

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLEAGİNOUS MİKROORGANİZMALARDA
MİKROBİYAL LİPİT ÜRETİMİ**

TURGAY KANAT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA
TEMMUZ 2013**

Onur Sözü

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Oleaginous Mikroorganizmalarda Mikrobiyal Lipit Üretimi**” başlıklı çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Turgay KANAT

Tezin Başlığı: Oleaginous Mikroorganizmalarda Mikrobiyal Lipit Üretimi

Tezi Hazırlayan: Turgay KANAT

Sınav Tarihi: 03.07.2013

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri:

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Prof. Dr. Sibel KAHRAMAN

Yrd. Doç. Dr. Seval CİNG YILDIRIM (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OLEAGİNOUS MİKROORGANİZMALARDA MİKROBİYAL LİPİT ÜRETİMİ

Turgay KANAT

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

73 + x sayfa

2013

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Seval CİNG YILDIRIM

Biyodizel, trigliseritlerin veya serbest yağ asitlerinin kısa zincirli alkollerle transesterifikasyonu sonucu elde edilmektedir. Biyodizel, biyolojik olarak parçalanabilen, yenilenebilir ve toksik olmayan bir yakıt türüdür. Biyodizel yanma özelliklerinden dolayı petrol kökenli dizelere benzemektedir. Günümüzde genellikle çeşitli bitkisel yağlar, hayvansal yağlar ve atık kızartma yağları biyodizel üretimi için hammadde olarak kullanılmaktadır. Ancak hammadde maliyetlerinin yüksek olmasından kaynaklanan sorunlardan dolayı, biyodizel üretimi yaygın olarak yapılamamaktadır. Mikrobiyal yağlar fungus, bakteri ve mikroalg gibi biyokütlelerinin % 20'sinden fazla yağ biriktirebilen ve oleaginous türler olarak tanımlanan mikroorganizmalar tarafından üretilir.

Bu çalışmada, *Candida lipolytica* ve *Rhodotorula glutinis*'in, lipit üretme kapasiteleri kesikli ve iki aşamalı fermentasyon sistemlerinde araştırıldı. Maya miktarı (% 1, 3 ve 5 v/v), inkübasyon zamanı, sıcaklık (20-40°C), başlangıç pH'sı (4-7), çalkalama hızı (50–200 rpm) gibi çeşitli parametrelerin lipit üretimi üzerine etkisi tespit edildi. Mayaların lipit üretiminin artırılması amacıyla, peynir altı suyu, glukoz, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄ ve melas gibi çeşitli maddeler besiyerine ilave edildi. En yüksek lipit birikimi pH 5, 30°C ve 150 rpm'de dördüncü günde bulundu. Lipit ekstrasyonu modifiye Bligh ve Dyer yöntemine göre gerçekleştirildi. Kesikli sistemde *C. lipolytica* ve *R. glutinis*'in en yüksek lipit içeriği sırasıyla % 29.35±4.58 ve % 29.53±0.46 oldu. İki aşamalı fermentasyon sisteminde *C. lipolytica* ile en yüksek lipit içeriği oranı (% 41.6±0.1) elde edildi. Ekstre edilen lipitler bir baz katalizle transesterifiye edildi. Metil esterleri gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kullanılarak analiz edildi. *C. lipolytica* ve *R. glutinis*'in biyodizel verimi sırasıyla % 79 ve % 80.65 oldu. Başlıca palmitik asit, oleik asit ve stearik asit içeren lipitlerin yağ asidi kompozisyonunun biyodizel üretimine uygun olduğu belirlendi.

ANAHTAR KELİMELER: *Candida lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, lipit, biyodizel, iki aşamalı fermentasyon sistemi, peynir altı suyu.

ABSTRACT

MSc Thesis

PRODUCTION OF MICROBIAL LIPIDS BY OLEAGINOUS MICROORGANISMS

Turgay KANAT

Inonu University
Institute of Science
Department of Biology

73 + x pages

2013

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Seval CİNG YILDIRIM

Biodiesel is derived from triglycerides or free fatty acid by transesterification with short chain alcohols. Biodiesel is a renewable, biodegradable and nontoxic fuel. Biodiesel is similar to petro-diesel in combustion properties. Currently varied plant oils, animal fats and waste cooking oils are usually adopted as feedstocks for biodiesel production. But the high cost of these feedstocks has become a rising problem for large-scale biodiesel production. Microorganisms, such as fungi, bacteria and microalga that can accumulate lipids more than 20 % of their biomass are defined as oleaginous species.

In the study, lipid production capabilities of *Candida lipolytica* and *Rhodotorula glutinis* were investigated in batch and two stage fermentation systems. The effects of various operational parameters, namely amount of yeast (1, 3 and 5 % v/v), incubation time, temperature (20-40°C), initial pH (4-7) of the medium, agitation speed (50-200 rpm) on the lipid production were determined. In order to increase lipid production in yeasts various substances such as cheese whey, glucose, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄ and molasses were added to the media. The highest lipid accumulation was found at pH 5, 30°C, 150 rpm on the fourth day. The extraction of lipid content was carried out according to the modified Bligh and Dyer method. In the batch system the maximum lipid content of *C. lipolytica* and *R. glutinis* were 29.35±4.58 % and 29.53±0.46 %, respectively. The highest lipid content ratio (41.6±0.1 %) was obtained by *C. lipolytica* in the two stage fermentation system. The extracted lipids were transesterified by a base catalyst. The methyl esters were analyzed by using gas chromatography-mass spectrometer. The biodiesel yields of *C. lipolytica* and *R. glutinis* were 79 % and 80.65 %, respectively. The fatty acid compositions of lipids were determined to be appropriate for the production of biodiesel which contains mainly palmitic acids, oleic acids and stearic acids.

KEYWORDS: *Candida lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, lipid, biodiesel, two stage fermentation system, cheese whey.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen beni yönlendiren, çalışmamın her aşamasında pratik ve teorik bilgilerinden faydalandığım danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Seval CİNG YILDIRIM'a;

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya ve Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye;

Lipitlerin analizini yapan Uzm. Onur ÖZGÜL'e;

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na;

2011-114 no'lu proje ile bu araştırmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne;

Ayrıca hayatım boyunca yardımlarını ve desteklerini gördüğüm ailem'e

en içten duygularıyla teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mikrobiyal Yağlar	1
1.2. Biyodizel	1
1.3. Biyodizel Üretimi İçin Hammadde Kaynakları	2
1.3.1. Biyodizel üretiminde kullanılan mikrobiyal kaynaklar	4
1.3.1.1. Mikroalgler	5
1.3.1.2. Bakteriler	5
1.3.1.3. Funguslar	6
1.4. Oleaginous Mikroorganizmalarda Yağ Üretim Metabolizması	9
1.4.1. Triaçilgliserollerin biyosentezi	13
1.4.2. Yağ asitlerinin β -oksidasyonu	13
1.5. Yağ Asitlerinin Transesterifikasyonu	14
1.5.1. Baz ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonu	15
1.5.2. Asit ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonu	16
1.5.3. Enzim ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonu	17
1.6. Yağ Asitlerinin Moleküler Yapısı	17
1.7. Biyodizelin Yakıt Kalitesi ve Biyodizel Kalite Standartları	18
1.8. Çalışmada Kullanılan Oleaginous Mayaların Sınıflandırılması	19
1.9. Oleaginous Mikroorganizmalarda Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
2.1. Biyodizel İçin Mikroorganizmaların Hammadde Olarak Kullanıldığı Çalışmalar	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	29
3.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	29

3.3.	Çalışmada Kullanılan Maya Kültürlerinin Üretimi ve Saklanması	29
3.4.	Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	29
3.4.1.	Stok besiyeri	29
3.4.2.	Lipit üretim besiyeri	30
3.5.	Stok Maya Kültürlerinin Hazırlanması	31
3.6.	Optimizasyon Çalışmaları	31
3.6.1.	Maya miktarının zamana bağlı olarak biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması	31
3.6.2.	Sıcaklığın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması	31
3.6.3.	Çalkalama hızının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması	31
3.6.4.	Başlangıç besiyeri pH'sının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması	32
3.7.	Lipit Üretim Besiyerine İlave Edilen İnorganik Azot Miktarı ve Çeşidinin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması	32
3.8.	Lipit Üretim Besiyerine İlave Edilen Glukoz Miktarının Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması	32
3.9.	Bazı Doğal Hammaddelerin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması	32
3.9.1.	Melas miktarının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması	32
3.9.2.	Peynir altı suyunun biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması	33
3.10.	İki Basamaklı Fermentasyon Yönteminin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması	33
3.11.	Analizler	33
3.11.1.	Kültür ortamındaki kuru biyokütle miktarının hesaplanması	33
3.11.2.	Maya hücrelerinden lipit ekstrasyonu	34
3.11.3.	Mikrobiyal lipitlerin transesterifikasyonu	35
3.11.4.	Yağ asidi ve yağ asidi metil esterlerinin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazında analizi	35
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36
4.1.	Optimizasyon Çalışmaları	36
4.1.1.	Maya miktarının ve inkübasyon süresinin biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	36
4.1.2.	Sıcaklığın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	40
4.1.3.	Çalkalama hızının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	42
4.1.4.	Başlangıç pH'sının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	44
4.2.	Lipit Üretim Besiyerine İlave Edilen İnorganik Azot Miktarı ve Çeşidinin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi	45

4.3.	Glukoz Miktarının Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi	49
4.4.	Bazı Doğal Hammaddelerin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi	50
4.4.1.	Melas Miktarının Lipit Birikimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi	50
4.4.2.	Peyniraltı Suyunun Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi	54
4.5.	İki Basamaklı Fermentasyon Yönteminin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi	55
4.6.	Maya Hücrelerinde Sentezlenen Yağ Asitlerinin Dağılımı	57
4.7.	Transesterifikasyon Sonrası Elde Edilen Yağ Asidi Metil Esterleri Dağılımı	58
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	61
6.	KAYNAKLAR	65
	ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Yağ asidi biyosentez metabolizmasının genel gösterimi	10
Şekil 1.2.	Yağ asidi sentetaz enzim kompleksi ve yağ asitlerinin uzatılması reaksiyonun genel gösterimi	11
Şekil 1.3.	Triaçilgliserollerin <i>de novo</i> biyosentezinin genel gösterimi	14
Şekil 1.4.	Transesterifikasyon reaksiyonu genel gösterimi	15
Şekil 1.5.	Baz ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonunun şematik gösterimi	16
Şekil 1.6.	Enzim ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonunun şematik gösterimi	17
Şekil 1.7.	Kesikli kültürde gelişen oleaginous mayalarda lipit birikimi	21
Şekil 4.1.	Maya miktarının (1 ml, <i>Rhodotorula glutinis</i>) biyokütle değişimi ve lipit miktarı üzerine etkisi	36
Şekil 4.2.	Maya miktarının (3 ml, <i>Rhodotorula glutinis</i>) biyokütle değişimi ve lipit miktarı üzerine etkisi	37
Şekil 4.3.	Maya miktarının (5 ml, <i>Rhodotorula glutinis</i>) biyokütle değişimi ve lipit miktarı üzerine etkisi	38
Şekil 4.4.	Maya miktarının (1 ml, <i>Candida lipolytica</i>) biyokütle değişimi ve lipit miktarı üzerine etkisi	38
Şekil 4.5.	Maya miktarının (3 ml, <i>Candida lipolytica</i>) biyokütle değişimi ve lipit miktarı üzerine etkisi	39
Şekil 4.6.	Maya miktarının (5 ml, <i>Candida lipolytica</i>) biyokütle değişimi ve lipit miktarı üzerine etkisi	40
Şekil 4.7.	Farklı sıcaklıkların <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	41
Şekil 4.8.	Farklı sıcaklıkların <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	42
Şekil 4.9.	Farklı çarkalama hızlarının <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	43
Şekil 4.10.	Farklı çarkalama hızlarının <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	43
Şekil 4.11.	Farklı besiyeri başlangıç pH'larının <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	44
Şekil 4.12.	Farklı besiyeri başlangıç pH'larının <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	45
Şekil 4.13.	Farklı konsantrasyonlarda glukozun <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	49
Şekil 4.14.	Farklı konsantrasyonlarda glukozun <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	50
Şekil 4.15.	Farklı konsantrasyonlarda melasın <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	51
Şekil 4.16.	Farklı konsantrasyonlarda melas ve 2 g/L NH ₄ Cl'ün <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.17.	Farklı konsantrasyonlarda melasın <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.18.	Farklı konsantrasyonlarda melas ve 2 g/L NH ₄ Cl'ün <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi ...	53

Şekil 4.19.	Farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyunun <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	54
Şekil 4.20.	Farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyunun <i>C. lipolytica</i> 'nin biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	55
Şekil 4.21.	İki basamaklı fermentasyon yönteminin <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	56
Şekil 4.22.	İki basamaklı fermentasyon yönteminin <i>C. lipolytica</i> 'nin biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	57
Şekil 4.23.	Yağ asidi metil esterlerinin (<i>R. glutinis</i>) gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazındaki analiz sonuçları	59
Şekil 4.24.	Yağ asidi metil esterlerinin (<i>C. lipolytica</i>) gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazındaki analiz sonuçları	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Bazı oleaginous mikroorganizmaların sentezledikleri yağ oranı yüzdeleri	9
Çizelge 1.2.	Bazı yağ asitlerinin genel, sistematik ve kısa isimleri	18
Çizelge 1.3.	Çalışmada kullanılan oleaginous mikroorganizmaların sistematik sınıflandırılması	20
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan stok besiyeri içeriği	30
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyeri içeriği	30
Çizelge 3.3.	Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyerine ilave edilen iz element karışımı içeriği	30
Çizelge 4.1.	Farklı konsantrasyonlardaki NH_4Cl 'ün pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	46
Çizelge 4.2.	Farklı konsantrasyonlardaki NH_4Cl 'ün pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	47
Çizelge 4.3.	Farklı konsantrasyonlardaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ün pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki <i>R. glutinis</i> 'in biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	48
Çizelge 4.4.	Farklı konsantrasyonlardaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ün pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki <i>C. lipolytica</i> 'nın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi	48
Çizelge 4.5.	<i>R. glutinis</i> ve <i>C. lipolytica</i> hücrelerinde biriktirilen lipitlerin yağ asidi içeriği	58
Çizelge 4.6.	<i>R. glutinis</i> ve <i>C. lipolytica</i> 'dan ekstre edilen yağ asitlerinin transesterifikasyonu sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

N	Normal (Molar/litre)
M	Molar (Mol/litre)
°C	Celcius derece
g	Gram
L	Litre
ml	Mililitre
v	Hacim
w	Kütle
MDa	Mikrodalton
FA	Yağ asidi
FAS	Yağ asidi sentetaz
ACP	Açıl taşıyıcı protein
TCA	Trikarboksilikasit
ACL	ATP-sitrat liyaz
ACC	Asetil-KoA karboksilaz
ME	Malik enzim
TAG	Triaçilgliserol

1. GİRİŞ

1.1. Mikrobiyal Yağlar

Uzun yıllardan beri mikroorganizmalar tek hücre proteini kaynağı olarak yaygın şekilde kullanılırken günümüzde artık tek hücre yağı kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Vamvakaki vd., 2010). Tek hücre yağı olarak adlandırılan mikrobiyal lipidlerin biyoteknolojik üretimleri gerçekleştirilmektedir. Bu işlemler sırasında gıda, ilaç endüstrisinde ve enerji üretiminde kullanılan bitkisel ve hayvansal kaynaklarda nadiren bulunan bazı özel lipid çeşitleri sentezlenmektedir (Kaboosi ve Behbahani, 2012). Mikrobiyal lipid üretiminde yüksek miktarda lipid üretebilme kapasitesinden dolayı oleaginous mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Mikrobiyal lipidlerin kullanım alanlarından biri de biyodizel üretimidir. Oleaginous mikroorganizmalar tarafından sentezlenen mikrobiyal lipidler biyodizel üretiminde alternatif bir hammadde kaynağı olabilmektedir (Khot vd., 2012).

1.2. Biyodizel

Dünyamızda insan nüfusunun artmasına bağlı olarak gelişmekte olan ülkelerin enerjiye olan taleplerinin artması, enerji krizlerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır (Lombard vd., 2008). 1973'ten 2007 yılına kadar olan süreçte dünya genelinde petrol tüketimi iki kat artışla 256 milyon galondan 505 milyon galona ulaşmıştır. 2010 yılı itibariyle dünya nüfusu 6.8 milyara ulaşırken petrol rezervlerindeki azalış ise % 2 ile % 3 arasında gerçekleşmiştir (Campbell, 2006). 2007 yılından 2035 yılına kadar olan süreçte ise dünya enerji tüketiminin % 49 oranında artacağı tahmin edilmektedir (Shi vd., 2011). Fosil yakıtların kullanımı bu hızda devam ettiği takdirde, tahmin edilebilir bir gelecekte fosil yakıtların tükenmesi muhtemeldir (Carioca, 2010). Bu sebeplerden dolayı yenilenebilir, geleceğin ihtiyaçlarına uygun ve çevreyle dost yeni yakıtların araştırılmasına yönelik çalışmalar dünya genelinde hızla devam etmektedir (Kerr, 2007).

Enerji krizlerinin aşılmasında petrol türevli yakıtlara alternatif olarak geliştirilen biyolojik yakıt türleri bulunmaktadır. Biyodizel gelecekte en çok kullanılacağı tahmin edilen biyolojik yakıtlar arasında bulunmaktadır (Stephanopoulos, 2007). Günümüzde biyodizel bir alkol, bir asit veya bir enzimin katalizör olarak kullanıldığı transesterifikasyon yöntemiyle elde edilmektedir (Miao

ve Wu, 2006). Biyodizel, yenilenebilir biyokütleden elde edilen triaçilgliserollerin veya serbest yağ asitlerinin kısa zincirli alkollerle transesterifikasyonu sonucu yağ asidi metil veya etil esteri şeklinde üretilir (Meng vd., 2009).

Biyodizel, eldesinin kolay ve moleküler yapısının günümüz yakıtlarına uygunluğu nedeniyle ayrıntılı olarak test edilmiş ve kullanılabilir alternatif bir yakıt olarak kabul görmüştür. Biyodizelin yanma özellikleri, dizel motorlarda kullanılmaya uygundur (Demirbaş, 2002). Biyodizel diğer petrol kökenli yakıtlarla kıyaslandığında CO₂ emisyonunda önemli oranda azalma meydana getirmektedir. Ayrıca biyodizel, sülfür ve aromatik bileşikler içermeyen, toksik olmayan bir yakıt türüdür (Demirbaş, 2009). Bu nedenle çevrenin korunması açısından birçok avantajları da bulunmaktadır. Çevre dostu bir yakıt olan biyodizel ülkelerin petrol ithalatına olan bağımlılığını da azaltmaktadır (Carraretto vd., 2004). Bu nedenlerden dolayı dünya çapında son on yıllık süre içinde biyodizel üretiminde gözle görülür oranda ilerleme kaydedilmiştir.

Avrupa Birliği biyodizel üretiminde dünya lideri konumundadır. Avrupa Birliği ülkelerinde biyodizel üretimi 2005 yılında 3.2 milyon ton iken 2006 yılında yaklaşık 4.9 milyon tona ulaşmıştır. Biyodizel üretimindeki yıllık % 54'lük ortalama artış 2005 yılı sonunda % 65'lik rekor bir orana yükselmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde ise 2000 yılında 2 milyon galon olan biyodizel üretimi 2006 yılında 250 milyon galona 2007 yılında ise 450 milyon galona ulaşmıştır. Biyodizel üretimindeki hızlı artış sadece gelişmiş ülkelerle sınırlı kalmayıp Çin, Brezilya, Arjantin, Endonezya ve Malezya gibi gelişmekte olan ülkelere de devam etmektedir. Dünya genelindeki biyodizel üretim kapasitesinin % 42'lik büyüme oranıyla 2016 yılına kadar 37 milyar galona ulaşması beklenmektedir (Li vd., 2008).

1.3. Biyodizel Üretimi İçin Hammadde Kaynakları

Biyodizel üretimi için kullanılan hammaddeler genellikle bitkisel, hayvansal yağlar ve atık kızartma yağları şeklinde çeşitlilik göstermektedir (Felizardo vd., 2006). Dünya genelinde üretilen biyodizelin % 95'inden fazlası besin olarak tüketilen yağlardan üretilmektedir. Fakat biyodizel maliyetinin % 70-90'ını hammadde olarak en çok tercih edilen bitkisel yağlar oluşturmaktadır. Ayrıca bitkisel yağların üretimi için geniş tarımsal arazilere ihtiyaç duyulmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde tarımsal üretime ayrılan alanların biyodizel için bitkisel hammadde üretimi

amacıyla kullanılması bu ülkelerde yaşayan insanların açlık tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına sebep olacaktır. Çünkü dünya genelinde insan nüfusunun artmasına paralel olarak gıdaya ve diğer kaynaklara duyulan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır (Azocar vd., 2010).

Biyodizelin pahalı bitkisel yağlardan üretilmesinden kaynaklanan yüksek üretim maliyeti, yemeklik olmayan yağların hammadde olarak kullanılmasıyla azaltılabilmektedir (Kondamudi vd., 2009). Günümüzde biyodizel üretiminde yemeklik yağlar yerine atık kızartma yağları ve atık motor yağları da kullanılmaktadır (Chung vd., 2009). Biyodizel üretiminde kullanılan atık yağlardan, sarı gres denilen yağ genellikle bitkisel ya da hayvansal yağlardan elde edilir ve ısıtılarak yemeklerde kullanılır. Sarı gresteki serbest yağ asidi içeriği % 15 olmak zorundadır. Eğer bu oran % 15'ten fazla olursa kahverengi gres olarak adlandırılır. ABD'de yıllık ortalama 500 milyon ton gres ve hayvansal yağ restaurantlarda kullanılmaktadır. Bu miktar ortalama 5.7 milyon litre biyodizel yakıt anlamına gelmektedir (Canakcı, 2007).

Bitkisel kökenli biyodizelin fiyatı petrol kaynaklı dizellerle karşılaştırıldığında 1.5 kat daha pahalıdır. Buna karşın atık kızartma yağlarının fiyatı bitkisel yağlardan 2-3 kat daha ucuzdur (Phan ve Phan, 2008). Ancak atık kızartma yağları yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarından yağ asitlerinde hidroliz, polimerizasyon ve oksidasyon gibi istenmeyen bazı kimyasal ve fiziksel değişimler meydana gelir (Kulkarni ve Dalai, 2006). Oksidasyon ve yüksek nem varlığında triaçilgliserolün hidrolize olması sebebiyle serbest yağ asidi miktarı artar. Serbest yağ asidi ve su transesterifikasyon reaksiyonunu olumsuz yönde etkiler. Ayrıca yağ asidi esterleri ve gliserolün ayrılmasını engeller. Kızartma yağlarında dimerik, polimerik asit ve gliseritlerin oluşumu yağın viskozitesini de önemli ölçüde artırır. Böylece moleküler kütle ve iyot değerleri düşerken, sabunlaşma değeri ve yoğunluğu artar. Bu durum transesterifikasyon reaksiyonunun yüksek oranda meydana gelmesini engeller (Enweremadu vd., 2009).

Hayvansal yağların biyodizel üretiminde kullanımları ile ilgili yapılan çalışmalarda kuyruk yağı ve tavuk artıklarından kalan yağlar kullanılmaktadır (Bhatti vd., 2008). Bu yağların miristik (C 14:0), palmitik (C 16:0) ve stearik asit (C 18:0) gibi doymuş yağ asitlerinden meydana gelmesi, yüksek setan numarasına sahip olmasına ve doymamış yağlara göre oksidasyona daha az yatkın olmasına neden

olmaktadır (Canakci, 2007). Sonzamanlarda bitkisel yağ üretim maliyeti, atık yağların ve atık kızartma yağlarının kullanımı ile ilgili dezavantajların bulunması sebebiyle, biyodizel üretiminde yeni ve farklı hammaddelerin kullanılmasına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır (Peralta ve Keasling, 2010).

1.3.1. Biyodizel üretiminde kullanılan mikrobiyal kaynaklar

Biyodizel üretimi için hammadde sınırlamalarını aşmak üzere araştırmacılar son yıllarda yağ asidi kaynağı olarak farklı biyolojik kaynaklara yönelmişlerdir. Bu kaynaklar arasında mikroorganizmalar özellikle de yüksek oranda yağ asidi ürettikleri için oleaginous mikroorganizmalar dikkat çekmektedir (Meng vd., 2009).

Biyokütlesinde % 20'den fazla oranda yağ biriktiren oleaginous mikroorganizmalar arasında bazı fungus, maya, bakteri ve mikroalg türleri bulunmaktadır (Vicente vd., 2009). Mikrobiyal yağlar, bitkisel ve hayvansal yağlarla kıyaslandığında kısa yaşam döngüsüne sahip olup kolay üretilibilmeleri, daha az iş gücü ve mekan gereksinimi olması, mevsimsel ve iklimsel koşullara ihtiyaç duymamaları açısından daha avantajlı bir şekilde biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilir (Li vd., 2008). Ayrıca mikrobiyal yağlar, yapıları ve yağ asidi bileşiminden dolayı biyodizel uygulamalarında hammadde olarak bitkisel yağlara alternatif olmaktadır (Peng vd., 2008).

Kısa sürede üreyen oleaginous mikroorganizmalar tarafından üretilen bu yağlar, mikroorganizmalardan ekstre edilerek, kısa zincirli alkollerle transesterifikasyona uğratılıp, günümüz standartlarında yüksek kalitede biyodizel üretilmektedir. Ayrıca geniş bir yelpazeye sahip mikrobiyal yağ çeşitlilikleri sayesinde biyodizelin sahip olması gereken yüksek setan sayısı, ısınma değeri ve düşük viskozite gibi birçok özellikleri de geliştirilebilmektedir. Bu avantajlara ek olarak oleaginous mikroorganizmaların biyodizel üretiminde kullanılması tarımsal ürünlerin ve gıdaların üretimini sınırlamayacaktır (Knothe, 2005). Ayrıca oleaginous olmayan bazı mikroorganizmalara yağ sentezinden sorumlu gen bölgeleri de aktararak bu mikroorganizmaların yağ üretme kapasiteleri artırılabilir (Kalsheuer vd., 2006).

1.3.1.1. Mikroalgler

Mikroalgler, fotosentetik mikroorganizmalardır ve karbondioksidi direk olarak yağ asitlerine dönüştürürler. Mikroalglerin kuru biyokütlelerindeki yağ içerikleri yaklaşık % 20 ile % 60 aralığındadır. Ancak *Botryococcus*, *Nannochloropsis*, *Schizochytrium* cinsleri yaklaşık olarak kuru biyokütlelerinin % 80'i oranında yağ biriktirebilirler. Ayrıca mikroalgler türlerine bağlı olarak çeşitli tipteki yağları ve hidrokarbonları üretebilirler (Guschina vd., 2006).

