

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

MİKROBİYAL LİPİT ÜRETİMİNDE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN  
MAYALARIN KULLANILMASI

Tezi Hazırlayan  
Ahmet ADIYAMAN

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

MİKROBİYAL LİPİT ÜRETİMİNDE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN  
MAYALARIN KULLANILMASI

Tezi Hazırlayan  
Ahmet ADIYAMAN

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Eylül 2021

NEVŞEHİR

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince gösterdiği büyük sabır ve özveri için danışmanım Sayın Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan Öğr. Gör. Dr. Enver Ersoy ANDEDEDEN'e,

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Mustafa AKAR, Mustafa GÜLTEKİN, İdris İŐNEL'e teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreçte her zaman yanımda olan sevgili eşim Rukiye ADIYAMAN ve oğullarım Yusuf Buğra ADIYAMAN ile Selim ADIYAMAN'a şükranlarımı sunarım.

# MİKROBİYAL LİPİT ÜRETİMİNDE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN KULLANILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Ahmet ADIYAMAN

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2021

ÖZET

Mayalar bazı koşullar altında hücre içinde yüksek miktarda lipit üretimi yaptıkları için biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilme potansiyeli olan mikroorganizmalardır. Bu çalışmanın amacı çok az çalışılmış olan gıda kaynaklı mikroorganizmalardan mayaların biyodizel üretim potansiyellerini belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda; izole edilen mayalar arasından azot yokluğu stresinde en yüksek lipit verimine ve biyodizel üretimi için uygun yağ asidi kompozisyonuna sahip maya izolatlarını keşfetmek hedeflenmiştir. Gıdalardan elde 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 karşılaştırılmış olup en yüksek değerlere sahip olan A10 ve A20 kodlu izolatlar *Pichia kudriavzevii* türü olarak tanımlanmışlardır. Tür tanımlaması yapılan A10 ve A20 kodlu izolatlara 30 °C sıcaklık 100 rpm ve 72 saat boyunca farklı pH (6-8-10) değerlerinde azot yokluğu stresi uygulanmıştır. Her iki izolatu da pH 10'da en yüksek % lipit miktarına ulaştığı (A10 %40, A20 %27) görülmüştür. A10 kodlu izolat pH 10'da 431,86 mg/L/gün ile en yüksek lipit verimine ulaşırken, A20 kodlu izolat ise pH 6'da 219,37 mg/L/gün ile en yüksek lipit verimine ulaşmıştır.

Maya hücrelerinden ekstre edilen lipitler transesterifikasyona uğratarak elde edilen metil esterleri GC-FID (Gaz kromatografisi-Alev iyonizasyon dedektörü) cihazında analiz edilmiştir. *Pichia kudriavzevii* olan A10 ve A20 izolatlarının metil ester (biyodizel) verimi sırasıyla A10 izolatu için %96,17 ve A20 izolatu için %95,85 olarak bulunmuştur. A10 ve A20 kodlu izolatların yağ asidi dağılımı A10 kodlu izolat için palmitik asit (%15,26), palmitoleik asit (%9,99), stearik asit (%9,72), oleik asit (%46,36) ve linoleik asit (%13,25) olarak bulunmuştur. A20 kodlu izolatta ise palmitik asit (%12,48), palmitoleik asit (%11,42), stearik asit (%10,97), oleik asit (%44,39) ve linoleik asit (%13,43) olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan maya lipitlerinin (*Pichia kudriavzevii*) çoğunluğunu C16 ve C18 metil esterlerinin oluşturması biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilme potansiyelini göstermektedir.

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

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

**Sayfa Adedi:** 68

# USING YEAST ISOLATED FROM FOOD IN THE PRODUCTION OF MICROBIAL LIPIDS

(M. Sc. Thesis)

Ahmet ADIYAMAN

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE

September 2021

## ABSTRACT

Yeasts are microorganisms that have the potential to be used as a raw material in the production of biodiesel, as they produce high amounts of lipids in the cell under certain conditions. The aim of this study is to determine the biodiesel production potential of yeasts from food-borne microorganisms that have been little studied. In accordance with this purpose; Among the isolated yeasts, it was aimed to discover yeast isolates with the highest lipid yield under nitrogen deficiency stress and suitable fatty acid composition for biodiesel production. Eight yeast isolates obtained from food were incubated at pH 5.5, 30 °C, 100 rpm (shaking speed) and 24 hours in both optimal medium (in the presence of nitrogen) and lipid production medium (lack of nitrogen) and compared in terms of lipid yield and % lipid content. A10 and A20 coded isolates with the highest values were defined as *Pichia kudriavzevii* species. Nitrogen deprivation stress was applied to A10 and A20 coded isolates, which were identified as species, at 30 oC temperature, 100 rpm and different pH (6-8-10) values for 72 hours. It was observed that both isolates reached the highest lipid content at pH 10 (A10 40%, A20 27%). The A10 coded isolate reached the highest lipid yield at pH 10 with 431.86 mg/day, while the A20 coded isolate reached the highest lipid yield at pH 6 with 219.37 mg/L/day. The methyl esters obtained by transesterification of lipids extracted from yeast cells were analyzed in the GC-FID (Gas chromatography-Flame ionization detector) device. The

methyl ester (biodiesel) yield of A10 and A20 isolates of *Pichia kudriavzevii* was found to be 96.17% for A10 and 95.85% for A20 isolate, respectively. Fatty acid distribution of isolates coded A10 and A20 For isolates coded A10, palmitic acid (15.26%), palmitoleic acid (9.99%), stearic acid (9.72%), oleic acid (46.36%), and linoleic acid (13.25%) was found. Palmitic acid (12.48%), palmitoleic acid (11.42%), stearic acid (10.97%), oleic acid (44.39%) and linoleic acid (13.43%) were found in the A20 coded isolate. The fact that C16 and C18 methyl esters form the majority of yeast lipids (*Pichia kudriavzevii*) used in the study shows the potential to be used as a raw material in biodiesel production.

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

**Thesis Supervisor:** Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

**Page Number:** 70



## 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. Biyodizel .....	3
2.2. Biyodizelin tarihçesi.....	5
2.3. Dünya’da ve Türkiye’de biyodizel üretimi .....	5
2.4. Biyodizelin yakıt kalitesi ve biyodizel kalite standartları.....	7
2.5. Biyodizelin avantajları ve dezavantajları.....	8
2.5.1. Biyodizelin avantajları .....	8
2.5.2. Biyodizelin dezavantajları .....	8
2.6. Biyodizel üretiminde kullanılan hammadde kaynakları .....	9

2.7.	Biyodizel üretiminde kullanılan mikroorganizmalar.....	10	
2.7.1.	Mikroalgler.....	11	
2.7.2.	Bakteriler.....	12	
2.7.3.	Fungus ve mayalar.....	12	
2.8.	Oleaginous mikroorganizmalarda biyokütle değişimi ve lipid birikimi.....	14	
2.9.	Triasilgliserollerin yakıt özelliklerinin iyileştirilmesi.....	16	
2.9.1.	Isıl yöntem.....	17	
2.9.2.	Kimyasal yöntem.....	17	
2.9.2.1.	Seyreltme.....	17	
2.9.2.2.	Mikroemülsiyon oluşturma .....	17	
2.9.2.3.	Piroliz .....	17	
2.9.2.4.	Transesterifikasyon .....	17	
3. BÖLÜM			
MATERYAL ve YÖNTEM .....			19
3.1.	Materyal .....	19	
3.1.1.	Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar.....	19	
3.1.2.	Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	20	
3.1.3.	Çalışmada kullanılan gıda örnekleri .....	21	
3.2.	Yöntem .....	21	
3.2.1.	Sıvı besiyeri hazırlanması .....	21	
3.2.2.	Katı besiyeri hazırlanması .....	21	
3.2.3.	Örnek alımı ve besiyerlerine ekim yapılması .....	21	
3.2.4.	İzolatların gram boyama işlemi .....	21	

3.2.5. İzolatların mikroskopta incelenmesi.....	22
3.2.6. Çalışmada kullanılacak maya kültürlerinin üretimi ve saklanması.....	22
3.2.7. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	22
3.2.7.1. Optimal besiyeri.....	22
3.2.7.2. Lipit üretim besiyeri.....	23
3.2.8. Azot yokluğu stres denemesinin uygulanması.....	23
3.2.9. Biyokütle veriminin hesaplanması .....	24
3.2.10. Toplam lipit miktarının hesaplanması.....	25
3.2.11. Lipit veriminin hesaplanması.....	25
3.2.12. Moleküler tanımlama .....	25
3.2.13. Moleküler tanımlaması yapılan A10 ve A20 kodlu izolatlara farklı PH larda azot yokluğu stresi uygulanması .....	27
3.2.14. Yağ asidi analizi.....	27
<b>4. BÖLÜM</b>	
<b>BULGULAR.....</b>	<b>28</b>
4.1. Çalışmada kullanılan maya izolatları.....	28
4.2. Azot yokluğu stresi altında maya izolatlarının lipit verimi bakımından seçilimi.....	29
4.3. Tür tanımlama sonuçları.....	30
4.4. A10 ve A20 kodlu izolatlara farklı pH larda azot stresi uygulama sonuçları....	30
4.5. Yağ asidi analiz sonuçları .....	31
<b>5. BÖLÜM</b>	
<b>TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>34</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>40</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>53</b>

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Biyodizelin petrol dizeli yakıtla karışım oranları.....	4
Tablo 2.2. 2019 yılı dünya biyodizel üretimi.....	6
Tablo 2.3. Bazı oleginous mikroorganizmaların sentezledikleri yağ oranı yüzdeleri....	14
Tablo 2.4. Yağların yakıt özelliklerini iyileştirme yöntemleri.....	17
Tablo 3.1. Tez kapsamında kullanılan alet ve cihazlar .....	19
Tablo 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar.....	20
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan optimal besiyeri içeriği.....	22
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyeri içeriği .....	23
Tablo 3.5. Moleküler tanımlama konsantrasyon değerleri .....	26
Tablo 4.1. İzolatların kodları ve izole edildikleri gıda kaynakları.....	28
Tablo 4.2. İzolatların biyokütle verimleri, % lipit miktarları ve lipit verimleri.....	29
Tablo 4.3. A10 ve A20 kodlu izolatların tür tanımlama sonuçları.....	30
Tablo 4.4. A10 ve A20 kodlu örneklerin farklı pH değerlerinde biyokütle verimi, toplam lipit miktarı, % lipit miktarı ve lipit verimi.....	31
Tablo 4.5. <i>Pichia kudriavzevii</i> A10'dan ekstre edilen lipitlerin transesterifikasyonu sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı .....	32
Tablo 4.6. <i>Pichia kudriavzevii</i> A20'den ekstre edilen lipitlerin transesterifikasyonu sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı.....	32
Tablo 5.1. Farklı pH larda % lipit miktarları .....	37

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1 Triglicerid ve alkolün transesterifikasyonu..... 10
- Şekil 2.2. Kesikli kültürde gelişen oleaginous mayalarda lipit birikimi..... 15
- Şekil 2.3. Transesterifikasyon reaksiyonu genel gösterimi..... 18



## RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1. A10 Kodlu izolatın mikroskop görüntüsü..... 28



## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>YAME</b>	Yağ asidi metil esteri
<b>ASTM</b>	Uluslararası Amerikan Test ve Materyalleri Topluluğu
<b>CH4</b>	Metan
<b>EN</b>	Avrupa Standartları
<b>KOH</b>	Potasyum hidroksit
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>PM</b>	Partikül madde
<b>%</b>	Yüzde
<b>EPDK</b>	Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu
<b>µg/l</b>	Mikrogram/Litre
<b>mg</b>	Miligram
<b>L</b>	Litre
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>(NH4)2SO4</b>	Amonyum sülfat
<b>KH2PO4</b>	Potasyum fosfat
<b>g</b>	Gram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>TAG</b>	Triaçilgliserol
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>Rpm</b>	Revolutions Per Minute/ dakikada devir sayısı
<b>CO</b>	Karbon monoksit
<b>CO2</b>	Karbon dioksit

<b>CxHy</b>	Hidrokarbon
<b>EtOH</b>	Etil alkol (Etanol)
<b>H2SO4</b>	Sülfirik asit
<b>H3PO4</b>	Fosforik asit
<b>MeOH</b>	Metil alkol (Metanol)
<b>NO<sub>x</sub></b>	Azot oksitler
<b>ÖTV</b>	Özel Tüketim Vergisi
<b>SO<sub>2</sub></b>	Kükürt dioksit
<b>SO<sub>x</sub></b>	Kükürt oksitler
<b>TSE</b>	Türkiye Standartları Enstitüsü
<b>PAH</b>	Polisiklik Aromatik
<b>SCO</b>	Tek hücre yağları
<b>HF</b>	Hidroflorik asit
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar
<b>N<sup>+</sup></b>	Azot varlığı
<b>N<sup>-</sup></b>	Azot yokluğu
<b>NCBI</b>	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
<b>MUFA</b>	Tekli doymamış yağ asitleri
<b>PUFA</b>	Çoklu doymamış yağ asitleri



# 1. BÖLÜM

## GİRİŞ

Enerji, tüm toplumlarda ekonomik ve sosyal kalkınma ile yaşam kalitesinin geliştirilmesi için temel bir ihtiyaçtır. Tüm dünya ülkelerinin giderek kalkınmasıyla ortaya çıkan enerji talebindeki artış ve bu talebin giderek azalan sonlu olduğu bilinen petrol, doğalgaz ve kömür gibi fosil enerji kaynaklarından karşılanıyor olmasının yanında giderek artan çevresel kaygılar insanlığı yeni ve yenilenebilir enerji kaynakları aramaya yönlendirmektedir. Dünyada ve ülkemizde alternatif enerji kaynakları arasında değerlendirilen ve son zamanlarda önemi oldukça artan yenilenebilir enerji kaynaklarından birisi de biyodizeldir. Biyodizel, bitkisel ve hayvansal yağlar ile atık yağlar gibi yerli ve yenilenebilir kaynaklardan üretilen alternatif bir yakıttır ve petrol dizeli yakıtların ikamesi olarak büyük ilgi görmüştür. Biyodizel doğal kayganlık, üstün parlama noktası ve doğada kendiliğinden biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi birçok avantaja sahiptir [1]. Fosil yakıtlardan atmosfere yüksek oranda salınan karbondioksit ve kükürt emisyonları biyodizelde çok düşük oranlardadır. Bu nedenle küresel ısınma için çevre dostu bir çözüm olarak kabul edilir [2]. Biyodizel, yenilenebilir biyokütleden elde edilen triaçilgliserollerin veya serbest yağ asitlerinin bazlar, asitler veya enzimler gibi farklı türdeki katalizörlerin varlığında kısa zincirli alkoller ile transesterifikasyona uğratılması sonucu metil esteri veya etil esteri şeklinde oluşan biyolojik kökenli dizel bir yakıttır [3,4]. Bugün palmiye yağı, soya fasulyesi yağı, kolza yağı ve ayçiçek yağı gibi bitkisel yağlar, birçok ülkede biyodizel üretimi için hammadde olarak kullanılmaktadır [5]. Bununla birlikte, bitkisel yağlar nispeten pahalıdır. Yaygın bir gıda maddesi olan bitkisel yağların önemli bir miktarının biyodizel üretimine tahsis edilmesi, bitkisel yağ kıtlığına neden olabilir [6].

