sucul ortamda mikroalgler, tek hücreli ve çok hücreli yapılarda yer alan, heterotrofik ya da ototrofik olarak gelişen fotosentetik organizmalardır [23]. Mikroalglerce karbondioksit doğrudan yağ asitlerine dönüştürülebilmektedir. Mikroalglerin kuru hücre ağırlıklarının yaklaşık % 20 ile % 60'ı yağ içeriklerinden oluşur. Fakat *Nannochloropsis*, *Botryococcus*, *Schizochytrium* türleri yaklaşık olarak kuru hücre ağırlıklarının % 80'i oranında yağ depolayabilirler. Bazı mikroalg türleri farklı formlarda yağ ve hidrokarbon üretme yeteneğine sahiptir [24]. Mikroalglerce üretilen uzun zincirli yağ asitleri, biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır [25].

Mikroalgler makroalgere göre bazı üstünlüklere sahiptir. Bunların başında daha küçük alanda yetişebilmeleri, daha kısa sürede çoğalabilmeleri ve daha fazla yağ depolama yeteneğine sahip olabilmeleri gelmektedir. Mikroalgler 3.5 saat gibi kısa bir süre içerisinde biyokütlelerini iki katına çıkarabilmektedir [26]. Alglerden üretilen biyodizelin sülfür içermediği, SO_x, hidrokarbon, partikül madde, ve CO emisyonlarının çok düşük oranda olmasına karşın NO_x emisyonunun nispeten daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [27].

Mikroalgler yağ asidi bakımından zengin olsa da fotosentez gereksinimleri için geniş alana ihtiyaç duymalarından dolayı üretim maliyeti yükselmektedir. Bunun yanında mikroalglerin çoğalmalarının iklim ve mevsim koşullarına bağlı olması ve yüksek miktarda suya ihtiyaç duyması nedeniyle üretim maliyetleri de yüksektir [28].

2.3. Biyodizel nedir?

Enerji kaynakları ile ilgili olarak son yıllarda alternatif yakıtlar, enerji tasarrufu, enerji verimliliği ve çevrenin korunması gibi konular önem kazanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde bitkisel yağlar, biyokütle, biyogaz gibi biyolojik kökenli yakıtların üretimi ve kullanılması önem kazanmaktadır. Bu aşamada biyodizel ümit verici bir seçenek olarak görülmektedir [29].

Biyodizel alternatif olarak üretilen bir biyo yakıttır. Yenilenebilir olması, toksik etkisinin olmaması ve emisyon değerlerinin düşük olmasından dolayı çevre dostu bir yakıt olarak nitelendirilmektedir. Biyo kelimesi elde edilen yakıt ürünün biyolojik kökenli ve yenilenebilir olduğunu, dizel kelimesi ise biyodizelin dizel yakıt olarak kullanılabileceğini göstermektedir [30].

Biyodizel, bitkisel, hayvansal ve atık yağların kısa zincirli bir alkol ile bir katalizör varlığında transesterifikasyon reaksiyonu sonucu üretilen dizel bir yakıttır [31]. Bitkisel ve hayvansal yağlar, esterleşme reaksiyonu sonucu yağ asitleri metil ester (YAME) formuna geçmektedir [30]. Bu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan biyodizelin temel özellikleri dizel yakıtı oldukça yakınlık göstermektedir [32]. Biyodizel, yenilenebilirlik, biyolojik parçalanabilirlik, düşük toksisite, düşük emisyon profili, daha yüksek yanma verimliliği, setan sayısı ve oksijen içeriği özelliklerinden dolayı daha avantajlı bir yakıttır [33].

Biyodizel içerdiği enerji ve fizikokimyasal özellikleri bakımından dizel yakıtı benzer; bundan dolayı geleneksel motorlarda büyük değişiklikler yapılmadan biyodizel tek başına veya biyodizel-dizel karışımı formunda kullanılabilir [33].

2.3.1. Biyodizelin çevresel özellikleri

Fosil yakıtlar petrolün birçok işleminden geçirilmesi sonucu kullanılabilir hale gelmektedir. Bu süreçte çevreye salınan emisyon oranları azımsanmayacak oranda yüksektir. Biyodizel ise bitkisel kaynaklı olduğu için hammaddenin yetişmesi, yağının elde edilmesi ve biyodizele dönüşüm süreci bir bütün olarak değerlendirildiğinde oluşan emisyon salınımları petrol esaslı yakıtlara göre oldukça azdır. Hatta bitkilerin fotosentez yaptığı da düşünüldüğünde biyodizelin çevreci özelliği oldukça ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, motorlarda yakıt olarak kullanımında oluşan egzoz emisyonları da genel olarak petrol yakıtlarından daha az seviyede oluşmaktadır [34]. Biyodizelin suda yaşayan canlılara zehirli bir etkisi bulunmamaktadır. Fakat bir litre ham petrolün bir milyon litre içme suyunun kirlenmesine sebep olduğu bilinmektedir. Biyodizel suya bırakıldığında 28 günlük bir sürecin sonunda % 95'i çözünürken, bu oran dizelde % 40 seviyelerine düşmektedir. Bu sebeple, başta ABD'nin birçok eyaletinde olmak üzere, nehir ve göller gibi sulak alanlarda kullanılan tekne ve ulaşım araçlarında saf biyodizel kullanımı mecburi hale gelmiştir [35].

2.3.2. Biyodizel üretim süreçleri

Biyodizel, her türlü bitkisel yağların bir katalizör eşliğinde kısa zincirli alkollerle transesterifikasyonu sonrası elde edilen biyolojik kökenli dizel bir yakıttır. Dizel araçlarda kullanımında küçük modifikasyonlar yeterli olmaktadır. Ayçiçeği, kanola, kenevir, pamuk, aspir gibi yağ içeriği yüksek olan bitkiler, günümüzde yaygın bir şekilde biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında atık yağlar ve mikroalglerle de biyodizel üretimi yapılmaktadır. Biyodizel üretmek için harcanan enerji, dizel yakıt üretmek için harcanan enerji miktarının % 32'si kadar olduğundan biyodizel üretim tesislerinde önemli ölçüde enerji tasarrufu da sağlanabilmektedir [36].

Biyodizel üretiminde kullanılan yöntemler aşağıda Şekil 2.1.'de verilmiştir. Bu yöntemler ısıl yöntem ve kimyasal yöntem olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Isıl yöntem günümüzde çok fazla kullanılmamaktadır. Kimyasal yöntemler ise seyreltme, mikoemülsiyon oluşturma, piroliz (ayırıştırma) ve transesterifikasyondan oluşmaktadır. Günümüzde bu yöntemler arasında en çok kullanılan transesterifikasyon yöntemidir. [37]. Transesterifikasyon esnasında yağ metanol ya da etanol gibi kısa zincirli bir alkol ile asit veya baz gibi bir katalizör eşliğinde reaksiyona sokularak metil ester ve gliserin elde edilir. Katalizör olarak sık kullanılan bazlar arasında sodyum hidroksit ve potasyum hidroksit yer almaktadır. Asit katalizörler arasında en sık kullanılan hidroklorik asit ve sülfirik asittir [38].



Şekil 2.1. Biyodizel üretim yöntemleri [36].

2.3.3. Dünya’da ve Türkiye’de biyodizel

Dünyadaki hızlı nüfus artışı, sanayileşmenin artmasından dolayı doğal kaynakların kontrolsüz kullanılması ve mevcut şartlarda kullanılan fosil yakıtların rezervlerindeki azalma, günümüzde bölgesel olmaktan uzaklaşarak küresel bir sorun haline gelmektedir. Bu durum karşısında hükümetler yasal düzenlemeler yaparak alternatif olan enerji kaynak arayışına başlamışlardır. Bu amaçla alternatif olacak enerji kaynağının yenilenebilir ve çevre dostu olması ziyadesiyle önemlidir. Günümüzde kullanılabilir alternatif yenilenebilir enerji kaynakları; rüzgâr, güneş, biyokütle, hidrolik enerji, jeotermal ve deniz enerjisi olarak sınıflandırılmaktadır. Uluslararası Enerji Ajansı tarafından yapılan çalışma sonuçlarına göre 2000-2030 yılları arasında enerji kaynaklarının payı fosil enerji için %85, petrol ve doğalgaz için % 60 ve yenilenebilir enerji için ise % 15 düzeyinde olacaktır [39].

