



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



Doktora Tezi

**BIYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN SEÇİLEN MİKROALG TÜRLERİNDE
LİPİT VERİMLİLİĞİNİN OPTİMİZASYONU**

Ayça OĞUZ ÇAM

Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı

İçsu Kaynakları ve Yönetimi Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Meriç ALBAY**

**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Oya OKAY**

Haziran, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 10.06.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı, İçsu Kaynakları ve Yönetimi Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Meriç ALBAY (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi

Prof. Dr. Fatma ÇEVİK
ukurova Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Doç. Dr. Sinem ORTABOY SEZER
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. Dilek ÖZYURT
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER
UZUNER
İstanbul Üniversitesi
Fen Bilimleri Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36334 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Oğuz, A., Köker, L., Ozbayram, E. G., Akcaalan, R., & Albay, M. (2024). Biodiesel Production from *Botryococcus sudeticus* and *Chlorella vulgaris*: Assessment of Nitrogen Deficiency on Lipid, Fatty Acid Yield and Biodiesel Properties. *Waste and Biomass Valorization*, 15(5), 2757-2768.

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim sırasında bana bu konuda çalışma fırsatı veren, rehberliği, sabrı ve değerli önerileri için Sayın tez danışmanım Prof. Dr. Meriç ALBAY’a,

Tezimin uygulama ve yazım aşamasında değerli bilgilerini benimle paylaşan, her daim destek olan ve yol gösteren Sayın Hocam Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY’ ve eş danışmanım Prof. Dr. Oya OKAY ‘a

Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse tez yazım aşamasında her zaman bilgi birikimi ve manevi destekleri ile yanımda olan, Doç. Dr. Latife KÖKER DEMO, Biyolog Cansu ATAR ve Doç. Dr. Emine Gözde ÖZBAYRAM’a,

Ayrıca sağladıkları kaynaklar ve verdikleri destekler için çok değerli LİMNİST araştırma grubu araştırmacılarına,

Son olarak, hayatımın her alanında beni destekleyen, manevi destekleri, sabrı ve anlayışları ile bu tezi bitirmemi sağlayan sevgili eşim Çağatay ÇAM ve sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2024

AYÇA OĞUZ ÇAM

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1 DÜNYADAKİ ENERJİ İHTİYACI	6
2.2 BİYOYAKITLAR.....	7
2.3 BİTKİSEL YAĞLARIN BİYOYAKIT OLARAK KULLANIMI.....	8
2.4 BİYODİZEL	10
2.4.1 Biyodizel Kullanım Avantajları	11
2.4.2 Biyodizel üretimindeki zorluklar.....	13
2.5 BİYODİZEL YAKIT ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE KULLANILAN STANDARTLAR.....	14
2.5.1 FAME İçeriği.....	15
2.5.2 Yoğunluk	16
2.5.3 Viskozite.....	16
2.5.4 Setan Sayısı.....	17
2.5.5 Alevlenme Noktası	17
2.5.6 Soğuk Akış Özellikleri	18
2.5.7 Oksidasyon Kararlılığı.....	18
2.6 BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANILAN HAMMADDELER	19
2.7 MİKROALGLER.....	20
2.7.1 Biyodizel Üretiminde Kullanılan Mikroalglerin Kullanım Avantajları	21
2.7.2 Mikroalglerden Elde Edilen Değerli Kimyasal ve Biyoaktif Bileşikler.....	23
2.7.3 Mikroalglerin Lipit İçerikleri	25
2.8 MİKROALGLERDEN BİYODİZEL ÜRETİM AŞAMALARI	27

2.9. MİKROALGLERİN BİYODİZEL ÜRETİMİNE ETKİ EDEN PARAMETRELER	29
2.9.1 Tür Çeşitliliği.....	29
2.9.2 Besin Stresi Koşulları	31
<i>Azot manipülasyonu;</i>	32
2.9.3 Lipit Ekstraksiyon Yöntemi	32
2.9.4 Transesterifikasyon Yöntemi.....	35
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	37
3.1 MİKROALG TÜRLERİ	38
3.1.1 <i>Botryococcus sudeticus</i>	38
3.1.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	40
3.1.3 <i>Scenedesmus obliquus</i>	41
3.2 MİKROALGLERİN KÜLTÜR ORTAMLARININ HAZIRLANMASI.....	43
3.3 BİYOMAS MİKTARLARININ BELİRLENMESİ	44
3.4 MİKROALGLERİN HASADI	45
3.5 LİPİT EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ	45
3.6 ÖN PARÇALAMA İŞLEMLERİ.....	47
3.6.1 Ultrasonikasyon.....	48
3.6.2 Sonik Banyoda Isıtma.....	48
3.6.3. Bead Beater	48
3.7 TRANSESTERİFİKASYON İŞLEMLERİ	49
3.7.1 Geleneksel Transesterifikasyon Yöntemleri (Lipit ekstraksiyonu- Transesterifikasyonu)	51
3.7.2 İn Situ Transesterifikasyonu.....	52
3.8 YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONUNUN BELİRLENMESİ.....	53
3.9 BİYODİZELİN KALİTE ÖZELLİKLERİ	54
3.10 AZOT MANİPÜLASYON DENEYLERİ.....	55
3.11 İSTATİSTİK ANALİZLER.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1 LİPİT EKSTRAKSİYON METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	58
4.1.1 Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyon metotlarının <i>B.sudeticus</i> ve <i>S. obliquus</i> türleri üzerindeki Lipit ve FAME verimlerine Etkisi	58
4.1.2 Bligh Dyer ve Hekzan Bazlı Lipit Ekstraksiyonlarının <i>B. sudeticus</i> ve <i>C.</i> <i>vulgaris</i> Türlerinin Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi	59
4.1.3 Bligh Dyer ve Hekzan Bazlı Lipit Ekstraksiyon Yöntemlerinin <i>B.</i> <i>sudeticus</i> ve <i>C.vulgaris</i> Türlerinin Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi	61

4.2 HÜCRE ÖN PARÇALAMA İŞLEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI	62
4.2.1 Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin <i>Scenedesmus obliquus</i> Türünün Lipit Ekstraksiyon, FAME Miktar ve FAME Verim Yüzdeleri Üzerindeki Etkisi	62
4.2.2 Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin <i>Scenedesmus obliquus</i> Türünün Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi	63
4.2.2 Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin <i>Scenedesmus obliquus</i> Türünün Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi	64
4.3 FARKLI TRANSESTERİFİKASYON METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	65
4.3.1 Transesterifikasyon Metotlarının Fame İçerik Miktarı Üzerine Etkisi	65
4.3.2 Farklı Transesterifikasyon Metotlarının Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi	67
4.3.2 Farklı Transesterifikasyon Metotlarının Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi	71
4.4 AZOT MANİPÜLASYON DENEYLERİ	75
4.4.1 Kültürlerin Büyümlerinin İzlenmesi	75
4.4.2 Azot Manipülasyon Deneylerinin Lipit, FAME İçerik ve FAME Verim Yüzdeleri	76
4.4.3 Azot Manipülasyon Deneylerinin <i>Botryococcus sudeticus</i> ve <i>Chlorella vulgaris</i> Türlerinin Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi	78
4.4.4 Azot Manipülasyon Deneylerinde <i>Botryococcus sudeticus</i> ve <i>Chlorella vulgaris</i> Türlerinin Yağ Asidi Kompozisyonu ve Biyodizel Özellikleri	80
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	82
5.1. LİPİT EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	82
5.2 ÖN PARÇALAMA İŞLEMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	86
5.3 TRANSESTERİFİKASYON YÖNTEMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	87
5.4 AZOT MANİPÜLASYON DENEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	92
5.4.1 Büyüme Koşullarının Değerlendirilmesi	92
5.4.2 Lipit ve FAME İçeriklerinin Değerlendirilmesi	93
5.4.3. Yağ Asidi Profili ve Biyodizel Kalitesine Etkisinin Değerlendirilmesi	95
KAYNAKLAR	101
EKLER	127
ÖZGEÇMİŞ	128

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: 2000-2022 yılları arasında kullanılan yakıtlara göre Dünya Yakıt Tüketimi (EIA, 2023) https://www.eia.gov/outlooks/ieo/	6
Şekil 2.2: Biyokütleden elde edilen enerji kaynakları.....	8
Şekil 2.3: Transesterifikasyon ile Biyodizel Üretimi	10
Şekil 2.4: Biyodizel (B20 VE B100) ve Petrol Dizelinin Yaşam Döngüsü Hava Emisyonlarının Karşılaştırılması (Ganev de diğ., 2018)	13
Şekil 2.5: Biyoyakıt Kaynaklarının Sınıflandırılması (Dragone ve diğ., 2010; Nigam ve Singh, 2011)	20
Şekil 2.6: Biyodizel Üretiminde Mikroalglerin Kullanım Avantajları (Dragone ve diğ., 2010).....	22
Şekil 2.7: Mikroalglerden Elde Edilen Ürünler.....	24
Şekil 2.8: Mikroalglerin Kullanım Alanları	25
Şekil 2.9: Mikroalglerin Lipit İçerikleri (Karım ve diğ., 2020)	27
Şekil 2.10: Mikroalglerden biyodizel üretim şeması (Karım ve diğ., 2020).....	28
Şekil 2.11: Lipit Ekstraksiyon Yöntemleri (Halim ve diğ., 2012)	33
Şekil 2.12: Transesterifikasyon Reaksiyonu	35
Şekil 3.1: Biyodizel Üretim Aşamalarında Gerçekleştirilen Optimizasyon Çalışmalarının Şematik Gösterimi	37
Şekil 3.2: <i>Botryococcus sudeticus</i>	39
Şekil 3.3: <i>Chlorella vulgaris</i>	41
Şekil 3.4: <i>Scenedesmus obliquus</i>	42
Şekil 3.5: Mikroalglerin Yetiştirilme Koşulları	43
Şekil 3.6: Liyofilize Edilen Mikroalg Örnekleri	45
Şekil 3.7: Lipit ekstraksiyon aşamaları	47
Şekil 3.8: <i>Scenedesmus obliquus</i> türü üzerinde gerçekleştirilen farklı transesterifikasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	50

Şekil 3.9: FAME 37 Standardının GC-FID cihazında ölçülen kromatografisi.....	53
Şekil 3.10: Azot Manipülasyon Deneyinin Kurulması	56
Şekil 4.1: Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilen <i>B.sudeticus</i> ve <i>S.obliquus</i> türlerinin Lipit Ekstraksiyon, FAME içerik ve FAME verim miktarları (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: Sütunlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	59
Şekil 4.2: <i>Scenedesmus obliquus</i> biyoması üzerinde Lipit ekstraksiyonu öncesi uygulanan ön parçalama işlemlerinin lipit ekstraksiyon ve FAME miktar ve verim yüzdeleri (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, ab; ön parçalama işlemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir).....	63
Şekil 4.3: Farklı Transesterifikasyon yöntemleri ile transesterifiye edilen <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün FAME içerik Yüzde miktarları (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c; Geleneksel, Tek adımlı ve İki adımlı in situ yöntemlerinin kendi içlerindeki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir).....	66
Şekil 4.4: Farklı Transesterifikasyon yöntemleri ile transesterifiye edilen <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün Doymuş (SFA) Tekli Doymamış (MUFA) ve Çoklu Doymamış Yağ Asit Yüzdeleri (PUFA) (Veriler ort+stdsapma değerleridir)	67
Şekil 4.5: Yağ asidi kompozisyonu (SFA, MUFA, PUFA), FAME verimi ve Biyodizel Kalite Parametrelerinin (IV, SV, CN, DU, LCSF, CFPP) küme analiz benzerliği	75
Şekil 4.6: Azot manipülasyon deneylerinde <i>Botryococcus sudeticus</i> ve <i>Chlorella vulgaris</i> türlerinin kl-a değerleri ve spesifik büyüme oranları (a) stok kültür, (b) besin takviyesi seti (c) azot eksikliği seti	76
Şekil 4.7: Azot manipülasyon deneylerinde <i>Botryococcus sudeticus</i> ve <i>Chlorella vulgaris</i> türlerinin lipit verimi %, ağırlıkça FAME içerik yüzdesi ve FAME verimi. (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: Setler arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	77

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Amerika (ASTM D-6751) ve Avrupa (EN 14214) Biyodizel Standartlarına göre Sınır Değerler	15
Tablo 3.1: <i>Botryococcus sudeticus</i> ve <i>Scenedesmus obliquus</i> türlerine Uygulanan Lipit Ekstraksiyon Yöntemleri	46
Tablo 3.2: <i>S.obliquus</i> için uygulanan ön parçalama ve lipit ekstraksiyon yöntemleri	49
Tablo 4.1: Bligh Dyer ve Hekzan lipit ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen <i>B.sudeticus</i> ve <i>S.obliquus</i> türlerinin Yağ Asidi Profilleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b : ekstraksiyonlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	60
Tablo 4.2: Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyon yöntemlerinin <i>B. sudeticus</i> ve <i>S. obliquus</i> türlerinin Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: ekstraksiyonlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	61
Tablo 4.3: Hücre Ön Parçalama İşlemlerine göre <i>S. obliquus</i> türünün Yağ Asidi Profili (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: ön parçalama işlemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	64
Tablo 4.4: Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a,b: ön parçalama işlemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	65
Tablo 4.5: Farklı Kimyasallar ile Geleneksel transesterifikasyon yöntemi uygulanan <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün yağ asidi (Veriler ort+-stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, d, e, ab, bc, dc: geleneksel yöntemler arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	69
Tablo 4.6: Farklı Kimyasallar ile tek adımlı İn situ transesterifikasyonu uygulanan <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün yağ asidi kompozisyonu (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, ab, bc: Tek adımlı in situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	70
Tablo 4.7: Farklı Kimyasallar ile iki adımlı İn situ transesterifikasyonu uygulanan <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün yağ asidi kompozisyonu (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, bd, cd, iki adımlı in situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	71

Tablo 4.8: Farklı Kimyasallar ile geleneksel transesterifikasyon metotları uygulanan <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün biyodizel kalite özellikleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, d, e: Geleneksel transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir).....	73
Tablo 4.9: Farklı Kimyasallar ile tek adımlı in situ transesterifikasyon metotları uygulanan <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün biyodizel kalite özellikleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, bc: tek adımlı in-situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	73
Tablo 4.10: Farklı Kimyasallar ile iki adımlı in situ transesterifikasyon metotları uygulanan <i>Scenedesmus obliquus</i> türünün biyodizel kalite özellikleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, d,e : iki adımlı in-situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	74
Tablo 4.11: Besin takviyesi ve Azot eksikliği setlerinde <i>Botryococcus sudeticus</i> ve <i>Chlorella vulgaris</i> 'in yağ asidi profilleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, d, e, f, g: Sütunlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)	79
Tablo 4.12: <i>B. sudeticus</i> ve <i>C. vulgaris</i> türlerinin Azot eksikliği ve Besin Takviyesi setlerine göre Biyodizel özellikleri ve EN14214 ve D6751 standardı ile karşılaştırılması (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: Setler arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir).....	81

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
μ	: Mikron
g	: Gram
mg	: Miligram
L	: Litre
$^{\circ}\text{C}$	: Celsius
μmol	: Mikromol
m^2	: Metrekare
v/v	: Hacimce yüzde
wt	: Ağırlıkça yüzde
α	: Alfa
β	: Beta

Kısaltmalar	Açıklama
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACP	: Asit taşıyıcı protein
ADP	: Adenozin difosfat

ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
ATP	: Adenozin trifosfat
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CFPP	: Soğuk filtre tıkanma noktası
CN	: Setan Sayısı
CO ₂	: Karbondioksit
CuSO ₄	: Bakır (II) sülfat
DAG	: Digliserit
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
DU	: Doymamışlık derecesi
EPA	: Eikosapentaenoik asit
FAME	: Yağ Asidi Metil Ester
FFA	: Serbest yağ asitleri
FID	: Alev iyonizasyon detektörü
GC	: Gaz Kromatografisi
H ₃ BO ₃	: Borik Asit
HC	: Hidrokarbon
HHV	: Yüksek ısıtma değeri
IV	: İyot değeri
K ₂ HPO ₄	: Potasyum bifosfat
kl- <i>a</i>	: Klorofil- <i>a</i>

KOH	: Potasyum hidroksit
LCSF	: Uzun zincirli doyma faktörü
MAG	: Monogliseritler
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
MnCl ₂	: Mangan(II) klorür
MUFA	: Tekli doymamış yağ asitleri
N	: Azot
Na ₂ O ₃	: Sodyum karbonat
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaMoO ₄	: Sodyum molibdat
NaNO ₃	: Sodyum nitrat
NaOH	: Sodyum hidroksit
OS	: Oksidatif stabilite
PM	: Partikül madde
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
SFA	:Doymuş yağ asitleri
SV	: Sabunlaşma değeri
TAG	:Triaçilgliserit
TS	:Türkiye Standartları
IS	:In situ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BİYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN SEÇİLEN MİKROALG TÜRLERİNDE LİPİT VERİMLİLİĞİNİN OPTİMİZASYONU

Ayça OĞUZ ÇAM

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Meriç ALBAY

II. Danışman : Prof. Dr. OYA OKAY

Sanayileşme çağından bu yana enerji ihtiyacının büyük ölçüde fosil yakıtlarla karşılanması, bu kaynaklarda dikkate değer bir azalmaya ve çevresel sorunlara yol açmıştır. Fosil yakıtların neden olduğu bu sorunları azaltmak ve artan enerji ihtiyacına alternatif kaynaklar sağlamak amacıyla yenilenebilir ve çevre dostu biyoyakıtların kullanımına yönelim başlamıştır. Bu bağlamda son yıllarda yenilenebilir, çevre dostu biyoyakıt kaynakları içerisinde önemli bir yere sahip olan biyodizel üretiminin geliştirilmesine yönelik çalışmalara hız verilmiştir.

Yenilenebilir ve çevre dostu enerji kaynaklarından birisi de biyodizeldir. Mikroalgler, biyodizel üretiminde önemli bir hammadde kaynağı olarak dikkat çekmektedir. Yüksek lipit ve yağ asidi içerikleri, hızlı büyüme oranları, yüksek fotosentetik verimleri ve çevresel koşullara uyum yetenekleri sayesinde biyodizel üretiminde avantaj sağlarlar. Mikroalglerden biyodizel üretim süreci, mikroalglerin yetiştirilmesi, lipit ekstraksiyonu ve transesterifikasyon aşamalarını içerir.

Kuşkusuz verimi artırmaya yönelik çalışmalar, biyodizel üretim maliyetinde ve kalitesinde önemli avantajlar sağlamaktadır.

Chlorella vulgaris, *Botryococcus sudeticus*, *Scenedesmus obliquus* gibi Chlorophyta grubundan tatlı su mikroalgleri, yüksek lipit ve uygun yağ asidi bileşimleri nedeniyle biyodizel üretiminde kullanılmaktadır.

Bununla birlikte biyodizel üretiminin ekonomik fizibilitesi, yüksek biyokütle, FAME verimi ve kalitesine bağlıdır. Bu nedenle, süreç optimizasyonu ve türe özgü yaklaşımlar, sürdürülebilir ve ticari ölçekli biyodizel üretimi için kritik öneme sahiptir. Bu amaçla planlanan bu çalışmada, mikroalglerin üretim ve yağ asidi verimliliğini artırmak için üretim aşamasında analitik yöntemlerin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi ve azot stresi uygulamasıyla FAME verim ve kalitesi üzerindeki etkileri incelendi.

Elde edilen sonuçlarda biyodizel verimini arttırmaya yönelik lipit ekstraksiyon ve transesterifikasyon optimizasyon çalışmalarının Toplam FAME verim ve kalitesi üzerinde büyük etkileri olduğunu ve bu etkilerin türe bağlı olarak değişiklik gösterebildiği tespit edildi.

Azot manipülasyon deneylerinde ise, ortamdan azotun tamamen uzaklaştırılması *B. sudeticus* kültüründe FAME verimini %21 artırırken, *C. vulgaris*'te %28 artırdı. Öte yandan azot eksikliğinin her iki türde de yüksek biyokütle üretimi elde edilmesinde ve biyodizel kalitesinin korunmasında bazı zorluklara neden oldu. Bununla birlikte, azot eksikliğine tepki olarak her iki türün biyodizel özellikleri birbirinden farklılık gösterdi.