Mayalar, mantarlar ve mikroalgler gibi oleginous mikroorganizmalar, uygun yetiştirme koşulları altında yüksek miktarlarda (TAG) depo lipitleri biriktirebilir. Gıda bileşenleri, antimikrobiyal aktivite ve biyodizel üretimi gibi potansiyel biyoteknolojik uygulamalar nedeniyle tek hücreli yağlar (SCO) olarak adlandırılan mikrobiyal lipid bileşiklerine artan bir ilgi vardır [7]. Heterotrofik oleginous mikroorganizmalar büyük ilgi

görmüştür. Oleginous mikroorganizma kullanımı, biyodizel üretiminde triaçilgliserol (TAG) kaynağı olarak başarıyla kullanılmıştır [3,8]. Bitkisel yağlara benzer yağ asitleri bileşimi ve enerji değeri sergileyen mayalar, kısa yaşam döngüsünün yanı sıra birçok avantaja da sahiptir. Herhangi bir yerde üretilebilirler, mevsim veya iklimten etkilenmezler, ölçek büyütme kolaydır ve çeşitli maddeler üzerinde yetiştirilebilirler ve bu nedenle bitkisel yağların birçok sınırlamasının üstesinden gelmeyi vaat ederler [6]. Oleginous mayalar, lipit cisimleri olarak bilinen özel hücre içi bölmelerde depolanan yüksek miktarlarda nötr lipitleri sentezleyebilir ve biriktirebilir [9]. Oleginous mayaların hücrelerinde depo ettiği yağın büyük çoğunluğu triaçilgliserol formundadır [10]. Oleginous maya türleri, kuru ağırlıklarının %70'ine varan lipit verimleri ile hücre başına oldukça üretkendir ve 3 ila 7 gün içinde 10 ila 100 g / L'ye varan biyokütle verimleri ile yüksek çoğalma hızına sahiptir [11,12]. Biyoyakıt üretimi için şimdiye kadar incelenen en yaygın mayalar *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* ve *Lipomyces*'dir [11,13]. Besi yerindeki birincil besin elementlerinin özellikle de azotun tükenmesi organizmada lipit sentezini tetiklemektedir. Ortamda azot bakımından bir açlık yaratılırken aynı zamanda karbon miktarının arttırılması C/N oranı lipit üretimi açısından son derece önemlidir. Ortamdaki azotun azalması hücre gelişimini sınırlarken, arttırılan karbon miktarı mikroorganizmalar tarafından yağ asitlerine daha sonra da trigliseritlere dönüştürülmektedir [14].

Bu çalışmanın amacı, farklı gıda kaynaklarından izole edilen mayaların biyodizel üretim potansiyellerini belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda; izole edilen mayalar arasından azot yokluğu stresinde en yüksek lipit verimine ve biyodizel üretimi için uygun yağ asidi kompozisyonuna sahip maya izolatlarını keşfetmek hedeflenmiştir.

## 2. BÖLÜM

### 2.1. Biyodizel

Enerji; günümüzde tüm toplumların hayat standartlarının mevcut seviyede sürdürülebilmesi ve bu seviyenin daha da geliştirilmesi için sahip olunması gereken başlıca unsurdur. Dünyada sürekli artan enerji talebine karşın fosil kökenli enerji kaynaklarının giderek tükenmesi ve çevreye verdiği zararların ortaya çıkması ülkeleri çevreye dost, yenilenebilir temiz enerji kaynakları bulmaya bu kaynakları geliştirmeye yönlendirmiştir. Uluslararası Enerji Ajansı verilerine göre 2000-2030 yıllarında enerji kaynaklarının payının fosil enerji için %85, yenilenebilir enerji için ise %15 düzeyinde olması öngörülmektedir [15].

Biyodizel, dizel yakıtı alternatif olarak üretilen emisyon değerleri daha düşük, biyolojik olarak doğada kolay parçalanabilen, çevre açısından toksik bir etki içermeyen, yenilenebilir bir yakıt türüdür. Ayrıca yüksek setan sayısı, yüksek yanma verimliliği ve dizel yakıtı göre yüksek oksijen içeriği açısından üstün bir yakıt türüdür. Biyo kelimesi biyolojik kökenli yenilenebilir bir yakıt türü olduğunu gösterirken dizel kelimesi ise petrol kökenli dizel yakıtı yerine kullanılabileceğini göstermektedir [16,17]. Biyodizelin enerji düzeyi ve fizikokimyasal yapısı dizel yakıtı son derece yakındır. Geleneksel motorların yapısında değişiklik yapılmadan veya çok küçük modifikasyonlar ile biyodizel saf olarak ya da belli oranlarda dizel yakıtı harmanlanarak kullanılabilir [17]. Dizel yakıtların belli oranlarda biyodizel ile harmanlanarak kullanılması motor parçalarının uzun süre sorunsuz bir şekilde çalışmasında önemli olan yağlayıcılık özelliğini artırmaktadır. Biyodizel saf ve dizel-biyodizel karışımları şeklinde yakıt olarak kullanılmaktadır.

Tablo 2.1. Biyodizelin petrol dizeli yakıtla karışım oranları [18]

B5 : %5 Biyodizel + %95 Dizel
B20 : % 20 Biyodizel + %80 Dizel
B50 : % 50 Biyodizel + %50 Dizel
B100 : %100 Biyodizel

Biyodizel; bitkilerden, hayvanlardan, alglerden, mayalardan ve bakterilerden elde edilen yağların, bir katalizör (asit, baz veya enzim) eşliğinde kısa zincirli bir alkol ile (metanol veya etanol) transesterleştirilmesi sonucunda ortaya çıkan biyolojik kökenli bir yakıttır. Biyoenerjinin umut verici formlarından biri olan biyodizel, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, yenilenebilir biyokütleden elde edilmesi gibi üstünlüklere sahip olması nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür [19].

Biyodizel, esas olarak bitkisel yağların transesterifikasyonu ile üretilir. Bitkisel yağ üretimi iklim koşullarına, mevsimlere, ekilebilir arazilerin varlığına ve iş gücü gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Tek hücre yağı (SCO) olarak bilinen mikrobiyal yağlar, bitkisel yağlara benzer bir yağ asidi bileşimine sahip olduklarından bitkisel yağların yerini alabilecek en umut verici yenilenebilir yağ kaynaklarıdır [20]. Alternatif bir dizel yakıtı olan biyodizelin; yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve çevreye herhangi bir toksik etkisinin bulunmaması nedeniyle son yıllarda giderek artan bir ilgi görmektedir. Bitkisel yağlar, hayvansal yağlar ve atık pişirme yağları dahil olmak üzere çeşitli lipit kaynakları biyodizel üretimi için hammadde olarak kullanılmıştır [21]. Ancak, biyodizel üretiminde kullanılacak bitkilerin ekimi, arazi mevcudiyeti, mevsim ve iklim ile sınırlıdır. Bunun yanında, biyodizel üretimi için büyük miktarlarda bitkisel yağ tüketimi, yemeklik yağ kıtlığına ve gıda fiyatlarında artışa yol açmaktadır [22]. Biyodizel üretim maliyeti, hammadde olarak hayvansal yağların veya atık pişirme yağlarının kullanılmasıyla belli oranda azaltılabilir de, bu kaynaklar sınırlıdır ve biyodizel üretimi için artan talebi destekleyemez [23]. Bu nedenle, mikroorganizmalar (algler, funguslar, mayalar, bakteriler) tarafından kısa sürede üretilebilen ve yağ asidi içeriği bakımından bitkisel yağlara benzerlik gösteren mikrobiyal lipit üretiminin araştırılması gerekir. Oleginous mayalar artık biyodizel üretimi için potansiyel bir lipit kaynağı olarak kabul edilmektedir [24].

## **2.2. Biyodizelin tarihçesi**

Biyoyakıtların gelişim süreci teknolojik gelişmelerden daha çok dünyada yaşanan ekonomik ve politik krizlerden etkilenmiştir. Bitkisel yağlardan transesterifikasyon yöntemi ile gliserin üretimi 1800'lü yıllardan beri bilinmektedir. Ancak Rudolf Diesel tarafından icat edilen dizel motorun yer fıstığı yağı ile 1898'de Dünya Fuarında çalıştırılması bitkisel yağ ve türevlerinin yakıt olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Ancak petrolün daha revaçta olması nedeniyle yeterli ilgiyi görmemiştir. 1970'lerde yaşanan petrol krizi nedeniyle alternatif enerji kaynakları tekrar gündeme gelmiştir. Biyodizel ismi ilk olarak 1992 yılında Amerika Ulusal Soydiesel Geliştirme Kuruluşu tarafından kullanılmıştır [18,25].

## **2.3. Dünya'da ve Türkiye'de biyodizel üretimi**

Dünya üzerindeki hızlı nüfus artışı, sanayileşmenin artmasından dolayı dünyada enerjiye olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Buna karşın fosil yakıtların rezervleri giderek azalırken fiyatlarındaki artış ve istikrarsızlığın yanında çevreye vermiş olduğu büyük zararlar bu zararların telafisi için yapılan büyük harcamalar, ülkelerin enerji kaynaklarını çeşitlendirerek enerji güvenliğini sağlama ve dışa bağımlılıktan kurtulma gibi stratejileri ülkeleri yenilenebilir ve temiz enerji kaynakları bulmaya yönlendirmektedir [26,27]. Ülkeler bu nedenlerden dolayı biyodizel gibi çevre dostu ve yenilenebilir yakıt türlerine yönelmektedir. Biyodizel üretiminde başarı sağlayabilmek için hammadde tedarikinden, biyodizel üretim sürecine kadar titizlikle planlanmalıdır. Temel gıda kaynakları arasında yer alan yağlı tohum bitkilerinin enerji üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanılması yerine mikroorganizmalarca üretilen mikrobiyal lipidlerin kullanımı çok daha faydalı olacaktır. Bunun nedeni biyodizelin üretim miktarının arttırılabilmesi, petrol dizeli yakıtla rekabet edebilmesi önündeki en büyük engel olan hammaddesinin insan besin kaynağı olarak da kullanılan dizel yakıtı göre daha pahalı olan bitkisel yağların kullanılmasıdır.

Tablo 2.2. 2019 yılı dünya biyodizel üretimi [28]

Sıra No	Ülke	2019
1	Endonezya	137.86
2	ABD	112.49
3	Brezilya	99.95
4	Almanya	62.29
5	Arjantin	43.08
6	Fransa	40.02
7	İspanya	36.61
8	Hollanda	35.08
9	Tayland	30.24
10	Malezya	29.12
...	...	...
30	Türkiye	2.37

Endonezya, biyodizel üretiminde dünyada birinci sırada yer almaktadır. 2019 yılı verilerine göre Endonezya'da biyodizel üretimi günlük 137.86 bin varil olarak gerçekleşmiştir. İlk 5 ülke arasında Endonezya, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Almanya ve Arjantin yer almaktadır. Endonezya'daki biyodizel üretimi, dünya biyodizel üretiminin %17,55'ini oluşturmaktadır. Dünya biyodizel üretiminde ilk beşte yer alan ülkeler toplam üretimin %57,99'unu oluşturmaktadır. Ülkemiz biyodizel üretiminde 2019 yılı verilerine göre otuzuncu sırada yer almaktadır [28].

Ülkemizde 16 Haziran 2017 tarih ve 30098 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu (EPDK) tebliği ile 1 Ocak 2018 tarihinden itibaren motorine %0,5 oranında yerli tarım ürünlerinden ve bitkisel atık yağlardan üretilmiş biyodizel yağ asidi metil esteri (YAME) harmanlanması zorunlu hale getirilmiştir [29]. Biyodizel ülkemizde en önemli alternatif yakıt seçeneklerinin başında gelmektedir. Ülkemizde petrol kaynaklı enerji tüketiminin yalnızca %15' iç kaynaklardan karşılanmaktadır. Geri kalan kısmı ithalat yoluyla yurt dışından karşılanmakta olup enerji temininde yurt dışına bağımlılığın sürmesine neden olmaktadır. Biyodizelin ülkemizde yaygınlaşması petrol tüketimini azaltacak; aynı zamanda dizel yakıttan kaynaklanan egzoz gazı emisyonlarını da düşürecektir [30]. Zira Kyoto Protokolü, üye ülkelerden iklim değişikliğine ve küresel ısınmaya neden olan çeşitli emisyon gazlarının

salınımlarını sınırlayan ve azaltan tedbirler almalarını aynı zamanda yenilenebilir enerji kaynaklarını teşvik etmelerini istemektedir. Ülkemiz Kyoto Protokolüne üye ülkeler arasında yer almaktadır. Biyodizelin yenilenebilir kaynaklardan üretilmesi ve zararlı emisyonları azaltması Kyoto Protokolü taahhütleri açısından son derece önemlidir [31].