Yenilenebilir enerji kaynaklarından biyodizel, artan petrol fiyatları, fosil yakıtların kaynaklarının azalmasından dolayı Dünya’da önemli bir konumda bulunmaktadır. Biyodizel üretimi Batı Avrupa’da 44 (11 tesis ile İtalya lider), Doğu Avrupa’da 29 (16 tesis ile Çek Cumhuriyeti lider), Kuzey Amerika’da 8, diğer ülkelerde ise 4 üretim tesisinde üretilmektedir. Biyodizel üretiminde 985 bin tonluk üretim ile Almanya ilk sırada yer almaktadır. Almanya’yı Fransa, İtalya ve İngiltere takip etmektedir. Dünya’da biyodizelin %50’si Almanya ve Fransa’da üretilmekte ve kaynak olarak büyük oranda kolza kullanılmaktadır. Biyodizel üretiminin desteklenmesi için üretim yapan tesisler Avrupa Birliği tarafından politik anlamda da desteklenmektedir.

Biyodizel, üretim maliyeti yüksek olan bir yakıt türüdür. Üretimi yağlı bitki tohumundan yapılan tesislerde maliyetin en büyük payı tohumdur. Biyodizel üretiminde hammadde olarak atık yağ ya da yağ üretiminin yan ürünlerinin kullanılması işletmelerde üretim maliyetini nispeten düşürmektedir. Ancak ülkemizde yağlı tohum üretimi diğer ülkelere oranla daha düşük seviyededir. Üretilen yağlı tohumlar mevcut nüfusa yetmediğinden dolayı ülkemiz yağlı tohum ithalatçısı haline gelmiştir. Yağlı tohum üretiminin az olduğu ülkemizde biyodizel üretiminin bir kısmı yağlı tohumlar kullanılarak her ne kadar yapılsa da büyük bir kısmı atık yağların işlenmesiyle yapılmaktadır [40].

Tablo 2.1. Dünya’da biyodizel üretimi

Sıra No	Ülke	2019 (Varil/Gün)	2018 (Varil/Gün)	2017 (Varil/Gün)
1	Endonezya	137.86	96.50	48.25
2	ABD	112.49	121.16	103.81
3	Brezilya	99.95	92.19	73.94
4	Almanya	62.29	65.78	59.28
5	Arjantin	43.08	47.56	56.18
...
30	Türkiye	2.37	2.15	1.31

Endonezya, biyodizel üretiminde dünyanın en iyi ülkesidir. 2019 yılı itibarıyla Endonezya’da biyodizel üretimi günlük 137.86 bin varil olarak gerçekleşmiştir. İlk 5 ülke arasında Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Almanya ve Arjantin de yer almaktadır [41].

Resmi Gazete’de yayımlanan 25 Şubat 2011 tarih ve 27857 tarihli Bakanlar Kurulu kararı ile ülkemizde biyodizel üretiminde oto biyodizel ve yakıt biyodizeline Özel Tüketim Vergisi (ÖTV) uygulaması getirilmiştir. Biyodizel üretimindeki maliyetin büyük bir kısmı hammadde kaynaklıdır. ÖTV uygulaması ile maliyetler daha fazla arttığı için biyodizel sektörü rekabet gücünü kaybetmiş ve duraklama dönemini yaşamaktadır. Lisansı olan üreticilerin çoğu lisanslarını iptal ettirmiş, lisansı devam edenler ise üretim yapamayacak durumdadır. 2005 yılında 80 işletme biyodizel üretimi lisansı almış iken, 2018 yılına gelindiğinde sadece 14 işletmenin lisansı devam etmektedir. Lisansı sonlandırılmayan ve üretime devam eden tesislerle birlikte toplam işleme kapasitesi yaklaşık 1,5 milyon ton civarındadır. 2020 yılına gelindiğinde ise Biyokütle Enerjisi Potansiyeli Atlası’nda (BEPA) 5 adet biyodizel üretim tesisi aktif görülmektedir. Biyodizel ile ilgili yeni düzenlemeler yapılmaz ve kapatılmalarına sebep olan engeller ortadan kaldırılmaz ise biyodizel alanında üretimin artması ve yeni tesislerin faaliyete geçmesi pek mümkün olmayacaktır [42].

3. BÖLÜM

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Tablo 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar

Sıra No	Alet ve Cihaz	Marka
1	Otoklav	Tetra MED 20
2	Hassas Terazı	KERN & Sohn GmbH
3	pH Metre	Isolab
4	Spektrofotometre	Tetra T60
5	Falkon	Isolab
6	Plastik Mikro Küvetler	Isolab
7	Ependorf Tüpler	Isolab
8	Mikropipet Takımı	Isolab
9	Etüv	Selecta 2001248 00-D 55911
10	Destile Su Cihazı	Isolab Lwd-3004
11	Mikroskop	Olympus CX21
12	Plastik Öze	Isolab
13	Petri	Isolab
14	Buzdolabı	Vestel
15	Santrifüj	Selecta
16	100-1000 mL erlen mayerler	Isolab
17	200 µL-1000 µL Pipet Uçları	Isolab
18	Su Banyosu	NB 301 L
19	Çalkalamalı Etüv	Nüve ES 110
20	Lam	Isolab

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Tablo 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

Sıra No	Kimyasal	Marka
1	Nutrient Broth	Merck
2	Etil Alkol (% 96)	Neva
3	Crystal Vigole	GBL
4	Lugol	GBL
5	Safranin	GBL
6	Metanol	Merck
7	Hekzan	Sigma Aldrich
8	İzopropanal	Sigma Aldrich
9	Dietileter	Merck
10	Asetik Asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Sigma Aldrich
11	Nütrient Agar	Merck
12	Agar Agar	Merck
13	Potato Dextrose Agar	Merck
14	Yeast Extract	Sigma Aldrich
15	Malt Extract	Sigma Aldrich
16	Peptone	Sigma Aldrich
17	Glucose	Merck
18	Amonyum Sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma Aldrich
19	Potasyum Sülfat KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich
20	Magnezyum Sülfat MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich
21	Sülfirik Asit (H ₂ SO ₄)	Merck
22	Fosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Sigma Aldrich
23	Vanilin (C ₈ H ₈ O ₃)	Sigma Aldrich
24	Kloroform	Sigma Aldrich
25	Butil Hidroksi Toluen (C ₁₅ H ₂₄ O)	Sigma Aldrich

3.1.3. Çalışmada kullanılan gıda örnekleri

Çalışmada Nevşehir ilinde ev yapımı elma sirkesi, turşu suyu, şalgam, zeytinli yağ, çiğ süt, tereyağı, yoğurt, domates sosu gibi gıda ürünleri maya izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Besiyeri hazırlanması

Sıvı besiyeri hazırlanırken katı haldeki Nutrient Broth kimyasalı, katı besiyeri hazırlanırken katı haldeki Potato Dextrose Agar kimyasalı kullanılmıştır.

3.2.2. Örnek alımı ve izolasyon

Maya izolasyon kaynağı olarak kullanılan çeşitli gıdalar elma sirkesi, turşu suyu, şalgam, zeytinli yağ, çiğ süt, tereyağı, yoğurt, domates sosundan örnek alınırken plastik özeler numuneler içerisine batırılarak örnek alımı yapılmıştır. Sıvı besi yerine ekim plastik özelerle alınan numuneler içerisine batırılmış besi yerine örneklerin geçmesi için plastik öze bir miktar içerisinden karıştırılmıştır. Ekim işlemi bittikten sonra ağzı kapatılan sıvı besi yerleri üreme olması için 30 °C’de etüvde 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübe edilmiş ve üreme gerçekleşmiş olan sıvı besi yerlerinden batırma yöntemiyle plastik öze yardımıyla örnek alınarak katı besi yerine çizgi ekim yapılmıştır ve 30 °C ‘de etüvde bir gün inkübe edilmiştir. Besiyerleri üzerinde gelişen koloniler arasında farklı görünüme sahip olanlar plastik öze yardımıyla alınarak tekrar aynı besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. Bu işlem saf görümlü koloniler elde edilinceye değin tekrarlanmıştır.

3.2.3. Alınan örneklerin gram boyama işlemi

Yapılan izolasyon çalışması sonucunda oluşan izolatlar gram boyama yöntemi ile boyanmıştır. Gram boyama işleminde kullanılan kimyasallar; kristal viyole, lugol çözeltisi, % 95’lik etanol, safranin boya çözeltisidir.

Gram boyama yönteminde belli bir sıra izlenerek şu işlemler yapılmıştır. İlk olarak lamların üzerine saf su eklenmiş ve bu işlemin ardından demir öze bek alevinde steril edilmiştir. Besi yerinden numune alınarak lam üzerine iyice yayılmıştır. Ardından lam üzerinde bulunan fazla su buharlaştırmak ve lamı kurutmak için bek alevinden geçirilmiştir. Kurutulan lama ilk olarak kristal viyole damlatılmıştır. Bir dakika beklendikten sonra saf sudan geçirilmiştir. Bu işlem sonrasında lam üzerine lugol çözeltisi eklenmiş bir dakika beklendikten sonra saf sudan geçirilmiştir. Daha sonra üzerine etil alkol çözeltisi damlatılmış ve 10-15 saniye bekletilip ardından bol saf sudan

geçirilmiştir. Son işlem olarak lam üzerine safranin boyası damlatılmış ve 30 saniye bekletilip ardından saf sudan geçirilmiştir. Bu işlemlerin sonunda ıslak olan lamlar temiz bir kâğıt havlu üzerinde kurumaya bırakılmıştır.



