

BİYODİZEL ELDESİNDE KULLANILMAK ÜZERE OLEAGİNOUS MAYA HÜCRELERİNDEN FARKLI KÜLTÜR TİPİ VE ORTAMLARDA LİPİT ÜRETİMİ

Seval CİNG YILDIRIM ^{1,*}, Turgay KANAT ¹

¹ Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye

ÖZET

Bu çalışmada oleaginous maya olan *Rhodotorula glutinis*'ten lipit üretimi ve ekstrakte edilen lipitten biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Maksimum lipit üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla başlangıç pH'sı, sıcaklık, çalkalama hızı, farklı karbon ve azot kaynakları gibi çeşitli sistem parametrelerinin etkisi kesikli fermantasyon sisteminde incelenmiştir. Biyodizel üretim maliyetini azaltmak için melas ve peynir altı suyu içeren besiyerleri de test edilmiştir. Ayrıca belirlenen optimum koşullarda iki basamaklı fermantasyon sistemiyle lipit üretilmiştir. Kültür ortamlarından lipit ekstraksiyonu modifiye Bligh ve Dyer yöntemine göre gerçekleştirilmiş ve elde edilen lipitler biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Yağ asidi ve yağ asidi metil esterlerinin analizi gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazında yapılmıştır. En yüksek lipit birikimi % 5 (v/v) ekim oranı ile üretimin 4. günü, 30°C'de, 150 rpm çalkalama hızında ve başlangıç besiyeri pH'sının 5 olduğu optimum koşullarda elde edilmiştir. Bu çalışma sonucunda üretilen maksimum lipit içeriği ve biyodizel verimi sırasıyla % 29.53±0.46 ve % 80.65 olarak tespit edilmiştir. Palmitik asit, oleik asit ve stearik asit içeren lipitlerin, yağ asidi kompozisyonunun biyodizel üretime uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Rhodotorula glutinis*, Lipit, Biyodizel, Sistem parametrelerinin etkisi, Peyniraltı suyu

PRODUCTION OF LIPIDS FROM OLEAGIOUS YEAST CELL IN DIFFERENT CULTURAL TYPES AND MEDIUMS FOR USAGE IN BIODIESEL PRODUCTION

ABSTRACT

In this study, lipid production from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and biodiesel production from the extracted lipid was performed. In order to determine the maximum lipid production conditions, the effect of various system parameters such as initial pH, temperature, agitation rate, different carbon and nitrogen sources has been examined in batch fermentation system. Media containing molasses and cheese whey were also tested to reduce the cost of biodiesel production. In addition, under optimum conditions, lipid was produced with a two-step fermentation system. Lipid was extracted from culture media according to the modified Bligh and Dyer method and lipids obtained were used for biodiesel production. Analysis of fatty acids and fatty acid methyl esters was carried out on the gas chromatograph-mass spectrometer. The maximum lipid accumulation was obtained under optimal conditions with a 5% (v / v) seeding rate on day 4 of production, at 30 ° C, a shaking speed of 150 rpm, and an initial pH of 5. As a result of this study, maximum lipid content and biodiesel production were 29.53 ± 0.46% and 80.65%, respectively. It has been determined that fatty acid composition of lipids containing palmitic acid, oleic acid and stearic acid is suitable for biodiesel production.

Keywords: *Rhodotorula glutinis*, Lipid, Biodiesel, The effect of various system parameters, Cheese whey

1. GİRİŞ

İnsan nüfusunun artmasına paralel olarak ülkelerin enerjiye olan taleplerinin artması, enerji krizlerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır [1]. 2007'den 2035 yılına kadar olan süreçte dünya enerji tüketiminin % 49 oranında artacağı tahmin edilmektedir [2]. Fosil yakıtların kullanımı bu hızda devam ettiği takdirde, yakın bir gelecekte fosil yakıtların tükenmesi muhtemeldir [3]. Enerji krizlerinin aşılmasında petrol türevli yakıtlara alternatif olarak geliştirilen biyolojik yakıt türleri bulunmaktadır.

*Sorumlu Yazar: seval.cing@inonu.edu.tr

Geliş Tarihi: 21 Şubat 2018 Yayın Tarihi: 17 Ağustos 2018

Biyodizel, gelecekte en çok kullanılacağı tahmin edilen biyolojik yakıtlar arasındadır [4]. Biyodizel, yenilenebilir biyokütleden elde edilen triaçilgliserollerin veya serbest yağ asitlerinin kısa zincirli alkollerle transesterifikasyonu sonucu yağ asidi metil veya etil esteri şeklinde üretilir [5]. Biyodizel, eldesinin kolay ve moleküler yapısının günümüz yakıtlarına uygunluğu nedeniyle alternatif bir yakıt olarak kabul görmüştür. Biyodizelin yanma özellikleri, dizel motorlarda kullanılmaya uygundur [6]. 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 [7]. Bu nedenle çevrenin korunması açısından da birçok avantajları bulunmaktadır. Çevre dostu bir yakıt olan biyodizel, ülkelerin petrol ithalatına olan bağımlılığını da azaltmaktadır [8]. Biyodizel üretimi için kullanılan hammaddeler genellikle bitkisel, hayvansal yağlar ve atık kızartma yağları şeklinde çeşitlilik göstermektedir [9]. Bitkisel kökenli biyodizelin fiyatı petrol kaynaklı dizellerle karşılaştırıldığında daha pahalıdır. Buna karşın atık kızartma yağlarının fiyatı bitkisel yağlardan 2-3 kat daha ucuzdur [10]. Ancak atık kızartma yağları yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarından yağ asitlerinde hidroliz, polimerizasyon ve oksidasyon gibi istenmeyen bazı kimyasal ve fiziksel değişimler meydana gelmektedir ve bu da elde edilen biyodizelin kalitesini etkilemektedir [11]. 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 [5, 12]. Biyokütlesinde % 20'den fazla oranda yağ biriktiren oleaginous mikroorganizmalar arasında bazı fungus, maya, bakteri ve mikroalg türleri bulunmaktadır [13]. Mikrobiyal yağlar, bitkisel ve hayvansal yağlarla kıyaslandığında, mikroorganizmaların kısa yaşam döngüsüne sahip olup kolay üretilibilmeleri, daha az iş gücü ve mekan gereksinimi olması, mevsimsel ve iklimsel koşullara ihtiyaç duymamaları açısından daha avantajlı bir şekilde biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilir [14]. Ayrıca mikrobiyal yağlar, yapıları ve yağ asidi bileşiminden dolayı biyodizel uygulamalarında hammadde olarak bitkisel yağlara alternatif olmaktadır [15]. Oleaginous mikroorganizmaların ürettiği yağ asitlerinin ana bileşenleri, soya fasulyesi ve kolza tohumu gibi bitkisel yağların bileşimlerine benzer şekilde 16 veya 18 karbonludur [16]. Kısa sürede üreyen oleaginous mikroorganizmalar tarafından üretilen bu yağlar, mikroorganizmalardan ekstrakte edilerek, kısa zincirli alkollerle transesterifikasyona uğrattılıp, 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 [1].