Ülkemizde biyodizel üretim maliyetinin büyük kısmını hammadde oluşturmaktadır. Hammadde fiyatı yüksek olan biyodizelin fiyatı üzerine özel tüketim vergisinin de eklenmesi ile biyodizel petrol kaynaklı dizel yakıtlarla fiyat açısından rekabet edemeyecek duruma gelmektedir. Ülkemizde sadece biyodizelin motorinle harmanlanmış %2'lik kısmı özel tüketim vergisinden muaftır. Ülkemizde kullanılan dizel motorlu araçların sayısının bir hayli fazla olması %2 lik biyodizel ilavesini bile önemli hale getirmektedir. Ülkemizde kullanılan motorin çeşitlerinin biyodizel ile %0,5 oranında harmanlanma zorunluluğu vardır [29]. Bu oran başka ülkelere kıyasla düşüktür. Biyodizel kullanımını teşvik edecek yeni düzenlemelerin yapılması biyodizel üretimini artırırken enerjide dışa bağımlılığı azaltacaktır. Ülkemizde biyodizel üretim lisansı bulunan firmalardan 2020 yılında sadece 4 adet firma üretim gerçekleştirmiştir. 2020 yılı toplam üretim miktarı 74575 (ton /yıl) olarak gerçekleşmiştir [32].

#### **2.4. Biyodizelin yakıt kalitesi ve biyodizel kalite standartları**

Biyodizel üretiminde kullanılan hammadde kaynağı ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Amerika'da daha çok soya yağı kullanılırken Avrupa'da kanola yağı kullanılmaktadır. Biyodizel üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynaklarının yanında farklı katalizör ve farklı alkol türleri de kullanılmaktadır. Bu yüzden biyodizel için belli standartlar oluşturulmuştur. Avrupa'da biyodizel standardı EN 14214 olarak Amerika'da ASTM D6751 olarak adlandırılmaktadır. Ülkemizde ise Avrupa standardı esas alınmıştır. Ülkemizde biyodizelle ilgili ilk standart 2005 yılında yayınlanmıştır. Geçen süre içinde birçok değişikliğe uğramış olup 29.04.2019 tarihinde “ TS EN 14214+A1 – Sıvı Petrol Ürünleri – Yağ Asidi Metil Esterleri (YAME/Biyodizel) – Dizel Motorlarda ve Isıtma Uygulamalarında kullanılan” adı ile kabul edilmiştir [33].

## **2.5. Biyodizelin avantajları ve dezavantajları**

### **2.5.1. Biyodizelin avantajları**

Biyodizel fosil yakıtlara bağımlılığı azaltır ve alternatif bir enerji kaynağıdır. Transesterifikasyon sonucu elde edilen biyodizel mevcut motor teknolojilerinde doğrudan ya da küçük değişikliklerle kullanılabilir. Daha düşük emisyon değerlerine sahiptir. Setan sayısı bakımından petrol dizeli yakıtla kıyaslandığında üstün olduğundan motor gürültüsü düşüktür ve vuruşu yapmaz [34]. Depolama koşulları açısından petrol dizeli yakıt ile aynıdır. Saf olarak kullanılabilmesi gibi petrol dizeli yakıtla her oranda harmanlanabilir. Biyodizelin yağlayıcı özelliği petrol dizeli yakıttan üstün olduğundan motorun ömrünü uzatır [35,36]. Biyodizel petrol dizeli yakıtla kıyaslandığında da güç çıktısı, alevlenme ve motor performansı açısından yakın değerlere sahiptir [37]. Biyodizel yakıt olarak taşıma ve depolanma açısından son derece güvenlidir. Biyodizelin parlama noktası 149°C iken petrol dizeli yakıt için bu değer 125°C dir. Yenilenebilir ve yerel kaynaklarla üretilebilir. Yapısında bulunan C16-C18 metil esterleri kolay ve hızlı bir şekilde biyolojik olarak parçalanır. Çevreye toksik bir etkisi yoktur ve çevre dostu bir yakıt türüdür. Biyodizel saf olarak yada dizel/biyodizel olarak belli oranlarda harmanlanarak kullanıldığı zaman partikül madde (PM), hidroflorik asit (HF), kükürt oksitler (SO<sub>x</sub>), metan (CH<sub>4</sub>) ve karbon monoksit (CO) emisyonları azalmaktadır. Biyodizelin yakıt olarak kullanılması dizel yakıtlara göre hava kirliliğini %50 oranında azaltmaktadır [38]. Küresel ısınmayı ve etkisini azaltır. Fosil kökenli yakıtların neden olduğu çevresel tahribatı azaltır. Egzoz emisyonlarının sağlık açısından riskini azaltır. Biyodizel suya bırakıldığında 28 günde %95 çözülme görülmüş ancak bu oran petrol dizeli yakıtta %40'a kadar düşmektedir. Bu nedenle, tüm dünyada deniz, göl, nehir ve su içeren yerlerde kullanılan nakliye araçlarında ve gemilerde yakıt olarak çoğunlukla biyodizel kullanılmaktadır [39].

### **2.5.2. Biyodizelin dezavantajları**

Uçuculuğu dizel yakıtla oranla düşüktür [40]. Soğuk hava şartlarında akma ve bulutlanma gibi özelliklerinin daha yüksek olması nedeniyle kullanımında sıkıntılar yaşanabilmektedir [41]. Isıl değer olarak petrol dizeli yakıttan daha düşük olduğu için yakıt tüketimi artmaktadır [42]. Kinematik viskozitesi dizel yakıttan daha yüksektir [43]. Oksijen içeriğinin yüksekliğinden dolayı yanma esnasında nispeten daha fazla



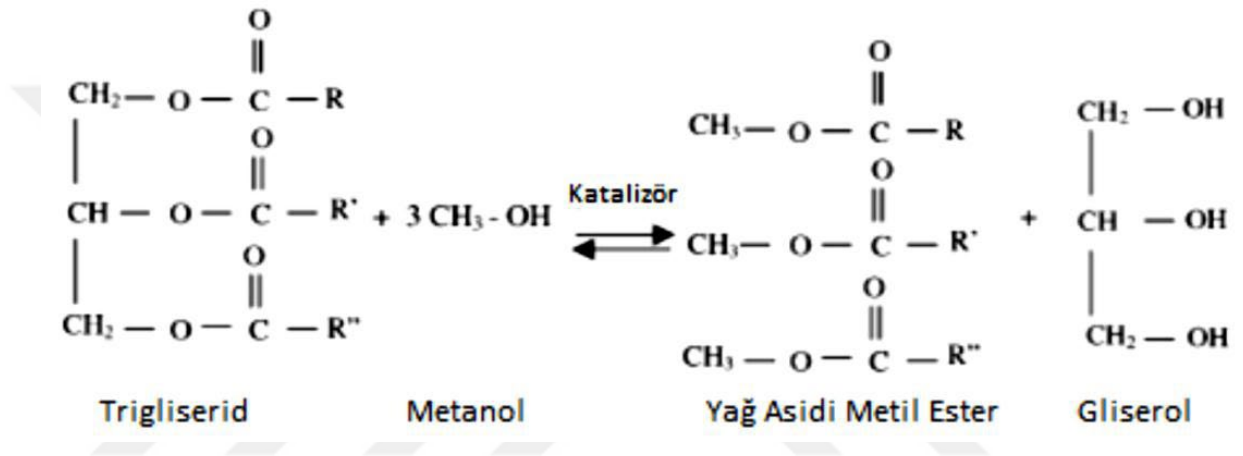
NO<sub>x</sub> oluşumuna sebep olur. Oksidasyon kararlılığının düşük olmasından dolayı uzun süreli depolama durumunda araç bileşenlerine zarar verecek ürünler ortaya çıkabilir. Biyodizel çözücü özelliğinden dolayı yakıt deposu ve borulardaki kalıntıları çözmektedir bu sebeple filtrelerin tıkanma ihtimali için bir takım önlemler alınması gerekmektedir [44].

## **2.6. Biyodizel üretiminde kullanılan hammadde kaynakları**

Biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak günümüzde en fazla kullanılan kaynakların başında bitkisel, hayvansal yağlar ve atık kızartma yağları gelmektedir [45]. Tüm dünyada üretilen toplam biyodizelin yaklaşık %95 gibi yüksek bir bölümü insan beslenmesinde kullanılan yağların hammadde olarak kullanılmasıyla elde edilmektedir. Bu yüzden biyodizelin maliyetinde en büyük payı besin olarak kullanılan bu bitkisel yağlar almaktadır. Bitkisel yağların üretiminde geniş arazilere olan ihtiyacın yanında bu bitkisel yağların biyodizel üretiminde kullanılması insan yaşamı için temel besin kaynaklarından olan bu gıdalara ulaşmasında zorluklar yaratacağı gibi bu ürünlerde kıtlığı da tetikleyebilir. Zira insan nüfusu günümüzde hala artmaya devam etmektedir [8]. Biyodizelin üretiminde insanların besin olarak kullandığı yağlar yerine besin olarak kullanılmayan yağların kullanımı ile yüksek maliyetler daha aşağıya çekilebilmiştir [46]. Atık kızartma yağları besin kaynağı olan yağlar yerine biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır [47].

Biyodizel üretiminde maliyetin yaklaşık %75'ni hammadde oluşturmaktadır. Bitkisel kaynaklı biyodizelin fiyatı ile atık fosil yakıt kaynaklı dizelin fiyatları mukayese edildiğinde bitkisel kaynaklı biyodizel fiyatı petrol dizelinin yaklaşık 1.5 katıdır. Bunun yanında atık kızartma yağlarından elde edilen biyodizelin fiyatı, bitkisel yağların kullanılması ile üretilen biyodizelden fiyat olarak iki üç kat daha az maliyete sahiptir [48]. Atık kızartma yağlarından biyodizel elde edilmesinde yaşanan başlıca zorluk ise yüksek sıcaklığa ulaşan kızartma yağında meydana gelen oksidasyon, polimerizasyon ve yağ asitlerinde meydana gelen hidroliz gibi bazı fiziksel ve kimyasal değişimlerin ortaya çıkmasıdır [49]. Biyodizel üretiminde en çok kullanılan hayvansal yağların başında tavuk atıklarından kalan yağlar ve hayvanların kuyruk yağları gelmektedir [50].

Yapısında bir adet yağ asidi bulunan gliseritlere monogliserit, iki adet yağ asidi olanlara digliserit, üç molekül yağ asidi bulunanlar ise trigliseritler olarak adlandırılır. Trigliseritler yağın ana bileşenidir. Bitkisel ve hayvansal yağlar gliserine bağlı üç yağ asidinden oluşmaktadır. Bu yüzden bitkisel yağlar trigliserit olarak adlandırılmaktadır [51].



Şekil 2.1. Trigliserid ve alkolün transesterifikasyonu [51]

## 2.7. Biyodizel üretiminde kullanılan mikroorganizmalar

Mikrobiyal yağlar (tek hücre yağları) bakteri, maya, mantar ve mikroalgler gibi birçok mikroorganizma türü tarafından sentezlenebilmektedir. Bu yağların biyodizel üretiminde kullanılan bitkisel yağlara potansiyel bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bu yağları üretebilen mikroorganizmalar bitkisel yağların üretimine göre çeşitli avantajlara sahiptirler. Değişen iklim ve mevsim şartlarından çok fazla etkilenmezler, kısa sürede hızlı çoğalır ve hücrelerinde yüksek miktarda lipid biriktirebilirler [52]. Oleginous mikroorganizmalar mikrobiyal lipid üretim kapasitelerinin yüksek olmasından dolayı biyodizel üretiminde potansiyel bir hammadde kaynağı olarak görülmektedir [53]. Biyodizel üretiminde kullanılan hammaddenin yüksek fiyatı ve tüm üretim süreci içindeki maliyetin yaklaşık %75'ni hammaddenin oluşturması nedeniyle biyodizel petrol türevi yakıtlara göre fiyat olarak

ekonomik bir yakıt olmaktan uzaktır [48]. Biyodizel üretimi için sınırlı olan hammadde kaynaklarına yeni alternatifler bulmak için yüksek oranda bitkisel yağlara benzer nitelikte mikrobiyal yağ üretme kapasitesine sahip oleginous mikroorganizmalar araştırmacıların dikkatini çekmektedir [2]. Mikrobiyal lipitler, toplam kuru biyokütle ağırlıklarının %20'sinden fazla lipit sentezleyen ve biriktiren oleginous mikroorganizmalar tarafından üretilir ve belirli koşullarda bu oran %70'e kadar ulaşabilir [21]. Azot sınırlayıcı koşullar altında, karbon kaynaklarının (glikoz) fazlalığı biyokütle üretimi için değil, daha çok biyodizel üretiminde kullanılan başlıca trigliseritler olmak üzere lipidlerin sentezi için kullanılmaktadır [54].

