



Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi (Research Article)

Makale Doi: [10.17100/nevbiltek.1024552](https://doi.org/10.17100/nevbiltek.1024552)

Geliş Tarihi:16-11-2021

Kabul Tarihi:02-12-2021



Çeşitli Gıda Ürünlerinden İzole Edilen Mayalardan Lipit Üretimi^A

Mehmet Ali BOZKURT ^{1*}, Şahlan ÖZTÜRK ²

¹Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Nevşehir
ORCID ID: 0000-0002-1001-310X

² Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Nevşehir
ORCID ID: 0000-0002-6064-3628

Öz

Bu çalışmanın amacı, çeşitli gıda örneklerinden izole edilmiş maya türlerinin lipit içeriği, lipit verimi ve yağ asidi profili bakımından biyodizel üretim potansiyellerini belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda; çalışmada çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen 7 maya izolatu, pH 5,5, 30 °C sıcaklık 100 rpm (çalkalama hızı) ve 24 saat sürede hem optimal besiyerinde (azot varlığında) hem de lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu) inkübe edilerek lipit verimi ve % lipit miktarı bakımından karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan *Pichia kudriavzevii* türünün yüksek lipit içeriğine ve lipit verimine sahip olmasının yanı sıra elde edilen lipitlerin büyük bölümünün C16 ve C18 metil esterlerinden oluşması bu mayaların sentezlediği lipitlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Maya; Biyodizel; Mikrobiyal Lipit; *Pichia kudriavzevii*.

Production of Lipids From Yeast Isolated From Various Food Products

Abstract

The aim of this study is to determine the biodiesel production potential of yeast strains isolated from various food samples in terms of lipid content, lipid yield and fatty acid profile. In accordance with this purpose; In the study, 7 yeast isolates isolated from various food products were incubated at pH 5.5, 30 oC temperature, 100 rpm (shaking speed) and 24 hours in both optimal medium (in the presence of nitrogen) and lipid production medium (lack of nitrogen) to increase lipid yield and Compared in terms of % lipid content. The fact that the *Pichia kudriavzevii* species used in the study has high lipid content and lipid yield, as well as the fact that most of the lipids obtained are composed of C16 and C18 methyl esters, has shown that the lipids synthesized by these yeasts have the potential to be used as a raw material in the production of biodiesel.

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

*Sorumlu yazar e-mail: alibozkurt@nevsehir.edu.tr

^A.Bu makale yüksek lisans tezinden üretilmiştir

1. Giriş

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

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

Maya, mantar ve mikroalgler bileşimi bitkisel yağlara benzeyen triasilgliseritleri (TAGs)'leri sentezleyebilirken, bakterilerin çoğu spesifik yağları sentezleyebilmektedirler. TAG'ler biyodizel üretimi için ana materyallerdir ve birçok mikroorganizma tarafından hücre içinde yüksek miktarlarda üretilebilmektedir. Biyodizel üretimi için diğer önemli kaynak materyali ise mayalardır. *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus curvatus* gibi bazı mayaların kuru ağırlıklarının %20'sinden daha fazla lipit üretimi yapabildiği bilinmektedir [2,3]. Mayalar glikoz, ksiloz, gliserol, nişasta, lignosellüloz, tarıma dayalı sanayi atıkları gibi çeşitli karbon kaynaklarını lipit üretimi için kullanabilirler. Fakat her durumda lipit üretimi karbon haricindeki bir besin elementinin sınırlandırılması ile oluşturulan koşullar altında gerçekleşmektedir [4].

Genellikle yağ üreten mayalar, diğer mayalarla kıyaslandığında daha yavaş geliştikleri görülür. Bu sebeple, lipit üretimi yapan mayalardan lipit üretimi açısından maksimum verim alabilmek için uzun bir süreye ihtiyaç vardır [5].

Yağlı mikroorganizmaların karbon seviyesinin yüksek olduğu durumlarda ve besiyeri içeriğinde herhangi bir element sınırlandırıldığında yağlı mikroorganizmalar depo yağı olan triasilgliserollerini üretmeye başlarlar. Yağ üretimini besiyerine ilave edilen çeşitli elementlerin oranı tetikleyebilir. Yağlı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda yağ üretiminin artırılması amacıyla özellikle azot sınırlaması sıklıkla kullanılmaktadır. Bazı inorganik tuzların (fosfat, magnezyum, demir veya sülfat) ve vitaminlerin de azotun dışında yağ üretim metabolizmasını etkilediği belirtilmiştir [6].