Resim 3.1. Gram boyama yapılan izolatlar

3.2.4. İzolatların mikroskopta incelenmesi

Gram boyama sonucu kuruyan boyalı lamların üzerindeki mikroorganizmaların üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskop yardımıyla 100x immersiyon objektifinde incelenmiştir. İnceleme sonucu boyama işlemi yapılan lamalarda mor renkte görülen mikroorganizmalar gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilmiştir. Mikroskopta incelemeler sonucu örnekler içerisindeki mayalar belirlenmiştir. Elimizde bulunan toplam 60 izolat içerisinde 8 adet izolatın maya olduğu tespit edilmiştir.

3.2.5. Çalışmada kullanılacak maya kültürlerinin üretimi ve saklanması

Gıda örneklerinden izole edilen maya izolatlarının devamlılığının sağlanması amacıyla, mayalar Potato Dextrose Agar (PDA) içeren yatık agar besiyerlerine ekilerek 30°C’de, 24 saat inkübe edildi. Mayalar 4-6 haftada bir taze besiyerlerine aktarılmıştır. Maya kültürleri +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.6. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada maya kültürlerinin üretimi amacıyla optimal besiyeri (azot varlığı) ve lipit üretim besiyeri (azot açlığı) olmak üzere iki çeşit besiyeri kullanılmıştır. Tüm besiyerleri ekim işlemleri öncesinde 120 °C 'de 1 saat 15 dakika otoklavize edilmiştir.

3.2.7. Optimal besiyeri

Stok maya kültürlerinin üretildiği optimal besiyerinin içeriği Tablo 3.3.'de verilmiştir. Besiyeri başlangıç pH'sı, HCl ve NaOH ile ayarlanmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan optimal besiyeri içeriği

Glikoz	10 g/L
Pepton	5 g/L
Maya Özütü	3 g/L
Malt özütü	3 g/L

3.2.8. Lipit üretim besiyeri

Tablo 3.4.'de içeriği verilen lipit üretim besiyerinin başlangıç pH'sı ortama 1N HCl ve 1 N NaOH ilave edilerek pH 5,5'e ayarlandı.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyeri içeriği

Glikoz	70 g/L
Maya Özütü	0.75 g/L
Amonyum Sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	0.55 g/L
Potasyum Sülfat KH ₂ PO ₄	0.40 g/L
Magnezyum Sülfat MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/L

3.3. Azot yokluğu stresinin uygulanması

PDA ortamında yatık agarda muhafaza edilen maya kültürlerinin aktifleştirilmesi için iğne uçlu öze yardımıyla alınan maya kültürü batırma yöntemiyle 100 mL stok besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere ekilmiştir. Hazırlanan maya kültürleri 30°C'de 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (Nüve ES 110) 1 gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra sıvı maya kültüründen aseptik koşullarda alınan 5 mL kültür, tekrar 100 mL stok besiyeri

içeren 250 mL'lik erlenlere ekilmiştir. 30°C'de 100 rpm'de çalkalamalı etüvde 1 gün inkübe edilen maya kültürleri optimal besiyeri (azot varlığı) ve lipit üretimini teşvik edici besiyerine (azot yokluğu) ekilmek üzere hazır hale getirilmiştir.

Azot yokluğu stresi oluşturmak için; stok besiyerinde 1 gün çoğalan örneklerden 20 ml alınmış ve alınan hücreler santrifüjle toplandıktan sonra üst faz atılarak, atılan üst faz yerine içerisinde lipit üretim besiyeri ile süspanse edilmiştir. Lipit üretim besiyeri/N- ile süspanse edilmiş hücreler, içerisinde 100 ml lipit üretim besiyeri/N- bulunan 250 mL'lik erlenlere ekim yapılmıştır. Ekim yapılan erlenler INFORS-HT marka inkübatörde 28°C, 80 rpm'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Azot stres denemesiyle aynı anda optimal besiyerine (optimal besiyeri/N+) de maya hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Her izolat için hem optimal besiyeri (optimal besiyeri/N+) hem de azot yokluğu besiyerine lipit üretim besiyeri/N+ besiyerinde 1 gün boyunca çoğaltılmış tek bir stoktan ekim yapılmıştır.

Toplam 1 günlük kültür süresi sonunda hem optimal besiyeri/N+ hem de lipit üretim besiyeri/N- besiyerlerinde çoğalan izolatlar toplanmış ve bu izolatlarda; biyokütle miktarı, biyokütle verimi, toplam lipit miktarı, kuru ağırlıkta % lipit miktarı, lipit verimi saptanmıştır.

3.4. Biyokütle veriminin saptanması

Biyokütle veriminin saptanması için biyokütle verimi: $(N_2 - N_1) / (t_2 - t_1)$ formülü kullanılmıştır ve formülde yer alan; N2: t2 zamanındaki biyokütle konsantrasyonu (mg/L), N1: t1 zamanındaki biyokütle konsantrasyonu, biyokütle konsantrasyonu: mg/litre/gün (1 günde 1 Lt besiyerinden elde edilen mg maya biyokütlesi) ifade etmektedir [43,44].

T1 zamanındaki başlangıç biyokütlesini (N₁) belirlemek için; ana stoktan (1 gün boyunca optimal koşullarda çoğaltılmış yaklaşık 100 ml hücre) 3 defa 20'şer mL hücre alınmış ve hücreler santrifüjle (3000 rpm'de 5 dk) toplandıktan sonra üst fazları atılmıştır. Sadece hücre bulunan tüplere saf su eklenerek saf suyla yıkama yapılmıştır. Yıkanan hücreler tekrar toplandıktan ve üst fazları döküldükten sonra, ağırlığı hassas terazide tartılmış ve ağırlığı kaydedilmiş olan 1,5 mL polipropilen tüplere aktarılmıştır. İçerisinde hücre bulunan tüpler 65°C'de etüvde yaklaşık 15 saat bırakılmıştır. Kuruyan hücrelerin bulunduğu tüpler tekrar hassas terazide tartılmış ve ağırlıklar kaydedilmiştir. İçerisinde

kuru maya biyokütlesi bulunan tüp ağırlından, aynı tüpün boş ağırlığı çıkarılarak 20 ml hücrenin kuru ağırlığı saptanmıştır. Saptanan kuru ağırlık mg/L olarak ifade edilmiştir.

T2 zamanındaki biyokütleyi (N₂) belirlemek için; 1 günlük inkübasyonun sonunda hem N⁺ (azot varlığı) hem de N⁻ (azot yokluğu) besiyerlerinde çoğalan hücrelerdeki her erlenden (her izolat için 1 erlen N⁺, 1 erlen N⁻) 3'er defa 20'şer mL hücre otomatik pipetle çekilmiş ve kuru ağırlıkları yukarı satırlarda belirtildiği şekliyle saptanmıştır. Saptanan kuru ağırlık mg/L olarak ifade edilmiştir.

3.5. Toplam lipit miktarının saptanması

Toplam lipit miktarının saptanması için spektrofotometrik bir yöntem olan SPV (sülfo-fosfo-vanilin) yöntemi kullanılmıştır [45,46]. Örnekler için; 1 ml hücre alınarak santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır. Tüpte kalan hücre peletinin üzerine 100 µL saf su eklenmiş ve hücreler cam tüplere alınmıştır. Cam tüplerin içerisine 2 ml sülfürik asit (%95-98) eklenerek 100°C'de 10 dk sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra buz üzerinde soğutulan tüplerin içerisine 5 ml fosforik asit+vanilin çözeltisi eklenmiş ve tüpler 30°C'de 15 dk bekletilmiştir. Beklemeden sonra spektrofotometre cihazında 530 nm'de okuma yapılmıştır. Kör için içerisinde 100 µL saf su olan cam tüpler kullanılmıştır. Analizler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve her numune için 530 nm'de okunan OD değerlerinin ortalaması alınmıştır. Elde edilen OD değerleri daha önce Enver Ersoy ANDEDEN'in doktora tez çalışmasında kanola yağının farklı konsantrasyonlarını kullanarak oluşturmuş olduğu standart eğri grafiğindeki denkleme konularak lipit miktarı saptanmıştır [47]. **Kuru ağırlıkta % lipit miktarı:** $100 \times \text{lipit miktarı } (\mu\text{g}) / \text{biyokütle miktarı } (\mu\text{g})$ formülüyle saptanmıştır.