Mikroalglerin ürettikleri yağ asitleri çoğunlukla doymamış yağ asitleridir. Bunlar, palmitoleik asit (C 16:1), oleik asit (C 18:1), linoleik asit (C 18:2) ve linolenik asit (C 18:3) tir. Doymuş yağlar, palmitik asit (C 16:0) ve stearik asit (C 18:0) olup, çok düşük oranlarda bulunur (Shi vd., 2011). Ürettikleri uzun zincirli yağ asitleri, biyodizel üretimi için kaynak olarak kullanılabilir (Beer vd., 2009). Ayrıca mikroalgler makroalgere göre kültür ortamı olarak daha az alana ihtiyaç duyarlar, daha kısa zamanda ürerler ve daha fazla yağ üretirler. Mikroalgler 3.5 saat içerisinde biyokütlelerini iki katına çıkarabilirler (Shay, 1993). Alglerden üretilen biyodizelin sülfür içermediği, partikül, CO, hidrokarbon ve SO_x emisyonlarının az olmasına rağmen NO_x emisyonunun bazı motor türlerinde fazla olduğu bildirilmiştir (Mata vd., 2010).

Mikroalgler yüksek oranda yağ asidi içermelerine rağmen diğer oleaginous mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında fotosentez aktivitelerini gerçekleştirmeleri için çok geniş alanlara ihtiyaç duyarlar. Ayrıca mikroalglerin üremelerinin mevsimsel koşullara bağlı olması ve büyük miktarda suya ihtiyaç duymalarından kaynaklı üretim maliyetleri çok yüksek olmaktadır (Chisti, 2007).

1.3.1.2. Bakteriler

Birçok bakteri türü polihidroksibütirik asit ve polihidroksialkonoik asit gibi depo yağları biriktirirken sadece birkaç bakteri türü biyodizel üretimine uygun triaçilgliseroller üretmektedir (Alvarez ve Steinbüchel, 2002). Actinomycetes sınıfına ait *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Nocardia* ve *Gordonia* triaçilgliserol üreten türler arasında yer almaktadır. *Rhodococcus opacus* PD630 yüksek konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde kuru biyokütlesinin % 38'i oranında triaçilgliserol üretmiştir ve yağ asidi içeriği palmitik asit (C 16:0), stearik

asit (C 18:0) ve oleik asit (C 18:1) tir (Kurosawa vd., 2010). *Gordoina sp.* biyokütlesinin % 50'sinden fazla oranda yağ asidini endüstriyel tarımsal atık içeren besiyerinde üretmiştir (Gouda, 2008).

Gen mühendisliği çalışmalarıyla model organizma *Escherichia coli*'de yağ asidi sentezi artırılabilir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada *fadD* geni bloke edilen *E. coli*'ye açıl-KoA sentetaz geni klonlanarak asetil-KoA karboksilaz ve tiyoesterazın aşırı ifadesi sağlanarak *E. coli* 2.5 g/L yağ asidi üretebilecek hale getirilmiştir (Lu vd., 2008). Ayrıca *Acinetobacter baylyi* ADP1'den ekstre edilen WS/DGAT (Wax ester sentetaz/açıl-KoA: diaçil-gliseroil açıltransferaz) *atfA* geni ve *Zymomonas mobilis*'ten ekstre edilen etanol üreten *pdC* ve *adhB* genleri *E. coli*'ye aktararak bu bakteri direk yakıt üreten bir bakteriye dönüştürülmüştür. Oluşan bu yakıtta da mikrodizel denilmektedir (Kalsheuer vd., 2006). Böylece, glukoz veya lignoselüloz gibi hammaddelerden transesterifikasyon yöntemine ihtiyaç duyulmadan direk biyodizel üretilebilmektedir (Shi vd., 2011).

Bakterilerin biyokütle artışları diğer mikroorganizmalara göre daha kısa sürede olmasına rağmen, ürettikleri yağ asidi içeriği diğer mikrobiyal kaynaklardan elde edilen yağlardan farklıdır. Bakteriler daha çok doymamış yağ asitleri ve bazı dallanmış zincirli yağ asitleri gibi özel yağları üretebilme yeteneğine sahiptirler. Bu sebeplerden dolayı bakteriler biyodizel üretim süreçlerinde daha az tercih edilmektedir (Li vd., 2008).

1.3.1.3. Funguslar

Bazı filamentli fungusların ve mayaların sentezledikleri mikrobiyal yağlar biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Filamentli fungusların biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmasına dönük çalışmalara çok yakın zamanlarda başlanmıştır. *Humicola lanuginosa* kuru biyokütlesinin % 75'i oranında yağ biriktirebilirken, *Aspergillus oryzae* kuru biyokütlesinin % 57'si oranında yağ üretebilmektedir ve triaçilgliserollerin transesterifikasyonunda rol alan lipaz enzimini sentezleyebilmektedir (Adachi vd., 2011).

Biyoteknolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılan *Mortierella alpina* çoklu doymamış yağ asitlerini sentezleyebilen bir fungus türüdür (Jang vd., 2005). Yüksek oranda yağ asidi üretebilen diğer bir fungus türü olan *Mucor circinelloides*,

Zygomycetes sınıfına aittir (Li vd., 2011). Bu fungus türü, ilk ticari mikrobiyal lipit üretimi çalışmalarında kullanılmıştır (Ratledege, 2004). *Mucor circinelloides*, biyodizel hammaddesi olarak triaçilgliserol sentezinin ve lipit transformasyonunun yoğun bir şekilde araştırıldığı bir fungus türüdür. *Umbelopsis isabellina*, biyolojik atıkları biyodizele dönüştürmede önemli bir tür olarak ortaya çıkmaktadır (Vicente vd., 2009).

Oleaginous mayalar, kuru biyokütlelerinin % 20'si üzerinde lipit üretebilirler. Sentezledikleri lipitlerin kompozisyonu ve enerji değerleri bitkisel ve hayvansal yağlarla benzer özellikler göstermektedir. Ayrıca mayalar, lipitleri kısa sürede sentezleyebilir ve mayaların üremeleri mevsimsel değişimlerden etkilenmez (Li vd., 2006). Oleaginous mayaların lipit üretme kapasiteleri 1970'li yıllardan beri bilinmektedir. Ancak son yıllarda, biyodizel üretiminde hammadde olarak mayalar tarafından üretilen lipitlerin kullanımına yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Biyodizel üretimi amacıyla kullanılan mayalar, toprakta, tatlı sularda, denizlerde, okyanusların yüzey ve derinlikleri gibi doğal yaşam alanlarında bulunabilirler (Ratledege, 2005).

Doğada geniş yayılma alanı bulunan mayalar, düşük sıcaklık, düşük oksijen seviyelerinde ve okyanus suları gibi ekstrem koşullarda yaşayabilirler. Şimdiye kadar 100 maya cinsi ve yaklaşık 1500 maya türü tanımlanmıştır. Oleaginous mayalar arasında Basidiomycota şubesine ait neredeyse bütün maya türlerinin iyi lipit üreticisi olduğu bilinmektedir. Ascomycota şubesi içinde *Yarrowia lipolytica* gibi bazı önemli oleaginous türler tanımlanmıştır (Beopoulos vd., 2009b).

Tanımlanan oleaginous mayaların büyük çoğunluğu *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospodium*, *Cryptococcus* ve *Lypomyces* cinsi maya türlerine aittir (Li vd., 2008). *Yarrowia lipolytica*, en iyi yağ sentezi yapabilen maya türüdür (Beopoulos vd., 2009b). Saccharomycetales ordosuna ait olan bu maya parafin ve yağ gibi hidrofobik substratları çok iyi yıkabildiğinden biyoteknolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayrıca genetik ve metabolik mühendislik çalışmalarının geliştirilmesi amacıyla kullanılan model bir organizmadır (Fickers vd., 2005).

Candida cinsi içerisinde yer alan *Candida curvata*, *Apiotrichum curvatum* ve *Candida freyschussii* yüksek oranda yağ depolayabilen maya türleri içerisinde yer almaktadır. Ascomycota şubesine ait *Candida* cinsi birbirinden farklı 150 maya

türünü içermektedir. Bu maya türlerinin büyük çoğunluğu 37°C'nin üstü sıcaklıklarda yaşayamaz (Ratledge, 2005).

Lypomyces cinsi mayalar Saccharomycetales ordosuna aittir. Bu cinse ait maya türleri hücrelerinde yüksek oranda triaçilgliserol depo etme yeteneğine sahiptir. Toprakta yaşayan *Lypomyces* türleri, dünya genelinde her yerde bulunurlar. *Lypomyces starkeyi*, farklı kültür koşullarında biyokütlesinin % 70'i üzerinde lipit depolayabilen bir mikroorganizmadır. Ayrıca bu maya türü ksiloz ve glikoz karışımlarını ya da atıkları kullanarak lipit üretebilir (Zhao vd., 2008).

Cryptococcus curvatus, çok çeşitli substratları kullanarak lipit üretebilen ve endüstriyel potansiyeli olan bir maya türüdür. Üremek için çok az oranda besine ihtiyaç duyar ve biyokütlesinin % 60'ı üzerinde lipit depolayabilir. *Cryptococcus* cinsi, sudan, yapraklardan, çiçeklerden ve bitki köklerinden izole edilebilen ve doğada geniş yayılıma sahip maya türlerini içermektedir (Zhang vd., 2011).

Rhodosporidium ve *Rhodotorula* cinsleri Basidiomycota şubesine aittirler ve oleaginous mayalar olarak tanımlanırlar. *Rhodotorula* türlerinin geniş yayılım alanı vardır. Bu cinse ait maya türleri, çeşitli ticari öneme sahip doğal karotenoidler sentezleyen potansiyel pigment üreticileridir. Bu cinsin bir türü olan *Rhodotorula glutinis* depo yağları sentezleyebilen, glikojeni besin olarak kullanabilen kırmızı bir maya türüdür (Malisorn vd., 2008).

Rhodosporidium toruloides mezofilik oleaginous bir maya türüdür. *Rhodosporidium*, epoksidleri, bifenilleri ve oksiranları biyolojik yıkıma uğratabilen, karotein üretebilen, çeşitli lignoselülozik biyoatıkları lipite dönüştürebilen maya türlerini içerir (De Miguel vd., 1997). *Rhodosporidium*, birçok biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilen ve çok farklı reaksiyonları bir arada yürütebilen maya türlerini kapsamaktadır (Li vd., 2006).

Bu mikroorganizmaların hücrelerinde en fazla rastlanan yağ asitleri arasında stearik asit (C 18:0), oleik asit (C 18:1), palmitoleik asit (C 16:1), linoleik asit (C 18:2) ve palmitik asit (C 16:0) gelmektedir (Cheirsilp vd., 2011). Mayalarda kültür koşullarının, besiyerindeki karbon ve azot (C/N) oranının, iz elementlerin ve organik tuzların oranının lipit üretimi üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Mainul vd., 1996). Ayrıca organik azot kaynaklarının lipit üretimi üzerinde, inorganik azot kaynaklarının ise biyokütle artışı üzerinde olumlu etkileri tespit edilmiştir (Enshaeieh

vd, 2012). Diğer taraftan Mg^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} ve Ca^{+2} gibi elementlerin konsantrasyonu da yağ üretimini etkilemektedir (Li vd., 2006).

Mayalarda kültür koşulları ve besiyeri içeriğinin, üretilen yağ miktarı üzerinde etkili olduğundan dolayı uzun süren optimizasyon çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır. Fakat optimum koşullar elde edildikten sonra, ucuz ve doğal karbon kaynakları kullanılarak yağ elde edilebildiğinden biyodizel maliyetleri düşürülebilmektedir. Bundan dolayı mayalar, biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak ön plana çıkmaktadır (Li vd., 2008). Çizelge 1.1’de bazı oleaginous mikroorganizmaların ürettikleri yağ oranları verilmektedir.

Çizelge 1.1. Bazı oleaginous mikroorganizmaların sentezledikleri yağ oranı yüzdeleri (Meng vd., 2009).

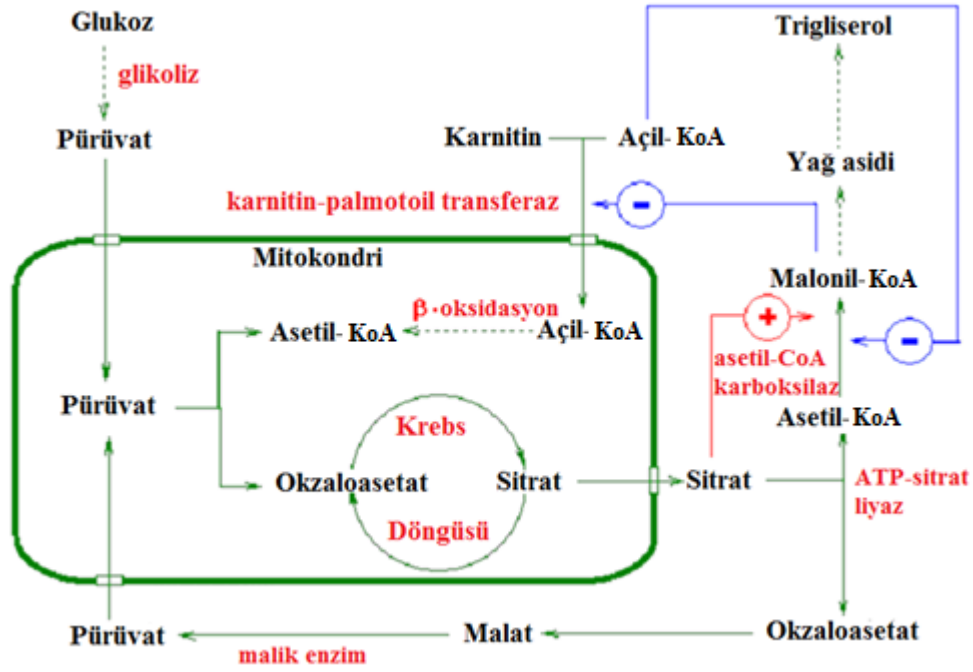
Mikroorganizma	Yağ oranı (%)	Mikroorganizma	Yağ oranı (%)
Mikroalg		Maya	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-57	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bakteri		Fungus	
<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

1.4. Oleaginous Mikroorganizmalarda Yağ Üretim Metabolizması

Yağ asitleri birçok farklı alanda özellikle de biyodizel üretiminde kullanılmaktadır (Guschina vd., 2006). Organizmalar aracılığıyla yağ asidi biyosentezi gerçekleştirilmektedir (Chisti, 2007). Bütün mikroorganizmalar lipit sentezleyebilir ancak sadece oleaginous türler önemli miktarda lipiti hücrelerinde depo ederler. Birçok araştırma şunu göstermiştir ki, aslında oleaginous mikroorganizmalar yağ asidi biyosentezinin temel birimi olan asetil-KoA’yı yüksek oranda sentezleyebilirler (Papanikolaou ve Aggelis, 2011).

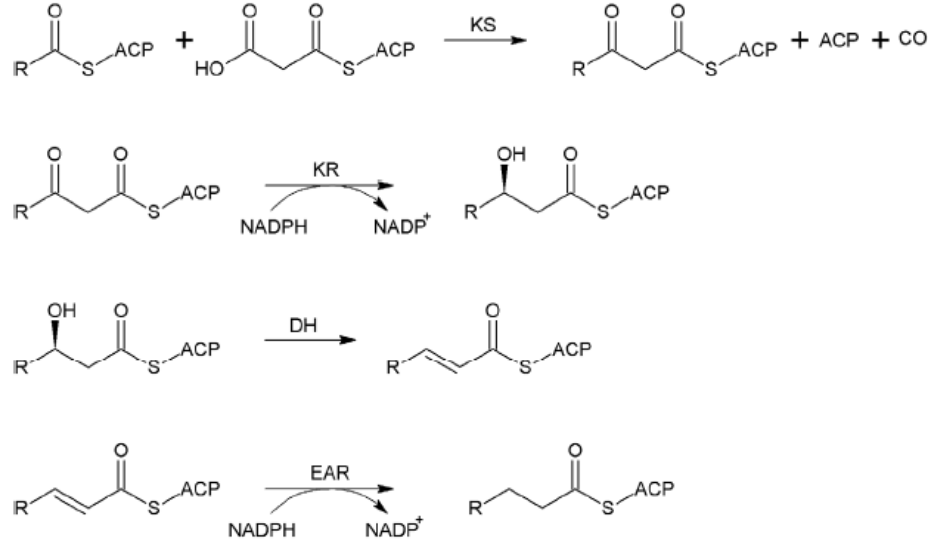
Lipit sentezi sırasında asetil-KoA, malonil-KoA ve gliserol gibi moleküllere ihtiyaç duyulurken, sentez için gerekli olan enerji ATP’den sağlanır (Botham ve Ratledge, 1979). Lipitler iki farklı yolla sentezlenirler (Şekil 1.1). Birincisi, yağ

asitlerinin öncülleri olan asetil-KoA ve malonil-KoA'ların depo lipitlerinin sentezine katıldıkları *de novo* sentezi, ikincisi ise yağ asitlerinin, triaçilgliserol ve farklı yağ tiplerine hücre içerisinde dönüştürüldüğü *ex novo* sentez yoludur. *Ex novo* sentez yolu hidrofobik substratların hidrolizine ihtiyaç duyar ayrıca triaçilgliserol ve nötral lipitlerin yeniden sentezi için hücre içinde lipit tanecikleri olarak saklanmasını ve yağ asitlerinin transportunu içerir (Beopoulos vd., 2009b).



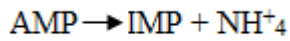
Şekil 1.1. Yağ asidi biyosentez metabolizmasının genel gösterimi (Altınışık, 2013).

Yağ asitlerinin (FA) *de novo* sentezi, lipit üretiminin ilk aşaması, yağ asidi sentetaz enzim kompleksince (FAS) sitozolde gerçekleştirilir (Şekil 1.2). Mayalarda FAS, fosfopantitein transferaz aktivitesini yüklenerek, koenzim pantotein taşıyan açil taşıyıcı proteinleri (ACP) aktive eder. FAS, *fas2* ve *fas1* tarafından kodlanan 6β ve 6α iki alt üniteden oluşur. Her alt ünite, dört fonksiyonel grup içerir. Yani FAS'lar 2,6 MDa ağırlığında 48 fonksiyonel merkez içeren, yağ asitlerinin sentezi aşamasında çoklu tüm reaksiyonları katalizleyen kompleks bir enzimdir. FAS ilk olarak asetil-KoA'yı β -ketoaçil-ACP sentetaz'a (KS) sonra β -ketoaçil-ACP redüktaz'a (KR), β -hidroksiaçil-ACP dehidrotaz'a (DH) ve enoil-ACP redüktaz'a (EAR) taşır. Bu reaksiyon palmitil-ACP oluşana kadar yedi kere tekrarlanır (Tehlivets vd., 2007).

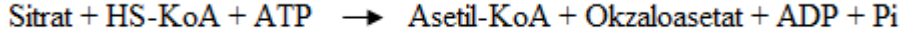


Şekil 1.2. Yağ asidi sentetaz enzim kompleksi ve yağ asitlerinin uzatılması reaksiyonun genel gösterimi KS: β-ketoaçil-ACP sentetaz, KR: β-ketoaçil-ACP redüktaz, DH: β-hidroksiaçil-ACP dehidrotaz, EAR: enoil-ACP redüktaz (Tehlivets vd., 2007).

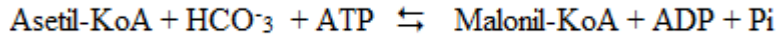
Oleaginous olmayan mayalarda asetil-KoA glikolizden sağlanırken, oleaginous mayalarda ise azot sınırlaması sonucu sitozolde biriken sitratın parçalanmasından sağlanmaktadır (Şekil 1.1). Oleaginous mikrororganizmalarda azot sınırlaması AMP deaminazı aktive eder. Böylece azot yokluğu yaşayan hücrelerde intraselüler AMP parçalanır ve IMP (İnosin monofosfat) ve NH₄⁺ oluşur. Mitokondriyal AMP konsantrasyonundaki azalma, izositrat dehidrogenaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Bundan sonra trikarboksilikasit döngüsü (TCA) izositrat aşamasında durur. Akinotaz aracılığıyla sitrata dönüştürülür. Biriken fazla sitrat, sitrat/malat döngüsüyle mitokondriden çıkarılır (Ratledge, 2002).



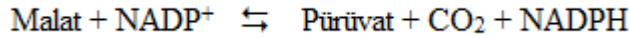
Sitozolik ATP-sitrat liyaz (ACL) sitratı önce okzaloasetata sonrada asetil-KoA'ya parçalar. Bu reaksiyon oldukça fazla oranda asetil-KoA'nın yağ asidi sentezi için oluşmasını sağlar. ATP-sitrat liyaz (ACL, EC 4. 1. 3. 8), *ACL1* ve *ACL2* gen bölgeleri tarafından kodlanmaktadır. Bu enzim oleaginous olmayan mikroorganizmalarda bulunmaz. ATP-sitrat liyaz aktivasyonu için amonyum iyonuna ihtiyaç duyan ve adenosin mono ve difosfata bağımlı bir enzimdir (Ratledge ve Wynn, 2002).



Asetil-KoA'ya ilaveten yağ asidi sentezinde Malonil-KoA ve NADPH'a sürekli gereksinim duyulmaktadır (Beopoulos vd., 2009a). Malonil-KoA, asetil-KoA karboksilaz (ACC, EC 6. 4. 1. 2) tarafından asetil-KoA'ya bikarbonat ilavesiyle elde edilmektedir. ACC, *de novo* yağ asidi sentezinde önemli yere sahip anahtar bir enzimdir (Tehlivets vd., 2007). Malonil-KoA ve NADPH seviyesi, oleaginous mikroorganizmaların lipit üretim mekanizmalarında olmazsa olmaz niteliklere sahiptir.



Yağ asidi sentez yolunda Asetil-KoA karboksilaz, asetil-KoA'dan malonil-KoA sentezlenmesinde ilk basamağı katalizler ve bu basamak yağ asidi sentezinde NADPH'ı indirgeyici etkiye sahiptir (Cronan vd., 2002). Büyük oranda NADPH sağlayıcısı olarak malik enzimin iş gördüğü düşünülmektedir ve malik enzim (ME, EC 1. 1. 1. 38) NADP⁺ ya bağımlı bir enzimdir (Tang vd., 2010).



Malik enzim, geri dönüşümsüz olarak malatı pürüvata çevirir ve bunu NADP⁺ dan NADPH elde ederek sağlar. Bu reaksiyonun oleaginous funguslardaki lipit sentezini sınırlayıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Malik enzim aktivitesinin oleaginous mikroorganizmaların birçoğunda bulunması, lipit biyosentezine pozitif katkı sağladığının bir göstergesidir. Örneğin *Mucor cicinelloides*'te malik enzim aktivitesinin artırılması lipit biyosentezinin 2.5 kat artmasını sağlamıştır (Zhang vd., 2007).

Sitozolik NADPH, yağ asidi sentetaz'lardan (FAS), β -ketoasil-ACP sentetaz (KS) ve enoil-ACP redüktaz'ın (EAR) fonksiyonları için de gereklidir. Açıl zincirinin her uzama aşamasında iki molekül NADPH gereklidir (Zhang, 2011). Yağ asidi sentetazların son ürünü miristik (C 14:0) ve palmitik (C 16:0) asittir. Reaksiyonun sonlanması, uzama ve doymamış yağların oluşum süreci endoplazmik retikulumda meydana gelir. Uzatma reaksiyonları elongaz (malonil-palmitoil transaçilaz (MPT)) tarafından katalizlenir. Bu organizasyon asetil-KoA karboksilaz (ACC) tarafından sağlanan malonil-KoA'ya gereksinim duyar. Endoplazmik retikulumda, yağlara doymamışlık özelliğinin verilmesinde hidrofobik membran-bağ proteinleri de görev alır. İlk çift bağlar palmitik veya stearik asite eklenir. İkinci çift bağlarda oleik (C 18:1) asit'ten linoleik asit meydana getirilir (Ratledge, 2004).

1.4.1 Triaçilgliserollerin biyosentezi

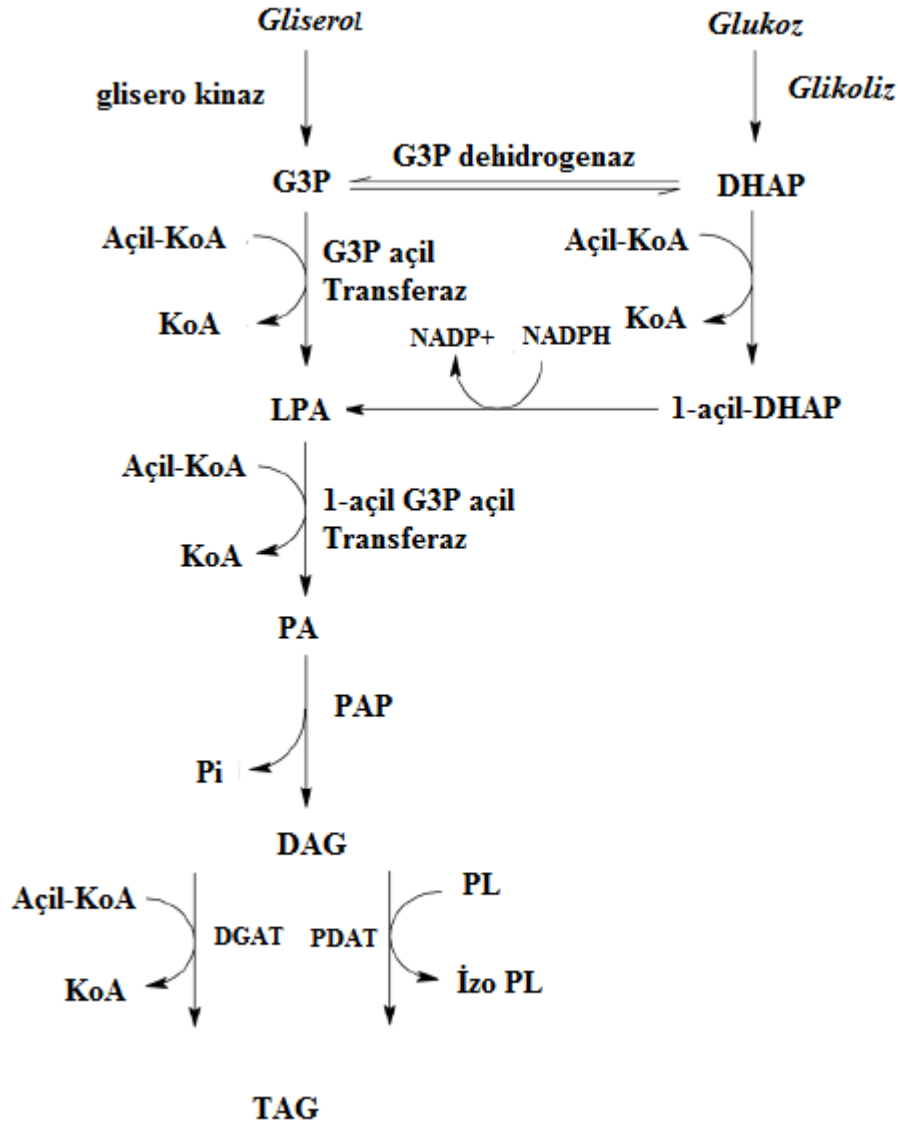
De novo senteziyle üretilen yağ asitleri, triaçilgliserol ve nötral lipitler üretmek üzere gliserol ve sterolle esterifiye olur. Oleaginous funguslarda nötral lipitler, triaçilgliseroller (TAG) hücre içerisinde yağ cisimcikleri şeklinde depo edilirler. TAG'lar çoğunlukla gliserol-3-fosfat'ın (G3P) açılması ile oluşur ve farklı açıltransferazlarca gerçekleştirilir. G3P, gliserol kinaz tarafından gliserolden veya G3P dehidrogenaz tarafından dihidrooksiaseton fosfattan (DHAP) meydana getirilir (Şekil 1.3).