Genel olarak bu bulgular, yeşil alglerin azot eksikliğine karşı karmaşık ve türe özgü tepkiler sergilediğini ve yüksek biyokütle, lipit içeriği ve biyodizel özelliklerine ulaşmak için besin koşullarının optimize edilmesi gerektiğini ortaya koydu.

Sonuç olarak, alg bazlı biyodizelin ekonomik fizibilitesi, yüksek biyokütle, FAME verimi ve kalitesine bağlı olarak değişim gösterdi. Sürdürülebilir ve ticari ölçekli biyodizel üretimi için, kullanılan mikroalg türlerinin spesifik ihtiyaçlarına ve özelliklerine göre stres koşullarının belirlenmesine ve yöntem optimizasyon çalışmalarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu araştırma, mikroalg bazlı biyodizel üretimi konusunda artan bilgi birikimine katkıda bulunmakta ve hem lipit verimliliğini hem de biyodizel kalitesini en üst düzeye çıkarmak için türe özgü yaklaşımların önemi ortaya konuldu.

Haziran 2024, 149 sayfa.

Anahtar kelimeler: Biyodizel, Fame, Yağ asidi, Lipit, Mikroalg



SUMMARY

Ph.D. THESIS

OPTIMIZATION OF LIPID COMPOSITION EFFICIENCY IN SELECTED
MICROALGAE SPECIES FOR BIODIESEL

Ayça OĞUZ ÇAM

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Marine and Freshwater Resources Management

Supervisor : Prof. Dr. Meriç ALBAY

Co-Supervisor : Prof. Dr. OYA OKAY

Industrialization led to the extensive use of fossil fuels to rely on fossil fuels to meet energy requirements, resulting in significant depletion of these resources and causing environmental issues. Renewable and eco-friendly biofuels are crucial to address these problems and offer alternatives. Therefore, considerable literature has concentrated on the development of biodiesel production which holds a prominent place among renewable biofuel sources.

Microalgae are a significant raw material for biodiesel production due to their high lipid and fatty acid content, rapid growth rate, high photosynthetic efficiency, and adaptability to environmental conditions. The biodiesel production process from microalgae involves cultivation, lipid extraction, and transesterification. Enhancing the efficiency of these stages can substantially reduce biodiesel production costs and improve quality.

Freshwater microalgae from the Chlorophyta group, including *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus sudeticus*, and *Scenedesmus obliquus*, are used in biodiesel production due to their high lipid content and favorable fatty acid compositions. However, the economic viability of biodiesel

production depends on achieving high biomass, FAME yield, and quality. Thus, process optimization and species-specific approaches are crucial for sustainable and commercial-scale biodiesel production.

In this study, analytical methods were optimized to enhance microalgae production and fatty acid efficiency, while the effects of nitrogen stress on FAME yield and quality were also examined. The results showed that lipid extraction and transesterification optimization significantly impacted Total FAME yield and quality, with variations observed among different species.

In nitrogen manipulation experiments, the complete removal of nitrogen increased FAME yield by 21% in *B. sudeticus* and 28% in *C. vulgaris*. However, nitrogen deficiency posed challenges in achieving high biomass production and maintaining biodiesel quality in both species. The biodiesel properties of both species exhibited differences under nitrogen deficiency, suggesting complex and species-specific responses to nutrient conditions.

In conclusion, the economic feasibility of algae-based biodiesel depends on achieving high biomass, FAME yield, and quality. Therefore, stress conditions and method optimization need to be tailored to the specific needs and characteristics of the microalgae species used. This research contributes to the growing body of literature on microalgae-based biodiesel production and underscores the importance of species-specific approaches to maximize lipid productivity and biodiesel quality.

June 2024, 149 pages.

Keywords: Biodiesel, Fame, Fatty acid, Lipid, Microalgae

1. GİRİŞ

Sanayileşme çağından bu yana enerji ihtiyacını karşılamak için fosil kaynaklara (kömür, petrol ve doğal gaz) büyük ölçüde ihtiyaç olmuştur. Günümüzde enerji ihtiyacının %80'i kömür, petrol ve doğalgaz gibi fosil kaynaklı yakıtlarla karşılanması, fosil yakıt rezervlerinde dikkat çekici bir azalışa neden olmuştur (Mahmudul ve diğ., 2017). Bunun yanı sıra fosil yakıt kullanımlarının artışı ekonomik, ekolojik ve çevresel açıdan değerlendirildiğinde ciddi problemlere yol açtığı bilinmektedir (Kim ve diğ., 2022). Küresel petrol kaynaklarının sınırlı olması ve antropojenik karbondioksit (CO₂) emisyonlarından kaynaklanan küresel ısınma gibi nedenlerle son birkaç yılda yenilenebilir enerji kaynaklarına ilgiyi arttırmıştır (Kim ve diğ., 2022). Bu nedenle hem küresel ısınmanın yıkıcı sonuçlarını hafifletmek hem de artan enerji ihtiyacına alternatif kaynaklar yaratmak için yenilenebilir, sürdürülebilir çevre dostu karbonsuz/nötr enerji biyoyakıt kaynakların kullanılması büyük önem taşımaktadır.

Bu bağlamda son yıllarda yenilenebilir, çevre dostu biyoyakıt kaynakları içerisinde yer alan biyodizel, biyogaz, biyoetanol, biyohidrojen gibi biyoyakıtların geliştirilmesine yönelik çalışmalara hız verilmiştir. Bu biyoyakıt kaynakları içerisinde önemli bir yere sahip olan biyodizel mevcut yenilenebilir enerji üretiminin %82'sini temsil etmektedir ve kullanımının uluslararası, politik ve ekonomik hedeflere göre artması beklenmektedir (Mata ve Martins, 2010; Yin ve diğ., 2020). Dizel motorlarda kullanılabileceği ve ulaştırma sektörünün toplam enerjinin %60'ını tükettiği dikkate alındığında büyüyen bir pazara sahip olduğu görülmektedir (Barua ve diğ., 2020).

Günümüzde biyodizelin ulaşım yakıtı olarak pratik uygulaması ve ticarileşmesi, herhangi bir motor modifikasyonu yapılmadan petrol türevi benzin/dizel ile karıştırılarak kullanılabilmesine yönelik uygulamalar gerçekleştirilmiştir (Bergthorson ve Thomson, 2015; Kalghatgi 2019). Bu nedenle biyodizel tüm kriterleri karşılayan ve gelecek vaat eden alternatif yakıt olarak değerlendirilmektedir (Mofijur ve diğ., 2014).

Biyodizel çevre dostu, yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilir, toksik olmayan ve karbon nötr olarak tanımlanmaktadır (Deshmukh ve diğ., 2019; Yin ve diğ., 2020). Bununla birlikte, biyodizel diğer fosil yakıtlar ile karşılaştırıldığında birçok avantajı bulunmaktadır. Bunların başında, daha yüksek parlama noktasına sahip olması, biyolojik olarak parçalanabilirlik,

geliştirilmiş setan sayısı ve azaltılmış egzoz emisyonları gelmektedir (Fazal ve diğ., 2013). Ayrıca, %1 (B1) ile %100 (B100) karışımları elde etmek için katkı maddesi olarak petrodizel ile harmanlanabilir durumda olması kullanım alanını genişletebilmektedir (Mizik ve Gyarmati, 2021).

Şimdiye kadar üç nesil sıvı biyoyakıt piyasaya sürülmüştür ve bunların ana farklılıkları kullanılan hammaddeye bağlıdır (Goh ve diğ., 2019; Sun ve diğ., 2019; Yin ve diğ., 2020). Üçüncül nesil biyoyakıt kaynakları arasında yer alan mikroalglerin fosil yakıtlara alternatif olarak biyodizel üretiminde kullanılması dünya genelinde yaygınlaşan bir çözümdür (Nigam ve Singh, 2011). Çünkü mikroalgler diğer karasal biyokütleler ile karşılaştırıldığında hektar başına biyokütle üretim miktarları açısından daha fazla lipid üretme yeteneğine sahiptirler (Hannon ve diğ., 2010). Mikroalgler, fotosentez yoluyla CO₂ yakalamayı verimli bir şekilde yönetme yeteneğinin yanı sıra çok çeşitli yüksek değerli biyoaktif bileşikler üretme potansiyeline de sahiptir (El-Sheekh ve diğ., 2013; Al-Humairi ve diğ., 2023). Bununla birlikte, büyük miktarlarda büyüme ortamı, su ve enerji gerektiğinden, daha yüksek bitkilerle ekonomik olarak rekabet edebilmek için mikroalg endüstriyel üretiminin optimize edilmesi gerektiği kabul edilmektedir (Chu ve diğ., 2013).

Mikroalglerden biyodizelin ticari üretimi, esas olarak mevcut biyokütle üretimi ve yakıt dönüştürme yollarıyla ilişkili yüksek maliyetler nedeniyle hala engellerle karşı karşıyadır (El-Sheekh ve diğ., 2013; Al-Humairi ve diğ., 2023). Bu biyokütle kaynağının rekabet gücünü artırmak amacıyla maliyet gereksinimini azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Tsukahara ve Sawayama, 2005; Nigam ve Singh 2011; Mahfouz ve diğ., 2023). Bunlar arasında biyokütle üretkenliği ve verimindeki iyileştirmelere yönelik araştırmalar, kültür koşullarının optimizasyonu ve alternatif "mikroalg-biyodizel" dönüşüm teknolojileri yer almaktadır (Ehimen ve diğ., 2010). Alg bazlı biyodizelin ekonomik fizibilitesi, yüksek biyokütle verimine lipid üretkenliğine ve gelişmiş biyodizel özelliklerine bağlıdır (Tsukahara ve Sawayama, 2005; Nigam ve Singh, 2011; Mahfouz ve diğ., 2023). Bu nedenle, lipid içeriğini artırmak ve genel sürecin çevresel etkilerini ve maliyetlerini azaltmak için süreç optimizasyonu gereklidir.

Mikroalg türleri içerisinde *Chlorella*, *Botryococcus*, *Scenedesmus* gibi genoslara ait türler biyoyakıt, gıda endüstrisi, kozmetik sektörü gibi birçok alanda değerli bileşikler elde etmek için en yaygın yetiştiriciliği yapılan türler arasındadır. *Chlorella*'nın büyüme koşullarının kolaylığı (Tan ve diğ., 2018), *Botryococcus*'un (Ruangsomboon, 2015) yüksek hidrokarbon içeriği ve uygun yağ asidi bileşimi, onları biyodizel üretimi için en kapsamlı şekilde araştırılan tatlı su cinsi haline getirmiştir. *Scenedesmus* genusu ise yüksek lipit içeriğine sahip olmasının yanında evsel ve endüstriyel atık su arıtımında kullanıma yönelik çok yönlü bir organizmadır (Voltolina ve diğ., 2005) ve son yıllarda oksijen üretimi, ağır metallerin uzaklaştırılması (Martínez ve diğ., 2000, Omar, 2002) ve atık ürünlerin faydalı organik maddelere dönüştürülmesi (Nuñez ve diğ., 2001) için kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bu mikroalg türlerinde ise hem yüksek biyokütle hem de değerli bileşikler elde etmek temel hedefleri oluşturmaktadır (Ruangsomboon, 2015).

Mikroalglerden biyodizel eldesi temel olarak mikroalglerin yetiştirilmesi, biyokütle hasadı, lipit ekstraksiyonu ve biyodizel dönüşüm reaksiyonu (Transesterifikasyon) olmak üzere dört önemli aşamayı içermektedir (Zou ve diğ., 2019; Mahfouz ve diğ., 2023; Oğuz ve diğ., 2024). Bu aşamaların her birinde biyodizel verimini arttırmaya yönelik gerçekleştirilecek çalışmalar, hem biyodizel üretim maliyetinde hem de biyodizel kalitesinde önemli ölçüde avantajlar sağlayabilmektedir (Oğuz ve diğ., 2024).

Mikroalglerden biyodizel üretmek için geleneksel yöntem lipit ekstraksiyonu ve transesterifikasyon reaksiyonu olan iki önemli adımı içermektedir (Likozar ve diğ., 2016). Lipit ekstraksiyon süreci, mekanik, kimyasal veya biyolojik yöntemler kullanılarak hücre parçalanmasıyla başlar ve ardından organik çözücüler kullanılarak gerçekleştirilir (Nguyen ve diğ., 2020). Elde edilen lipit bir alkol (en yaygın olarak metanol) ve bir asit, baz veya heterojen katalizör varlığında transesterifikasyon reaksiyonu yoluyla biyodizele dönüştürülür (Kim ve diğ., 2013; Martínez ve diğ., 2017). Bununla birlikte, ön parçalama işlemi yapılmadan yaş veya kuru mikroalg biyokütlesinin *in situ* transesterifikasyon reaksiyonu yoluyla doğrudan biyodizele dönüştürme fikri dikkat çekmiştir (Kim ve diğ., 2019; Nguyen ve diğ., 2020). Genel olarak, *in situ* transesterifikasyon, yağın ekstraksiyonu ve dönüştürülmesinin eş zamanlı sürecini ifade eder. Bu işlem, lipit ekstraksiyonu ve solvent geri kazanım adımlarını en aza indirdiği ve aynı zamanda ilk yatırım ve genel masrafları azalttığı için biyodizel üretim endüstrisinde son yıllarda tercih edildiği ifade edilmiştir (Skorupskaite, ve diğ., 2016). Yakın zamanda yapılan bir tekno-ekonomik analiz, *in situ* transesterifikasyon işleminin, mikroalg

biyodizel maliyetini, benzinli dizel ile karşılaştırılabilir bir değer olan 0,68-1,26 \$/L'ye düşürmeye yardımcı olabileceğini de ortaya çıkardığı belirtilmiştir (Pan, ve diğ., 2017). Ayrıca in situ transesterifikasyonda ilave kurutma adımını ortadan kaldırmak için yaş mikroalg macunu kullanılmıştır ancak mikroalg biyokütlesindeki yüksek nem içeriğinin yağ asidi ester verimini düşürdüğü belirlenmiştir. (Sathish, ve diğ., 2014; Huang ve diğ., 2015).

Biyodizel üretiminde maksimum lipit verimi elde etmenin yanında istenen biyodizel özelliklerini korumak için uygun yağ asidi profili sağlamak da önem arz etmektedir (Chu ve diğ., 2013). Bu nedenle hem istenilen yağ asidi profilini elde etmek hem de yüksek lipit ve FAME verimi sağlamak için kültür koşullarında besin stresi deneyleri uygulanmaktadır. Azot manipülasyonu da bu stratejiler içerisinde en bilinen yöntemlerden biridir (İkaran ve diğ., 2015). Azot eksikliği, diğer stres koşullarına kıyasla daha fazla lipit birikimine yol açar, çünkü azot alglerdeki lipit metabolizması ile ilişkilidir (Ruangsomboon 2015; Nagappan ve diğ., 2020). Diasilgliserol Asiltransferaz (Asil CoA), trigliserit sentezinde (Farese ve diğ., 2000) ve azot stresinde yer alan anahtar bir enzimdir. Azot eksikliği koşullarında, aşırı uyarılmanın lipit birikimine yol açtığı Asil CoA'nın uyarıldığı gözlemlenmiştir (Stephenson, 2010). Ayrıca azot stresi koşulları, toplam lipit ve yağ asidi kompozisyonlarındaki farklılıkları ortaya koymaktadır (Ruangsomboon 2015).

Biyodizel kalitesi, doymuş yağ asitlerini (SFA'lar), tekli doymamış yağ asitlerini (MUFA'lar) ve çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA'lar) içeren Yağ Asidi Metil Esterlerinin (FAME) genel bileşimine dayalı olarak değerlendirilir (Knothe, 2008). Biyodizelin bu özellikleri, Avrupa standartları (EN14214) ve Amerikan Test ve Malzeme Derneği (ASTM D6751) gibi dünya genelinde biyodizel standartlarına uygun olmalıdır. Türe özgü kültür koşullarının FAME bileşimi ve biyodizel özelliklerine göre optimize edilmesi ve ileri çalışmaların yapılması önemlidir.

Son yıllarda biyodizel eldesi için hammadde olarak mikroalglerin kullanılmasıyla ilgili çalışmalar yoğunlaşmış olsa da en ekonomik koşullarda maksimum verimliliğin elde edilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla planlanan çalışmada; (1) biyodizel üretimine uygun olarak belirlenen mikroalglerin üretim ve yağ asidi verimliliğinin artırılmasında analitik yöntemlerin optimizasyonunun gerçekleştirilmesi; (2) belirlenen analitik yöntemler ile seçilen türler üzerinde azot stresi uygulanarak FAME verim ve kalitesi üzerindeki değişimin incelenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, mikroalglerin yetiştiriciliği ile

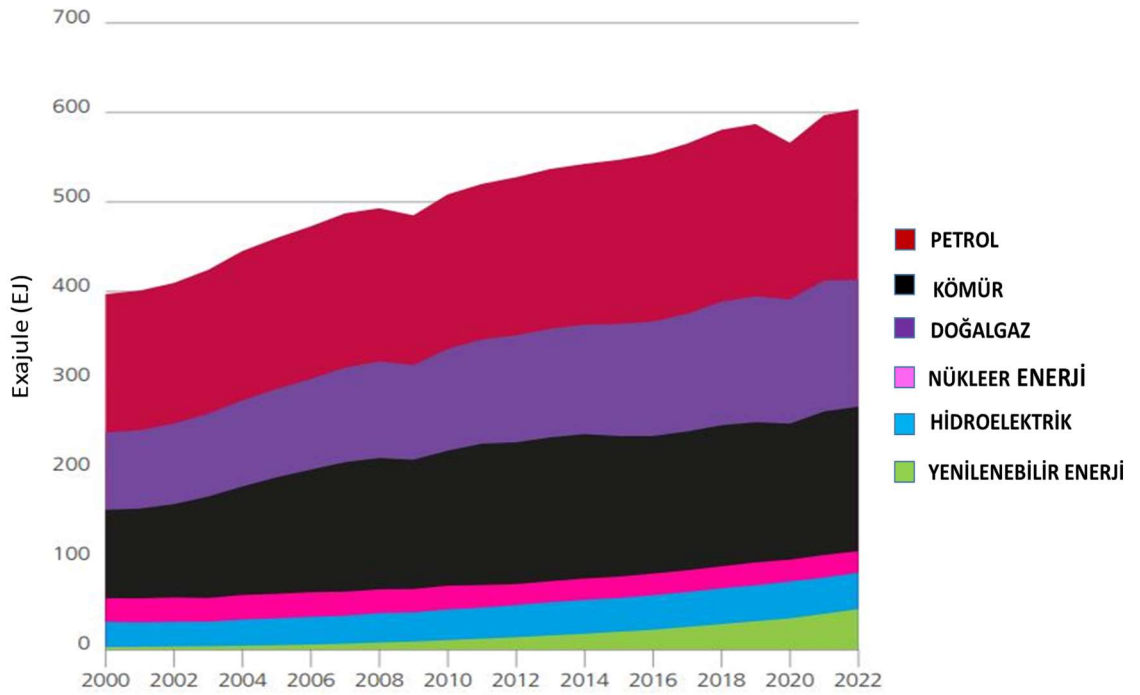
başlayıp biyodizel eldesine kadar giden her bir sũreç için ayrı optimizasyon çalışmalarının planlanması, mikroalglerden biyodizel eldesi ile ilgili ileride yapılacak çalışmalar için önemli bir altlık oluşturacağı dũřũnũlmektedir.



2. GENEL KISIMLAR

2.1 DÜNYADAKİ ENERJİ İHTİYACI

Dünya genelinde enerji talebi her geçen yıl artmaktadır (Şekil 2.1). Amerika Birleşik Devletleri Enerji Bilgi İdaresi raporuna göre, bu eğilim devam edecek ve 2015 ile 2040 arasında enerji tüketiminde %28'lik bir artış öngörülmektedir. Sadece 2018 yılında dünya genelinde birincil enerji tüketimi % 2,9 oranında artmıştır (EIA, 2017).