3.6. Lipit veriminin saptanması

Azot yokluğuna maruz bırakılan ve optimal koşullarda çoğaltılan hücrelerde lipit veriminin saptanması için; **Lipit verimi (mg/L/gün):** Biyokütle verimi \times kuru hücre ağırlığında % lipit formülü kullanılmış [43,44,48] ve formülde yer alan biyokütle veriminin nasıl saptandığı Bölüm 3.4'de anlatılmıştır. Kuru hücre ağırlığında % lipit miktarının saptanması için azot yokluğu stres denemesinin sonlandırıldığı gün kültürlerden 1 ml hücre alınarak -25°C'de 1 gün muhafaza edilmiş ve ertesi gün hücreler oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra Bölüm 3.5'de bahsedilen yöntem kullanılarak, 1 ml hücredeki lipit miktarı saptanmıştır.

3.7. Moleküler tanımlama

Lipit verimi en yüksek olan 2 adet maya izolatının moleküler tanımlaması hizmet alım yöntemi ile BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti firması tarafından yapılmıştır.

1) Maya DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır.

2) DNA izolasyonundan sonra elde ettiğimiz DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3) PCR çalışmasında universal primer olarak

27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')

1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT)

ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')

ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.5. Moleküler tanımlama konsantrasyon değerleri

Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25mM	1,5 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
F. Primer	10 µM	0,3 µM
R. Primer	10 µM	0,3 µM
Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2 U
DNA template	3 µl	
PCR grade su ile 35 µL'ye tamamlanır		
• 95°C 5 dakika – initial denaturation		
• 40 döngü:		
— 95°C for 45 saniye - denaturation		
— 57°C for 45 saniye - annealing		
— 72°C for 60 saniye – extension		
• 72°C for 5 dakika – final extension		

PCR (kyratec thermocyclers) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütüldü ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır

Hedeflenen bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunuz Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Örnekleriniz için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

4) PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır.

5) Sanger Dizileme örnekleriniz için, Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA).

6) 27F – 1492R ve ITS1 – ITS4 primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla contig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

3.8. Moleküler tanımlaması yapılan B37 ve B53 kodlu izolatlar farklı pH'larda azot yokluğu stresi uygulanması

Lipit verimi, % lipit miktarı yüksek olan ve tür tanımlaması yapılan B37 ve B53 numaralı izolatlar; lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) tekrar azot yokluğu stresi uygulanmıştır.

3.9. Yağ asidi analizi

Yağ asidi analizi, azot yokluğu stresinde en yüksek lipit verimine sahip B37 ve B53 kodlu izolatlar için yapılmıştır. Lipitlerin ekstre edilmesinde Bligh ve Dyer yöntemi kullanılmıştır [49]. Lipit ekstraksiyonu için B37 ve B53 kodlu izolatların kuru biyokütlesinden 10 mg tartıldı üzerine 900 µL metanol kloroform (2:1, v/v) karışımı eklenmiştir. 30 dk bekletildikten sonra 300 µL kloroform ve 480 µL ultra saf su eklenmiştir. Faz ayrımı için 2500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Alt faz çekilip başka tüpe alınmıştır. Üstteki su fazı atılarak ekstraksiyon işlemi 2 defa daha tekrarlanmıştır. Yeni tüpe alınan ekstraktın berrak olması için 500 µL saf su eklenerek karıştırıldı ve

santrifuj edilerek alt faz tekrar yeni bir tüpe aktarılmıştır. Sonra azot gazı altında uçurma işlemi yapıldı ve 250 µL toluen eklenmiştir. Bunun üzerine 1,5 mL methanol sülfirik asit karışımı (97 mL methanol + 2,5 mL sülfirik asit) eklenmiştir. Cam tüpler 50°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan tüplerin içerisine 0,5 mL ultra saf su ve 0,7 mL hekzan eklenmiş ve tüpler çalkalanmıştır. Çalkalanan tüpler 2000 rpm'de 1,5 dk santrifuj edildikten sonra üst faz cam pastör pipeti ile alınarak başka bir cam tüpe aktarılmıştır. Azot gazı altında uçurma işlemi yapılmış ve 250 µL hekzan eklenmiştir. Numune tüplerine aktarılan üst fazın yağ asidi analizi hizmet alım yöntemi ile Düzen Norwest Çevre, Gıda ve Veteriner Sağlık Hizmetleri Eğitim Danışmanlık Ticaret A. Ş. firması tarafından yapılmıştır. Yağ asidi analizleri GC-FID (Gaz kromatografisi-Alev iyonizasyon dedektörü) cihazında analiz edilmiş ve yağ asitleri standardı olarak Supelco 37 FAME Mix kullanılarak 37 yağ asidinin profili çıkarılmıştır.

4. BÖLÜM

BULGULAR

4.1. İzolatların kaynakları

Maya izolasyon kaynağı olarak kullanılan çeşitli gıdalar elma sirkesi, turşu suyu, şalgam, zeytinli yağ, çiğ süt, tereyağı, yoğurt, domates sosundan örnek alırken plastik özeler numuneler içerisine batırılarak örnek alımı yapılmıştır. Elde edilen izolatlara verilen kodlar ve izolatların alındıkları gıdalar Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. İzolatların kodları ve izole edildikleri gıda kaynakları

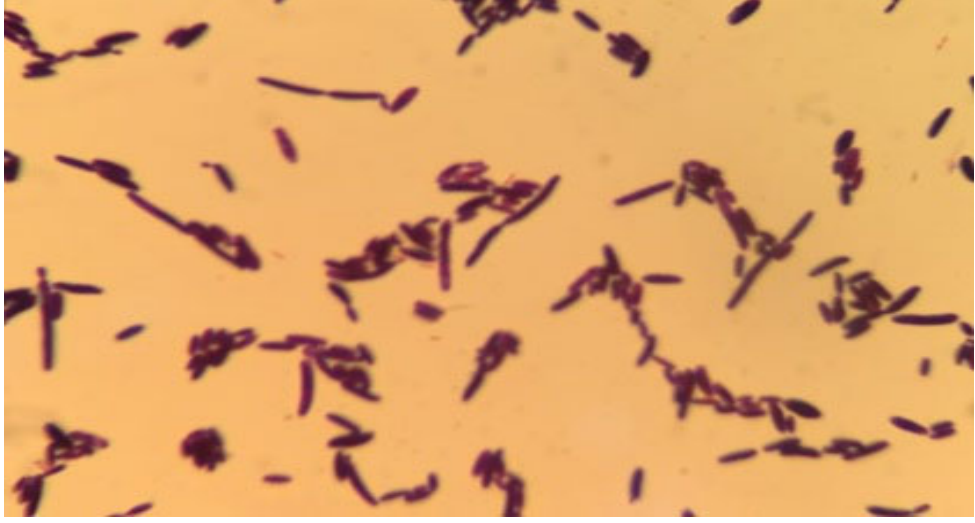
İzolasyon kodu	İzolasyon kaynağı
B2	Elma sirkesi
B3	Elma sirkesi
B5	Turşu suyu
B37	Elma sirkesi
B45	Turşu suyu
B52	Zeytinyağı
B53	Elma sirkesi
B58	Turşu suyu

4.2. Maya izolatları

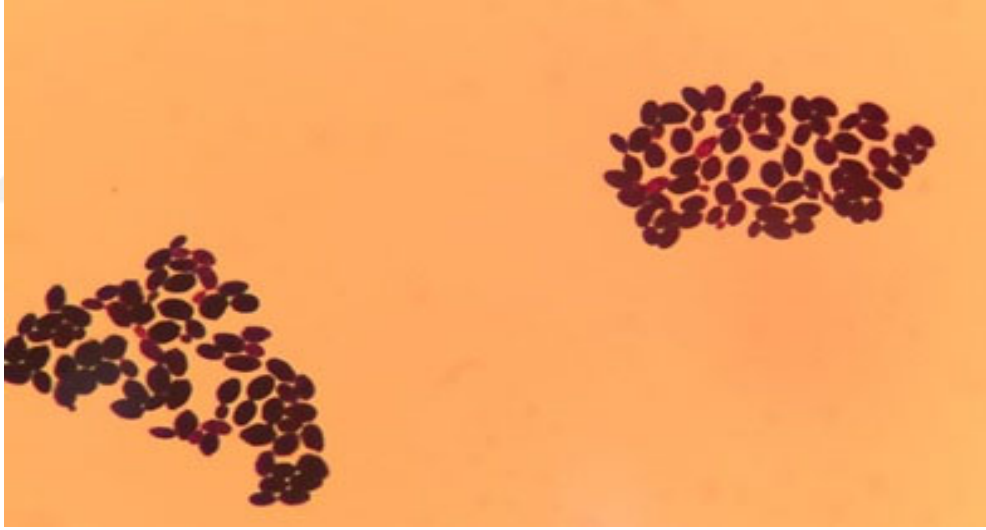
Yapılan izolasyon çalışması sonucunda Potato Dextrose Agar (PDA) üzerinde toplam 60 adet izolat elde edilmiştir.