Fungus, bakteri, maya ve mikroalg gibi birçok mikroorganizma biyokütellerinin %20'sinden fazla bir oranda yağ biriktirebilmektedir [55]. Ayrıca mikrobiyal yağlar, yapıları ve yağ asidi bileşiminden dolayı biyodizel uygulamalarında hammadde olarak bitkisel yağlara alternatif olmaktadır [56].

### **2.7.1. Mikroalgler**

Mikroalgler çoğunlukla triaçilgliserol formunda lipit üretirler, bu lipitler ise çok yüksek miktarda C16 ve C18 numaralı karbon atomları içerir. Mikroalg hücrelerinin lipit biriktirme aralıkları %1 ile %70 aralığında değişim gösterse de mikroalgler için yetiştirme koşullarının optimizasyonu sağlandığında bu oranın %90 oranına ulaşabildiği bilinmektedir [2]. Palmitoleik asit (C 16:1), oleik asit (C 18:1), linoleik asit (C 18:2) ve linolenik asit (C18:3) gibi doymamış yağ asitleri mikroalgler de palmitik asit (C 16:0) ve stearik asit (C 18:0) gibi doymuş yağ asitlerinden daha fazla miktarda üretilir. Doymuş yağ asitlerinin oranı doymamış yağ asitlerinden daha düşüktür [57]. Mikroalgler tarafından üretilen uzun zincirli yağ asitleri, biyodizel üretiminde mikrobiyal hammadde kaynaklarından biridir [58]. Daha kısa sürede çoğalmaları, fiziksel olarak daha küçük alanlarda üretilebilmeleri mikrobiyal yağ üretim miktarının daha yüksek olması mikroalglerin makroalglerden üstün yanları arasında yer alır [59]. Alglerden üretilen biyodizelin petrol kökenli yakıtlardan üretilen dizel yakıtıya yakın bir performans ortaya koyduğu, emisyon açısından değerlendirildiğinde hidrokarbon, CO, SO<sub>x</sub> ve partikül maddenin petrol dizeli yakıtlardan çok düşük oranlarda olduğu sadece NO<sub>x</sub> emisyonunda bir miktar artış gözlemlendiği ortaya konulmuştur [60]. Araştırmacılar

mikroalglerin diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında iyi bir mikrobiyal yağ üreticisi olduğunu ancak fotosentez ihtiyacından dolayı çok geniş alanlara ihtiyaç duyduklarını, çoğalmalarında mevsimsel koşulların etkili olduğunu ve suya olan ihtiyacının yüksek olmasından dolayı üretim maliyetleri bir hayli yüksektir [61].

### 2.7.2. Bakteriler

Bakterilerden çok az bir kısmı biyodizel üretiminde kullanılan triaçilgliserollerini sentezler. Çoğunlukla polihidroksialkanoik asit ve polihidroksibütirik asit gibi depo yağları üretirler [62]. Bakteriler diğer mikroorganizmalardan daha hızlı çoğalmaya karşı bakterilerin meydana getirdiği yağ asidi içeriği diğer kaynaklardan elde edilen yağ asitlerinden farklı formdadır. Bakteriler dallanmış yağ asitleri ve doymamış yağ asitleri gibi yağ asidi sentezleme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenlerden biyodizel üretiminde mikrobiyal yağ üreticisi olarak pek fazla tercih edilmemektedir [63]. Genel olarak bakterilerin lipit içerikleri ortalama %20-40 arasında değişmektedir. Bu alglerle kıyaslandığında düşük bir oran olsa da bakterilerin çok hızlı bir şekilde çoğalması biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilirlik ihtimalini desteklemektedir. Fakat lipit üreticisi bakteri sayısı çok sınırlıdır. Birkaç bakteri türü yapılarında polihidroksialkanoat biriktirebilmektedir. Dış zarda yer alan bu yapıların ekstrakte edilmeleri güçtür. Bu nedenle yüksek lipit içeriğine sahip olsa bile biyodizel üretiminde hammadde olarak tercih edilmesi ekonomik değildir [2].

### 2.7.3. Funguslar ve mayalar

Funguslar (filamentli funguslar ve tek hücreli mayalar) oleginous mikroorganizmalar olarak uzun zamandan beri dikkatleri üzerine çekmektedir. Hücrelerinde kuru ağırlıklarının %70'i kadar lipit biriktirebilme özelliğine sahip *Rhodospiridium* sp, *Rhodotorula* sp, ve *Lypomyces* sp, gibi çeşitli maya türleri mevcuttur. *Mortierella* sp. cinsine ait türler ise yüksek lipit biriktirebilme yeteneği açısından funguslara iyi bir örnek teşkil etmektedir. Küfler ve oleginous maya türleri doymamış yağ asitleri bakımından zengin olan triaçilgliserol formunda mikrobiyal lipit depo etme özelliğine sahiptir. Bu hücrelerin sahip olduğu yağ asitlerine bakıldığında C18:1, C18:2, C16:0, C16:1 gibi yağ asidi türleri yüksek miktarda bulunmaktadır. Funguslar ve oleginous maya türlerinin alternatif birer mikrobiyal yağ üreticisi olduğu görülmektedir [2].

Bazı maya ve filamentli fungusların ürettikleri mikrobiyal yağlar hammadde kaynağı olarak biyodizel üretiminde yer almaktadır. Filamentli fungusların biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak yer alması için yapılan çalışmalar çok eski değildir. *Humicola lanuginosa* kuru hücre ağırlığının %75'i oranında mikrobiyal yağ sentezlerken, *Aspergillus oryzae* kuru hücre ağırlığının %57'si oranında yağ sentezleyebilmektedir [64].

Oleginous mayalar, kuru hücre ağırlıklarının %20'si üzerinde lipit sentezleyebilirler. Ürettikleri bu lipitler içeriği ve enerji değerleri açısından hayvansal ve bitkisel yağlara benzer bir yapıdadır. Bunun yanında mayaların üretileceği fermentasyon prosesleri mevsim koşullarından etkilenmez ve lipitleri kısa bir sürede sentezleyebilir [65]. 1970'li yıllardan beri oleginous mayaların lipit sentezleme yetenekleri bilinse de, biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanımına ilişkin araştırmalar son yıllarda artmıştır. Biyodizel üretiminde kullanılacak maya türleri birçok doğal yaşam ortamında bulunabilir [66].

Mikrobiyal yağ, maya, mikroalg, bakteri ve mantar gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir. Aslında mayalar, diğer oleginous mikroorganizmalara kıyasla lipit üretimi için birçok avantaja sahiptir. Çoğalma süreleri kısadır, tek hücreli forma sahiptirler, kontrollü ve yoğun sistemlerde büyümeleri çok kolaydır [20].

Mayalar, bakteriler ve mantarlar gibi bazı mikroorganizmalar, karbonhidratlar ve diğer benzer substratlar gibi karbon kaynaklarını lipit haline getirme konusunda büyük bir yeteneğe sahiptir. Mikroorganizmalar arasında oleginous mayalar diğer türlere göre daha fazla avantaja sahiptir. Maya lipidleri, bitkisel lipidlere çok benzer, bu nedenle genellikle biyodizel üretiminin ümit verici kaynakları olarak bilinirler. Yıllarca süren uğraşlardan sonra, oleginous mayaların güvenilir bir biyodizel kaynağı olarak lipit ürettikleri keşfedilmiştir [67].

Tablo 2.3. Bazı oleginous mikroorganizmaların sentezledikleri yağ oranı yüzdeleri [2]

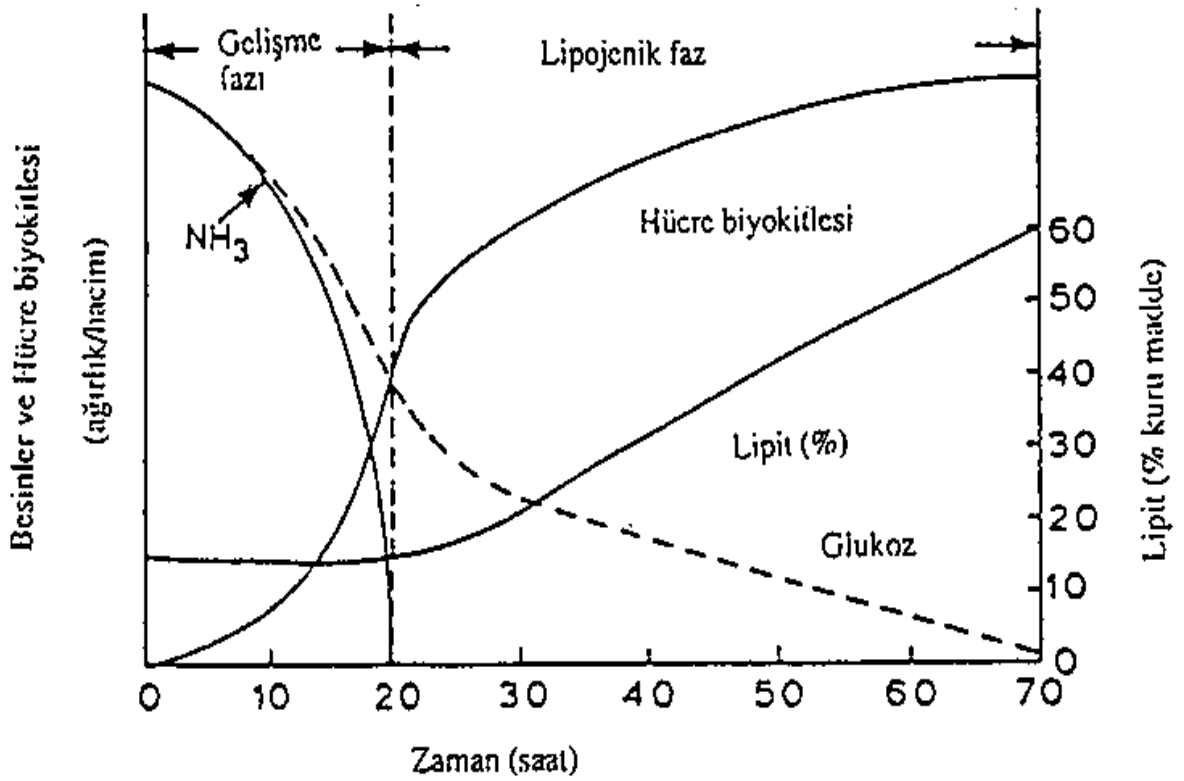
Mikroorganizma	Yağ oranı (%)	Mikroorganizma	Yağ oranı (%)
<b>Mikroalg</b>		<b>Maya</b>	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-57	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
<b>Bakteri</b>		<b>Fungus</b>	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

## 2.8. Oleginous mikroorganizmalarda biyokütle değişimi ve lipit birikimi

Bazı faktörler mikroorganizmaların lipit üretme kapasitelerini sınırlandırmaktadır. Besiyerindeki birincil besin elementlerinin özellikle de azotun tükenmesi organizmada lipit sentezini tetiklemektedir. Ortamda azot bakımından bir açlık yaratılırken aynı zamanda karbon miktarının artırılması C/N oranı lipit üretimi açısından son derece önemlidir. Ortamdaki azotun azalması hücre gelişimini sınırlarken, arttırılan karbon miktarı mikroorganizmalar tarafından yağ asitlerine daha sonra da trigliseritlere dönüştürülmektedir [14].

Şekil 2.2. de görüldüğü gibi mikrobiyal lipit üretimi iki aşamada gerçekleşmektedir. Ortamda bütün besin elementleri birinci aşamada mevcut olduğu için dengeli bir gelişme söz konusudur. Ortamdaki besin elementleri tükendiği zaman ikinci aşama olan lipit üretim (lipojenik faz) aşaması ortaya çıkmaktadır. Bu aşamada karbon kaynağı ya da lipit sentezinde gerekli diğer besin elementleri tamamen tükeninceye kadar mikroorganizma tarafından lipit üretimi devam etmektedir. Tüklenen bu besin elementleri eğer ortama tekrar ilave edilecek olursa lipit üretim aşaması olan lipojenik faz yeniden başlar ve oldukça yüksek lipit verimine ulaşılabilir. Maya ve küf gibi

mikroorganizmalardan bu yöntemle biyokütlelerinden %70'in üzerinde lipit verimi elde edileceği belirtilmektedir. Lipit sentezleyen mikroorganizmaların tümü aerobik olduklarından ortamın oksijen seviyesi bir süre sonra büyümeyi sınırlayan bir faktöre dönüşür. Hücredeki gelişim 60 g/L düzeyinin üstünde yavaşlarken 100 g/L üzerinde ise tamamen durabilir. Buna karşılık lipit üretimi lipit sentezleyen mayalarda kontrollü şartlarda 150 g/L biyokütle miktarına yaklaşabilir. Bu sebeple oksijen bir besin elementi olarak düşünülmesi ve hücre kaybını engellemek için sistemin oksijen seviyesi belirli bir düzeyde tutulmalıdır [68].



Şekil 2.2. Kesikli kültürde gelişen oleaginous mayalarda lipit birikimi [68]

Mikroorganizmalar tarafından üretilen lipitler belirli bir süre sonra metabolizma faaliyetleri için mikroorganizmalarca kullanılabilir. Ortamda yeteri miktarda karbon kaynağı mevcut diğer besin elementleri açısından açlık var ise lipitlerin mikroorganizmalarca hücre içi faaliyetlerde tekrar kullanımı oldukça yavaş gerçekleşmektedir. Ancak ortamdaki azot ve fosfor miktarı artırılırken karbon miktarı azaltılırsa lipitlerin mikroorganizmalarca parçalanması hızlanmaktadır. Bunun nedeni lipitlerin hücreler tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmasıdır [69].