S. cerevisiae açıl grup alıcısı olarak DHAP ve G3P'yi kullanır. Birinci açıl gurubun eklenmesiyle 1-açıl G3P elde edilir ve lizofosfatidik asit olarak (LPA) adlandırılır. Ayrıca LPA, açıl-DHAP'nın redüksiyonuyla da elde edilir. İkinci bir açıltransferaz, bir başka açıl gurubunu yükler ve 1,2- diaçıl G3P'i meydana getirir (fosfatik asit, PA). Fosfat, fosfatidat fosfataz izoenzimlerince PA'dan ayrılır ve diaçilgliserole dönüştürülür (DAG). DAG, TAG'ın öncülüdür ve direk fosfolipit biyosentezine kanalize edilebilir (Papanikolaou ve Aggelis, 2011).

TAG'ın *de novo* sentezinin son basamağında açıl-KoA açıl donörü olarak kullanılır. Endoplazmik retikulumun integral proteini olan DAG açıl transferaz (DGAT) üçüncü açıl-KoA'yı direk ekleyebilir. *S. cerevisiae* ve *Y. lipolytica*'da durağan fazda oldukça aktif olan DGAT eksponensiyel fazda da sentezlenir. *Y. lipolytica*'da eksponensiyel fazda daha aktif olan ikinci bir DGAT enzimi de tanımlanmıştır (Czabany vd., 2007). TAG, TAG lipazlar tarafından hidrolize edilerek serbest yağ asitlerine (FFA) ve DAG'lara dönüştürülebilir. β -oksidasyon yoluyla FFA'lar elde edilebilir (Fickers vd., 2005).

1.4.2. Yağ asitlerinin β -oksidasyonu

β -oksidasyon yolu dört enzim tarafından katalizlenmektedir. β -oksidasyon yolu serbest yağ asitlerinin, asetil-KoA'ya parçalandığı aşamalardan oluşur. *Yarrowia lipolytica* da yağ asitlerinin yıkımı, peroksizom içerisinde β -oksidasyon yıkım yolu aracılığıyla dört aşamada gerçekleştirilir. Altı farklı açıl-KoA oksidaz β -oksidasyon yolağının ilk aşamalarını katalizler. β -oksidasyon yolunun ikinci ve üçüncü aşamalarında, hidrataz ve dehidrogenaz aktiviteleri gerçekleşir. Dördüncü aşamada ise 3-ketoaçıl-KoA-tiyolaz enzim aktivitesi gerçekleşir. β -oksidasyon yolunun dördüncü aşaması sınırlandırıldığı takdirde, lipit üretiminin arttırılacağı düşünülmektedir (Wang, 1999).



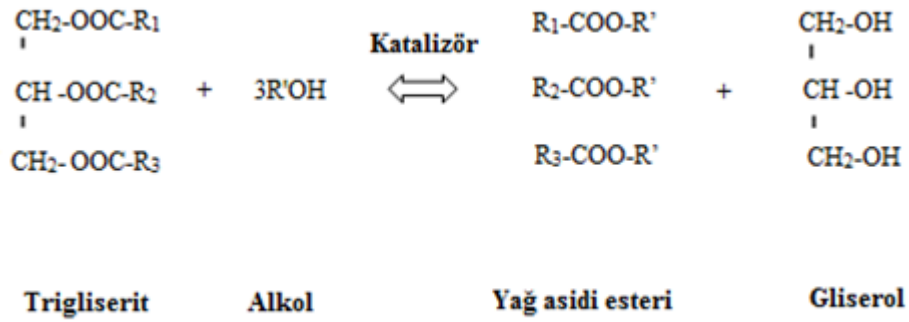
Şekil 1.3. Triaçilgliserollerin *de novo* biyosentezinin genel gösterimi. DHAP: Dihidrooksiaseton fosfat, G3P: Gliserol-3-fosfat, LPA: Lizofosfatidik asit, PA: Fosfatik asit, DAG: Diaçilgliserol, TAG: Triaçilgliserol, PAP: Fosfatidat Fosfataz, DGAT: Diaçilgliserol açil tansferaz, PDAT: Fosfolipit- Diaçilgliserol açil tansferaz (Czabanay vd., 2007).

1.5. Yağ Asitlerinin Transesterifikasyonu

Çeşitli kaynaklarca üretilen triaçilgliserollerin dizel yakıt olarak kullanılabilmesi için transesterifiye edilmeleri gerekmektedir. Transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda triaçilgliserollerin viskoziteleri düşer ve kullandıkları makine performansını artırmaya yönelik fiziksel özellikleri değiştirilmiş olur. Şekil 1.4'de gösterildiği gibi transesterifikasyon, biyodizel üretiminde trigliseritlerle alkol arasında bir katalizör varlığında yağ asidi esterlerinin yanı sıra yan ürün olarak

gliserolün açığa çıktığı bir reaksiyondur (Fjerbaek vd., 2009). Reaksiyon diaçilgliserol, monoaçilgliserol ve gliserolün ardışık olarak ortaya çıktığı üç basamaktan oluşur (Fukuda vd., 2001).

Reaksiyonda kullanılan katalizör, reaksiyonun hızını ve verimini artırmaktadır. Transesterifikasyon reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyon olması nedeniyle, ortamda bulunan aşırı alkol tepkimeyi ileri yön lehine çevirebilir. Bu amaçla kullanılan alkoller genellikle 1 ve 8 arasında karbon atomuna sahip primer ve sekonder monohidrik alifatik alkollerdir. En çok kullanılan alkoller metil alkol ve etil alkoldür. Ticari uygulamalarda sıklıkla tercih edilen alkol ise ucuz olmasından dolayı metil alkoldür (Baarje ve Chakraborty, 2009). Transesterifikasyonda kullanılan katalizör türü hammadde olarak kullanılan yağın çeşidine göre değişmektedir. Transesterifikasyonda kullanılan katalizörler baz, asit ve enzim olarak sınıflandırılmaktadır.



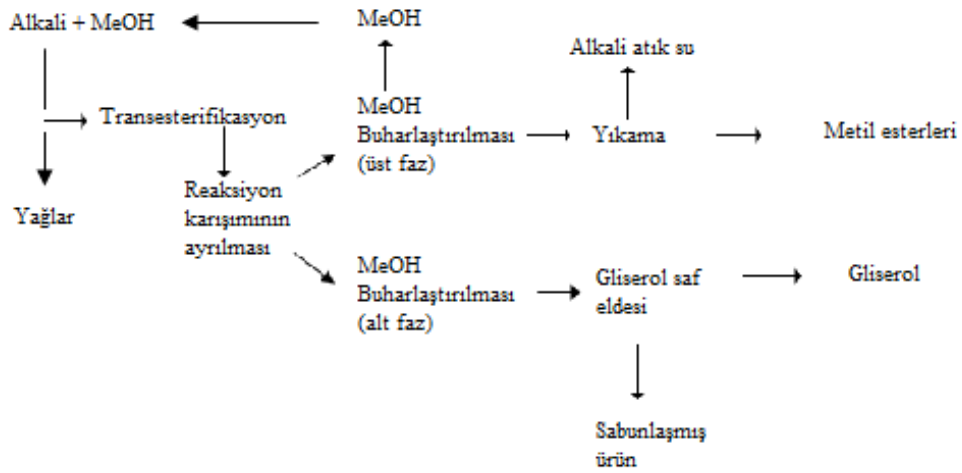
Şekil 1.4. Transesterifikasyon reaksiyonu genel gösterimi (Fukuda vd., 2001).

1.5.1. Baz ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonu

Geleneksel biyodizel üretiminde transesterifikasyon reaksiyonu için genelde tercih edilen katalizör bazdır. Başlıca kullanılan bazlar ise sodyum hidroksit, potasyum hidroksit, sodyum metoksit ve potasyum metoksittir (Vincente vd., 2007). Şekil 1.5’de bazla katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonunun şematik gösterimi görülmektedir (Fukuda vd., 2001). Bazla katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonu aynı oranda asitle katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonuna göre 400 kat daha hızlıdır. Bu sebepten dolayı bazlar, ticari olarak daha çok tercih edilmektedir (Formo, 1954).

Bazlarla kısa sürede (20-60 dakika) ve yüksek oranda (> 0.8 g/g yağ asidi esteri) % 100’e yakın verim elde edilebilir. Ancak kullanılan biyodizel

hammaddesinde, serbest yağ asitleri ve su olmamalıdır. Çünkü serbest yağ asitleri varlığında, transesterifikasyon reaksiyonunda sodyum hidroksit gibi baz katalizörleri sabunlaşmaya neden olur. Yağın içindeki su ise esterlerin hidrolizine ve biyodizel veriminin düşmesine neden olmaktadır. Bu tür reaksiyonlarda serbest yağ asidi oranı % 0.05'ten, su oranı ise % 0.06'dan düşük olmak zorundadır (Yan vd., 2009). Diğer kataliz yöntemlerinden farklı olarak baz ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonlarında ürün, transesterifikasyon karışımından daha kolay ayrılabilir. Reaksiyon sonrasında hammadde kalıntılarının daha az olmasına rağmen, kalıntılar çevreye zarar verebilmektedir (Di Serio vd., 2008).



Şekil 1.5. Baz ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonunun şematik gösterimi (Fukuda vd., 2001).

1.5.2. Asit ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonu

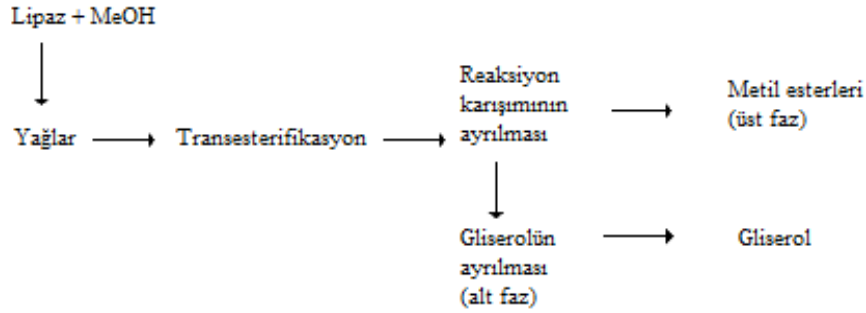
Asitle katalizlenen transesterifikasyon yönteminde genellikle sülfürik ve hidroklorik asit kullanılır. Asitle katalizlenen transesterifikasyon baz ile katalizlenen transesterifikasyona göre daha yavaştır. Yüksek reaksiyon sıcaklıklarına ve basınca ihtiyaç duyar ayrıca verim düşüktür (Ma ve Hanna, 1999).

Bu tür reaksiyonlar serbest yağ asitlerinin, yağ asidi metil esterlerine dönüştürülmesinde yüksek aktiviteye sahiptir. Fakat trigliseritlerin transesterifikasyonunda verim düşüktür. Çevreye verdiği aşındırıcı etkileri baz ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonlarıyla benzerdir (Vasudevan ve Fu, 2010). Sülfürik asitle katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonları yüksek sıcaklık ve uzun

reaksiyon zamanı gerektirmektedir. Ayrıca reaksiyonda kullanılan molar alkol ve yağ oranı bazla katalizlenen reaksiyona göre daha yüksektir (Soldi vd., 2009).

1.5.3. Enzim ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonu

Son dönemlerde biyodizel üretimi amacıyla transesterifikasyon reaksiyonlarında lipaz enzimi kullanılmaktadır. Baz ve asitle katalizlenen reaksiyonlara göre birçok avantajı bulunmaktadır (Şekil 1.6). Transesterifikasyon reaksiyonları oldukça düşük sıcaklıklarda (40-70°C) gerçekleşir. Reaksiyon boyunca sabunlaşma meydana gelmez ayrıca biyodizel ve gliserolün ayrıştırılması kolay olur. Lipaz biyolojik olarak parçalanabilir olduğundan, kalıntıların çevreye verebileceği olası zararları azaltır. Tekrar tekrar kullanılabilir ve katalitik aktivitesi yüksektir. Reaksiyonu sürdürmek için çok az miktarda metanole gereksinim duyulur (Vasudevan ve Fu, 2010).



Şekil 1.6. Enzim ile katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonunun şematik gösterimi (Fukuda vd., 2001).

1.6. Yağ Asitlerinin Moleküler Yapısı

Yağ asitleri, uzun zincirli hidrokarbon zincirlerinden ve terminal karboksil gruplarından oluşur. Pozisyonlarına, biçimlerine, karbon zincirlerinin doymuşluk ve doymamışlığına göre farklı tiplerde 1000'den fazla yağ asidi bulunmaktadır. Buna rağmen sadece 20 yağ asidi doğada yaygın olarak bulunur. Birçok yağ asidi dallanmamış çift karbon atomlarından (10-24) meydana gelir. Doymamışlık çift bağların (0-6 arasında) bulunmasına göre derecelendirilir. Dallanmamış yağ asitleri x:y olarak sembolize edilir. x, karbon atom numarasını y, çift bağ sayısını temsil etmektedir. Karbon atomları, karboksil uçlarından başlanarak sayılır. Çizelge 1.2'de

gösterildiği gibi çift bağların pozisyonu Δ ile ve bir sayıyla temsil edilir. Örneğin Δ 9 18:1 ifadesi: 18 karbon atomundan meydana gelen yağ asidinin, karboksil ucundan başlamak üzere 9. pozisyonda bir çift bağ olduğunu göstermektedir. Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) birden çok çift bağ içeren 18 ve daha fazla karbon atomundan oluşurlar. Bu tip yağ asitleri metil ucundan başlanarak sayılırlar ve birinci çift bağlarının pozisyonuyla tanımlanırlar. Örneğin ω -3 PUFA olarak yazılıyorsa metil ucundan başlayarak 3. pozisyonda bir çift bağ olduğu anlamına gelmektedir. PUFA'ların tanımlanması için ω ve n simgelerinin ikisi de kullanılabilir. Örneğin α -linolenik asit (18:3, n-3) 18 karbon atomlu 9, 12, 15 pozisyonlarda üç çift bağ bulunduğu ve n-3 son bağın (C 15 ve C 16 arasında) olduğu anlamına gelmektedir (Kraisintu, 2009).

Çizelge 1.2. Bazı yağ asitlerinin genel, sistematik ve kısa isimleri (Kraisintu, 2009).

Genel İsim	Sistematik İsim	Kısa İsim
Doymuş Yağ Asitleri		
Laurik asit	Dodekanoik asit	12:0
Miristik asit	Tetradekanoik asit	14:0
Palmitik asit	Hekzadekanoik asit	16:0
Stearik asit	Oktadekanoik asit	18:0
Tekli Doymamış Yağ Asitleri		
Palmitoleik asit	Δ 9-Hekzadekanoik asit	Δ 9 16:1
Oleik asit	Δ 9-Oktadekanoik asit	Δ 9 18:1
ω-6 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri		
Linolenik asit (LA)	Δ 9, Δ 12-Oktadekanoik asit	ω -6 18:2
γ -Linoleik asit (GLA)	Δ 6, Δ 9, Δ 12-Oktadekanoik asit	ω -6 18:3
Araşidonik asit (ARA)	Δ 5, Δ 8, Δ 11, Δ 14-Eikosatetraenoik asit	ω -6 20:4
ω-3 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri		
α -Linolenik asit (LNA)	Δ 9, Δ 12, Δ 15-Oktadekatrienoik asit	ω -3 18:3
Eikosapentaenoik asit (EPA)	Δ 5, Δ 8, Δ 11, Δ 14, Δ 17-Eikosapentatenoik asit	ω -3 20:5
Dekosahekzaenoik asit (DHA)	Δ 4, Δ 7, Δ 10, Δ 13, Δ 16, Δ 19-Dekosahekzaenoik asit	ω -3 22:6

1.7. Biyodizelin Yakıt Kalitesi ve Biyodizel Kalite Standartları

Biyodizelin diğer petrol kökenli dizellere alternatif olabilmesi için bazı özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu özellikler arasında biyodizelin

yoğunluğu, ateşlenme noktası, akışkanlığı, donma noktası, yanma değeri gibi önemli kriterler bulunmaktadır. Biyodizeldeki önemli yakıt kriteri triaçilgliserollerin kalıntısı ve biyodizel kısmındaki gliseritler olarak iş gören gliserole bağlıdır. (Xiaoling ve Qingyu, 2006).

Biyodizel özelliği yağ asidi metil esterlerinin bileşenlerine bağlı olarak değişmektedir (Knothe, 2005). En önemli özelliklerin başında ateşleme kalitesi (örneğin setan sayısı), soğuk akış özellikleri ve oksidatif kararlılık gelmektedir. Doymuş yağlardan üretilen biyodizel yüksek setan sayısına ve çok güçlü oksidatif kararlılığa sahipken daha düşük yanma özellikleri gösterir. Doymuş yağlardan üretilen biyodizel çevresel sıcaklıklarda jelleşme eğilimi göstermektedir. Uzun zincirli doymamış yağ asidi bakımından zengin hammaddeden üretilen biyodizel ise soğuk akışkan özelliğe sahiptir. Fakat bu yağ asitlerinin de okside olma eğilimi diğerlerine göre çok yüksektir. Bu yüzden biyodizelin uzun süreli depolanması sürecinde problemler yaşanabilmektedir (Hu vd., 2008).

Biyodizel yakıtlar yağ asidi metil esteri şeklinde bulunurlar ve birçok ülkede üretimi yapılmaktadır. ABD'deki uygun biyodizel standardı ASTM Biodiesel Standard D 6751'iken Avrupa Birliği Ülkelerinde bu standartlar ikiye ayrılmaktadır: Araç kullanımına yönelik standart Standard EN 14214 ve ısınmaya yönelik standart Standard EN 14213'tür. ASTM D 6751 biyodizelin asit sayı limiti Avrupa biyodizel oranına uyumlu olup 0,5 değerindedir. Isınma için kullanılmak üzere tasarlanmış biyodizel için böyle bir sınırlama yoktur fakat biyodizelin kabul edilebilirliği iyot değerinin yağın doymamışlık oranına bağlıdır ve EN 14214 ve EN 14213 standartlarına göre biyodizelin iyot değeri 120 ve 130 g iyot/100 g değerlerini aşmamalıdır (Knothe, 2006).

1.8. Çalışmada Kullanılan Oleaginous Mayaların Sınıflandırılması

Çalışmada kullanılan *Rhodotorula glutinis* ve *Candida lipolytica*'nın sistematik sınıflandırılması Çizelge 1.3'de görülmektedir.

Çizelge 1.3. Çalışmada kullanılan oleaginous mikroorganizmaların sistematik sınıflandırılması (Ncbi, 2013).

	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Candida lipolytica</i>
Alem	Fungi	Fungi
Şube	Basidiomycota	Ascomycota
Sınıf	Urediniomycetes	Ascomycetes
Ordo	Sporidiales	Saccharomycetales
Familya	Spridioboiaceae	Saccharomycetaceae
Cins	<i>Rhodotorula</i>	<i>Candida</i>

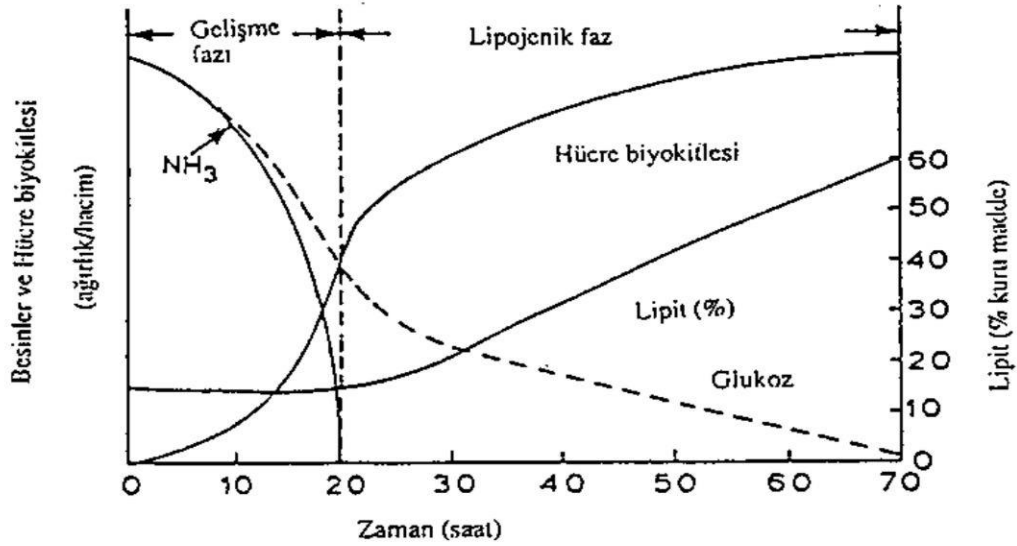
1.9. Oleaginous Mikroorganizmalarda Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi

Mikroorganizmaların lipit üretme yeteneklerini sınırlayan bazı etkenler bulunmaktadır. Organizmalarda lipit üretiminin başlaması besiyerindeki primer besin elementlerinin tükenmesine bağlıdır. Bu durum özellikle besiyerindeki azotun tükenmesine bağlıdır. Organizmaların lipit üretimini teşvik etmek için, azot miktarının azaltılmasının yanında, kullanılabilir karbon miktarının artırılması gerekmektedir. Protein ve nükleik asit sentezi için esansiyel olan azotun ortamda tükenmesi, hücre gelişimini sınırlayacak, buna karşılık ortamda bulunan karbon hücreler tarafından asimile edilmeye devam edecektir. Hücreler, alınan bu karbonu önce yağ asitlerine, daha sonra da trigliseritlere sentezleyebilmektedir (Ratledge, 2002).

Azotun dışında bazı inorganik tuzlar (fosfat, magnezyum, demir veya sülfat) vitaminler ve inozitolün de lipit üretimini sınırlayıcı etki yaptığı belirtilmiştir. Karbon kaynağı olarak genellikle glukoz kullanılmasına rağmen, pentoz ve laktozun da bu amaç için kullanıldığı bilinmektedir (Woodbine,1995).

Şekil 1.7’de de görüldüğü gibi mikrobiyal lipit üretimi iki aşamalı bir işlemdir. Birinci aşamada hücrelerin gelişimi için bütün besin elementleri bulunduğu için, dengeli bir gelişme olmaktadır. Ortamda besin elementleri tükendiği zaman bu aşama sona erer ve lipit üretim aşaması veya lipojenik faz başlar. Bu aşama, ya ortamda bulunan karbon kaynağı tükeninceye ya da lipit üretimi için gerekli diğer besin

elementleri hücreler tarafından tamamen tüketilinceye kadar devam eder. Eğer bu besin elementleri ortama tekrar ilave edilirse, lipojenik faz tekrar başlar ve hücrelerden oldukça yüksek miktarda lipit verimi elde edilebilir. Bazı durumlarda maya ve küf biyokütlelerinden bu yolla % 70'in üzerinde lipit elde edilebileceği belirtilmiştir. Buna karşılık bütün lipit üreten mikroorganizmalar aerobik olduklarından kültürler için gerekli olan oksijen bir süre sonra gelişmeyi sınırlayıcı faktör haline gelebilmektedir. Hücre gelişimi 60 g/L düzeyinin üzerine çıktığında, oldukça yavaşlar, 100 g/L'nin üzerinde ise hemen hemen imkansız hale gelir. Buna karşılık, lipit biyosentezi büyük oranda oksijene bağımlı değildir ve lipit üretebilen mayalar, kontrollü koşullarda 150 g/L biyokütleyle ulaşabilirler. Bu nedenle oksijen de bir besin elementi olarak düşünülmeli ve hücre ölümlerini önlemek için fermentöre yeterli düzeyde oksijen verilmelidir (Denli ve Tekin, 2000).



Şekil 1.7. Kesikli kültürde gelişen oleaginous mayalarda lipit birikimi (Denli ve Tekin, 2000).

Mikroorganizmalar, ürettikleri lipit rezervlerini bir süre sonra metabolizma faaliyetleri için kullanmaya başlarlar. Eğer ortamda karbon dışında, diğer besin elementleri açısından açlık yaratılırsa lipit kullanımı ve parçalanması oldukça yavaş gerçekleşecektir. Ancak ortamda karbon tükenip azot ve fosfat gibi besin elementleri zenginleştirilirse bu durumda parçalanma oldukça hız kazanmaktadır. Bu da lipitlerin hücreler tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmasından kaynaklıdır (Holdsworth ve Ratledge, 1988).

Diğer taraftan, mikroorganizmaların üreme koşulları (sıcaklık, pH, oksijen miktarı) üretilen lipitin çeşidini ve bileşimini etkilemektedir. Substrat olarak kullanılan karbonhidratların bileşimi de, üretilen lipidlerin bileşimini ve yağ asidi dağılımlarını etkilemektedir (Ratledge, 1982).

Mikroorganizmalar, gelişme ortamında oluşabilecek herhangi bir değişime oldukça hızlı reaksiyon verebilmektedirler. Bu durum mikroorganizmaların sadece gelişme ve üretimlerini değil aynı zamanda üretilecek lipidlerin bileşimlerini de etkilemektedir. Bu nedenle üretme koşulları (sıcaklık, pH, oksijen miktarı) belirlenirken ve değiştirilirken oldukça dikkatli davranılmalıdır. Ayrıca fermentasyon sıcaklığının yağ asidi kompozisyonunu en fazla etkileyen parametre olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2000).