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

2. Materyal ve Metot

2.1. Çalışmada kullanılan gıda örnekleri

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

2.2. Örnek alımı ve izolasyon

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

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

2.2.1. Alınan örneklerin Gram boyama işlemi

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

Gram boyama yönteminde belli bir sıra izlenerek şu işlemler yapılmıştır. İlk olarak lamaların üzerine saf su eklenmiş ve bu işlemin ardından demir öze bek alevinde steril edilmiştir. Besi yerinden numune alınarak lam üzerine iyice yayılmıştır. Ardından lam üzerinde bulunan fazla su buharlaştırmak ve lamı kurutmak için bek alevinden geçirilmiştir. Kurutulan lama ilk olarak kristal viyole damlatılmıştır. Bir dakika beklendikten sonra saf sudan geçirilmiştir. Bu işlem sonrasında lam üzerine lugol çözeltisi eklenmiş bir dakika beklendikten sonra saf sudan geçirilmiştir. Daha sonra üzerine etil alkol çözeltisi damlatılmış ve 10-15 saniye bekletilip ardından bol saf sudan geçirilmiştir. Son işlem olarak lam üzerine safranin boyası damlatılmış ve 30 saniye bekletilip ardından saf sudan geçirilmiştir. Bu işlemlerin sonunda ıslak olan lamalar temiz bir kâğıt havlu üzerinde kurumaya bırakılmıştır.

2.2.2. İzolatların mikroskopta incelenmesi

Gram boyama sonucu kuruyan boyalı lamaların üzerindeki mikroorganizmaların üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskop yardımıyla 100x immersiyon objektifinde incelenmiştir. İnceleme sonucu boyama işlemi yapılan lamlarda mor renkte görülen mikroorganizmalar gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilmiştir. Mikroskopta incelemeler sonucu örnekler içerisindeki mayalar belirlenmiştir. Elimizde bulunan toplam 60 izolat içerisinde 7 izolatın maya olduğu tespit edilmiştir.

2.2.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

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

2.2.4. Optimal besiyeri

Stok maya kültürlerinin üretildiği optimal besiyerinin içeriği Tablo 2.1.'de verilmiştir. Besiyeri başlangıç pH'sı, HCl ve NaOH ile ayarlanmıştır.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan optimal besiyeri içeriği

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

2.2.5. Lipit üretim besiyeri

Tablo 2.2.'de içeriği verilen lipit üretim besiyerinin başlangıç pH'sı ortama 1N HCl ve 1 N NaOH ilave edilerek pH 5,5'e ayarlandı.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyeri içeriği

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

2.3. Azot yokluğu stresinin uygulanması

PDA ortamında yatık agarda muhafaza edilen maya kültürlerinin aktifleştirilmesi için iğne uçlu öze yardımıyla alınan maya kültürü batırma yöntemiyle 100 mL stok besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere ekilmiştir. Hazırlanan maya kültürleri 30°C'de 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (Nüve ES 110) 1 gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra sıvı maya kültüründen aseptik koşullarda alınan 5 mL kültür, tekrar 100 mL stok besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere ekilmiştir. 30°C'de 100 rpm'de çalkalamalı etüvde 1 gün inkübe edilen maya kültürleri optimal besiyeri (azot varlığı) ve lipit üretimini teşvik edici besiyerine (azot yokluğu) ekilmek üzere hazır hale getirilmiştir.

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

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

2.4. Biyokütle veriminin saptanması

Biyokütle veriminin saptanması için biyokütle verimi: $(N_2 - N_1) / (t_2 - t_1)$ formülü kullanılmıştır ve formülde yer alan; N₂: t₂ zamanındaki biyokütle konsantrasyonu (mg/L), N₁: t₁ zamanındaki biyokütle konsantrasyonu, biyokütle konsantrasyonu: mg/litre/gün (1 günde 1 Lt besiyerinden elde edilen mg maya biyokütlesi) ifade etmektedir [7,8].

T1 zamanındaki başlangıç biyokütlesini (N₁) belirlemek için; ana stoktan (1 gün boyunca optimal koşullarda çoğaltılmış yaklaşık 100 ml hücre) 3 defa 20'şer mL hücre alınmış ve hücreler santrifüjle (3000 rpm'de 5 dk) toplandıktan sonra üst fazları atılmıştır. Sadece hücre bulunan tüplere saf su eklenerek saf suyla yıkama yapılmıştır. Yıkanan hücreler tekrar toplandıktan ve üst fazları dököldükten sonra, ağırlığı hassas terazide tartılmış ve ağırlığı kaydedilmiş olan 1,5 mL polipropilen tüplere aktarılmıştır. İçerisinde hücre bulunan tüpler 65°C'de etüvde yaklaşık 15 saat bırakılmıştır. Kuruyan hücrelerin bulunduğu tüpler tekrar hassas terazide tartılmış ve ağırlıklar kaydedilmiştir. İçerisinde kuru maya biyokütlesi bulunan tüp ağırlından, aynı tüpün boş ağırlığı çıkarılarak 20 ml hücrenin kuru ağırlığı saptanmıştır. Saptanan kuru ağırlık mg/L olarak ifade edilmiştir.

T2 zamanındaki biyokütleyi (N₂) belirlemek için; 1 günlük inkübasyonun sonunda hem N+ (azot varlığı) hem de N- (azot yokluğu) besiyerlerinde çoğalan hücrelerdeki her erlenden (her izolat için 1 erlen N+, 1 erlen N-) 3'er defa 20'şer

mL hücre otomatik pipetle çekilmiş ve kuru ağırlıkları yukarı satırlarda belirtildiği şekliyle saptanmıştır. Saptanan kuru ağırlık mg/L olarak ifade edilmiştir.