Sıcaklık, pH, oksijen miktarı gibi mikroorganizmanın içinde bulunduğu ortam koşulları üretilen lipidin çeşidi ve birleşimi üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Besin maddesi olarak kullanılan karbon kaynakları da sentezlenen lipidlerin bileşimini ve yağ asidi dağılımını belirlemektedir [70]. Gelişme ortamlarında meydana gelen değişimlere mikroorganizmalar oldukça hızlı tepki gösterebilmektedirler. Ortaya çıkan bu değişiklikler mikroorganizmaların sadece çoğalma ve lipid biriktirme miktarını değil aynı zamanda üretilen lipidlerin birleşimi üzerinde de etkili olmaktadır. Bu yüzden üretim koşulları ( sıcaklık, pH, oksijen miktarı) oluşturulurken ve değişiklik yapılırken son derece dikkatli olunmalıdır. Ayrıca fermentasyon sıcaklığının yağ asidi bileşimi üzerinde en büyük etkiye sahip faktör olduğu belirtilmiştir [71].

### **2.9. Triaçilgliserollerin yakıt özelliklerinin iyileştirilmesi**

Bitkisel yağlar dizel yakıtla kıyaslandığında viskozite açısından 10-20 kat daha yüksektir. Aynı zamanda bitkisel yağların içerdikleri serbest yağ asitleri, fosfolipitler, steroller, su ve odorantlar gibi bileşikler nedeniyle doğrudan yakıt olarak kullanılamamaktadır [72]. Dizel yakıtlar yerine kullanılan triaçilgliserollerin yüksek viskozite, düşük uçuculuğa sahip olması ve çoklu doymamış yağ asidi içermeleri nedeniyle kullanımları sırasında çeşitli sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunların ortadan kaldırılması ve dizel yakıt performansına ulaşabilmesi için triaçilgliserollere çeşitli kimyasal işlemler uygulanmaktadır [73].



Tablo 2.4. Yağların yakıt özelliklerini iyileştirme yöntemleri

Viskozite azaltma yöntemleri	
Isıl yöntem	Kimyasal yöntem

- Seyreltme (inceltme) [73]
- Mikroemülsiyon oluşturma [74]
- Piroliz (ayırıştırma) [74]
- İç ester değişim reaksiyonu [74]

**2.9.1. Isıl yöntem:** Isıl yöntemde yapılacak ön ısıtma ile bitkisel kaynaklı yakıtın viskozitesinin azaltılması amaçlanmıştır. Fakat günümüzde çok fazla uygulanan bir yöntem değildir [75].

### 2.9.2. Kimyasal yöntem

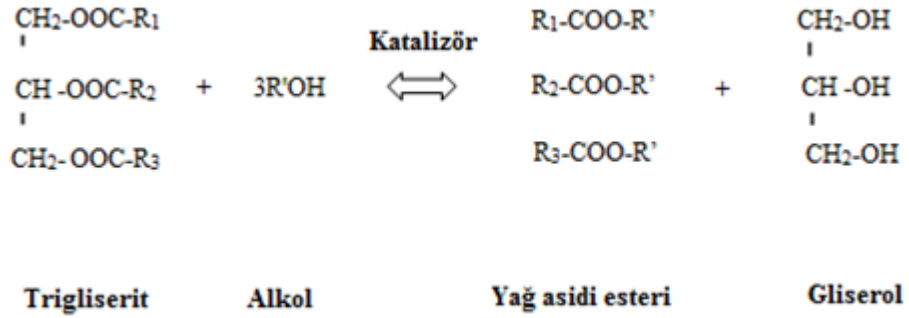
**2.9.2.1. Seyreltme;** Triaçilgliserollerin belli oranlarda dizel bir yakıt, etanol veya başka bir çözücü ile incetilmesidir [73].

**2.9.2.2. Mikroemülsiyon oluşturma;** Yüksek viskoziteye sahip bitkisel yağların etanol veya metanol gibi çözücülerle mikroemülsiyonlar oluşturmasıdır [74].

**2.9.2.3. Piroliz;** Termal enerji uygulamak suretiyle yağların kimyasal bağlarının parçalanarak daha küçük moleküllü yapılar oluşturmasıdır [74].

**2.9.2.4. Transesterifikasyon;** Bitkiler, hayvanlar veya çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen triaçilgliserollerin dizel yakıt olarak kullanılabilmesi için uygulanan kimyasal yöntemler arasında en çok tercih edilen ve günümüzde kullanımı en yaygın olan yöntemdir. Transesterifikasyon triaçilgliserollerin veya serbest yağ asitlerinin kısa zincirli alkollerle (etanol veya metanol ) bir katalizör varlığında (enzim, asit veya baz) reaksiyona girmesi sonucu yağ asidi metil veya etil esteri oluşturmasıdır [74].

Transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda triaçilgliserollerin viskoziteleri düşer, fiziksel özellikleri değiştirilmiş olur. Transesterifikasyon reaksiyonunu etkileyen faktörler arasında hammadde olarak kullanılan yağ, alkolün yağa oranı, katalizör çeşidi ve miktarı, reaksiyon ısısı, çalkalama hızı yer almaktadır.



Şekil 2.3. Transesterifikasyon reaksiyonu genel gösterimi [74]

### 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 terazi	KERN & Sohn GmbH
3	pH metre	Isolab
4	Spektrofotometre	Tetra T60
5	Etüv	Selecta 2001248 00-D 55911
6	Destile su cihazı	Isolab Lwd-3004
7	Çalkalamalı etüv	Nüve ES 110
8	Sıcak su banyosu	NB 301 L
9	Santrifüj	Selecta
10	Mikroskop	Olympus CX21
11	Buzdolabı	Vestel
12	Falkon	Isolab
13	Plastik mikro küvetler	Isolab
14	Ependorf tüpler	Isolab
15	Mikropipet takımı	Isolab
16	Plastik öze	Isolab
17	Petri	Isolab
18	100-1000 mL erlen mayerler	Isolab
19	200 µL-1000 µL Pipet uçları	Isolab
20	Lam	Isolab

### 3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Tablo 3.2. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

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

### **3.1.3. Çalışmada kullanılan gıda örnekleri**

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

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Sıvı besiyeri hazırlanması**

Sıvı besiyeri hazırlanırken katı haldeki nutrient broth kimyasalı kullanılmıştır.

### **3.2.2. Katı besiyeri hazırlanması**

Katı besiyeri hazırlanırken katı haldeki potato dextrose agar kimyasalı kullanılmıştır.

### **3.2.3. Örnek alımı ve besiyerlerine ekim yapılması**

Elma sirkesi, turşu suyu, şalgam suyu, zeytinli yağ, çiğ süt, tereyağı ve yoğurt maya izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. İzolasyon kaynağımız olan gıdalardan belirli bir miktar steril halde olan falkon tüplere alınmıştır. Plastik öze falkon tüpler içine batırılarak alınan örnekler sıvı besiyerine ekilmiştir. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra kapakları kapatılan sıvı besi yerleri üreme için etüvde 30 °C sıcaklıkta bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Bir gün boyunca 30 °C sıcaklıkta inkübe edilmiş sıvı besiyerlerinde üreme gerçekleşmiş olan sıvı besiyerlerinden plastik öze kullanılarak katı besi yerine çizgi ekimi yapılmıştır. Katı besiyerleri 30 °C 'de etüvde bir gün inkübe edilmiştir. Besiyerleri üzerinde gelişen koloniler arasında farklı görünüme sahip olanlar plastik öze yardımıyla alınarak yeni besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. Bu işlem birkaç kez tekrarlanarak saf görünümlü koloniler elde edilmiştir.

### **3.2.4. İzolatların gram boyama işlemi**

İzolasyon çalışmasında elde edilen izolatlar gram boyama yöntemi kullanılarak boyanmıştır. Gram boyama işleminde kristal viyole, lugol çözeltisi, %95'lik etanol ve safranin boya çözeltisi kullanılmıştır. İlk olarak lamaların üzerine saf su eklenmiş. Besi yerinden öze ile alınan örnek lam üzerine yayılmıştır. Daha sonra lam üzerinde bulunan fazla suyu buharlaştırmak ve lamı kurutmak için bek alevinden geçirilmiştir. Kurutulan lama ilk olarak kristal viyole damlatılmış ve bir dakikalık süre beklendikten sonra saf su ile yıkanmıştır. Bir sonraki adımda lam üzerine lugol çözeltisi eklenmiş bir dakika

beklendikten sonra saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra üzerine etil alkol çözeltisi damlatılmış ve 10-15 saniye bekletilip ardından bol saf su ile yıkanmıştır. Son işlem olarak lam üzerine safranin boyası damlatılmış ve 30 saniye bekletilip ardından saf su dan geçirilmiştir. Boyama işleminin ardından lamlar kuruması için temiz bir kağıt havlu üzerine bırakılmıştır.

### **3.2.5. İzolatların mikroskopta incelenmesi**

Gram boyama işlemi yapılmış olan lamaların üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelenmiştir. İnceleme sonucu boyama işlemi yapılan lamalarda mor renkte görülen mikroorganizmalar gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilmiştir. Mikroskopta yapılan incelemeler sonucunda maya olan izolatlar belirlenmiştir.

### **3.2.6. 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 aktarıldı. Maya kültürleri +4°C’de buzdolabında saklandı.

### **3.2.7. Çalışmada kullanılan besiyerleri**

Çalışmada maya kültürlerinin üretimi amacıyla optimal besiyeri (azot varlığı) ve lipid üretim besiyeri (azot yokluğu) olmak üzere iki çeşit besiyeri kullanılmıştır. Besiyerleri ekim işlemi öncesinde 120 °C ‘de 1 saat 15 dakika otoklavda steril hale getirilmiştir.

#### **3.2.7.1. Optimal besiyeri**

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan optimal besiyeri içeriği

Glukoz	10 g/L
Pepton	5 g/L
Maya özütü	3 g/L
Malt özütü	3 g/L

### 3.2.7.2. Lipit üretim besiyeri

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyeri içeriği [76]

Glukoz	70 g/L
Maya özütü	0.75 g/L
Amonyum sülfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.55 g/L
Potasyum sülfat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.40 g/L
Magnezyum sülfat MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g/L

### 3.2.8. Azot yokluğu stres denemesinin uygulanması

Potato dextrose agar (PDA) ortamında yatık agarda muhafaza edilen maya kültürlerinin aktifleştirilmesi için iğne uçlu öze yardımıyla alınan maya kültürü batırma yöntemiyle 100 ml optimal besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere ekilmiştir. Hazırlanan maya kültürleri 30°C'de 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (INFORS-HT) 1 gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra sıvı maya kültüründen aseptik koşullarda alınan 5 ml kültür, tekrar 100 mL optimal 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 üretim besiyerine (azot yokluğu) ekilmek üzere hazır hale getirilmiştir.

Azot yokluğu stresi oluşturmak için; optimal besiyerinde 1 gün çoğalan örneklerden 20 ml alınmış ve alınan hücreler santrifüjle toplandıktan sonra üst faz atılarak, atılan üst faz yerine (lipit üretim besiyeri/N-) ile süspanse edilmiştir. Lipit üretim besiyeri/N- ile süspanse edilmiş hücreler, içerisinde 100 ml lipit üretim/N- besiyeri bulunan 250 mL'lik erlenlere ekim yapılmıştır. Ekim yapılan erlenler INFORS-HT marka inkübatörde 30°C'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Azot stres denemesiyle aynı anda optimal besiyerine (optimal/N+) de maya izolatlarının ekimi yapılmıştır. 24 saatlik kültür süresi sonunda hem optimal/N+ hem de lipit üretim/N- besiyerlerinde çoğalan izolatlar toplanmış ve bu izolatlarda; biyokütle verimi, toplam lipit miktarı, kuru ağırlıkta % lipit miktarı ve lipit verimi saptanmıştır.

### 3.2.9. Biyokütle veriminin hesaplanması

Biyokütle veriminin hesaplanması için biyokütle verimi:  $(N2-N1)/(t2-t1)$  formülünden yararlanılmıştır. Formülde bulunan; N2: t2 zamanındaki biyokütle konsantrasyonunu, N1: t1 zamanındaki biyokütle konsantrasyonunu mg/litre/gün (1 günde 1 Lt besiyerinden elde edilen mg maya biyokütlesi) olarak göstermektedir [77,78]. T1 zamanındaki başlangıç biyokütlesini (N1) bulmak için; ana stoktan 3 defa 20'şer mL hücre alınmış ve hücreler santrifüj (3000 rpm'de 5dk) edildikten sonra üst fazları dökülmüştür. Sadece hücre bulunan tüplere saf su eklenerek saf suyla yıkama yapılmıştır. Yıkanan hücreler tekrar santrifüj edilerek üst fazları döküldükten sonra, ağırlığı hassas terazide tartılmış ve ağırlığı daha önce kaydedilmiş olan 1,5 mL polipropilen tüplere alınmıştır. İçerisinde hücre bulunan tüpler 65°C'de etüvde yaklaşık 14 saat bırakılmıştır. Kuruyan hücrelerin bulunduğu tüpler tekrar hassas terazide tartılmış ve ağırlıklar kaydedilmiştir. İçerisinde kuru maya biyokütlesi bulunan tüp ağırlığından, 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; 24 saatlik inkübasyonun sonunda hem optimal/N+ hem de lipit üretim/N- besiyerlerinde çoğalan hücrelerdeki her erlenden (her izolat için 1 erlen optimal/N+, 1 erlen lipit üretim/N-) 3'er defa 20'şer mL hücre otomatik pipetle çekilmiş ve kuru ağırlıkları yukarı satırlarda belirtildiği şekilde bulunmuştur. Bulunan kuru ağırlık mg/L olarak ifade edilmiştir.