Şekil 2.1: 2000-2022 yılları arasında kullanılan yakıtlara göre Dünya Yakıt Tüketimi (EIA, 2023)
<https://www.eia.gov/outlooks/ieo/>

Birçok sektörün farklı ihtiyaçlar için enerjiye ihtiyaç duymaları nedeniyle dünya genelinde petrol ve diğer yakıtların kullanımı artmakta, en büyük artış ise taşımacılık ve endüstri sektörlerinde görülmektedir. Taşıma sektöründe, fosil yakıtlar rezerv kıtlığına rağmen enerjinin büyük bir kısmını sağlamaktadır (EIA, 2017). Fosil yakıtların daha sürdürülebilir enerji kaynakları ile yer değiştirilmesi, yenilenebilir kaynakların kullanımının maksimize edilmesi, sadece sera gazı emisyonlarını azaltmakla kalmayıp aynı zamanda enerji arz güvenliğini artırmak açısından giderek daha önemli hale gelmektedir (Atabani ve diğ., 2012). Bu endişeler, küresel çevre politikasında değişikliklere yol açmaktadır.

Avrupa Birliği, 2007 yılında iklim değişikliği ile mücadele etmek, enerji güvenliğini artırmak ve aynı zamanda rekabet gücünü güçlendirmek amacıyla bir iklim ve enerji politikası başlatmıştır. İlgili paket, 2009 yılında yasalaştırılmıştır (Yenilenebilir Enerji Direktifi) ve 2020 yılı için hedefler belirlemiştir (EC, Directive 2009/28). Bu hedefler;

- İklim değişikliği ile mücadele kapsamında sera gazı emisyonlarında 1990 seviyelerine göre %20'lik azalma,
- Enerji çeşitliliğinde AB'nin enerjisinin %20'sinin yenilenebilir kaynaklardan sağlanması,
- Enerji verimliliğinde %20'lik iyileşmenin sağlanmasıdır.

AB ayrıca, 2020 yılında tüm taşıma sektörünün tükettiği enerjinin en az %10'unun yenilenebilir kaynaklardan sağlanması için bağlayıcı ulusal hedefler belirlemiştir (EC, Directive 2009/28). Öngörülen hedeflere ulaşmanın bir yolu da alternatif enerji kaynağı olan biyoyakıt kullanımının artırılmasını teşvik etmekten geçmektedir.

2015 yılında, Yenilenebilir Enerji Direktifi Directive revize edilerek, gıda arz ve güvenliğini etkilememesi için biyoyakıt üretiminde kullanılan nişasta zengini bitkiler ve yağ bitkilerinden sağlanan biyoyakıt üretimi %7 ile sınırlandırılmıştır (EC Directive 2015/1513). AB, ayrıca, 2030 yılına kadar taşımacılıkta tüketilen enerjinin en az %14'ünün yenilenebilir kaynaklardan sağlanması için yeni bir bağlayıcı ulusal hedef belirlemiştir (Ramos ve diğ., 2020).

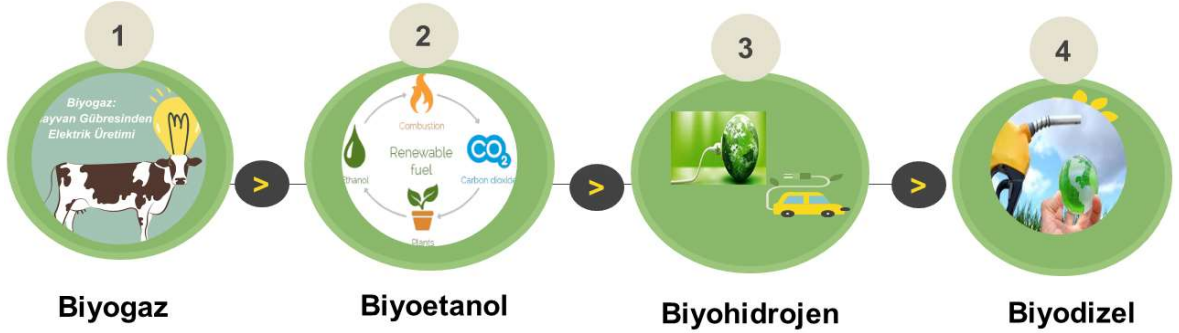
2.2 BİYOYAKITLAR

Yenilenebilir enerji kaynakları arasında, "Biyokütle" en büyük teknik potansiyele sahiptir. Bitkisel ve hayvansal kökenli maddelerin temel bileşenleri olan karbonhidrat bileşikler, "Biyokütle Enerji Kaynağı" olarak adlandırılır ve bu kaynaklardan elde edilen enerji ise "Biyoyakıt" olarak tanımlanır (Khan ve diğ., 2021).

Biyoyakıtlar, biyokütle kaynaklı olan ve fosil yakıtlara karşı yenilenebilir alternatifler sağlayan yakıtlardır. (EC Directive 2015/1513). Biyokütleden elde edilen enerji kaynaklarının tükenme riskinin bulunmaması nedeniyle sürdürülebilirdir. Bununla birlikte belirli ülkelerin tekelinde olmaması, enerji temini konusunda ülkeleri tek bir enerji kaynağına bağımlı olmaktan kurtarmaktadır. Örneğin;

- Biyodizel: Dizel kalite standartlarına uygun olan bitkisel veya hayvansal yağlardan üretilen metil ester.
- Biyoetanol: Gıda dışı biyokütle veya kalıntılardan (lignoselülozik gibi yenilebilir olmayan biyokütle), yakıt metanol (biyomethanol) veya etanol (biyoethanol) üretimi
- Biyogaz: organik maddelerin (bitkisel ve hayvansal atıklar, şehir ve endüstriyel atıklar) oksijensiz ortamda fermantasyonu sonucu oluşan ağırlıklı gazdır
- Sentetik Biyoyakıtlar: Biyokütle kaynaklı sentetik hidrokarbonlar veya karışımları.
- Biyohidrojen: Biyokütle ve/veya atığın biyobozunur kısmından üretilen hidrojen.

Sektörde, dünya genelinde en yaygın kullanılan biyoyakıtlar biyoetanol (benzin yerine) ve biyodizel (dizel yerine) olarak kullanılmaktadır. Diğer biyoyakıtlar da kullanılmakla birlikte, pazar erişimleri daha sınırlıdır (Demirbaş, 2007).



Şekil 2.2: Biyokütleden elde edilen enerji kaynakları

2.3 BİTKİSEL YAĞLARIN BİYOYAKIT OLARAK KULLANIMI

İçten yanmalı motorun, yüksek ısı ve basınç koşulları altında yakıtın kendiliğinden tutuşmasına dayanan bir versiyonu olan dizel motor 1890'larda geliştirildi. Mucidi Rudolf Diesel (1858–1913), “Die Entstehung des Dieselmotors” adlı kitabında anlattığı gibi o dönemde çok sayıda yakıtı test etti (Diesel R. 1913). Bitkisel yağın dizel motorda yakıt olarak ilk kullanımı 1900 yılında Paris'teki Dünya Fuarı'nda Rudolf Diesel'in küçük bir dizel motoru fıstık (yerfıstığı) yağıyla çalıştırmasıyla gerçekleşti (Diesel, 1913). Daha sonra, 1920'li yıllardan yaklaşık II. Dünya Savaşı'nın sonuna kadar, bitkisel yağların dizel motorlarda kullanımına ilişkin literatürde genellikle enerji bağımsızlığı teması altında çok sayıda rapor yayınlandı (Knothe 2007).

1930'lu yıllardan itibaren bitkisel yağ ve bunların karışımlarının dizel motorlarda kullanılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bitkisel yağların yakıt olarak kullanımına yönelik ilk resmi doküman, 31 Ağustos 1937'de Brüksel Üniversitesi'nden G. Chavanne tarafından gerçekleştirilen bir çalışma sonucunda ortaya çıkmış, elde edilen yakıt, 1938 yazında Brüksel ile Leuven arasında çalışan ticari araçlarda kullanılmıştır. Walton (1938) tarafından yapılan çalışmada soya palmiye ve pamuk yağlarının dizel yakıtlarının verdiği performans kadar verimli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte bitkisel yağların yüksek viskozitesinin motorda tortu gibi operasyonel sorunlara yol açabileceğini belirtmişlerdir. Bu problemlerin çözümüne yönelik Walton, elde edilen yakıttan gliserol kısmının ayrılmasını ve yağların (trigliseritlerin) yağ asitleri metil esterlerine ayrıştırılarak yakıt olarak kullanılmasını önermiştir (Graboski ve McCormick 1998).

Chavanne (1937) yapmış oldukları çalışmada palm yağının etanol ile transesterifikasyonu yoluyla elde edilen etil esterlerinin biyoyakıt olarak kullanımına yönelik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir.

Alternatif yakıtlara ilişkin araştırmalar, İkinci Dünya Savaşı'ndan sonraki yıllarda, 1970'lerdeki enerji krizlerinin bu konuya olan ilgiyi yeniden canlandırmasına kadar kayda değer çalışma yapılmadı. Daha sonraki yıllarda bitkisel yağlar dizel motorlar için potansiyel yakıt olarak yeniden keşfedildi. Bitkisel yağların esterleri ile ilgili ilk raporlar 1980 yılına kadar uzanmaktadır (Graboski ve McCormick 1998). Bu çalışmada, Güney Afrika'dan araştırmacılar, ayçiçek yağının metil esterlerinin bir dizel motorda kullanımını ve bu esterlerin kullanımının viskozite sorununu ve daha sonraki işletimi hafiflettiği belirtildi (Bruwer 1980).

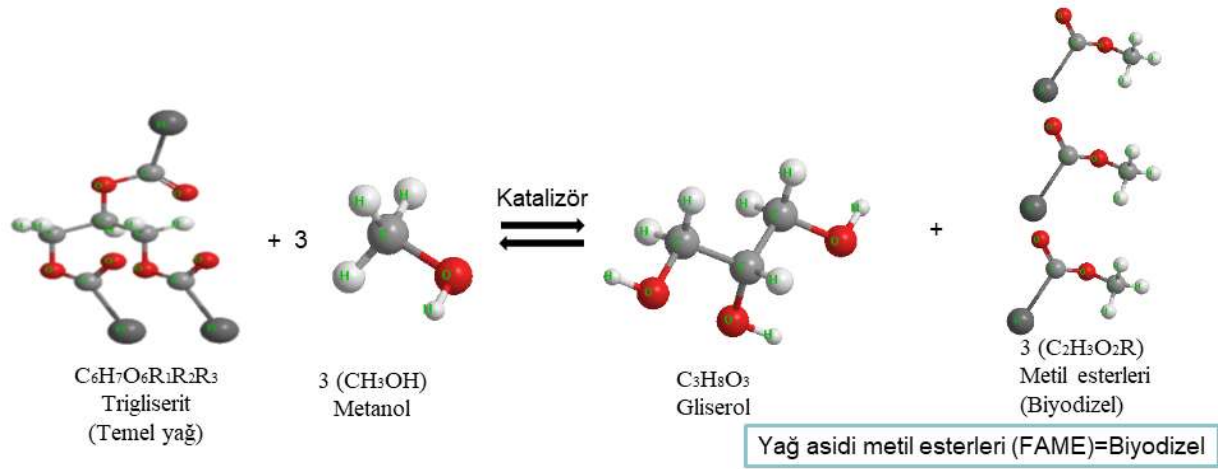
Bitkisel bir yağın alkil esterlere transesterifikasyon yoluyla viskozitesinin azaltılmasının yanı sıra, yüksek viskozite sorununa yönelik çözümler de mevcuttur: Bunlar; mikro emülsifikasyon, petrodizel ile seyreltme ve pirolizdir. Her durumda, transesterifikasyon, viskozitenin azaltılmasına yönelik olarak en çok dikkate alınan yaklaşımdır ve bitkisel yağların alkil esterleri artık biyodizel olarak bilinmektedir. Metil esterler en yaygın olarak üretilen ve kullanılan bitkisel veya bitkisel yağ esterleridir; bunun nedeni büyük ölçüde metanolün bu amaç için mevcut en yaygın ve en ucuz alkol olmasıdır.

Chavanne (1937) tarafından gerçekleştirilen çalışma, biyodizel ile ilgili o tarihe kadar yayınlanmış en önemli eser olarak kabul edilmektedir. Bu dönemde, biyodizel ilk olarak "Palm

Yağı Etil Esteri" olarak tanımlanmış, kullanılan bitkisel yağa göre genel olarak "etil ester" veya "metil ester" olarak belirtilmiştir. Ancak, biyodizelin adının resmi olarak belirlenmesi ve dünya çapında yaygınlaşması, Knothe'un 1988 yılında yayımlanan makalesi ile gerçekleşmiştir. Knothe'un bu makalesinde, metil ester ilk kez "biyodizel" terimi ile tanımlanmış ve bu terim, çevre dostu yakıtın araştırma ve kullanım alanlarının genişlemesine öncülük etmiştir.

2.4 BIYODİZEL

Alternatif enerji kaynaklarından biri olan biyodizel, dizel motorlarda kullanılan çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen hidrofobik özellikteki yağlardan elde edilen çevre dostu, yenilenebilir bir yakıt türüdür (Öğüt ve diğ., 2003; Demirbaş ve Demirbaş, 2010). Bitkisel yağların biyodizele dönüştürülebilmesi için temel adım transesterifikasyon işlemidir. Bu işlemde, trigliseritlerin (yağ) metanol veya etanol gibi kısa zincirli bir alkol ile potasyum veya sodyum hidroksit / asit veya enzim gibi katalizörler varlığında reaksiyona girerek ester ve gliserol oluşturur. Transesterifikasyon işlemi Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Transesterifikasyon ile Biyodizel Üretimi

Trigliseritler, üç mol yağ asidi ve bir mol gliserinden (gliserol) oluşan esterlerdir. Bu moleküler yapı, bitkisel yağların temel bileşenini oluşturur. Srivastava ve diğ. (2000) trigliserit moleküllerinin yapılarında önemli miktarda oksijen bulunurken, uzun zincirli hidrokarbon kısımlarında doymamışlık içerdiğini belirtmişlerdir. Bu yapı, bitkisel yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemede kritik bir rol oynamaktadır ve bu özelliklerin çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen yağlarda farklılık göstermesine neden olmaktadır.

Alternatif motor yakıtları olarak bitkisel yağlar, petrol dizel yakıtından 10-17 kat daha yüksek viskozitelere sahip, son derece viskozdur. Biyodizel, petrodizelinkine yakın bir viskozite elde etmek için ana sıvı veya katı yağın transesterifikasyonu yoluyla üretilir. Transesterifikasyon işleminin amacı yağın viskozitesini düşürmektir.

Biyodizel, orta uzunluktaki C16-C18 yağ asidi zincirlerini içeren bitkisel yağ bazlı bir yakıttır (Knothe ve diğ., 2006). Petrol kökenli dizel yakıtlara benzer özelliklere sahip olduğu için biyodizel, bu yakıtla her oranda karıştırılabilir (Demirbas, 2007). Bu tür karışımlar genellikle BXX şeklinde ifade edilir, burada XX, toplam yakıt karışımı içinde kullanılan biyodizel miktarının yüzdesini temsil eder. Biyodizel-dizel karışımları, motor parçalarının daha uzun süre çalışmasını sağlayacak üstün yağlama özelliğine sahiptir. Piyasada yaygın olarak kullanılan dizel-biyodizel karışımları şu şekilde adlandırılır:

- B20: %20 biyodizel + %80 dizel
- B50: %50 biyodizel + %50 dizel
- B100: %100 biyodizel

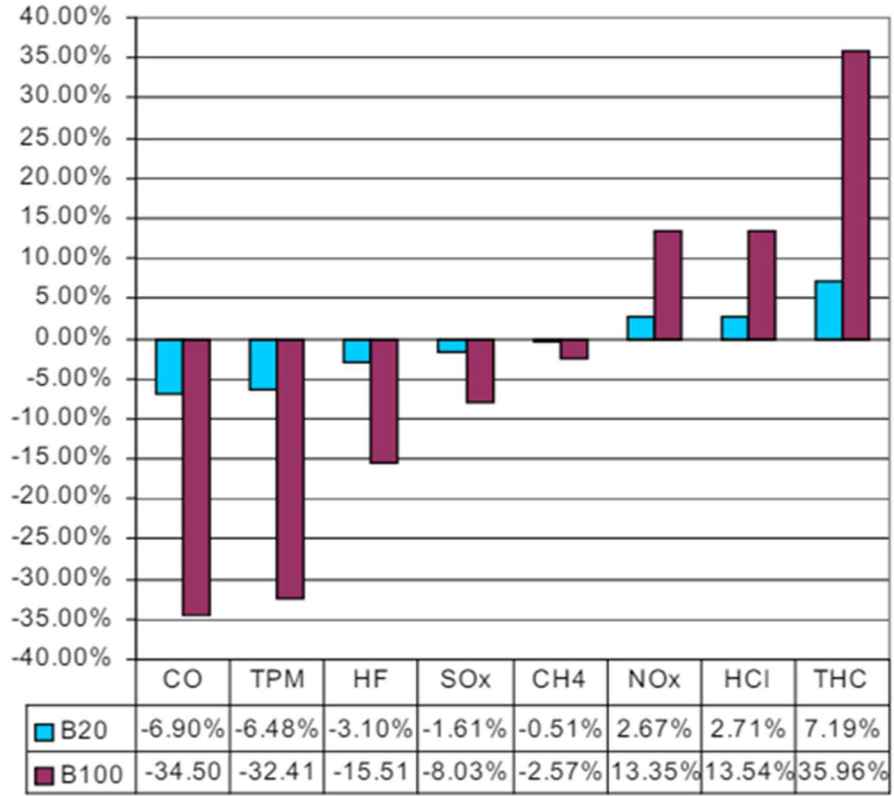
2.4.1 Biyodizel Kullanım Avantajları

Biyodizel yakıtın ulaşımda kullanılan petrol dizeliyle karşılaştırıldığında birçok önemli avantajı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır;

- Biyodizel, setan sayısı, enerji içeriği, viskozite ve faz değişiklikleri gibi temel özellikleri bakımından petrol türevi dizele oldukça benzemesine rağmen hiçbir petrol ürünü içermez ve geleneksel dizel ile uyumludur (Lin ve diğ., 2011). Bununla birlikte daha yüksek stabiliteye sahip bir biyodizel karışımı oluşturmak için fosil bazlı dizel ile herhangi bir oranda karıştırılabilir (Lin ve diğ., 2011). Bu nedenle biyodizel dünyada en yaygın biyoyakıtlardan biri haline gelmiştir.
- Biyodizel daha yüksek yanma verimliliği, daha düşük kükürt ve aromatik içerik içermektedir (Knothe ve diğ., 2006),
- Biyodizel yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilir ve biyokütle enerjisinin kullanımı, sera gazı emisyonlarını büyük ölçüde azaltma potansiyeline sahiptir ve dolayısıyla biyodizelin, fosil yakıtlarla karşılaştırıldığında küresel ısınmaya kayda değer bir biçimde daha az bir katkısı vardır. Her ne kadar fosil yakıtlar milyonlarca yıl önce fotosentezle yakalanan karbondioksiti serbest bıraksa da, biyokütle, yakıtı yetiştirmek,

hasat etmek ve işlemek için ne kadar enerji kullanıldığına bağlı olarak, kendi büyümesinde yakaladığı karbondioksitle büyük ölçüde dengelenen karbondioksiti serbest bırakır. (Agarwal, 2007; Canakçı ve Şanlı, 2008)

- Yanan biyodizelin kütle birimi başına biyodizel egzoz borusu CO₂ emisyonları, petrol dizeline göre daha düşüktür. Petrol dizelinin yerine B100 veya B20 kullanıldığında hava emisyonlarında meydana gelen en büyük azalma (%34,5) CO içindir. B20'nin yaşam döngüsü CO emisyonlarını azaltmadaki etkinliği, karışım seviyesiyle orantılı olarak düşer. Bununla birlikte, B100, petrol dizelinin yaşam döngüsünden %32,41 daha düşük yaşam döngüsü TPM emisyonları sergiler (Mata ve Martins, 2010) (Şekil 2.4).
- Biyodizelin taşınması ve depolanmasındaki riskler, petrodizel ile ilişkili risklerden çok daha düşüktür.
- Biyodizel üretiminin yerli menşeli olması, ithal petrole bağımlılığın azaltılmasında önemlidir (Amigun ve diğ., 2008).
- Biyodizel üretimi ve ham maddelerin ön işleme tabi tutulmasıyla ilgili teknolojilerin, halihazırda mevcut işlemlere dayalı olarak uygulanması basit ve kolaydır (Mata ve Martins, 2010).
- Tüm konvansiyonel dizel motorlarda kullanımı güvenlidir, petrol dizel yakıtına benzer performans ve motor dayanıklılığı sunar. Bu nedenle, yeni motor türlerine veya mevcut motorlarda önemli değişikliklere gerek yoktur, bu da biyoyakıtın benimsenmesini kolaylaştırır. (Knothe ve diğ., 2006; Mata ve Martins, 2010).