2.5. Toplam lipit miktarının saptanması

Toplam lipit miktarının saptanması için spektrofotometrik bir yöntem olan SPV (sülfo-fosfo-vanilin) yöntemi kullanılmıştır [9,10]

Örnekler için; 1 ml hücre alınarak santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır. Tüpte kalan hücre peletinin üzerine 100 µL saf su eklenmiş ve hücreler cam tüplere alınmıştır. Cam tüplerin içerisine 2 ml sülfirik asit (%95-98) eklenerek 100°C'de 10 dk sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra buz üzerinde soğutulan tüplerin içerisine 5 ml fosforik asit+vanilin çözeltisi eklenmiş ve tüpler 30°C'de 15 dk bekletilmiştir. Beklemeden sonra spektrofotometre cihazında 530 nm'de okuma yapılmıştır. Kör için içerisindedir 100 µL saf su olan cam tüpler kullanılmıştır. Analizler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve her numune için 530 nm'de okunan OD değerlerinin ortalaması alınmıştır. Elde edilen OD değerleri daha önce Enver Ersoy ANDEDEN'in doktora tez çalışmasında kanola yağının farklı konsantrasyonlarını kullanarak oluşturmuş olduğu standart eğri grafiğindeki denkleme konularak lipit miktarı saptanmıştır [11]. **Kuru ağırlıkta % lipit miktarı:** $100 \times \text{lipit miktarı} (\mu\text{g})/\text{biyokütle miktarı} (\mu\text{g})$ formülüyle saptanmıştır.

2.6. Lipit veriminin saptanması

Azot yokluğuna maruz bırakılan ve optimal koşullarda çoğaltılan hücrelerde lipit veriminin saptanması için; **Lipit verimi (mg/L/gün):** $\text{Biyokütle verimi} \times \text{kuru hücre ağırlığında \% lipit formülü}$ kullanılmış [12,7,8] ve formülde yer alan biyokütle veriminin nasıl saptandığı Bölüm 3.4'de anlatılmıştır. Kuru hücre ağırlığında % lipit miktarının saptanması için azot yokluğu stres denemesinin sonlandırıldığı gün kültürlerden 1 ml hücre alınarak -25°C'de 1 gün muhafaza edilmiş ve ertesi gün hücreler oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra Bölüm 3.5'de bahsedilen yöntem kullanılarak, 1 ml hücredeki lipit miktarı saptanmıştır.

2.7. Moleküler tanımlaması yapılan B37 izolata farklı pH'larda azot yokluğu stresi uygulanması

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

2.8. Yağ asidi analizi

Yağ asidi analizi, azot yokluğu stresinde en yüksek lipit verimine sahip B37 kodlu izolat için yapılmıştır. Lipitlerin ekstre edilmesinde Bligh ve Dyer yöntemi kullanılmıştır [13]. Lipit ekstraksiyonu için B37 kodlu izolatın kuru biyokütlesinden 10 mg tartıldı üzerine 900 µL metanol kloroform (2:1, v/v) karışımı eklenmiştir. 30 dk bekletildikten sonra 300 µL kloroform ve 480 µL ultra saf su eklenmiştir. Faz ayrımı için 2500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Alt faz çekilip başka tüpe alınmıştır. Üstteki su fazı atılarak ekstraksiyon işlemi 2 defa daha tekrarlanmıştır. Yeni tüpe alınan ekstraktın berrak olması için 500 µL saf su eklenerek karıştırıldı ve santrifüj edilerek alt faz tekrar yeni bir tüpe aktarılmıştır. Sonra azot gazı altında uçurma işlemi yapıldı ve 250 µL toluen eklenmiştir. Bunun üzerine 1,5 mL metanol sülfirik asit karışımı (97 mL metanol + 2,5 mL sülfirik asit) eklenmiştir. Cam tüpler 50°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan tüplerin içerisine 0,5 mL ultra saf su ve 0,7 mL hekzan eklenmiş ve tüpler çalkalanmıştır. Çalkalanan tüpler 2000 rpm'de 1,5 dk 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.