### 3.2.10. Toplam lipit miktarının hesaplanması

Toplam lipit miktarının bulunması için spektrofotometrik bir yöntem olan SPV (sülfo-fosfo-vanilin) yöntemi kullanılmıştır [79,80]. Kuru hücre ağırlığında % lipit miktarının bulunması için azot yokluğu stres denemesinin tamamlandığı gün kültürlerden 1 ml hücre alınarak santrifüj edilmiş ve üst faz dökülmüştür. Tüpte kalan hücre peletinin üzerine 100 µL saf su ilave edilmiş ve hücreler cam tüplere aktarılmıştır. Cam tüplere 2 ml sülfürik asit (%95-98) eklenerek 100°C'de sıcak su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Devamında buz üzerinde soğutulmuş tüplerin içerisine 5 ml fosforik asit+vanilin çözeltisi eklenerek, tüpler 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometre cihazında 530 nanometrede okuma yapılmıştır. Kör tüp için içerisinde 100 µL saf su olan cam tüpler kullanılmıştır. Analizler 3 tekrarlı yapılmış ve her numune için 530 nanometrede 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 miktarları bulunmuştur [81]. Kuru ağırlıkta % lipit miktarı:  $100 \times \text{lipit miktarı } (\mu\text{g}) / \text{biyokütle miktarı } (\mu\text{g})$  formülüyle bulunmuştur.

### 3.2.11. Lipit veriminin hesaplanması

Azot yokluğu stresi uygulanan hücreler ve optimal koşullarda çoğaltılan hücrelerde lipit veriminin belirlenmesi için; Lipit verimi (mg/L/gün):  $\text{Biyokütle verimi} \times \text{kuru hücre ağırlığında \% lipit formülü}$  kullanılmıştır [77,82].

### 3.2.12. Moleküler tanımlama

Lipit verimi ve kuru ağırlıkta % lipit miktarı en yüksek olan 2 adet maya izolatının tür tanımlaması hizmet alım yöntemi ile BM Yazılım Danis. ve Lab. Sis. Ltd. Şti firması tarafından yapılmıştır.

DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra elde ettiğimiz DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmasında universal primer olarak 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') – 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT) ve 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 <sub>2</sub>	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		
• Sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PCR tamamlanmıştır.		

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

### **3.2.13. Moleküler tanımlaması yapılan A10 ve A20 kodlu izolatlar farklı pH larda azot yokluğu stresi uygulanması**

Lipit verimi, % lipit miktarı yüksek olan ve tür tanımlaması yapılan A10 ve A20 numaralı izolatlar; lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) tekrar azot yokluğu stresi uygulanmıştır.

### **3.2.14. Yağ asidi analizi**

Yağ asidi analizi, azot yokluğu stresinde en yüksek lipit verimine sahip A10 ve A20 kodlu izolatlar için yapılmıştır. Lipitlerin ekstre edilmesinde Bligh ve Dyer yöntemi kullanılmıştır [83]. Lipit ekstraksiyonu için A10 ve A20 kodlu izolatların kuru biyokütlesinden hassas terazide 10 mg tartılarak üzerine 900 µL metanol kloroform (2:1, v/v) karışımı eklenmiştir. 30 dakika beklendikten sonra 300 µL kloroform ve 480 µL saf su eklenmiştir. Faz ayrımı için 2500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Alt faz çekilip başka tüpe alınmıştır. Üstteki su fazı dökülerek ekstraksiyon işlemi 2 defa daha yapılmıştır. Yeni tüpe alınan ekstraktın berrak olması için 500 µL saf su eklenerek karıştırılmış ve santrifüj edilerek alt faz tekrar yeni bir tüpe alınmıştır. Sonra azot gazı altında uçurma işlemi yapılmış 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 saf su ve 0,7 mL hekzan eklenmiş tüpler çalkalanmıştır. Çalkalanan tüpler 2000 rpm'de 1,5 dk santrifüj 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

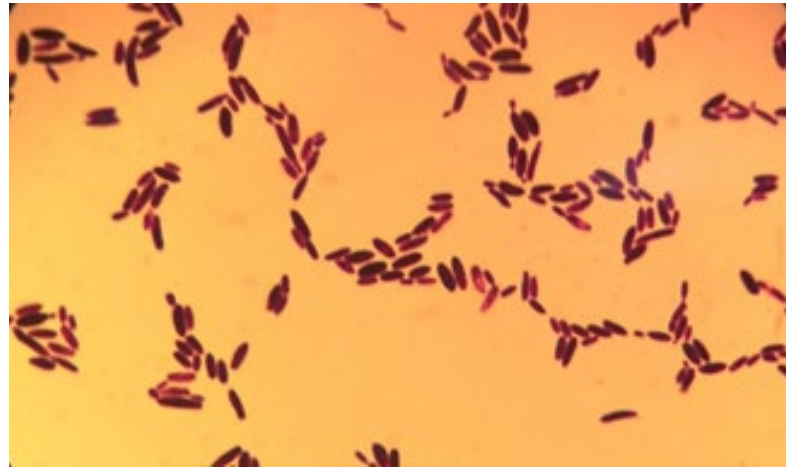
### BULGULAR

#### 4.1. Çalışmada kullanılan maya izolatları

Çalışmada kullanılan maya izolatları Nevşehir ili ev yapımı gıda kaynaklarından izole edilmiştir. Çalışmada ilk etapta 50 adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatların gram boyaması yapıp mikroskopik incelemesi sonucunda 8'inin maya izolatı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen 8 maya izolatına verilen kodlar ve izolatların elde edildiği gıda kaynakları aşağıda tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. İzolatların kodları ve izole edildikleri gıda kaynakları

İzolasyon kodu	Gıda kaynağı
A2	Elma sirkesi
A3	Elma sirkesi
A6	Turşu suyu
A10	Turşu suyu
A16	Şalgam suyu
A20	Şalgam suyu
A27	Zeytinli yağ
A50	Zeytinli yağ



Resim 4.1. A10 Kodlu izolatın mikroskop görüntüsü

#### 4.2. Azot yokluğu stresi altında maya izolatlarının lipit verimi bakımından seçilimi

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

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

Maya izolatları	Biyokütle verimi (mg/L/gün)	Kuru ağırlıkta % Lipit miktarı	Lipit verimi (mg/L/gün)
A2 N-	1160,07	5,56	64,50
A2 N+	1119,28	4,18	50,13
A3 N-	895,69	6,04	54,10
A3 N+	1179,00	3,00	35,37
A6 N-	116,15	30,70	35,66
A6 N+	462,85	7,87	35,64
A10 N-	376,65	38,64	145,54
A10 N+	747,45	3,73	27,88
A16 N-	44,23	37,21	16,46
A16 N+	204,59	0,87	1,78
A20 N-	157,44	53,30	83,92
A20 N+	251,07	2,80	7,03
A27 N-	216,78	27,40	59,40
A27 N+	381,50	7,3	27,85
A50 N-	240,15	19,1	45,87
A50 N+	564,74	9,7	54,78

N+ : Azot varlığı

N- : Azot yokluğu

Azot varlığında en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar; A50 (%9,7) ve A6 (%7,87) en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise A20 (%2,80) ve A3 (%3) izolatlarıdır. Azot yokluğunda ise en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar A20 (%53,30) ve A10 (%38,64) dur. En düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise A2 (%5,56) ve A3 (%6,04) tür. Azot varlığında en yüksek lipit verimine sahip izolatlar A50 ( 54,78 mg/L/gün) ve A2 (%50,13 mg/L/gün) olarak, en düşük lipit verimine sahip izolatlar A16 (1,78 mg/L/gün) ve A20 (7,03 mg/L/gün) olarak saptanmıştır. Azot yokluğunda en yüksek lipit verimine sahip izolatlar ise A10 (145,54 mg/L/gün) ve A20 (83,92 mg/L/gün) dir.

Azot yokluğunda en düşük lipit verimine sahip izolatlar ise A16 (16,46 mg/L/gün) ve A6 (35,66 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.

#### 4.3. Tür tanımlama sonuçları

Tür tayinleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerindeki en yakın türlere göre yapılmıştır. A10 kodlu izolat NCBI üzerinde *Pichia kudriavzevii* isolate KDLYL17-1 ile dizi eşleşme oranı %100, benzerlik oranı %99,81 oranda eşleşme gösterdiğinden *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır. A20 kodlu izolat NCBI üzerinde dizi eşleşme oranı %100, benzerlik oranı %100 oranda eşleşme gösterdiğinden *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4.3. A10 ve A20 kodlu izolatların tür tanımlama sonuçları

A10-ITS1/ITS4: <i>Pichia kudriavzevii</i>	
Toplam Baz Sayısı	513
Dizi Eşleşme Oranı	%100
Benzerlik Oranı	%99,81
NBCI'daki türü	<i>Pichia kudriavzevii</i> isolate KDLYL17-1
NBCI'daki accession numarası	JX174414.1
A20-ITS1/ITS4: <i>Pichia kudriavzevii</i>	
Toplam Baz Sayısı	811
Dizi Eşleşme Oranı	%100
Benzerlik Oranı	%100
NBCI'daki türü	<i>Pichia kudriavzevii</i> Strain YSP6
NBCI'daki accession numarası	MW008482.1

#### 4.4. A10 ve A20 kodlu izolatlara farklı pH larda azot stresi uygulama sonuçları

Lipit verimi ve % lipit miktarı yüksek olan tür tanımlaması yapılan A10 ve A20 numaralı izolatlara lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) azot yokluğu stresi uygulanmıştır. A10 kodlu izolat pH değerleri yükseldikçe hem % lipit miktarı olarak hem de lipit verimi olarak düzenli bir artış göstermiştir. En yüksek

% lipit miktarı %40, lipit verimi ise 431,86 mg/L/gün olarak pH 10'da değerinde gerçekleşmiştir.

A20 kodlu izolatta ise pH değeri yükseldikçe % lipit miktarı düzenli şekilde artarken lipit verimi birbirine yakın değerlerde gerçekleşmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar tablo 4.4. de verilmiştir.

Tablo 4.4. A10 ve A20 kodlu örneklerin farklı pH değerlerinde biyokütle verimi, toplam lipit miktarı, % lipit miktarı ve lipit verimi

İzolot kodu	pH değeri	Biyokütle verimi (mg/L/gün)	Toplam lipit miktarı (µg/mL/gün)	Kuru ağırlıkta % Lipit miktarı	Lipit verimi (mg/L/gün)
A10	pH 6	998,67	37,58	22,9	228,3
A10	pH 8	926,67	55,08	35,9	332,32
A10	pH 10	1078,67	70,62	40	431,86
A20	pH 6	1098,33	34,83	20	219,37
A20	pH 8	957,00	31,66	20,7	197,81
A20	pH 10	807,00	35,26	27	217,65

#### 4.5. Yağ asidi analiz sonuçları

Moleküler tanımlama sonucunda her ikisinde *Pichia kudriavzevii* olduğu belirlenen A10 ve A20 kodlu izolatların kuru biyokütlesinden ekstre edilen lipitlerin transesterifikasyonu sonucunda sırasıyla %96,17 ve %95,85 oranında biyodizel verimi elde edilmiştir. Sonuçlar tablo 4.5. ve 4.6. de verilmiştir.

Tablo 4.5. *Pichia kudriavzevii* A10'dan ekstre edilen lipidlerin transesterifikasyonu sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı

Yağ Asitleri	Yağ asidi türü	Miktarı (%)
Lavrik Asit (C12:0)	Doymuş	0,47
Miristik Asit (C14:0)	Doymuş	0,52
Miristoleik Asit (C14:1)	Tekli-doymamış	0,53
Pentadekanoik (C15:0)	Doymuş	0,27
Palmitik Asit (C16:0)	Doymuş	15,26
Palmitoleik Asit(C16:1)	Tekli-doymamış	9,99
HeptadekanoikAsit (C17:0)	Doymuş	0, 17
Heptadesenoik Asit (C17:1)	Tekli-doymamış	1,27
Stearik Asit (C18:0)	Doymuş	9,72
Oleik Asit (C18:1)	Tekli-doymamış	46,36
Linoleik Asit (C18:2)	Çoklu doymamış	13,25
Linolenik Asit (C18:3n3)	Çoklu doymamış	1,59
Araşidik Asit (C20:0)	Doymuş	0,24
Gadoleik Asit (C20:1)	Tekli-doymamış	0, 18
Behenik Asit (C22:0)	Doymuş	0,23

Tablo 4.6. *Pichia kudriavzevii* A20'den ekstre edilen lipidlerin transesterifikasyonu sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı

Yağ Asitleri	Yağ asidi türü	Miktarı (%)
Lavrik Asit (C12:0)	Doymuş	0,32
Miristik Asit (C14:0)	Doymuş	0,44
Pentadekanoik (C15:0)	Doymuş	0,32
Palmitik Asit (C16:0)	Doymuş	12,48
Palmitoleik Asit (C16:1)	Tekli-doymamış	11,42
Heptadekanoik Asit (C17:0)	Doymuş	0,20
Heptadesenoik Asit (C17:1)	Tekli-doymamış	1,83
Stearik Asit (C18:0)	Doymuş	10,97
Oleik Asit (C18:1)	Tekli-doymamış	44,39
Linoleik Asit (C18:2)	Çoklu doymamış	13,43
Linolenik Asit (C18:3n3)	Çoklu doymamış	3,16
Araşidik Asit (C20:0)	Doymuş	0,32
Gadoleik Asit (C20:1)	Tekli-doymamış	0,21
Behenik Asit (C22:0)	Doymuş	0,54



Yağ asidi analiz sonuçlarına göre yağlarımızda C16:0 (Palmitik Asit), C16:1 (Palmitoleik Asit), C18:0 (Stearik Asit), C18:1 (Oleik Asit), C18:2 (Linoleik Asit) gibi yağ asitleri yüksek oranda bulunmuştur.