Bütün mikroorganizmalar lipit sentezleyebilir ancak sadece oleaginous türler önemli miktarda lipiti hücrelerinde triaçilgliserol (TAG) olarak depo ederler. Ayrıca oleaginous mikroorganizmalar yağ asidi biyosentezinin temel birimi olan asetil-KoA'yı yüksek oranda sentezleyebilirler [17]. Mikrobiyal lipit üretimi iki aşamalı bir işlemdir. Birinci aşamada hücrelerin gelişimi için bütün besin elementlerinin bulunduğu, dengeli bir gelişme olmaktadır. Ortamda besin elementleri tükendiği zaman bu aşama sona erer ve lipit üretim aşaması (lipojenik faz) başlar. Bu aşama, ortamda bulunan karbon kaynağı ya da 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 [18].

Diğer taraftan, mikroorganizmaların üreme koşulları (sıcaklık, pH, oksijen miktarı) ve hammadde olarak kullanılan substratlar lipit verimini, üretilen lipitlerin bileşimini ve yağ asidi dağılımlarını etkilemektedir [19]. Bu yüzden parametrelerin etkilerinin incelendiği uzun süren çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Fakat optimum koşullar elde edildikten sonra, ucuz ve doğal karbon kaynakları da kullanılarak, yüksek oranda yağ elde edilebildiğinden biyodizel maliyetleri düşürülebilmektedir. Bu sebeplerden, mayalar, biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak ön plana çıkmaktadır [14].

Bu çalışmada *Rhodotorula glutinis* kullanılarak, öncelikle kesikli süreçte kültür koşullarını etkileyen parametrelerin incelenmesi ve lipit verimi artırımı yapılmıştır. Çalışmada maliyetini azaltmak amacıyla,

melas ve peynir altı suyu içeren besiyerlerinde lipit üretimi sağlanmıştır. Ayrıca iki basamaklı fermantasyon yöntemiyle de lipit üretimi yapılarak verim açısından kültür tipleri karşılaştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Mikroorganizma Temini ve Saklanması

Çalışmada, kırmızı oleaginous mayalardan *Rhodotorula glutinis* kullanıldı. *R. glutinis* Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma laboratuvarından temin edilmiştir [20]. Maya, sabouraud dekstroz agar (SDA) plaklarında 30°C’de, 2-3 gün inkübe edilerek, 4-6 haftada bir taze besiyerlerine aktarılmıştır.

2.2. Kullanılan Besiyeri İçerikleri ve Mikroorganizma Üretimi

Çalışmada iki tip besiyeri kullanılmıştır; stok besiyeri (glukoz, 20 g/L; maya özütü, 10 g/L ve pepton, 10 g/L) ve lipit üretim besiyeri (glukoz, 20 g/L; maya özütü, 5 g/L; pepton, 5 g/L; MgCl₂.6H₂O, 1.5 g/L; NH₄Cl, 4 g/L; Na₂SO₄, 0.02 g/L; KH₂PO₄, g/L ve iz element karışımı). Tüm besiyerlerinin (besiyeri başlangıç pH’sının etkilerin incelendiği çalışmalar hariç) başlangıç pH’sı sterilizasyon öncesinde 5 olarak ayarlanmıştır. SDA ortamında üretilen maya kültüründen, batırma yöntemiyle, 100 mL stok besiyeri içeren 250 mL’lik erlenlere ekim yapılmıştır. Hazırlanan maya kültürü 30°C’de, 150 rpm’de, 1 gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra sıvı maya kültüründen aseptik koşullarda alınan 5 mL kültür, tekrar 100 mL stok besiyeri içeren 250 mL’lik erlenlere ekilmiştir ve aynı koşulda 1 gün süreyle inkübe edilerek lipit üretim besiyerlerine ekilmek üzere hazır hale getirilmiştir.

2.3. Lipit Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresi, Sıcaklık, Çalkalama Hızı ve pH’nin Etkisi

Optimum lipit üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresinin (2., 4.ve 6. gün), sıcaklığın (20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C), çalkalama hızının (50, 100, 150 ve 200 rpm) ve başlangıç besiyeri pH’sının (pH 4, 5, 6 ve 7) oleaginous mayanın biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerine etkisi saptanmıştır. Tüm parametrelerin etkilerinin incelendiği çalışmalarda, 250 mL hacmindeki erlenlerde 100 mL olarak hazırlanmış lipit üretim besiyerlerine % 5 (v/v) oranında maya kültürü ekilmiştir. Tek faktörlü yöntemde, deneyler adım adım ve her adımda yalnızca bir parametre değiştirilerek ve üçerli tekrarlar halinde yapılmıştır.

2.4. Lipit Üretimi Üzerine Karbon ve Azot Kaynağı Etkisi

Lipit üretimi üzerine karbon ve azot kaynağı miktarının etkisini incelemek amacıyla lipit üretim besiyerine ilave edilen (20 g/L) glukoz miktarı artırılmıştır (30 ve 40 g/L). Ayrıca ortama inorganik azot kaynağı olarak ilave edilen NH₄Cl’ün (4 g/L) miktarı da 8 ve 12 g/L’ye yükseltilerek biyokütle değişimi ve lipit birikimi düzeyi araştırılmıştır. Diğer bir inorganik azot kaynağı, (NH₄)₂SO₄ derişimleri 4, 8 ve 12 g/L olmak üzere, ortama ilave edilmiştir. Aynı deneyler, ortamda organik azot kaynakları olmadan da yapılmıştır. 5 mL maya kültürü, 250 mL’lik erlenlerdeki, 100 mL’lik besiyerlerine (başlangıç pH’sı 5) ekilerek 30°C ve 150 rpm’de 4 gün inkübe edilerek 4. gün sonunda biyokütle ve lipit analizi yapılmıştır.