4.3. İzolatların gram boyaması ve mikroskopik tanımlama

İzolasyon çalışması sonucunda elde edilen 60 adet izolat gram boyama yöntemi ile boyanmış olup mikroskopik tanımlama işlemine hazır hale getirilmiştir. Gram boyama sonucu kuruyan boyalı lamaların üzerindeki mikroorganizmaların üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskop yardımıyla 100x immersiyon objektifinde incelenmiştir. Toplam 60 adet izolat içerisinde 8 adet izolatın maya olduğu tespit edilmiştir.



Resim 4.1. B37 Kodlu izolatin mikroskop görüntüsü



Resim 4.2. B53 Kodlu izolatin mikroskop görüntüsü

4.4. Azot yokluğu stresi altında maya izolatlarının lipit verimi bakımından seçilimi

Hem optimal besiyerinde (azot varlığı/N+) hem de lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) 8 adet maya izolatına ait biyokütle verimi, % lipit miktarları ve lipit verimleri aşağıda tablo 4.2. de verilmiştir.

Tablo 4.2. İzolatların biyokütle verimleri, % lipit miktarları ve lipit verimleri

Maya İzolatları	Biyokütle verimi (mg/L/gün)	% Lipit miktarı	Lipit verimi (mg/L/d)
B2 N-	887,27	5,56	49,34
B2 N+	927,27	4,18	38,73
B3 N-	1135,45	6,04	68,56
B3 N+	925,45	3,00	27,74
B5 N-	367,37	16,30	59,88
B5 N+	357,37	6,01	21,48
B37 N-	239,09	53,95	129,00
B37 N+	432,42	3,96	17,14
B45 N-	134,44	94,40	126,91
B45 N+	494,44	2,88	14,24
B52 N-	386,16	34,22	132,14
B52 N+	422,83	3,80	16,05
B53 N-	1009,39	16,13	162,80
B53 N+	846,06	2,89	24,40
B58 N-	223,74	22,50	50,34
B58 N+	277,07	4,25	11,78

N+ : Azot varlığı

N- : Azot yokluğu

Azot varlığında en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar; B5 (% 6,01) ve B58 (% 4,25), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B45 (% 2,88) ve B53 (% 2,89) izolatlarıdır. Azot yokluğunda ise en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar B45 (% 94,40) ve B37 (% 53,95), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B2 (% 5,56) ve B3 (% 6,04) tür. Azot varlığında en yüksek lipit verimine sahip izolatlar B2 (38,73 mg/L/gün) ve B3 (% 27,74

mg/L/gün) olarak, en düşük lipit verimine sahip izolatlar B58 (11,78 mg/L/gün) ve B45 (14,24 mg/L/gün) olarak saptanmıştır. Azot yokluğunda en yüksek lipit verimine sahip izolatlar ise B53 (162,80 mg/L/gün) ve B52 (132,14 mg/L/gün), en düşük lipit verimine sahip izolatlar ise B2 (49,34 mg/L/gün) ve B58 (50,34 mg/L/gün) olarak bulunmuştur. Tüm izolatlarda lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu stresi) optimal besiyerine (azot varlığı) göre % lipit miktarı ve lipit verimleri daha yüksek bulunmuştur.

4.5. Moleküler tanımlama sonuçları

Lipit verimi en yüksek olan 2 adet maya izolatının moleküler tanımlaması hizmet alım yöntemi ile BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti firması tarafından yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda tablo 4.3., 4.4.'de verilmiştir. Tür tayinleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerindeki en yakın türlere göre yapılmıştır. B37 kodlu izolat *Pichia kudriavzevii* İsolate QC-1 türüyle % 100 eşleşme gösterdiği için *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4.3. B37 - ITS1 - ITS4: *Pichia kudriavzevii*

Toplam Baz Sayısı	512
Dizi Eşleşme Oranı	% 100
Benzerlik Oranı	% 99.80
NCBI'daki Türü	<i>Pichia kudriavzevii</i> İsolate QC-1
Accession Numarası	MK894151.1

B53 kodlu izolat *Saccharomyces cerevisiae* strain levure UK türüyle % 99 eşleşme gösterdiği için *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4.4. B53 - ITS1 - ITS4: *Saccharomyces cerevisiae*

Toplam Baz Sayısı	789
Dizi Eşleşme Oranı	% 99
Benzerlik Oranı	% 100
NCBI'daki Türü	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain levure UK
Accession Numarası	KT732655.1

4.6. B37 ve B53 kodlu izolatlarla farklı pH'larda azot stresi uygulama sonuçları

Lipit verimi, % lipit miktarı yüksek olan ve tür tanımlaması yapılan B37 ve B53 numaralı izolatlarla lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) azot yokluğu stresi uygulanmıştır. B37 kodlu izolatın pH 6'da % 34,4 olarak en yüksek % lipit miktarına, pH 8'de ise 261,37 olarak en yüksek lipit verimine sahip olduğu görülmüştür. B53 kodlu izolatın pH 10'da % 44,3 olarak en yüksek % lipit miktarına ve 730,60 mg/L/gün olarak en yüksek lipit verimine sahip olduğu görülmüştür. Her iki izolatın farklı pH'lardaki en yüksek % lipit miktarı % 44,3, lipit verimi ise 730,60 mg/L/gün olarak pH 10 değerinde gerçekleşmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5. B37 ve B53 kodlu izolatların farklı pH değerlerinde biyokütle verimi, toplam lipit miktarı, % lipit miktarı ve lipit verimi

İzolat kodu	pH değeri	Biyokütle verimi (mg/L/gün)	Toplam lipit miktarı (µg/mL/gün)	Kuru ağırlıkta % Lipit miktarı	Lipit verimi (mg/L/gün)
B37	pH 6	685,67	42,33	34,4	235,80
B37	pH 8	1866,33	42,04	14,0	261,37
B37	pH 10	1451,00	33,29	14,0	203,05
B53	pH 6	1203,00	83,04	41,2	495,78
B53	pH 8	1933,67	54,35	34,9	675,69
B53	pH 10	1649,00	118,91	44,3	730,60

4.7. Yağ asidi analiz sonuçları

Moleküler tanımlama sonucunda *Pichia kudriavzevii* olduğu belirlenen B37 ve *Saccharomyces cerevisiae* olduğu belirlenen B53 kodlu izolatların kuru biyokütlesinden ekstre edilen lipitlerin transesterifikasyonu sonucunda sırasıyla % 96,02 ve % 96,28 oranında biyodizel verimi elde edilmiştir. Sonuçlar tablo 4.6. ve 4.7. de verilmiştir.

Tablo 4.6. *Pichia kudriavzevii* B37'den ekstre edilen yağ asitlerinin transesterifikasyon sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı

Yağ Asitleri	%
Palmitik Asit (C16:0)	15,61
Palmitoleik Asit (C16:1)	9,73
Margarik Asit (C17:0)	2,21
Heptadesenoik Asit (C17:1)	1,79
Stearik Asit (C18:0)	15,52
Oleik Asit (C18:1)	37,14
Linoleik Asit (C18:2)	14,96
Linolenik Asit (C18:3n3)	3,06

Tablo 4.7. *Saccharomyces cerevisiae* B53'den ekstre edilen yağ asitlerinin transesterifikasyon sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı

Yağ Asitleri	%
Kaprik Asit (C10:0)	0,15
Lavrik Asit (C12:0)	1,41
Miristik Asit (C14:0)	1,46
Miristoleik Asit (C14:1)	0,24
Pentadekanoik (C15:0)	0,10
Palmitik Asit (C16:0)	12,00
Palmitoleik Asit (C16:1)	41,49
Heptadekanoik Asit (C17:0)	0,11
Heptadesenoik Asit (C17:1)	0,11
Stearik Asit (C18:0)	9,62
Oleik Asit (C18:1)	33,17
Araşidik Asit (C20:0)	0,14

5. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde temel enerji kaynaklarına ait rezervler her geçen gün azalmaktadır. Artan enerji talebini karşılama potansiyeli hakkında endişeler de giderek artmaktadır. Enerji ihtiyacı günümüze kadar fosil kaynaklı yakıtların kullanılması ile karşılanmıştır. Rezervlerin giderek tükenmesinin yanında ozon tabakası, küresel ısınma, asit yağmurları gibi pek çok olumsuz durum fosil kaynaklı yakıtların kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bunların önüne geçmek için sürdürülebilir bir büyüme ve sürdürülebilir bir çevre için acil olarak çevreye zarar vermeyen yeni enerji alternatiflerinin ortaya çıkarılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Sürekli artan araç ve insan sayısı nedeniyle bu ihtiyaç her geçen gün katlanarak büyümektedir. Artan talep fosil yakıtların tükenmesine neden olmakla birlikte fiyatlarını da her geçen gün arttırmaktadır. Fosil yakıtların giderek tükenmesi ve çevreye olan olumsuz etkileri sonucu biyodizel yeni ve çevreci bir enerji kaynağı olarak, çeşitli araştırmalara konu olmaktadır [50].