Üretilen yağ asidi metil esterinin *Pichia kudriavzevii* A10 kodlu izolat için %26,88' nin doymuş yağ asitlerinden %73,16' sının ise doymamış yağ asitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Toplam lipitler içerisinde tekli-doymamış yağ asitlerinin oranı %58,33, çoklu doymamış yağ asitlerinin oranı ise %14,83 olarak tespit edilmiştir. Lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan yağ asidi tekli doymamış yağ asidi olan oleik asit (C18:2) %46,36 bunun ardından doymuş bir yağ asidi olan palmitik asit (C16:0) %15,26 olduğu belirlenmiştir. Lipit içerisinde en fazla bulunan 3. yağ asidinin ise çoklu doymamış linoleik asit (C18:2) % 13,25 olduğu tespit edilmiştir. Lipitlerin içerisindeki diğer baskın yağ asitlerinin ise Palmitoleik asit (C16:1), Stearik asit (C18:0), olduğu belirlenmiştir.

*Pichia kudriavzevii* A20 kodlu izolat için %25,59'nun doymuş yağ asitlerinden %74,44'ünün ise doymamış yağ asitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Toplam lipitler içerisinde tekli-doymamış yağ asitlerinin oranı %57,85, çoklu doymamış yağ asitlerinin oranı ise %16,59 olarak tespit edilmiştir. Lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan yağ asidi tekli doymamış yağ asidi olan oleik asit (C18:2) %44,39 bunun ardından çoklu doymamış bir yağ asidi olan linoleik asit (C18:2) %13,43 olduğu belirlenmiştir. Lipit içerisinde en fazla bulunan 3. yağ asidinin ise doymuş palmitik asit (C16:0) %12,48 olduğu tespit edilmiştir. Lipitlerin içerisindeki diğer baskın yağ asitlerinin ise Palmitoleik asit (C16:1), Stearik asit (C18:0), olduğu belirlenmiştir.

## 5. BÖLÜM

### TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Enerji, tüm toplumlarda ekonomik ve sosyal kalkınma ile yaşam kalitesinin geliştirilmesi için temel bir ihtiyaçtır. Tüm dünya ülkelerinin giderek kalkınmasıyla ortaya çıkan enerji talebindeki artış ve bu talebin giderek azalan sonlu olduğu bilinen petrol, doğalgaz ve kömür gibi fosil enerji kaynaklarından karşılanıyor olmasının yanında giderek artan çevresel kaygılar insanlığı yeni ve yenilenebilir enerji kaynakları aramaya yönlendirmektedir. Biyodizel, dizel yakıtı alternatif olarak üretilen emisyon değerleri daha düşük, biyolojik olarak doğada kolay parçalanabilen, çevre açısından toksik bir etki içermeyen, yenilenebilir bir yakıt türüdür. Bugün palmye yağı, soya fasulyesi yağı, kolza yağı ve ayçiçek yağı gibi bitkisel yağlar, birçok ülkede biyodizel üretimi için hammadde olarak kullanılmaktadır [5]. Bununla birlikte, bitkisel yağlar nispeten pahalıdır. Yaygın bir gıda maddesi olan bitkisel yağların önemli bir miktarının biyodizel üretimine tahsis edilmesi, bitkisel yağ kıtlığına neden olabilir [6].

Biyodizel üretiminde kullanılacak bitkilerin ekimi, arazi mevcudiyeti, mevsim ve iklim ile sınırlıdır. Bunun yanında, biyodizel üretimi için büyük miktarlarda bitkisel yağ tüketimi gıda fiyatlarında artışa yol açmaktadır [22]. Biyodizel üretim maliyeti, hammadde olarak hayvansal yağların veya atık pişirme yağlarının kullanılmasıyla belli oranda azaltılabilir de, bu kaynaklar sınırlıdır ve biyodizel üretimi için artan talebi karşılayamaz [23]. Türkiye hali hazırda tükettiği yağlı tohumun büyük bir kısmını ithal olarak temin ettiği için bitkisel yağlardan biyodizel elde edilmesi ülkemizin dışa bağımlılığını arttıracaktır [84]. Bu nedenle, mikroorganizmalar (algler, funguslar, mayalar, bakteriler) tarafından kısa sürede üretilebilen ve yağ asidi içeriği bakımından bitkisel yağlara benzerlik gösteren mikrobiyal lipit üretiminin araştırılması gerekmektedir.

Mayaların hücrelerinde yüksek miktarda yağ depo etme özellikleri, büyüme hızlarının yüksek olması ve TAG formundaki yağlarının bitkisel yağlara olan benzerliği bugüne kadar mayalar üzerinde birçok çalışma yapılmasını sağlamıştır [85].

*Lypomyces sp.*, *Rhodosporidium sp.*, ve *Rhodotorula sp* gibi maya türlerinin hücrelerinde kuru ağırlıklarının %70'i kadar lipit biriktirebildikleri rapor edilmiştir [86].

Oleginous mikroorganizmaların besiyeri içeriğinde herhangi bir element sınırlandırıldığında ve karbon seviyesinin yüksek olduğu durumlarda oleginous mikroorganizmalar depo yağı olan triaçilgliserollerini üretmeye başlarlar. Azot sınırlaması yağ üretiminin arttırılması amacıyla oleginous mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [87].

Çeşitli gıda kaynaklarından mikrobiyal lipit üretme kapasitelerini araştırmak için izole ettiğimiz 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 literatürde ki kültür ortamında azot sınırlamasının lipit üretimini tetikleyici bir unsur olduğu bilgisiyle paralellik göstermektedir [68].

Lipit üretme kapasitesi açısından bütün mikroorganizmalar aynı değildir. Araştırmalar lipit içeriği %20 üzerinde olan, oleginous mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Uygun kültür koşullarında bazı mikroorganizmaların lipit içeriğinin %70'lere ulaştığı rapor edilmektedir [54,83]. Bu yüzden, mikrobiyal lipitlerin üretiminde amaca yönelik yüksek miktarda lipit üretebilen ve uygun yağ asidi profiline sahip olan mikroorganizma seçimi çok önemlidir. Bu yüzden çalışmada kullanılan maya izolatlarının şu ana kadar saptanan lipit verimi değerleri ile % lipit miktarları açısından kıyaslanmış olup azot yokluğu stresinde % lipit miktarı ve lipit verimi açısından diğer izolatlardan üstün olan A10 ve A20 kodlu izolatların tür tanımlaması yapılmıştır. A10 kodlu izolat NCBI üzerinde *Pichia kudriavzevii* isolate KDLYL17-1 ile dizi eşleşme oranı %100, benzerlik oranı %99,81 oranda eşleşme gösterdiğinden *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır. A20 kodlu izolat NCBI üzerinde *Pichia kudriavzevii* Strain YSP6 ile dizi eşleşme oranı %100, benzerlik oranı %100 oranda eşleşme gösterdiğinden *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır.

Çok az çalışma, *Pichia kudriavzevii*'yi oleginous maya olarak araştırmıştır, bu nedenle yağ asidi profilleri ve kültür koşullarının bu profiller üzerindeki etkisi hakkında çok az bilgi vardır. Son araştırmalar, *Pichia kudriavzevii*'nin lipit ve etanol gibi yüksek değerli ürünler için iyi bir kaynak olarak kabul edilebileceğini göstermiştir [88,89]. Yapılan başka bir çalışmada *Pichia kudriavzevii*'nin aside toleranslı bir maya türü olduğu rapor edilmiştir [90].

Kültür pH'sının lipit verimi ve % lipit miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Tür tanımlaması yapılan *Pichia kudriavzevii* A10 ve *Pichia kudriavzevii* A20 kodlu izolatlarla lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) azot yokluğu stresi uygulanmıştır. *Pichia kudriavzevii* A10 kodlu izolat pH değerleri yükseldikçe hem % lipit miktarı olarak hem de lipit verimi olarak düzenli bir artış göstermiştir. En yüksek % lipit miktarı %40, lipit verimi ise 431,86 mg/L/gün olarak pH 10'da gerçekleşmiştir. *Pichia kudriavzevii* A20 kodlu izolatta ise pH değeri yükseldikçe % lipit miktarı düzenli şekilde artarken lipit verimi birbirine yakın değerlerde gerçekleşmiştir.

Test edilen bütün pH'ların % lipit miktarını çok fazla etkilediği görülmüştür. Örneğin, *Pichia kudriavzevii* A10 kodlu izolat pH 6'da lipit miktarı %22,9 iken pH 8'de %35,9 ve pH 10'da %40 olarak bulunmuştur. Kültür ortamının pH değeri yükseldikçe % lipit miktarı da sürekli artmıştır. Aynı durum lipit veriminde de görülmüştür. Lipit verimi pH 6'da 228,30 mg/L/gün iken pH 8'de 332,32 mg/L/gün ve pH 10'da 431,86 mg/L/gün olarak bulunmuştur. Bu bulgular da kültür pH'sının mikrobiyal lipitlerin sentezini çok fazla etkilediğini gösteren önceki çalışmalarla paralellik taşımaktadır [91,92].

Sankh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada çürük meyvelerden izole edilmiş oleaginous maya, *Pichia kudriavzevii* mtcc 5493'ün %23 oranında lipit biriktirdiği rapor edilmiştir [93]. Daha sonra yapılan bir çalışmada ise *Pichia kudriavzevii*'nin en yüksek lipit birikiminin yüksek miktarda glikoz (66,21 g/L), düşük azot içeriğinde ve pH 8 de %28 oranında lipit biriktirdiği rapor edilmiştir [67]. Mevcut çalışmamızda ise 70 g/L glikoz, düşük miktar azot içeren ve pH 10'daki kültür ortamında %40 lipit miktarı elde edilmiştir. *Pichia kudriavzevii*'nin lipit miktarını % 28 olarak bulan önceki araştırmaya göre mevcut araştırmamız lipit üretiminde yüzde 12'lik bir artış sağlamıştır (kuru ağırlık biyokütlesinde yüzde 40 lipit). Yüksek karbon:azot oranının oleaginous mikroorganizmlarda lipit birikimini artırdığı belirtilmektedir [7]. Çalışmamızda karbon:azot oranı 127 gibi yüksek bir oranda tutulmuştur.

Daha önce yapılmış bir çalışmada *Pichia kudriavzevii*'nin lipit biriktirme kapasitesi üzerine farklı pH ların etkisi araştırılmış olup tablo 5.1. verilen sonuçlar rapor edilmiştir.

Tablo 5.1. Farklı pH larda % lipit miktarları [67]

pH	% lipit miktarı
4	10,2
6	11,5
8	14,2

Tablo 5.1. de yer alan sonuçlara bakıldığı zaman *Pichia kudriavzevii*'nin kültür ortamının pH seviyesi yükseldikçe % lipit miktarında artış olmuştur [67]. Çalışmamızın sonuçları 4. bölümde tablo 4.4. verilmiş olup en yüksek % lipit miktarı pH 10'da %40 olarak elde edilmiştir. Hem daha önce yapılmış çalışmalar hem de çalışmamız *Pichia kudriavzevii*'nin % lipit miktarının pH seviyesi artıkça yükseldiğini göstermiş olup, yapılacak daha sonraki çalışmalarda bu durumun dikkate alınarak *Pichia kudriavzevii* için % lipit miktarındaki artışın hangi pH değerine kadar devam ettiği araştırılmalıdır. Azot yokluğunda A10 kodlu izolat için doymuş yağ asitlerinin yüzdesi %26,88, tekli doymamış yağ asitlerinin yüzdesi %58,33, çoklu doymamış yağ asitlerinin yüzdesi %14,83 olarak bulunmuştur.

Azot yokluğunda A20 kodlu izolat için doymuş yağ asitlerinin yüzdesi %25,59, tekli doymamış yağ asitlerinin yüzdesi %57,85, çoklu doymamış yağ asitlerinin yüzdesi %16,59 olarak bulunmuştur.

Biyodizelde çoklu doymamış ve doymuş yağ asitlerinin düşük seviyelerde olmasının oksidasyon kararlılığını ve düşük sıcaklıktaki akış problemlerini düşürdüğü, tekli doymamış yağ asitlerinden palmitoleik asit (16:1) ve oleik asit (18:1)'in yüksek miktarlarda olmasının oksidasyon kararlılığına ve düşük sıcaklıktaki akışa pozitif katkı yaptığı bildirilmiştir [94]. Doymamış yağ asidi akümülyasyonu yapan hücrelerin biyodizel üretimi için ideal organizmalar olduğu ve tekli doymamış yağ asitlerinin miktarındaki artışın biyodizel kalitesini arttıran bir parametre olduğu rapor edilmiştir [95]. Yağ asidi analiz sonuçlarına göre; *Pichia kudriavzevii* A10 ve *Pichia kudriavzevii* A20 kodlu suşun biyodizel üretimi için uygun yağ asidi kompozisyonuna sahip olduğu saptanmıştır.

Yapılan araştırmalarda biyodizel kalitesinin palmitik asit (C16: 0) ve oleik asitten (C18: 1) pozitif yönde etkilendiği rapor edilmiştir [96]. Bu çalışmada, yüksek miktarlarda C16: 0 ve C18: 1 (toplam yağ asitlerinin A10 kodlu izolat için %61,62'si A20 kodlu izolat için %56,87 ) yağ asitleri elde edilmiştir. Bu durum *Pichia kudriavzevii* 'nin potansiyel bir biyodizel üretim kaynağı olduğunu göstermektedir.

Çoklu doymamış yağ asitleri, üretilen biyodizelin viskozitesini azalttığından dolayı, çoklu doymamış yağ asitlerini içermeyen veya bu yağ asitlerini düşük oranda içeren mikrobiyal lipitlerin ise bitkisel yağlara alternatif olarak biyodizel üretiminde ham madde olarak kullanılabilereği belirtilmektedir [83,91].