Çalışmanın bu aşamasında lipit üretim besiyeri olarak bazı yenilenebilir substratlar test edilmiştir. Şeker fabrikası yan ürünü olan melası, farklı derişimlerde (% 1, % 5 ve % 10’luk (w/v)) içeren besiyerine iz element karışımı ve 2 g/L NH₄Cl ilave edilmiştir. Ayrıca peynir üretimi sırasında oluşan peynir altı suyunu % 1, % 5 ve % 10 (v/v) derişimlerde içeren, besiyerlerine iz element karışımı ve 20 g/L glukoz ilave edilerek lipit üretim besiyerleri hazırlanıp, sterilizasyon öncesi pH ayarlaması yapılmıştır. 30°C ve 150 rpm’de 4 gün inkübe edilerek 4. gün sonunda biyokütle ve lipit analizi yapılmıştır.

2.5. İki Basamaklı Fermantasyon Sisteminin Lipit Üretimi Üzerine Etkisi

Lipit üretimi üzerine iki basamaklı fermantasyon sisteminin etkisini incelemek üzere lipit üretim besiyerinde yukarıda belirtilen şekilde 72 saat inkübe edilen mayalar, 72 saatin sonunda aseptik koşullarda santrifüj tüplerine alınarak, 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Maya hücreleri, başlangıç pH’sı 5 olan ve sadece 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 edilmiştir.

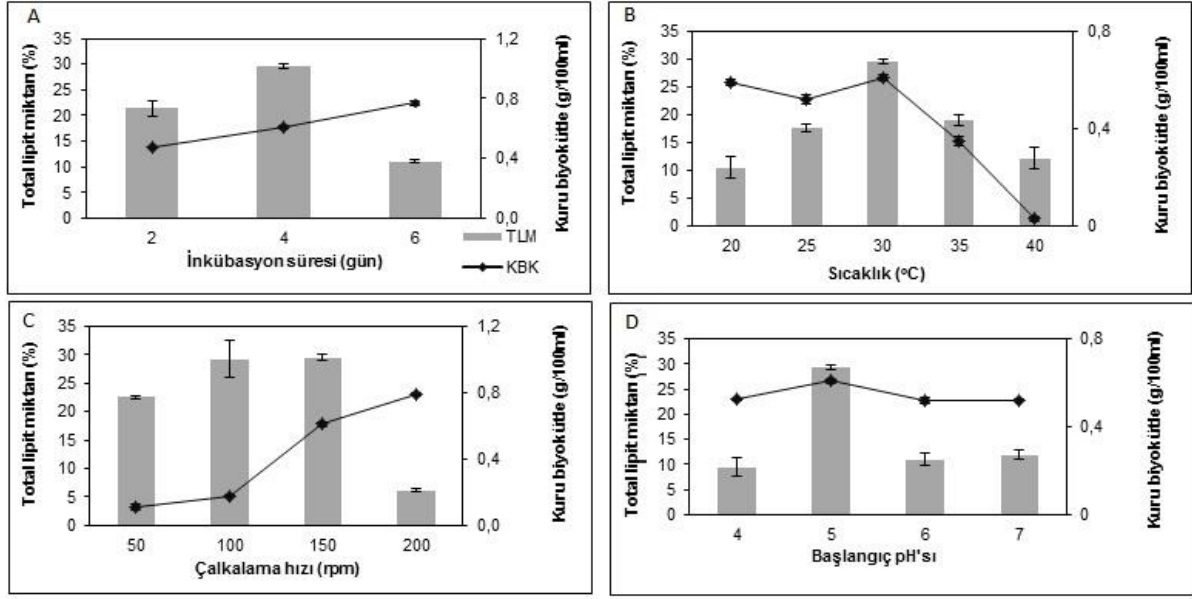
2.6. Analizler

Kuru biyokütle gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Öncelikle 50°C’de pastör fırınında kurutulan boş filtre kağıtları (Whatman No:1, Toyo Advantec, 125 mm çap) 1 saat desikatörde bekletilmiştir. Daha sonra boş filtre kağıtlarının ağırlıkları hassas terazide tespit edilmiştir. Maya kültürleri darası alınmış filtre kağıdından süzümüştür. Filtre üstü maya hücrelerinin ağırlığı yukarıda belirtildiği gibi saptandıktan sonra kuru biyokütle ağırlığı (KBK; g/100mL) olarak ifade edilmiştir. Farklı kültür koşullarında üretilen mayaların sentezledikleri lipitlerin ekstrasyonu modifiye Bligh ve Dyer yöntemine göre yapılmıştır [21]. Ekstrakte edilen total lipit miktarı (lipit içeriği (g/g)) gravimetrik olarak hesaplanmıştır. Hücrelerin toplam lipit miktarı (lipit içeriği), yaş hücre ağırlığına karşılık gelen kuru hücre ağırlığı başına düşen lipit miktarı olarak yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır.

Optimum şartlarda üretilen ve en yüksek lipit verimine ulaşan mayalardan ekstrakte edilen lipitler, ISO-5509,2000 yöntemine göre transesterifiye edilmiştir. 0,1 g lipit, kapaklı santrifüj tüpüne alınarak üzerine 10 ml n-hekzan eklenip kuvvetlice karıştırılmıştır. 0,5 ml 2 N metanollü KOH çözeltisi karışıma eklenerek kuvvetlice karıştırılmıştır. Üst faz belirginleşinceye kadar 2 saat karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Üst fazdan 1mL örnek alınarak gaz kromatografisi-kütle spektrofotometre cihazında yağ asidi esterleri analizi yapılmıştır. Metil esterlerinin analizleri, 6890N Network GC System, 5973 Inert Mass Selective Detector (Agilent Technologies) ve 19091N-136 60 m x 0.250 mm x 0.25µm (HP-INNOWAX) kolonunda 40-260°C’ler arasında He gazı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışmanın ilk aşamasını teşkil eden parametrelerin etkilerinin incelendiği deneylerde öncelikle lipit içeriğinin, inkübasyon süresince en yüksek olduğu gün belirlenmiştir. Lipit üretim besiyerine, 5 ml *R. glutinis* maya kültürü ekildiğinde, lipit içeriğinin 4. gün sonunda % 29.53±0.46 oranıyla en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir. Zamana bağlı olarak kuru biyokütle değerleri, artış gösterirken, total lipit miktarı önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 1A).



