



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



YEŞİL EKSTRAKSİYON TEKNOLOJİSİ İLE ÇEVRE DOSTU PROSES GELİŞTİRİLMESİ

Yüksek lisans Tezi

Alperen ALPURAL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İZMİR
2024



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



YEŞİL EKSTRAKSİYON TEKNOLOJİSİ İLE ÇEVRE DOSTU PROSES GELİŞTİRİLMESİ

Alperen ALPURAL

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esra İMAMOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Yüksek lisans Tezi Programı

İZMİR
2024

Alperen ALPURAL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Yeşil Ekstraksiyon Teknolojisi ile Çevre Dostu Proses Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 02.10.2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Esra İMAMOĞLU

Raportör Üye : Doç. Dr. Sibel BARIŞCI

Üye : Doç. Dr. İrem DENİZ CAN



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yeşil ekstraksiyon teknolojisi ile çevre dostu proses geliştirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

02/ 10 / 2024

Alperen ALPURAL



ÖZET

YEŞİL EKSTRAKSİYON TEKNOLOJİSİ İLE ÇEVRE DOSTU PROSES GELİŞTİRİLMESİ

ALPURAL, Alperen

Yüksek lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esra İMAMOĞLU

Ekim 2024, 42 sayfa

Bu çalışmada, çevre dostu ekstraksiyon teknikleri kullanılarak *Chlorococcum novae-angliae* mikroalginden lipid eldesi araştırılmıştır. İlk olarak *Chlorococcum novae-angliae* mikroalgi üretiminde azot varlığının lipid üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Akabinde Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) ve Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE) yöntemlerinin verimliliği karşılaştırılmış ve bu yöntemlerin lipid üretimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. UAE ve MAE süreçlerinin optimizasyonu, biyokütle-çözücü oranı, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, güç ve döngü değişkenleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. UAE için en yüksek verim $0,026 \pm 0,001$ g lipid/g ıslak biyokütle olup, 1:25 biyokütle-çözücü oranı, 180 W güç, 20 kHz frekans, 2 dakikalık süre ve 1 saniyelik döngü ile elde edilmiştir. MAE için ise en uygun koşullar 1:30 biyokütle-çözücü oranı, 300 W güç, 35 °C sıcaklık ve 2 dakikalık ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, UAE'nin daha yüksek doymuş yağ asidi (SFA) verimi sağladığını ve biyoyakıt üretimi için uygun bir profil sunduğunu göstermektedir. MAE ise daha yüksek çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği ile öne çıkmıştır, bu da gıda ve sağlık endüstrileri için önemlidir. Bu bulgular, yeşil ekstraksiyon yöntemlerinin sürdürülebilir enerji üretimi ve çevre dostu biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliğini vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Chlorococcum novae angliae*, lipid ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, biyoyakıt, sürdürülebilirlik, çevre dostu.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ENVIRONMENTALLY FRIENDLY PROCESS WITH GREEN EXTRACTION TECHNOLOGY

ALPURAL, Alperen

Master degree Thesis, Department of Bioengineering

Supervisor: Doç. Dr. Esra İMAMOĞLU

November 2024, 42 pages

In this study, the extraction of lipids from the microalga *Chlorococcum novae-angliae* using environmentally friendly extraction techniques was investigated. First, the effect of nitrogen availability on lipid production in *Chlorococcum novae-angliae* microalgae was examined. Subsequently, the efficiencies of Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) and Microwave-Assisted Extraction (MAE) methods were compared, and their effects on lipid production were evaluated. The optimizations of UAE and MAE processes were carried out by considering variables such as biomass-to-solvent ratio, temperature, extraction duration, power, and cycle. For UAE, the maximum yield was recorded as 0.026 ± 0.001 g lipid/g wet biomass under the optimal conditions determined as a biomass-to-solvent ratio of 1:25, 180 W power, 20 kHz frequency, a 2 minute extraction duration, and a 1 second cycle. For MAE, the optimal conditions were recorded as a biomass-to-solvent ratio of 1:30, 300 W power, 35 °C temperature, and a 2 minute extraction duration. The results demonstrated that UAE provided a higher yield of saturated fatty acids (SFAs), making it suitable for biofuel production, while MAE resulted in a higher content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which is valuable for the food and health industries. These findings highlight the applicability of green extraction methods in sustainable energy production and eco-friendly biotechnological applications.

Keywords: *Chlorococcum novae angliae*, lipid extraction, ultrasonic assisted extraction, microwave assisted extraction, biofuel, sustainability, environmentally friendly.

ÖNSÖZ

Bilimsel araştırmanın getirdiği zorlukları ve öğrenme süreçlerini içeren bu tez, bilimsel yolculuğumda önemli bir adım oldu.

Bu süreç boyunca yaşanan deneyimler, yalnızca akademik bilgimi değil, aynı zamanda sabır ve azim gerektiren araştırma süreçlerini de kapsadı. Proje boyunca karşılaştığım her zorluk, bana araştırmanın hem zorlu hem de tatmin edici yönlerini daha iyi anlama fırsatı sundu.

Bu çalışmanın tamamlanmasında, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin (BAP, Proje No: 30846) sağladığı destek için minnettarım. Bu destek olmadan bu çalışmayı tamamlamak mümkün olmazdı.

İZMİR,

Ekim 2024

Alperen Alpural



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI.....	i
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	iii
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Mikroalglerin Tanımı ve Önemi	2
2.1.1 <i>Chlorococcum novae angliae</i>	3
2.2 Ekstraksiyon Teknolojisinin Temelleri: Ekstraksiyonun genel tanımı, geleneksel yöntemler ve çevre dostu ekstraksiyon	4
2.3 Yeşil Ekstraksiyonun Önemi ve Yöntemleri	5
2.3.5 Maserasyon	7
2.4 <i>Chlorococcum novae angliae</i> ve Yeşil Ekstraksiyon	8
2.5 <i>Chlorococcum novae-angliae</i> ve Yeşil Ekstraksiyonun Bağdaştığı Noktalar ...	8
2.5.1 Biyoaktif Bileşiklerin Verimli Ekstraksiyonu	8
2.5.2 Çevresel Sürdürülebilirlik.....	8
2.5.3 Enerji Verimliliği	8
2.5.4 Kombinasyon Yöntemleri.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1 Gereç	10

3.1.1 Mikroalg Kültürü	10
3.1.2 Mikroalgal Kültivasyon	10
3.1.3 Ultrasonik Destekli Lipid Ekstraksiyon (UAE).....	11
3.1.4 Mikrodalga Destekli Lipid Ekstraksiyonu (MAE)	12
3.2 Yöntem.....	12
3.2.1 Mikroalg Kültivasyonu	12
3.2.2 Kontrol Amaçlı Kullanılan Geleneksel Ekstraksiyon.....	13
3.2.3 Kontrol Amaçlı Yağ asidinin Geleneksel Ekstraksiyonu Transesterifikasyon	13
3.2.4 Ultrasonik Destekli Lipid Ekstraksiyon (UAE).....	14
3.2.5 Yağ asidinin Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonu, Transesterifikasyon	15
3.2.6 Mikrodalga Destekli Lipid Ekstraksiyonu (MAE)	15
3.2.7 Yağ asidinin Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonu, Transesterifikasyon.....	16
3.2.8 Yağ asidi metil esterleri (GC-FID) Analizi	16
3.2.9 İstatistiksel Analiz:	17
3.2.10 Kuru Hücre Ağırlığı Tayini	17
3.2.11 Türbidite.....	17
4.BULGULAR ve TARTIŞMA	18
4.1 Azotsuz N8 Besin Ortamında Mikroalgal Üretim	18
4.2 Azotlu N8 Besin Ortamında Mikroalgal Üretim	21
4.3 <i>Chlorococcum Novae Angliae</i> 'nin Büyüme Kinetiği.....	24
4.3. Besin ortamındaki azot varlığının yağ asidi profiline etkisi	25
4.4 <i>Chlorococcum novae-angliae</i> Ekstraksiyon Optimizasyonu.....	27
4.4.1 Ultrasonik Destekli Lipid Ekstraksiyon (UAE) Optimizasyonu	27
4.4.2 Mikrodalga Destekli Lipid Ekstraksiyonu (MAE) Optimizasyonu	30
4.5 Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) ve Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE) ile Lipid Ekstraksiyonunun Karşılaştırılması.....	31
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	34

5.1 Nitrojen Sınırlaması ve Lipid Birikimi	34
5.2 Lipid Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Verimliliği	34
5.3 Yağ Asidi Profili ve Ekstraksiyon Yöntemlerinin Etkisi.....	35
5.4 Gelecek Çalışmalar ve Öneriler	35
KAYNAKLAR DİZİNİ	37
KAYNAKLAR DİZİNİ (devam).....	38
KAYNAKLAR DİZİNİ (devam).....	39
KAYNAKLAR DİZİNİ (devam).....	40
KAYNAKLAR DİZİNİ (devam).....	41
TEŞEKKÜR.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1: <i>Chlorococcum novae-angliae</i> hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	10
Şekil 3.2: Panel fotobiyoreaktör.....	13
Şekil 3.3: Ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi.....	16
Şekil 4.1: Azotsuz N8 ile <i>Chlorococcum novae angliae</i> üretiminde hücre sayım değerleri.....	19
Şekil 4.2: Azotsuz N8 ile <i>Chlorococcum novae angliae</i> üretiminde kuru ağırlık ölçümleri.....	19
Şekil 4.3: Azotsuz N8 ile <i>Chlorococcum novae angliae</i> üretiminde türbidite değerleri.....	20
Şekil 4.4: Azotlu N8 ile <i>Chlorococcum novae angliae</i> üretiminde hücre sayımı değerleri.....	22
Şekil 4.5: Azotlu N8 ile <i>Chlorococcum novae angliae</i> üretiminde kuru ağırlık değerleri.....	22
Şekil 4.6: Azotlu N8 ile <i>Chlorococcum novae angliae</i> üretiminde türbidite değerleri.....	23
Şekil 4.7: Azotlu ve azotsuz üretimlerde elde edilen lipid verimi	26
Şekil 4.8: UAE’de Solvent Seçimi.....	28
Şekil 4.9: UAE optimizasyonu: Biyokütle:Çözgen, Zaman ve Döngü -.....	29
Şekil 4.10:MAE optimizasyonu: (a) Biyokütle:Çözgen, (b) Sıcaklık, (c) Güç ve (d) Zaman	31

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 4.11: Optimal koşullar altında Ultrasonik destekli ekstraksiyon süreci ve Mikrodalga destekli ekstraksiyon süreci: (a) Lipid verimi; (b) Yağ asidi profili.....32



TABLolar DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo 4.1 *C. novae-angliae*'nin panel PBR'deki büyüme kinetiği sonuçları.....25

Tablo 4.2 *C. novae-angliae*'nin farklı kültür ortamlarındaki yağ asidi içeriği.....27

Tablo 4.3 Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ile elde edilen yağ asidi içerikleri.....33



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
CO ₂	Karbondioksit
β	Beta
W	Watt
°C	Santigrat derece
KNO ₃	Potasyum nitrat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
NaHPO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum klorür dihidrat
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir (II) sülfat heptahidrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
Na.EDTA.Fe	Sodyum demir EDTA
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
FeEDTA	Demir EDTA
MnCl ₂ .4H ₂ O	Mangan (II) klorür tetrahidrat
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko sülfat heptahidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır (II) sülfat pentahidrat
Al ₂ (SO ₄) ₃ .18H ₂ O	Alüminyum sülfat oktadekahidrat
NaOH	Sodyum hidroksit

Kısaltmalar**Açıklama**

UAE	Ultrason Destekli Ekstraksiyon
MAE	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
EAE	Enzim Destekli Ekstraksiyon
SFE	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
PLE	Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu
PTFE	Politetrafloroetilen
s	Saniye
m	Metre
Dk	Dakika
Rpm	Dakikada Devir (Revolution per minute)
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
g	Gram
L	Litre
µmol	Mikromol
BHT	Bütilatlı Hidroksitoluen

1.GİRİŞ

Enerji kaynaklarının sınırlı olması ve fosil yakıtların çevresel etkileri, alternatif ve sürdürülebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyacı arttırmaktadır. Bu bağlamda, mikroalgler gibi biyo-temelli kaynakların kullanılması, enerji açığının kapatılmasında ve çevre dostu teknolojilerin geliştirilmesinde önemli bir potansiyel sunmaktadır (Halim et al., 2011). Bu tezde, *Chlorococcum novae angliae* türü üzerinde yoğunlaşarak, bu mikroalg türünden yeşil ekstraksiyon teknolojisi kullanarak lipid eldesinin verimliliğini artırmayı ve biyoyakıt üretimi için potansiyel bir kaynak olarak değerlendirmeyi planlanmıştır. Enerji ihtiyacının karşılanmasında ve çevresel etkilerin azaltılmasında, çeşitli yöntemlerin birleştirilmesiyle yeşil ekstraksiyon teknolojilerinin etkinliği incelenmiştir. Bu kapsamda, etanol, etilasetat ve su gibi yeşil çözümler kullanılarak ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) gibi tekniklerle *Chlorococcum novae angliae* mikroalgin lipid ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve bu yöntemlerin etkinliği karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Literatür taraması, *Chlorococcum novae angliae* mikroalginin lipid ekstraksiyonu üzerine sınırlı sayıda çalışma olduğunu göstermiştir. Ancak, mevcut az sayıdaki çalışmalar, bu mikroalg türünün potansiyel bir biyo-yakıt kaynağı olabileceğini işaret etmektedir (Kapoore et al., 2018). Yeşil çözümler ve MAE yöntemi ile ilgili olarak ise bu alanda yeterince araştırma yapılmadığı görülmektedir (Conde et al., 2022). Bu tez, bu yöntemlerin bir arada kullanımıyla alana önemli bir katkı sağlamayı amaçlamaktadır