3. Bulgular

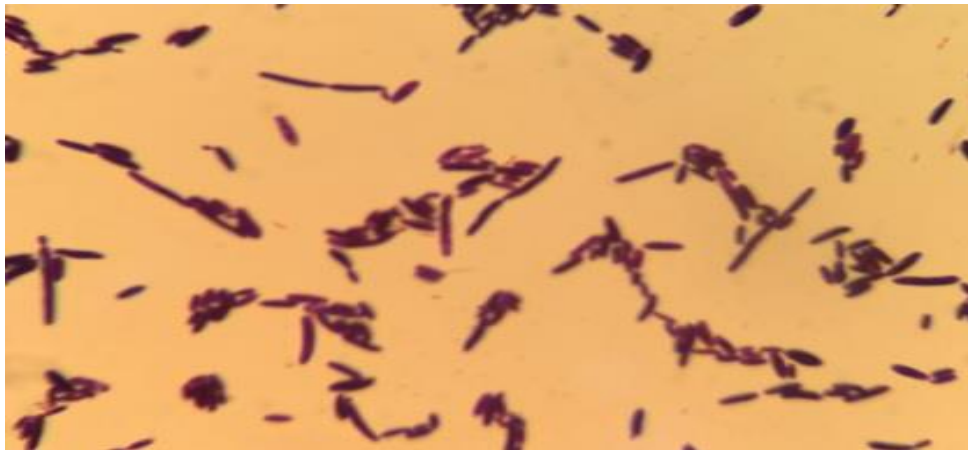
3.1. İzolatların kaynakları

Maya izolasyon kaynağı olarak kullanılan çeşitli gıdalar elma sirkesi, turşu suyu, şalgam, zeytinli yağ, çiğ süt, tereyağı, yoğurt, domates sosundan örnek alırken plastik özeler numuneler içerisine batırılarak örnek alımı yapılmıştır. Elde edilen izolatlara verilen kodlar ve izolatların alındıkları gıdalar Tablo 3.1.'de sunulmuştur.

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

3.2. İzolatların Gram boyaması ve mikroskopik tanımlama

İzolasyon çalışması sonucunda elde edilen 60 izolat gram boyama yöntemi ile boyanmış olup mikroskopik tanımlama işlemine hazır hale getirilmiştir. Gram boyama sonucu kuruyan boyalı lamaların üzerindeki mikroorganizmaların üzerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskop yardımıyla 100x immersiyon objektifinde incelenmiştir. Toplam 60 izolat içerisinde 7 izolatın maya olduğu tespit edilmiştir.



Resim 3.1. B37 İzolatının mikroskop görüntüsü

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

Hem optimal besiyerinde (azot varlığı/N+) hem de lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) 7 maya izolatına ait biyokütle verimi, % lipit miktarları ve lipit verimleri aşağıda tablo 4.2. de verilmiştir.

Tablo 3.2. İzolatların biyokütle verimleri, % lipit miktarları ve lipit verimleri

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

N+ : Azot varlığı
N- : Azot yokluğu

Azot varlığında en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar; B5 (% 6,01) ve B58 (% 4,25), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B45 (% 2,88) ve izolatıdır. Azot yokluğunda ise en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar B45 (% 94,40) ve B37 (% 53,95), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B2 (% 5,56) ve B3 (% 6,04) tür. Azot varlığında en yüksek lipit verimine sahip izolatlar B2 (38,73 mg/L/gün) ve B3 (27,74 mg/L/gün) olarak, en düşük lipit verimine sahip izolatlar B58 (11,78 mg/L/gün) ve B45 (14,24 mg/L/gün) olarak saptanmıştır. Azot yokluğunda en yüksek lipit verimine sahip izolat B52 (132,14 mg/L/gün), en düşük lipit verimine sahip izolatlar ise B2 (49,34 mg/L/gün) ve B58 (50,34 mg/L/gün) olarak bulunmuştur. Tüm izolatlarda lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu stresi) optimal besiyerine (azot varlığı) göre % lipit miktarı ve lipit verimleri daha yüksek bulunmuştur.

3.4. Moleküler tanımlama sonuçları

Lipit verimi en yüksek olan maya izolatlarından birinin moleküler tanımlaması hizmet alım yöntemi ile BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti firması tarafından yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tür tayinleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerindeki en yakın türlere göre yapılmıştır. B37 kodlu izolat *Pichia kudriavzevii* İzolate QC-1 türüyle % 100 eşleşme gösterdiği için *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 3.3. B37 - ITS1 - ITS4: *Pichia kudriavzevii*

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

3.5. B37 kodlu izolata farklı pH'larda azot stresi uygulama sonuçları

Lipit verimi, % lipit miktarı yüksek olan ve tür tanımlaması yapılan B37 numaralı izolata lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) azot yokluğu stresi uygulanmıştır. B37 kodlu izolata pH 6'da % 34,4 olarak en yüksek % lipit miktarına, pH 8'de ise 261,37 olarak en yüksek lipit verimine sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 3.5. B37 kodlu izolatin farklı pH değerlerinde biyokütle verimi, toplam lipit miktarı, % lipit miktarı ve lipit verimi

İzolot kodu	pH değeri	Biyokütle verimi	Toplam lipit	Kuru ağırlıkta %	Lipit verimi
B37	pH 6	685,67	42,33	34,4	235,80
B37	pH 8	1866,33	42,04	14,0	261,37
B37	pH 10	1451,00	33,29	14,0	203,05

3.6. Yağ asidi analiz sonuçları

Moleküler tanımlama sonucunda *Pichia kudriavzevii* olduğu belirlenen B37 kodlu izolatin kuru biyokütlesinden ekstre edilen lipitlerin transesterifikasyonu sonucunda sırasıyla % 96,02 oranında biyodizel verimi elde edilmiştir. Sonuçlar tablo 3.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.6. (B37) *Pichia kudriavzevii*'den ekstre edilen yağ asitlerinin transesterifikasyon sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı

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

4. Tartışma ve Sonuç

Günümüzde temel enerji kaynaklarına ait rezervler her geçen gün azalmaktadır. Artan enerji talebini karşılama potansiyeli hakkında endişeler de giderek artmaktadır. Enerji ihtiyacı günümüze kadar fosil kaynaklı yakıtların kullanılması ile karşılanmıştır. Rezervlerin giderek tükenmesinin yanında ozon tabakası, küresel ısınma, asit yağmurları gibi pek çok olumsuz durum fosil kaynaklı yakıtların kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bunların önüne geçmek için sürdürülebilir bir büyüme ve sürdürülebilir bir çevre için acil olarak çevreye zarar vermeyen yeni enerji alternatiflerinin ortaya çıkarılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Sürekli artan araç ve insan sayısı nedeniyle bu ihtiyaç her geçen gün katlanarak büyümektedir. Artan talep fosil yakıtların tükenmesine neden olmakla birlikte fiyatlarını da her geçen gün arttırmaktadır. Fosil yakıtların giderek tükenmesi ve çevreye olan olumsuz etkileri sonucu biyodizel yeni ve çevreci bir enerji kaynağı olarak, çeşitli araştırmalara konu olmaktadır [14].

Biyodizel üretimi için kullanılan hammaddeler genellikle bitkisel, hayvansal yağlar ve atık kızartma yağları şeklinde çeşitlilik göstermektedir [15]. Biyodizelin gıda olarak kullanılan bitkisel yağlardan elde edilmesinden dolayı yüksek olan hammadde maliyeti gıda ürünü olarak kullanılmayan bitkisel yağların kullanılmasıyla üretim maliyeti daha aşağıya çekilmiştir [16]. Atık kızartma yağları ve atık motor yağları günümüzde biyodizel üretiminde bitkisel yağların yerine maliyet düşürme amaçlı kullanılmaktadır [17]. 1930 ve 1940'larda zorunlu durumlarda bitkisel yağlar dizel yakıt kaynağı olarak kullanılmıştır. Biyodizel o dönemde sadece bitkisel yağların metil esterleri olarak kabul edilse de ekonomik bir yakıt olma özelliğine sahip olamamıştır [18,19].

Biyodizel üretiminde oluşan maliyetin en büyük kısmını, hammadde oluşturmaktadır. Bu yüzden, hammadde maliyetinde ortaya çıkan bir artış biyodizel fiyatını % 40 oranında arttırmaktadır. Bu nedenle biyodizel üretiminde hammadde seçimi son derece önemlidir [20].

Biyodizel kullanımının petrol dizeli yakıtta göre ekonomik olmamasının başlıca nedeni hammadde maliyetinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Biyodizel üretimindeki maliyetin toplam % 70-75'ini hammadde oluşturmaktadır. Bu yüzden biyodizel günümüzde fazla yaygınlaşamamıştır. Bu kısıtlamanın aşılabilmesi için ucuz hammadde kaynaklarını ortaya çıkarmak gerekmektedir. Dünya nüfusunun giderek artması nedeniyle tarımsal üretim için gerekli alan ihtiyacı da her geçen gün artmaktadır. Bu sorun günümüzde Dünya'nın birçok yerinde yaşanmaktadır. Bu

durum bitkisel yağ fiyatlarını yükseltmektedir. Önümüzdeki yıllarda Dünyanın geri kalanında da benzer sorunların ortaya çıkması beklenmektedir. Bu açıdan bakıldığında mikrobiyel lipitler biyodizel üretiminde kullanılan bitkisel yağlara alternatif bir hammadde kaynağı olabilme potansiyeli taşımaktadır [21]. Bu çalışmadaki sonuçlara göre;

Azot varlığında en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar; B5 (% 6,01) ve B58 (% 4,25), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B45 (% 2,88) ve B3 (% 3,00) izolatlarıdır. Azot yokluğunda ise en yüksek % lipit içeriğine sahip izolatlar B45 (% 94,40) ve B37 (% 53,95), en düşük % lipit içeriğine sahip izolatlar ise B2 (% 5,56) ve B3 (% 6,04) izolatlarıdır. Bütün izolatlarda, azot yokluğu stresinde azot varlığına kıyasla % lipit miktarlarında yüksek oranda artış olmuştur.

Azot varlığında en yüksek biyokütle verimine sahip izolatlar B2 (927,27 mg/L/gün) ve B3 (925,45 mg/L/gün) olarak, en düşük biyokütle verimine sahip izolatlar ise B58 (277,07 mg/L/gün) ve B5 (357,37 mg/L/gün) olarak saptanmıştır. Azot yokluğunda ise en yüksek biyokütle verimine sahip izolat B3 (1135,45 mg/L/gün), en düşük biyokütle verimine sahip izolat ise B45 (134,44 mg/L/gün) olarak saptanmıştır.