Şekil 1. İnkübasyon süresinin (A), farklı sıcaklıkların (B), çalkalama hızlarının (C) ve besiyeri başlangıç pH'sının (D) biyokütle değişimi (g/100 ml) ve toplam lipit miktarı (%) üzerine etkisi (Ekim miktarı: 5 ml/100 ml).

İnkübasyon süresi belirlendikten sonra ortam sıcaklığının lipit verimi üzerine etkisi saptanmıştır. En yüksek kuru biyokütle değeri (0.61 ± 0.01 g/100 mL) ve lipit içeriği 30°C 'de tespit edilmiştir (Şekil 1B). Düşük sıcaklıklarda benzer biyokütle değerleri elde edilirken total lipit miktarı sıcaklık artışına bağlı olarak artmıştır. Üreme sıcaklığı 30°C 'nin üzerine çıktığında biyokütle ve total lipit miktarı hızla azalmıştır. Çalkalama hızının etkisinin saptandığı çalışmada en yüksek kuru biyokütle değeri 200 rpm'de, en yüksek lipit içeriği 150 rpm'de tespit edilmiştir (Şekil 1C). Çalkalama hızındaki artış sonucunda *R. glutinis*'in biyokütlesi ve lipit birikimi artarken, 200 rpm'de lipit birikiminde hızlı bir düşüş, biyokütle miktarında ise artış kaydedilmiştir.

Besiyeri başlangıç pH'sındaki değişimin, *R. glutinis*'in lipit biyosentezini önemli oranda etkilediği tespit edilmiştir (Şekil 1D). En yüksek biyokütle miktarı ve lipit birikimi besiyeri başlangıç pH'sının 5 olduğu kültür şartlarında elde edilmiştir. Sonuçlar, fiziksel parametrelerin optimizasyonu, *R. glutinis* lipit içeriğinin % 9.51'den % 29.53'e ulaştığını göstermiştir.

Oleaginous mikroorganizmalardaki lipit birikiminin karbon kaynağının fazla, azot, fosfor ve kükürt gibi diğer besinlerin sınırlı olduğu ortamlarda yüksek olduğu bilinmektedir. Sadece organik azot kaynaklarının kullanıldığı kontrol grubunda, lipit içeriği % 13.05 ± 0.08 olurken kuru biyokütle miktarı 0.56 ± 0.06 g/100 ml olmuştur. 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. Bu yüzden farklı derişimlerde inorganik azot kaynakları, NH_4Cl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, lipit üretim besiyerine ilave edilmiştir. *R. glutinis*'te artan oranlarda (8 ve 12 g/L) NH_4Cl ilave edilmesi biyokütlerde artışa neden olurken lipit birikiminde hızlı bir düşüşe sebep olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenen tüm besiyerlerinde mayanın lipit üretme kapasitesi en düşük düzeyde kalmıştır. Sülfatça zengin bir ortamın oluşturulması lipit üretimini olumsuz etkilemiştir.

Tablo 1. Farklı derişimlerdeki NH_4Cl 'ün ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın, pepton ve maya özütü içeren ve içermeyen lipit üretim besiyerlerindeki *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipit birikimi (%) üzerine etkisi.

Pepton	Maya Özütü	NH_4Cl (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Lipit içeriği (% w/w)	Kuru biyokütle (g/100mL)
+	+	-	-	13.05 ± 0.08	0.56 ± 0.060

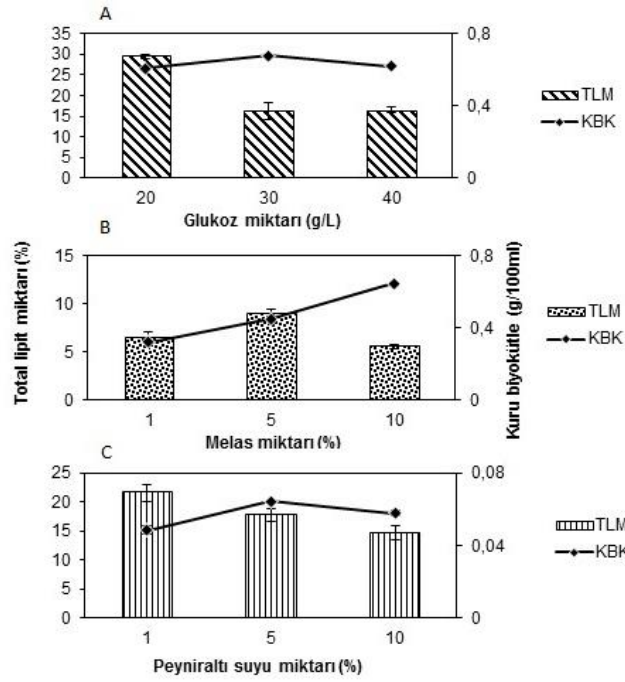
-	-	4	-	11.39 ± 0.127	0.26 ± 0.009
-	-	8	-	9.23 ± 0.771	0.24 ± 0.005
-	-	12	-	16.17 ± 2.559	0.21 ± 0.019
-	-	-	4	8.35 ± 1.301	0.26 ± 0.009
-	-	-	8	14.15 ± 0.778	0.24 ± 0.005
-	-	-	12	6.55 ± 0.778	0.21 ± 0.019
+	+	4	-	29.53 ± 0.459	0.61 ± 0.011
+	+	8	-	7.97 ± 0.931	0.66 ± 0.006
+	+	12	-	6.00 ± 0.856	0.72 ± 0.010
+	+	-	4	9.61 ± 0.917	0.41 ± 0.011
+	+	-	8	7.75 ± 1.358	0.43 ± 0.003
+	+	-	12	4.92 ± 0.827	0.46 ± 0.004

Pepton ve maya özütü bulunmayan, sadece NH₄Cl bulunan lipit üretim besiyerlerinde ise, lipit üretimi yeterince olamamıştır (Tablo 1). NH₄Cl miktarında artış yapılsa da pepton, maya özütü ve minimum seviyede NH₄Cl (4 g/L) içeren ortama göre daha düşük lipit birikimi elde edilmiştir. *R. glutinis* lipit sentezi için az miktarda NH₄Cl'e ihtiyaç duymuştur. Organik azot kaynağının olmadığı durumlarda biyokütle artışı da kaydedilememiştir.