Bu çalışmanın amacı, sürdürülebilir enerji kaynaklarına olan ilgiyi artırmak ve *Chlorococcum novae angliae* türünün biyo-yakıt üretimi için potansiyelini değerlendirmek aynı zamanda *Chlorococcum novae angliae*'den lipid ekstraksiyonu için kullanılan ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak incelemek ve bu yöntemlerin etkinliğini değerlendirmektir. Bu çalışmanın, biyoyakıt üretimi ve mikroalglerin sürdürülebilir kullanımı ile ilgilenen araştırmacılar için değerli bir kaynak olması amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Mikroalglerin Tanımı ve Önemi

Mikroalgler, tatlı suda ve deniz suyunda bulunan küçük organizmalardır. Ökaryotik mikroorganizmalar veya prokaryotik siyanobakteriler (mavi-yeşil algler) olarak bilinen 25.000'den fazla türü izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmalar atmosferdeki CO₂ yoğunluğunu azaltmak için önemli bir doğal mekanizma olan fotosentez yapmaktadırlar (Sathasivam et al., 2019). Mikroalgler ayrıca kısa bir nesil ile karakterize edilirler. Uygun zaman, uygun çevre koşulları altında katlanarak çoğalan yapıdadırlar. Metabolizmaları için kullanılan enerji ve karbon kaynakları ile ilgili olarak, üç farklı büyüme yöntemi vardır: ototrofik, heterotrofik ve miksotrofik. Bu yöntemler, metabolizmaları için gereken enerji ve karbon kaynaklarını belirlemektedir. Ototrofik büyümede mikroalgler CO₂'yi ve güneş ışığını kullanarak organik madde üretirler. Ototrofik kültürasyon genellikle açıkta gerçekleştirilir. Kapalı fotobiyoreaktörlerde ve havuz sistemlerinde kültive edilebilirler. Organik bileşikler, heterotrofik büyümede hem enerji hem de karbon kaynağı olarak kullanılır. En yaygın karbon kaynağı glikozdur, ancak bazı mikroalgler gliserol ile büyüyebilir. Miksotrofik metabolizma, organik karbon içeriği yüksek olduğunda heterotrofik birinci aşamadan ve organik karbon içeriği düşük olduğunda fotosentez indüksiyonu ile başlayan ototrofik ikinci aşamadan oluşur. Bu yöntem, mikroalglerin doğal ışık ve karanlık döngülerinde büyüme yeteneğine sahip olmak için iki yöntemin en iyi mekanizmalarını kullanarak avantaj sağlayabilir (Vale et al., 2020). Bu organizmaların hücre yapıları ve çeşitlilik gösteren morfolojileri, çeşitli endüstriyel uygulamalar için potansiyel sağlayan farklı biyokimyasal bileşenlerin üretimine olanak tanır. Özellikle lipidler, proteinler, karotenoidler ve vitaminler gibi bileşenler, mikroalglerin biyo-çeşitliliği içerisinde bulunur ve endüstriyel, gıda, kozmetik ve enerji sektörlerinde çeşitli kullanım alanlarına sahiptir(Sandgruber et al., 2023). Mikroalgler, biyoyakıt üretimi için önemli bir potansiyele sahiptir. Bu organizmalar, hızlı büyüme hızları ve yüksek yağ içerikleri sayesinde biyoyakıt üretiminde çeşitli avantajlar sunarlar. Özellikle, lipid içerikleri yüksek olan mikroalg türleri, biodizel üretimi için önemli birer adaydır. Bu lipitler, biyodizel üretimi için ideal bir ham madde oluşturur ve

geleneksel fosil yakıtların yerine yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelik bir alternatif sağlar (Halim et al., 2011). Mikroalglerin biyoyakıt üretimindeki rolü, enerji sektörünün yanı sıra gıda, kozmetik, ilaç ve hayvan yemi gibi birçok alanda da etkili olabilir. Biyoyakıt üretimi için mikroalglerin kullanılması, geleneksel tarım alanlarına ihtiyaç duymadan gerçekleşebilir, bu da gıda üretimiyle çatışma olmadan biyoyakıt üretimini mümkün kılar. Ayrıca, mikroalglerin biyoyakıt üretimi için kullanılması, sera gazlarının azaltılması gibi çevresel faydalar sağlar (Halim et al., 2011). Bununla birlikte, mikroalglerin biyoyakıt üretimindeki potansiyeli, endüstriyel ve ticari alanda daha fazla araştırma ve geliştirme gerektirmektedir.

2.1.1 *Chlorococcum novae angliae*

Yeşil bir mikroalg olan *Chlorococcum novae angliae*'nin log fazındaki hücrelerinin çoğu yaklaşık 10-15 µm çapında, küresel şekildedir ve duvarları genellikle 1 µm kalınlığındadır veya daha incedir. Elipsoidal yapıda olan hücreleri ise ince duvarlıdır yaklaşık 0,5 µm kalınlığında duvarlara sahiptir ve 5-7 x 8-11 µm boyutlarındadırlar. Durağan fazdaki hücreler ise genellikle 16 µm'ye kadar büyüklükte olup duvar kalınlıkları 2 µm'ye kadar ulaşabilir. Bu hücrelerde pirenoid adı verilen, nişasta kılıfıyla çevrili özel yapılar bulunur. Ayrıca, bu hücreler genellikle tek çekirdeklidir (Blackwell et al., 1991). *Chlorococcum novae angliae*, geniş bir yelpazede değerli bileşiklerin üretiminde potansiyel bir kaynak olarak öne çıkmaktadır. Bu mikroalg türü, linolenik asit, lutein, kantaksantin, β-karoten, astaksantin gibi önemli ve çeşitli biyoaktif bileşikleri sentezleme kabiliyetine sahiptir. Linolenik asit, çoklu doymamış yağ asitlerinden biri olarak, özellikle biyoyakıt endüstrisinde yakıt stabilitesi için önemlidir. Aynı zamanda, astaksantin gibi karotenoidler, antioksidan özellikleri nedeniyle farmasötik endüstride ve besin takviyelerinde talep görmektedir (Bhagavathy et al., 2011). Nişasta kılıfı ile çevrili özel yapısı sayesinde astaksantin gibi karotenoidlerin sentezlenmesinde önemli bir rol oynar. *Chlorococcum novae angliae*'nin bu değerli bileşikleri üretme yeteneği, biyoyakıt, farmasötik ve kozmetik endüstrilerde kullanılabilecek potansiyel kaynaklar sunmaktadır. Bu değerli bileşiklerin elde edilmesi, mikroalginin hücre yapısı ve içerdiği bileşiklerin özgünlüğü göz önüne alındığında oldukça önemlidir. Bu aşama, mikroalginin hücrelerinden yağlar, karotenoidler, proteinler gibi istenen

bileşiklerin çıkarılmasını içerir. Ekstraksiyon yöntemleri, bu bileşiklerin verimli bir şekilde ayrılmasını ve konsantre bir formda toplanmasını sağlar. Ekstraksiyon yöntemlerinin seçimi, mikroalginin büyüme koşulları, hücresel yapısı ve hedeflenen bileşiklerin özellikleri ile yakından ilişkilidir. Örneğin, bir mikroalginin hücre duvarı yapısı incelendiğinde, bazı bileşiklerin çıkarılması için mekanik veya kimyasal yöntemlerin daha uygun olabileceği belirlenebilir. Bu durumda, ekstraksiyon yöntemleri, hedeflenen bileşiklerin özelliklerine ve mikroalginin büyüme aşamasına göre titizlikle seçilmelidir (Hakalin et al., 2014). Ekstraksiyon aşaması, mikroalginin değerli bileşiklerini elde etmenin yanı sıra, sonraki aşamalarda bileşiklerin saflaştırılması ve karakterizasyonu için temel bir adımdır. Örneğin, lipidlerin ekstraksiyonu biyoyakıt üretimi için kritik öneme sahiptir. Bu aşama, mikroalginin yağ içeriğini en verimli şekilde toplamak ve biyoyakıt üretiminde kullanılmak üzere uygun bir formda sunmak için dikkatlice planlanmalıdır (Richard, 2010).

Bu nedenle, mikroalglerden değerli bileşiklerin elde edilmesi için ekstraksiyon, başlangıç aşamasında dikkate alınması gereken kritik bir adımdır. Ekstraksiyon yöntemlerinin seçimi, mikroalginin özgün özellikleriyle uyumlu olarak belirlenmeli ve hedeflenen bileşiklerin en verimli şekilde elde edilmesini sağlamak için titizlikle planlanmalıdır (Halim et al., 2011).

2.2 Ekstraksiyon Teknolojisinin Temelleri: Ekstraksiyonun genel tanımı, geleneksel yöntemler ve çevre dostu ekstraksiyon

Bileşiklerin bitkilerden çıkarılması, buhar distilasyonu ve çözücü ekstraksiyonu gibi çeşitli mekanik ve kimyasal işlemlerle gerçekleştirilir. Soxhlet, hidrodistilasyon ve alkolle maserasyon mevcut yöntemlerdir. Hedeflenen bileşiğin doğasına göre en yüksek verim ve saflık, uygun yöntemin seçilmesiyle elde edilebilir. Ancak geleneksel ekstraksiyon teknikleri, faz katılımı ve çözücülerin difüzyon hızları nedeniyle süreci uzatabilir ve enerji yoğunluğunu artırabilir. Ek olarak, hassas bileşenler ısıya ve çevresel koşullara duyarlı olabilir ve organik çözücülerin çevresel zararı, bu tekniklerin kullanılmasını kısıtlayabilir.

Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE), , ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE), süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE) ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) gibi teknolojiler, geleneksel tekniklerin sınırlarını aşabilir. Bu teknolojiler, daha hızlı, daha verimli ve çevre dostu bir ekstraksiyon süreci sağlayabilir (Kadam et al., 2013).

2.3 Yeşil Ekstraksiyonun Önemi ve Yöntemleri

Mikroalgin değerli bileşiklerini elde etmek için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri, mikroalgin hücresel yapısı ve içerdiği bileşiklerle yakından ilişkilidir. Bu yöntemler, mikroalgin özellikleri ve hücresel bileşenleri üzerinde belirgin etkilere sahiptir. Modern ekstraksiyon teknikleri, bu bileşikleri verimli bir şekilde elde etmek için giderek daha fazla tercih edilmektedir.

2.3.1 Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE)

Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE), yüksek frekanslı ultrasonik dalgaların mikroalgal hücrelerin duvarlarını parçalamak için kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem, ultrasonik dalgaların çözücü ortamda kavitasyon baloncukları oluşturması prensibine dayanır. Bu baloncuklar patladığında, oluşan enerji hücre duvarlarını parçalayarak iç bileşiklerin serbest kalmasını ve çözücü ortamına daha etkin bir şekilde salınmasını sağlar. UAE, özellikle yağ asitleri (örneğin linolenik asit) ve karotenoidler (örneğin astaksantin) gibi biyolojik olarak değerli bileşiklerin daha verimli bir şekilde elde edilmesine olanak tanır. UAE, gıda, kozmetik, ilaç ve biyoyakıt endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntemin avantajları arasında yüksek verimlilik, kısa işlem süresi ve düşük sıcaklıklarda çalışılabilmesi yer alır, bu da ısıya duyarlı bileşiklerin korunmasını sağlar. Ancak, ultrasonik dalgaların aşırı kullanımı, termal etkiler oluşturabilir ve bu da ısıya duyarlı bileşiklerin bozulmasına neden olabilir. Ayrıca, yüksek enerji tüketimi ve ultrasonik ekipmanların maliyeti, endüstriyel ölçekli uygulamalarda sınırlayıcı faktörler olarak karşımıza çıkabilir (Wang & Weller, 2006).

2.3.2 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE)

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), mikrodalga enerjisinin mikroalgal hücrelerin içerdği bileşiklerin salınımını artırmak için kullanıldığı bir yöntemdir. Mikrodalga enerjisi, moleküllerle doğrudan etkileşime girerek hızlı ve homojen bir ısıtma sağlar, bu da hücresel yapının bozularak bileşiklerin çözücüye geçmesini kolaylaştırır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon, özellikle lipidler gibi organik bileşiklerin çözünürlüğünü artırarak lipid ekstraksiyon verimliliğini artırır. MAE, biyoyakıt üretimi, doğal pigmentlerin ekstraksiyonu, farmasötik ve kozmetik ürünlerin üretimi gibi çeşitli alanlarda kullanılır. Yöntem, kısa işlem süresi, yüksek verimlilik ve düşük enerji tüketimi gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, mikrodalga cihazlarının maliyeti ve aşırı ısınma riski, küçük ölçekli üretimlerde sınırlayıcı faktörler olabilir. Ayrıca, mikrodalgaların yüksek sıcaklıklar üretebilme potansiyeli, termal olarak kararsız bileşiklerin bozulmasına neden olabilir (Cecilia et al., 2000; Herrero et al., 2006; Lucchesi et al., 2004).

2.3.3 Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonu

Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, karbondioksit gazının süperkritik bir sıvıya dönüştürülerek mikroalgal bileşiklerin çıkarılmasında kullanıldığı çevre dostu bir yöntemdir. Süperkritik CO₂, gaz ve sıvı fazların özelliklerini birleştirir; düşük viskozite, yüksek difüzyon kapasitesi ve çözücülük gücüne sahiptir. Bu özellikleri sayesinde, organik çözücülere kıyasla daha etkili ve seçici bir ekstraksiyon sağlar. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, özellikle gıda, ilaç, kozmetik ve biyoyakıt endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajları arasında toksik çözücüler kullanmadan çevre dostu bir süreç sunması, yüksek saflıkta ürün elde edilmesi ve ekstraksiyondan sonra CO₂'nin kolayca uzaklaştırılabilmesi yer alır. Ancak, süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, yüksek maliyetli ekipman ve işletme gerektirdiği için endüstriyel ölçekli uygulamalarda sınırlayıcı olabilir. Ayrıca, düşük polariteye sahip olması nedeniyle, çok polar bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun olmayabilir (Brondz, 2017).