Bu çalışmada amacımız, *R. glutinis* ve *C. lipolytica* türlerinin kesikli süreçte lipid veriminin artırılması ve kültür koşulların optimizasyonunun yapılmasıdır. Çalışmada biyodizel hammaddesi olacak lipidlerin üretildiği besiyeri maliyetini düşürmek amacıyla doğal ve ucuz hammaddelerin veya atıkların kullanımı da test edilecektir. Ayrıca iki basamaklı fermentasyon yöntemi kullanılarak lipid veriminin artırılması sağlanacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Biyodizel İçin Mikroorganizmaların Hammade Olarak Kullanıldığı Çalışmalar

Biyodizel yakıtlar, yağ asidi metil ya da etil esteri olarak tanımlanmaktadır. Biyodizel, çeşitli yağ kaynaklarından elde edilen ve toksik olmayan alternatif bir yakıt türüdür (Zhu vd., 2008). Mikrobiyal yağlar, biyodizel üretiminde yağ asitleri kompozisyonunun benzerliği nedeniyle bitkisel yağların yerine kullanılabilir (Peng ve Cheng, 2008). Biyokütlelerinin % 20'sinden fazla lipit biriktirebilen ve oleagineous mikroorganizmalar içinde yer alan mayalar, büyük ilgi uyandırmıştır. Sentezlenen lipitlerin büyük bir oranı bitkisel yağlarda olduğu gibi uzun zincirli yağ asitlerini içermektedir. Bu nedenle son zamanlarda mikrobiyal lipitlerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılması ile ilgili çalışmalarda maya hücreleri büyük dikkat çekmektedir (Hong-Yong vd., 2006).

Li vd. (2007) yaptıkları kesikli-beslemeli çalışmada; *Rhodospiridium toruloides* Y4 mayasının lipit üretimini ve biyokütle artışını karbon kaynağı olarak 10-400 g/L arasında değişen glukoz kullanarak araştırmışlardır. Kesikli üretimde başlangıç besiyeri pH'sı 5.5'a ayarlanarak, 12 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 1.5 g/L MgSO₄.7H₂O ve 0.5 g/L maya özütü içeren besiyerinde maya hücrelerinin, ortamda 150 g/L glukoz olduğunda en yüksek lipit verimi ve biyokütle değerlerine ulaştıkları gözlenmiştir. Fakat artan glukoz konsantrasyonunun, yağ üretimini ve biyokütle artışını inhibe ettiği bildirilmiştir. 25 gün süreyle inkübe edilen kesikli-beslemeli kültürlerde ise kuru biyokütle ve hücrelipit içeriği sırayla 151.5 g/L ve % 48 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar kesikli-beslemeli üretimde 134. saatin sonunda *Rhodotorula toruloides* Y4'ün 16 ve 18 karbon atomlu uzun zincirli yağ asitlerini sentezlediğini bildirmişlerdir. Sentezlenen yağ asitlerinin ise, miristik (C 14:0), palmitik (C 16:0), palmitoleik (C 16:1) ve linolenik (C 18:2) asit olduğu belirlenmiştir (Li vd., 2007).

Şeker fabrikası yan ürünü olan melas, % 47-48 oranında şeker (ağırlıklı olarak sukroz), % 9-14 oranında inorganik maddeler (kül), % 8-12 nitrojen (genelde betain ve glutamik asit) içermektedir (Aksu ve Eren, 2005). Karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı bir çalışmada 4 günlük inkübasyon sonucunda % 8'lik melas, 1 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren kültür ortamında en yüksek lipit verimi ve yağ asidi metil esteri

oranı sırasıyla *Candida lipolytica* için % 59.9 ve % 84.9 *Candida tropicalis* için % 46.8 ve % 93.2 *Rhodotorula mucilaginosa* için ise % 69.5 ve % 92.3 olarak tespit edilmiştir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi analizleri sonucunda maya hücrelerinin en fazla palmitik (C 16:0) ve stearik (C 18:0) asit sentezledikleri belirlenmiştir (Karatay ve Dönmez, 2010).

Xue vd. (2010) yüksek kimyasal oksijen istemi olan nişasta atık suyunda *Rhodotorula glutinis* mayasını 30-37°C'de fermente ederek en ideal hücre artışı ve en yüksek lipit verimini araştırmışlardır. Araştırmacılar 5 litrelik fermentasyon kaplarında 60 saatlik inkübasyon sonunda 60 g/L'den fazla biyokütle ve % 30 oranında (w/w) lipit elde etmişlerdir. Sıcaklığa duyarlı olan *Rhodotorula glutinis*'in optimum üreme sıcaklığı 30°C olarak tespit edilmiştir. 300 litrelik pilot fabrika ölçekli fermentasyon kaplarında ise herhangi bir sterilizasyon ve pH ayarlaması yapmadan, 30-40 saatlik inkübasyon sonucunda % 80 oranında kimyasal oksijen ihtiyacında azalma gözlenirken, 40 g/L'lik biyokütle ve % 35 (w/w) oranında lipit elde edilmiştir. Transesterifikasyon sonucuna göre ise % 90 oranında oleik asit (C 18:1) ve % 10 oranında palmitik asit (C 16:0) metil esterleri elde edilmiş ve elde edilen bu lipitin biyodizel üretimi için uygun olduğu bildirilmiştir (Xue vd., 2010).

Oleaginous mikroorganizmaların besiyeri içeriğinde herhangi bir element sınırlandırıldığında ve karbon seviyesinin yüksek olduğu durumlarda oleaginous mikroorganizmalar depo yağı olan triaçilgliserollerini üretmeye başlarlar. Besiyerine ilave edilen çeşitli elementlerin oranı yağ üretimini tetikleyebilir. Özellikle azot sınırlandırılması yağ üretiminin artırılması amacıyla oleaginous mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Azotun dışında bazı inorganik tuzların (fosfat, magnezyum, demir veya sülfat) ve vitaminlerin de yağ üretim metabolizmasını etkilediği belirtilmiştir (Woodbine,1995).

Azot sınırlı, karbon/fosfat ve karbon/azot oranlarının ayarlandığı bir çalışmada *Rhodospiridium toruloides* Y4 mayası kullanılarak 0-3.6 g/L fosfatın lipit birikimi üstündeki etkisi araştırılmıştır. 200 rpm'de ve 30°C'de yapılan çalışmada karbon/azot (C/N) oranının 6.1 ve karbon/fosfat (C/P) oranının 9552 olduğu besiyerinde, 96 saatlik inkübasyon sonucunda lipit içeriğinin % 62.2 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda besiyerinde fosfatın hiç olmadığı veya çok az olduğu durumlarda lipit biyosentezinin en yüksek olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda en belirgin yağ asidi oleik asit (C 18:1) olurken onu sırasıyla palmitik asit

(C 16:0), stearik asit (C 18:0) izlemiştir. Fosfatın sınırlandırıldığı durumda ise palmitik ve oleik asit oranlarında yükselme gözlenirken, stearik asit oranında azalma olmuştur (Wu vd., 2010).

Sülfat sınırlamasının *Rhodospiridium toruloides* Y4 mayasının intraselüler lipit birikiminde etkili olduğu başka bir çalışmada, 122.5 saatlik inkübasyon sonucunda en iyi lipit birikimi sülfatın hiç olmadığı veya 0.02 g/L olduğu durumlarda elde edilmiştir. 200 rpm ve 30°C'de karbon/sülfat (C/S) oranının 11.380 olduğu durumlarda % 57 oranında lipit içeriği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, besiyerinde sülfatın hiç olmadığı veya 0.02 g/L gibi çok az oranda bulunduğu durumlarda lipit içeriği sırasıyla % 58.3 ve % 57 olmuştur. 122.5 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen yağ asitlerinin dağılımına göre en fazla oleik asit (C 18:1) daha az oranda ise palmitik (C 16:0) ve stearik asit (C 18:0) tespit edilmiştir. Karbon/sülfat (C/S) oranı arttıkça doymuş yağ asidi oranı giderek artma eğilimine girmiştir (Zhao vd., 2011).

Yen ve Zhang'ın çözünmüş oksijenin *Rhodotorula glutinis*'in biyokütle ve lipit birikimi üstüne etkisini araştırdıkları çalışma 24°C'de, 60, 150 ve 210 rpm'de ve 30, 40 ve 50 ml hacimli kültür koşullarında yürütülmüştür. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda düşük miktarda oksijenin biyokütle üzerinde olumsuz etkileri görülürken (38.5 g/L), lipit birikimini arttırdığı (% 63.49) belirlenmiştir. Yüksek oksijen bulunan ortamdaki lipit içeriği (% 47.3) düşük miktarda oksijen bulunan ortamdaki lipit içeriğinden daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Ancak oksijen oranının lipit birikimi üstündeki tek belirleyici etken olmadığı da belirtilmiştir. Yüksek ve düşük miktarda oksijen bulunan kültürlerde yağ asidi oleik asit (C 18:1) % 50-60 oranında olurken palmitik asit (C 16:0) % 20-30 oranında tespit edilmiştir (Yen ve Zhang, 2011).

Dai vd. (2007) biyodizel üretiminde çeşitli karbon kaynaklarının *Rhodotorula glutinis*'in lipit birikimi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, glukozun yanı sıra mısır sapı, pirinç samanı kullanmışlardır. 100 g/L glukoz, 8 g/L maya özütü ve 3 g/L pepton içeren besiyeri pH'sı 5'e ayarlandıktan sonra maya ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür 28°C'de, 180 rpm'de 96 saat inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda % 49.25 oranında lipit içeriği, 14.66 g/L lipit verimi elde edilmiştir. Aynı kültür koşulları 5 litrelik fermentörde uyguladığında ise lipit içeriği % 60,69 olurken lipit verimi 23.41 g/L olarak gözlenmiştir. Aynı kültür koşulları farklı karbon kaynaklarıyla

tekrarlandığında, mısır sapında, lipit içeriği % 11.78, lipit verimi 2.01 g/L, ağaç yaprağında, lipit içeriği % 28.59, lipit verimi 4.73 g/L, pirinç samanında, lipit içeriği % 5.74, lipit verimi ise 0.21 g/L olarak tespit edilmiştir. Transesterifikasyon sonrasında elde edilen yağ asidi esterleri verimi % 81.7 olurken, yağ asidi metil esterleri içeriği ise miristik (C 14:0) % 1.29, palmitik (C 16:0) % 18.74, stearik (C 18:0) % 1.16, oleik (C 18:1) % 66.96, linoleik asit (C 18:2) metil esterleri % 4.57 olduğu rapor edilmiştir (Dai vd., 2007).

Lin vd. (2011) *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560'ın iki basamaklı fermentasyon yönteminde lipit birikimini araştırdıkları çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada, maya hücreleri besince zengin kültür ortamında geliştirilirken, ikinci aşamada, içerisinde steril ve steril olmayan glukoz bulunan 7 L'lik fermentasyon ünitelerinde 40 saat boyunca inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda biyokütle 104.6 g/L, lipit verimi 67.9 g/L, lipit içeriği ise % 64.9 olarak tespit edilmiştir. Steril olmayan glukozun kullanıldığı çalışmada lipit içeriği düşmüştür. Sonuç olarak araştırmacılar, lipit üretim ve maya hücrelerinin gelişim aşamalarının ayrılması gerektiği sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmada elde edilen yağ asitlerinin dağılımı, miristik (C 14:0), palmitik (C 16:0), palmitoleik (C 16:1), stearik (C 18:0), oleik (C 18:1), ve linoleik asit (C 18:2) olarak belirtilmiştir (Lin vd., 2011).

Saxena vd. (1998) *Rhodotorula minuta* IIP-33 oleaginous maya türünde çalkalama hızının 600 rpm, sıcaklığın 30-38°C'ler arasında değiştiği, başlangıç pH'sının 4.5 olduğu, 10-70 saatlik inkübasyon süresinde, farklı oranlarda karbon azot (C/N) ve de karbon kaynağı olarak farklı kaynakların kullanıldığı bir araştırma yürütmüşlerdir. Araştırma sonunda 30°C'de ve 55 saatlik inkübasyon sonucunda karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı ve karbon azot oranının 30 olduğu koşullarda *Rhodotorula minuta* IIP-33 maya türünün % 48'lik lipit içeriğiyle en yüksek lipit yüzdesine ulaştığı belirtilmiştir. Ayrıca yağ asidi içeriğinin ve yapısının sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik gösterdiği 30-32°C'lerde 16 ve 18 karbonlu uzun zincirli yağ asitlerinin oranlarında bir artış olurken, 38°C'de 7 ve 9 karbonlu kısa zincirli yağ asidi oranının arttığı belirtilmiştir. Sentezlenen yağ asidi profilinin farklı sıcaklıklarda değişmesinin nedeni olarak yağ asidi zinciri uzamasından sorumlu olan sıcaklığa duyarlı açıl taşıyıcı proteinler olduğu öne sürülmüştür (Saxena vd., 1998).

Xue vd. (2006) *Rhodotorula glutinis*'in farklı oranlarda monosodyum glutamat içeren besiyerlerindeki lipit üretme kapasitesini araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda 30°C'de, 140 rpm çalkalama hızında, başlangıç pH'sının 5.5 olduğu ve 5000 mg/L monosodyum glutamat bulunan kültür koşullarında % 11.56'lık lipit içeriğiyle en yüksek değere ulaşılmıştır. Yağ asidi kompozisyonunun diğer bitkisel yağlarda olduğu gibi 16 ve 18 karbonlu uzun zincirli yağ asitlerinden oluştuğu, yağ asidi metil esterlerinin % 92.54 gibi yüksek bir orana sahip olduğu tespit edilmiştir (Xue vd., 2006).

Wu vd. (2011) *Trichosporan capitatum* oleaginous mikroorganizmasının, farklı azot ve karbon kaynakları kullanılarak lipit üretme kapasitesinin araştırıldığı çalışma 28°C'de, 160 rpm çalkalama hızında ve 6 gün sürmüştür. Çalışmalarda % 32.6 ile en yüksek lipit içeriği peptonun azot kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde elde edilirken, % 33 oranıyla en yüksek lipit içeriği karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı besiyerinde elde edilmiştir. Karbon azot (C/N) oranının 147 olduğu besi yerinde lipit içeriği % 36.2 olarak tespit edilmiştir. Sıcaklığın lipit birikimine etkisinin araştırıldığı 20-35°C'ler arasındaki çalışmalarda ise en yüksek lipit içeriği % 43 ile 28°C'de gözlemlenmiştir. Başlangıç besiyeri pH'sı 5, 6 ve 7'ye ayaralandığında en yüksek lipit içeriği % 43.1 ile pH 6'da gözlemlenmiştir. Karbon kaynağı olarak melas kullanılan çalışma sonucunda en yüksek lipit içeriği % 30.2 ile % 10'luk melas kullanılan besi yerinde elde edilmiştir. Elde edilen yağ asitleri içerisinde, oleik asidin % 79.8 ile en yüksek değerde olduğu belirtilmiştir (Wu vd., 2011).

Liu ve Zhao (2007) *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* ve *Mortierella isabellina* türlerinden elde ettikleri lipitleri bazik ve asidik katalizörlerle transesterifiye etmişlerdir. Transesterifikasyon reaksiyonuna metanol oranının, kataliz konsantrasyonunun, reaksiyon sıcaklığı ve zamanın etkilerini test etmişlerdir. Ayrıca 0.2 mol/L H₂SO₄ ve 0.4 mol/L HCl kullanarak asidik ve bazik katalizörlerin reaksiyon üzerine etkilerini de araştırmışlardır. Elde edilen kuru biyokütle 70°C'de, 20 saat, 1:20 (w/v) oranında metanol kullanılarak, % 98'e varan oranda verim elde edilerek kataliz edilmiştir. Elde edilen biyodizelin setan numaraları 56 ve 59 olarak tespit edilmiştir. Bazik katalizörlerin asidik katalizörlere göre reaksiyonu daha düşük sıcaklıklarda ve daha kısa sürede katalizlediğini tespit etmişlerdir. Direk metanoliz sonucunda tüm türlerde gözlenen başlıca yağ asidi metil esterleri palmitik (C 16:0)

ve oleik asit (C 18:1) olarak tespit edilmiştir. *Lipomyces starkeyi*'nin yağ asidi metil esteri içeriği % 96.8 olurken, *Rhodospiridium toruloides*'in % 98.1 ve *Mortierella isabellina*'nın % 91 olarak tespit edilmiştir (Liu ve Zhao, 2007).

Zygomycetes sınıfına ait *Mortierella isabellina*, *Thamnidium elegans* ve *Mucor sp.* fungus türlerinde peynir altı suyunun besiyeri olarak kullanıldığı çalışmada, fungus türlerinin biyokütle gelişimleri ve lipit üretme kapasiteleri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan peynir altı suyu içeriğinin % 92-95 su, % 4-5 laktoz, % 0.8 protein, % 0.1-0.8 laktik asit, % 1 tuz, mineral, vitamin ve iz elementlerden oluştuğu belirtilmiştir. Çalışmaların ilk aşamasında besiyeri olarak 58.5±6 laktoz g/L ve 8.5±1.5 g/L protein bulunan peynir altı suyu kullanılmıştır. *Mortierella isabellina*'nın önce mevcut bütün laktozu sonra proteini tükettiği bunun tersine *Thamnidium elegans* ve *Mucor sp.*'nin ise önce proteini tamamen tüketip sonrasında laktozu tükettiği tespit edilmiştir. Bununla beraber *Mortierella isabellina*'nın bulunduğu besiyerine ekstra laktoz eklendiğinde lipit içeriğinde artış gözlenirken *Thamnidium elegans* ve *Mucor sp.*'nin bulunduğu besiyerine amonyum sülfat eklendiğinde bu iki fungus türünde de lipit içeriğinde artış gözlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında *Mortierella isabellina*'nın bulunduğu besiyerine 25 g/L laktoz, *Thamnidium elegans* ve *Mucor sp.*'nin besiyerine 6 g/L amonyum sülfat eklenmiştir. pH 6'da, 180 rpm'de ve 28°C'de 420 saatlik inkübasyon sonunda *Mortierella isabellina*'da 42.3 g/L biyokütle ve % 25.3 oranında lipit içeriği, *Thamnidium elegans*'ta 29.5 g/L biyokütle ve % 1 oranında lipit içeriği, *Mucor sp.*'de ise 28.5 g/L biyokütle ve % 0.7 lipit içeriği tespit edilmiştir. Her üç türün sentezlediği yağ asitlerinin, palmitik (C 16:0), oleik (C 18:1), linoleik (C 18:2), palmitoleik (C 16:1) ve stearik (C 18:0) asit olduğu belirtilmiştir (Vamvakaki vd., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar, glukoz Bio Shop, pepton ve maya özütü Conda, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, NH_4Cl , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ve Kloroform Sigma-Aldrich, Na_2SO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ ve Metanol Merck, KH_2PO_4 Carloerba, n-Hekzan ise Kimetsan firmasından temin edilmiştir. Peynir altı suyu, Asil Süt Ürünleri Şirketi'nden, melas ise Malatya Şeker Fabrikası'ndan temin edilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada, Ascomycetes sınıfına ait oleaginous mayalardan *Candida lipolytica* ve Urediniomycetes sınıfına ait oleaginous mayalardan *Rhodotorula glutinis* kullanıldı. *Candida lipolytica* Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarından ve *Rhodotorula glutinis* Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma laboratuvarından temin edildi.

3.3. Çalışmada Kullanılan Maya Kültürlerinin Üretimi ve Saklanması

Çalışmada kullanılan mayaların devamlılığının sağlanması amacıyla, mayalar Sabouraud dekstroz agar (SDA) plaklarında 30°C'de, 2-3 gün inkübe edildi. Mayalar 4-6 haftada bir taze besiyerlerine aktarıldı. Maya kültürleri +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada maya kültürlerinin üretimi amacıyla stok besiyeri ve lipit üretimini teşvik edici lipit üretim besiyeri olmak üzere iki çeşit besiyeri kullanıldı. Tüm besiyerleri ekim işlemleri öncesinde 121°C'de 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavize edilmiştir.

3.4.1. Stok besiyeri

Stok maya kültürlerinin üretildiği stok besiyerinin içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir. Besiyeri başlangıç pH'sı, ortama 1 N HCl ve 1 N NaOH ilave edilerek pH 5'e ayarlandı.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan stok besiyeri içeriği.

Glukoz	20 g/L
Pepton	10 g/L
Maya özütü	10 g/L

3.4.2. Lipit üretim besiyeri

Çizelge 3.2’de içeriği verilen lipit üretim besiyerinin başlangıç pH’sı ortama 1 N HCl ve 1 N NaOH ilave edilerek pH 5’e ayarlandı.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyeri içeriği.

Glukoz	20 g/L
Pepton	5 g/L
Maya özütü	5 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,5 g/L
NH ₄ Cl	4 g/L
Na ₂ SO ₄	0,02 g/L
KH ₂ PO ₄	0,1 g/L
İz element karışımı	1ml/100 ml

Çizelge 3.3’de içeriği verilen stok iz element karışımı, 1L distile su içinde hazırlanıp lipit üretim besiyerinden ayrı olarak steril edildikten sonra her 100 ml’lik besiyerine 1 ml ilave edildi. Maya miktarının, sıcaklığın, çalkalama hızının ve besiyeri başlangıç pH’sının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptandığı çalışmalarda iz element karışımı lipit üretim besiyerine eklenmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan lipit üretim besiyerine ilave edilen iz element karışımı içeriği.

CaCl ₂ .2H ₂ O	4 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,55 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	0,076 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,13 g/L

3.5. Stok Maya Kùltürlerinin Hazırlanması

SDA ortamında üretilen maya kùltürlerinden, iğne uçlu öze yardımıyla alınan maya kùltürü batırma yöntemiyle 100 ml stok besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere ekildi. Hazırlanan maya kùltürleri 30°C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (Nüve ES 110) 1 gün süre ile inkübe edildi. Daha sonra sıvı maya kùltüründen aseptik koşullarda alınan 5 ml kùltür, tekrar 100 ml stok besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere ekildi. 30°C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde 1 gün inkübe edilen maya kùltürleri lipit üretim besiyerlerine ekilmek üzere hazır hale getirildi.

3.6. Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmanın ilk aşamasında maya miktarının, sıcaklığın, çalkalama hızının ve başlangıç besiyeri pH'sının oleaginous mayaların biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi saptandı. Deneyler üçerli tekrarlar halinde yapıldı.

3.6.1. Maya miktarının zamana bağlı olarak biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması

Stok maya kùltüründen alınan 1, 3 ve 5 ml maya kùltürü ayrı ayrı 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml'lik lipit üretim besiyerine ekildi. Kùltürler 30°C'de 150 rpm'de 6 gün boyunca inkübe edildi. 6 günlük inkübasyon periyodunun 2., 4. ve 6. günlerinde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.6.2. Sıcaklığın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması

Stok maya kùltüründen alınan 5 ml maya kùltürü ayrı ayrı 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml'lik lipit üretim besiyerine ekildi. Kùltürler 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C'de 150 rpm'de 4 gün boyunca inkübe edildi. 4. günde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.6.3. Çalkalama hızının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması

Çalkalama hızının biyokütle ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması amacıyla 250 ml hacmindeki erlenlerde 100 ml olarak hazırlanmış lipit üretim besiyerlerine % 5 (v/v) oranında maya kùltürü ekildi. Kùltürler 30°C'de 50, 100, 150 ve 200 rpm'lerde 4 gün inkübe edildi. 4. günde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.6.4. Başlangıç besiyeri pH'sının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması

Stok maya kültürlerinden alınan 5 ml maya kültürü 250 ml'lik erlenlerdeki pH'ları 4, 5, 6 ve 7'ye ayarlanmış 100 ml'lik lipit üretim besiyerine ekildi. Kültürler 30°C'de ve 150 rpm'de 4 gün boyunca inkübe edildikten sonra 4. günde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.7. Lipit Üretim Besiyerine İlave Edilen İnorganik Azot Miktarı ve Çeşidinin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması

Çizelge 3.2'de içeriği verilen lipit üretim besiyerindeki inorganik azot kaynağı olan NH_4Cl 'ün miktarı 8 ve 12 g/L'ye yükseltilecek biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca 4, 8 ve 12 g/L olmak üzere $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonları da denendi. Aynı deneyler, ortamda organik azot kaynakları olmadan yapıldı. 5 ml maya kültürü 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml'lik besiyerlerine (başlangıç pH'sı 5) ekilerek 30°C'de ve 150 rpm'de 4 gün inkübe edildi. 4. günde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.8. Lipit Üretim Besiyerine İlave Edilen Glukoz Miktarının Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması

Çizelge 3.2'de içeriği verilen lipit üretim besiyerindeki glukoz konsantrasyonu 30 ve 40 g/L'ye yükseltilecek, biyokütle ve lipit birikimi üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmalar, Bölüm 3.7'de belirtildiği gibi kesikli olarak yürütüldü. 4. günde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.9. Bazı Doğal Hammaddelerin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması

Çalışmanın bu aşamasında lipit üretim besiyeri olarak bazı yenilenebilir substratlar test edilmiştir. Şeker fabrikası yan ürünü olan melas ve peynir fabrikası atık suyu olan peynir altı suyu zengin azot ve karbon içeriğinden dolayı farklı oranlarında besiyerlerine ilave edilmiştir.

3.9.1. Melas miktarının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması

Şeker fabrikası yan ürünü olan melasın, iki oleaginous maya türünün biyokütle değişimi ve lipit üretme yetenekleri üzerine etkisinin araştırılması amacıyla iki farklı besiyeri hazırlandı. Birinci besiyeri % 1, % 5 ve % 10'luk (w/v) melas ve iz element karışımı içerirken ikinci besiyerine birinci besiyerine ek olarak 2 g/L NH_4Cl ilave

edildi. Başlangıç pH'sı 5'e ayarlanan besiyerlerine 5 ml stok maya kültüründen ekim yapıldı. Kültürler 30°C ve 150 rpm'de 4 gün inkübe edildikten sonra biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.9.2. Peynir altı suyunun biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin saptanması

% 1, % 5 ve % 10 (v/v) oranlarında peynir altı suyu içeren besiyerlerine iz element karışımı ve 20 g/L glukoz ilave edilerek lipit üretim besiyerleri hazırlandı. Başlangıç pH'sı 5 olarak ayarlanan lipit üretim besiyerlerine 5 ml stok maya kültüründen ekim yapıldıktan sonra kültürler 30°C ve 150 rpm'de 4 gün inkübasyona bırakıldı. 4. günde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.10. İki Basamaklı Fermentasyon Yönteminin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisinin Saptanması

Çalışmanın bu aşamasında mayaların üremesi ve lipit birikimi iki aşamalı kültür ortamında test edildi. Lipit üretim besiyerinde Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde 72 saat inkübe edilen mayalar, 72 saatin sonunda aseptik koşullarda santrifüj tüplerine alınarak, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Hettich zentrifugen EBA 20) edildi. Santrifüj tüplerindeki süpernatant dökülüp dipteki maya hücreleri, başlangıç pH'sı 5 olan 40 g/L glukoz içeren yeni lipit üretim besiyerine aseptik koşullarda aktarıldı. Kültürler ikinci üretim aşamasında 30°C ve 150 rpm'de 312 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun 96., 168., 240. ve 312. saatlerde biyokütle ve lipit analizi yapıldı.