Şekil 2.4: Biyodizel (B20 VE B100) ve Petrol Dizelinin Yaşam Döngüsü Hava Emisyonlarının Karşılaştırılması (Ganev de diğ., 2018)

2.4.2 Biyodizel üretimindeki zorluklar

Günümüzde biyodizele yönelmenin arkasındaki ana itici güçlerin başında yukarıda da belirtildiği gibi biyodizel üretimiyle bağlantılı olarak çevresel etkilerin azaltılması ve bu yakıtın mevcut motorlarda kullanılabiliyor olması gelmektedir. Bununla birlikte, hem biyodizelin dizel motorlarda kullanımına yönelik yanma özelliklerinin geliştirilmesi hem de üretim maliyetlerinin düşürülmesine yönelik çalışmaların artmasına ihtiyaç vardır. Biyodizelin üretiminde aşılması gereken problemlerden bazıları şöyle özetlenebilir; (Akoh ve diğ., 2007; Agarwal, 2007).

- Hammadde maliyetleri, sermaye maliyeti ve getirisi de dahil olmak üzere doğrudan biyodizel üretim maliyetlerinin büyük bir yüzdesini oluşturur. Bu nedenle halihazırda kullanılan fosil yakıtlarla rekabet ederken henüz ekonomik olarak daha fazla uygulanabilirliğin sağlanmasına gereksinim duyulmaktadır.

- Hammadde üretimi aşamasında daha iyi ve verimli mahsullere, biyodizel üretim aşamasında ise daha hızlı ve verimli üretim süreçlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca, normalde petrokimya endüstrisinde olduğu gibi, mevcut süreçlerin sağlamlığını artırmak ve özelliklerinde önemli farklılıklar olan hammaddeleri kullanma kapasitelerini geliştirmek için farklı stratejilere ihtiyaç vardır.
- Biyodizelin dönüşümünde kullanılan trigliseritlerin molekülleri daha büyük olduğundan normal dizele göre viskozitesi daha yüksek olacaktır ve bu özellik pompa ve enjeksiyon sistemini etkileyerek motor performansını etkileyecektir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi mevcut biyodizel hiçbir değişiklik yapılmadan kullanılabilir, bununla birlikte koşullar veya kullanımı daha kısıtlayıcı olabilir. Biyodizel sınırlamalarının bir kısmını ortadan kaldırmak ve halihazırda kullanılan motorlarda biyodizel kullanımının potansiyel çevresel etkisini azaltmak için biyodizel ile harmanlanacak yeni katkı maddelerinin geliştirilmesi gerekebilir.

Tüm bu sorunlar değerlendirildiğinde yeni ve daha verimli üretim süreçlerinin geliştirilmesi açısından üretim proseslerinin her birinde gerçekleştirilecek optimizasyon çalışmaları biyodizel endüstrisi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabilir ve biyodizelin sürdürülebilir kullanımına önemli ölçüde katkıda bulunabilir.

2.5 BIYODİZEL YAKIT ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE KULLANILAN STANDARTLAR

Biyodizel yakıtın kalitesinin dünya çapında standartlaştırılması amacıyla bazı sınır değerler hayata geçirilmektedir AB, dünyanın en büyük biyodizel üreticisi olarak EN14214 standardını kullanırken, ABD ise ASTM D6751 standardını kullanmaktadır (ABD'de ASTM D 6751; Avrupa'da EN 14214). Türkiye'de de bu standardın güncel versiyonu TS EN 14214:2013, 12.06.2013 tarihinden itibaren yürürlüktedir. Bu standartlar sayesinde hem kullanıcıların güvenliği sağlanmakta hem de bu özelliklerin sağlanması durumunda çeşitli hammaddelerden biyodizel üretme olanağı sağlanmaktadır. Dizel motor üreticileri biyodizelin kullanımına bu standartlara uygun olması koşuluyla onay vermektedir.

Transesterifikasyon reaksiyonu sonunda gliserol faz ayrımı elde edilebilmektedir ancak üretilen ester ürününün yakıt kalitesinde olup olmadığının tespiti için standartlarda tanımlanan tüm özelliklerin ölçülmesi gerekmektedir. Bu standart değerlerin karşılanması koşuluyla biyodizel,

yüksek kaliteli bitkisel yağlardan veya ucuz, kalitesiz hammaddelerden üretilebilmektedir. Tablo 2.1’de biyodizel üretiminde kullanılan sınır değerler gösterilmektedir. EN 14214 ve ASTM D6751, aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli temel parametreleri kapsar.

Tablo 2.1: Amerika (ASTM D-6751) ve Avrupa (EN 14214) Biyodizel Standartlarına göre Sınır Değerler

Biyodizel özellikleri	Amerika standardı (ASTM D-6751)	Avrupa Standardı (EN 14214)	Birim
Kinematic vizkozite (at 40°C)	1,9–6,0	3,5–5,0	mm ² /s
Setan sayısı	47 min	51 min	-
Alevlenme noktası	130 min	120,0 min	°C
Yoğunluk	-	860–900	Kg/m ³
İyot Sayısı	-	120 max	-
Oksidatif Stabilité	-	6 min	saat

2.5.1 FAME İçeriği

Biyodizel üretiminde kullanılan hammaddenin yağ asidi bileşimi biyodizelin kalitesini oluşturan parametrelerden motor performansı ve emisyon özelliklerini etkilemektedir (Shanmugam ve diğ., 2020). Bu nedenle hammaddelerin biyodizel üretimindeki potansiyelini anlamak için yağ asidi bileşimini analiz etmek önemlidir.

Biyodizel üretiminde en uygun yağ asidi bileşimi için C16-C18 yağ asidi gibi orta uzunlukta yağ asidi zincirlerini içermesi önemlidir. Bununla birlikte yağ asidi bileşimindeki yüksek çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) (≥ 2 çift bağ) içeriği, biyodizelin oksidatif stabilitesini olumsuz etkileyerek onları oksidasyona ve serbest radikal saldırılarına karşı daha duyarlı hale getirir (Rai ve Gupta 2017). Özellikle depolama sırasında biyodizelin yüksek PUFA içeriği oksidasyon reaksiyonlarına uğrayarak peroksitlerin ve diğer bozunma ürünlerinin oluşmasına neden olur (Knothe 2005). Bu nedenle, iyi oksidatif stabilite sağlamak ve biyodizelin kalitesini arttırmak

için genellikle bileşimde doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin daha yüksek oranda bulunması tercih edilir.

2.5.2 Yoğunluk

Yakıt yoğunluğunun silindire püskürtülen yakıtın parçalanması üzerinde etkisi vardır. Ayrıca yakıt yoğunluğu arttıkça kütsel olarak daha fazla yakıt enjekte edilir. Bitkisel yağlardan veya katı yağlardan üretilmiş olmasına bakılmaksızın tüm biyodizel yakıtlar, dizel yakıttan daha yoğun ve daha az sıkıştırılabilir (Canakci ve Gerben 2003; Knothe 2005).

Yoğunluğu ve viskozitesi daha düşük olan bir yakıt enjekte edildiğinde daha iyi atomizasyon ve daha iyi karışım oluşumu elde edilebilir. Yakıt yoğunluğu egzoz emisyonlarını da etkiler. Yoğunluk partikül madde (PM) ve NO_x emisyonu ile ilişkilendirilebilir. Yoğunluğu yüksek olan yakıt genellikle dizel motorlarda PM ve NO_x emisyonlarının artmasına neden olur (Szybist ve diğ., 2007). Yakıtın zincir uzunluğu ve doygunluk seviyesi yoğunluğu artırır (Canakci ve Gerben 2003; Knothe 2005). Bu nedenle, katı veya gres gibi hammaddelerden üretilen biyodizeller, bitkisel yağlardan üretilen biyodizellere göre daha fazla doymuş yağ asitlerine sahiptir. Ancak yoğunluktaki bu artış, gerekli standart değer açısından sorun teşkil etmemektedir (Szybist ve diğ., 2007).

2.5.3 Viskozite

Bir motor yakıtının viskozitesi, yakıtın en kritik özelliklerinden biridir. Yakıtın püskürtülmesinde, karışım oluşumunda ve yanma sürecinde baskın bir rol oynar. Yüksek viskozite, enjeksiyon prosesine müdahale eder ve yakıtın yetersiz atomizasyonuna yol açar (Çanakçı ve Sanli 2008). Ayrıca, yakıt viskozitesi arttıkça enjektörden gelen yakıt damlacıklarının ortalama çapı ve bunların nüfuzu da artar (Choi ve Reitz 1999). Yakıtın havayla verimsiz karışması motorda eksik yanmaya katkıda bulunur (Choi ve Reitz 1999; Lee ve diğ., 2002).

Herhangi bir yakıtın viskozitesi kimyasal yapısıyla ilgilidir. Zincir uzunluğunun artmasıyla viskozite artar, çift bağ sayısının artmasıyla (doymamışlık düzeyi) azalır (Goering ve diğ., 1982; Graboski ve McCormick, 1998; Knothe, 2005). Ayrıca hammaddelerin ve biyodizel yakıtların viskozitesi ve ısı içeriği birlikte artma eğilimindedir (Demirbas 2003).

2.5.4 Setan Sayısı

Setan sayısı, yakıtın tutuşma kalitesinin ana göstergesidir ve benzinli yakıtın oktan sayısının tersidir. Enjeksiyonun başlaması ile yanmanın başlaması arasındaki süre “tutuşma gecikme süresi” olarak adlandırılır ve Setan sayısı arttıkça tutuşma gecikmesi azalır ve ana yanma aşaması (difüzyon kontrollü yanma) artar. Uzun ateşleme süresi dizelde vuruntuya neden olacağından kabul edilemez (Çanaklı ve Şanlı 2008).

Bununla birlikte setan sayısının çok yüksek olması da motor açısından istenmeyen durumlar ortaya çıkarabilmektedir. Dizel yakıtın setan sayısı çok yüksekse bu yakıt enjektöre kısa bir mesafede ateşlenecek ve enjektörün aşırı ısınmasına neden olacaktır. Yoğun ısınma sonucu enjektör içerisinde pişen yakıt parçacıkları enjektör memesini tıkayabilir. Bu nedenle dizel yakıtın setan sayısının 65'ten fazla olmaması gerekmektedir (Heywood 1988).

Setan sayısının direkt enjeksiyonlu dizel motor performansı üzerindeki etkisini gözlemlemek için İcingur ve Altıparmak (2003) motor testleri gerçekleştirdi. Bu amaçla 46, 51, 54,5 ve 61,5 setan sayısına sahip yakıtlar 150 bar enjeksiyon basıncında ve tam yük koşullarında test edilmiştir. Sonuçlar, setan sayısı 46'dan 54,5'e çıkarıldığında motor torkunun ve güç çıkışının sırasıyla %5 ve %4 arttığını gösterdi. Ancak setan sayısı 54,5'in üzerine çıkarıldığında motor performansında önemli bir artış gözlenmemiştir.

Zincir uzunluğunun artması, dallanmanın ve doymamışlığın azalmasıyla setan sayısı artar (Knothe 2008; İslam ve diğ., 2013). Bu kimyasal yapılar aynı zamanda ısıtma değerini de artırır, dolayısıyla setan sayısının viskozite ve ısıtma değeriyle birlikte artma eğilimi vardır (Demirbas, 2003).

2.5.5 Alevlenme Noktası

Alevlenme noktası, yakıtın ateşleme ile temas ettiğinde yanmaya başlayacağı sıcaklığı ifade eder (Knothe, 2005). Bu sıcaklık, depolama ve taşıma sırasında güvenlik açısından önemli bir faktördür ve biyodizelin uçuculuğunu da etkiler. Yüksek viskozite ve düşük uçuculuk kombinasyonu, motorun ateşleme esnasında gecikmesine neden olabilir (Szybist, 2007). Bununla birlikte yüksek alevlenme noktasına sahip bir yakıt, yanma odasında karbon birikimine neden olabilir.

2.5.6 Soğuk Akış Özellikleri

Soğuk akış özellikleri esas olarak biyodizelin düşük sıcaklıktaki akış performansını belirlemek için kullanılan önemli biyodizel kalite parametrelerinden biridir (Knothe, 2005). Bir yakıtın soğuk akış özellikleri bulutlanma noktası ve akma noktası tarafından belirlenir. Bulutlanma noktası, soğutulduğunda bir sıvı içinde balmumu kristallerinden oluşan bir bulutun ilk ortaya çıktığı sıcaklıktır. Oluşan bu kristaller yakıt hatlarını ve filtreleri tıkayabileceğinden çalışma sorunlarına neden olabilir. Akma noktası, yakıtın hala aktığı ve pompalanabildiği en düşük sıcaklıktır (Lee ve diğ., 1995). Kaynağına bakılmaksızın tüm biyodizel yakıtlar, dizel yakıttan daha yüksek bulutlanma ve akma noktalarına sahiptir ve bu zayıf soğuk akış özelliği, biyodizelin yaygın kullanımının önündeki en kritik engellerden biridir.

Kaynağına bakılmaksızın tüm biyodizel yakıtlar, dizel yakıttan daha yüksek bulutlanma ve akma noktalarına sahiptir ve bu özellik biyodizelin yaygın kullanımının önündeki en kritik engellerden biridir. Biyodizelin yağ asidi bileşimi onun soğuk akış özelliklerini büyük ölçüde etkiler. Biyodizel yakıtın donma noktası arttıkça artar, karbon zincirindeki karbon atomları ve artan çift bağlarla azalır (Demirbaş 2003; Knothe 2005). Bu bilgiye göre, yüksek miktarda doymuş yağ asidi içeren hammaddelerden elde edilen biyodizelin bulutlanma noktasının ve akma noktasının daha yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Nitekim bitkisel yağ bazlı biyodizelin bulutlanma oranı daha düşüktür.

Biyodizelin soğuk akış problemi, transesterifikasyonda izo-propanol, 2-butanol gibi dallı zincirli alkollerin kullanılmasıyla aşılabılır. Lee ve diğ., (1995) hem sıvı hem de hayvansal yağlardan elde edilen biyodizel yakıtların soğuk akış özelliklerini geliştirmek için çalışma yaparak soya fasulyesi yağının izo-propil ve 2-bütil esterleri için bulutlanma noktasının, karşılık gelen metil esterlerinkinden sırasıyla 7 ve 10°C daha düşük olan -9 ve -12°C olduğu sonucuna vardılar.

2.5.7 Oksidasyon Kararlılığı

Biyodizelin bir diğer önemli parametresi oksidasyon kararlılığıdır. Bu özellik, yakıtın uzun süreli depolama sırasında oksidasyona karşı direncini gösterir. Ayrıca biyodizel oksitlendikçe daha viskoz hale gelir ve setan sayısı artar (Çanakçı ve diğ., 1999). Bu nedenle oksitlenmiş biyodizel oksitlenmemiş olana göre daha erken yanmaya başlar ve NO_x emisyonu artar

Biyodizel yakıtın kimyasal yapısı oksidasyon reaksiyonunda önemli bir faktördür. Oksidasyon, zincirlerdeki çift bağların varlığından kaynaklanır; yani, çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin yağ asidi kompozisyonuna sahip hammaddeler doymuş veya tekli doymamış yağ asitlerine sahip hammaddelere göre çok daha duyarlıdır (Knothe, 2005).

2.6 BIYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANILAN HAMMADDELER

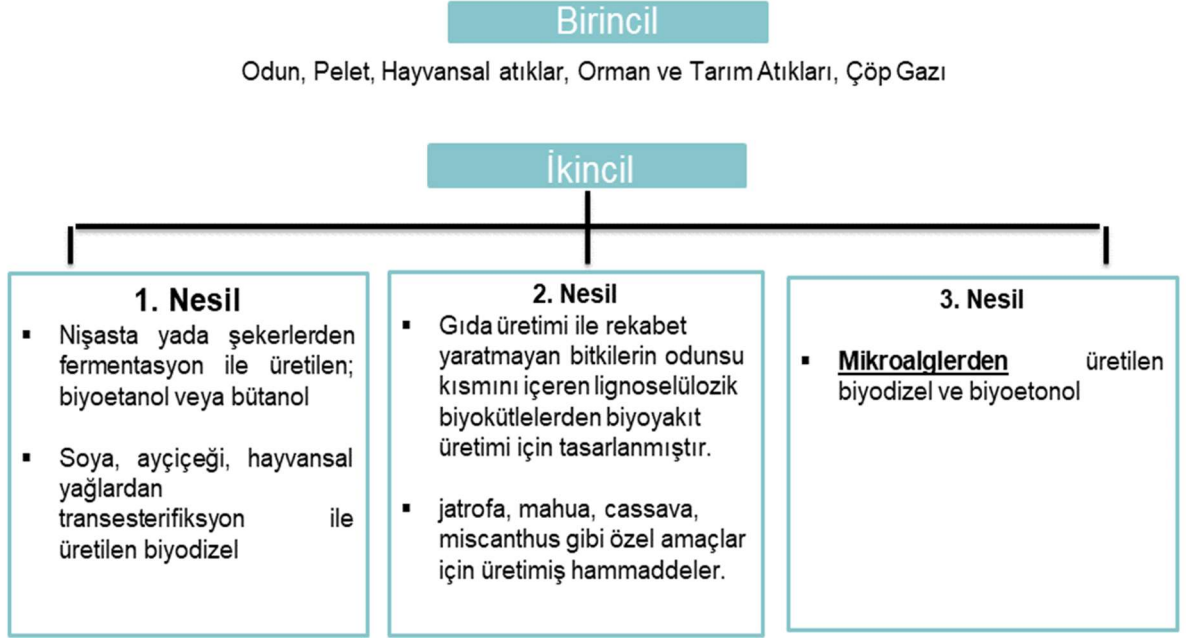
Biyokütlenin işlenmesi ile üretilen biyodizel gibi biyoyakıtlar üretim teknolojilerine, hammadde türüne veya gelişim seviyesine göre birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyoyakıtlar olarak sınıflandırılmaktadırlar (Dragone ve diğ., 2010; Nigam ve Sing 2011) (Şekil 2.5).

Birinci nesil biyoyakıt kaynakları arasında; mısır, arpa, şeker kamışı, ayçiçeği, soya, palm yağı gibi gıda olarak da kullanılan yağlı tohum bitkileri yer almaktadır (Lam ve Lee, 2012; Sims ve diğ., 2010). Bu biyoyakıt kaynaklarının CO₂ emisyonlarının azaltılması ve yerli enerji üretimine alternatif olabilmesi açısından avantajlı olduğu belirtilmektedir (Naik ve diğ., 2010; Dragone ve diğ., 2010). Fakat enerji kaynağı olarak insan gıdası için tüketilen yağların kullanımının, gıda sektöründe yaratacağı rekabet nedeniyle önemli ekonomik ve çevresel sınırlamalara neden olmuştur (Dragone ve diğ., 2010; Lam ve Lee, 2012; Maity ve diğ., 2014).

Birçok birinci nesil biyoyakıtın sürdürülebilirliğine yönelik artan eleştiriler, lignoselüloz gibi gıda dışı hammaddelerden üretilen ikinci nesil biyoyakıtların geliştirilmesine olan ilgiyi artırmıştır (Searchinger ve diğ., 2008).