2.3.4 Solvent Ekstraksiyonu

Solvent ekstraksiyonu, mikroalgal bileşiklerin organik çözücüler kullanılarak elde edilmesini sağlayan geleneksel bir yöntemdir. Bu yöntem, özellikle metanol, etanol veya hekzan gibi organik çözücülerin mikroalgal hücrelerle etkileşime girerek iç bileşiklerin çözücüye aktarılmasını içerir. Solvent ekstraksiyonu, geniş bir bileşik yelpazesini etkin bir şekilde çıkarabilmesine rağmen, solventlerin toksisitesi ve çevresel etkileri göz önünde bulundurulmalıdır. Solvent ekstraksiyonu, gıda, ilaç, biyoyakıt ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılır. Yöntemin avantajları arasında farklı bileşiklerin ekstrakte edilmesine olanak tanıyan geniş bir solvent yelpazesinin kullanılabilmesi ve yönteminin kolayca ölçeklendirilebilir olması yer alır. Ancak, solventlerin toksik olması ve çevresel açıdan olumsuz etkileri bu yöntemin dezavantajları arasında yer alır. Ayrıca, solvent kalıntıları ürün saflığını azaltabilir ve ekstrakte edilen bileşiklerin kalitesini etkileyebilir (Borowitzka & Moheimani, 2013.)

2.3.5 Maserasyon

Maserasyon, bitkisel veya mikroalgal materyalin bir çözücü içinde uzun süre bekletilmesini içeren basit ve düşük maliyetli bir ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntemde, çözücü, hücre duvarlarından geçerek iç bileşikleri çözer ve zamanla bu bileşikleri çözücüye aktarır. Maserasyon, özellikle biyolojik olarak aktif bileşiklerin düşük sıcaklıklarda ekstrakte edilmesini sağladığı için, ısıya duyarlı bileşikler açısından avantajlıdır. Ayrıca, basit bir ekipman gerektirmesi ve düşük maliyetli olması nedeniyle yaygın olarak kullanılır. Ancak, maserasyon işlemi genellikle uzun süreli bekleme gerektirir ve bu da işlemin zaman alıcı olmasına neden olur. Ayrıca, daha yüksek verimlilik elde etmek için büyük miktarda çözücü gerekebilir, bu da çevresel açıdan olumsuz etkiler yaratabilir (Azmir et al., 2013).

Mikroalglerden değerli bileşiklerin ekstraksiyonu, yeşil ve sürdürülebilir yöntemlerin kullanılmasıyla hem ekonomik hem de çevresel açıdan önemli avantajlar sunar. UAE ve MAE gibi modern ekstraksiyon yöntemleri, hızlı ve verimli ekstraksiyon sağlamaları nedeniyle öne çıkmaktadır (Herrero et al., 2006; Wang & Weller, 2006). Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ise çevresel sürdürülebilirlik açısından ideal bir yöntem olarak kabul edilirken (Bronz, 2017), solvent

ekstraksiyonu ve maserasyon gibi geleneksel yöntemler de belirli avantajlar sunmaktadır (Azmir et al., 2013; Borowitzka & Moheimani, 2013). Bu yöntemlerin her biri, mikroalginin spesifik bileşikleri ve kullanım alanlarına bağlı olarak seçilmelidir.

2.4 *Chlorococcum novae angliae* ve Yeşil Ekstraksiyon

Chlorococcum novae-angliae'nin çeşitli biyoaktif bileşikler sentezleme kabiliyeti, bu türü biyoyakıt, farmasötik ve kozmetik endüstrilerde potansiyel bir kaynak haline getirir. Yeşil ekstraksiyon yöntemleri, bu bileşiklerin çevre dostu ve sürdürülebilir bir şekilde elde edilmesini sağlar. Yeşil ekstraksiyon, toksik solventlerin kullanımını minimize ederken enerji verimliliğini artırır ve çevresel etkileri azaltır.

2.5 *Chlorococcum novae-angliae* ve Yeşil Ekstraksiyonun Bağdaştığı Noktalar

2.5.1 Biyoaktif Bileşiklerin Verimli Ekstraksiyonu

Chlorococcum novae-angliae, linolenik asit, lutein, kantaksantin, β -karoten ve astaksantin gibi değerli bileşiklerin üretiminde öne çıkar. Yeşil ekstraksiyon yöntemleri, bu bileşiklerin hücrelerden etkin bir şekilde ayrılmasını sağlar. Örneğin, ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) gibi teknikler, hücre duvarlarını parçalayıp iç bileşikleri çözücü ortama salarak verimi artırabilir (Hakalin et al., 2014; Wang & Weller, 2006).

2.5.2 Çevresel Sürdürülebilirlik

Yeşil ekstraksiyon yöntemleri, çevre dostu çözümler sunar ve toksik solventlerin kullanımını minimize eder. Bu, *Chlorococcum novae-angliae*'nin biyoyakıt üretiminde kullanımını daha sürdürülebilir kılar. Örneğin, süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, çevresel açıdan sürdürülebilir bir yöntemdir ve toksik solventlerin kullanılmaması avantajına sahiptir (Brondz, 2017).

2.5.3 Enerji Verimliliği

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), mikrodalga enerjisi kullanarak hızlı ve homojen ısıtma sağlar. Bu, *Chlorococcum novae-angliae*'nin hücrelerinden lipitlerin ve diğer biyoaktif bileşiklerin verimli bir şekilde ekstrakte edilmesine

yardımcı olur. Aynı zamanda enerji tüketimini azaltarak daha ekonomik bir süreç sunar (Cecilia et al., 2000; Lucchesi et al., 2004)

2.5.4 Kombinasyon Yöntemleri

Chlorococcum novae-angliae'nin değerli bileşiklerini elde etmek için yeşil ekstraksiyon yöntemlerinin kombinasyonu kullanılabilir. Örneğin, önce ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ile hücre duvarlarının parçalanması ve ardından mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ile bileşiklerin salınması, ekstraksiyon verimliliğini artırabilir. Bu tür kombinasyonlar, hedeflenen bileşiklerin özelliklerine göre optimize edilebilir (Lucchesi et al., 2004; Wang & Weller, 2006).

Chlorococcum novae-angliae'nin biyoyakıt, farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde kullanılacak potansiyel kaynaklar sunması, yeşil ekstraksiyon yöntemleri ile desteklenmektedir. Bu yöntemler, hem çevresel sürdürülebilirliği artırmakta hem de ekonomik verimliliği sağlamaktadır. Bu nedenle, *Chlorococcum novae-angliae*'nin yeşil ekstraksiyon yöntemleriyle birlikte kullanımı, gelecekteki uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Mikroalg Kültürü

Bu tezde kullanılan *Chlorococcum novae angliae* (SAG 5.85) suşu Boğaziçi Üniversitesi Öğretim Üyesi Dr. Berat Haznedaroğlu tarafından hediye edilmiştir. (Çalışkan & Haznedaroğlu, 2022).



Şekil 3.1: *Chlorococcum novae-angliae* (SAG 5.85) hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

3.1.2 Mikroalgal Kültivasyon

Kullanılan Ekipmanlar:

- 100 ml'lik Erlenler
- 250 ml'lik Erlenler
- 2 L'lik Otoklav şişeleri
- 5 L'lik Otoklav şişesi
- 6 L Panel biyoreaktör

Ölçek büyütme sırasında, kültürasyon geçişlerinde kullanılmıştır.

- N8 Besiyeri İçeriği (Hamedı et al., 2016):
 - KNO_3 : 1 g/L
 - KH_2PO_4 : 0.74 g/L
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.26 g/L
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.013 g/L
 - FeEDTA: 0.01 g/L
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g/L
 - Distile su içerisinde çözünmüş ve 1 mL elemental çözelti (g/L) içerir:
 - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 12.98
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3.2
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1.83
 - $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$: 3.58

Bu ekipmanlar ve besiyerleri, mikroalg kültürasyonunda kullanılmış ve belirli aşamalarda ölçek büyütmelelerinde veya besiyeri değışikliklerinde tercih edilmiştir.

3.1.3 Ultrasonik Destekli Lipid Ekstraksiyon (UAE)

Kullanılan Ekipmanlar:

- Yeşil çözenler (Etanol, Etil Asetat)
- Ultrasonik dalga cihazı
- PTFE fitre
- Santrifüj Cihazı
- 50 mL'lik Falcon tüp
- Döner Evaporatör
- Tartım cihazı
- Tıbbi şırınga 20ml'lik

- Evaporatör şişeleri

3.1.4 Mikrodalga Destekli Lipid Ekstraksiyonu (MAE)

Kullanılan Ekipmanlar:

- Yeşil çözümler (Etanol, Etil Asetat)
- Mikrodalga cihazı
- PTFE filtre
- Santrifüj Cihazı
- 50 mL'lik Falcon tüp
- Döner Evaporatör
- Tartım cihazı
- Tıbbi şişinge 20ml'lik
- Evaporatör şişeleri

3.2 Yöntem

3.2.1 Mikroalg Kültürasyonu

Stok kültür eldesi için 250 ml'lik erlenlere 50 ml inokulum 200 ml N8 ortamı olacak şekilde 22 ± 2 °C sıcaklıkta 2 erlende 7 gün kùltive edilmiştir. Akabinde 2L'lik 2 otoklav şişesine 250ml'lik erlenlerde bulunan kültür inoküle edilerek N8 besin ortamı ile 2 L'ye tamamlanmış ve 80 ± 2 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ şiddetinde beyaz ışık altında hava beslemesi ile 15 gün kùltive edilmiştir.

Daha sonra fotobiyoreaktör üretimlerine geçilmiştir. Dört günlük kültürden yaklaşık 4×10^8 hücre/mL içeren 900 mililitrelik aş, 7 L'lik panel PBR (Şekil 3.1) içindeki 6 litrelik sterilize edilmiş N-8 kültür ortamına (azotlu ve azotsuz) inoküle edilmiştir. Panel Fotobiyoreaktör 5 L/dak sürekli hava akış hızıyla 22 ± 2 °C sıcaklıkta 10 günlük bir süre boyunca 80 ± 2 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda çalıştırılmıştır.



Şekil 3.2: Panel fotobiyoreaktör Üretimi

3.2.2 Kontrol Amaçlı Kullanılan Geleneksel Ekstraksiyon

Geleneksel lipid ekstraksiyonunda toplam lipid, modifiye Bligh ve Dyer (1959) prosedürü ile ekstrakte edilmiştir. Islak hücre pelleti tartılarak üzerine 4 mL kloroform: metanol (2:1,v/v) ve 0,5 mg/mL buthylated hidroksitoluen (BHT) ilave edilmiştir. Bir gece boyunca 25 °C’de çalkalayıcıda ekstraksiyona tabii tutulmuş, takiben 6000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant 0,45 µm PTFE filtreden geçirilmiş ve sıvı üzerine 3 mL ultra saf su eklenerek faz ayrımı için bekletilmiştir. Faz ayrımı sonrası üst faz pipet yardımı ile uzaklaştırılmış, klorofom ve lipid içeren alt faz ise 30 °C’de döner evaporatöre alınarak kloroform uzaklaştırılmıştır. Kloroform uzaklaştırıldıktan sonra geride kalan miktar gravimetrik olarak tartılarak belirlenmiştir. Lipid içeriği, toplam yağ miktarının ıslak biyokütleyle oranı (lipid /ıslak biyokütle, (g/g)) şeklinde ifade edilmiştir (Isleten-Hosoglu et al., 2013).

3.2.3 Kontrol Amaçlı Yağ asidinin Geleneksel Ekstraksiyonu Transesterifikasyon

5 mg lipid üzerine 3 mL kloroform:hidroklorikasit:methanol (10:1:1) karışımı ilave edilip karıştırıldıktan sonra su banyosunda 80 °C’de 2 saat tutularak yağ asitlerinin metil esterleri elde edilmiştir. Metanol-kloroform faz ayrımı, ayırma

hunisinde 2 mL distile su ilavesi ile yapılmış ve takiben 2 mL hekzan ilavesi ile üst fazda metil esterleri hekzan fazına geçirilmiştir (Lewis et al., 2000). Hem trasesterifikasyon hem de yağ asidi analizleri için E.Ü. MATAI laboratuvarından hizmet alımı yapılmıştır. Analizler, TS EN ISO 12966-2 ve TS EN ISO 12966-4 kullanılarak GC-FID cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Ultrasonik Destekli Lipid Ekstraksiyon (UAE)

Bu çalışmada üç farklı parametre incelenmiştir: biyokütle-çözücü oranı (1:20, 1:25, 1:30), ekstraksiyon süresi (2, 4, 6 dakika) ve döngü süresi (1, 2, 4 saniye). İlk ekstraksiyonda, yaklaşık 0,4 gram yaş biyokütle ekstraksiyon kabına yerleştirilmiş ve biyokütle:çözücü oranı deneyi için farklı hacimlerde etanol (1:20 oranı için 8 mL, 1:25 oranı için 10 mL, 1:30 oranı için 12 mL) eklenmiştir. Karışım, çözücü ile iyice karışmasını sağlamak için hafifçe döndürülmüştür. Ardından, ekstraksiyon işlemi 180 W güç, 20 kHz frekans ve 2 saniyelik döngü ile 2 dakika boyunca bir ultrasonikasyon cihazı (Bandelin Sonoplus UW 2070) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karışım daha sonra bir çalkalayıcıda gece boyunca 25 °C'de 100 rpm'de karıştırılmıştır.