3.11. Analizler

3.11.1. Kültür ortamındaki kuru biyokütle miktarının hesaplanması

Kültür ortamındaki kuru biyokütle miktarını hesaplamak için öncelikle 50°C'de pastör fırınında kurutulan boş filtre kağıtları (Whatman No:1, Toyo Advantec, 125 mm çap) 1 saat desikatörde bekletildi. Daha sonra boş filtre kağıtlarının ağırlıkları hassas terazide tespit edildi. 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml'lik kültür darası alınmış filtre kağıdından süzüldü. Filtre üstü maya hücrelerinin ağırlığı, yukarıda belirtildiği gibi saptandıktan sonra kuru biyokütle miktarı g/100 ml cinsinden ifade edildi.

3.11.2. Maya hücrelerinden lipit ekstrasyonu

Farklı kültür koşullarında üretilen mayaların sentezledikleri lipitlerin ekstrasyonu Bligh ve Dyer yöntemine göre yapıldı (Burja vd., 2007). Mikrobiyal lipit ekstrasyonu için aşağıdaki işlemler uygulandı:

- Sıvı maya kültürleri santrifüj tüplerine alındı.
- Besiyeri 6000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı.
- Maya hücreleri distile suyla yıkanarak tekrar santrifüj edildi.
- Maya hücreleri 100 ml hacminde kahverenkli cam şişeler içine alındı.
- Maya biyokütlesinin 1 g'ı için 2.5 ml distile su ve 30 ml kloroform/metanol karışımı (2/1, v/v) eklendi.
- Karışım 2 dakika boyunca homojenize (Heidolph RZR 2021) edildi.
- Homojenata 10 ml kloroform ilave edilerek 30 saniye daha homojenize edildi.
- Elde edilen homojenat bir gece boyunca 200 rpm'de çalkalandı.
- Homojenat filtre kağıdından geçirildi.
- Filtrat, ayırma hunisine alınarak 15 ml distile su ilave edildi.
- Faz ayrımı için 1 saat beklendi.
- Ayırma hunisinin dibindeki kloroform tabakası dereceli cam kaba alındı.
- Kloroform ekstratı darası bilinen aliminyum kaba alındı.
- Kloroform 80°C'deki pastör fırınında (Nüve FN 500) 20-30 dakika süreyle uçuruldu.
- Elde edilen lipit gravimetrik olarak tayin edildi.

Ekstre edilen total lipit miktarı (lipit içeriği (g/g)) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Toplam lipit miktarı: } (W_L - W_D) \times V_C \times 100 / V_P \times W_S$$

W_D : Boş aliminyum tabağın ağırlığı (g)

W_L : Aliminyum tabak ve yağın ağırlığı (g)

W_S : Mikroorganizmanın kuru biyokütlesi (g)

V_C : Toplam kloroform miktarı (ml)

V_P : Aliminyum tabağa aktarılan kloroform miktarı (ml)

Hücrelerin toplam lipit miktarı (lipit içeriği) yaş hücre ağırlığına karşılık gelen kuru hücre ağırlığı başına düşen, lipit miktarı olarak yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

3.11.3. Mikrobiyal lipitlerin transesterifikasyonu

Optimum şartlarda üretilen ve en yüksek lipit değerlerine ulaşan mayalardan ekstre edilen lipitler, ISO-5509,2000 yöntemine göre aşağıdaki şekilde transesterifiye edilmiştir.

- 0,1 g yağ 15 ml'lik kapaklı santrifüj tüpüne alındı.
- Üzerine 10 ml n-hekzan eklenip kuvvetlice karıştırıldı.
- 0,5 ml 2 N metanollü KOH çözeltisi karışıma eklenerek kuvvetlice karıştırıldı.
- Üst faz belirginleşinceye kadar 2 saat karanlık bir ortamda bekletildi.
- Üst fazdan 1ml örnek alınarak gaz kromatografisi-kütle spektrofotometre cihazında yağ asidi esterleri belirlendi.

3.11.4. Yağ asidi ve yağ asidi metil esterlerinin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazında analizi

Maya hücrelerinden ekstre edilen lipitler ve mikrobiyal lipitlerin transesterifikasyonu reaksiyonu sonucu oluşan metil esterlerinin analizleri, 6890N Network GC System, 5973 Inert Mass Selective Detector (Agilent Technologies) ve 19091N-136 60 m x 0.250 mm x 0.25 μ m (HP-INNOWAX) kolonunda 40-260°C'ler arasında He gazı kullanılarak yapıldı.

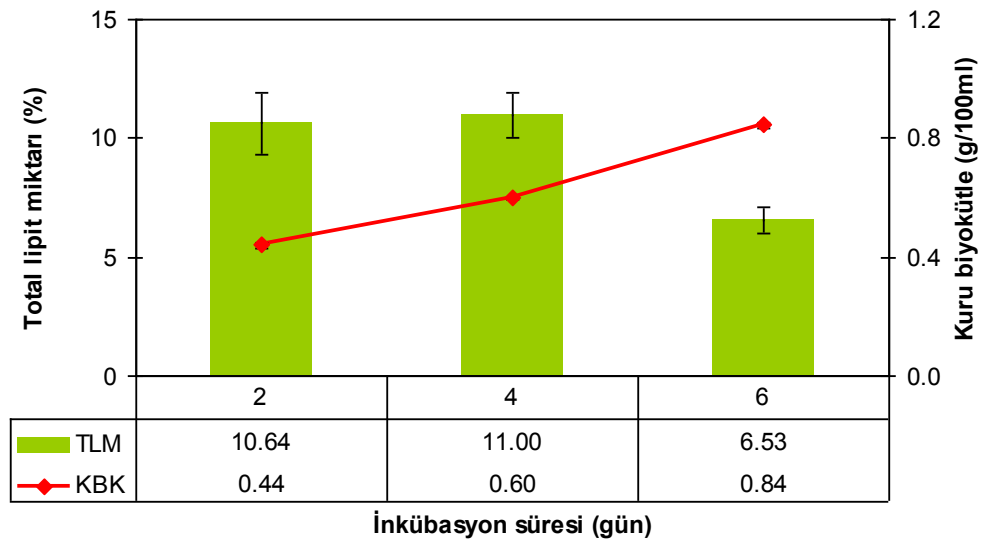
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Optimizasyon Çalışmaları

Mikrobiyal kaynaklardan yağ eldesi çalışmalarında, biyokütlenin artırılmasının yanı sıra sitoplazmada yüksek oranda yağ birikiminin sağlanması için optimum kültür koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu açıdan çalışmanın ilk aşamasında maya miktarının, inkübasyon süresinin, sıcaklığın, çalkalama hızının ve besiyeri başlangıç pH'sının mayaların biyokütle değişimi ve lipid birikimi üzerine etkisi araştırıldı.

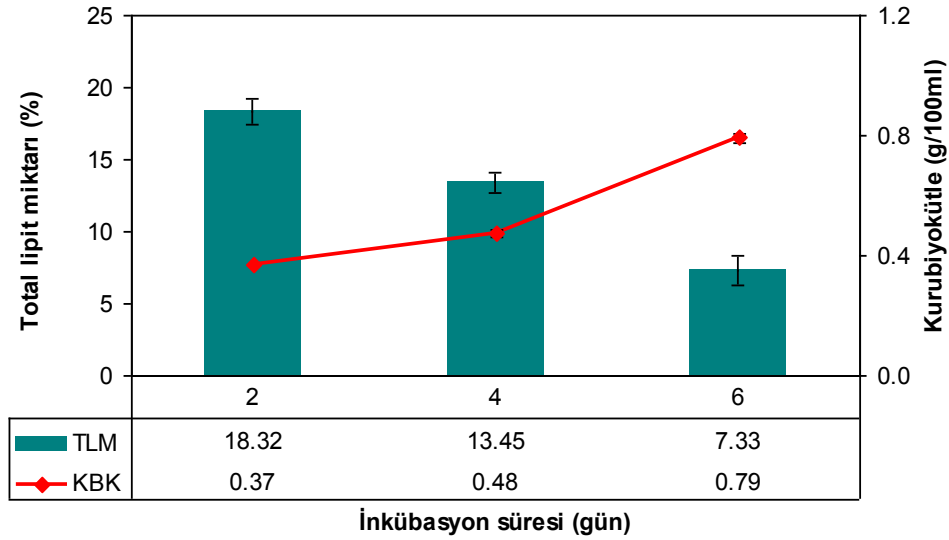
4.1.1. Maya miktarının ve inkübasyon süresinin biyokütle değişimi ve lipid birikimi üzerine etkisi

Maya miktarının ve inkübasyon süresinin biyokütle değişimi ve lipid birikimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla stok maya kültüründen 1 ml, 3ml ve 5 ml kültür, lipid üretim besiyerine ekilerek inkübasyonun 2., 4. ve 6. günlerinde biyokütle ve lipid analizi yapıldı. *R. glutinis* kültüründen lipid üretim besiyerine 1 ml ekim yapıldığında inkübasyonun 2. ve 4. günlerinde sırasıyla % 10.64±1.31, % 11±0.95 olmak üzere benzer lipid içeriği değerleri elde edilirken 6. günde lipid içeriği (% 6.53±0.54) yüzdesi düştü. Biyokütle miktarının ise zamana bağlı olarak arttığı tespit edildi (Şekil 4.1).



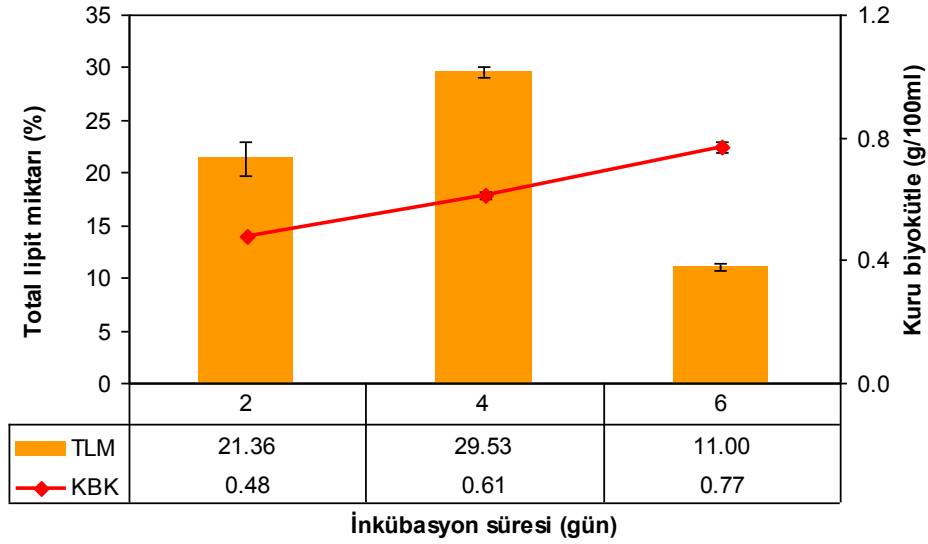
Şekil 4.1. Maya miktarının (*Rhodotorula glutinis*) biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipid miktarı (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 1 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Lipit üretim besiyerine ekilen maya miktarı 3 katına çıkarıldığında (3 ml/100 ml) en yüksek lipit içeriği % 18.32 ± 0.94 olarak inkübasyonun 2. gününde tespit edildi. Günlere bağlı olarak lipit içeriğinde azalış kaydedilirken kuru biyokütle miktarı zamana bağlı olarak arttı (Şekil 4.2).



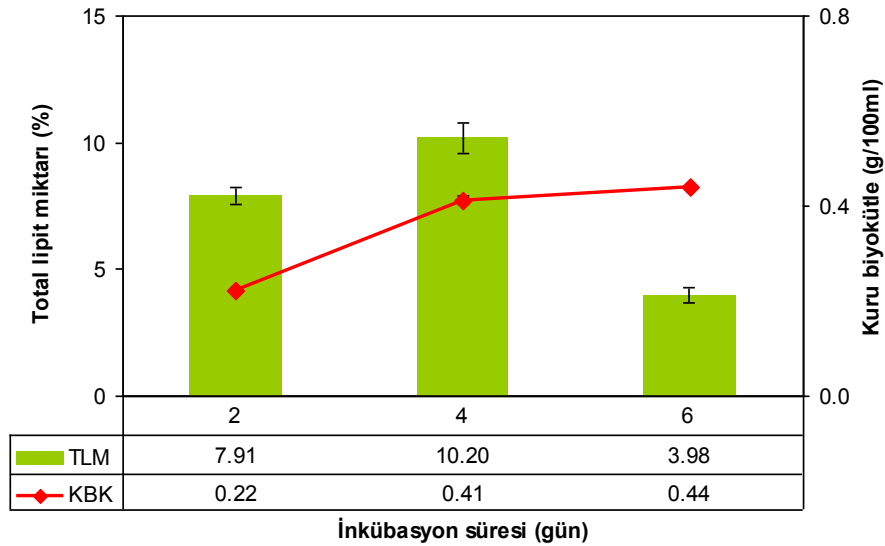
Şekil 4.2. Maya miktarının (*Rhodotorula glutinis*) biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit miktarı (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 3 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Lipit üretim besiyerine 5 ml *R. glutinis* maya kültürü ekildiğinde lipit içeriğinin 1 ml ve 3 ml ekim yapılan çalışmalara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. 4. gün sonu itibariyle % 29.53 ± 0.46 oranıyla en yüksek lipit içeriğine ulaşıldı. Zamana bağlı olarak kuru biyokütle değerleri artış gösterdi (Şekil 4.3). Feiyan vd. (2006), monosodyum glutamat atık suyunu besiyeri olarak kullandıkları çalışmada, besiyerine % 5-20 oranında *R. glutinis* mayası ekildiğinde en iyi biyokütle artışı % 12'lik ekim miktarında olmuştur. Fakat araştırmacılar ekim miktarının lipit içeriğinde olumlu bir etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir (Feiyan vd., 2006).



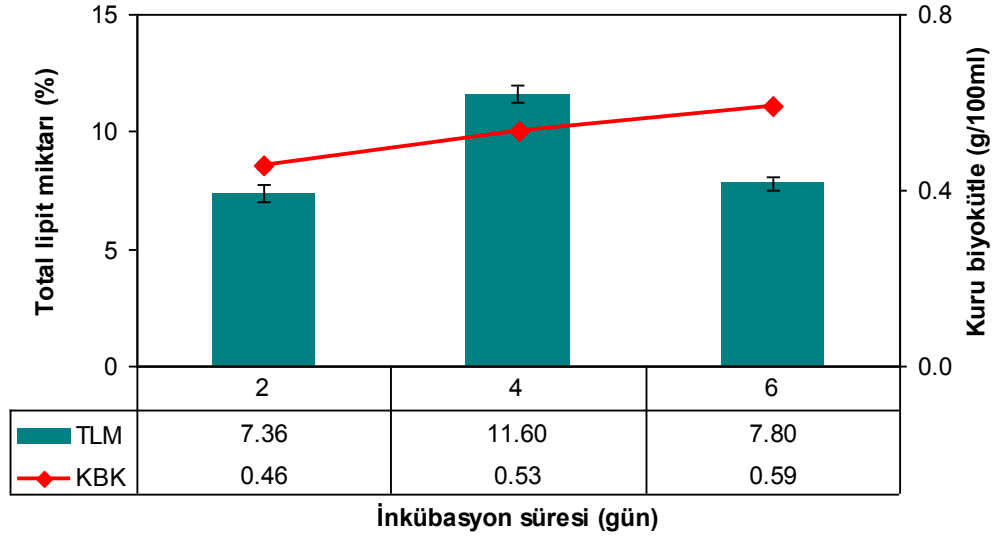
Şekil 4.3. Maya miktarının (*Rhodotorula glutinis*) biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit miktarı (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

C. lipolytica kültüründen lipit üretim besiyerine 1 ml ekim yapıldığında en iyi lipit içeriği (% 10.2±0.6) 4. günde elde edildi. İnkübasyonun 2. gününden sonra hızla artan kuru biyokütle değeri 4. ve 6. günlerde benzer oldu (Şekil 4.4).



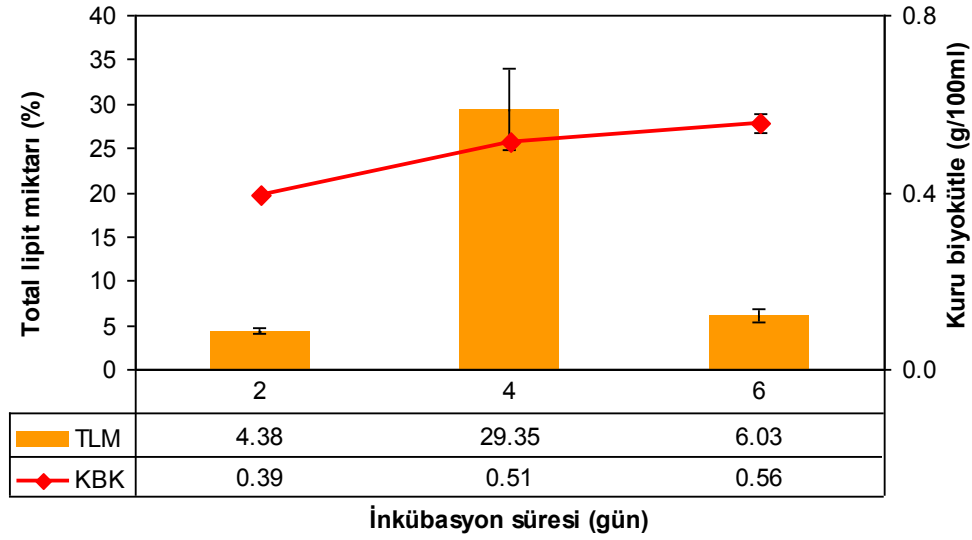
Şekil 4.4. Maya miktarının (*Candida lipolytica*) biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit miktarı (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 1 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Lipit üretim besiyerine ekilen *C. lipolytica* miktarı 3 ml'ye arttırıldığında inkübasyonun 4. gününde, en yüksek lipit içeriğine ulaşıldı. Kuru biyokütle miktarları günlere bağlı olarak az bir artış gösterdi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Maya miktarının (*Candida lipolytica*) biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit miktarı (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 3 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Lipit üretim besiyerine 5 ml *C. lipolytica* ekildiğinde 4. günde lipit içeriğinin (% 29.35±4.58), 1 ml ve 3 ml ekim yapılan çalışmalara göre yaklaşık 2.5 kat arttığı tespit edildi. Fakat lipit içeriği 6. günde hızlı bir şekilde düştü. Buna rağmen kuru biyokütle değerleri 4. ve 6. günlerde benzer oldu (Şekil 4.6). Wu vd. (2011) *Trichisporon capitatum* ile yaptıkları çalışmada, benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Azot sınırlı besiyerine % 10 oranında *T. capitatum* ekildikten sonra, 10 günlük inkübasyon süresi içerisinde en iyi biyokütle artışı ve en yüksek lipit içeriği 6. günde elde edilirken ilerleyen günlerde biyokütle değişimi sabit kalmıştır ve lipit içeriğinde azalma olmuştur. Hücre içerisinde biriktirilen lipitin, hücre çoğalması için yıkıldığı rapor edilmiştir (Wu vd., 2011).

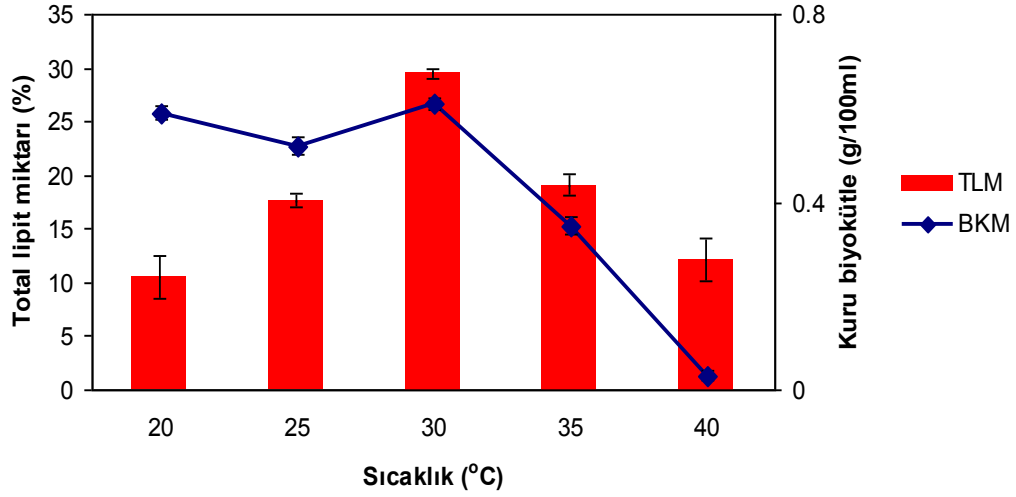


Şekil 4.6. Maya miktarının (*Candida lipolytica*) biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipid miktarı (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Şekil 4.1-6'daki sonuçlara göre ekim miktarı ve inkübasyon süresi biyokütle değişimi ve lipid miktarı üzerine etkili oldu. Her iki maya türünde inkübasyonun 4. gününde ve besiyerine % 5 (v/v) ekim yapıldığında en yüksek lipid miktarı elde edildiği için sonraki optimizasyon çalışmalarında lipid üretim besiyerine % 5 (v/v) ekim yapılarak inkübasyonun 4. gününde biyokütle ve lipid analizi yapılmıştır.

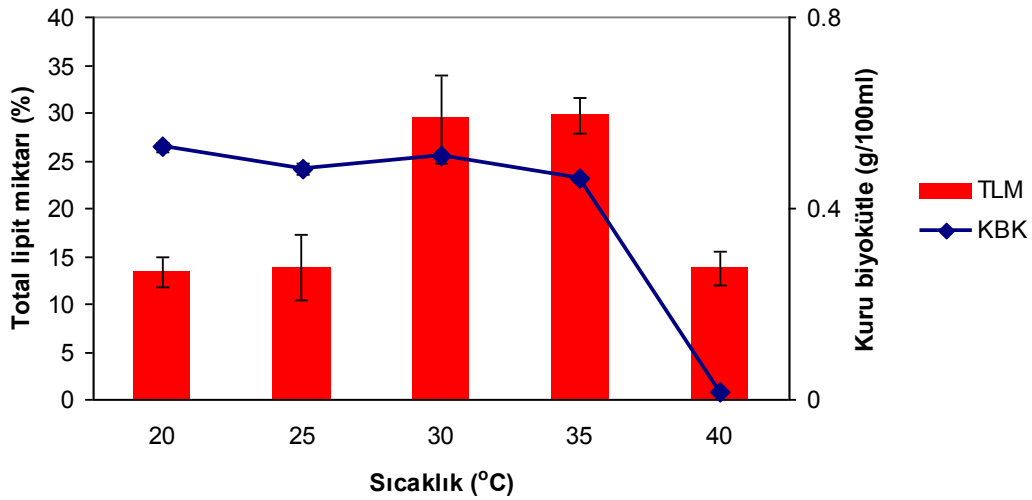
4.1.2. Sıcaklığın biyokütle değişimi ve lipid birikimi üzerine etkisi

Farklı sıcaklıkların *R. glutinis*'in biyokütle değişimi ve lipid biriktirme kapasitesine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda en yüksek kuru biyokütle değeri (0.61±0.01 g/100 ml) ve lipid içeriği (% 29.53±0.46) 30°C'de tespit edildi (Şekil 4.7). Düşük sıcaklıklarda benzer biyokütle değerleri elde edilirken total lipid miktarı sıcaklık artışına bağlı olarak artmıştır. Üreme sıcaklığı 30°C'nin üzerine çıktığında biyokütle ve total lipid miktarı hızla azalmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ortam sıcaklığının biyokütle değişimi ve lipid birikimi üzerinde etkili olduğu tespit edildi. Yüksek sıcaklıklarda (35-40°C) hem hücre gelişimi sağlanamamış hem de lipid sentezi gerçekleştirilememiştir. Benzer sonuçlar Saxena ve arkadaşları (1998) tarafından rapor edilmiştir (Saxena vd., 1998). Tao ve arkadaşlarının (2010) asitle hidrolize edilmiş *Populus euramevicana* yapraklarını substrat olarak kullandıkları çalışmada, *R. glutinis* 28°C'de, % 28.55 oranında lipid biriktirmiştir (Tao vd., 2010).



Şekil 4.7. Farklı sıcaklıkların *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipid birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

C. lipolytica, 4 günlük inkübasyon sonunda 30°C ve 35°C'lerde, birbirine yakın değerlerde lipid biriktiren en yüksek kuru biyokütle değeri ve lipid birikimi 30°C'de tespit edildi (Şekil 4.8). Karatay ve Dönmez (2010) karbon kaynağı olarak melas kullandıkları besiyerinde, *C. lipolytica*'da % 59.9 lipid içeriğini, optimum üreme sıcaklığının 30°C olduğu kültür koşullarında tespit etmişlerdir (Karatay ve Dönmez, 2010). 40°C'de kuru biyokütlenin ve lipid birikiminin en düşük seviyede olduğu belirlendi. Nie vd (2006) optimum üreme sıcaklığında yağ sentezinden sorumlu enzimlerin katalizlediği reaksiyonların hızının arttığını fakat yüksek sıcaklıklarda enzimlerin denatüre olduğunu rapor etmiştir (Nie vd., 2006).