İkinci nesil biyoyakıt kaynaklarının hammaddesini birinci nesil kaynakların aksine, insan gıdası için kullanılmayan bitkilerin odunsu kısmını içeren lignoselülozik kaynaklı biyokütller ve evsel katı atıkların organik bileşenleri oluşturmaktadır (Dragone ve diğ., 2010; Maity ve diğ., 2014; Abou-Shanab ve diğ., 2015). İkinci nesil biyoyakıtlar insan gıdası ile rekabet oluşturmaması bakımından önemli olmakla beraber (Nigam ve Singh, 2011) biyokütle üretiminde yüksek yağ verimi sağlamak için düzenli sulama ve yüksek miktarda gübre kullanımı açısından bazı dezavantajlara neden olur (Lam ve Lee, 2012). Bununla birlikte lignoselülozik biyokütllerin fermente şekerlere dönüşmesi sırasında yüksek maliyetli ön arıtım teknolojiler gerekmektedir. Sonuç olarak ikinci nesil biyoyakıt kaynaklarının da büyük ölçekte üretiminin ekonomik açıdan sürdürülebilir olmadığı bildirilmiştir (Dragone ve diğ., 2010).

Daha sürdürülebilir ve ekonomik olarak rekabetçi biyokütle kaynak arayışları, araştırmacıların dikkatini 3. nesil biyoyakıt kaynakları olan mikroskobik organizmalara yönlendirmiştir. Mevcut bilimsel bilgi ve teknolojik gelişmeler ışığında, mikroalglerden elde edilen üçüncü nesil biyoyakıtların, birinci ve ikinci nesil biyoyakıtlardaki dezavantajları içermeyen alternatif bir enerji kaynağı olarak ön plana çıktığı görülmüştür (Nigam ve diğ., 2011).



Şekil 2.5: Biyoyakıt Kaynaklarının Sınıflandırılması (Dragone ve diğ., 2010; Nigam ve Singh, 2011)

2.7 MİKROALGLER

Mikroalgler tatlı su ve deniz ortamında doğal olarak bulunan tek hücreli mikroskobik organizmalardır. Oldukça yüksek tür çeşitliliğine sahip (40.000'den fazla), tek hücreli veya filamentli formda bulunabilirler (Hu ve diğ., 2008). Mikroalgler, farklı sıcaklık, tuzluluk, pH ve besin varlığına karşı geniş bir tolerans aralığıyla ototrofik veya heterotrofik olarak büyüyebilir (Hu ve diğ., 2008). Siyanobakteriler gibi prokaryotik gruba dahil olan algler olduğu gibi, diatomlar, sarı-yeşil algler, kırmızı algler, kahverengi algler, dinoflagellatlar ve yeşil algler gibi çeşitli ökaryot gruba dahil olan algler de bulunmaktadır (Hu ve diğ., 2008; Packer 2009).

Mikroalgler de tıpkı bitkiler gibi karbondioksit ve güneş ışığını kullanarak fotosentez yaparlar ve bu sırada lipid, karbonhidrat ve protein gibi besin maddelerini yapılarında biriktirerek besin açısından zengin biyokütleye dönüştürebilirler. Bununla birlikte zorlu çevre koşullarında

yetişebildikleri için diğerkarasal bitkilerle rekabet etmeden verim sağlayabilmektedirler (Gong ve Jiang 2011).

Mikroalg lipitlerinin çeşitliliği nedeniyle, biyodizel üretimine uygun yağlı mikroalg suşlarının seçimi, çok sayıda mikroalg suşunun incelenmesini gerektirmektedir. Yağ oranı yüksek alglerin ilk büyük ölçekteki toplanması ve taranması, yüksek lipit içerikli alglerden biyodizel ile ilgili alışma ABD Ulusal Yenilenebilir Enerji Laboratuvarı (NREL) tarafından 1978 yılında başlatıldı. 8 yıl süren bir çalışmayla 3.000'den fazla tür toplanmış ve sonunda 300'e yakın alg türünün biyodizel üretimi için uygun içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir (Sheehan ve diğ., 1998).

Son zamanlarda, lipit üretkenliğini artırmak için kültür koşullarının optimize edilmesine ve biyodizel üretim potansiyelinin değerlendirilmesine odaklanan, mikroalglerin taranmasına yönelik bazı çalışmalar rapor edilmiştir (Gouveia ve diğ., 2009; Rodolfi ve diğ., 2009; Cheng ve diğ., 2013; Oğuz ve diğ., 2024). Mikroalglerin taranmasına yönelik rutin prosedürler, sahadan veya alg kültür koleksiyonundan numune alma, izolasyon ve saflaştırma, mikroalglerin tanımlanmasını ve lipit üretim potansiyellerinin araştırılması gibi basamakları kapsamaktadır (Mutanda ve diğ., 2011).

2.7.1 Biyodizel retiminde Kullanılan Mikroalglerin Kullanım Avantajları

Mikroalglerin biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanımının avantajları, yüksek bitkilere ve diğerk organizmalara göre avantajlarından dolayı büyük ilgi görmüştür (şekil 2.6). (Dragone ve diğ., 2010; Chisti, 2007). Bu avantajlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir;



Şekil 2.6: Biyodizel Üretiminde Mikroalglerin Kullanım Avantajları (Dragone ve diğ., 2010)

- Mikroalgler hızla büyür ve çoğu türü, büyük ölçekli biyodizel üretimi için yeterli hammadde sağlayabilen yüksek miktarda lipit içerir (Chisti 2007);
- Mikroalg kültürü için ekilebilir araziye ihtiyaç duyulmaması, bunların gıda üretimiyle çatışmadan yetiştirilmesine olanak sağlar. Chisti (2007) tarafından yapılan bir hesaplama göre, ABD'nin mevcut ulaşım yakıtı ihtiyacının yalnızca yarısının biyodizelle karşılanması, en yüksek petrol verimliliğiyle (5.950 l ha^{-1}) palmiye yağı yetiştirmek için toplam ekim alanının %24'ünü gerektirecektir. Öte yandan, eşdeğer biyodizel üretebilen biyokütlede %30 yağ bulunan mikroalglerin yetiştirilmesi için mevcut ekim alanının yalnızca %2,5'i gerekli olacaktır. Gereken ekim alanı yüzdesi daha da düşük olabilir çünkü birçok yağlı mikroalg için biyokütledeki %30 yağ içeriğine kolaylıkla ulaşılabilir;
- Mikroalg hücreleri, havadaki CO_2 'yi
- sabitlemek ve karbonu karbonhidratlara ve lipitlere dönüştürmek için yüksek bitkilerinkine benzer fotosentetik mekanizmaya sahiptir; bazı türler, biyodizel üretimi için uygun olan büyük miktarda triasilgliserit (TAG'ler) biriktirir (Scott ve diğ., 2010). Mikroalglerin fotosentetik mekanizması, glikoz ve diğer organik karbon kaynaklarını kullanan, petrol üreten heterotrofik mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında uygun maliyetlidir (Kim ve diğ., 2019);
- Mikroalgler, enerji santralleri ve diğer endüstriyel kaynaklardan yayılan büyük miktardaki CO_2 'yi ortadan kaldırarak sera gazı azaltımına katkıda bulunabilir (Packer

2009); Çevresel açıdan bakıldığında, bazı mikroalgler, aşırı azot ve fosfor besin maddeleri içeren, yüksek oranda kirlenmiş belediye ve tarımsal atık suları verimli bir şekilde arıtılabilir (Votolina ve diğ., 2005).

- Çekici bir biyoreaktör sistemi olarak mikroalgler, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri, gıda maddeleri için karotenoidler ve kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanılan diğer bileşikler (Walker ve diğ., 2005) dahil olmak üzere faydalı yan ürünler üretebilir. Bu yan ürünlerin entegre kullanımı genel üretim maliyetlerinin azaltılmasına önemli katkı sağlayacaktır.
- Mikroalgler ayrıca genetik mühendisliği yoluyla alkanlar, etanol, bütanol ve hidrojen gibi diğer yakıtları da üretebilir (Radakovits ve diğ., 2010);
- Mikroalglerden elde edilen biyodizelin kullanımı, petrol türevi dizelle karşılaştırıldığında kükürt dioksit, nitroz oksit ve diğer kirlenici maddelerin minimum düzeyde salınmasına neden olur (Mutanda ve diğ., 2011).

2.7.2 Mikroalglerden Elde Edilen Değerli Kimyasal ve Biyoaktif Bileşikler

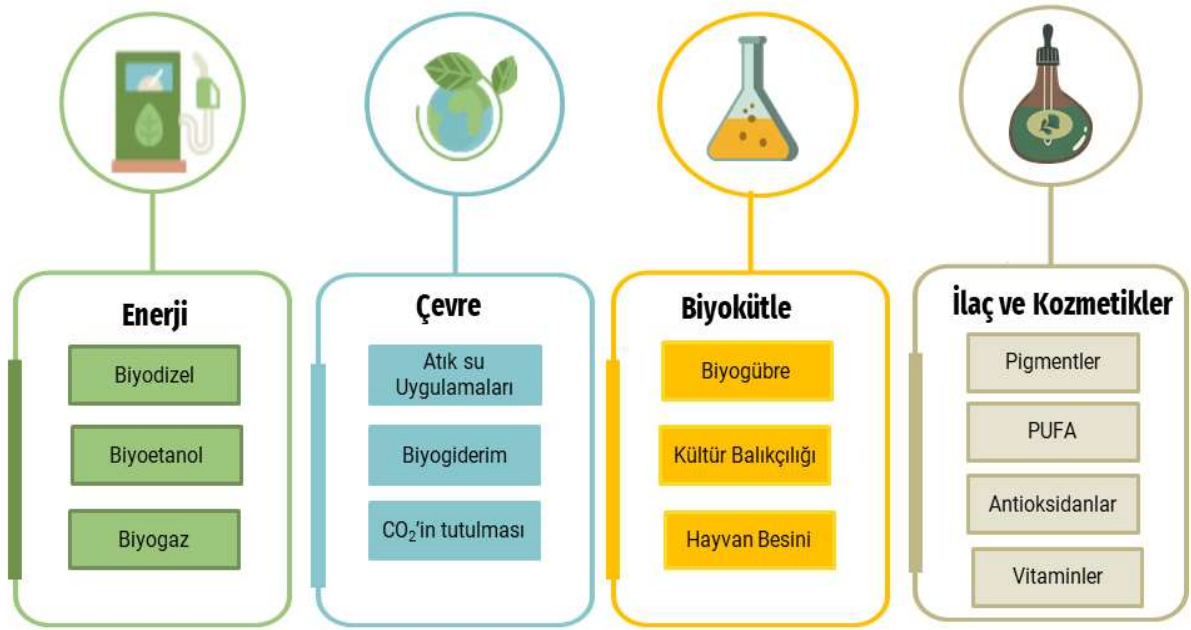
Mikroalgler, karotenoidler (Borowitzka 2010), uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (Mendes ve diğ., 2009) ve fikobilinler (Chini ve diğ., 2023) dahil olmak üzere ticari olarak üretilen yüksek değerli kimyasalların önemli kaynaklarıdır. Mikroalglerin (yani prokaryotik siyanobakteriler ve ökaryotik mikroalgler) tür çeşitliliği oldukça yüksektir bu çeşitlilik henüz tam olarak araştırılmamıştır (Massana ve diğ., 2006; Stern ve diğ., 2010). Bu evrimsel ve filogenetik çeşitlilik aynı zamanda bu organizmaların kimyasal bileşiminde de büyük bir çeşitlilik anlamına gelir ve bu nedenle, bu onları biyolojik araştırma ve geniş bir biyomolekül yelpazesinin ticari kaynakları olarak potansiyel kullanım açısından son derece çekici kılmaktadır (Walker ve diğ., 2005) Mikroalglerden elde edilen değerli ürünleri Şekil 2.7' de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: Mikroalglerden Elde Edilen Ürünler

Mikroalgler bazı hayvanlar için besin kaynağı olarak su sistemlerinde gereklidir (Bhuyar ve diğ., 2021). Bunlar aynı zamanda farmasötik ürünler, kozmetikler, gıda katkı maddeleri, gübreler, sağlık takviyeleri ve biyoyakıtlar (örn. biyodizel ve etanol) üretmek için kullanılabilecek karbon türevli bileşiklerin kaynağıdır (Mehariya ve diğ., 2021; Siddiki ve diğ., 2022). Sonuç olarak, geniş bir yelpazedeki karbon kaynakları (örneğin, karbon üreten nokta kaynaklar veya atık su arıtma tesisleri), azot ve fosforu büyümeleri için kullanılabilir, böylece besin kaynaklarının maliyeti azaltılabilir (Chandra ve diğ., 2021). Mikroalglerin kullanım alanları Şekil 2.8'de gösterilmiştir.

Bununla birlikte mikroalglerin sahip oldukları trigliseritlerin (TAG'ler) içerikleri endüstriyel ölçekte biyodizel üretimi için hammaddeyi oluşturur (Bhuyar ve diğ., 2021). Bu nedenle, bu mikroorganizmaların atık sularda yetiştirilmesinin faydaları ve bunların biyoyakıtlara dönüştürülmesi, enerji üretimi için alternatif süreçler sunmak üzere incelenmiştir. Zhou ve diğ., (2019), biyodizel üretimi için %23'lük bir lipit geri kazanım oranı elde etmek amacıyla belediye atık suyunda *Scenedesmus obliquus* mikroalgini yetiştirme potansiyelini incelemişlerdir Chandra ve diğ., (2021), ise %19'luk bir lipit içeriği elde etmek için süt atıksuyuyla beslenen mikroalglerin (*Chlorella minutissima*, *Scenedesmus abundans*, *Nostoc muscorum* ve *Spirulina* sp.) birarada üretimi konusunda deney yürütmüştür.



Şekil 2.8: Mikroalgelerin Kullanım Alanları

2.7.3 Mikroalgelerin Lipit İçerikleri

Mikroalgelerde bulunan lipitler genellikle plazma membranından, endo-membranlardan, kloroplastlardan ve lipit cisimciklerinden elde edilir (Levasseur ve diğ., 2020). Lipitler hücrede enerji depolama, enerji substratları olarak, hücre zarının yapısal bileşenleri olarak ve metabolik süreçlerde (sinyal iletimi, transkripsiyonel ve translasyon kontrolü, hücreler arası etkileşimler, keseciklerin salgılanması ve transferi) kullanılabilir (Lupette ve Benning, 2020).

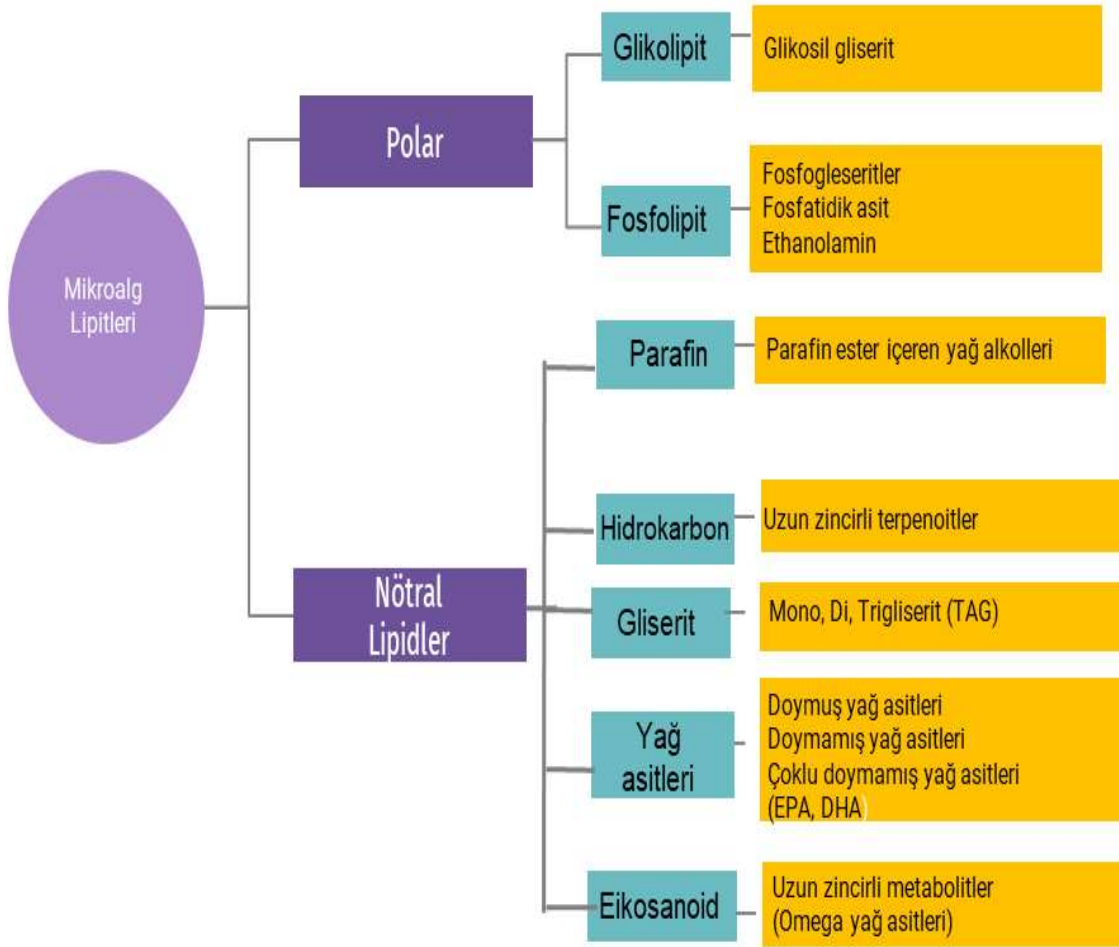
Lipitler, genel olarak 2 grup altında sınıflandırılır; (Şekil 2.9).

- ***Nötral lipitler;*** (genellikle TAG'ler), depo lipitler olarak da bilinen bu lipitler hücrelerde enerji depou olarak görev yapar ve fotosentez yoluyla sentezlenir. Bu lipitler arasında monogliseritler (MAG'ler), digliseritler (DAG'ler) ve trigliseritler (TAG'ler), serbest yağ asitleri, hidrokarbonlar ve pigmentler bulunur (Robles ve diğ., 1998)
- ***Polar lipitler;*** (fosfolipitler ve steroller), mikroalg yapılarının önemli bileşenleri olmakla beraber, hücre membranını oluşturan yapısal lipitler olarak tanımlanmaktadır (Halim ve diğ., 2012).

Nötral lipitlerden, açılgliseroller (gliseritler) gliserol omurgasına bağlı yağ asidi esterlerinden oluşmakta ve yağ asitlerinin sayılarına göre (triaçilgliserol, diaçilgliserol, monoaçilgliserol) kategorize edilmektedirler. Lipit sınıfı bakımından açılgliserollerin, polar lipitlerden daha düşük doymamışlık derecesine sahip olmaları nedeniyle, biyodizele dönüşüm için daha uygun oldukları bildirilmiştir (Halim ve diğ., 2012). Hidrokarbonlar, steroller, ketonlar, pigmentler (karotenler ve klorofiller) gibi yağ asidi içermeyen bazı nötral lipit türleri de mevcuttur. Bu lipit fraksiyonları organik solventlerde çözünmelerine rağmen biyodizele dönüştürülemezler. Özellikle mikroalglerden elde edilen lipitler, çeşitli fraksiyonlardan oluşan kompozit karışımlar olarak ekstrakte edilmektedirler

Mikroalglerin biriktirdikleri lipitler genellikle (>%80) triaçilgliserol formunda olup 12-22 karbonlu ve 6 çift bağa kadar olabilen doymamış cis-isomerler ve doymuş yağ asitlerinden oluştuğu belirtilmektedir. Asetil-CoA yağ asitlerinin oluşumunda öncü görev almaktadır (Lupette and Benning, 2020). Asetil-CoA, malonyl-CoA'nın (lipit biyosentezinin ilk ürünü) oluşumunu tetikler. Bu asetil-CoA havuzu, sitosol/plastit glikolizinden veya dihidroksiaseton fosfat aracılığıyla Calvin döngüsünden üretilir (Ananthi ve diğ., 2021). Daha sonra, asil-asid taşıyıcı protein (asil-ACP), plastitten ekstraplastid lipitlerin (fosfolipitler, TG'ler ve betain lipitleri) üretilmesi veya endoplazmik retikulumda poli doymamış yağ asitlerinin oluşumuna katılması için plastitten ihraç edilebilir (Lupette ve Benning, 2020).