Ekstraksiyondan sonra numuneler, 10 dakika boyunca 4100 rpm'de santrifüjlenmiş ve ham lipidleri içeren süpernatant bir cam tüpe alınmıştır. Ayırışmayı kolaylaştırmak için ham lipidlere eşit hacimde su ve hekzan (1:1) eklenmiş ve 1 saat bekletilmiştir (Saifuddin et al., 2016). Süspansiyonun katmanlarının tamamen ayrılması için numune tekrar 10 dakika boyunca 4100 rpm'de santrifüjlenmiştir. Ekstrakte edilen lipidleri içeren üst katman Minisart SRP 25 şırınga filtresi kullanılarak süzölmüştür. Çözücü, 30 °C'de bir rotary evaporatör (Stuart RE300) kullanılarak buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Lipid konsantrasyonu gravimetrik olarak ölçülmüş ve lipid içeriği, toplam lipid içeriğinin yaş biyokütleyle oranı olarak ifade edilmiştir (g lipid/g yaş biyokütle).

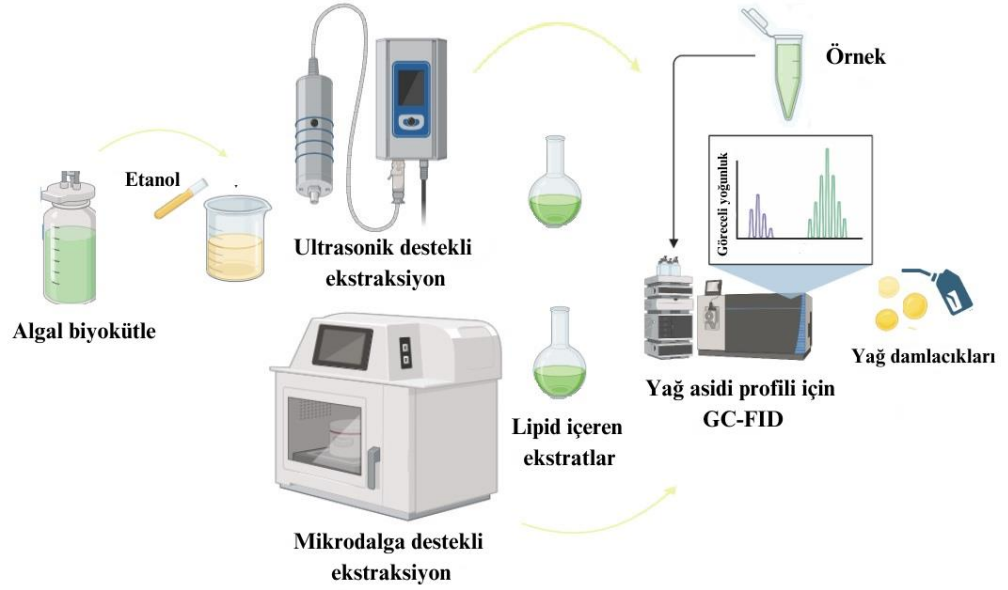
3.2.5 Yağ asidinin Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonu, Transesterifikasyon

Etanol ve lipid karışımına (ör: 9:1) NaOH (w/v) çözeltisi (ör: %1) ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışım sonrası ultrasonikasyon cihazında belirlenen güçte, belirlenen sıcaklıkta ve belirlenen ekstraksiyon süresinde deneme gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra gliserin ve yağ asidi metil esterleri elde edilerek 12 saat gliserin tabakasının çökmesi için beklenmiştir. Gliserini ayırdıktan sonra yağ asidi metil esterleri içerisinde bulunan eser miktardaki NaOH saf su ile yıkanarak nötralize edilmiş ve kalan etanol 60 °C'deki fırında kurutularak uzaklaştırılmıştır (Martinez-Guerra & Gude, 2014)(Martinez-Guerra & Gude, 2014). Örnek analizleri için E.Ü. MATAI laboratuvarından hizmet alımı yapılmıştır. Analizler, TS EN ISO 12966-2 ve TS EN ISO 12966-4 kullanılarak GC-FID cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 Mikrodalga Destekli Lipid Ekstraksiyonu (MAE)

Bu çalışmada, biyokütle-çözücü oranları (1:20, 1:25, 1:30), sıcaklıklar (35, 50 ve 65 °C), güç seviyeleri (300 W, 400 W ve 500 W) ve süreler (2, 4 ve 6 dakika) gibi çeşitli parametreler kapalı kap mikrodalga sindirim sistemi (Sineo MDS-8G, Çin) kullanılarak değerlendirilmiştir. İlk ekstraksiyon denemesi için, yaklaşık 0,5 gram yağ biyokütle ekstraksiyon kabına yerleştirilmiş ve biyokütle-çözücü oranına bağlı olarak değişen hacimlerde etanol eklenmiştir. Süspansiyon hafifçe karıştırılmış ve ardından ekstraksiyon, 300 W güç seviyesinde, 35 °C sıcaklıkta ve 2 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyondan sonra, süspansiyon 10 dakika boyunca 4100 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatant bir cam tüpe alınmıştır. Ardından, ham lipidler eşit hacimde su ve hekzan (1:1) ile karıştırılmış ve Saifuddin et al., (2016) tarafından bildirildiği üzere bir saat bekletilmiştir. Numune tekrar 10 dakika boyunca 4100 rpm'de santrifüjlenmiş ve üst katman Minisart SRP 25 şırınga filtresi kullanılarak süzülmüştür. Çözücüler, 30 °C'de bir rotary evaporatör kullanılarak buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Son olarak, lipid konsantrasyonu gravimetrik olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.3: Ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun şematik gösterimi

3.2.7 Yağ asidinin Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonu, Transesterifikasyon

Etanol ve lipid karışımına (ör: 9:1) NaOH (w/v) çözeltisi (ör: %1) ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışım sonrası mikrodalgada belirlenen güçte, belirlenen sıcaklıkta ve belirlenen ekstraksiyon süresinde deneme gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra gliserin ve yağ asidi metil esterleri elde edilmiş ve 12 saat gliserin tabakasının çökmesi için beklenmiştir. Gliserini ayırdıktan sonra yağ asidi metil esterleri içerisinde bulunan eser miktardaki NaOH saf su ile yıkanarak nötralize edilmiş ve kalan etanol 60 °C'deki fırında kurutularak uzaklaştırılmıştır (Martinez-Guerra & Gude, 2014). Örnek analizleri için E.Ü. MATAL laboratuvarından hizmet alımı yapılmıştır. Analizler, TS EN ISO 12966-2 ve TS EN ISO 12966-4 kullanılarak GC-FID cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 Yağ asidi metil esterleri (GC-FID) Analizi

E.Ü. MATAL laboratuvarından hizmet alımı yapılmıştır. Örnek analizleri, TS EN ISO 12966-2 ve TS EN ISO 12966-4 kullanılarak alev iyonizasyon dedektörü ve Supelco sp-2380 A kapiler kolon ile donatılmış Agilent 7890 gaz kromatografisinde (GC-FID, 60 m × 250 µm × 0.2 µm) taşıyıcı gaz olarak 0.7 mL

/dak akış hızında helyum kullanılarak ölçülmüştür. 1 µl örnek, bölünmüş enjeksiyon bloğuna (split oranı 20:1) enjekte edilmiştir. Giriş ve detektör sıcaklıkları 260 °C'e ayarlanacak ve fırın sıcaklığı başlangıç sıcaklığı olarak 100 °C, daha sonra dakikada 10 °C artacak şekilde 250 °C'ye çıkarılacak ve 3 dakika bu sıcaklıkta tutulacak şekilde programlanmıştır. Yağ asidi metil esterleri, özgün standartlarla kromatografik karşılaştırma yoluyla tanımlanmıştır (Isleten-Hosoglu et al., 2013).

3.2.9 İstatistiksel Analiz:

Gerçekleştirilecek tüm deneyler en az iki tekrarlı olacak şekilde tasarlanmış olup, deney gruplarından en az üçer örnek test edilmiştir (n=3). Yapılacak sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ve standart sapmalar rapor edilerek, deney grupları arasındaki istatistiksel farklar ANOVA (varyans analizi) yöntemi ile %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Gerekliğinde istatistiki karşılaştırma için GraphPad 8.1 programı kullanılmıştır.

3.2.10 Kuru Hücre Ağırlığı Tayini

Whatman GF/C (Whatman glass microfibre filters, 1,2 µm, 47 mm) filtre kâğıtları 105 °C'deki etüvde 2 saat kurutulup, 20 dakika desikatörde bekletildikten sonra analitik terazide tartılıp darası alınmıştır. 2.5 mL'lik örnekler filtre edildikten sonra filtrat 2,5 mL saf su (pH 7) ile yıkanmıştır. Hücrelerin bulunduğu filtre kâğıtları 105 °C'deki etüvde 2 saat kurutulup, 20 dakika desikatörde bekletilecek ve analitik terazide tartılmıştır (Teker, 2022).

3.2.11 Türbidite

680 nm optik yoğunlukta spektrofotometrede hücre kültürünün absorbansları ölçülmüştür.

3.2.12 Hücre Sayımı

Mikroskopik hücre sayımı Neubauer kamarası kullanılarak yapılmıştır. Kamaranın üzerinde lamelin oturacağı yer hafifçe ıslatılmış ve lamel kamara üzerine hiç hareket etmeyecek şekilde yapıştırılmıştır. Sayılacak örnek homojenize edildikten sonra, pastör pipeti (145 mm, 250/µk) ile bir miktarı alınarak sayıma hazır hale getirilen kamaraya dikkatlice doldurulmuş ve hücrelerin tüm kamara alanına homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra sayım işlemine geçilmiştir. Sayım işlemi dört kez tekrar edildikten sonra ortalaması alınarak mL'deki hücre sayısı hesaplanmıştır (Cirik ve Gökpınar, 1993). Neubauer kamarasındaki 9 adet 1 mm²'lik kareler farklı şekillerde bölünmüştür. Kamaranın total hacmi 9x10⁻⁴ mL'dir.

3.2.13. Büyüme Hızı Hesaplamaları (Becker, 1995)

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\Delta t}$$

μ ; Spesifik büyüme hızı

x_2 ; t_2 zamanındaki hücre konsantrasyonu

x_1 ; t_1 zamanındaki hücre konsantrasyonu

$\Delta t = t_2 - t_1$

$$D.T = \frac{\ln 2}{\mu}$$

D.T ; İkilene süre

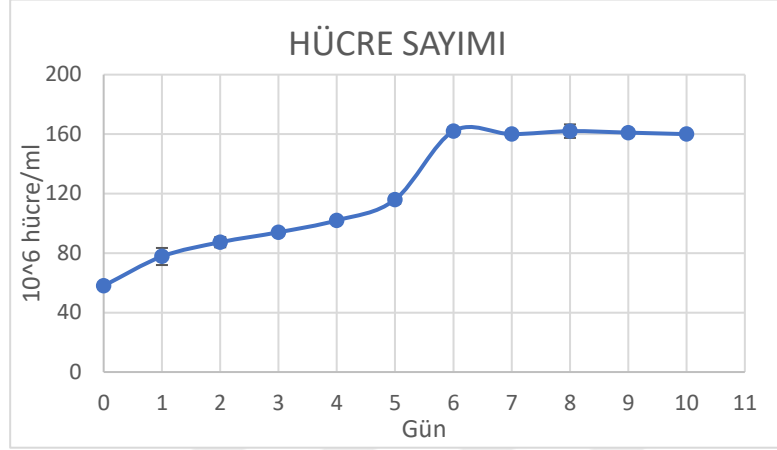
Büyüme hızı hesaplamalarında üretim periyodunun 0. gününde sistemin kurulması için harcanan zaman ve hücrelerin yeni koşullara adapte olma süreci dikkate alınarak 0. gün hesaplamalara ilave edilmemiştir. Ayrıca denemeler sırasında üretim periyodunda ulaşılan maksimum değer x_2 olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Azotsuz N8 Besin Ortamında Mikroalgal Üretim

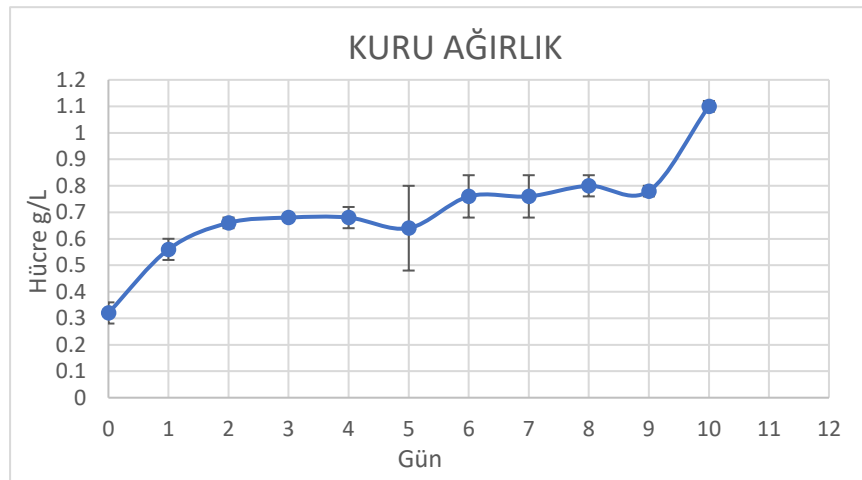
Hücreler, 7 L'lik panel PBR'de 6 L azot içermeyen N-8 kültür ortamında inoküle edilmiştir. Panel Fotobiyoreaktör 5 L/dak sürekli hava akış hızıyla 22 ± 2 °C sıcaklıkta 10 günlük bir süre boyunca 80 ± 2 µmol foton m⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğunda

çalıştırılmıştır.10 günlük üretim süresince her gün 6 L Panel biyoreaktörden örnekler alınarak incelenmiş ve elde edilen verilerle büyüme grafikleri oluşturulmuştur.