Biyodizel üretimi için kullanılan hammaddeler genellikle bitkisel, hayvansal yağlar ve atık kızartma yağları şeklinde çeşitlilik göstermektedir [51].

Biyodizelin gıda olarak kullanılan bitkisel yağlardan elde edilmesinden dolayı yüksek olan hammadde maliyeti gıda ürünü olarak kullanılmayan bitkisel yağların kullanılmasıyla üretim maliyeti daha aşağıya çekilmiştir [52]. Atık kızartma yağları ve atık motor yağları günümüzde biyodizel üretiminde bitkisel yağların yerine maliyet düşürme amaçlı kullanılmaktadır [53].

1930 ve 1940'larda zorunlu durumlarda bitkisel yağlar dizel yakıt kaynağı olarak kullanılmıştır. Biyodizel o dönemde sadece bitkisel yağların metil esterleri olarak kabul edilse de ekonomik bir yakıt olma özelliğine sahip olamamıştır [54,55].

Biyodizel üretiminde oluşan maliyetin en büyük kısmını, hammadde oluşturmaktadır. Bu yüzden, hammadde maliyetinde ortaya çıkan bir artış biyodizel fiyatını % 40 oranında arttırmaktadır. Bu nedenle biyodizel üretiminde hammadde seçimi son derece önemlidir [56].

Biyodizel kullanımının petrol dizeli yakıta göre ekonomik olmamasının başlıca nedeni hammadde maliyetinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Biyodizel üretimindeki maliyetin toplam % 70-75'ini hammadde oluşturmaktadır. Bu yüzden biyodizel günümüzde fazla yaygınlaşamamıştır. Bu kısıtlamanın aşılabilmesi için ucuz hammadde kaynaklarını ortaya çıkarmak gerekmektedir. Dünya nüfusunun giderek artması nedeniyle tarımsal üretim için gerekli alan ihtiyacı da her geçen gün artmaktadır. Bu sorun günümüzde Dünya'nın birçok yerinde yaşanmaktadır. Bu durum bitkisel yağ fiyatlarını yükseltmektedir. Önümüzdeki yıllarda Dünyanın geri kalanında da benzer sorunların ortaya çıkması beklenmektedir.

Bu açıdan bakıldığında mikrobiyel lipitler biyodizel üretiminde kullanılan bitkisel yağlara alternatif bir hammadde kaynağı olabilme potansiyeli taşımaktadır [37].

Bu çalışmadaki sonuçlara göre;

Azot varlığında en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar; B5 (% 6,01) ve B58 (% 4,25), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B45 (% 2,88) ve B53 (% 2,89) izolatlarıdır.

Azot yokluğunda ise en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar B45 (% 94,40) ve B37 (% 53,95), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B2 (% 5,56) ve B3 (% 6,04) izolatlarıdır.

Bütün izolatlarda, azot yokluğu stresinde azot varlığına kıyasla % lipit miktarlarında yüksek oranda artış olmuştur.

Azot varlığında en yüksek biyokütle verimine sahip izolatlar B2 (927,27 mg/L/gün) ve B3 (925,45 mg/L/gün) olarak, en düşük biyokütle verimine sahip izolatlar ise B58 (277,07 mg/L/gün) ve B5 (357,37 mg/L/gün) olarak saptanmıştır.

Azot yokluğunda ise en yüksek biyokütle verimine sahip izolat B3 (1135,45 mg/L/gün), en düşük biyokütle verimine sahip izolat ise B45 (134,44 mg/L/gün) olarak saptanmıştır.

Lipit verimi verilerine bakıldığında ise, tüm izolatlarda azot yokluğunda lipit veriminin, azot varlığına oranla önemli ölçüde artış gösterdiği saptanmıştır.

Buna göre azot varlığında en yüksek lipit verimine sahip izolat B2 (38,73 mg/L/gün), en düşük lipit verimine sahip izolat ise B58 (11,78 mg/L/gün) olarak saptanmıştır. Azot yokluğunda en yüksek lipit verimine sahip izolatlar; B53 (162,80 mg/L/gün) ve B52

(132,14 mg/L/gün) izolatları, en düşük lipit verimine sahip izolat ise B2 (49,34 mg/L/gün) izolatı olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada çeşitli gıda kaynaklarından mikrobiyal lipit üretme kapasitelerini araştırmak için izole edilen mayalar üzerinde iki farklı besiyerinde optimal besiyeri (azot varlığı) ve lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu) yapılan çalışmalar sonucu maya izolatlarının tamamında azot sınırlı ortamda lipit veriminin daha yüksek oranlarda olduğu görülmüştür. Bu durum, Woodbine, M. (1995) tarafından yapılan çalışmada özellikle azot sınırlamasının yağ üretiminin artırılması amacıyla yağlı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanıldığı bilgisiyle örtüşmektedir [7].

Lipit verimi en yüksek olan maya izolatlarından olan B37 ve B53 kodlu izolatların tür tanımlaması yapılmıştır. B37 kodlu izolat *Pichia kudriavzevii* İzolate QC-1 türüyle % 100 eşleşme gösterdiği için *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır. B53 kodlu izolat *Saccharomyces cerevisiae* strain levure UK türüyle % 99 eşleşme gösterdiği için *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanmıştır.

Ekmek ve alkollü içkilerin üretiminde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*'nin, ökaryot, küresel şekilli bir maya olduğu ve bitkilerin yüzeylerinde, toprakta, böcek ve hayvanların vücut yüzeylerinde bulunduğu bilinmektedir [57].

Saccharomyces cerevisiae ile yapılan çalışmalarda inositol içermeyen besiyerinde geliştirildiğinde yağ içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı görülmüştür [16].

Günümüzde ise yapılan analizler sonucunda mikroorganizmaların ve özellikle de mayaların çok farklı yağ asitlerini sentezleyebildikleri ve uygun koşullarda toplam biyokütlelerinin % 70'ine varan oranlarda yağ depolayabildikleri belirlenmiştir. Mayalar arasında *Saccharomyces cerevisiae* kolay bulunabilirliği ve metabolizmasının ortaya konulmuş olmasından dolayı mikrobiyel yağ üretim çalışmalarının temelini teşkil etmektedir [17].

Literatürde çok az çalışma, *Pichia Kudriavzevii*'yi oleaginous maya olarak araştırmıştır, bu nedenle yağ asidi profilleri ve kültür koşullarının bu profiller üzerindeki etkisi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Son araştırmalar, *Pichia kudriavzevii*'nin lipit ve etanol gibi yüksek değerli ürünler için iyi bir kaynak olarak kabul edilebileceğini

göstermiştir [58,59]. Park vd. (2018) yapılan bir çalışmada *Pichia kudriavzevii*'nin aside toleranslı bir maya türü olduğunu rapor etmişlerdir [60].

Mikrobiyal lipit üretiminde besiyeri pH'ı oldukça önemli bir parametredir. Mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu elementlerin çözünürlük derecesi üzerinde oldukça etkili olan ortam pH'ı, bazı metallerin mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliğine etki etmektedir [61].

Johnson vd. (1992) farklı besiyeri başlangıç pH'larının *R. glutinis* mayasının lipit sentezi üzerine etkili olduğunu belirterek, en yüksek lipit içeriğinin pH 4'te elde edildiğini rapor etmişlerdir [62].

Literatürde yer alan bazı çalışmalarda mayaların lipit üretiminin pH 5.0–6.0 değerleri arasında optimum olduğu rapor edilmiştir [63,64,65,66].

Xue vd. (2006) lipit üretimi açısından *Rhodotorula glutinis* mayası ile monosodyum glutamat atıksuyu bulunan ortamda yaptıkları çalışmada ortam pH'sının 2.5 olduğu durumda hücre gelişiminin sınırlı hale geldiğini, ortam pH'sının 4.5–7.0 olduğu durumlarda ise dengede olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada biyokütle artışı ve % lipit miktarının en yüksek seviyesine pH 5.5'te ulaşıldığı görülmüştür [63].