Çalışmanın bu aşamasında lipit üretim besiyerinde mevcut olan glukoz miktarı arttırılarak karbon kaynağı açısından zengin bir ortam hazırlanmıştır. En yüksek lipit içeriği, en düşük derişimde glukoz (20 g/L) içeren besiyerinde tespit edilirken artan glukoz derişimlerinde benzer kuru biyokütle değerleri elde edilmiştir (Şekil 2A). Glukoz miktarındaki artış mayanın lipit sentezini olumsuz yönde etkilemiştir.

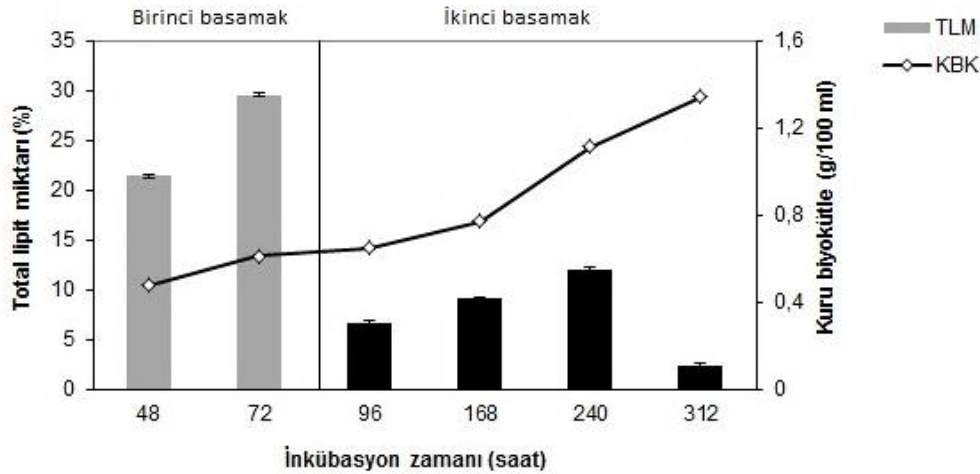
Lipitin, yenilebilir substratlar içeren besiyerlerinde üretimi basamağında ilk olarak farklı derişimlerde sadece melas içeren ortamlar hazırlandığında lipit içeriği % 8.1±0.37 olarak tespit edildi. Melasın içeriğindeki azotlu bileşiklerin, azotça zengin ortam hazırlayamamasından dolayı ortama 2 g/L NH₄Cl ilave edilmiştir. İnorganik azot kaynaklarının, organik olanlara göre daha ucuz olması tercih sebebimiz olmuştur. İz elementler ve NH₄Cl içeren melaslı ortamda lipit içeriği çok az artarak % 9.1±0.41 değerine ulaşmıştır (Şekil 2B). % 10'luk melas içeren ortamda, NH₄Cl'ün biyokütle artışına sebep olduğu tespit edilmiştir. Başlangıç pH'sı 5 olan melaslı ortamların 4 günlük inkübasyon sonrasında pH'larının 7-8 aralığında olduğu yani yükseldiği saptanmıştır. Melaslı ortamlarda pH'nın metabolik faaliyetler sonucunda artması lipit sentezini sınırlamıştır.

R. glutinis'in % 1'lik peyniraltı suyu içeren besiyerinde en yüksek lipit içeriği (% 21.65±1.48) tespit edilmiştir. Peynir altı sulu ortamda elde edilen lipit içeriği, zenginleştirilmiş besiyerlerinde elde edilen lipit içeriği değerine (% 29.53±0.46) yakın olmuştur (Şekil 2C).



Şekil 2. Farklı derişimlerdeki glukozun (A), melasın (B) ve peynir altı suyunun (C) biyokütle değışimi (g/100 ml) ve lipid 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).

Kesikli sistemde mayalarda en yüksek lipid içeriğine ulaşıldıktan sonra ortamdaki karbon tükenip sitrik asit gibi ara metabolitler üretmeye başladığı zaman sentezlenmiş depo lipid hücre çoğalması için yıkılmaktadır. Bu yüzden lipid içeriği hızla düşerken biyokütle artışı devam etmektedir. Ortamda, dışsal (eksternal) azot miktarı az olmasına rağmen AMP-deaminaz enziminin etkisiyle içsel (internal) azot miktarı yüksek olduğundan hücre çoğalması olmaktadır. Lipid üretimi sırasında yukarıda belirtilen durumların önüne geçmek için kesikli üretim sistemi, birinci ve ikinci aşamasında farklı besiyerlerinin kullanıldığı iki basamaklı fermantasyon yöntemine dönüştürülmüştür. İki basamaklı fermantasyon yönteminin birinci basamağında biyokütle artışı ve lipid biyosentezi sağlanmıştır. İkinci basamakta sadece 40 g/L glukoz içeren azot sınırlı ortamda, biyokütle artışını sınırlayarak lipid biyosentezinin tetiklenmesi hedeflenmiştir. Fermantasyonun ilk basamağında (72. saatte) en yüksek lipid içeriğine ulaşıldıktan sonra *R. glutinis* maya hücreleri karbonca zengin ortama alındığı zaman lipid içeriğinde beklenen artış olmamıştır (Şekil 3).



Şekil 3. İki basamaklı fermantasyon yönteminin *R. glutinis*'in biyokütle değişimi (g/100 ml) ve lipid birikimi (%) üzerine etkisi (Ekim miktarı: 5 ml/100 ml, sıcaklık: 30°C, çalkalama hızı: 150 rpm ve başlangıç besiyeri pH'sı: 5).