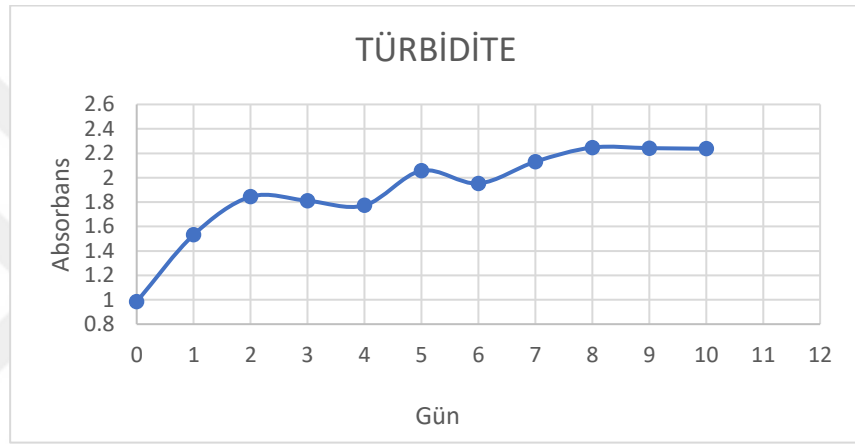
Şekil 4.1: Azotsuz N8 ile *Chlorococcum novae angliae* üretiminde hücre sayım değerleri.

Şekil 4.1’de, hücre sayısının günler boyunca izlediği büyüme eğrisi gösterilmektedir. İlk günlerde hücre sayısında kademeli bir artış gözlemlenmiş, 6. güne kadar hücre sayısı hızla artarak maksimum seviyeye ulaşmıştır. 6. günden itibaren ise büyüme hızı azalmış ve hücre sayısı sabitlenmiştir. Bu durum, kültür ortamında başlangıçta uygun koşullar altında hücrelerin hızla çoğaldığını, ancak belirli bir noktadan sonra besin sınırlamaları veya atık birikimi gibi faktörler nedeniyle büyümenin durduğunu ve dengeye ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.2: Azotsuz N8 ile *Chlorococcum novae angliae* üretiminde kuru ağırlık ölçümleri

Şekil 4.2’de, hücrelerin kuru ağırlığının ilk 4 gün boyunca istikrarlı bir artış gösterdiği gözlemlenmektedir. 4. günden itibaren kuru ağırlık artışı yavaşlamış ve 7. güne kadar nispeten sabit kalmıştır. Bu dönem, hücrelerin büyüme hızının azaldığını ve durağan faza girdiğini işaret etmektedir. 7. günden itibaren ise hücrelerin kuru ağırlığında hafif dalgalanmalar gözlemlenmiş, ancak 10. günde belirgin bir artış yaşanarak kuru ağırlık 1,1 g/L seviyesine ulaşmıştır. Bu artış, muhtemelen hücrelerin metabolik aktivitesindeki değişim veya besin kullanımındaki verimlilik artışıyla ilişkilendirilebilir.



Şekil 4.3: Azotsuz N8 ile *Chlorococcum novae angliae* üretiminde türbidite değerleri

Şekil 4.3’de, Türbidite değerleri, ilk günlerde hızlı bir artış göstermiş ve 2. günde yaklaşık 1,8 absorbans birimine ulaşmıştır. Bu artış, kültürdeki hücre yoğunluğunun hızla arttığını, yani hücrelerin hızlı bir büyüme dönemi geçirdiğini göstermektedir. 2. günden sonra türbidite değerlerinde nispeten stabil bir seyir izlenmiştir. 5. güne kadar türbidite değerleri 2,2 absorbans birimine kadar çıkmış, ancak ardından 6. ve 7. günlerde hafif bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu dalgalanma, hücre büyüme hızındaki değişiklikleri veya olası hücre ölümünü işaret edebilir. 7. günden sonra türbidite değerleri tekrar hafif bir artış göstererek 2,4 absorbans birimine kadar çıkmış, ardından 9. günden itibaren stabilize olmuştur. Bu sabitleme, kültürdeki hücre yoğunluğunun maksimuma ulaştığını ve büyümenin durağan faza geçtiğini göstermektedir.

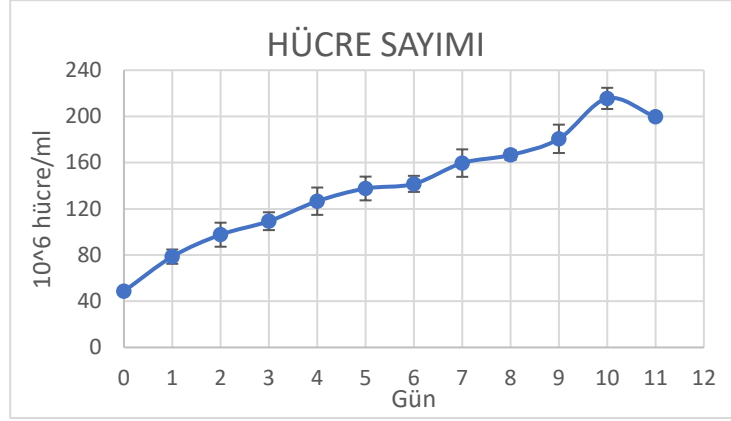
Hücre sayısının 6. güne kadar hızla artması ve ardından büyümenin yavaşlayarak sabitlenmesi, genellikle mikroalg üretiminde gözlemlenen bir

fenomendir. Bu durum, kültür ortamında besinlerin tükenmesi veya atık maddelerin birikmesi nedeniyle hücrelerin büyüme hızında bir yavaşlama yaşandığını ve hücrelerin durağan faza geçtiğini göstermektedir. Benzer şekilde, farklı bir çalışmada, kültür ortamında besinlerin tükenmesi sonucunda hücre büyüme hızının azaldığı ve durağan faza geçişin hızlandığı bildirilmiştir (Procházková et al., 2014).

Kuru ağırlığın 4. günden itibaren sabit kalması ve 10. günde belirgin bir artış göstermesi, hücrelerin metabolik aktivitelerinde bir değişim yaşandığını veya hücrelerin besin kullanımında verimlilik kazandığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda, *Chlorococcum amblystomatis*'in büyüme sürecinde benzer bir eğilim gözlemlenmiş ve bu artışın hücrelerin metabolik adaptasyonu ve besin kullanım stratejileri ile ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir (Del Río et al., 2017). Türbidite sonuçları ise hücre yoğunluğunun hızla arttığını ve ardından bir dengeye ulaştığını göstermektedir. Türbidite değerlerindeki dalgalanmalar, hücre büyüme hızındaki değişiklikleri veya olası hücre ölümlerini işaret edebilir. Özellikle 7. günden itibaren türbiditenin stabilize olması, kültürdeki hücre yoğunluğunun maksimuma ulaştığını ve büyümenin durağan faza geçtiğini doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, Arguelles, (2022) tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde rapor edilmiştir, bu çalışmada türbidite değerlerinin kültür boyunca arttığı ve ardından belirli bir noktada stabilize olduğu belirtilmiştir.

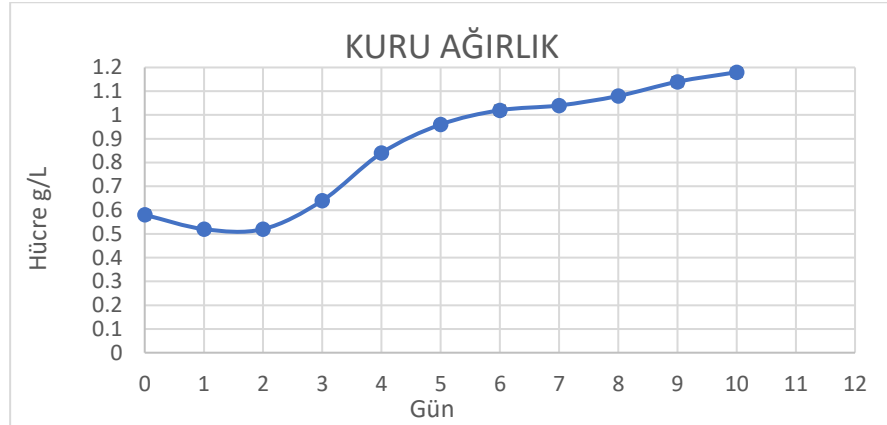
4.2 Azotlu N8 Besin Ortamında Mikroalgal Üretim

Hücreler, 7 L'lik panel PBR'de 6 L azot içeren N-8 kültür ortamında inoküle edilmiştir. Panel Fotobiyoreaktör 5 L/dak sürekli hava akış hızıyla 22 ± 2 °C sıcaklıkta 10 günlük bir süre boyunca 80 ± 2 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda çalıştırılmıştır. 11 günlük üretim süresince her gün 6 L Panel biyoreaktörden örnekler alınarak incelenmiş ve elde edilen verilerle büyüme grafikleri oluşturulmuştur.



Şekil 4.4: AzotluN8 ile *Chlorococcum novae angliae* üretiminde hücre sayımı değerleri

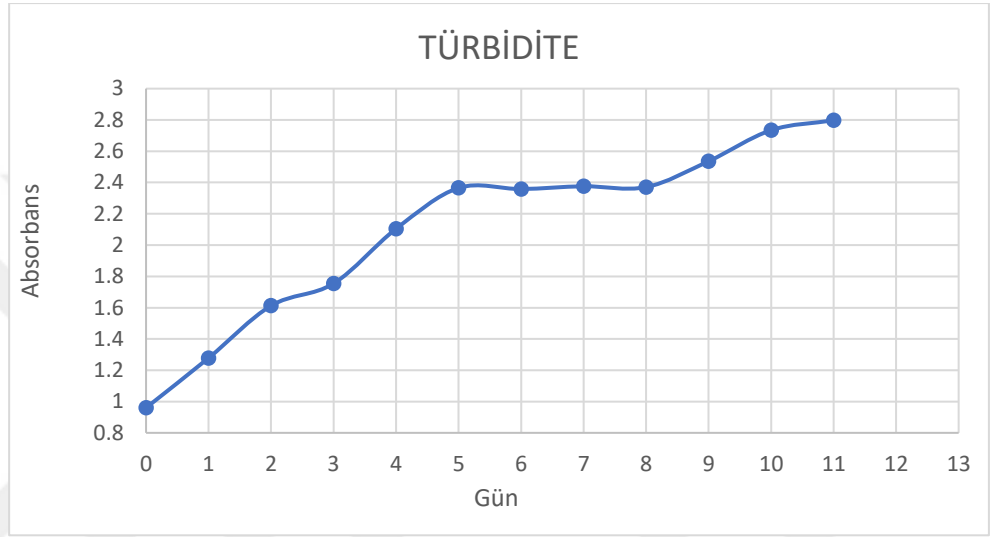
Şekil 4.4’de, hücre sayısının zamanla düzenli bir şekilde arttığını görülmektedir. İlk günlerde hücre sayısı yaklaşık 40×10^6 hücre/ml civarındadır. İlk 10 gün boyunca hücre sayısı sürekli artarak 200×10^6 hücre/ml’ye ulaşmıştır. Bu süreç, mikroalglerin logaritmik büyüme fazında olduğunu ve kültür ortamının hücre çoğalması için uygun koşulları sağladığını göstermektedir. 11. günde ise hücre sayısında hafif bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüş, hücrelerin durağan faza girdiğini, yani büyümenin yavaşladığını ve sonunda durma noktasına geldiğini işaret edebilir. Bu durum, besin maddelerinin tükenmesi, atık ürünlerin birikmesi veya kültür ortamındaki diğer stres faktörleri nedeniyle ortaya çıkabilir.



Şekil 4.5: Azotlu N8 ile *Chlorococcum novae angliae* üretiminde kuru ağırlık değerleri

Şekil 4.5’de, hücrelerin kuru ağırlığının zamanla nasıl değiştiğini görülmektedir. İlk günlerde kuru ağırlık yaklaşık 0,6 g/L seviyesindedir. 2. ve 3. günlerde hafif bir düşüş gözlemlenmiş, ancak 4. günden itibaren kuru ağırlıkta

belirgin bir artış başlamıştır. Bu artış, 6. güne kadar devam etmiş ve kuru ağırlık yaklaşık 1,0 g/L seviyesine ulaşmıştır. 6. günden itibaren kuru ağırlık artışı yavaşlamış ve 10. güne kadar nispeten sabit bir artış göstermiştir. 10. gün itibariyle kuru ağırlık 1,1 g/L seviyesine ulaşmış ve bu noktada dengeye oturmuştur. Bu, hücre büyümesinin azaldığını ve kültür ortamındaki besinlerin tükenmeye başlamasıyla birlikte büyümenin durağan faza geçtiğini göstermektedir.



Şekil 4.6: Azotlu N8 ile *Chlorococcum novae angliae* üretiminde türbidite değerleri

Şekil 4.6, kültür ortamındaki hücre yoğunluğunun zamanla nasıl değiştiğini, yani hücrelerin büyüme sürecini yansıtmaktadır. İlk günlerde türbidite değeri yaklaşık 0,8 absorbans birimi ile başlamaktadır. İlk 4 gün boyunca türbidite değeri düzenli bir artış göstermiş ve 5. gün itibariyle 2,4 absorbans birimine ulaşmıştır. Bu artış, hücre yoğunluğunun hızla arttığını ve hücrelerin büyüme döneminde olduğunu göstermektedir. 5. günden sonra, 7. güne kadar türbidite değerlerinde bir duraklama ve sabitlenme gözlemlenmiştir. Bu sabitlenme, hücre büyüme hızının azaldığını ve kültür ortamının besin kaynaklarının azalması veya atık birikimi gibi nedenlerle sınırlayıcı hale geldiğini işaret edebilir. 8.günden itibaren türbidite değerleri tekrar hafif bir artış göstermiş ve 11. gün itibariyle maksimum seviyeye, yaklaşık 2,8 absorbans birimine ulaşmıştır. Bu noktada türbidite artışı durmuştur, bu da hücre yoğunluğunun en üst düzeye ulaştığını ve büyümenin durağan faza geçtiğini gösterir.