Mayaların biriktirdiği yağ, ağırlıklı olarak oleik (C18: 1), linoleik (C18: 2), stearik (C18: 0), palmitik (C16: 0) veya palmitoleik asit (C16: 1) olan triaçilgliserol formundadır [2]. Mevcut sonuçlar, *Pichia kudriavzevii* 'den elde edilen yağ asitlerinin diğer oleginous mayalardan elde edilen yağ asitleri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Xue ve arkadaşları *Rhodotorula glutinis* hücrelerinden ekstre ettikleri lipitleri gaz kromatografide analiz etmişlerdir. Maya hücrelerinden elde ettikleri lipidin bitkisel yağlara benzediğini ve 16 ile 18 numaralı karbon atomları bakımından zengin olduğunu ve %92,4 oranında yüksek metil esterini oluşturduğunu rapor etmişlerdir [86]. Çalışmamızda ise *Pichia kudriavzevii* 'den elde ettiğimiz lipitlerin transesterifikasyona uğratılarak elde edilen metil esterleri GC-FID (Gaz kromatografisi-Alev iyonizasyon dedektörü) cihazında analiz edilmiştir. *Pichia kudriavzevii* A10 hem de *Pichia kudriavzevii* A20 kodlu izolatların metil ester verimleri sırasıyla %96,17 ve %95,85 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada elde edilen veriler, *Pichia kudriavzevii* A10 ve *Pichia kudriavzevii* A20 kodlu izolatların ürettiği mikrobiyal lipitlerin biyodizel üretimi için umut verici alternatif birer hammadde kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeli taşıdığını göstermiştir.

- İdeal lipit üreticisi mikroorganizmanın keşfedilmesi,
- Keşfedilen mikroorganizmanın lipit üretimi için optimum koşullarının belirlenmesi,
- Mikroorganizmaların substrat olarak kullanabileceği ucuz karbon kaynaklarının bulunması.

Biyodizel maliyetinin büyük bölümünü oluşturan hammadde maliyetini azaltmak ve insan beslenmesinde önemli bir yeri olan bitkisel yağlara alternatif bir lipit kaynağı ortaya koymak için üç temel aşama olarak karşımıza çıkmaktadır.

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

## 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. Meng, X., Yang, J.M., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q.J. and Xian, M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energy*, 34(1), 1-5.
3. Liu, B. and Zhao, Z.K. (2007) Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 775–780.
4. Fedosov, S.N., Brask, J., Pedersen, A.K., Nordblad, M., Woodley, J.M. and Xu, X.B. (2013) Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 85–86, 156–168.
5. Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yanez, E.E., Castillo, E.F. and Almazan, O. (2009) Biofuels: environment, technology and food security. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13,1275–1287.
6. Dalia M. Mohammed, Enas A. Hassan\*, Fatma H. Abd El Zaher, H.K. Abd El Maksoud and E.M. Ramadan\* (2014) Egypt. J.Microbiol. 49, pp. 81- 98
7. Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., Lucia, D.M., Leonardi, A. And Rossi, M. (2010) Single cell oil of cold adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories*, 23, 59-73.



8. Azócar, L., Ciudad, G., Heipieper, H.J. and Navia, R. (2010) Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88 (3), 621-636.
9. Czabany, T., Athenstaedt, K. and Daum, G. (2007) Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, 1771, 299–309.
10. Rossi, M., Buzzini, P., Cordisco, L., Amaretti, A., Sala, M., Raimondi, S., Ponzoni, C., Pagnoni, U.M. and Matteuzzi, D. (2009) Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic and mesophilic yeasts. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 69, 363-
11. Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M. and Guebitz, G.M. (2008) Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyce starkeyi* for biodiesel production. *Biores. Technol.* 99, 3051-3056.
12. Liu, Z.Y., Wang, G.C. and Zhou, B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Biores. Technol.* 99 (11), 4717-4722.
13. Yen, H.W. and Yang, Y.C. (2012) The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Biores. Technol.*, 107, 539–541.
14. Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Trans.* 30, 1047-1050
15. Üstün, G. E., & Genç, B. (2015). Dünya’da ve Türkiye’de biyoyakıtların durumu. *Journal Of Agricultural Faculty Of Uludag University*, 29(2), 157-164.

16. Kaplan, M. (2019). *Pamuk yağından biyodizel eldesi ve verimliliğinin incelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Selçuk Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
17. 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.
18. <https://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=Biyodizel&action=edit&section=4> Erişim tarihi [05.08.2021]
19. L. Qin, L. Liu, A.-P. Zeng, and D. Wei, “From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts,” 2017 *Bioresource Technology*, vol. 245, pp. 1507–1519.
20. 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.
21. C. Ratledge, “Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production,” *Biochimie*, vol. 86, no. 11, pp. 807–815, 2004.
22. S. Papanikolaou, G. Aggelis, Lipids of oleaginous yeasts: part II: technology and potential applications, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113 (2011) 1052–1073.
23. A. Yousuf, Biodiesel from lignocellulosic biomass – prospects and challenges, *Waste Manage.* 32 (2012) 2061–2067.

24. C.T. Evans, C. Ratledge, Effect of nitrogen source on lipid accumulation inoleaginous yeasts, J. Gen. Microbiol. 130 (1984) 1693–1704.
25. Uslu, İ., 2019, Biyodizel.
26. Akınerdem, F., 2007, Enerji Tarımı; Enerji Bitkileri Potansiyelimiz, Enerji Güvenliği, Enerji Tarımı, Küresel Isınma Açısından Biyoyakıtlar Uluslararası Sempozyumu,  
[http://www.albiyobir.org.tr/files/img\\_etk/fikret\\_akinerdem.pdf](http://www.albiyobir.org.tr/files/img_etk/fikret_akinerdem.pdf)
27. Kılıçarslan, M. N., 2019, Atık yağlardan üretilen biyodizelin ve biyodizel üretim atığı olan yıkama suyunun karakterizasyonu, Yüksek Lisans, Konya teknik üniversitesi
28. <https://knoema.com/search?query=world+biodiesel+production+by+country&pageIndex=&scope=&term=&correct=&source=Header>
29. <https://www.resmigazete.gov.tr/>
30. Alptekin, E, ve Çanakçı, M Biyodizel ve Türkiye'deki Durumu, Mühendis ve Makine, 47(561):57-64, (2006)
31. Erel, F.P., “Biyodizel Üretiminde Ters Lojistik Uygulamaları”, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı, Tekirdağ. (2014).
32. <https://www.epdk.gov.tr/Detay/Icerik/3-0-107/yillik-sektor-raporu>
33. <https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/StandardAra.aspx>

34. Suresh, M., Jawahar, C. ve Richard, A., 2018, A review on bioEurodiesel production, combustion, performance, and emission characteristics of non-edible oils in variable compression ratio Eurodiesel engine using bioEurodiesel and its blends, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 38-49.
35. Altun, ğ. ve Öner, C., 2013, Gaseous emission comparison of a compression–ignition engine fueled with different bioEurodiesels, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10 (2), 371-376.
36. Chattopadhyay, S., & Sen, R. (2013). Fuel properties, Engine performance and environmental benefits of biodiesel produced by a greenproces. *AppliedEnergy*, 105, 319–326.  
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.01.003>
37. Mutlu, L., Yavuz, H. ve Bayrakçeken, H., 2006, Biyodizel yakıtların performanslarının karşılaştırılması, 9, *Yanma Sempozyumu*, 40-49.
38. Özdemir, Z. Ö., Mutlubaş, H., 2016. Biyodizel üretim yöntemleri ve çevresel etkileri, *Kırklareli University Journal of Engineering and Science*, 2, 129-143
39. Ölçüm, T., 2006, Biyodizel teknolojisi, Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 72.
40. Öztürk, Ö., 2007, Dizel Motorlarında Karışimsız Olarak Kullanılan Biyodizellerin Motor Performansına Olan Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi, 118.

41. Ögüt, H., Oğuz, H., Üçüncü Milenyumun Yakıtı Biyodizel, Nobel Yayın Dağıtım (ISBN: 975-591-730-6), II. Baskı, 190, (2006)
42. Mazivila, S. J., 2018, Trends of non-destructive analytical methods for identification of bioEurodiesel feedstock in Eurodiesel-bioEurodiesel blend according to European Commission Directive 2012/0288/EC and detecting Eurodiesel-bioEurodiesel blend adulteration: A brief review, *Talanta*, 180, 239-247.
43. Seraç, M. R., 2018, Biyodizelin jeneratörlü bir dizel motorunda performans, emisyon ve yanma karakteristikleri üzerindeki etkilerinin araştırılması, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,54.
44. Anonim,2019.WebSitesi:<http://www.yegm.gov.tr/yenilenebilir/biyodizel.aspx> Erişim
45. Felizardo, P., Correia, M.J.N., Raposo, İ, Mendes, J.F., Berkemeier, R., Bordado, J.M. (2006). Production of biodiesel from waste frying oil. *Waste Manage.* 26:5, 487-494.
46. 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.
47. 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.
48. Phan, A.N., Phan, T.M. (2008). Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel.* 87, 3490-3496.

49. Kulkarni, M., Dalai, A. (2006). Waste cooking oils an economical source for biodiesel: a review. *Ind Eng Chem Res.* 45, 2901-2913.
50. Bhatti, H.N., Hanif, M.A., Qasim, M. and Rehman, A. 2008. Biodiesel production from waste tallow. *Fuel*, 87, 2961-2966.
51. Uzun, G. (2018). *Yağ asidi katkılı kolza yağından biyodizel üretimi ve üretilen biyodizellerin karakteristik özelliklerinin incelenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
52. 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.
53. Khot, M., Kamat, S., Zinjarde, S., Pant, A., Chopade, B., Ravikumas, A. (2012). Single cell oils of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microb. Cell Fact.* 11:71, 2-13.
54. A. Beopoulos, J. Cescut, R. Haddouche, J.-L. Uribelarrea, C. Molina-Jouve, and J.-M. Nicaud, "Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production," *Progress in Lipid Research*, vol. 48, no. 6, pp. 375–387, 2009.
55. Vicente, G., Bautista, L.F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F.J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S., Garre, V. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem. Eng. J.* 48:1, 22–27.

56. Peng, H., Chen, H. (2008). Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresour. Technol.* 99, 3885–3889.
57. Shi, S., Rodriguez, J., Siewers, V., Nielsen, J. (2011). Prospects for microbial biodiesel production. *Biotechnol. J.* 6, 277-285.
58. Beer, L., Boyd, E., Peters, J., Posewitz, M. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 264-271.
59. Shay, E.G. (1993). Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. *Biomass Bioener.* 4, 227-242.
60. 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.
61. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 25, 294-306.
62. Alvarez, H., Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 367-376.
63. Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80, 749-756.
64. Adachi, D., Hama, S., Numata, T., Nakashima, K., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2011). Development of an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst coexpressing triglyceride and partial glyceride lipases for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102:12, 6723-6729.

65. Li, Y.H., Liu, B., Zhao, Z.B., Bai, F.W. (2006). Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *China J. Biotechnol.* 22:4, 650-656.
66. Ratledge, C. (2005). *Single cell oils for the 21st century*. In: Cohen, Ratledge, editors, *Single cell oils*. Champaign: AOCS Press. 1-20.
67. *Biological Journal of Microorganism* 8th Year, Vol. 8, No. 32, Winter 2020 Received: August 28, 2019/ Accepted: November 4, 2019. Page: 153- 163
68. Denli, Y., Tekin, A. (2000). Oil production and microorganisms. *Gıda*. 25:4, 265-270.
69. Holdsworth, J.E., Ratledge, C. (1988). Lipid turnover in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 134, 339-346.
70. Ratledge, C. (1982). Microbial oils and fats; an assesment of their commercial potential. *Indust. Microbiol.* 16, 119-206.
71. Liu, S.J., Yang, W.B., Shi, A.H. (2000). Screening of the high lipid production strains and studies on its flask culture conditions. *Microbiol.* 27:2, 93-97.
72. Meher, L.C., Sagar, V.D., and Naik, S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10,248-268.



73. Srivastava, A. and Prasad, R. 2000. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 111-133.
74. Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 405–416.
75. Verma, P. & Sharma, M.P., 2016. Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 62, ss.1063–1071. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032116300879>.
76. P. Kraisintu, W. Yongmanitchai, S. Limtong, Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 44 (2010) 436–445.
77. 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.
78. 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.
79. 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.

80. 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.
81. 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).
82. 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.
83. Katre G, Joshi C, Khot M, Zinjarde S and Ravikumar A., 2012. Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express* 2:36.
84. Diger Kulaksız, B. (2021). Trakya bölgesindeki yağ fabrikalarının rafınasyon atığı olan asit yağlardan biyodizel eldesinin araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
85. Darcan S., Sarıgül N., 2015. Mikroorganizmalardan Tek Hücre Yağları Üretimi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(2):55-67.
86. Dönmez G., Karatay S., E., 2011. Maya ve Fungus Lipitlerinin Soxhlet Sistemi ile Ekstraksiyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu. Proje Numarası: 10H4240001.

87. Woodbine, M. (1995). Microbial fat: microorganisms as potential producers. *Prog. Indust. Microbiol.* 1, 145-179.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. Taskin, M., Saghafian, A., Aydogan, M. N., & Arslan, N. P., 2015. Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), 595-605.
92. Zhu LY, Zong MH, Wu H., 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99, 7881-7888.
93. Sankh S., Thiru M., Saran S., Rangaswamy V. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel* 2013; 106: 690–6.

94. Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan M. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), pp.143-169.
95. Ahmad, I., Sharma, A. K., Daniell, H., & Kumar, S. (2015). Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2. *Plant biotechnology journal*, 13(4), 540-550.
96. Demirbas A. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science* 2007; 33 (1): 1–18.