Lipitlerin sayısı ve karbon zincirindeki çift bağların varlığı veya konumu, mikroalg türüne ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişebilir (Rodolfi,ve diğ., 2009). Optimum koşullar, yağ asitlerinin gliserol bazlı membran lipitlerine dönüşümünü kolaylaştırabilirken, olumsuz koşullar, triasilgliseroller gibi nötr lipitlerin sentezini artırabilir. Tipik olarak birçok mikroalg, araşidonik asit, eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ve palmitik gibi doymuş yağ asitlerini içermektedir (Renaud,ve diğ., 1991). Alglerden türetilen lipitlerin önemi, eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) ve bunların öncüsü α -linolenik asit gibi PUFA'larından fonksiyonel gıda ürünleri elde etmek için alternatif bir kaynak olarak ticari değerlerinde yatmaktadır (Olofsson ve diğ., 2012).

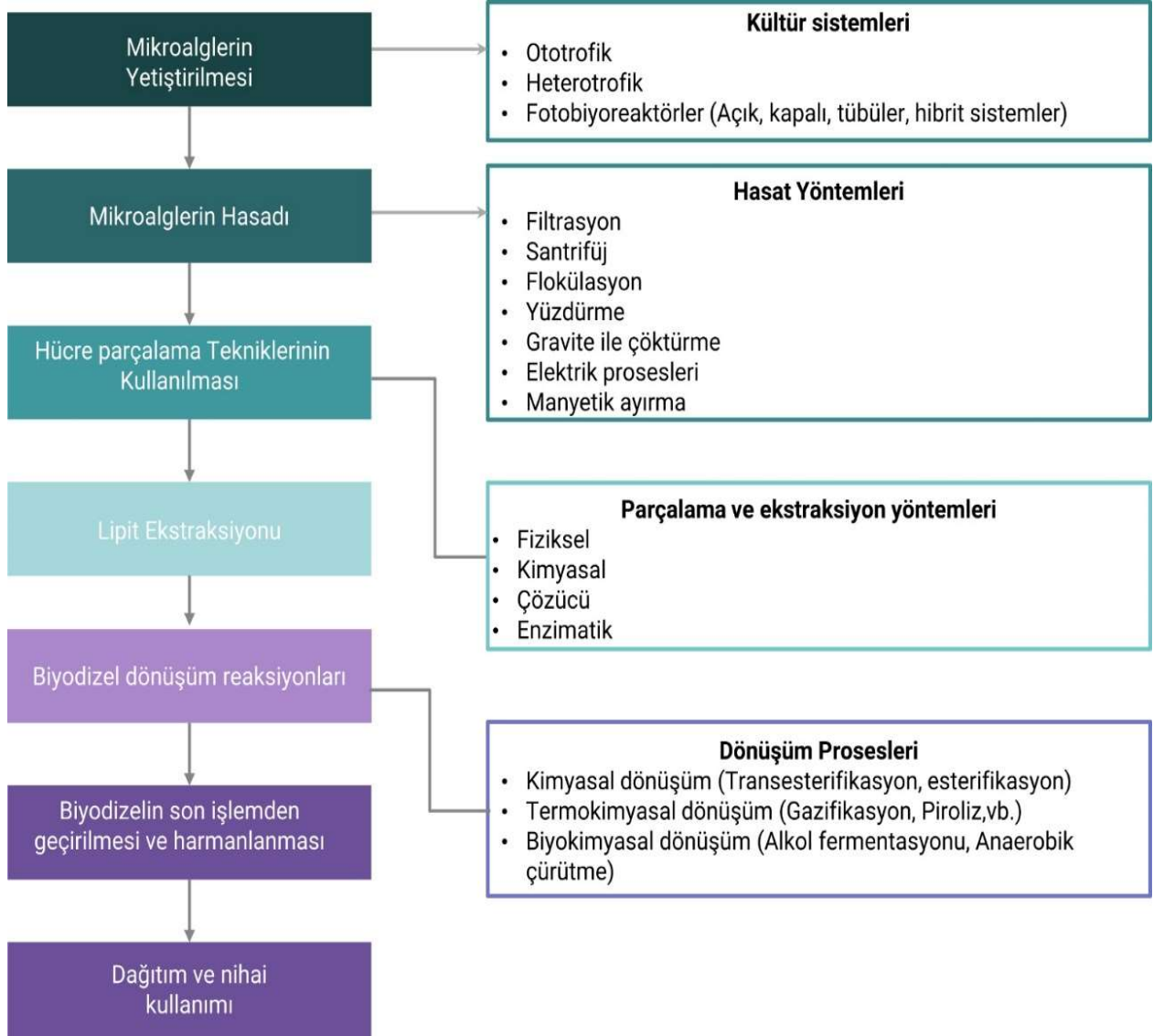


Şekil 2.9: Mikroalglerin Lipit İçerikleri (Karım ve diğ., 2020)

2.8 MİKROALGLERDEN BİYODİZEL ÜRETİM AŞAMALARI

Mikroalglerden biyodizel üretimi için mevcut tüm süreçler, hücrelerin yetiştirildiği bir üretim ünitesini içerir, ardından hücrelerin yetiştirme ortamından ayrılması ve ardından lipidlerin çıkarılması gelir. Daha sonra, lipidlerin biyodizel veya diğer biyoyakıt dönüşümü için belirli işlem ve teknolojilerin kullanılması gerekmektedir.

Şekil 2.10 alg biyodizel değer zinciri aşamalarının şematik bir temsilini göstermektedir. Bu aşamalar, mikroalglerin yetiştirilme koşullarına bağlı olarak seçilmesi ve mikroalglerin büyümesi için bir yetiştirme sisteminin tasarlanması ile başlar. Ardından, biyokütlenin hasadı, lipid ekstraksiyonu ve biyodizel dönüşüm reaksiyonlarını kapsar.



Şekil 2.10: Mikroalglerden biyodizel üretim şeması (Karım ve diğ., 2020)

Basitleştirilmiş bir şekilde biyodizel üretim zinciri aşamaları, aşağıdaki ana adımları içermektedir. Bununla birlikte, mikrolag üretiminden biyodizel eldesine kadar geçen aşamalarda bazı adımların birleştirilmesi (Lipit ekstraksiyon ve Transesterifikasyonu) veya verimliliği arttırmak için gerçekleştirilen kültür koşullarının optimizasyonu ve hücrelerin ön parçalama işlemlerine maruz bırakılması gibi süreçler yetiştirilen türlere göre farklılık gösterebilmektedir.

Mikroalg Kültürlerinin Kültür Koşullarının Optimizasyonu

- 1- Mikroalglerin Yetiştirilmesi
- 2- Mikroalglerin Hasadı
- 3- Hücre parçalama Tekniklerinin Kullanılması
- 4- Lipit Ekstraksiyonu
- 5- Transesterifikasyon ile Biyodizel üretimi
- 6- Biyodizelin son işlemden geçirilmesi ve harmanlanması
- 7- Dağıtım ve nihai kullanımı

2.9. MİKROALGLERİN BİYODİZEL ÜRETİMİNE ETKİ EDEN PARAMETRELER

Mikroalglerden biyodizelin ticari üretimi, esas olarak mevcut biyokütle üretimi ve yakıt dönüştürme yollarıyla ilişkili yüksek maliyetler nedeniyle hala engellerle karşı karşıyadır. Bu biyokütle kaynağının rekabet gücünü artırmak amacıyla maliyet gereksinimini azaltmaya yönelik çeşitli planlar halen araştırılmaktadır. Bunlar arasında biyokütle üretkenliği ve verimindeki iyileştirmelere yönelik araştırmalar, foto-biyoreaktör optimizasyonu ve alternatif "mikroalg-biyodizel" dönüşüm teknolojileri yer almaktadır (Ehimen ve diğ., 2010).

Mikroalglerin içerdikleri Lipit ve FAME verimleri, tür çeşitliliğine, kültürlerin yetiştirildiği ortam şartlarına (besiyeri içeriği sıcaklık, ışık, havalandırma), ekstraksiyon öncesinde mikroalg hücrelerinin parçalama tekniklerine, lipit ve transesterifikasyon metodlarına göre farklılık gösterebilmektedir.

2.9.1 Tür Çeşitliliği

Başarılı alg biyoteknolojisi temel olarak belirli kültür koşulları ve ürünleri için ilgili özelliklere sahip doğru alglerin seçilmesine bağlıdır (Pulz ve Gross 2004). Mikroalglerin yüksek tür çeşitliliğine sahip olması, lipit ve FAME içeriklerinin hem türler arasında hem de ortam şartlarına bağlı olarak farklılık göstermesi nedeniyle biyodizel üretiminde uygun tür seçiminin belirlenmesi için detaylı araştırmaların yapılmasını gerektirmektedir (Pulz ve Gross 2004). Tür seçimi çevresel etkinin, sürdürülebilirliği, biyoyakıtın üretilebilirliği ve süreç ekonomisinin değerlendirilmesi açısından önemli olsa da, şu anda her parametreyi maksimuma çıkaran mükemmel bir mikroalg türü mevcut değildir (Griffiths ve Harrison 2009).

Mikroalglerin yetiştirilme koşulları, büyüme hızları içerdikleri lipit miktarları ve yağ asidi kompozisyonları tür seçimi etkileyen parametrelerden bazılarıdır. (Sheehan ve diğ., 1998). Örneğin, bazı alg türleri, daha hızlı büyüyen alglerle rekabette geride kaldıkları için açık havada güvenilir bir şekilde yetiştirilemez. Bununla birlikte, daha yavaş büyüme oranlarına sahip olanlar, daha yüksek lipit içeriğinin birikmesini kolaylaştırmak için potansiyel olarak kapalı bir fotobiyoreaktörde muhafaza edilebilir. Bu durum üretim maliyetleri üzerinde etkilidir. Bu nedenle yerel iklim koşulları için optimize edilmiş hızlı büyüyen, üretken türlerin seçimi, herhangi bir yoğun alg kültürünün başarısı ve özellikle biyodizel gibi değerli ürünler için temel öneme sahiptir (Griffiths ve Harrison 2009). Hızlı büyüme, yüksek biyokütle verimliliğini teşvik eder. Yüksek biyokütle yoğunluğu, hasat hacmi başına verimi artırır ve maliyeti azaltır. Yüksek büyüme oranı aynı zamanda planktonik, sürekli kültür sistemlerinde daha yavaş yetiştiricilerin rekabeti nedeniyle kontaminasyon riskini de azaltır. İstenilen ürünün yüksek içeriği proses verim katsayısını artırır ve birim ürün başına ekstraksiyon ve saflaştırma maliyetini azaltır (Borowitzka 1992).

Örneğin, *Chlorella vulgaris*, küçük hücre boyutundan dolayı büyük ölçekli ekim için yaygın olarak kullanılan bir türdür ve bu da yetiştirme ortamında dolaşımını kolaylaştırır (Saraylo ve diğ., 2018). Ek olarak, yüksek yağ içeriğine ve zorlu ortamlara dayanma yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte *Botryococcus* genusu *Chlorella* ile karşılaştırıldığında nispeten düşük büyüme oranlarına sahip olsa da *Botryococcus* cinsinin (Rao ve diğ., 2007) yüksek hidrokarbon içeriği ve uygun yağ asidi bileşimi, onu biyodizel üretimi için en kapsamlı şekilde araştırılan tatlı su cinsi haline getirmiştir (Oğuz ve diğ., 2024). Bununla birlikte çeşitli yeşil mikroalgler arasında *Scenedesmus* cinsi yüksek büyüme hızı ve lipit içeriği ile bilinir (Wu ve diğ., 2014; Ashokkumar ve diğ., 2015). Piligaev ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada *S. abundans* (A1175)'ın, *Chlorella*, *Nannachloropsis*, *Botryococcus* ve *Bracteacoccus* gibi cinslere ait diğer beş mikroalg türüyle karşılaştırıldığında daha yüksek biyokütle üretkenliği ($73,82 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) ve daha yüksek lipit birikimine (% 44,4) sahip olduğunu göstermiştir.

Biyodizel üretimi için en önemli parametlerin başında ise mikroalgler tarafından üretilen yağ asidi zincir uzunluğu, doymunluk derecesi ve trigliseritlerden oluşan toplam lipitin oranı gelmektedir. Bunlar üretilen biyodizelin kalitesini etkiler ve türler arasında oldukça farklılık gösterebilir. Örneğin, *Scenedesmus* sp. biyodizel özelliklerinin, %80'den fazla C16-C18 yağ asitleri ve daha yüksek SFA ve MUFA içeriği nedeniyle uluslararası standartları karşıladığı

bulunmuştur (Wu ve diğ., 2015). *Scenedesmus* türlerinin çoğu C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 ve C18:3 yağ asitlerine sahiptir. Bu yağ asitleri arasında, C16:0 ve C18:1'in kümülatif miktarı, kaliteli biyodizel için temel bir gereklilik olan %70'ten fazlasını oluşturmaktadır (Valez-ojeda ve diğ., 2015).

Scenedesmus abundans türünün lipid verimliliğinin iyi olması ve uygun FAME profili nedeniyle türün biyodizel üretimi açısından ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Mikroalg, uygun seviyedeki protein, karbonhidrat, lipidler ve pigmentler nedeniyle muhtemelen geniş bir uygulama yelpazesine sahip olabilir ancak doğru kullanım için fiziko-kimyasal parametrelerinin sistematik bir şekilde incelenmesi gerekmektedir (Rai ve Gupta 2017).

Sonuç olarak, çeşitli lipid sınıflarının (özellikle trigliseritlerin) oranı çevresel koşullara göre büyük ölçüde değişir (Rodolfi ve diğ., 2009), bu da alg türlerinin deneysel koşullar arasında karşılaştırılmasını zorlaştırır (Grima ve diğ., 1994).

2.9.2 Besin Stresi Koşulları

Besin mevcudiyetinin mikroalglerin büyümesi ve lipid ve yağ asidi kompozisyonları üzerinde geniş etkileri vardır. Besinlerin sınırlı olduğu çevresel stres durumu, hücre bölünme hızının sürekli olarak azalmasına neden olur. Şaşırtıcı bir şekilde, bazı alg türlerinde, fotosentez için yeterli ışık ve CO₂ mevcut olduğu sürece, bu koşullar altında yağ asitlerinin aktif biyosentezi korunur (Thompson,1996). Alg çoğalması yavaşladığında ve yeni membran bileşiklerinin sentezine gerek kalmadığında, hücreler bunun yerine yağ asitlerini TAG'a yönlendirir ve biriktirir. Bu koşullar altında TAG üretimi koruyucu bir mekanizma görevi görebilir. Normal büyüme koşulları altında, fotosentez tarafından üretilen ATP ve NADPH, biyokütle üretilerek tüketilir; ADP ve NADP⁺, sonunda fotosentezde alıcı moleküller olarak yeniden kullanılabilir hale gelir. Besin eksikliği koşullarında ise hücre büyümesi ve çoğalması bozularak fotosentez için ana elektron alıcısı olan NADP⁺ havuzunu tüketebilir. Fotosentez esas olarak ışığın bolluğu ile kontrol edildiğinden ve tamamen durdurulmadığından, bu durum hücre için potansiyel olarak tehlikeli bir duruma yol açabilir ve hücre bileşenlerine zarar verebilir. NADPH, yağ asidi biyosentezinde tüketilir, bu nedenle artan yağ asidi üretimi (bu da TAG'lerde depolanır), büyümeyi sınırlayan koşullar altında NADP⁺ havuzunu yeniler (Sharma ve diğ., 2012).

Azot manipölasyonu;

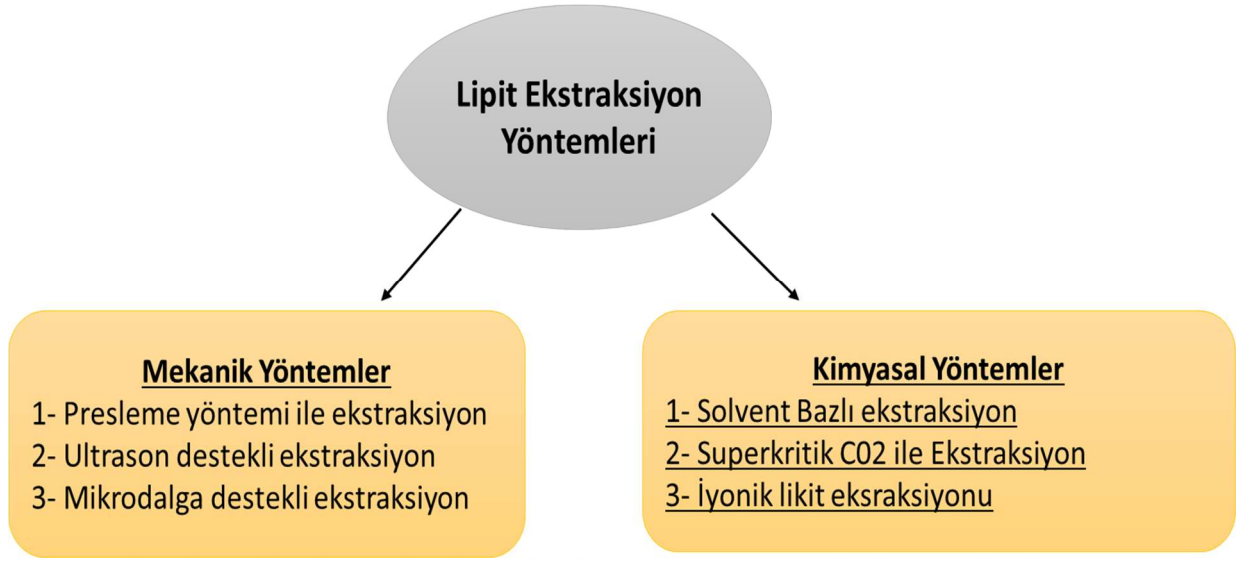
Azot (N) alglerde lipit metabolizmasını etkileyen en kritik besindir (Ikaran ve diğ., 2015). Çeşitli çalışmalar (Hsieh ve Wu, 2009 ;Yeh ve Chang 2012; Praveenkumar ve diğ., 2012), azot (N) sınırlamasının, hücre büyümesini ve gelişimini yavaşlatsa bile, lipit üretimi ve birikimi için en etkili strateji olduğunu göstermiştir. Özellikle azotun alglerdeki lipit metabolizması ile direkt ilgili olması azot stresinin diğ er besin stresi koşullarına kıyasla daha fazla lipit birikimine yol açtığı belirlenmiştir. Çeşitli mikroalg türlerinde azot eksikliğine yanıt olarak trigliserit sentezinde (Farase ve diğ., 2000) anahtar enzim olan Diaçilgliserol Asiltransferaz (Asil CoA), enzimin aşırı uyarılması ile lipitlerin, özellikle de TAG'ın birikmesine yönelik genel bir eğilim gözlemlenmiştir. Ayrıca azot stresi koşulları, toplam lipit ve yağ asidi kompozisyonları üzerinde de farklılıklar oluşturmaktadır (Ruangsomboon, 2015). Azot sınırlı olduğunda, doymuş yağ asitlerinin (SFA'lar) ve tekli doymamış yağ asitlerinin (MUFA'lar) oranı artar ve toplam lipitlere göre çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA'lar) oranı azalır (Chu ve diğ., 2013; Ikaran ve diğ., 2015; Shen ve diğ., 2015). Bugüne kadar, mikroalglerde lipit birikimine yönelik rutin protokoller iki aşamalı bir kültür sistemi önermektedir. İlk olarak, mikroalgler maksimum biyokütle üretimi için optimize edilmiş beslenme koşullarında yetiştirilir, ardından kültürler besin açlığına (özellikle azota), maruz bırakılarak lipit üretiminin artması teşvik edilir (Sharma ve diğ., 2012).

2.9.3 Lipit Ekstraksiyon Yöntemi

Mikroalgler kalın duvarlı hücre duvarına sahiptir ve biyoaktif bileşiklerinin salınımı mikroalg matrisinin sertliği ile sınırlıdır. Bu nedenle mikroalglerden lipit elde etmek ve biyoaktivitelerini korumak için uygun ön parçalama ve ekstraksiyon yöntemlerinin seçilmesi kritik öneme sahiptir (Mubarak ve diğ., 2015).