R. glutinis'den ekstrakte edilen yağlarda yoğun olarak uzun zincirli, doymuş ve doymamış yağ asitlerinin bulunduğu saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. *R. glutinis* hücrelerinde biriktirilen lipidlerin yağ asidi içeriği.

Yağ asitleri	<i>R. glutinis</i>
Kaprik 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)	-

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 (Tablo 3). Bu çalışma sonucunda üretilen maksimum lipid içeriği ve biyodizel verimi sırasıyla % 29.53±0.46 ve % 80.65 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3. *R. glutinis*'den ekstrakte edilen yağ asitlerinin transesterifikasyonu sonrası elde edilen yağ asidi metil esterleri dağılımı.

Yağ asidi metil esteri (%)	<i>R. glutinis</i>
Miristik asit (C 14:0)	----
Palmitik asit (C 16:0)	10.77
Palmitoleik asit (C 16:1)	----
Heptadekanoik asit (C 17:1)	1.52
Stearik asit (C 18:0)	35.43
Oleik asit (C 18:1n9c)	32.93
Linoleik asit (C 18:2n6c)	---
Toplam C 16, C 17 ve C18 metil ester verimi (%)	80.65

4. TARTIŞMA

Dünya çapında gerçekleşen enerji krizleri ve fosil yakıtlardan kaynaklanan çevre kirliliği nedeniyle çevre dostu alternatif enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Alternatif enerji kaynakları arasında biyodizel pek çok olumlu özelliklerinden dolayı ön plana çıkmaktadır. Üstelik biyodizel hammaddesi olarak mikrobiyal lipidler kullanıldığında, bitkisel ve hayvansal lipidlerden kaynaklanan sınırlamalar da aşılmaktadır. Mikrobiyal lipid üretim besiyeri maliyetlerini azaltmaya yönelik çalışmalar da hızla devam etmektedir. Bu çalışmada yüksek lipid üretme kapasitesine sahip olan oleaginous maya, *R. glutinis*'ten ekstrakte edilen lipidlerin transesterifikasyonu sonucunda biyodizel üretilmiştir. Mayanın üretildiği fiziksel ortam şartları ve besiyerleri modifiye edilerek lipid üretim kapasitesi artırılmıştır.

Fiziksel parametrelerin optimizasyonu ile lipid veriminde artış elde edilmiştir. En iyi lipid birikimi % 5 (v/v) ekim oranı ile üretimin 4. günü, 30°C'de, 150 rpm çalkalama hızında ve başlangıç besiyeri pH'sının 5 olduğu optimum koşullarda elde edilmiştir. Monosodyum glutamat atık sulu besiyerine % 5-20 oranında *R. glutinis* mayası ekildiğinde en iyi biyokütle artışı % 12'lik ekim miktarında olmuştur [22]. Wu vd. [23] *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 lipid içeriği 6. günde elde edilirken ilerleyen günlerde

biyokütle değişimi sabit kalmıştır ve lipit içeriğinde azalma olmuştur. Hücre içerisinde biriktirilen lipidin, hücre çoğalması için yıkıldığı rapor edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre ortam sıcaklığının biyokütle değişimi ve lipit birikimi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Asitle hidrolize edilmiş *Populus euramevicana* yapraklarında üretilen *R. glutinis* 28°C’de, % 28.55 oranında lipit biriktirmiştir [24]. Sıcaklık, hücrelerdeki lipit birikimini ve yağ asidi kompozisyonunu da etkilemektedir. *R. glutinis* tarafından sentezlenen yağ asitlerinin, 30°C ve üstü sıcaklıklarda doymuşluk özelliğinin arttığı belirtilmiştir [24]. Sıcaklık parametresinin etkilerinin incelendiği çalışmalarda, yüksek sıcaklıklarda (35-40°C) hem hücre gelişimi sağlanamamış hem de lipit sentezi gerçekleştirilememiştir. Birçok çalışma, yüksek çalkalama hızının, hücre büyümesini ve glukoz tüketimi oranını büyük oranda artıracağını göstermiştir. Bununla birlikte, hızlı hücre büyümesi daha düşük lipit içeriği ile sonuçlanmıştır. Düşük karıştırma oranı, çeşitli oleaginous suşlarda yüksek lipit içeriği ve düşük bir biyokütle konsantrasyonuna yol açmıştır [25, 26].

Besiyeri pH’sı mikrobiyal üreme ve metabolit üretiminde oldukça önemlidir. Ortam pH’sı mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu elementlerin çözünürlük derecesi üzerinde oldukça etkili olup bazı metallerin mikroorganizmalar tarafından kullanılabilirliğini etkilemektedir. Johnson vd. [27] farklı besiyeri başlangıç pH’larının *R. glutinis* mayasının lipit sentezi üzerine etkili olduğunu belirterek, en yüksek lipit içeriğinin pH 4’te elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Lipit birikimi üzerinde karbon-azot (C/N) oranının önemli bir etkisi vardır. Besiyeri modifikasyonlarında farklı azot ve karbon kaynakları ile miktarları test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *R. glutinis* lipit biyosentezi için organik ve inorganik azot kaynaklarına ihtiyaç duymaktadır. *Rhodotorula* 110 mayasının üretildiği ortama hem organik hem de inorganik azot kaynağı ilave edilmiştir [28]. Azot bakımından zengin olan ortamlar oluşturulduğunda, hücre artışının teşvik edilip lipit biyosentezinin sınırlanması literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermiştir [14, 29]. Mikroorganizmaların lipit sentezi için tercih ettikleri azot kaynakları da farklılık göstermektedir. Evans ve arkadaşları [30] *Rhodosporidium toruloides* ile yaptıkları çalışmada azot kaynağı olarak NH₄Cl 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. İnorganik azot kaynağı ortama ilave edilmediği durumlarda da NH₄⁺ miktarı daha az olduğundan yüksek oranda lipit sentezlenememiştir. Sadece oleaginous mayalarda bulunan ATP-sitrat liyaz enzimi NH₄⁺ iyonuna ihtiyaç duymaktadır [31]. Çalışmamızda en yüksek lipit verimi ve biyokütle eldesi ortama pepton, maya özütü ve NH₄Cl eklendiğinde elde edilmiştir. Fakat inorganik azot kaynağı olarak (NH₄)₂SO₄ kullanıldığında sadece azot değil sülfat kaynağı açısından zengin bir ortam oluşturulduğundan lipit içeriği artış gösterememiştir. *Rhodosporidium toruloides* mayasının üretildiği besiyerine, Na₂SO₄ eklendiğinde üretim yüksek biyokütle verimi ile sonuçlanırken lipit verimi yetersiz olmuştur. Yüksek lipit içeriğine ise Na₂SO₄’ın az olduğu veya olmadığı durumlarda ulaşılabilmektedir [30]. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, bu maya türü lipit biyosentezi için organik ve inorganik azot kaynaklarına birlikte ihtiyaç duymaktadır.