Hücre sayısının 10. güne kadar sürekli artarak yaklaşık 200×10^6 hücre/ml seviyesine ulaşması, *Chlorococcum novae-angliae*'nin nitrojenli ortamda etkili bir şekilde büyüdüğünü göstermektedir. Bu bulgu, Procházková et al. (2014) tarafından yapılan çalışmayla uyumludur; bu çalışmada da besin maddelerinin yeterli olduğu ortamlarda mikroalglerin hızlı bir büyüme gösterdiği ve hücre yoğunluğunun zamanla arttığı belirtilmiştir. 11. günde gözlemlenen hücre sayısındaki hafif düşüş ise, hücrelerin besin eksikliği veya diğer stres faktörleri nedeniyle durağan faza geçtiğini düşündürmektedir. Kuru ağırlık verileri, hücre büyüme sürecini yansıtan önemli bir parametre olarak öne çıkmaktadır. Kuru ağırlığın 6. güne kadar artış göstermesi ve ardından 10. günde dengeye ulaşması, hücrelerin büyüme performansını ve besin kullanımını optimize ettiğini göstermektedir. Del Río et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada, mikroalglerin büyüme sürecinde benzer bir eğilim gözlemlenmiş ve kuru ağırlığın, besinlerin tükenmesiyle birlikte durağan faza geçtiği belirtilmiştir. Türbidite değerlerindeki artış, kültürdeki hücre yoğunluğunun arttığını ve mikroalglerin hızlı bir büyüme dönemi geçirdiğini göstermektedir. Ancak, 5. günden itibaren türbidite değerlerinde bir duraklama ve sabitlenme gözlemlenmiştir. Bu durum, kültür ortamındaki besinlerin azalması veya atık birikimi nedeniyle hücre büyüme hızının azaldığını ve durağan faza geçildiğini düşündürmektedir. Jaiswal et al., (2024)'ün çalışmasında, benzer bir şekilde, türbidite değerlerinin büyüme süreci boyunca artış gösterdiği ve belirli bir noktada stabil hale geldiği rapor edilmiştir. 11. günde türbiditenin maksimum seviyeye ulaşması, hücre yoğunluğunun en üst düzeye çıktığını ve büyümenin durduğunu göstermektedir.

4.3 *Chlorococcum Novae Angliae*'nin Büyüme Kinetiği

Azot sağlanan kültür ortamında yetiştirilen *Chlorococcum sp.*, $2,16 \pm 8,18 \times 10^8$ hücre/mL ile en yüksek hücre sayısına ulaşmış ve spesifik büyüme hızı (μ) $0,55 \text{ d}^{-1}$ olarak kaydedilmiştir (Tablo 4.1). Bu değer, azot yoksunluğu altında yetiştirilen hücrelere kıyasla %26 daha yüksektir. Azot sağlanan koşullarda büyüme hızındaki artış, azotun hücre çoğalmasını desteklemedeki ve mikroalglerin genel sağlığını korumadaki kritik rolünü vurgulamaktadır. Üretim boyunca hem hücre sayısı hem de optik yoğunluk ölçümlerinde tutarlı sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu tutarlılık, azot mevcudiyetinin hücre büyümesi üzerindeki olumlu etkisini daha da

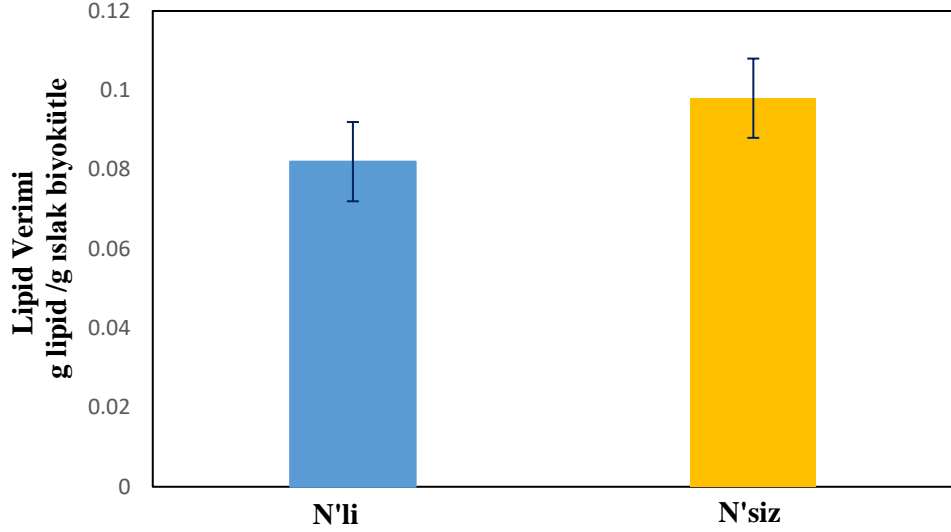
doğrulamaktadır. Ayrıca, beklendiği gibi, azot mevcudiyeti ile biyokütle verimliliği arasında pozitif bir korelasyon vardır (Tablo 4.1). Azot sağlanan kültür ortamında biyokütle konsantrasyonu $1,18 \pm 0,03$ g/L'ye ulaşmış olup, bu değer azot yoksunluğu ortamındaki biyokütle konsantrasyonundan %22 daha yüksektir. Diğer bir deyişle, azot yoksunluğu kültür ortamı kullanıldığında biyokütle konsantrasyonu kademeli olarak azalmıştır. Bu düşüş, muhtemelen hücrel metabolizmayı ve biyokütle oluşumunu kısıtlayan önemli bir besin maddesinin eksikliğine bağlanabilir. Sonuçlar, azot mevcudiyetinin *Chlorococcum* sp.'nin büyümesi ve verimliliği üzerinde önemli bir rol oynadığını açıkça göstermektedir.

Tablo 4.1 *C. novae-angliae*'nin panel PBR'deki büyüme kinetiği sonuçları.

Kinetic results	N'li üretim	N'siz Üretim
Kuru Ağırlık (g L ⁻¹)	1,18±0,02	0,92±0,03
Biyokütle verimi (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0,12	0,10
Spesifik Büyüme Hızı (μ, d ⁻¹)	0,55	0,23
İkilenme Süresi (d)	2,77	3
Lipid Verimi (g lipid g ⁻¹ ıslak biyokütle)	0,082±0,010	0,098±0,012
Hücre Sayısı (10 ⁶ hücre/ml)	160	215,6

4.3. Besin ortamındaki azot varlığının yağ asidi profiline etkisi

Çalışmanın ilk aşamasında, *Chlorococcum novae-angliae*'nin büyüme performansı farklı kültür koşulları ile değerlendirildi. Şekil 4.7, azotsuz kültür ortamında lipid veriminin $0,098 \pm 0,012$ g lipid/g yaş biyokütle olduğunu ve bu değer, azotlu kültür ortamında gözlemlenen $0,082 \pm 0,01$ g lipid/g yaş biyokütle lipid verimine kıyasla nispeten daha yüksek olduğunu göstermektedir. Azotlu kültür ortamı ile azotsuz kültür ortamı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu bulgu, azotsuz besin ortamında *Chlorococcum* sp.'de lipid birikimini artırdığını göstermektedir. Azot eksikliği, büyük olasılıkla mikroalglerde bir stres yanıtını tetikleyerek, besin kıtlığına karşı başa çıkma stratejisi olarak lipid üretimini artırmaktadır.



Şekil 4.7: Azotlu ve azotsuz üretimlerde elde edilen lipid verimi

Ayrıca azotun etkisini görebilmek için, *C. novae-angliae*'nin yağ asidi profili değerlendirildi, Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, azotsuz ortamda yetiştirilen mikroalglerde doymuş yağ asitleri (SFAs) içeriği %86,532 ile oldukça yüksek bir oranda bulunmuştur. Özellikle tridekanoik asit (C13:0) ve palmitik asit (C16:0) gibi doymuş yağ asitlerinin oranı, azotsuz ortamda sırasıyla %65,747 ve %11,933 olarak tespit edilmiştir. Bu oranlar, biyoyakıt üretimi için ideal bir yağ asidi profili oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca, tekli doymamış yağ asitleri (MUFAs) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) içerikleri, azotlu kültür ortamına kıyasla azotsuz ortamda daha düşük seviyelerde gözlemlenmiştir. Örneğin, linolenik asit (C18:3n3) azotlu ortamda %9,218 iken, azotsuz ortamda %1,543 oranında bulunmuştur. Bu sonuçlar, azotsuz besin ortamında doymuş yağ asitlerinin baskın olduğu, biyoyakıt üretimi için uygun bir yağ asidi profili oluşturduğunu ortaya koymaktadır. (Rehman & Anal, 2019).

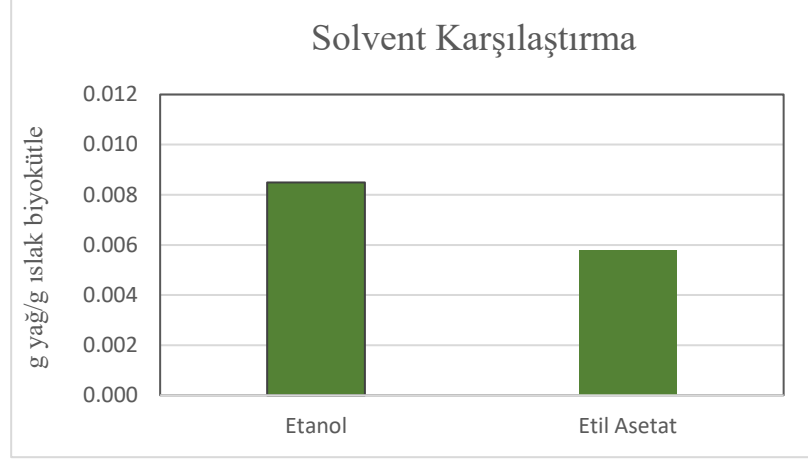
Tablo 4.2 *C. novae-angliae*'nin farklı kültür ortamlarındaki yağ asidi içeriği.

Yağ asidi metil esterleri (FAMES)	Sembol	N'li üretim (%)	N'siz üretim (%)
Doymuş Yağ Asitleri (SFAs)		81,311	86,532
Kaprilik asit	C8:0	2,749±0,24	2,926±0,19
Tridekanoik asit	C13:0	61,081±7,86	65,747±8,62
Pentadekanoik asit	C15:0	0,144±0,01	0,145±0,08
Palmitik asit	C16:0	10,757±3,14	11,933±2,93
Stearik asit	C18:0	3,341±1,852	3,261±1,34
Arakidik asit	C20:0	3,239±2,042	2,520±0,24
Tekli Doymamış Yağ Asitleri (MUFAs)		5,817	9,580
Palmitoleik asit	C16:1	0,671±0,02	2,012±0,03
cis-10-heptadekanoik asit	C17:1	0,403±0,01	1,774±0,07
Oleik asit	C18:1	4,023±0,60	5,345±0,66
Erusik asit	C22:1	0,346±0,01	0,188±0,01
Nervonik asit	C24:1	0,374±0,04	0,261±0,01
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (PUFAs)		12,872	3,888
Linoleik asit	C18:2	3,654±0,41	2,345±0,21
Linolenik asit	C18:3n3	9,218±0,32	1,543±0,08
Toplam		100	100

4.4 *Chlorococcum novae-angliae* Ekstraksiyon Optimizasyonu

4.4.1 Ultrasonik Destekli Lipid Ekstraksiyon (UAE) Optimizasyonu

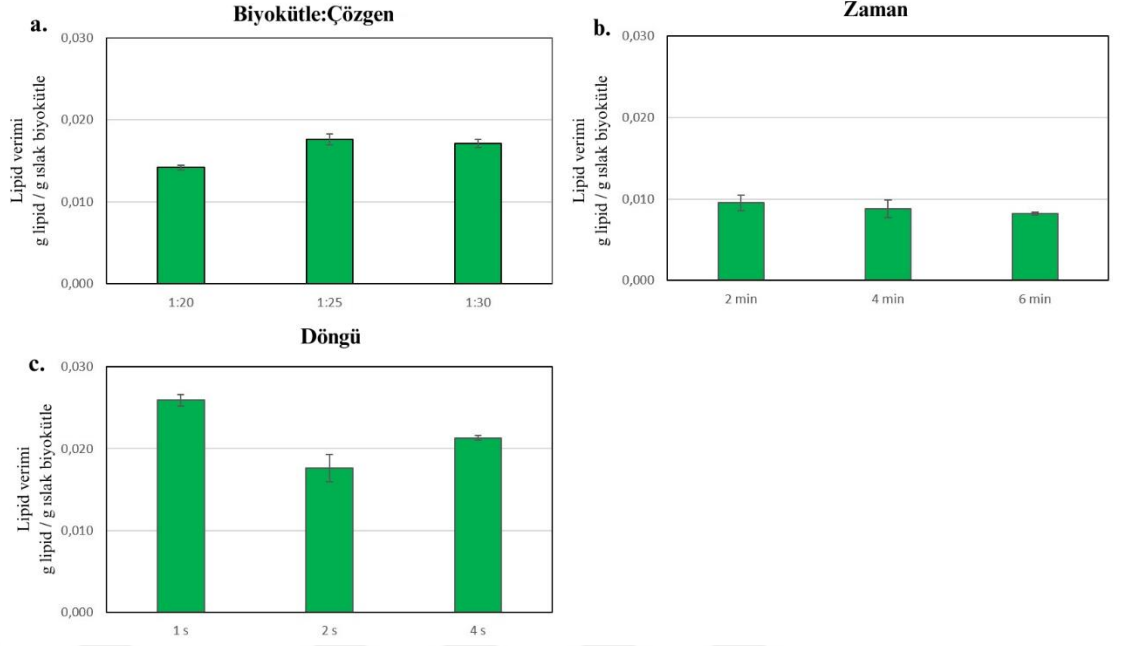
Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) sürecinin optimizasyonu, solvent seçimi, biyokütle-çözücü oranı, süre ve döngü değişkenleri üzerinde yoğunlaşmıştır.



Şekil 4.8: UAE’de Solvent Seçimi.