Çeşitli lipit ekstraksiyon prosesleri mevcut olmasına rağmen henüz ideal bir yöntem geliştirilmemiştir ve her bir prosesin etkinliği, mikroalg hücresinin lipit içeriğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Lee ve diğ., 2010). Mikroalglerden lipit ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler mekanik ve kimyasal yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (Halim ve diğ., 2012) (Şekil 2.11). Kimyasal lipit ekstraksiyon yöntemleri içerisinde sokslet ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu gibi yöntemler yer alırken, mekanik yöntemler içerisinde yağ püskürtücü, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve

ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemleri bulunmaktadır (Khoo ve diğ., 2011). Kimyasal yöntemde, toksik ve yanıcı olan n-hekzan (C_6H_{14}), kloroform ($CHCl_3$) gibi organik çözücüler kullanılır. Bu kimyasalların kullanımına göre lipit ekstraksiyon verimliliği artırılabilir (Lee ve diğ., 2010). Bununla birlikte her bir ekstraksiyon prosesi türü, enerji tüketimi, maliyet, verimlilik, güvenlik gibi avantaj ve dezavantajları içeren farklılıklara sahiptir (Lee ve diğ., 2010).



Şekil 2.11: Lipit Ekstraksiyon Yöntemleri (Halim ve diğ., 2012)

Ekstraksiyon için hem polar hem de polar olmayan (apolar) çözücüler kullanılır ve seçimi, karşılıklı çözünürlüğü belirlediği için hedef bileşiğin polaritesine bağlıdır; polar bileşikler, polar çözücüler kullanılarak daha iyi ekstrakte edilir ve bunun tersi de geçerlidir. Hekzan (polar olmayan), sebze ekstraksiyonunda solvent olarak dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır (Balasubramanian ve diğ., 2011).

Mikroalglerin yağ ekstraksiyonu için, uygun bir hücre parçalama tekniği bir ön koşul olmasına rağmen (lipitlerin verimli ekstraksiyonu büyük ölçüde kullanılan organik çözücünün veya çözücü karışımının polaritesine bağlıdır (Lewis ve diğ., 2000). Genel olarak, polar ve polar olmayan çözücü içeren çözücü karışımları ile daha fazla miktarda lipit ekstrakte edilebilir (Ryckebosch ve diğ., 2012). Örneğin, Bligh Dyer (1959) yöntemi olarak bilinen kloroform (polar olmayan), metanol (polar) ve suyun bir kombinasyonu, çok çeşitli biyolojik örneklerden lipit ekstraksiyonu için kullanılmıştır (Ryckebosch ve diğ., 2012). Bununla birlikte,

ekstraksiyon çözücülerin kullanımıyla ilgili biyogüvenlik sorunlarına ilişkin endişeler, biyoyoumlu ve daha az veya toksik olmayan solventlere (örn. diklorometan) olan talebi artırmıştır (Cequier ve diğ., 2008).

Son yıllarda, özellikle farmasötik ve nötrasötik biyoürünler için mikroalgal yağ ekstraksiyonunda süperkritik akışkan teknolojisi benimsenmiştir. Sıvı solvent ekstraksiyonları ile karşılaştırıldığında, süperkritik akışkan karbondioksit (ScCO_2) tekniği, toksisite olmaması, ekstraktların oksidasyonu veya termal bozunması olmaması, yüksek yayılma ve istenen biyoürünlerin kolay ayrılması gibi çeşitli avantajlar sunar (Li ve diğ., 2016). Bununla birlikte, ScCO_2 ekstraksiyonu kullanılarak elde edilen lipit veriminin, *Cryptocodinium cohnii*'nin heterotrofik olarak kültürlenmiş mikroalgleri üzerinde Bligh Dyer (1956) yönteminin kullanılmasından çok daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Couto ve diğ., 2010). Şu anda, mikroalg hücreleri üzerinde yağ ekstraksiyonuna yönelik teknik ve fizyokimyasal yöntemlerin karşılaştırmalı ekonomisi henüz gerçekleştirilmemiştir.

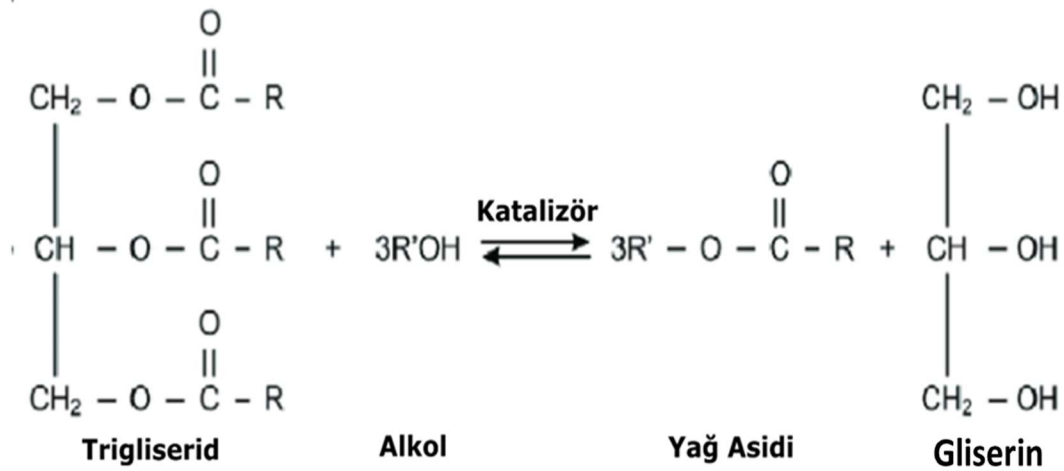
Bugüne kadar mikroalg biyokütlesinden lipitlerin çıkarılmasında kullanılan farklı yöntemleri sonucunda ortaya çıkan sonuçlar şu şekilde özetlenebilmektedir (Mubarak ve diğ., 2015).

- Araştırmacıların çoğu, başlangıç sermayesi ekipman yatırımının düşük olması nedeniyle mikroalg biyokütlesinden yağ çıkarmak için n-hekzan, kloroform, metanol, etanol, petrol eteri, diklorometan, izopropanol gibi organik çözücüler kullanmıştır.
- Lipit ekstraksiyonunda en verimli yöntemi ve optimize edilmiş koşulları bulmak, mikroalglerden biyodizel üretiminin maliyetini azaltmak için önemlidir.
- Alglerden maksimum verimi elde etmek için tek bir ekstraksiyon yönteminin benimsenmesi yeterli olmayabilir. Bu nedenle, ultrasonikasyon ve mikrodalga destekli yöntemler gibi ön arıtma yöntemleri, solvent ekstraksiyonu ve mekanik pres ile bir araya getirilerek maksimum miktarda alg lipiti ekstrakte edilebilir.
- Süperkritik sıvı ekstraksiyon tekniği, lipitlerin ekstraksiyonu için daha az toksik solventler kullanır, ancak başlangıç sermaye ekipmanı yatırımı yüksektir.
- Mikroalg hücrelerinden lipit veya yağ ekstraksiyonu işlemi, enerji yoğun ve maliyetli bir prosedürdür çünkü lipitlerin ekstraksiyonu için solventlerin kullanılması, ekstraksiyondan sonra lipitlerden aynı solventlerin geri kazanılması için ekstra enerji gerektirir. Ayrıca kullanılan yöntemin hızlı olması ve ekstrakte edilen lipitlere zarar vermemesi gerekmektedir.

2.9.4 Transesterifikasyon Yöntemi

Hücre artıkları ve çözücünün uzaklaştırılmasından sonra lipidler, transesterifikasyon, doğrudan kullanım ve harmanlama, mikroemülsiyonlar veya piroliz yoluyla biyodizele dönüştürülebilir. Bununla birlikte, en yaygın kullanılan tekniğin transesterifikasyon yöntemi olduğu belirtilmiştir (Miao ve Wu 2006). Transesterifikasyondan elde edilen ürünün, daha fazla değişiklik yapılmadan doğrudan motorlarda saf veya karışım halinde kullanılabilir olması ve transesterifikasyon işleminin daha düşük viskoziteye neden olması gibi nedenler bu tekniği diğer tekniklere kıyasla ön plana çıkarmaktadır (Miao ve Wu 2006).

Proses genellikle reaksiyonun gerçekleşmesi için metanol, asit veya alkali katalizörleri gerektirir. Transesterifikasyon reaksiyonun tersinir olmasından dolayı aşırı asit/alkali/metanol kullanımı biyodizel içindeki gliserol miktarını arttırabilir ve son ürünler olarak transesterifikasyona uğramamış lipidlerden dolayı kirlenme meydana gelebilir (Halim ve diğ., 2012). Transesterifikasyon reaksiyonları Şekil 2.12’ de gösterilmektedir.



Şekil 2.12: Transesterifikasyon Reaksiyonu

Şu anda endüstride kullanılan en popüler yöntem, KOH veya NaOH kullanılarak homojen alkali katalizli transesterifikasyondur. Bu yöntemde reaksiyon koşulları düşük sıcaklık ve basınca sahiptir ve reaksiyon süresi hızlıdır, ancak lipid fraksiyonundaki serbest yağ asitleri (FFA), sabunlaşma reaksiyonunda sabun oluşturmak için bazla reaksiyona girer, bu da reaksiyon karışımında jelleşmeye neden olur ve genel dönüşümü azaltır (Kim ve diğ., 2013).

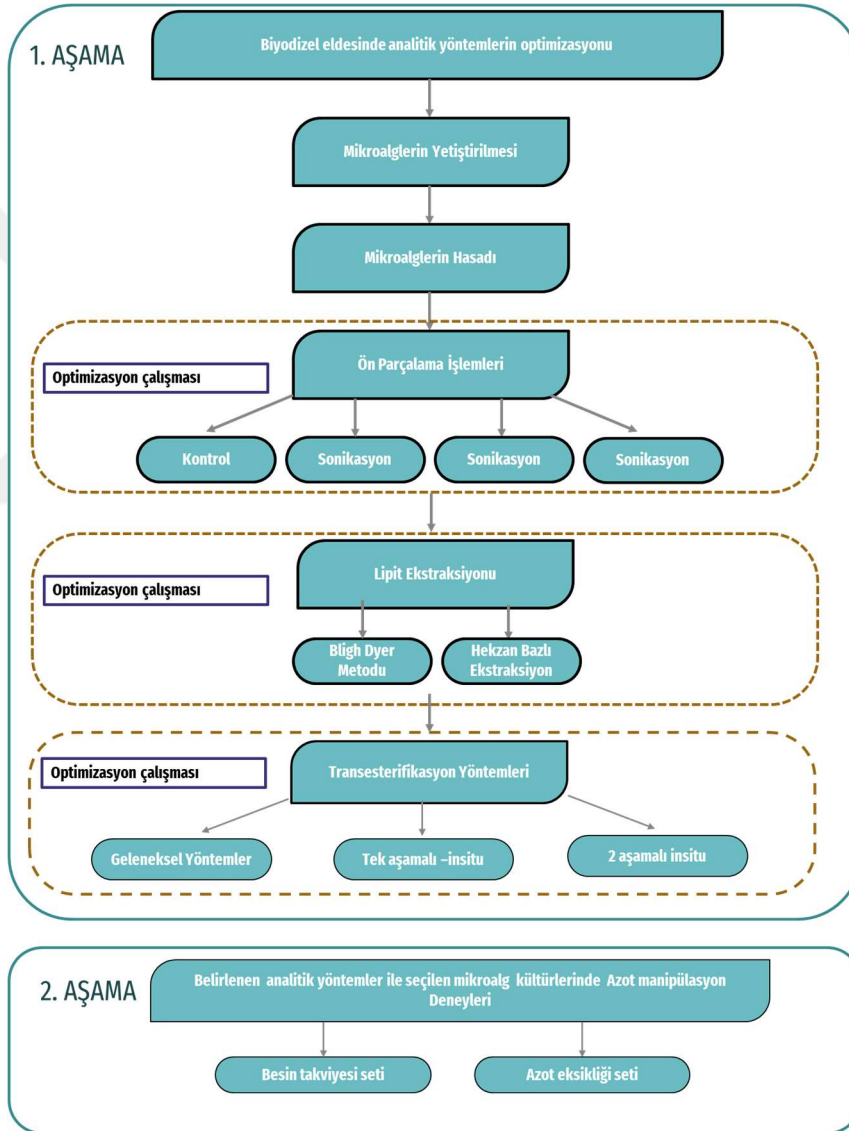
Sabunlaşmayı önlemek için kimyagerler, sülfürik (H_2SO_4) veya hidroklorik asit (HCl) gibi asitler kullanılarak asit katalizli transesterifikasyonu önermişlerdir (Ehimen ve diğ., 2010) fakat asit kullanımının ekipman için aşındırıcı olması, yüksek hacimde metanol ve yüksek sıcaklık gerektirmesi ve alkali katalizinden çok daha yavaş olması nedeniyle bu tekniğin de bazı dezavantajları olabilmektedir (Halim ve diğ., 2012; Kim ve diğ., 2013; Yen ve diğ., 2013). Kataliz olmadan, metanolün süperkritik koşulları altında transesterifikasyon da kullanılan metotlardandır. Bununla birlikte metanolün yüksek sıcaklık ve hacim gereksinimleri, bu seçeneği ekonomik açıdan da elverişsiz hale getirmektedir (Ehimen ve diğ., 2010; Kim ve diğ., 2013).

Yakıt dönüşüm prosesinin işlem birimlerini ve maliyetlerini azaltma potansiyeline sahip olduğu düşünülen geleneksel prosese bir başka alternatif de lipit ekstraksiyonu ve transesterifikasyonu tek adımda birleştiren doğrudan transesterifikasyon (in situ transesterifikasyon) işlemidir (Kumar ve diğ., 2014). İn situ transesterifikasyon biyokütle yağının doğrudan yağ içeren biyokütleden FAME'e dönüştürülmesini kolaylaştırır, böylece geleneksel yöntemde olduğu gibi lipit elde etmek için gereken solvent ekstraksiyon aşamasını ortadan kaldırır. Dolayısıyla bu biyodizel üretim planı, yakıt dönüştürme sürecinin basitleştirilmesine yardımcı olabilir, potansiyel olarak genel işlem maliyetini düşürebilir, dolayısıyla nihai yakıt ürünü maliyetlerini de düşürebilir (Haas ve diğ., 2007). Bu yöntem, mikroalglerle kullanım için özellikle avantajlı olabilir, çünkü mikroalg lipitlerinin ekstraksiyonu, geleneksel yağ bitkileri için kullanılan daha ucuz fiziksel ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımıyla değil, genellikle solvent ekstraksiyonu yoluyla gerçekleştirilir. Biyokütledeki yağın doğrudan alkolizinin, geleneksel yöntemle karşılaştırıldığında biyodizel veriminin artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Proses atıkları ve kirlilik de bu yöntemle azaltılabilir (Haas ve diğ., 2007).

Sonuç olarak biyodizel dönüşüm teknolojilerine yönelik proseslerde her bir yöntemin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır ve bu özellikler hammadde olarak kullanılacak türe özgü olarak değişmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Mikroalglerden biyodizel üretiminde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının şematik gösterimi Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Birinci aşamada parçalama işlemleri, lipit ekstraksiyonu ve transesterifikasyonu süreçlerinde farklı metotlar denenerek optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise belirlenen en uygun yöntemler *Botryococcus sudeticus* ve *Chlorella vulgaris* türlerinin azot manipülasyonu deneylerinde uygulanmıştır.



Şekil 3.1: Biyodizel Üretim Aşamalarında Gerçekleştirilen Optimizasyon Çalışmalarının Şematik Gösterimi

3.1 MİKROALG TÜRLERİ

Bu çalışmada kullanılan *Botryococcus sudeticus* (UTEX B 2629) ve *Scenedesmus obliquus* (UTEX3031) türleri Austin'deki Texas Üniversitesi'ndeki Alg Kültür Koleksiyonu'ndan, *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/79) ise Alg ve Protozoa Kültür Koleksiyonu'nundan temin edildi.

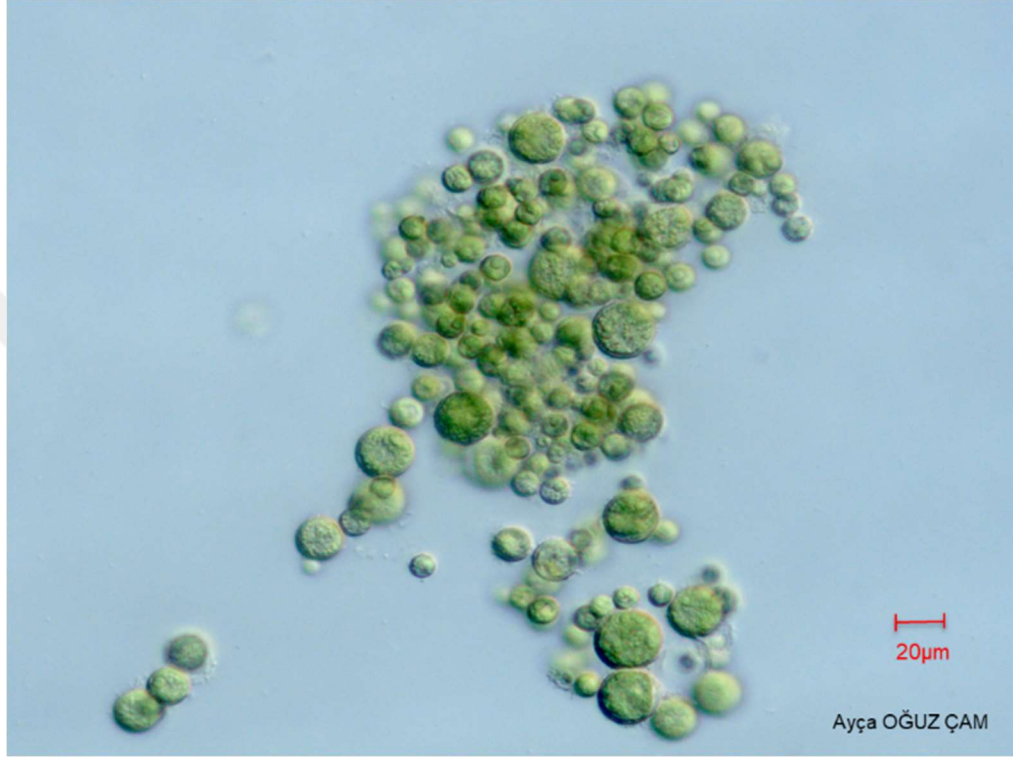
3.1.1 *Botryococcus sudeticus*

Botryococcus suşları biriktirdikleri hidrokarbonlar bakımından farklılık gösterir ve A, B ve L olarak adlandırılan üç kimyasal ırka ayrılırlar. A ırkındaki suşlar alkadienleri biriktirir; B ırkındaki suşlar, triterpenoidler olan botryococcenleri biriktirir; ve L ırkındaki suşlar bir tetraterpenoid olan likopadien biriktirir (Metzger vd., 1985; 1991). Kimyasal ırkların farklı evrimsel soylara karşılık gelip gelmediği bildirilmemiştir.

Botryococcus suşlarının tür teşhisi henüz tam anlamıyla çözülememiştir. En ayrıntılı sınıflandırma, morfolojik açıdan 13 tür öneren Komarek ve Marvan (1992)'ın sınıflandırmasıdır. Kullandıkları morfolojik farklılıklar nispeten çok küçüktür ve Plain ve diğ., (1993), büyüme koşullarına bağlı olarak tek bir izolatin birden fazla türe benzeyebileceğini bulmuşlardır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda *B. braunii* türüne atıfta bulunmaktadır.