Lipit verimi verilerine bakıldığında ise, tüm izolatlarda azot yokluğunda lipit veriminin, azot varlığına oranla önemli ölçüde artış gösterdiği saptanmıştır. Buna göre azot varlığında en yüksek lipit verimine sahip izolat B2 (38,73 mg/L/gün), en düşük lipit verimine sahip izolat ise B58 (11,78 mg/L/gün) olarak saptanmıştır. Azot yokluğunda en yüksek lipit verimine sahip izolatlar; B52 (132,14 mg/L/gün) ve B37 (129,00 mg/L/gün) izolatları, en düşük lipit verimine sahip izolat ise B2 (49,34 mg/L/gün) izolatı olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada çeşitli gıda kaynaklarından mikrobiyal lipit üretme kapasitelerini araştırmak için izole edilen mayalar üzerinde iki farklı besiyerinde optimal besiyeri (azot varlığı) ve lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu) yapılan çalışmalar sonucu maya izolatlarının tamamında azot sınırlı ortamda lipit veriminin daha yüksek oranlarda olduğu görülmüştür. Bu durum, Woodbine, M. (1995) tarafından yapılan çalışmada özellikle azot sınırlamasının yağ üretiminin artırılması amacıyla yağlı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanıldığı bilgisiyle örtüşmektedir [6].

Lipit verimi en yüksek olan maya izolatlarından olan B37 kodlu izolatın tür tanımlaması yapılmıştır. B37 kodlu izolat *Pichia kudriavzevii* İzolat QC-1 türüyle % 100 eşleşme gösterdiği için *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmıştır. Ekmek ve alkollü içkilerin üretiminde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*'nin, ökaryot, küresel şekilli bir maya olduğu ve bitkilerin yüzeylerinde, toprakta, böcek ve hayvanların vücut yüzeylerinde bulunduğu bilinmektedir [22].

Saccharomyces cerevisiae ile yapılan çalışmalarda inositol içermeyen besiyerinde geliştirildiğinde yağ içeriğinin yaklaşık 15 kat arttığı görülmüştür [23].

Günümüzde ise yapılan analizler sonucunda mikroorganizmaların ve özellikle de mayaların çok farklı yağ asitlerini sentezleyebildikleri ve uygun koşullarda toplam biyokütellerinin % 70'ine varan oranlarda yağ depolayabildikleri belirlenmiştir. Mayalar arasında *Saccharomyces cerevisiae* kolay bulunabilirliği ve metabolizmasının ortaya konulmuş olmasından dolayı mikrobiyel yağ üretim çalışmalarının temelini teşkil etmektedir [24].

Literatürde çok az çalışma, *Pichia kudriavzevii*'yi oleaginous maya olarak araştırmıştır, bu nedenle yağ asidi profilleri ve kültür koşullarının bu profiller üzerindeki etkisi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Son araştırmalar, *Pichia kudriavzevii*'nin lipit ve etanol gibi yüksek değerli ürünler için iyi bir kaynak olarak kabul edilebileceğini göstermiştir [25,26]. Park vd. (2018) yapılan bir çalışmada *Pichia kudriavzevii*'nin aside toleranslı bir maya türü olduğunu rapor etmişlerdir [27].

Mikrobiyal lipit üretiminde besiyeri pH'ı oldukça önemli bir parametredir. Mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu elementlerin çözünürlük derecesi üzerinde oldukça etkili olan ortam pH'ı, bazı metallerin mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliğine etki etmektedir [28]. Johnson vd. (1992) farklı besiyeri başlangıç pH'larının R. glutinis mayasının lipit sentezi üzerine etkili olduğunu belirterek, en yüksek lipit içeriğinin pH 4'te elde edildiğini rapor etmişlerdir [29].

Literatürde yer alan bazı çalışmalarda mayaların lipit üretiminin pH 5.0–6.0 değerleri arasında optimum olduğu rapor edilmiştir [30,31,32,33]. Xue vd. (2006) lipit üretimi açısından *Rhodotorula glutinis* mayası ile monosodyum glutamat atıksuyu bulunan ortamda yaptıkları çalışmada ortam pH'sının 2.5 olduğu durumda hücre gelişiminin sınırlı hale geldiğini, ortam pH'sının 4.5–7.0 olduğu durumlarda ise dengede olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada biyokütle artışı ve % lipit miktarının en yüksek seviyesine pH 5.5'te ulaşıldığı görülmüştür [30].

Zhu vd. (2008) ortam pH değerinin 4-10 aralığında olduğu *Trichosporon fermentans* maya hücrelerinin lipit biriktirme kapasitesi üzerine yaptıkları çalışmada; maya hücrelerinin pH 6.5 değerinde % 62,4 oranıyla en yüksek lipit içeriğine ulaştığını rapor etmişlerdir [34]. *Lipomyces starkeyi* mayasının gelişme ortamındaki karbonun azota oranı 100 iken, Angerbauer vd. (2008) yaptıkları çalışmada; besiyerinin pH değerlerini 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0 olarak ayarlamış ve en yüksek % lipit miktarını % 56 olarak pH 5 değerinde bulmuşlardır [31].