Karbon-azot (C/N) oranı, oleaginous mayaların üretimi sırasında lipit birikiminin anahtar belirleyicisidir; yüksek C/N oranı, lipit sentezini teşvik eder [32]. Azot, bu metabolik yolda esansiyel bir elementtir. Ortamdaki azot miktarının azalması protein ve nükleik asit sentezinin yavaşlamasına sebep olurken lipit üretimi artmaktadır. Çünkü oleaginous mayalarda asetil-KoA, azot sınırlaması sonucu, sitozolde biriken sitratın parçalanmasından oluşmaktadır (oleaginous olmayan mayalarda asetil-KoA glikolizden sağlanır). Oleaginous mikroorganizmalarda azot sınırlaması AMP (adenozin monofosfat) deaminazı aktive eder. Böylece azot yokluğu yaşayan hücrelerde intraselüler AMP parçalanır ve IMP (İnosin monofosfat) ve NH₄⁺ oluşur. Mitokondriyal AMP derişimindeki 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 [33]. Sitozolik ATP-sitrat liyaz (ACL), sitratı önce okzaloasetata sonra da asetil-KoA’ya parçalar. Bu reaksiyon oldukça fazla oranda asetil-KoA’nın

lipit sentezi için oluşmasını sağlar. Bu enzim oleaginous olmayan mikroorganizmalarda bulunmaz [31]. İki fazdan oluşan lipit birikiminin ilk fazı, dengeli bir gelişimin gözlemlendiği ve metabolizmanın biyokütle artışına yöneldiği fazdır. Bu fazda hem biyokütle artışı hem de lipit sentezi olmaktadır. Fakat azotça zengin ortamlarda AMP-deaminaz enzimi aktive olmadığından, mitokondride AMP derişimi ve buna bağlı olarak izositrat dehidrogenaz aktivitesi yüksek olmaktadır. Böylece TCA siklusu bloklanmaz ve lipit üretimi gerçekleşmez.

Lipomyces starkeyi mayasının 40-180 g/L arasında değişen derişimlerde glukoz bulunan besiyerindeki lipit biriktirme kapasitesini araştırdıkları çalışmada, en yüksek glukoz derişiminde (180 g/L) biyokütle ve lipit miktarının oldukça düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durumun yüksek glukoz derişiminin ozmotik basıncı arttırmasından kaynaklı olduğu belirtilmiştir [34]. Ayrıca lipit üretme besiyerindeki yüksek başlangıç glukoz derişiminin, lipit birikimi üzerinde inhibitör etkisi olduğu *Trichosporon fermentans* mayasıyla yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir [35].

% 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 düşük olmuştur. Melasın içeriğindeki mevcut azotlu bileşikler yeterli olamamaktadır. *Rhodotorula mucilaginosa*'nın üretildiği melaslı besiyerine de 1 g/L (NH₄)₂SO₄ ilave edilmiştir [36]. Steril edilmeden melas kullanıldığında ilave bir azot kaynağı olarak da amonyum sülfat seçilmiştir. İnorganik azot kaynakları, maya özütü ve pepton gibi organik azot kaynaklarına göre daha ucuzdur [37]. Başlangıç pH'sı 5 olan melaslı ortamların 4 günlük inkübasyon sonrasında pH'larının 7-8 aralığında olduğu yani yükseldiği tespit edildi. Başlangıç besiyeri pH'sı lipit üretiminde oldukça önemlidir. Melaslı ortamlarda pH'nın metabolik faaliyetler sonucunda artması lipit sentezini sınırlamıştır.

Melasın içerdiği azotlu bileşiklerin oranı, maya üremesi veya lipit sentezi için yeterli olmadığından, ortama ek bir azot kaynağı eklenmesi gerekliliği literatürde belirtilmiştir [37]. Ayrıca *Rhodotorula* suşlarının amonyum sülfat varlığında diğer inorganik azot kaynakları ile karşılaştırıldığında daha fazla lipit ürettiği bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, bu genel fenomenin aksine *R. glutinis*'in NH₄Cl varlığında yüksek oranda lipit sentezlebildiğini göstermiştir. Melaslı ortamlar sülfat içerdiğinden, sülfat açısından zengin ortamda lipit üretimi sınırlanmıştır [38]. Bu yüzden inorganik azot kaynağı olarak NH₄Cl tercih edilmiştir.

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 [39]. Melas ve peynir altı suyu karıştırılarak hazırlanan ortamda, *Cryptococcus laurentii* ile yüksek lipit verimi elde edilmiştir [40]. Sonuçlarımız, peynir altı suyunun standart lipit üretim besiyeri alternatifi olarak azot sınırlı bir ortam teşkil ettiğini göstermiştir.

Oleaginous mayaların ürettiği lipitler ağırlıklı olarak biyodizel olarak kullanılmaya elverişli C16 ile C18 yağ asitlerinden oluşur. Palmitik asit, oleik asit ve stearik asit içeren lipitlerin, yağ asidi kompozisyonunun biyodizel üretimine uygun olduğu belirlenmiştir.