Zhu vd. (2008) ortam pH değerinin 4-10 aralığında olduğu *Trichosporon fermentans* maya hücrelerinin lipit biriktirme kapasitesi üzerine yaptıkları çalışmada; maya hücrelerinin pH 6.5 değerinde % 62,4 oranıyla en yüksek lipit içeriğine ulaştığını rapor etmişlerdir [67].

Lipomyces starkeyi mayasının gelişme ortamındaki karbonun azota oranı 100 iken, Angerbauer vd. (2008) yaptıkları çalışmada; besiyerinin pH değerlerini 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0 olarak ayarlamış ve en yüksek % lipit miktarını % 56 olarak pH 5 değerinde bulmuşlardır [64].

Tür tanımlaması yapılan *Pichia kudriavzevii* B37 ve *Saccharomyces cerevisiae* B53 kodlu izolatlar lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) azot yokluğu stresi uygulanmıştır.

Pichia kudriavzevii B37 kodlu izolat en yüksek % lipit miktarına pH 6'da, *Saccharomyces cerevisiae* B53 kodlu izolat ise en yüksek % lipit miktarına pH 10'da ulaşmıştır.

Pichia kudriavzevii B37 kodlu izolat en yüksek lipit verimine pH 8’de, *Saccharomyces cerevisiae* B53 kodlu izolat ise en yüksek lipit verimine pH 10’da ulaşmıştır.

Pichia kudriavzevii B37 kodlu izolat en yüksek biyokütle verimine pH 8’de, *Saccharomyces cerevisiae* B53 kodlu izolat da en yüksek biyokütle verimine pH 8’de ulaşmıştır. En yüksek % lipit miktarı % 44,3 lipit verimi ise 730,60 mg/L/gün olarak pH 10 değerinde gerçekleşmiş ve bu durum literatür çalışmaları ile paralellik göstermiştir.

Çalışmada üretilen yağ asidi metil esterinin *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolatın % 31,13’nün doymuş yağ asitlerinden % 64,89’unun ise doymamış yağ asitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Toplam lipitler içerisinde tekli-doymamış yağ asitlerinin oranı % 46,87, lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan yağ asidi tekli doymamış yağ asidi olan oleik asit (C18:1) % 37,14 bunun ardından doymuş bir yağ asidi olan palmitik asitin (C16:0) % 15,61 olduğu belirlenmiştir.

Saccharomyces cerevisiae B53 kodlu izolat için % 21,62’sinin doymuş yağ asitlerinden % 74,66’sının ise doymamış yağ asitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan yağ asidi tekli doymamış yağ asidi olan palmitoleik asit (C16:1) % 41,49 bunun ardından tekli doymamış bir yağ asidi olan oleik asitin (C18:1) % 33,17 olduğu tespit edilmiştir.

Xue vd. (2006) *Rhodotorula glutinis* hücrelerinden ekstre ettikleri lipitleri Gaz Kromatografi’de analiz etmişler ve bu maya hücrelerinden elde ettikleri lipitin bitkisel yağlar ile benzer özelliklere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu lipitlerin yüksek miktarda C16 ve C18 numaralı karbon atomlarını içerdiğini ve % 92,4 gibi yüksek oranda metil esteri oluşturduğunu rapor etmişlerdir [63].

Rhodotorula toruloides ve *Lypomyces starkeyi* maya türleri üzerinde Liu ve Zhao (2007) tarafından yapılan çalışmada 70 g/L glukoz, 2.0 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren pH’sı 6 olan besiyeri ortamında sırasıyla % 58,0 ve % 50,2 oranında lipit içeriği elde etmişlerdir [68].

Angerbauer vd. (2008) *Lipomyces starkeyi* mayasını kullandıkları çalışmalarında; karbonun azota oranının lipit birikimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Glikoz miktarı arttırılarak karbonun azota oranının 15, 20, 30, 60 ve 150 olarak ayarlandığı besiyeri ortamları oluşturulmuş ve en yüksek lipit miktarı % 68 olarak karbonun azota oranının 150 olduğu besiyerinde elde edilmiştir [64].

Bu çalışmada karbonun azota oranı 127 olarak ayarlanmış *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolatın en yüksek lipit oranı % 34, *Saccharomyces cerevisiae* B53 kodlu izolatın en yüksek lipit oranı ise % 44 olarak tespit edilmiştir.

Li vd. (2010) *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15 mayasından ekstre ettikleri lipitin transesterleştirilmesi sonucunda elde edilen metil ester verimini % 85,8 oranında bulmuşlardır [69].

Karatay S, (2010) tarafından yapılan doktora tez çalışmasında, amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ maya hücrelerinin lipit konsantrasyonlarının belirlenmesinde azot kaynağı olarak kullanılmıştır. (NH₄)₂SO₄'ın besi ortamında sınırlandırılması sonucunda maya hücrelerindeki lipit üretiminde artış gerçekleştiği bildirilmiştir [70].

Farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde yetiştirilen mayalardan ekstre edilen lipitlerin yağ asidi dağılımlarının son derece benzer olduğu görülmüştür. Başlıca yağ asitlerinin C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 olduğu belirlenmiştir [70].

Yapılan çalışmayı diğer çalışmalardan özgün kılan şey mikrobiyal lipit üretimi açısından daha önce ülkemizde çalışılmamış bir oleaginous maya türü olan *Pichia kudriavzevii* ile gerçekleştirilmesidir. Bu izolatların, ekonomik ve çevresel faydaları birleştirerek alternatif karbon kaynakları kullanarak daha büyük ölçekli uygulamalarda tek hücreli yağ üretimi için potansiyel olabileceği düşünülmektedir.

Pichia kudriavzevii olduğu belirlenen B37 ve *Saccharomyces cerevisiae* olduğu belirlenen B53 kodlu maya izolatlarının kuru biyokütlelerinden ekstre edilen lipitlere transesterifikasyon işlemi uygulandığında biyodizel verimleri sırasıyla % 96,02 ve % 96,28 olmuştur. Elde edilen sonuca göre yağlı bir maya türü olan *Pichia kudriavzevii*'nin ürettiği lipitlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmaya son derece uygun olduğu *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda ise inositol içermeyen besiyerinde geliştirildiğinde yağ içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı ve mikrobiyal yağ üretim çalışmalarının temelini teşkil ettiği görülmüştür. Bu çalışmada izole ettiğimiz yağlı bir maya türü olan *Pichia kudriavzevii*'nin yağ asidi metil esterleri diğer oleaginous mayalarla benzerlik göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Xu, J., Du, W., Zhao, X., Zhang, G. and Liu, D. (2013) Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. *Biofuels, Bioprod. Bioref. Rev.* 10, 1-13.
2. S. C. Viñarta, M. V. Angelicola, J. M. Barros et al., “Oleaginous yeasts from Antarctica: screening and preliminary approach on lipid accumulation,” *Journal of Basic Microbiology*, vol. 56, no. 12, pp. 1360–1368, 2016.
3. Feofilova EP, et al. (2010) [Biodiesel-fuel: content, production, producers, contemporary biotechnology (review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 46(4):405-15
4. Wu, C.L., Buszard, B., Teng, C.H., Chen, W.L., Warr, C.G., Tiganis, T., Meng, T.C. (2011). Dock/Nck facilitates PTP61F/PTP1B regulation of insulin signalling. *Biochem. J.* 439(1): 151--159.
5. F. Thevenieau, J.-M. Nicaud, Published by EDP Sciences 2013 DOI: 10.1051/ocl/2013034
6. Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Veiga-Crespo, P. et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1219–1227 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>
7. Woodbine, M. (1995). Microbial fat: microorganisms as potential producers. *Prog. Indust. Microbiol.* 1, 145-179.
8. Deak, T. Ve Beauchat, L. L. (1996). "Handbook Of Food" Spoilage Yeast. Florida: CRC Press.