İlk olarak etanol ve etilasetat çözenleri 1:25 biyokütle:solvent oranı, 180 W güç, 20 Khz, 2 saniye döngü çalışma koşulları altında karşılaştırılmıştır. Yapılan deneme sonucu etanol verimi daha yüksek bulunmuş ve sonraki denemelerde solvent olarak etanol kullanılmıştır. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi, etanol solventi, etil asetata kıyasla daha yüksek bir yağ verimi sağlamıştır (0,0085 g yağ/g ıslak biyokütle). Bu sonuç, etanolün yağ ekstraksiyonu için daha etkin bir çözücü olduğunu göstermektedir.

Biyokütle-çözücü oranı (Şekil 4.9a) açısından, 1:25 oranı ile en yüksek lipid verimi elde edilmiştir ve bu değer $0,018 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütle olarak kaydedilmiştir. Bu oran, 180 W güç, 20 kHz frekans ve 2 saniye döngü ile 2 dakika süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 1:25 biyokütle-çözücü oranının, biyokütle miktarı ve çözücü hacmi arasında dengeli bir ilişki sağladığını ve böylece *C. novae-angliae*’nin yaş biyokütlesinden etkin lipid ekstraksiyonu yapıldığını göstermektedir. 1:20 oranı ise en düşük verimi göstermiştir, bu durum biyokütle yoğunluğunun çok yüksek olmasının, çözücünün etkin şekilde nüfuz etmesini engelleyebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.9: UAE optimizasyonu: a: Biyokütle Çözgen oranı, b: Zaman, c. Döngü.

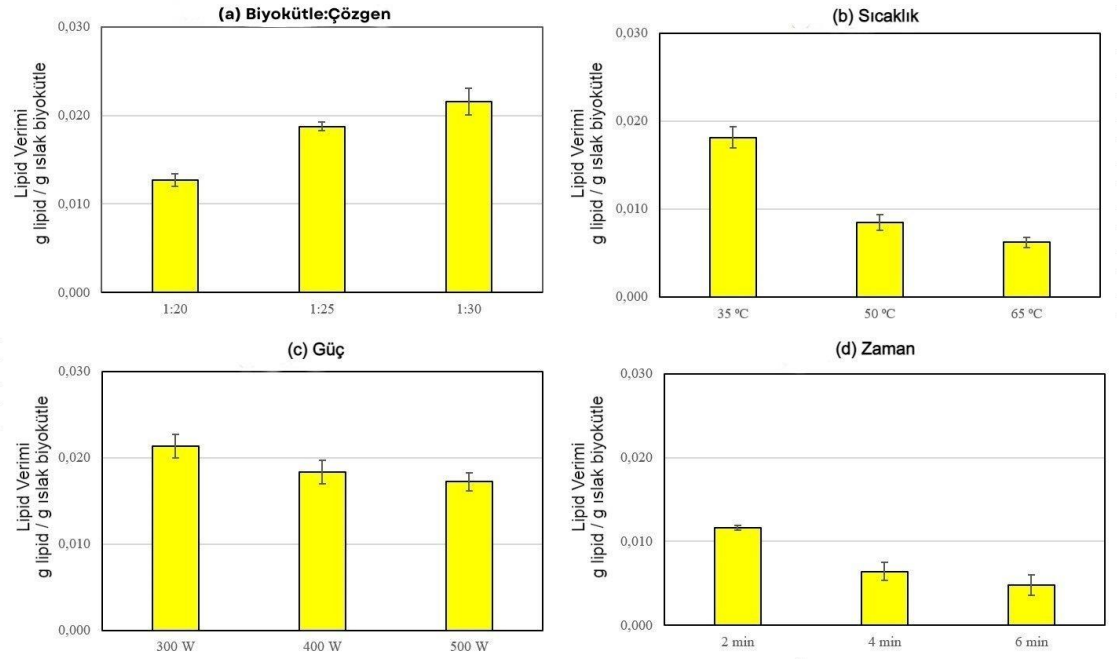
Süre (Şekil 4.9 b) değişkenine odaklanıldığında, 2 dakika süresince yapılan ekstraksiyonun, 6 dakika süren işlemlere kıyasla lipid içeriğini 1,16 kat artırdığı gözlemlenmiştir. Bu da daha kısa sonikasyon süresinin, daha uzun süreye göre daha yüksek lipid verimi sağladığını göstermektedir. 1 saniyelik döngüde, 2 saniyelik döngüye göre %46 daha yüksek bir lipid verimi ($0,026 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütle) elde edilmiştir. Kısa döngüler (Şekil 4.9 c), numunenin yoğun sonikasyona maruz kaldığı süreyi en aza indirerek aşırı ısınma ve biyolojik aktif bileşenlerin bozulma riskini azaltabilir. Bu bulgular, daha önceki araştırmalarla uyumludur ve sonikasyon kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda lipid içeriğinin arttığını göstermektedir. Shen et. al (2023) çalışmasında belirtildiği gibi, ultrasonik destekli ekstraksiyon sürecinde parametrelerin optimize edilmesi önemlidir, çünkü birçok faktör bu sürecin etkinliğini etkileyebilir. Bu çalışmada ideal koşullar; 1:25 biyokütle-çözücü oranı, 1 saniyelik döngü, 180 W güç, 20 kHz frekans ve etanol kullanılarak 2 dakika süresince gerçekleştirilen ekstraksiyon olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda *C. novae-angliae*'den $0,026 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütle verimi elde edilmiştir.

4.4.2 Mikrodalga Destekli Lipid Ekstraksiyonu (MAE) Optimizasyonu

Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE) sürecinde biyokütle-çözücü oranının lipid ekstraksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiş, çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Yapılan deneylerde, 1:20, 1:25 ve 1:30 biyokütle-çözücü oranları kullanılmış ve en yüksek lipid verimi ($0,022 \pm 0,002$ g lipid/g yaş biyokütle) 1:30 oranında elde edilmiştir (Şekil 4.10 a). Biyokütle-çözücü oranının artırılması, çözücünün biyokütle boyunca daha etkin şekilde dağıtılmasını sağlamış ve bu da lipid çözünürlüğünü ve ekstraksiyon verimliliğini artırmıştır.

Ekstraksiyon sıcaklığının lipid verimi üzerindeki rolü de incelenmiştir (Şekil 4.10 b). 35, 50 ve 65 °C sıcaklıklarında yapılan ekstraksiyonlarda, sıcaklığın artırılmasıyla lipid veriminde düşüş gözlemlenmiştir. 35 °C'de $0,018 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütle olarak kaydedilen verim, 65 °C'de $0,006 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütleyle düşmüştür. Yüksek sıcaklıklar, lipidlerin bozunmasına veya uçucu hale gelmesine neden olarak verimi azaltabilir.

Mikrodalga gücü açısından yapılan deneylerde (Şekil 4.10c), 300 W, 400 W ve 500 W güçleri değerlendirilmiştir. Maksimum lipid verimi 300 W'da ($0,021 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütle) kaydedilmiş, en düşük verim ise 500 W'da ($0,017 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütle) elde edilmiştir. Bunun sebebi daha yüksek güç seviyeleri kullanımında, sıcaklığın aşırı artabilmesi ve lipidlerin veya diğer bileşenlerin termal bozulmasına yol açabilmesidir (Georgiopoulou et al., 2023). Bu bulgular ışığında en yüksek lipid verimini elde etmek için, 1:30 biyokütle-çözücü oranı, 300 W güç, 35 °C sıcaklık ve 2 dakikalık ekstraksiyon süresi ile etanol kullanılarak mikrodalga destekli ekstraksiyon koşulları en uygun parametreler olarak belirlenmiştir.

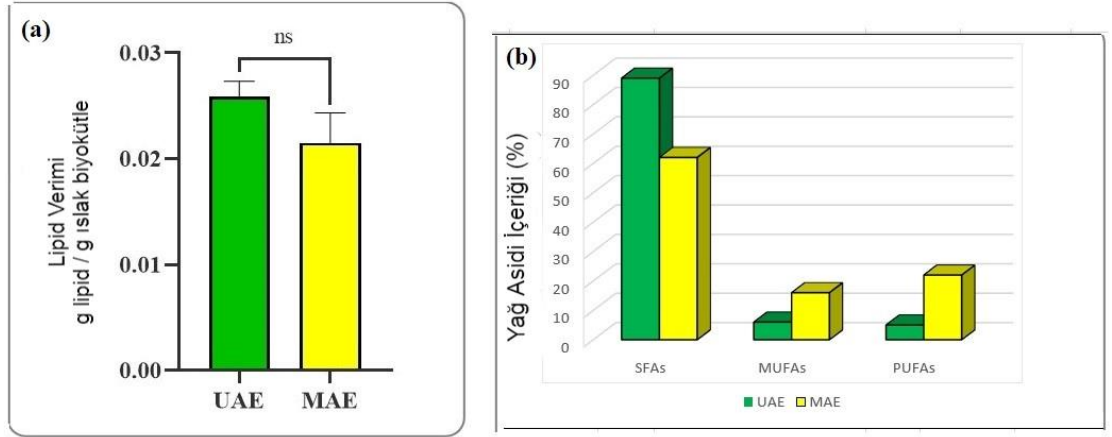


Şekil 4.10: MAE optimizasyonu: (a) Biyokütle:Çözgen, (b) Sıcaklık, (c) Güç ve (d) Zaman.

4.5 Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) ve Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE) ile Lipid Ekstraksiyonunun Karşılaştırılması

UAE ve MAE yöntemleri kullanılarak yapılan lipid ekstraksiyonu çalışmaları, iki yöntemin lipid verimi ve yağ asidi profili üzerindeki etkilerini karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, UAE'nin daha yüksek lipid verimi sağladığını (Şekil 4.11 a) ve SFA'ların oranını artırdığını göstermiştir. MAE ise daha yüksek PUFA oranı ile öne çıkmıştır (Şekil 4.11b).

UAE yöntemi, düşük enerji tüketimi ve kısa işlem süresi ile ön plana çıkarken, yüksek SFA oranlarıyla biyoyakıt üretimi için uygun bir profil sunmaktadır. Buna karşılık, MAE yöntemi daha yüksek PUFA içeriği ile özellikle gıda ve sağlık sektörleri için uygun bileşikler sağlamaktadır. Bu bulgular, her iki yöntemin farklı endüstriyel uygulamalar için uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11: Optimal koşullar altında Ultrasonik destekli ekstraksiyon süreci ve Mikrodalga destekli ekstraksiyon süreci: (a) Lipid verimi; (b) Yağ asidi profili.

Tablo 4.3, palmitik asidin (C16:0) en yaygın doymuş yağ asidi olduğunu (% $49,19 \pm 3,4$) ve bunu % $21,53 \pm 2,44$ ile stearik asidin (C18:0) izlediğini göstermektedir. Bu oranlar, UAE yöntemi için geçerli olup, MAE yöntemi için bu yağ asidi içerikleri yaklaşık %55 daha düşük olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Tekli doymamış yağ asitleri (MUFAs) arasında oleik asit (C18:1) MAE yöntemi için en yaygın olarak bulunmuş ve % $13,93 \pm 1,94$ oranında tespit edilmiştir. Ayrıca, MAE yönteminde linoleik asit (C18:2) ve linolenik asit (C18:3) gibi önemli miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFAs) tespit edilmiştir. Veriler, yağ asidi kompozisyonu açısından UAE ve MAE arasındaki farklılıkları, özel ekstraksiyon koşullarından kaynaklanan farklarla ortaya koymaktadır. Ultrasonik dalgaların yüksek yoğunluğu, belirli yağ asidi türlerinin seçici olarak ekstrakte edilmesine yol açabilir (Kumar et al., 2021), bu da daha stabil doğaları nedeniyle doymuş yağ asitlerini tercih edebilir. Öte yandan, PUFAs, oksidasyona ve bozulmaya daha yatkındır (Tao, 2015). Ultrasonik ekstraksiyon sırasında oluşan kavitasyon ve ısı, PUFAs'in bozulmasına neden olabilir ve bu da ekstrakte edilen lipitte bu yağ asitlerinin daha düşük bir oranda bulunmasına yol açar (Shen et al., 2023). Mikrodalga ekstraksiyonu, genellikle ultrasonik ekstraksiyona kıyasla daha kontrollü bir ısıtma sağlar, bu da PUFAs gibi hassas bileşiklerin bütünlüğünün korunmasına yardımcı olabilir.

Tablo 4.3 Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ile elde edilen yağ asidi içerikleri.

Yağ Asidi Metil Esterleri (FAMES)	Sembol	UAE (%)	MAE (%)
Doymuş Yağ Asitleri (SFAs)		88,984	61,527
Kaprilik asit	C8:0	5,310±0,95	8,065±1,48
Kaprik asit	C10:0	0,899±0,04	2,163±0,34
Laurik asit	C12:0	ND	1,461±0,16
Tridekanoik asit	C13:0	2,415±0,32	0,905±0,06
Miristik asit	C14:0	4,962±0,68	2,019±0,28
Pentadakanoik asit	C15:0	1,093±0,08	ND
Palmitik asit	C16:0	49,187±3,42	24,103±2,16
Heptadekanoik asit	C17:0	1,844±0,18	0,748±0,05
Stearik asit	C18:0	21,529±2,44	6,697±1,14
Arakidik asit	C20:0	0,654±0,05	12,095±1,82
Behenik asit	C22:0	1,091±0,08	1,751±0,19
Lignoserik asit	C24:0	ND	1,520±0,21
Tekli Doymamış Yağ Asitleri (MUFAs)		5,739	16,492
Miristoleik asit	C14:1	0,777±0,04	ND
Palmitoleik asit	C16:1	1,435±0,11	1,003±0,07
cis-10-heptadekanoik asit	C17:1	0,432±0,02	1,561±0,12
Oleik asit	C18:1	3,095±0,44	13,928±1,94
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (PUFAs)		5,278	21,981
Linoleik asit asit	C18:2	0,288±0,01	4,630±0,66
Linolenik asit	C18:3n3	0,546±0,02	3,159±0,52
cis-11,14-eikosadienoik asit	C20:2	1,178±0,09	1,556±0,14
cis-8,11,14-eikosatrienoik asit	C20:3n3	1,022±0,08	1,966±0,19
cis-11,14,17-eikosatrienoik asit	C20:3n6	0,977±0,07	ND
cis-13,16-dokosadienoik asit	C22:2	1,267±0,12	2,739±0,31
cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksaenoik asit	C22:6	ND	7,931
Toplam		100	100

Not: ND = tespit edilmedi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma, *Chlorococcum novae-angliae* mikroalginin biyoyakıt üretimi için potansiyel bir kaynak olarak değerlendirilmesi ve bu süreçte kullanılan çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin verimliliğinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, hem Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (UAE) hem de Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE) yöntemlerinin farklı avantajlar sunduğunu ortaya koymaktadır.