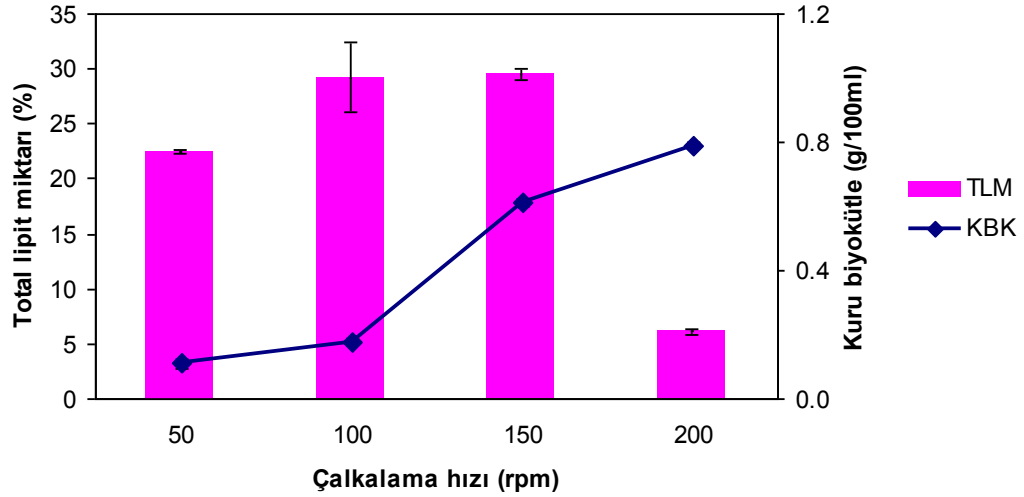


Şekil 4.8. Farklı sıcaklıkların *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipid birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Her iki mezofilik maya türünde de optimum üreme sıcaklığı ve en yüksek lipid birikiminin sağlandığı sıcaklık 30°C olarak tespit edildi. Sıcaklık, hücrelerdeki lipid birikimini yağ asidi kompozisyonunu da etkilemektedir. Tao ve arkadaşları (2010) *R. glutinis* tarafından sentezlenen yağ asitlerinin, 30°C ve üstü sıcaklıklarda doymuşluk özelliğinin arttığını, 30°C altında ise doymamışlık özelliğinin arttığını belirtmişlerdir (Tao vd., 2010).

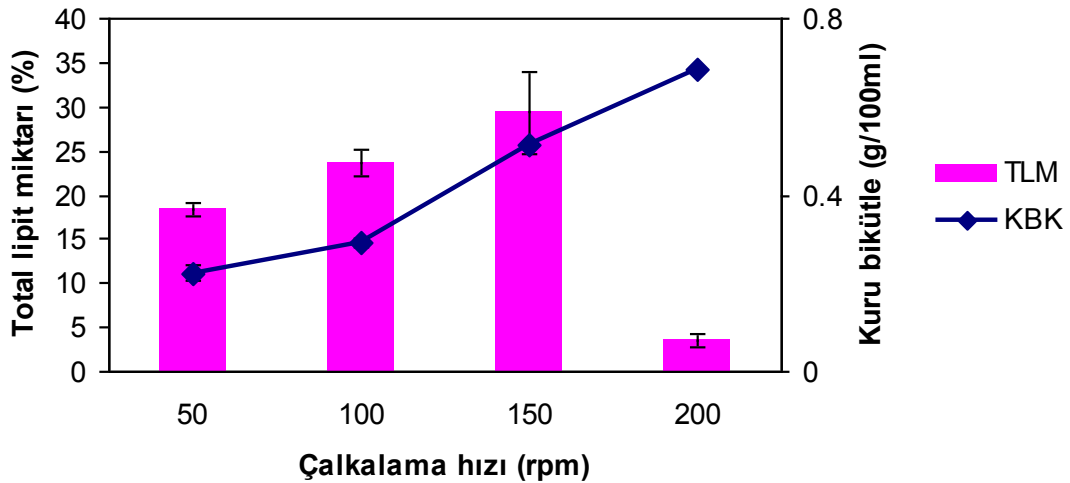
4.1.3. Çalkalama hızının biyokütle değişimi ve lipid birikimi üzerine etkisi

R. glutinis'in farklı çalkalama hızlarındaki biyokütle değişimi ve lipid biriktirme kapasitesi araştırılmıştır. En yüksek kuru biyokütle değeri 200 rpm'de, en yüksek lipid içeriği 150 rpm'de tespit edildi (Şekil 4.9). Çalkalama hızındaki artış sonucunda *R. glutinis*'in biyokütlesi ve lipid birikimi artarken, 200 rpm'de lipid birikiminde hızlı bir düşüş, biyokütle miktarında ise artış kaydedildi. Yen ve Zhang (2011), çalkalama hızının *R. glutinis*'in lipid sentezine etkisini araştırdıkları çalışmada, yüksek çalkalama hızının biyokütle artışına sebep olurken lipid miktarında azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. İki farklı çalkalama hızının da ard arda test edildiği aynı çalışmada, 210 rpm'de ilk 24 saatlik inkübasyonda biyoküttele ve lipid miktarında artış olurken sonraki 60 rpm'de gerçekleştirilen ikinci 24 saatlik inkübasyonda kontrol gurubuna göre lipid miktarında daha fazla bir artış, biyoküttele düşüş olduğunu rapor etmişlerdir (Yen ve Zhang, 2011).



Şekil 4.9. Farklı çalkalama hızlarının *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

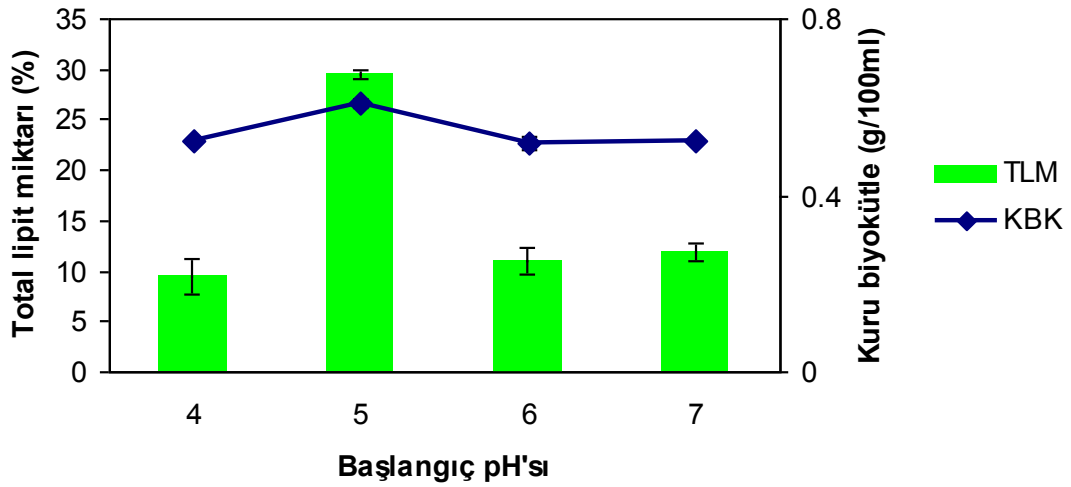
C. lipolytica mayasının, farklı çalkalama hızlarında *R. glutinis*'e benzer özellikler gösterip, 150 rpm'de en yüksek oranda lipit biriktirdiği tespit edildi (Şekil 4.10). 200 rpm'de lipit birikiminin çarpıcı bir şekilde düştüğü ancak biyokütle değerlerinin arttığı tespit edilmiştir Cheirsilp vd. (2011), *R. glutinis* mayası ve *Chlorella vulgaris* alginden oluşan karışık kültür kullanarak yürüttükleri çalışmada, her iki türde de çalkalama hızına bağlı olarak biyokütle ve lipit birikiminde artış tespit etmişlerdir (Cheirsilp vd., 2011).



Şekil 4.10. Farklı çalkalama hızlarının *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

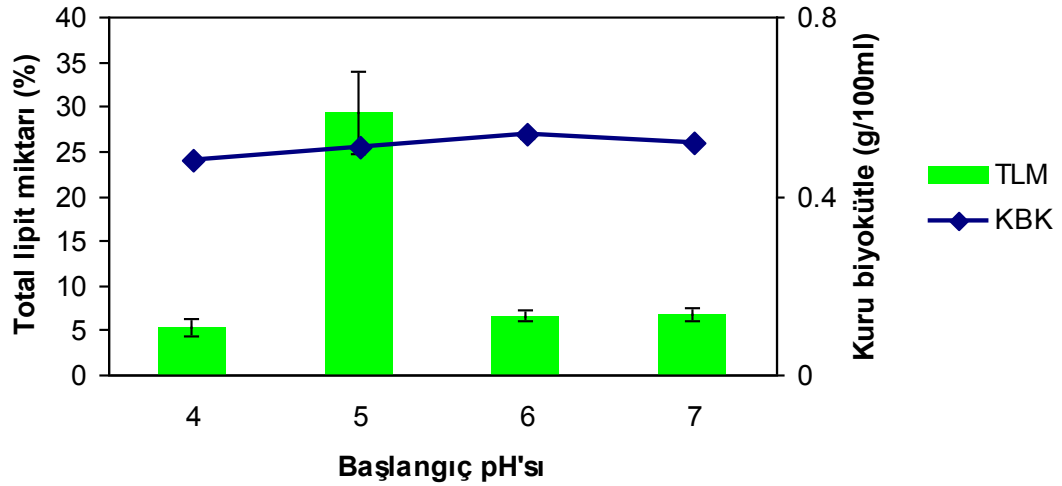
4.1.4. Başlangıç pH'sının biyokütle değişimi ve lipid birikimi üzerine etkisi

Besiyeri başlangıç pH'sındaki değişimin *R. glutinis*'in, lipid biyosentezini önemli oranda etkilediği tespit edildi (Şekil 4.11). En yüksek biyokütle miktarı ve lipid birikimi besiyeri başlangıç pH'sının 5 olduğu kültür şartlarında elde edildi. Johnson vd (1992) farklı besiyeri başlangıç pH'larının *R. glutinis* mayasının lipid sentezi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, en yüksek biyokütle değerinin 22.3 g/L ve lipid içeriğini % 66 olarak pH 4'te rapor etmişlerdir (Johnson vd., 1992).



Şekil 4.11. Farklı besiyeri başlangıç pH'larının *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipid birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C ve çalkalama hızı: 150 rpm.

Besiyeri başlangıç pH'sının, *C. lipolytica*'in lipid birikimi üzerinde çok etkili olduğu belirlendi (Şekil 4.12). En yüksek lipid içeriği değerine pH 5'te ulaşılırken test edilen diğer pH'larda çok düşük lipid içeriği elde edildi. Benzer sonuçlar, Karatay ve Dönmez (2010) tarafından melas içeren besiyerinde üretilen *C. lipolytica* ortamında elde edilmiştir. pH 5'de maksimum lipid birikimi % 59.9 olarak belirtilirken test edilen diğer pH değerlerinde (4, 6 ve 7) yaklaşık % 30 civarında lipid birikimi olduğu bildirilmiştir (Karatay ve Dönmez, 2010). Gong ve arkadaşları (2013) farklı besiyeri başlangıç pH'larında *Cryptococcus curvatus*'un selülozu hidrolize ederek lipid biriktirme kapasitesini araştırmışlardır. Besiyeri başlangıç pH'sı 4.4'ten 5.5'ye çıkarıldığında lipid verimi 5.5 g/L'den 6.5 g/L'ye çıktığını, pH 5.6 ise lipid veriminin düşme eğilimine girdiğini belirtmişlerdir (Gong vd., 2013).



Şekil 4.12. Farklı besiyeri başlangıç pH'larının *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C ve çalkalama hızı: 150 rpm.

4.2. Lipit Üretim Besiyerine İlave Edilen İnorganik Azot Miktarı ve Çeşidinin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda inorganik azot kaynakları, NH_4Cl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lipit üretim besiyerine ilave edildi. Her iki maya türünde organik azot kaynaklarının yanısıra lipit üretim besiyerine artan oranlarda (8 ve 12 g/L) NH_4Cl ilave edilmesi biyokütlede artışa neden olurken lipit birikiminde hızlı bir düşüşe sebep olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1). Azot bakımından zengin olan bu ortamların, hücre artışını teşvik edip lipit biyosentezini sınırlaması literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermiştir (Li vd., 2008; Kraisintu vd., 2010; Enshaeieh vd., 2012).

Sadece organik azot kaynaklarının kullanıldığı kontrol grubunda, lipit içeriği % 13.05 ± 0.08 olurken kuru biyokütle miktarı 0.56 ± 0.06 g/100 ml oldu. İnorganik azot kaynağı ortama ilave edilmediği durumlarda NH_4^+ miktarı daha az olduğundan yüksek oranda lipit sentezlenememiştir. Sadece oleaginous mayalarda bulunan ATP-sitrat liyaz enzimi NH_4^+ iyonuna ihtiyaç duymaktadır (Ratledge ve Wynn, 2002).

R. glutinis lipit sentezi için az miktarda NH_4Cl 'e ihtiyaç duymuştur. Mikroorganizmaların lipit sentezi için tercih ettikleri azot kaynakları farklılık göstermektedir. Evans ve arkadaşları (1984) *Rhodosporidium toruloides* ile yaptıkları çalışmada azot kaynağı olarak NH_4Cl kullandıklarında % 18 oranında lipit içeriği elde ederken bu oran glutamat, üre veya maya özütü kullanıldığında % 50'nin üzerine çıkmıştır. *R. toruloides*, *R. glutinis*'in aksine organik azot kaynaklarını tercih etmiştir (Evans vd. 1984).

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki NH₄Cl'ün pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi.

NH ₄ Cl miktarı	Pepton (+), Maya özütü (+)		Pepton (-), Maya özütü (-)	
	TLM	KBK	TLM	KBK
4 g/L	29.53 ± 0.459	0.61 ± 0.011	11.39 ± 0.127	0.26 ± 0.009
8 g/L	7.97 ± 0.931	0.66 ± 0.006	9.23 ± 0.771	0.24 ± 0.005
12 g/L	6.00 ± 0.856	0.72 ± 0.010	26.17 ± 2.559	0.21 ± 0.019

Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Pepton ve maya özütü bulunmayan, sadece 4, 8 ve 12 g/L NH₄Cl bulunan lipit üretim besiyerlerinde, *R. glutinis*'ten 12 g/L NH₄Cl içeren besiyerinde en yüksek lipit içeriği ve en düşük kuru biyokütle değeri tespit edildi (Çizelge 4.1). En yüksek kuru biyokütle değeri ise 4 g/L NH₄Cl içeren kültür ortamında elde edildi. Ancak azot kaynağı olarak 12 g/L NH₄Cl kullanıldığında elde edilen lipit verimi 0.76±2.56 g/L iken 4 g/L NH₄Cl kullanıldığında ise lipit verimi 0.84±0.46 g/L olarak tespit edilmiştir. 12 g/L NH₄Cl ortama eklendiğinde elde edilen yüzde lipit miktarının yüksek görülmesi aslında elde edilen düşük biyokütleden kaynaklıdır. *R. glutinis* ile pepton ve maya özütü olmayan lipit üretim besiyerinde NH₄Cl miktarında artış yapılırsa da pepton, maya özütü ve minimum seviyede NH₄Cl (4 g/L) içeren ortama göre daha düşük lipit birikimi elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bu maya türü lipit biyosentezi için organik ve inorganik azot kaynaklarına ihtiyaç duymaktadır. Enshaeieh ve arkadaşları da (2012) *Rhodotorula* 110 ile yaptıkları çalışmada lipit üretim besiyerine hem organik hem de inorganik azot kaynağı ilave etmişlerdir (Enshaeieh vd., 2012).

C. lipolytica ile aynı kültür koşullarında çalışma yürütüldüğünde, *R. glutinis* ile elde edilen sonuçlara benzer sonuçlara ulaşıldı (Çizelge 4.2). *C. lipolytica*'nın lipit sentezleyebilmek için hem organik hem de az miktarda inorganik azota (4 g/L) ihtiyaç duyduğu tespit edildi.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki NH_4Cl 'ün pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi.

NH_4Cl miktarı	Pepton (+), Maya özütü (+)		Pepton (-), Maya özütü (-)	
	TLM	KBK	TLM	KBK
4 g/L	29.35 ± 4.581	0.52 ± 0.004	9.86 ± 1.358	0.37 ± 0.006
8 g/L	8.91 ± 1.489	0.62 ± 0.003	7.12 ± 1.287	0.33 ± 0.013
12 g/L	5.82 ± 0.717	0.63 ± 0.005	22.9 ± 0.845	0.29 ± 0.005

Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Lipit üretim besiyerinde bulunan organik azot kaynaklarına ek olarak ortama artan miktarlarda (4, 8 ve 12 g/L) başka bir inorganik azot kaynağı (NH_4)₂SO₄ ilave edilerek çalışmalar yürütüldü (Çizelge 4.3-4). Her iki maya türünde de en yüksek lipit içeriği 4 g/L (NH_4)₂SO₄ içeren besiyerinde elde edilirken en yüksek kuru biyokütle değeri 12 g/L (NH_4)₂SO₄ içeren besiyerinde tespit edildi. (NH_4)₂SO₄ miktarındaki artış lipit birikimini olumsuz yönde etkilemiştir. Karatay ve Dönmez (2010) melaslı besiyerine farklı konsantrasyonlarda (NH_4)₂SO₄ ilave ederek maya hücrelerinin lipit sentezleme kapasitelerini test ettikleri çalışmada, (NH_4)₂SO₄ miktarı 0.5 g/L'den 1.5 g/L'ye çıkarıldığı zaman maya hücrelerinde sentezlenen lipit miktarında düşme olduğunu ifade etmişlerdir (Karatay ve Dönmez, 2010). İnorganik azot kaynağı olarak (NH_4)₂SO₄ kullanıldığında sadece azot değil sülfat kaynağı açısından zengin bir ortam oluşturulmuştur. Oysaki her iki maya türü de yüksek oranda lipit sentezleyebilmek için az miktarda inorganik azot ve sülfata ihtiyaç duymaktadır. Wu ve arkadaşları (2011) *Rhodospiridium toruloides* mayasının sülfat sınırlı besiyerinde, lipit üretme kapasitesini araştırdıkları çalışmada sülfat kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda Na₂SO₄ kullanmışlardır. Besiyerine 2 g/L Na₂SO₄ ilave ettiklerinde en yüksek biyokütle değerlerine ulaşırken en düşük lipit içeriğini tespit etmişlerdir. Yüksek lipit içeriğine ise Na₂SO₄'ın az olduğu veya olmadığı durumlarda ulaşılabilmektedir (Wu vd., 2011). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, NH_4Cl içeren besiyerinde tespit edilen lipit içeriği ve kuru biyokütle miktarı, (NH_4)₂SO₄ içeren besiyerinde tespit edilenlere göre daha yüksek oldu. Her iki maya türü de inorganik azot kaynağı olarak NH_4Cl 'ü tercih etti.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı	Pepton (+), Maya özütü (+)		Pepton (-), Maya özütü (-)	
	TLM	KBK	TLM	KBK
4 g/L	9.61 ± 0.917	0.41 ± 0.011	8.35 ± 1.301	0.51 ± 0.002
8 g/L	7.75 ± 1.358	0.43 ± 0.003	14.15 ± 0.778	0.49 ± 0.002
12 g/L	4.92 ± 0.827	0.46 ± 0.004	6.55 ± 0.778	0.5 ± 0.006

Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Lipit üretim besiyerine azot kaynağı olarak sadece 4, 8 ve 12 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilave edildiğinde *R. glutinis*'de en yüksek lipit içeriği 8 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerinde, en yüksek kuru biyokütle değeri ise 4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerinde tespit edildi (Çizelge 4.3). *C. lipolytica*'da en yüksek lipit içeriği 4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerinde en yüksek kuru biyokütle ise 12 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerinde elde edildi (Çizelge 4.4). Wu ve arkadaşları (2010) *Rhodospiridium toruloides* mayasının fosfat sınırlı ve farklı konsantrasyonlarda $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerindeki lipit biriktirme kapasitesini araştırdıkları çalışmada benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. Besiyerindeki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı 5 g/L'den 8 g/L'ye çıkarıldığında biyokütlerde artış olurken lipit içeriğinde azalma olduğu belirtilmiştir (Wu vd., 2010).

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın pepton, maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerindeki *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi.

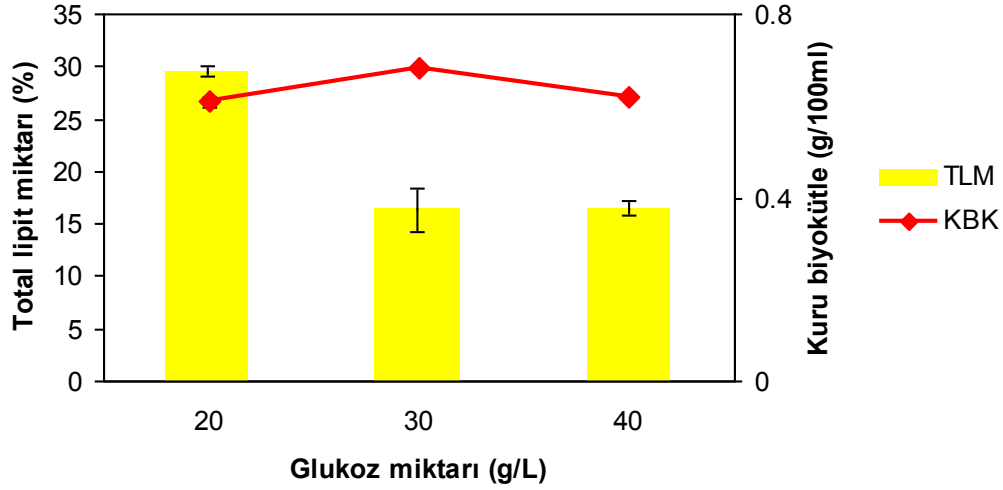
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı	Pepton (+), Maya özütü (+)		Pepton (-), Maya özütü (-)	
	TLM	KBK	TLM	KBK
4 g/L	8.87 ± 0.463	0.54 ± 0.002	13.61 ± 0.417	0.34 ± 0.013
8 g/L	6.96 ± 0.774	0.55 ± 0.001	7.25 ± 0.260	0.35 ± 0.014
12 g/L	6.95 ± 0.198	0.56 ± 0.004	8.08 ± 0.587	0.37 ± 0.006

Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

İnorganik ve organik azot kaynaklarının biyokütle artışında ve lipit birikiminde farklı rolleri vardır. Organik azot lipit birikimini ve biyokütle artışını arttırırken inorganik azotun biyokütle artışında daha etkili olduğu belirtilmiştir (Zhang vd., 2011).

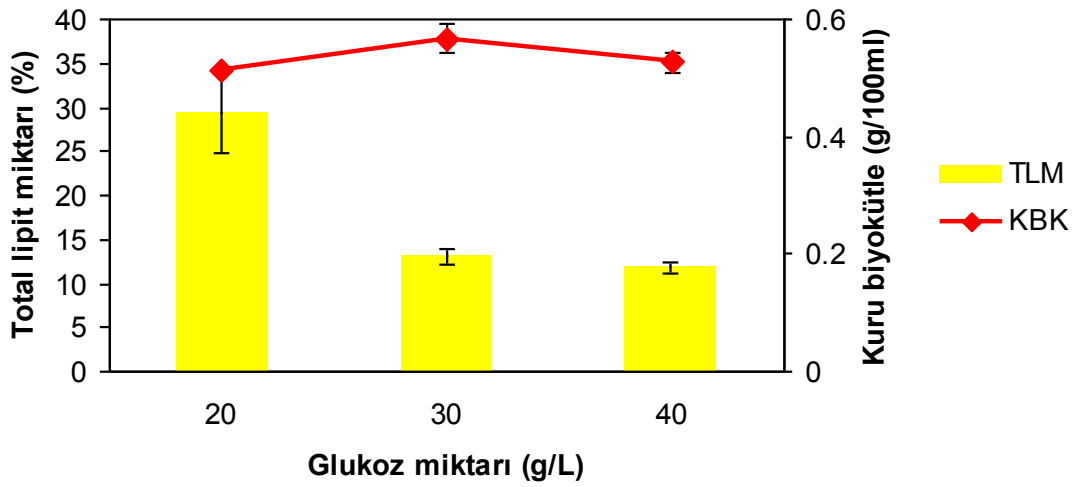
4.3. Glukoz Miktarının Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi

Çalışmanın bu aşamasında lipit üretim besiyerine 20, 30 ve 40 g/L glukoz ilave edilerek maya hücrelerinin lipit birikimi ve kuru biyokütle değişimleri araştırıldı. *R. glutinis*'de en yüksek lipit içeriği 20 g/L glukoz içeren besiyerinde tespit edilirken farklı glukoz konsantrasyonlarında benzer kuru biyokütle değerleri elde edildi (Şekil 4.13). Glukoz konsantrasyonlarındaki artış mayaların lipit sentezini olumsuz yönde etkilemiştir. Lipit sentezinde azot/karbon oranı oldukça önemlidir. Lin ve arkadaşları (2011) *Lipomyces starkeyi* mayasının 40-180 g/L arasında değişen konsantrasyonlarda glukoz bulunan besiyerindeki lipit biriktirme kapasitesini araştırdıkları çalışmada, en yüksek glukoz konsantrasyonunda (180 g/L) biyokütle (9.2 g/L) ve lipit miktarının (5.0 g/L) oldukça düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durumun yüksek glukoz konsantrasyonunun ozmotik basıncı artırmasından kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Lin vd., 2011). Ayrıca lipit üretme besiyerindeki yüksek başlangıç glukoz konsantrasyonunun, lipit birikimi üzerinde inhibitör etkisi olduğu *Trichosporon fermentans* mayasıyla yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Zhu vd., 2008).



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda glukozun *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

C. lipolytica'nın 20 g/L glukoz içeren besiyerinde en yüksek lipit içeriğine, 30 g/L glukoz bulunan besiyerinde ise en yüksek kuru biyokütle değerine ulaştığı tespit edildi (Şekil 4.14). Li ve arkadaşları (2007) *Rhodosporidium toruloides* Y4 mayasının farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyerindeki lipit biriktirme kapasitesini araştırdıkları çalışmada, 120 g/L glukoz bulunan besiyerinde lipit veriminin (8.63 g/L) ve biyokütle değerinin (18.6 g/L) en yüksek olduğunu ancak glukoz miktarının 200 g/L'ye çıkarıldığında lipit veriminin (8.6 g/L) ve biyokütle değerinin (18 g/L) düşme eğilimine girdiğini rapor etmişlerdir. Bu düşüşün glukozun sınırlayıcı etkisinden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Li vd., 2007).