Biyodizel gibi yenilebilir enerji çeşitlerinin kullanımı, ülkemizin dışa bağımlı enerji politikasının değişebilmesine, olumlu katkılarda bulunabilmektedir. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen biyodizelin yaygın olarak kullanılabilmesi, olası enerji krizlerini çözüme uygun bir yöntem olabilecektir. Çalışma sonuçlarımız, oleaginous mayalardan elde edilen lipitlerin, biyodizel üretiminde kullanılmak üzere hammadde olabilecek nitelikte olduğu göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenen 11F114 numaralı projenin bir bölümüdür. Destek için kurumumuza teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Knothe G, Razon LF. Biodiesel fuels. *Prog Energ Combust Sci* 2017; 58: 36-59.
- [2] Shi S, Rodriguez J, Siewers V, Nielsen J. Prospects for microbial biodiesel production. *Biotechnol. J.* 2011; 6, 277-285.
- [3] Carioca JOB. (2010). Biofuels: Problems, challenges and perspectives. *Biotechnol J.* 2010; 5, 260-273.
- [4] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science.* 2007; 315, 801-804.
- [5] Meng X, Yang, J Zu, X Zhang, L Nie Q, Xian M. 2009; Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energ.* 2009; 34, 1-5.
- [6] Demirbaş A. Diesel fuel from vegetable oil via transesterification and soap pyrolysis. *Energ Source.* 2002; 24, 835-841.
- [7] Alptekin E. Emission, injection and combustion characteristics of biodiesel and oxygenated fuel blends in a common rail diesel engine. *Energy* 2017; 119, 44-52.
- [8] Carraretto C, Macor A, Mirandola A, Stoppato A, Tonon S. Biodiesel as alternative fuel: experimental analysis and energetic evaluations. *Energy.* 2004; 29, 2195-2211.
- [9] Felizardo P, Correia MJN, Raposo I, Mendes JF, Berkemeier R, Bordado JM. Production of biodiesel from waste frying oil. *Waste Manage.* 2006; 26:5, 487-494.
- [10] Phan AN, Phan TM. Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel.* 2008; 87, 3490-3496.
- [11] Kulkarni M, Dalai A. Waste cooking oils an economical source for biodiesel: a review. *Ind Eng Chem Res.* 2006; 45, 2901-2913.
- [12] Soccol CR, Neto CJD, Soccol VT, Sydney EB, Costa ESFD, Medeiros ABP, Vandenberghe LPDS. Pilot scale biodiesel production from microbial oil *Rhodosporidium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technol.* 2017; 223, 259-268.
- [13] Vicente G, Bautista LF, Rodríguez R, Gutiérrez FJ, Sádaba I, Ruiz-Vázquez RM, Torres-Martínez S, Garre V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem. Eng. J.* 2009; 48:1, 22–27.
- [14] Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 80, 749-756.
- [15] Peng X, Cheng Y. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. *Bioresource Technol.* 2008; 99, 3885-3889.

- [16] Amara S, Seghezzi N, Otani H, Diaz-Salazar C, Liu J, Eltis LD, Characterization of key triacylglycerol biosynthesis processes in rhodococci. *Sci Rep.* 2016; 6, 24985.
- [17] Papanikolaou S, Aggelis G. Lipids of oleaginous yeast. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Sci Technol.* 2011; 113, 1031-1051.
- [18] Denli Y, Tekin A. Oil production and microorganisms. *Gıda.* 2000; 25:4, 265-270.
- [19] Ratledge C. Microbial oils and fats; an assesment of their commercial potential. *Indust Microbiol.* 1982; 16, 119-206.
- [20] Aksan E, A research on the carotenoids extracted from various yeast and the usability as food colouring in sausage. PhD Thesis, Çukurova University, Adana, Turkey, 2005.
- [21] Burja AM, Armenta RE, Radianingtyas H, Barrow J. Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium* sp. *ONC-T18.* *J Aric Food Chem.* 2007; 55:12, 4795-4801.
- [22] Feiyan X, Zhang X, Luo H, Tan T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Pro Biochem.* 2006; 41, 1699-1702.
- [23] Wu H, Li Y, Chen L, Zong M. Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum.* *Appl Energ.* 2011; 88, 138-142.
- [24] Tao J, Dai CC, Yang QY, Guan XY, Shao WL. Production of biodiesel with acid hydrolysate of *Populus euramevicana* cv leaves by *Rhodotorula glutinis.* *Int J Green Energy.* 2010; 7, 387-396.
- [25] Yen HW, Zhang Z. Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis.* *J Biosci Bioeng.* 2011; 112:1, 71-74.
- [26] Yen H, Liu YX. Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates *J Biosci Bioeng.* 2014; 118:2, 195-198.
- [27] Johnson V, Singh M, Saini VS, Sista VR, Yadav NK. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *W J Microbiol.* 1992; 8, 382-384.
- [28] Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi İ, Madani M. Bioconversion of different carbon sources in to microbial oil and biodiesel using oleaginous yeast. *J Biol T World.* 2012; 1:2, 82-92.
- [29] Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S. Selection and optimization for lipit production of a new isolated oleaginous yeast, *Rhodospordium toruloides* DMKU3-TK16. *Nat. Sci.* 2010; 44, 436-445.
- [30] Evans CT, Ratledge C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeast. *J G Microbiol.* 1984; 130, 1693-1704.
- [31] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* 2002; 51, 1-51.
- [32] Kolouchova I, Maltatkova O, Sigler K, Masak J, Rezanka T. Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. *Folia Microbiol.* 2016; 61, 431-438.

- [33] Patel A, Arora N, Mehtani J, Pruthi V, Pruthi PA. Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production, *Renew Sust Energ Rev.* 2017; 77 604–616.
- [34] Lin J, Shen H, Tan H, Zhang X, Wu S, Hu C, Zhao ZK. Lipit production by *Lipomyces starkeyi* cells in glucose solution without auxiliary nutrients. *J Biotechnol.* 2011; 152:4, 184-188.
- [35] Zhu LY, Zhong MH, Wu H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technol.* 2008; 99, 7881-7885.
- [36] Karatay SE, Dönmez G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technol.* 2010; 101, 7988-7990.
- [37] Taskin M, Ortucu S, Aydogan MN, Arslan NP, Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29, *Renew Energy* 2016; 99, 198-204.
- [38] Curtin LV, Molasses-general considerations, *Molasses in Animal Nutrition*, National Feed Ingredients Association Ivowa, USA 1983.
- [39] Vamvakaki AN, Kandarakis I, Kaminarides S, Komaitis M, Papanikolaou S. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by *Zygomycetes*. *Eng Life Sci.* 2010; 10:4, 348–360.
- [40] Castanha RF, Mariano AP, Morais LASD, Scramin S, Monteiro RTR. Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. *Braz J Microbiol.* 2014; 45, 379-387.