Tür tanımlaması yapılan *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolata lipit üretim besiyerinde (azot yokluğu/N-) farklı pH'larda (6-8-10) azot yokluğu stresi uygulanmıştır. *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolat en yüksek % lipit miktarına pH 6'da ulaşmıştır. *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolat en yüksek lipit verimine pH 8'de ulaşmıştır.

Pichia kudriavzevii B37 kodlu izolat en yüksek biyokütle verimine pH 8'de ulaşmıştır. En yüksek % lipit miktarı % 34,4 lipit verimi ise 261,37 mg/L/gün olarak sırasıyla pH 6 ve pH 8 değerinde gerçekleşmiş ve bu durum literatür çalışmaları ile paralellik göstermiştir.

Çalışmada üretilen yağ asidi metil esterinin *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolatin % 31,13'nin doymuş yağ asitlerinden % 64,89'unun ise doymamış yağ asitlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Toplam lipitler içerisinde tekli-doymamış yağ asitlerinin oranı % 46,87, lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan yağ asidi tekli doymamış yağ asidi olan oleik asit (C18:1) % 37,14 bunun ardından doymuş bir yağ asidi olan palmitik asitin (C16:0) % 15,61 olduğu belirlenmiştir. Lipit içerisinde en yüksek miktarda yer alan yağ asidi tekli doymamış yağ asidi olan palmitoleik asit (C16:1) % 41,49 bunun ardından tekli doymamış bir yağ asidi olan oleik asitin (C18:1) % 33,17 olduğu tespit edilmiştir.

Xue vd. (2006) *Rhodotorula glutinis* hücrelerinden ekstre ettikleri lipitleri Gaz Kromatografi'de analiz etmişler ve bu maya hücrelerinden elde ettikleri lipitin bitkisel yağlar ile benzer özelliklere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu lipitlerin yüksek miktarda C16 ve C18 numaralı karbon atomlarını içerdiğini ve % 92,4 gibi yüksek oranda metil esteri oluşturduğunu rapor etmişlerdir [30].

Rhodotorula toruloides ve *Lipomyces starkeyi* maya türleri üzerinde Liu ve Zhao (2007) tarafından yapılan çalışmada 70 g/L glukoz, 2.0 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren pH'sı 6 olan besiyeri ortamında sırasıyla % 58,0 ve % 50,2 oranında lipit içeriği elde etmişlerdir [35].

Angebauer vd. (2008) *Lipomyces starkeyi* mayasını kullandıkları çalışmalarında; karbonun azota oranının lipit birikimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Glikoz miktarı artırılarak karbonun azota oranının 15, 20, 30, 60 ve 150 olarak ayarlandığı besiyeri ortamları oluşturulmuş ve en yüksek lipit miktarı % 68 olarak karbonun azota oranının 150 olduğu besiyerinde elde edilmiştir [31].

Bu çalışmada karbonun azota oranı 127 olarak ayarlanmış *Pichia kudriavzevii* B37 kodlu izolatin en yüksek lipit oranı % 34 olarak tespit edilmiştir. Li vd. (2010) *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15 mayasından ekstre ettikleri lipitin transesterleştirilmesi sonucunda elde edilen metil ester verimini % 85,8 oranında bulmuşlardır [36].

Karatay (2010) tarafından yapılan doktora tez çalışmasında, amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ maya hücrelerinin lipit konsantrasyonlarının belirlenmesinde azot kaynağı olarak kullanılmıştır. (NH₄)₂SO₄'ın besi ortamında sınırlandırılması sonucunda maya hücrelerindeki lipit üretiminde artış gerçekleştiği bildirilmiştir [37].

Farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde yetiştirilen mayalardan ekstre edilen lipitlerin yağ asidi dağılımlarının son derece benzer olduğu görülmüştür. Başlıca yağ asitlerinin C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 olduğu belirlenmiştir. [37].

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

Pichia kudriavzevii olduğu belirlenen B37 kodlu maya izolatlarının kuru biyokütlelerinden ekstre edilen lipitlere transesterifikasyon işlemi uygulandığında biyodizel verimleri sırasıyla % 96,02 olmuştur. Elde edilen sonuca göre yağlı bir maya türü olan *Pichia kudriavzevii*'nin ürettiği lipitlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmaya son derece uygun olduğu görülmüştür. Bu çalışmada izole ettiğimiz yağlı bir maya türü olan *Pichia kudriavzevii*'nin yağ asidi metil esterleri diğer oleaginous mayalarla benzerlik göstermektedir.

5. Teşekkür ve Katkı Beyanı

Bu çalışma, ABAP20F36 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz. M.A.B: Deney düzeneklerinin hazırlanması, laboratuvar çalışmaları, makale yazımı. Ş.Ö.: Laboratuvar çalışmalarının yürütülmesi, makale yazımı düzenleme.