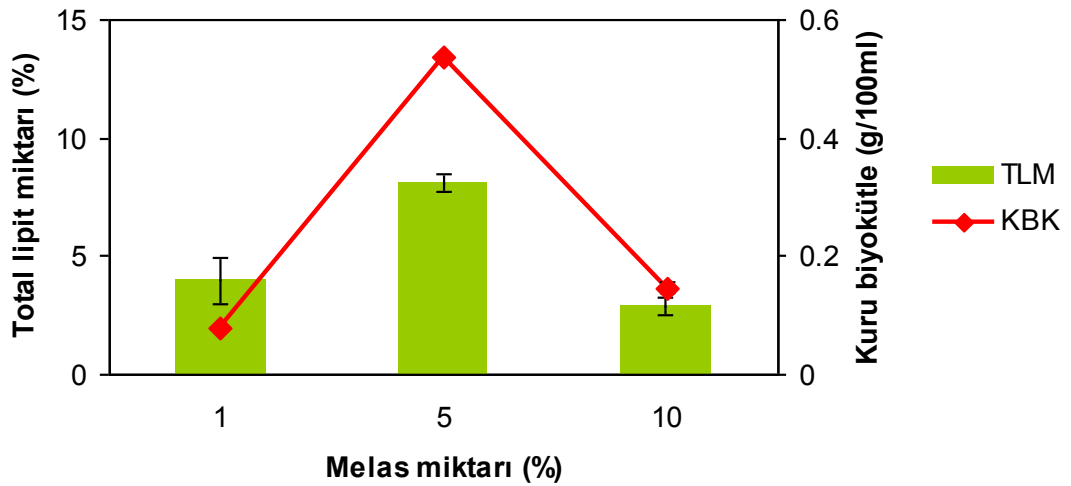
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda glukozun *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

4.4. Bazı Doğal Hammaddelerin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi

4.4.1. Melas Miktarının Lipit Birikimi ve Biyokütle Üzerine Etkisi

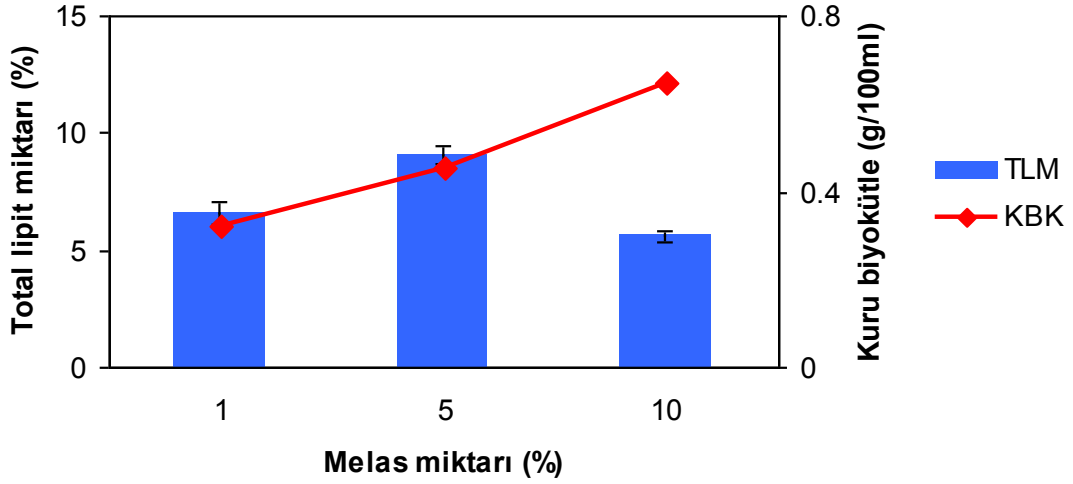
Lipit üretim besiyeri olarak melasın kullanıldığı çalışmada melas miktarının etkisini test etmek üzere iki farklı ortam hazırlandı. Birinci ortamda % 1, % 5 ve % 10'luk melas ve iz element karışımı bulunurken ikinci ortamda melas ve iz element karışımına ek olarak 2 g/L NH₄Cl besiyerine ilave edilmiştir.

R. glutinis'in % 5'lik melas kullanılan besiyerinde en yüksek lipit içeriğine ve kuru biyokütle değerine ulaştığı tespit edildi (Şekil 4.15). Cheirslip ve arkadaşları (2011) farklı konsantrasyonlarda melas kullanarak *R. glutinis* mayası ve *Chlorella vulgaris* mikroalginin lipit üretme kapasitelerini araştırdıkları çalışmada, melas oranı % 5'ten % 10'a çıkarıldığında mikroorganizmaların biyokütlelerinde ve lipit birikimlerinde hızlı bir düşüş olduğunu rapor etmişlerdir (Cheirslip vd., 2011). % 5 melas içeren ortamda en yüksek lipit birikimi ve biyokütle değişimi elde edilmesine rağmen, bu sonuçlar *R. glutinis*'in standart lipit üretim besiyerinde üretildiğinde elde edilen sonuçlardan oldukça düşük olmuştur. Bunun nedeni olarak da ortamda inorganik azot kaynağının olmaması gösterilebilir. *Rhodotorula mucilaginosa*'nın üretildiği melaslı besiyerine de 1 g/L (NH₄)₂SO₄ ilave edilmiştir (Karatay ve Dönmez, 2010). Bu nedenden dolayı çalışmamızda melas ve iz element karışımı içeren besiyerine 2 g/L NH₄Cl ilave edilmiştir.



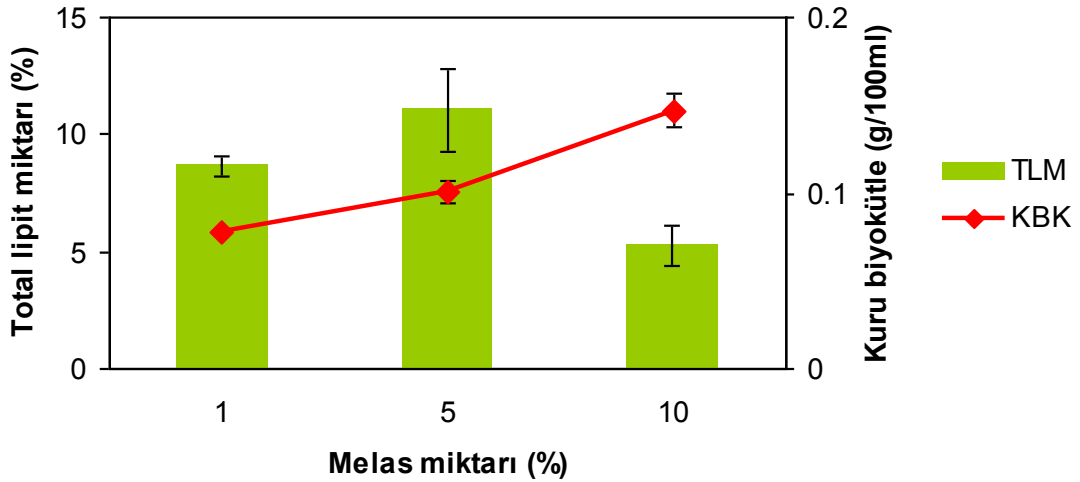
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda melasın *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

% 5'lik melas içeren amonyum klorürsüz ortamda lipit miktarı % 8.1±0.37 olurken amonyum klorür ortama ilave edildiğinde bu oran çok az artarak % 9.1±0.41 oldu. NH₄Cl ilavesi mayanın lipit biriktirme kapasitesi üzerinde fazla etkili olmadı. Fakat özellikle % 10'luk melas içeren ortamda, NH₄Cl'ün biyokütle artışına sebep olduğu tespit edildi (Şekil 4.16).



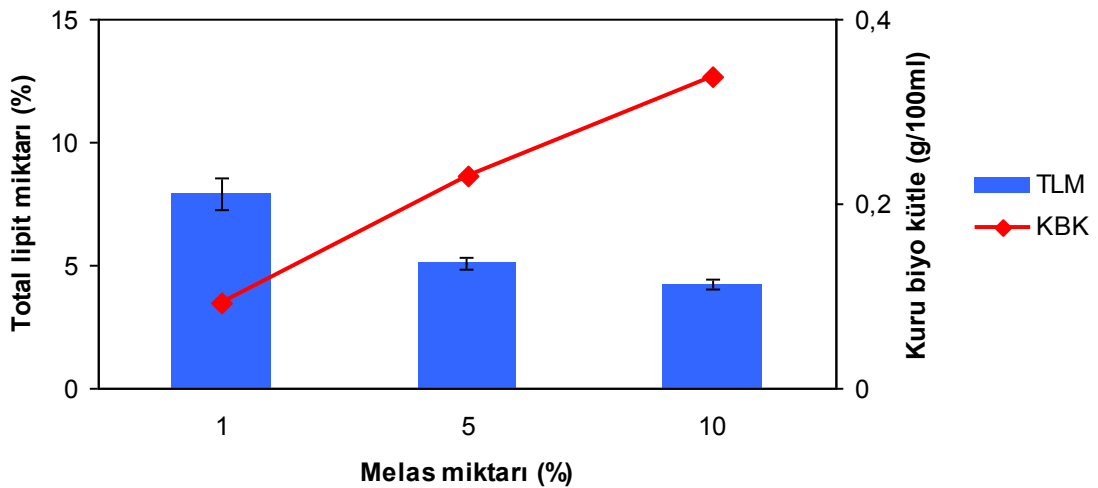
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda melas ve 2 g/L NH₄Cl'ün *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

C.lipolytica maya hücrelerinin % 5' lik melas içeren besiyerinde en yüksek lipit (% 11.1±1.74) üretme kapasitesine, % 10'luk melas bulunan besiyerinde ise en yüksek biyokütle (0.15±0.01 g/100 ml) değerlerine ulaştığı gözlemlendi. % 5 oranında melas bulunan besiyerinde *C. lipolytica*'nın lipit içeriğinin *R. glutinis*'in lipit içeriğinden (% 8.1±0.37) daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlarda melasın *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Melas içeriğine ek olarak lipit üretim besiyerine 2 g/L NH₄Cl ilave edilen ortamda, *C. lipolytica*'da % 1'lik melas içeren besiyerinde en yüksek lipit içeriği (% 7.9±0.62) elde edildi. Melas konsantrasyonunun artışına bağlı olarak lipit içeriği hızlı bir şekilde düştü. Buna rağmen biyokütle değerleri yükseldi (Şekil 4.18). Karatay ve Dönmez (2010) farklı oranlarda melas (% 6, % 8 ve %10) ve (NH₄)₂SO₄'ın bazı oleaginous mikroorganizmaların lipit birikimleri ve biyokütle gelişimleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada *C. lipolytica*'nın % 8 melas ve 1 g/L (NH₄)₂SO₄ bulunan besiyerinde en yüksek lipit içeriğine (% 59.9) ulaştığını ancak % 10'luk melas içeren besiyerinde lipit içeriğinin (% 32.1) düştüğünü bildirmişlerdir. Bunun sebebinin, Karatay ve Dönmez'e göre yüksek oranda melasın hücreler üzerindeki toksik etkisi olduğu ifade edilmiştir (Karatay ve Dönmez, 2011). Benzer sonuçlar Wu ve arkadaşları (2011) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar, ayrıca melaslı ortamda sentezlenen yağ asidi içeriğinin de, azot sınırlı ortamda sentezlenen yağ asidi içeriği ile benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir (Wu vd., 2011).



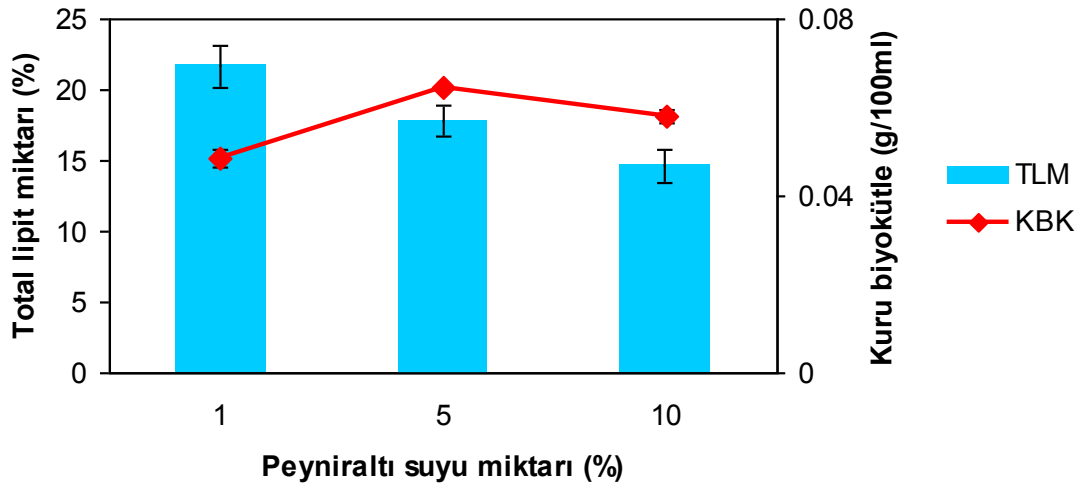
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda melas ve 2 g/L NH₄Cl'ün *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

Başlangıç pH'sı 5 olan melaslı ortamların 4 günlük inkübasyon sonrasında pH'larının 7-8 aralığında olduğu yani yükseldiği tespit edildi. Bölüm 4.1.4'de açıklanan sonuçlara göre başlangıç besiyeri pH'sı lipit üretiminde oldukça önemlidir. Melaslı ortamlarda pH'nın metabolik faaliyetler sonucunda artması lipit sentezini sınırlamıştır.

4.4.2. Peyniraltı Suyunun Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi

Çalışmada % 1, % 5 ve % 10'luk (v/v), peyniraltı suyu, iz element karışımı ve 30 g/L glukoz içeren lipit üretim besiyerleri kullanıldı. Laktozun karbon kaynağı olarak kullanılması glukozu göre daha zor olduğu için çalışmamızda biyokütle artışını sağlamak üzere ortama glukoz ilave edildi.

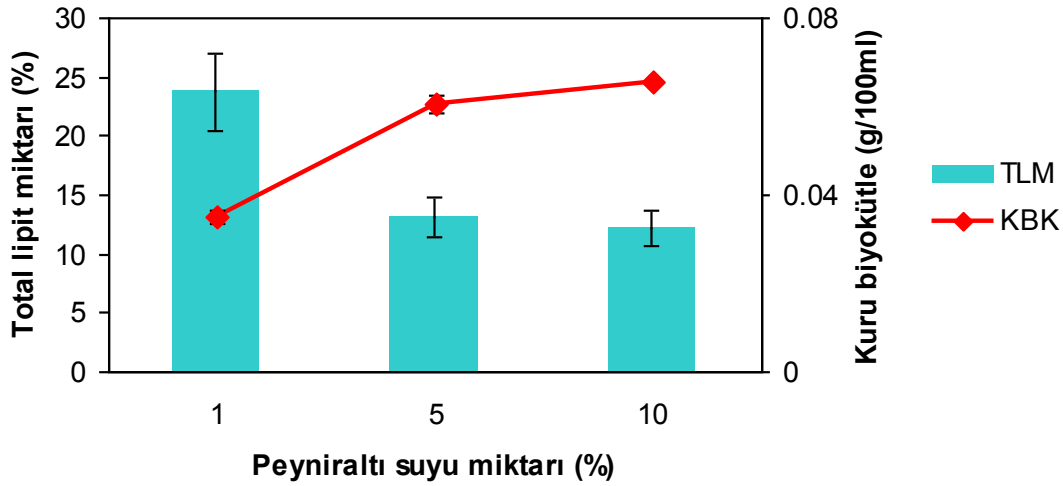
R. glutinis'in % 1'lik peyniraltı suyu içeren besiyerinde en yüksek lipit içeriği (% 21.65±1.48) tespit edildi (Şekil 4.19). Peynir altı sulu ortamda elde edilen lipit içeriği, zenginleştirilmiş besiyerlerinde elde edilen lipit içeriği değerine (% 29.53±0.46) yakın olmuştur. Son dönemlere kadar yapılan çalışmalarda, peynir altı suyu içerisindeki laktozun oleaginous mikroorganizmalar için uygun karbon kaynağı olamayacağı belirtilirken günümüzde ise laktozun ve laktoz içeren peynir altı suyunun tek hücre yağı üretiminde glikoz ve nişasta içeren besiyerleri gibi kullanılabilmesi rapor edilmiştir. Peynir altı suyu azot sınırlı bir ortam olduğundan oleaginous mikroorganizmalarda lipit birikimi için alternatif bir besiyeri olmuştur (Vamvakaki vd. 2010).



Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyunun *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

C. lipolytica'nın % 1'lik peynir altı suyu bulunan besiyerinde lipit içeriğinin (% 23.8±3.29) olduğu tespit edildi (Şekil 4.20). Bu maya türünde de peynir altı sulu ortamda elde edilen lipit içeriği, standart lipit üretim besiyerinde elde edilen lipit içeriği değerine yakın olmuştur. Vamvakaki vd. (2010) peynir altı suyunun, *Thamnidium elegans* ve *Mucor sp.* fungus türlerinin lipit birikimi ve biyokütle

gelişimleri üzerine etkisini test ettikleri çalışmada, bu türlerin laktozu direkt kullanmadığını belirtmişlerdir. Laktoz tüketimini kolaylaştırmak için ortama $(NH_4)_2SO_4$ ilave ettiklerini rapor etmişlerdir (Vamvakaki vd., 2010).



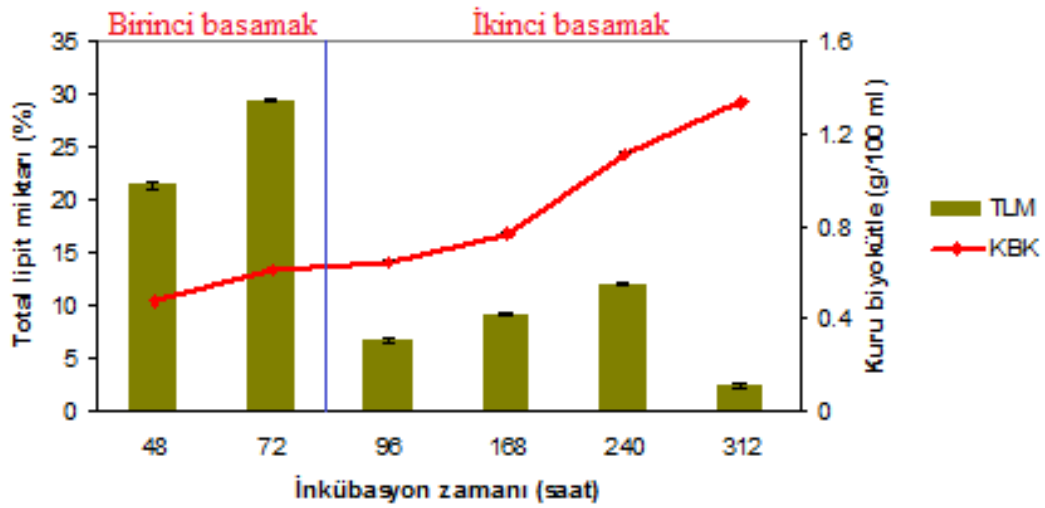
Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyunun *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, inkübasyon süresi: 4 gün, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

4.5. İki Basamaklı Fermentasyon Yönteminin Biyokütle Değişimi ve Lipit Birikimi Üzerine Etkisi

Yüksek oranda lipit birikimini sağlamak üzere üç farklı kültür sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır: kesikli, kesikli-beslemeli ve sürekli sistem literatürdeki çalışmalar incelendiğinde en çok tercih edilen kültür tipinin kesikli sistem olduğu görülmüştür (Beopoulos vd., 2009a). Kesikli sistemde mayalarda en yüksek lipit içeriğine ulaşıldıktan sonra ortamdaki karbon tükenip sitrik asit gibi ara metabolitler üretilmeye başladığı zaman sentezlenmiş depo lipit hücre çoğalması için yıkılmaktadır. Bu yüzden lipit içeriği hızla düşerken biyokütle artışı devam etmektedir. Ortamda, dışsal (eksternal) azot miktarı az olmasına rağmen AMP-dehidrogenaz enziminin etkisiyle içsel (internal) azot miktarı yüksek olduğundan hücre çoğalması olmaktadır. Lipit üretimi sırasında yukarıda belirtilen durumların önüne geçmek için kesikli üretim sistemi, birinci ve ikinci aşamasında farklı besiyerlerinin kullanıldığı iki basamaklı fermentasyon yöntemine dönüştürüldü. İki basamaklı fermentasyon yönteminin amacı birinci basamakta biyokütle artışı ve lipit biyosentezini sağlamaktır. İkinci basamakta sadece 40 g/L glukoz içeren azot

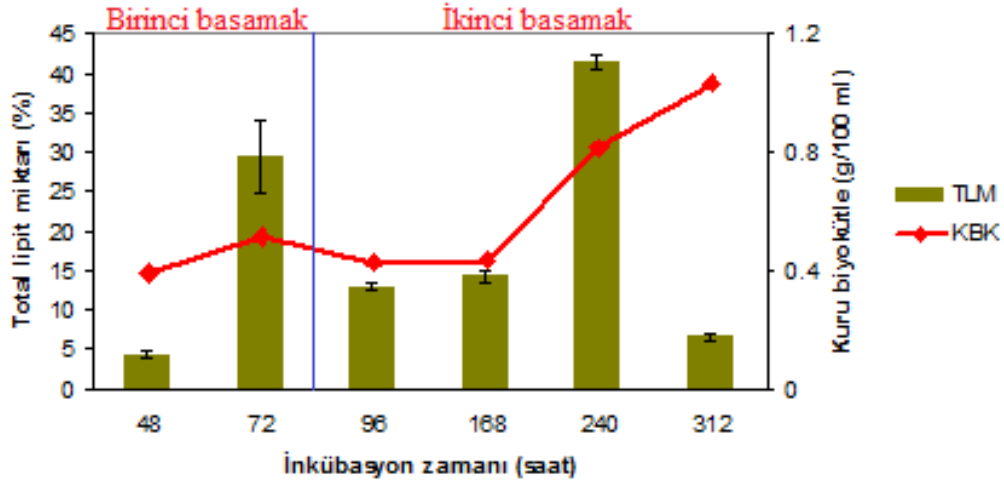
sınırlı ortamda, biyokütle artışını sınırlayarak lipit biyosentezinin tetiklenmesi hedeflenmiştir.

Lipit üretim besiyerinde 72 saat üretilen mayalar, 72 saat sonunda başlangıç pH'sı 5 olan 40 g/L glukoz içeren yeni lipit üretim besiyerine aseptik koşullarda aktarılmıştır. Kültürler ikinci üretim aşamasında 30°C ve 150 rpm'de 312 saat boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyonun 96., 168., 240. ve 312. saatlerinde biyokütle ve lipit analizi yapılmıştır. Fermentasyonun ilk basamağında (72. saatte) en yüksek lipit içeriğine ulaşıldıktan sonra *R. glutinis* maya hücreleri karbonca zengin ortama alındığı zaman lipit içeriğinde beklenen artış olmamıştır (Şekil 4.21). Fermentasyonun ikinci basamağında (240. saatte) en yüksek lipit içeriği (% 12.01±0.29) ilk basamaktan daha az olmuştur. Buna rağmen fermentasyonun ikinci basamağında *R. glutinis*'in biyokütle artışı devam etmiştir.



Şekil 4.21. İki basamaklı fermentasyon yönteminin *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi. Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

R. glutinis'de iki basamaklı fermentasyon yöntemi ile beklenen sonuçlar elde edilemezken, *C. lipolytica*'da fermentasyonun ikinci basamağında şimdiye kadar elde edilen en yüksek lipit içeriğine (% 41,6±0.1) ulaşıldı (Şekil 4.22). Lin vd (2011) *Lipomyces starkeyi* ile iki basamaklı fermentasyon yönteminde glukoz dışında ekstra besin içermeyen ikinci ortamda yüksek lipit verimi elde etmişlerdir (Lin vd., 2011).



Şekil 4.22. İki basamaklı fermentasyon yönteminin *C. lipolytica*'nın biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5.

4.6. Maya Hücrelerinde Sentezlenen Yağ Asitlerinin Dağılımı

Optimum koşullarda standart lipit üretim besiyerinde üretilen *R. glutinis* hücrelerinden ekstre edilen lipitlerin yağ asidi içeriği tespit edildi. *R. glutinis*'in sentezlediği yağ asitlerinin yoğun olarak uzun zincirli, doymuş ve doymamış yağ asitlerinden meydana geldiği saptandı (Çizelge 4.5). Cheirslip ve arkadaşları (2011) *R. glutinis*'ten ekstre ettikleri yağlarda gözlenen başlıca yağ asitlerinin palmitik, oleik, stearik ve linoleik asitten oluştuğunu ve doymamış yağ asidi içeriğinin biyodizel üretimi için hammadde olarak uygun olduğunu bildirmişlerdir (Cheirslip vd., 2011).

İki basamaklı fermentasyon yönteminde üretilen *C. lipolytica* hücrelerinden ekstre edilen yağ asidi içeriği tespit edilmiştir. *C. lipolytica*'dan ekstre edilen yağlarda yoğun olarak uzun zincirli, doymuş ve doymamış yağ asitlerinin bulunduğu saptandı (Çizelge 4.5). Benzer sonuçlar, Karatay ve Dönmez (2010) tarafından *C. lipolytica* kullanılarak yürütülen çalışma sonucunda elde edilmiştir. Maya hücreleri tarafından sentezlenen yağ asitlerinin daha çok palmitik (C 16:0) ve stearik (C 18:0) asit gibi doymuş yağ asitlerinden oluştuğunu bildirmişlerdir (Karatay ve Dönmez, 2010).

Çizelge 4.5. *R. glutinis* ve *C. lipolytica* hücrelerinde biriktirilen lipidlerin yağ asidi içeriği.