5.1 Nitrojen Sınırlaması ve Lipid Birikimi

C. novae-angliae'nin lipid üretiminde nitrojen sınırlamasının önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Azotsuz besin ortamında, $0,098 \pm 0,012$ g lipid/g yaş biyokütle verimi ile en yüksek lipid üretimi elde edilmiştir ve bu lipitlerin %77'si tridekanoik ve palmitik asitlerden oluşmuştur. Buna karşılık, en yüksek biyokütle konsantrasyonu $1,18 \pm 0,03$ g/L azotlu kültür ortamında elde edilmiştir. Bu bulgular, hücre büyümesi ile lipid üretimi arasında bir denge kurmanın önemini vurgulamaktadır. Yüksek lipid veriminin kritik olduğu biyoyakıt üretimi gibi uygulamalar için azotsuz besin ortamı daha etkili bir strateji olabilir. Ancak, hayvan yemi gibi daha yüksek biyokütle gerektiren uygulamalar için yeterli azot seviyelerinin korunması daha avantajlıdır.

5.2 Lipid Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Verimliliği

UAE yöntemi ile en yüksek lipid verimi $0,026 \pm 0,001$ g lipid/g yaş biyokütle olarak elde edilmiştir. Bu verim, 1:25 biyokütle-çözücü oranı, 2 dakikalık ekstraksiyon süresi, 1 saniyelik döngü ve 180 W güç kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında elde edilen lipid verimi, MAE yöntemi ile elde edilen verimden %21 daha fazladır. MAE yöntemi ise 1:30 biyokütle-çözücü oranı, 2 dakikalık ekstraksiyon süresi, 300 W güç ve 35 °C sıcaklık kullanılarak optimize edilmiştir. Her iki yöntem de farklı yağ asidi profilleri sunmakta olup, UAE daha yüksek doymuş yağ asitleri (SFA) oranı sağlarken, MAE daha yüksek çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içeriği sağlamıştır. Bu durum, her iki yöntemin farklı endüstriyel uygulamalar için uygun olduğunu göstermektedir.

5.3 Yağ Asidi Profili ve Ekstraksiyon Yöntemlerinin Etkisi

UAE ve MAE yöntemleri, yağ asidi profilleri açısından farklılıklar göstermektedir. UAE yöntemi ile elde edilen lipidler, daha yüksek oranda doymuş yağ asitleri (SFA) içerirken, MAE yöntemi ile elde edilen lipidler, daha yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içermektedir. UAE'nin yüksek yoğunluklu ultrasonik dalgaları, belirli yağ asitlerinin seçici olarak ekstrakte edilmesine yol açabilirken, MAE yöntemi daha kontrollü bir ısıtma sağlayarak hassas bileşiklerin, özellikle de PUFA'ların, bütünlüğünü korumaktadır. Her iki yöntemin de yağ asidi kompozisyonu üzerindeki etkisi, ekstraksiyon süreçlerinin doğası gereği farklılık göstermektedir. Bu durum, yağ asitlerinin endüstriyel kullanım alanlarına yönelik spesifik ekstraksiyon yöntemlerinin seçilmesinin önemini vurgulamaktadır.

5.4 Gelecek Çalışmalar ve Öneriler

Bu çalışma, UAE ve MAE yöntemlerinin endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğini ve optimize edilmiş süreçlerini araştırmak için önemli bir temel sunmaktadır. Ancak, *C. novae-angliae* kullanılarak büyük ölçekli biyodizel üretiminin ekonomik fizibilitesi hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, bu süreçlerin maliyet analizlerine ve ölçek büyütme çalışmalarına odaklanabilir. Ayrıca, azotsuz besin ortamında lipid birikimini artırmak için genetik veya metabolik mühendislik yaklaşımlarının potansiyeli tam olarak keşfedilmemiştir. Bu alandaki çalışmalar, lipid verimlerini artırmak için genetik modifikasyonların nasıl iyileştirilebileceğini araştırabilir. Bu boşlukların giderilmesi, *Chlorococcum sp.*'nin biyodizel üretimi için etkin bir şekilde kullanılmasına yönelik daha ayrıntılı ve pratik bir anlayış sağlayabilir.

Sonuç olarak, yeşil ekstraksiyon parametrelerinin optimize edilmesi, verimi maksimize ederken enerji tüketimini minimize etmek için önemlidir. Ekstraksiyon ekipmanlarında, sürecin verimliliğini ve çevresel parametreleri izlemek için gerçek zamanlı izleme sistemlerinin dahil edilmesi gerekmektedir. Süreçlerin başlangıcından sonuna kadar çevresel etkilerini değerlendirmek için kapsamlı yaşam döngüsü değerlendirmeleri (LCA) yapılmalıdır. Bu tür yaklaşımlar, sürdürülebilir kalkınma hedefleri doğrultusunda biyoyakıt üretimi ve diğer

biyoteknolojik uygulamalar için daha çevre dostu ve verimli ekstraksiyon süreçlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Arguelles, E. D. L. R., 2022, Nitrogen Starvation Induced Lipid Accumulation by *Chlorococcum infusionum* (EAU-10) as Potential Renewable Source of Lipid for Biodiesel Production, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(5), 1931 p.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N. ve Omar, A. K. M., 2013, Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review, *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436 p.
- Bhagavathy, S., Sumathi, P. ve Madhushree, M., 2011, Antimutagenic Assay of Carotenoids from Green Algae *Chlorococcum humicola* using *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA102, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1(4), 308-316 p.
- Blackwell, J. R., Cox, E. J. ve Gilmour, D. J., 1991, The Morphology and Taxonomy of *Chlorococcum submarinum* (Chlorococcales) Isolated from a Tidal Rockpool, *British Phycological Journal*, 26(2), 133-139 p.
- Borowitzka, M. A. ve Moheimani, N. R., (yıl yok), *Algae for Biofuels and Energy*, Springer, New York, 7591 p.
- Brondz, I., 2017, Influence of Modifiers, Extractants, and Trappers on Lipid Composition with Liquids in Standard State Extraction, Supercritical Fluid Extraction and Trapping by Supercritical Fluid Extraction, Part II, *International Journal of Analytical Mass Spectrometry and Chromatography*, 05(04), 87-95 p.
- Çalışkan, E. ve Haznedaroğlu, B. Z., 2022, Characterization of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acid Accumulation in *Chlorococcum novae-angliae* Microalgae Grown under Various Culture Conditions, *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 5(3), 346-369 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cecilia, ", Eskilsson, S. ve Bjorklund, E., 2000, Analytical-Scale Microwave-Assisted Extraction, *Journal of Chromatography A*, 902, 323-331 p.
- Del Río, E., García-Gómez, E., Moreno, J., Guerrero, M. G. ve García-González, M., 2017, Microalgae for Oil: Assessment of Fatty Acid Productivity in Continuous Culture by Two High-Yield Strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Algal Research*, 23, 37-42 p.
- Georgiopoulou, I., Tzima, S., Louli, V. ve Magoulas, K., 2023, Process Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Chlorophyll, Carotenoid and Phenolic Compounds from *Chlorella vulgaris* and Comparison with Conventional and Supercritical Fluid Extraction, *Applied Sciences (Switzerland)*, 13(4), 2740 p.
- Hakalin, N. L. S., Paz, A. P., Aranda, D. A. G. ve Moraes, L. M. P., 2014, Enhancement of Cell Growth and Lipid Content of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* sp. by Optimizing Nitrogen, Phosphorus and Vitamin Concentrations for Biodiesel Production, *Natural Science*, 06(12), 1044-1054 p.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K. ve Webley, P. A., 2011, Oil Extraction from Microalgae for Biodiesel Production, *Bioresource Technology*, 102(1), 178-185 p.
- Hamed, S., Mahdavi, M. A. ve Gheshlaghi, R., 2016, Improved Lipid and Biomass Productivities in *Chlorella vulgaris* by Differing the Inoculation Medium from the Production Medium, *Biofuel Research Journal*, 3(2), 410-416 p.
- Herrero, M., Cifuentes, A. ve Ibañez, E., 2006, Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-By-Products, Algae and Microalgae - A Review, *Food Chemistry*, 98(1), 136-148 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Isleten-Hosoglu, M., Ayyildiz-Tamis, D., Zengin, G. ve Elibol, M., 2013, Enhanced Growth and Lipid Accumulation by a New *Ettlia texensis* Isolate under Optimized Photoheterotrophic Condition, *Bioresource Technology*, 131, 258-265 p.
- Jaiswal, P. K., Nandi, B. K. ve Saxena, V. K., 2024, Potential of Coal Fly Ash as Low-Cost Culture Medium for Cultivation of Microalgae *Chlorococcum* and Sustainable Nutrient Recovery from CFA Culture Medium, *Environment, Development and Sustainability*, 26(3), 8045-8063 p.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K. ve O'Donnell, C. P., 2013, Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4667-4675 p.
- Kapooore, R. V., Butler, T. O., Pandhal, J. ve Vaidyanathan, S., 2018, Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery, *Biology*, 7(1), 1001 p.
- Kumar, K., Srivastav, S. ve Sharanagat, V. S., 2021, Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Bioactive Compounds from Fruit and Vegetable Processing By-Products: A Review, *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325 p.
- Lewis, T., Nichols, P. D. ve Mcmeekin, T. A., 2000, Evaluation of Extraction Methods for Recovery of Fatty Acids from Lipid-Producing Microheterotrophs, *Journal of Microbiological Methods*, 43, 329-337 p.
- Lucchesi, M. E., Chemat, F. ve Smadja, J., 2004, Solvent-Free Microwave Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs: Comparison with Conventional Hydro-Distillation, *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323-327 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martinez-Guerra, E. ve Gude, V. G., 2014, Synergistic Effect of Simultaneous Microwave and Ultrasound Irradiations on Transesterification of Waste Vegetable Oil, *Fuel*, 137, 100-108 p.
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V. ve Brányik, T., 2014, Effect of Nutrient Supply Status on Biomass Composition of Eukaryotic Green Microalgae, *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1359-1377 p.
- Rehman, Z. U. ve Anal, A. K., 2019, Enhanced Lipid and Starch Productivity of Microalga (*Chlorococcum* sp. TISTR 8583) with Nitrogen Limitation Following Effective Pretreatments for Biofuel Production, *Biotechnology Reports*, 21, 200298 p.
- Richard, T. L., 2010, Challenges in Scaling up Biofuels Infrastructure, *Science*, 329(5993), 793-796 p.
- Saifuddin, N., Amzar, A. B. ve P. Priatharsini, A., 2016, Improvement in Oil Extraction from Microalgae/Algae for Biodiesel Production using Microwave Assisted Oil Extraction with Methyl Ester, *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 13(4), 331-340 p.
- Sandgruber, F., Gielsdorf, A., Schenz, B., Müller, S. M., Schwerdtle, T., Lorkowski, S., Griehl, C. ve Dawczynski, C., 2023, Variability in Macro- and Micronutrients of 15 Rarely Researched Microalgae, *Marine Drugs*, 21(6), 60355 p.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A. ve Abd_Allah, E. F., 2019, Microalgae Metabolites: A Rich Source for Food and Medicine, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 709-722 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashid, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H. ve Ren, X., 2023, A Comprehensive Review of Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) for Bioactive Components: Principles, Advantages, Equipment, and Combined Technologies, *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106646 p.
- Tao, L., 2015, Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids and Its Impact on Food Quality and Human Health, *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal*, 1(6), 135-142 p.
- Teker, S., (yıl yok), Haematococcus pluvialis Flotow Mikroalginin Üretim Tesisi Planlanması ve Endüstriyel Astaksantin Üretimi, yayımlanmamış.
- Vale, M. A., Ferreira, A., Pires, J. C. M. ve Gonçalves, G. A. L., 2020, CO2 Capture Using Microalgae, *Advances in Carbon Capture: Methods, Technologies and Applications*, 381-405 p., Elsevier.
- Wang, L. ve Weller, C. L., 2006, Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants, *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300-312 p.

TEŞEKKÜR

Bu alıőma sűrecinde deęerli bilgileri ve rehberlięi ile bana yűn gűsteren danıőman hocam Doç. Dr. Esra İmamoęlu'na sonsuz teőekkűrlerimi sunarım. Kendisi, araőtırma boyunca beni her zaman desteklemiő ve bilimsel anlamda geliőimime bűyűk katkı saęlamıőtır.

Ayrıca, tez çalıőmam sűresince deęerli katkılarıyla bana destek olan ve sűrecin her aőamasında yanımda bulunan sevgili arkadaőım Buse Dinçoęlu'na teőekkűrű bir borç bilirim. Onun bilimsel katkıları ve yűnlendirmeleri, bu çalıőmanın ilerleyiőine űnemli űlűde katkı saęlamıő ve sűreci daha etkin kılmıőtır.

Son olarak, beni bu zorlu sűrete hep destekleyen, anlayıőları ve sabırlarıyla her zaman yanımda olan aileme ve tűm dostlarıma őűkranlarımı sunarım.

Ekim 2024

Alperen ALPURAL