6. Kaynaklar

- [1] Xu, J., Du, W., Zhao, X., Zhang, G. and Liu, D. Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* Rev. 10, 1-13. 2013
- [2] Vinarta, S. C., Angelicola, M. V., Barros, J. M., Fernandez, P. M., Mac Cormack, W., Aybar, M. J., & De Figueroa, L. I. Oleaginous yeasts from Antarctica: screening and preliminary approach on lipid accumulation. *Journal of basic microbiology*, 56(12), 1360-1368.2016
- [3] Wu, C.L., Buszard, B., Teng, C.H., Chen, W.L., Warr, C.G., Tiganis, T., Meng, T.C. Dock/Nck facilitates PTP61F/PTP1B regulation of insulin signalling. *Biochemical Journal*, 439(1), 151-159. 2011
- [4] Thevenieau, F., & Nicaud, J. M. *Microorganisms as sources of oils*. Ocl, 20(6), D603, 2013
- [5] Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1219-1227. 2011
- [6] Woodbine, M. Microbial fat: microorganisms as potential producers. *Progress Industrial Microbiology*. 1, 145-179. 1995
- [7] Zhu, J., Chen, W., Chen, H., Zhang, X., He, C., Rong, J., & Wang, Q. Improved Productivity of Neutral Lipids in *Chlorella* sp. A2 by Minimal Nitrogen Supply. *Frontiers in microbiology*, 7. 2016
- [8] Belotti, G., Bravi, M., de Caprariis, B., de Filippis, P., & Scarsella, M. 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.
- [9] Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, 155, 330-333. 2014
- [10] 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. 2016
- [11] Andeden, E.E, "Stres koşullarının bazı mikroalg türlerinde lipid 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

- [12] Gour, R. S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R. S., & Kant, A. Characterization and screening of native *Scenedesmus* sp. isolates suitable for biofuel feedstock. *PloS one*, 11(5), e0155321, 2016
- [13] Burja, A.M., Armenta, R.E., Radianingtyas, H., Barrow, J. Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55:12, 4795-4801. 2007
- [14] Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. ve Tiffany, D., Environmental, economic, and energetic costs and benefits of bioEurodiesel and ethanol biofuels, *Proceedings of the National Academy of sciences*, 103 (30), 11206-11210. 2006
- [15] Felizardo, P., Correia, M.J.N., Raposo, Í, Mendes, J.F., Berkemeier, R., Bordado, J.M. *Production of biodiesel from waste frying oils. Waste Management*. 26:5, 487-494. 2006
- [16] Kondamudi, N., Strul, J., Misra, M., Mohapatra, S.K. A green process for producing biodiesel from feather meal. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 6163–6166. 2009
- [17] Chung, K.H., Kim, J., Lee, K.Y. Biodiesel production by transesterification of duck tallow with methanol on alkali catalysts. *Biomass Bioenergy*. 33, 155-158. 2009
- [18] Fernandez-Álvarez, P., Vila, J., Garrido, J.M., Grifoll, M., Feijoo, G. and Lema, J.M. Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy oil spill of the Prestige, *Journal of hazardous materials*, 147, 914-922. 2007
- [19] Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., & Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied energy*, 87(1), 38-46,2010
- [20] Yan, J., and Lin, T. Biofuels in Asia, *Applied energy*, 86 , S1-S10, 2009
- [21] Ma, F. and Hanna, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70, 1–15, 1999
- [22] Gökteş, M. S., “Mikroorganizmaların yenilenebilir yağ üretimi potansiyelleri üzerine araştırma”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s. 49, Isparta, 2016
- [23] Bunker, H., J., Microbial Food. Rainbow, C., Rose, A., H., (Ed.), Biochemistry of Industrial Microorganisms (47-53). *Academic Press*, 147. New York, 1963
- [24] Kuleaşan, H., Hızal, M. Tek Hücre Yağları Üretimi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mezuniyet Tez Çalışması*, 2009
- [25] 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* ; 9 (5): 517–21, 2015
- [26] Oberoi H. S., Babbar N., Sandhu S. K., Dhaliwal S. S., Kaur U., Chadha B. S., 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* ; 39 (4): 557–66, 2012
- [27] Park, H.J., Bae, J.H., Ko, H.J., Lee, S.H., Sung, B.H., Han, J.I., Sohn, J.H., 'Low-pH production of d-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 2232–2242, 2018
- [28] Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Sista, V.R., Yadav, N.K. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 382-384, 1992
- [29] Cing Yıldırım S. ve Kanat T./ *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C- Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji* 7-9, 2018
- [30] Xue, F., Zhang, X., Luo, H. and Tan, T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*, 41, 1699-1702, 2006

- [31] Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbatch, M. and Guebitz, G.M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 99, 3051-3056, 2008
- [32] Easterling, E.R., French, W.T., Hernveez, R. and Licha, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 100, 356-361, 2009
- [33] Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., and Xian, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34, 1-5, 2009
- [34] Zhu, L.Y., Zong, M.H. and Wu, H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99, 7881-7885, 2008
- [35] Liu, B., & Zhao, Z. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(8), 775-780, 2007
- [36] Li, M., Liu, G.L., Chi, Z. and Chi, Z. M. 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a, *Biomass and Bioenergy* 34 , 101-107.
- [37] Ertuğrul Karatay, S., “Mikrobiyel lipitlerin biyodizel üretiminde kullanım kapasitelerinin belirlenmesi”, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s. 86-87, Ankara, (2010).