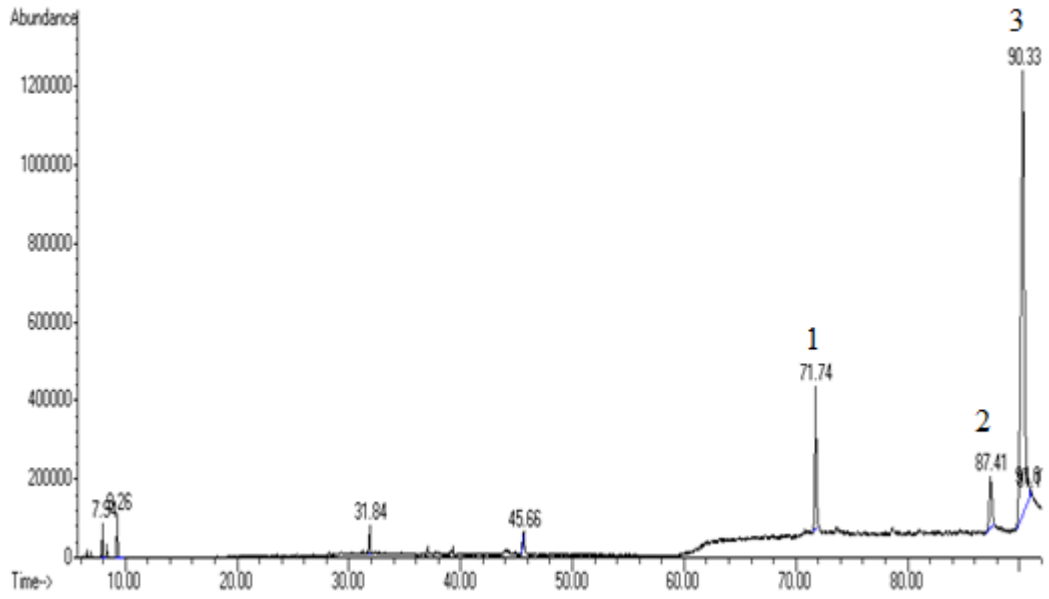
Yağ asitleri	<i>R. glutinis</i>	<i>C. lipolytica</i>
Caprik asit (C 10:0)	+	-
Miristik asit (C 14:0)	-	+
Pentadekonik asit (C 15:0)	-	+
Palmitik asit (C 16:0)	+	+
Palmitoleik asit (C 16:1)	-	+
Heptadekanoik asit (C 17:1)	+	-
Stearik asit (C 18:0)	+	-
Oleik asit (C 18:1n9c)	+	+
Linoleik asit (C 18:2n6c)	-	+

4.7. Transesterifikasyon Sonrası Elde Edilen Yağ Asidi Metil Esterleri Dağılımı

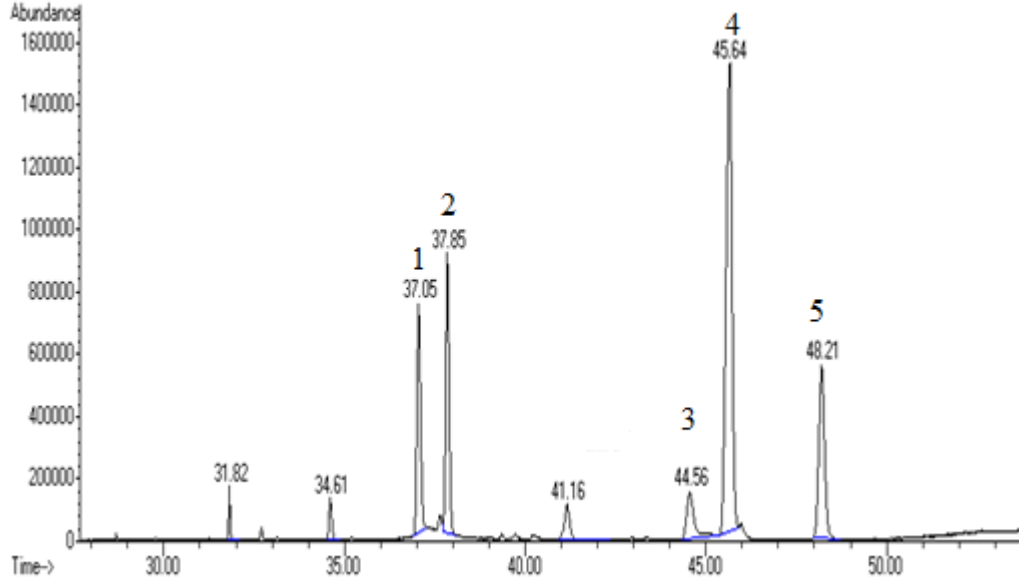
Bölüm 4.6’da belirtilen ortamlardan ekstre edilen lipidlerin transesterifikasyonu sonucu elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile belirlendi (Şekil 4.23-24). *R. glutinis* ve *C. lipolytica* hücrelerinden ekstre edilen lipidlerin transesterifikasyonu sonucunda sırasıyla % 80.65 ve % 79 oranında biyodizel verimi elde edildi (Çizelge 4.6). *R. glutinis*’ten en yüksek oranda elde edilen yağ asidi metil esterleri stearik (C 18:0) ve oleik asit (C 18:1) olup oranları sırasıyla % 35.43 ve % 32.93’tür. Dai ve arkadaşları (2007) *R. glutinis* hücrelerinden elde edilen yağın transesterifikasyonu sonucunda % 81.7 biyodizel verimine ulaştıklarını rapor etmişlerdir. Yağ asidi metil esterleri içerikleri ve verimleri sırasıyla, miristik (C 14:0), % 1.29; palmitik (C 16:0), % 18.74; stearik (C 18:0), % 1.16; oleik (C 18:1), % 66.96; linoleik asit (C 18:2), % 4.57 olduğu bildirilmiştir (Dai vd., 2007). *C. lipolytica*’da tespit edilen en yüksek metil ester oranı palmitik asitle (C 16:0) % 38.9’dur. Karatay ve Dönmez (2010) melashı ortamda üretilen *C. lipolytica*’nın yağ asidi metil ester veriminin % 84.9 olduğunu rapor etmişlerdir (Karatay ve Dönmez, 2010).

Çizelge 4.6. *R. glutinis* ve *C. lipolytica*'dan ekstre edilen yağ asitlerinin transesterifikasyonu sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı.

Yağ asidi metil esterleri (%)	<i>R. glutinis</i>	<i>C. lipolytica</i>
Miristik asit (C 14:0)	---	0.06
Palmitik asit (C 16:0)	10.77	38.9
Palmitoleik asit (C 16:1)	---	3.99
Heptadekanoik asit (C 17:1)	1.52	---
Stearik asit (C 18:0)	35.43	8.12
Oleik asit (C 18:1n9c)	32.93	18.1
Linoleik asit (C 18:2n6c)	---	9.89
Toplam C 16 ve C 18 metil ester verimi (%)	80.65	79



Şekil 4.23. Yağ asidi metil esterlerinin (*R. glutinis*) gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazındaki analiz sonuçları. 1: Palmitik asit, 2: Stearik asit, 3: Oleik asit.



Şekil 4.24. Yağ asidi metil esterlerinin (*C. lipolytica*) gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazındaki analiz sonuçları. 1: Palmitik asit, 2: Palmitoleik asit, 3: Stearik asit, 4: Oleik asit, 5: Linolenik asit.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada kullanılabilir fosil yakıt kaynakları, insan nüfusunun ve endüstrileşmenin artmasına bağlı olarak hızla azalmaktadır. Mevcut petrol rezervleri 2010 yılından itibaren, yılda % 2-3 arasında azalma göstermektedir (Azocar vd., 2010). Enerji isteğinin ve dünya enerji tüketiminin 2007 yılından 2035 yılına kadar olan süreçte % 49 oranında artacağı tahmin edilmesi ve mevcut fosil yakıtlarının tükenmeye başlaması, yeni ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilen alternatif enerji üretimini zorunlu hale getirmektedir (Shi vd., 2011). Yenilenebilir enerji kaynaklarının en önemlilerinden biri biyodizeldir.

Biyodizel, yenilenebilir biyokütleden elde edilen triaçilgliserollerin veya serbest yağ asitlerinin kısa zincirli alkollerle transesterifikasyonu sonucu yağ asidi metil veya etil esteri şeklinde üretilmektedir. Oleaginous mikroorganizmalar tarafından sentezlenen mikrobiyal lipitler biyodizel üretiminde alternatif bir hammadde kaynağı olabilmektedir. Biyokütlesinin % 20'sinden fazla yağ biriktiren oleaginous mikroorganizmalar arasında bazı fungus, bakteri ve mikroalg türleri bulunmaktadır.

Oleaginous mikroorganizmalarda kültür koşulları ve besiyeri içeriği, üretilen yağ miktarı üzerinde etkili olmaktadır. Bundan dolayı uzun süren optimizasyon çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır. Fakat optimum koşullar elde edildikten sonra, ucuz ve doğal karbon kaynakları kullanılarak yağ elde edilebildiğinden biyodizel maliyetleri düşürülebilmektedir.

Maya miktarının ve inkübasyon süresinin biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisinin araştırılması çalışmalarında, ekim miktarının ve inkübasyon süresinin biyokütle değişimi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Her iki maya türünde de inkübasyonun 4. gününde ve besiyerine % 5 (v/v) ekim yapıldığında en yüksek lipit miktarı elde edilmiştir.

Farklı ortam sıcaklıklarının, mayaların biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerinde etkili olduğu saptandı. *R. glutinis* ve *C. lipolytica*'da en yüksek kuru biyokütle değeri ve lipit birikimi 30°C'de elde edildi. Elde edilen sonuçlara göre, yüksek sıcaklıklarda (35-40°C) hem hücre gelişimi sağlanamamış hem de lipit sentezi gerçekleştirilememiştir.

Farklı çalkalama hızlarında, *C. lipolytica* ve *R. glutinis* benzer özellikler göstererek, mayaların 150 rpm’de lipit içeriği en yüksek değere ulaşmıştır. 200 rpm’de lipit birikimlerinin çarpıcı bir şekilde düştüğü ancak biyokütle değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.

Başlangıç pH’sındaki değişimin *R. glutinis* ve *C. lipolytica*’nın lipit biyosentezini önemli oranda etkilediği gözlenmiştir. En yüksek biyokütle miktarı ve lipit birikimi besiyeri başlangıç pH’sının 5 olduğu kültür koşullarında tespit edilmiştir.

Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı çalışmalar sırasında, lipit üretim besiyerinde bulunan pepton ve maya özütü organik azot kaynağı olarak, NH_4Cl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ise inorganik azot kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda lipit üretim besiyerine ilave edilmiştir. Her iki maya türünde de organik azot kaynaklarının yanısıra lipit üretim besiyerine artan oranlarda (8 ve 12 g/L) NH_4Cl ilave edilmesi biyokütlede artışa neden olurken lipit birikiminde hızlı bir düşüşe sebep olduğu tespit edildi. Azot bakımından zengin olan bu ortamların, hücre artışını teşvik edip lipit biyosentezini sınırlaması literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla paralellik gösterdi.

R. glutinis ve *C. lipolytica*’da pepton ve maya özütü bulunmayan lipit üretim besiyerinde, NH_4Cl miktarında artış yapılmasına rağmen standart lipit üretim besiyerine göre daha düşük lipit içeriği belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre bu maya türlerinin lipit biyosentezi için organik ve inorganik azot kaynaklarına ihtiyaç duydukları tespit edildi. Organik azot kaynaklarına ek olarak 4, 8 ve 12 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılan çalışmalarda, her iki maya türünde de en yüksek lipit içeriği 4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerinde gözlenirken en yüksek kuru biyokütle 12 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerinde tespit edildi. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarındaki artışın lipit birikimini olumsuz yönde etkilediği saptandı. Organik azotun lipit birikimini ve biyokütle artışına sebep olurken, inorganik azotun biyokütle artışında daha etkili olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, NH_4Cl içeren besiyerinde tespit edilen lipit içeriği ve kuru biyokütle miktarı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besiyerinde tespit edilenlere göre daha yüksek olmuştur. Her iki maya türü de inorganik azot kaynağı olarak NH_4Cl ’ü tercih etmiştir.

Lipit üretim besiyerine 20, 30 ve 40 g/L glukoz ilave edilen çalışmalarda, *R. glutinis* ve *C. lipolytica*’da en yüksek lipit oranı 20 g/L glukoz içeren besiyerinde

tespit edilirken farklı glukoz konsantrasyonlarında benzer kuru biyokütle değerleri elde edilmiştir. Glukoz konsantrasyonlarındaki artışın mayaların lipit sentezini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir.

% 5 oranında melas bulunan besiyerinde *C. lipolytica*'nın lipit içeriğinin *R. glutinis*'in lipit içeriğinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Melaslı besiyerine NH₄Cl ilavesinin *R. glutinis* ve *C. lipolytica*'da lipit biriktirme kapasitesi üzerinde fazla etkili olmadığı belirlenmiştir. Yüksek oranda melasın hücreler üzerinde toksik etki gösterebileceği tahmin edilmektedir. Ayrıca melaslı ortamlarda pH değerlerinin yükselmesi lipit sentezini olumsuz yönde etkilemiştir.

Peyniraltı suyu, iz element karışımı ve 30 g/L glukoz içeren lipit üretim besiyerinde, *R. glutinis* ve *C. lipolytica*'nın % 1'lik peyniraltı suyu içeren besiyerinde en yüksek lipit içeriğine ulaştıkları tespit edilmiştir. Kuru biyokütle değerinin ise birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Peynir altı suyu azot sınırlı bir ortam olduğundan oleaginous mikroorganizmalarda lipit birikimi için alternatif bir besiyeri olabileceği görülmüştür.

R. glutinis'de iki basamaklı fermentasyon yöntemi ile beklenen sonuçlar elde edilemezken, *C. lipolytica*'da fermentasyonun ikinci basamağında çalışmalarımız sırasında elde edilen en yüksek lipit içeriğine (% 41.6±0.1) ulaşılmıştır. İki basamaklı fermentasyon yönteminde çeşitli parametreler değiştirilerek lipit içeriğinin arttırılabileceği görülmüştür.

R. glutinis ve *C. lipolytica* hücrelerinden ekstre edilen uzun zincirli ve doymuş yağ asidi içeren mikrobiyal lipitler, bitkisel yağ asidi içeriği ile benzerlik göstermektedir. Sonuçlarımıza göre *C. lipolytica* ve *R. glutinis*'in ürettikleri lipitler biyodizel üretimi için ideal hammadde olabilmıştır. Mayalardan ekstre edilen lipitler transesterifiye edildiğinde *R. glutinis*'in ve *C. lipolytica*'nın biyodizel verimi sırasıyla % 80.65, % 79 olmuştur. Sonuçlarımıza göre baz ile transesterifikasyon reaksiyonunun başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür.

Muhtemel enerji krizlerinin aşılması amacıyla, biyodizel üretiminde mikrobiyal lipitlerin kullanılması uygun bir yöntem olabilecektir. Bu açıdan mikroorganizmalardan yağ elde edilmesi üretim maliyetlerini azaltabilir. Ancak bu yöntemin geliştirilmesi ve uygulanabilirliğinin arttırılması gerekmektedir. Ülkemizin

dıŖa bağımlı enerji politikasının deđiŖebilmesi için bu alternatif enerji kaynaklarının araŖtırılmasına yönelik alıŖmalar hızlandırılmalı ve desteklenmelidir. Bu tür biyolojik kaynaklardan elde edilen biyodizelin yaygın olarak kullanılabilmesi, olası enerji krizlerini çözmede uygun bir yöntem olabilecektir. alıŖma sonuçlarımız, önerdiğimiz yöntemin ek alıŖmalarla ileri dönemlerde endüstriyel boyutta uygulanabilir duruma getirilebileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- 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.
- Alvarez, H., Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 367-376.
- Altınışık, M. (2013). www.mustafaaltinisik.org.uk.
- Aksu, Z., Eren, A.T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process. Biochem.* **40**, 2985-2991.
- Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H.J., Navia, R. (2010). Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Appl Microbiol Biotechnol.* **88**, 621-636.
- Baarjee, A., Chakraborty, R. (2009). Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production. *Conserv and Recycling.* **53**, 490-497.
- Beer, L., Boyd, E., Peters, J., Posewitz, M. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 264-271.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribealarea, J.L., Molina-Jouve, C., Nicaud, J.M. (2009a). *Yarrowia lipolytica* as a model for-oil production. *Prog in Lipid Res.* **48**, 375-387.
- Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.M. (2009b). *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochem.* **91:6**, 692-696.
- Bhatti, H.N., Hanif, M.A., Qasim, M., Rehman, A. (2008). Biodiesel production from waste tallow. *Fuel.* **87**, 2961-2966.
- Botham, P.A., Ratledge, C. (1979). A Biochemical Explanation for Lipid Accumulation in *Candida* 107 and Other Oleaginous Micro-organisms. *J. G. Microbiol.* **114**, 361-375.
- Burja, A.M., Armenta, R.E., Radianingtyas, H., Barrow, J. (2007). Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium sp.* ONC-T18. *J. Aric. Food. Chem.* **55:12**, 4795-4801.
- Campbell, C. (2006). The Rimini protocol an oil depletion protocol: heading off economic chaos and political conflict during the second half of the age of oil. *Energ Policy.* **34**, 1319-1325.
- Canakci, M. (2007). The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresour. Technol.* **98**, 183-190.

- Carioca, J.O.B. (2010). Biofuels: Problems, challenges and perspectives. *Biotechnol J.* **5**, 260-273.
- Carraretto, C., Macor, A., Mirandola, A., Stoppato, A., Tonon, S. (2004). Biodiesel as alternative fuel: experimental analysis and energetic evaluations. *Energy.* **29**, 2195-2211.
- Cheirsilp, B., Suwannarat, W., Niyomdecha, R. (2011). Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnol.* **28:4**, 362-368.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalga. *Biotechnol Adv.* **25**, 294-306.
- 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.
- Cronan, J.E., Waldrop, G.L. (2002). Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res.* **41**, 407-435.
- Czabany, T., Athenstaedt, K., Daum, G. (2007). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* **17:71**, 299-309.
- Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., Zhang, M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr. J. Biotechnol.* **6:18**, 2130-2134.
- De Miguel, T., Calo, P., Díaz, A., Villa, T. G. (1997) The genus *Rhodospiridium*: a potential source of beta-carotene. *Microbiol.* **13:1**, 67-70.
- Demirbaş, A. (2002). Diesel fuel from vegetable oil via transesterification and soap pyrolysis. *Energy Sources.* **24**, 835-841.
- Demirbaş, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energ Convers Manage.* **50**, 14-34.
- Denli, Y., Tekin, A. (2000). Oil production and microorganisms. *Gıda.* **25:4**, 265-270.
- Di Serio, M., Tesser, R., Pengmei, L., Santacesaria, E. (2008). Heterogeneous catalysts for biodiesel production. *Energy Fuels.* **22:1**, 207-217.
- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, İ., Madani, M. (2012). Bioconversion of different carbon sources in to microbial oil and biodiesel using oleaginous yeast. *J. Biology T. World.* **1:2**, 82-92.
- Enweremadu, C.C., Mbarawa, M.M. (2009). Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil-A review. *Renew. Sust. Energ Rev.* **13**, 2205-2224.
- Evans, C.T., Ratledge, C. (1984). Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeast. *J. G. Microbiol.* **130**, 1693-1704.
- Feiyan, X., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Pro. Biochem.* **41**, 1699-1702.

- Felizardo, P., Correia, M.J.N., Raposo, Í, Mendes, J.F., Berkemeier, R., Bordado, J.M. (2006). Production of biodiesel from waste frying oil. *Waste Manage.* **26:5**, 487-494.
- Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marry, A., Mauersberger, S., Smit, M.S. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential application. *FEMS Yeast Res.* **5**, 527-543.
- Fjerbaek, L., Christensen, K., Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng.* **102**, 1298-1315.
- Formo, M. (1954). Ester reactions of fatty materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **31**, 548-539.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Bio. Bioeng.* **92**, 405-416.
- Gong, Z., Shen, H., Wang, Q., Yang, X., Xie, H., Zhao, Z.K. (2013). Efficient conversion of biomass into lipids by using the simultaneous saccharification and enhanced lipid production process. *Biotechnol. Biofuel.* **6**, 1-36.
- Guschina, Í.A., Harwood, J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* **45**, 160-186.
- Gouda, M., Omar, S., Aouad, L. (2008). Single cell oil production by *Gordonia sp.* DG using agro-industrial wastes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1703-1711.
- Hass, M. (2005). Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock. *Fuel Process Technol.* **86**, 1087-1096.
- Holdsworth, J.E., Ratledge, C. (1988). Lipid turnover in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 339-346.
- Hong-Yong, L., Bo, L., Zong-Bao, Z., Feng-Wu, B. (2006). Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese J. Biotechnol.* **22**, 650-656.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *T. Plant J.* **54**, 621-639.
- Jang, H.D., Lin, Y.Y., Yang, S.S. (2005). Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresour. Technol.* **96:15**, 1633-1644.
- Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Sista, V.R., Yadav, N.K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *W. J. Microbiol.* **8**, 382-384.

- Kaboosi, H., Behbahani, B. (2012). An overview on effective parameters in production of single cell-oil by microorganisms especially the fungus of *Mortierella isabellina*. *Ann.Bio. Res.* **3:3**, 1650-1654.
- 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.
- Kalscheuer, R., Stolting, T., Steinbuchel, A. (2006). Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiol.* **152**, 2529-2536.
- Karatay, S.E., Dönmez, G. (2010). Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Biores. Technol.* **101**, 7988-7990.
- Kerr, R.A. (2007). Climate Chance: Global warming is changing the world. *Science.* **316**, 188-190.
- Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *F. Pro. Technol.* **86**, 1059-1070.
- Knothe, G. (2006). Analyzing biodiesel: standards and other methods. *J AM Oil Chem Soc.* **83**, 823-833.
- 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.
- Kraisintu, P. (2009). Optimization of lipid production by oleaginous yeast. *A Thesis of Master. Kasetsar University. Bangkok.*
- Kraisintu, P., Yongmanitchai, W., Limtong, S. (2010). Selection and optimization for lipid production of a new isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Nat. Sci.* **44**, 436-445.
- Kulkarni, M., Dalai, A. (2006). Waste cooking oils an economical source for biodiesel: a review. *Ind Eng Chem Res.* **45**, 2901-2913.
- Kurosawa, K., Bocazzi, P., Almeida, N.M., Sinskey, A.J. (2010). High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD360 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. *J. Biotechnol.* **147**, 212-218.
- Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* **80**, 749-756.
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 312-317.
- 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.

- Lin, J., Shen, H., Tan, H., Zhang, X., Wu, S., Hu, C., Zhao, Z.K. (2011). Lipid production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *J. Biotechnol.* **152:4**, 184-188.
- 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.
- Liu, B., Zhao, Z. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**, 775-780.
- Lu, X., Vora, H., Khosla, C. (2008). Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production. *Metab. Eng.* **10:6**, 333-339.
- Ma, F., Hanna, M.A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresour. Technol.* **70**, 1-15.
- Mainul, H., Philippe, J.B., Louis, M.G., Alain, P. (1996). Influence of Nitrogen and Iron Limitations on Lipid Production by *Cryptococcus curvatus* Grown in Batch and Fed-batch Culture. *Process Biochem.* **31:4**, 355-361.
- Malisorn, C., Suntornsuk, W. (2008). Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresour. Technol.* **99**, 2281-2287.
- 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.
- Meng, X., Yang, J., Zu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energ.* **34**, 1-5.
- Miao, X., Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* **97**, 841-846.
- Ncbi. (2013). www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T. (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *J. M. Catal. B: Enzymatic.* **43**, 142-147.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeast. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur.J. Sci. Technol.* **113**, 1031-1051.
- 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.
- Peng, X., Cheng, Y. (2008). Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis sp.* *Bioresour. Technol.* **99**, 3885-3889.
- Peralta-Yahya, P.P., Keasling, J.D. (2010). Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnol J.* **5**, 147-162.

- Perez-Lombard, L., Ortiz, J., Pout, C. (2008). A review on buildings energy consumption information. *Energ Build.* **40**, 394-398.
- Phan, A.N., Phan, T.M. (2008). Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel.* **87**, 3490-3496.
- Ratledge, C. (1982). Microbial oils and fats; an assesment of their commercial potential. *Indust. Microbiol.* **16**, 119-206.
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem Soc Trans.* **30**, 1047-1050
- Ratledge, C., Wynn, J.P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* **51**, 1-51.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochem.* **86:11**, 807–815.
- Ratledge, C. (2005). *Single cell oils fort he 21st century*. In: Cohen, Ratlege, editors, Single cell oils. Champaign: AOCS Press. 1-20.
- Saxena, V., Sharma, C.D., Bhagat, S.D., Saini, V.S., Adhikari, D.K. (1998). Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Indian Institute of Petroleum.* **75:4**, 501-505.
- Shay, E.G. (1993). Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunites. *Biomass Bioener.* **4**, 227-242.
- Shi, S., Rodriguez, J., Siewers, V., Nielsen, J. (2011). Prospects for microbial biodiesel production. *Biotechnol. J.* **6**, 277-285.
- Soldi, R.A., Oliveira, A.R.S., Ramos, L.P., Ce'sar-Oliveira, M.A.F. (2009). Soybean oil and beef tallow alcoholysis by acid heterogeneous catalysis. *Appl. Catal. A.* **361**, 42-48.
- Stephanopoulos, G. (2007). Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science.* **315**, 801-804.
- Tang, W., Zhang, S.F., Tan, H.D., Zhao, Z.B.K. (2010). Molecular cloning and characterization of malic enzyme gene from the oleaginous yeast *Lipomyces starkey*. *Mol Biotechnol.* **45**, 121-128.
- Tao, J., Dai, C.C., Yang, Q.Y., Guan, X.Y., Shao, W.L. (2010). Production of biodiesel with acid hydrolysate of *Populus euramevicana* cv leaves by *Rhodotorula glutinis*. *Int. J. Green Energy.* **7**, 387-396.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1171:3**, 255-270.
- Vamvakaki, A.N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M., Papanikolaou, S. (2010). Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Eng. Life Sci.* **10:4**, 348–360.

- Vasudevan, P.T., Fu, B. (2010). Environmentally Sustainable Biofuels: Advances in Biodiesel Research. *Waste Biomass Valor.* **1**, 47-63.
- 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.
- Vincente, G., Martinez, M., Aracil, J. (2007). Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour. Technol.* **92:3**, 951-960.
- Wang, H., Le Dail, M.L., Wache, Y., Laroche, C., Belin, J.M., Nicaud, J.M. (1999). Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Biophys.* **31**, 165-174.
- Woodbine, M. (1995). Microbial fat: microorganisms as potential producers. *Prog. Indust. Microbiol.* **1**, 145-179.
- Wu, H., Li, Y., Chen, L., Zong, M. (2011). Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum*. *Appl. Energ.* **88**, 138-142.
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour. Technol.* **101**, 6124-6129.
- Xiaoling, M., Qingyu, W. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* **97**, 841-846.
- Xue, F., Gao, B., Zhu, Y., Zhang, X., Feng, W., Tan, T. (2010). Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresour. Technol.* **101**, 6092-6095.
- Xue, F., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem.* **41**, 1699-1702.
- Yan, S.L., Salley, S.O., Ng, K.Y.S. (2009). Simultaneous transesterification of unrefined or waste oils over ZnO-La₂O₃ catalysts. *Appl. Catal. A.* **353:2**, 203-212.
- Yen, H.W., Zhang, Z. (2011). Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *J. Bioscience Bioeng.* **112:1**, 71-74.
- Zhang, J. (2011). Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenerg.* **35**, 1906-1911.
- Zhang, J., Fang, X., Zhu, X.L., Li, Y., Xu, H.P., Zhao, B.F., Chen, L., Zhang, X.D. (2011). Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenerg.* **35:5**, 1906 1911.
- Zhang, Y., Adams, L.P., Ratledge, C. (2007). Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5 fold increase in lipid accumulation. *Microbiol.* **153**, 2013-2025.

Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., Zhao, Z.K. (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**: 5, 405–412.

Zhao, X., Wu, S., Shen, H., Wang, Q., Zhao, Z.K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresour. Technol.* **102**, 1803-1807.

Zhu, L.Y., Zhong, M.H., Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour. Technol.* **99**, 7881-7885.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Turgay KANAT

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya, 10.10.1981

E-posta: tkanat@hotmail.com

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Bildiriler:

Yıldırım, S.C., Kanat, T., Yıldırım, İ.H., Oleaginous mikroorganizmalarda mikrobiyal lipid üretimi, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 2012, Antalya.

Seminerler:

Kanat, T., Biyodizelden mikrodizele alternatif enerji kaynaklarının gelişimi, Fen Edebiyat Fakültesi, 2012, Malatya.