9. Molina M., Gil C., Pia J., Arroyo J., Nombela C., 2000. "Protein Localization Approaches For Understanding Yeast Cell Wall Biogenesis." *Microscopy Research And Technique*, 51:601-612.
10. Pitt, J. I. Ve Hacking, A. D. (1997). " Fungi And Food Spoilage" Cambridge: University Press.
11. Williams, G. M. 1993. Food: Its Role In The Etiology Of Cancer. In "Food And Cancer Prevention: Chemical And Biological Aspects.(Eds: K. W. Waeldron, J. T. Johnson, G. R. Fenwick)". The Royal Society Of Chemistry. P:3-11.
12. Chen, L. H., Bossonneault, G. A. And Glauert, H.P. 1988. "Vitamin C. Vitamin E And Cancer (Review)" *Anticancer Res.* 8: 739-748.
13. Gouda MK, Omar SH, Aouad LM. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:1703-11. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9664-z>
14. Aytuna H. Katı Faz Fermentasyon Yöntemiyle Küflerden Lipid Üretimi. [Yüksek Lisans] İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2004.
15. Dönmez G., Karatay S., E., 2011. Maya ve Fungus Lipitlerinin Soxhlet Sistemi ile Ekstraksiyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu. Proje Numarası: 10H4240001.
16. Bunker, H., J., 1963. *Microbial Food*. Rainbow, C., Rose, A., H., (Ed.), *Biochemistry of Industrial Microorganisms* (47-53). Academic Press, 147. New York.
17. Kuleaşan, H., Hızal, M. 2009. Tek Hücre Yağları Üretimi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mezuniyet Tez Çalışması.

18. Bennet, J.W., 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology* 66, 101–107.
19. Adrio, J.L. and Demain, A.L., 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6, 191-199.
20. Fakasa, S., Papanikolaou, S., Batsosa, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchosa, A. and Aggelis, G., 2009. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy* 33:573–580.
21. Alemdag, Y., Cooper, R. & Liang, H. (2013) Friction And Wear Behaviour Of Intermetallic Ni60ti40 Alloy Modified With Aluminium. *Journal Of The Balkan Tribological Association*, 19(4), 558-569.
22. Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80, 749-756.
23. Zhu L., Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 41, 1376-1384, 2015.
24. Guschina, I.A., Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45, 160-186.
25. Beer, L., Boyd, E., Peters, J., Posewitz, M. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 264-271.
26. Shay, E.G. (1993). Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. *Biomass Bioener.* 4, 227-242.

27. Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energ Rev.* 10, 217-232.
28. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalge. *Biotechnol Adv.* 25, 294-306.
29. Barnwal, B.K., & Sharma, M.P. (2005). Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9(4), 363–378. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.05.007>
30. Kaplan, M. (2019). *Pamuk yağından biyodizel eldesi ve verimliliğinin incelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Selçuk Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
31. Kaya, C. (2006). Bitkisel yağlardan biyodizel üretimi (Yüksek Lisans Tezi). Dicle Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
32. Meher, L.C., Vidya Sagar, D., & Naik, S.N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification – A review. *Renewable & Sustainable Energy*, 10(3), 248–268. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>
33. Chilukuri, B. S. (2014). Development of heterogeneous mesoporous acid catalyst for the esterification of oleic acid with methanol. (Master Of Science Dissertation), Texas A&M University-Commerce, Texas
34. Çetinkaya M.,Ulusoy Y.,Tekin Y.,Karaosmanoglu F., 2005. Engine and winter road test performances of used cooking oil originated biodiesel Energy conversion and management Vol 46,1279-129.
35. Kafadar, A. 2010. Yağlardan Biyodizel Elde Edilmesine Etki Eden Faktörlerin Araştırılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 96 s.

36. Alptekin, E, ve Çanakçı, M Biyodizel ve Türkiye'deki Durumu, Mühendis ve Makine, 47(561):57-64, (2006)
37. Ma, F., and Hanna, M.A., “Biodiesel production: a review, Bioresource Technology”, 70, 1-15, (1999)
38. National Biodiesel Board, (4 Ekim 2019), <http://www.biodiesel.org/>. (2009)
39. Üstün, G. E., & Genç, B. (2015). Dünya’da ve Türkiye’de biyoyakıtların durumu. Journal Of Agricultural Faculty Of Uludag University, 29(2), 157-164.
40. Acar, M., Gizlenci, Ş., & Aygün, Y. (2019). Alternatif bir yakıt biyodizel ve ülkemiz açısından önemi. Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun <https://www.Researchgate.Net/Publication/330583339>
41. <https://knoema.com/atlas/topics/Energy/Renewables/Biodiesel-production>
42. İllez, B. (2020). Türkiye’de Biyokütle Enerjisi. Türkiye’nin Enerji Görünümü.
43. Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., & Wang, Q. (2016). Improved Productivity of Neutral Lipids in *Chlorella* sp. A2 by Minimal Nitrogen Supply. *Frontiers in microbiology*, 7.
44. Belotti, G., Bravi, M., de Caprariis, B., de Filippis, P., & Scarsella, M. 2013. Effect of nitrogen and phosphorus starvations on *Chlorella vulgaris* lipids productivity and quality under different trophic regimens for biodiesel production. *American Journal of Plant Sciences*, 2013.
45. Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, 155, 330-333.

46. Breddy, A. R., Gupta, A., Barrow, C. J., & Puri, M. 2016. A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. *Journal of microbiological methods*, 125, 28-32.
47. Andeden, E.E, “Stres koşullarının bazı mikroalg türlerinde lipit verimine ve triaçilgliserol (tag) içeriğine etkisinin gen ekspresyon düzeyinde ortaya konulması ve yağ asidi profili ile ilişkili biyodizel kalitesinin araştırılması” Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s. 11, Temmuz (2021).
48. Gour, R. S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R. S., & Kant, A. (2016). Characterization and Screening of Native *Scenedesmus* sp. Isolates Suitable for Biofuel Feedstock. *PloS one*, 11(5), e0155321.
49. Burja, A.M., Armenta, R.E., Radianingtyas, H., Barrow, J. (2007). Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. *J. Agric. Food. Chem.* **55:12**, 4795-4801.
50. Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. ve Tiffany, D., 2006, Environmental, economic, and energetic costs and benefits of bioEurodiesel and ethanol biofuels, Proceedings of the National Academy of sciences, 103 (30), 11206-11210.
51. Felizardo, P., Correia, M.J.N., Raposo, Í, Mendes, J.F., Berkemeier, R., Bordado, J.M. (2006). Production of biodiesel from waste frying oil. *Waste Manage.* 26:5, 487-494.
52. Kondamudi, N., Strul, J., Misra, M., Mohapatra, S.K. (2009). A green process for producing biodiesel from feather meal. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 6163–6166.
53. Chung, K.H., Kim, J., Lee, K.Y. (2009). Biodiesel production by transesterification of duck tallow with methanol on alkali catalysts. *Biomass Bioenergy.* **33**, 155-158.

54. Fernández-Álvarez, P., Vila, J., Garrido, J.M., Grifoll, M., Feijoo, G. and Lema, J.M. 2007. Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy oil spill of the Prestige, *J. Hazard. Mater.* 147, 914-922.
55. GuanHua, H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology, *Appl. Energy.* 87 , 38-46.
56. Yan, J., and Lin, T. 2009. Biofuels in Asia, *Appl. Energy.* 86 , S1-S10.
57. Göktaş, M. S., “Mikroorganizmaların yenilebilir yağ üretimi potansiyelleri üzerine araştırma”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s. 49, Isparta, (2016).
58. Rachamontree P., Phusantisampan T., Woravutthikul N., Pornwongthong P., Sriariyanun M. Selection of *Pichia kudriavzevii* Strain for the Production of Single-Cell Protein from Cassava Processing Waste. *World Academy of Science Engineering And Technology International Journal* 2015; 9 (5): 517–21.
59. Oberoi HS., Babbar N., Sandhu SK., Dhaliwal SS., Kaur U., Chadha BS., et al. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2012; 39 (4): 557–66.
60. Park, H.J., Bae, J.H., Ko, H.J., Lee, S.H., Sung, B.H., Han, J.I., Sohn, J.H., 2018. 'Low-pH production of d-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 2232–2242.
61. Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Sista, V.R., Yadav, N.K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *W. J. Microbiol.* 8, 382-384.

62. Cing Yıldırım ve Kanat / Anadolu Üniv. Bil.Tek. Der. C – Yaşam Bil. ve Biyotek. 7 (X) – 2018.
63. Xue, F., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. 2006. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem.* 41, 1699-1702.
64. Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbatch, M. and Guebitz, G.M. 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 99, 3051-3056.
65. Easterling, E.R., French, W.T., Hernveez, R. and Licha, M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol.* 100, 356-361.
66. Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., and Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34, 1-5.
67. Zhu, L.Y., Zong, M.H. and Wu, H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour. Technol.* 99, 7881-7885.
68. Liu, B. and Zhao, Z.K., 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 775-780.
69. Li, M., Liu, G.L., Chi, Z. and Chi, Z. M. 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJJY15a, *Biomass Bioenergy* 34 , 101-107.
70. Ertuğrul Karatay, S., “Mikrobiyel lipitlerin biyodizel üretiminde kullanım kapasitelerinin belirlenmesi”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s. 86-87, Ankara, (2010).