Bununla birlikte, *Botryococcus* cinsi içinde bulunan *B. sudeticus* Lemmermann. türü *B. braunii* türünden morfolojik olarak farklı sınıflandırılmaktadır. Chodat 1922'de onu yeni bir cins olan Botryosphaera'ya yerleştirmiştir (Vazquez-Duhalt ve Greppin, 1987), ancak bu ayırım evrensel olarak benimsenmemiştir (Fritsch 1935). Vazquez-Duhalt ve Greppin (1987) ve Vazquez-Duhalt ve Arredondo-Vega (1991), bu türü *B. braunii* suşu olan CCAP 807/1 kültüründen kontaminasyon sonucu izole ettikleri bir alg olarak tanımladılar. *Botryococcus sudeticus* olarak tanımladıkları bu alg, UTEX Alg Kültür Koleksiyonu'nda UTEX 2629 izolatu olarak depolanmıştır. Vazquez-Duhalt ve Greppin (1987), *Botryococcus sudeticus* türünün yüksek oranda triaçilgliserol içeren büyük miktarda nötr lipidlerden oleik asit oranını yüksek miktarda biriktirdiğini tespit etmiş ve yağın bileşimi zeytinyağına benzediğinden gıda yağı olarak kullanılması önerilmiştir (Vazquez-Duhalt ve Greppin 1987). Bu nedenle UTEX 2629'dan izole edilen lipid türü, *B. braunii*'nin üç kimyasal ırkında bulunan hidrokarbon lipidlerinden oldukça farklıdır.

Morfolojik olarak *B. sudeticus*, yoğun küresel hücre kümeleri halinde görünmektedir. Hücrelerin boyutu 4 ile 20 μm arasında değişmekte olup rengi parlak-koyu yeşildir (Senousy ve diğ., 2004). *Botryococcus sudeticus* bir hidrokarbon üreticisidir ve biyokütlesinin %3'üne kadar hidrokarbon biriktirebilir (Eroğlu ve diğ., 2011)



Şekil 3.2: *Botryococcus sudeticus*

Botryococcus sudeticus'un Sistematikteki Yeri

Phylum : Chlorophyta
Classis : Trebouxioephyceae
Ordo : Trebouxiales
Familia : Botryococcaceae
Genus : *Botryococcus*
Species : *Botryococcus sudeticus*

3.1.2 *Chlorella vulgaris*

Yeşil mikroalgler arasında tek hücreli *Chlorella* cinsi öne çıkmaktadır. Bu cins, yaklaşık 2-10 µm çapında olan küresel geometrileri ile yüksek fotosentetik verimlilik, besin değeri ve büyüme hızına sahiptirler (Ciurli ve diğ., 2021; Spain ve diğ., 2021). Özellikle *Chlorella vulgaris*, küçük hücre boyutundan dolayı büyük ölçekli ekim için yaygın olarak kullanılan bir türdür ve bu da kültür ortamında dolaşımını kolaylaştırır (Sarayloo ve diğ., 2018). Azot içeriği uygun koşullar altında yetiştirildiğinde, kuru hücre bazında yaklaşık günlük 0,17-0,18 g L⁻¹ gibi nispeten yüksek biyokütle üretim oranlarına sahiptir (Rodolfi ve diğ., 2009). Ek olarak, yüksek yağ içeriğine ve zorlu ortamlara dayanma yeteneğine sahiptir (Tan ve diğ., 2018).

Chlorella vulgaris türünün büyüme koşullarının kolaylığı ve uygun yağ asidi bileşimi, onları biyodizel üretimi için en kapsamlı şekilde araştırılan tatlı su türü haline getirmiştir. Türün yetiştirilme koşullarına bağlı olarak %7 ila %41 arasında ağırlıkça lipit içerebildikleri tespit edilmiştir (Mata ve diğ., 2016; Sadvakasova ve diğ., 2019; Xia ve diğ., 2020; Mirizadeh ve diğ., 2021). Bununla birlikte azot sınırlaması altında, esas olarak TAG'lardan oluşan ve bu nedenle biyodizel üretimi için uygun olan toplam lipit içeriğinin ağırlıkça %63'e kadar olduğu rapor edilmiştir (Piorreck ve diğ., 1984).

Phylum : Chlorophyta

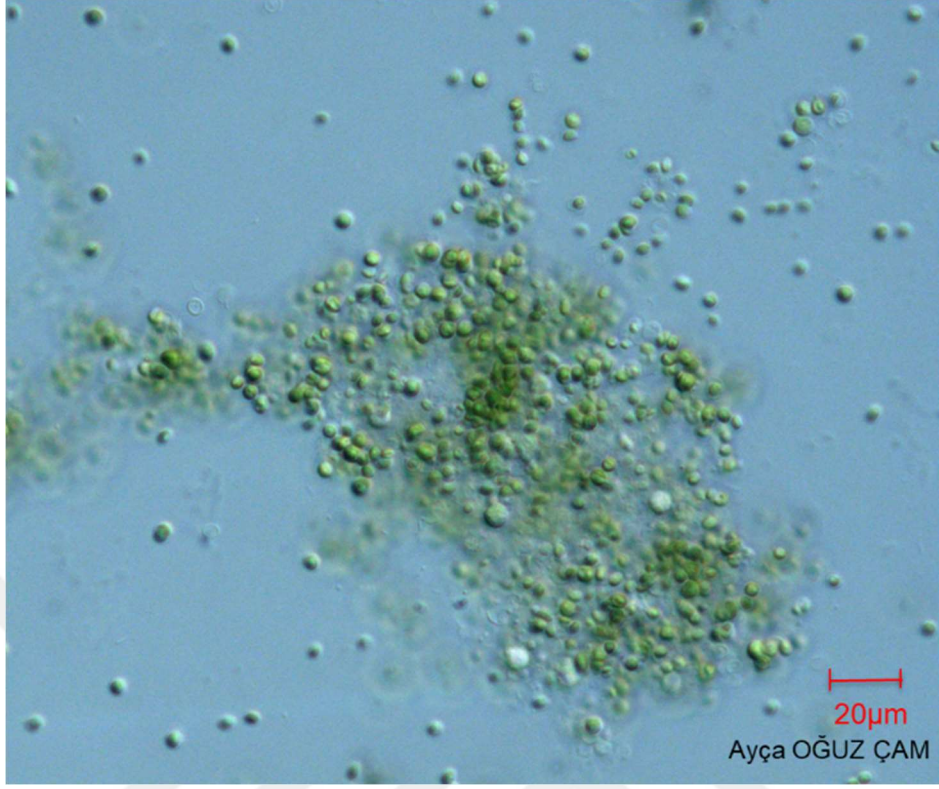
Classis : Trebouxiophyceae

Ordo : Chlorellales

Familia : Chlorellaceae

Genus : *Chlorella*

Species : *Chlorella vulgaris*



Şekil 3.3: *Chlorella vulgaris*

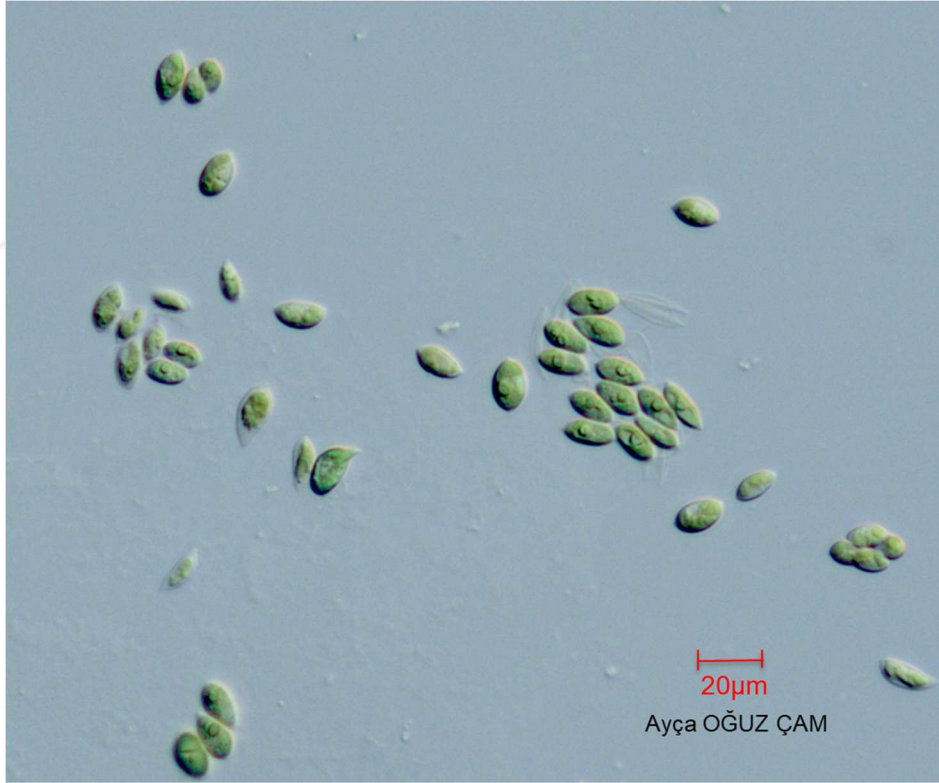
3.1.3 *Scenedesmus obliquus*

Yetiştirilme kolaylığı ve çevre koşullarına uyum sağlamaları nedeniyle dünya çapında endüstriyel amaçlı yaygın olarak kullanılan mikroalglerden birisi de Chlorophyta grubuna ait olan *Scenedesmus*'tur (Pulz ve Gross, 2004). *Scenedesmus* sp. hızlı büyümesi ve işlenebilirliği nedeniyle in vitro kültüre alınan ilk alglerden biridir (Trainor, 1993, Lürling, 2006). Biyodizel üretimi için en çok çalışılan türleri *Scenedesmus obliquus* (Mata ve diğ., 2012; Abomohra ve diğ., 2017; Amorim ve diğ., 2020), *Scenedesmus bijugus* (Minhas ve diğ., 2020), *Scenedesmus abundans* (Nayak ve Ghosh, 2019; Chandra ve diğ., 2021) ve *Scenedesmus dimorphus* (Tejada ve diğ., 2020; Arutselvan ve diğ., 2021; Zhang ve diğ., 2021)'dur ve lipid kompozisyonları %25 ila %65 ağırlıkça değişmektedir.

Scenedesmus obliquus (Chlorococcales) sönobiyum adı verilen düzenli kümeler halinde iki veya daha fazla hücrenin iki boyutlu düzenlenmesiyle karakterize edilir (Komárek ve Fott, 1983, Soeder ve Hegwald, 1992). Bu tür evsel ve endüstriyel atık su arıtımında kullanılan çok yönlü bir organizmadır (Voltolina ve diğ., 2005) ve son yıllarda oksijen üretimi, ağır metallerin

uzaklaştırılması (Omar, 2002) ve atık ürünlerin faydalı organik maddelere dönüştürülmesi (Nuñez ve diğ., 2001) için kullanılmaya başlanmıştır. Farklı biyohacime sahip her *S. obliquus* suşu, değişkenlerin kombinasyonuna farklı tepkiler gösterir (Trainor, 1993, Lüring, 2006). Kültür ortamının modifikasyonu, maksimum biyokütle üretimini ve istenen ürünlerin birikimini sağlamak için temel faktördür.

Phylum : Chlorophyta
 Classis : Chlorophyceae
 Ordo : Sphaeropleales
 Familia : Scenedesmaceae
 Genus : *Scenedesmus*
 Species : *Scenedesmus obliquus*



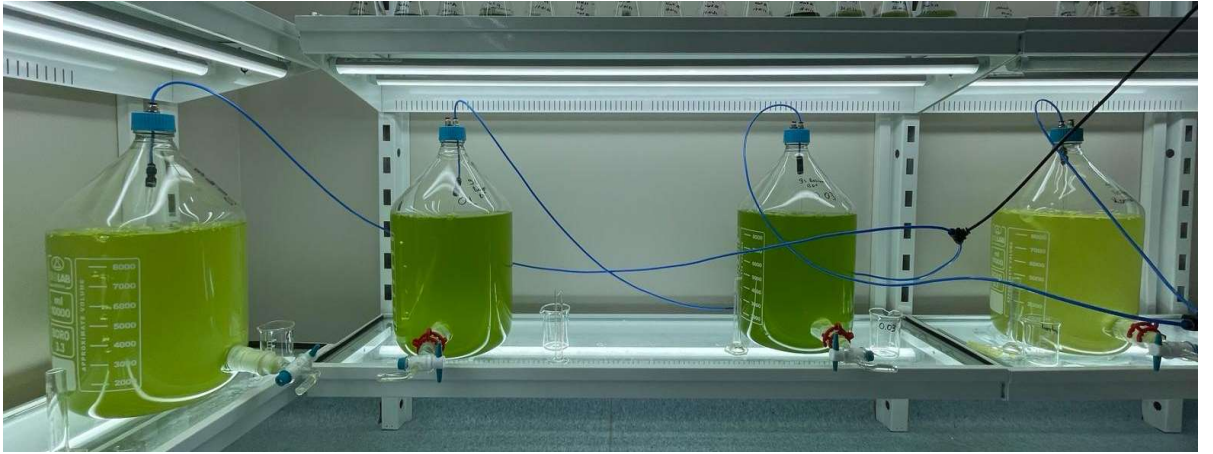
Şekil 3.4: *Scenedesmus obliquus*

3.2 MİKROALGLERİN KÜLTÜR ORTAMLARININ HAZIRLANMASI

Bu çalışmada yetiştirilen mikroalg kültürleri 24 °C sıcaklık altında, 5 L'lik erlenmeyerlerde 12:12 saat: aydınlık: karanlık fotoperiyot rejimi altında soğuk beyaz floresan ışıklar tarafından sağlanan $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışıktaki büyütüldü. Kültürlerin havalandırılması ve çalkalanması, günde iki kez kuru hava ile sağlandı (Şekil 3.5).

Deney setlerine başlamadan önce besiyeri ve şişeler, kontaminasyonu önlemek için otoklavda 1 atm basınç altında, 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi. Deneyde steril BG-11 (Rippka ve diğ., 1979) kültür ortamı kullanıldı; Bu ortamda, 1 L ultra saf (g L^{-1}): 1.5 g NaNO_3 (sodyum nitrat); 0,04 g K_2HPO_4 (potasyum fosfat); 0,075 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnezyum sülfat); 0,0036 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (kalsiyum klorür); 0,006 g $(\text{NH}_4)_5(\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2$ (ferrik-amonyum sitrat); 0,006 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (sitrik asit); 0,001 g EDTA-2Na (EDTA, disodyum tuzu); ve 0,02 g Na_2O_3 (sodyum karbonat); 2.86 g H_3BO_3 ; 1.81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.39 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.079 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.494 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_3$ içeren besin maddeleri eklendi.

Azot eksikliği deneyi için azotsuz hazırlanan BG11 besiyerine NaNO_3 (sodyum nitrat) hariç diğer besin maddeleri aynı şekilde eklendi.



Şekil 3.5: Mikroalglerin Yetiştirilme Koşulları

3.3 BİYOMAS MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Kültürlerim büyüme eğrisi haftalık olarak Klorofil-*a* (kl-*a*) ölçümüyle izlendi. Klorofil-*a*, ISO 10260 standart yöntemine göre analiz edildi. Ölçümler sırasında işlemler klorofilin zarar görmesini engellemek amacıyla mümkün olan en düşük ışıktta gerçekleştirildi. Analizler için %90'lık etanol ile ekstrakte edilen örnekler UV spektrofotometre (Shimadzu) ile 665 ve 750 nm absorbans değerlerinde ölçüldü. İlk ölçümden sonra örnek 1 damla 2 N HCl ile asitlendirildi ve 5 dakika sonra tekrar aynı dalga boylarında ölçüm gerçekleştirildi. Klorofil-*a* konsantrasyonu ($\mu\text{g L}^{-1}$) Denklem 3.1' e göre hesaplandı.

$$Kl\ a = \frac{29,6 \times (A_{665} - B_{665}) \times v}{V \times L} \quad (3.1)$$

Kl-*a*: Klorofil-*a* konsantrasyonu ($\mu\text{g L}^{-1}$)

29.6: %90'lık etanolde klorofil için özel absorpsiyon katsayısı 82 olarak alındığında ve maksimum asit oranı 1.7 olarak kabul edildiğinde kullanılacak olan katsayı

A_{665} : Asidifikasyondan önce ölçülen 665 nm deki absorbans (750nm deki ölçüm sonucu çıkarıldıktan sonraki değer)

B_{665} : Asidifikasyondan sonra ölçülen 665 nm deki absorbans (750nm deki ölçüm sonucu çıkarıldıktan sonraki değer)

v: Kullanılan etanol miktarı (mL)

V: Süzülen su miktarı (L)

L: Spektrofotometre küvetinin ışık yolu uzunluğu (cm)

Spesifik büyüme oranı (Rao ve diğ., 2007)'ye göre kl-*a* değerlerine baz alınarak hesaplandı. Spesifik büyüme oranı (μ), Denklem 3.2' ye göre hesaplandı:

$$\mu = \ln \frac{(N_2 - N_1)}{(T_2 - T_1)} \quad (3.2)$$

N_2 ve N_1 ; sırasıyla T_2 ve T_1 anlarındaki kl-*a* değerleridir.

3.4 MİKROALGLERİN HASADI

Kültürler 4500 rpm'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde (Beckman Coulter Allegra X-22R) 50 ml'lik santrifüj tüpleri kullanılarak toplandı. Santrifüj sonrasında pelletler ortamdan uzaklaştırıldı ve birkaç kez saf su ile yıkandı. Peletlerin tamamı birleştirilerek toplandı.

Yaş peletlerden kuru biyokütle elde etmek için örnekler liyofilizatörde (Operon marka) dondurularak kurutuldu. Liyofilizatörden çıkan örnekler 1 saat desikatörde bekletilerek neminin uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra havanda dövülerek homojenize toz haline getirildi (Şekil 3.6).

Nemden uzaklaştırılmış ve homojenize edilmiş örnekler hassas terazide tartılarak kuru biyokütle miktarları mg cinsinden belirlendi.



Şekil 3.6: Liyofilize Edilen Mikroalg Örnekleri

3.5 LİPİT EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Lipit ekstraksiyonunun verimliliğini hesaplamak için Bligh Dyer (1959) ve Hekzan Bazlı solvent ekstraksiyon yöntemleri *B.sudeticus* ve *Scenedesmus obliquus* türleri üzerinde uygulandı. Buna göre her iki tür üzerinde uygulanan lipit ekstraksiyon yöntemleri ve kullanılan solvent miktarları Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1: *Botryococcus sudeticus* ve *Scenedesmus obliquus* türlerine Uygulanan Lipit Ekstraksiyon Yöntemleri

Kod	Kültür	Ekstraksiyon Yöntemleri	Kullanılan Alg Miktarları (mg)	Ekstraksiyon Solvent Oranları (V:V:V)	Toplam Çözücü Miktarları (ml)
1	<i>B.sudeticus</i>	Bligh Dyer	100	Kloroform:Metanol:Su (1:2:0,8)	3,8
2	<i>S.obliquus</i>	Bligh Dyer	100	Kloroform:Metanol:Su (1:2:0,8)	3,8
3	<i>B.sudeticus</i>	Hekzan bazlı	100	Hekzan:Metanol (1:1)	4
4	<i>S.obliquus</i>	Hekzan bazlı	100	Hekzan:Metanol (1:1)	4

Buna göre; Geleneksel Bligh Dyer (1959) lipit ekstraksiyon metodunda çözücü olarak kloroform:methanol:su (1:2:0,8 V:V:V) kullanılırken, Hekzan bazlı ekstraksiyon metodunda çözücü olarak hekzan:methanol (1:1 V:V) kullanıldı. Her iki yöntemde de mikroalgelere farklı çözücü eklendikten sonra aynı ekstraksiyon süre ve adımları uygulandı. Bu adımlar;

- 1- Çözücü eklendikten sonra ön parçalama işlemleri uygulanmadan örnekler 2 dk vorteks edildi ve yarım saat boyunca karanlık ortamda bekletildi.
- 2- Faz ayrımını gerçekleştirmek için üzerlerine 0,8 ml su eklendi ve ardından 10 dk 4500 rpm de santrifüj edilerek faz ayrımının gerçekleşmesi sağlandı.
- 3- Santrifüj işleminden sonra alttaki lipitleri içeren kloroform fazı 0.22 µm PVDF membran şırınga filtreden (MillexHV marka) geçirilerek önceden tartılmış 4ml'lik temiz vial tüpüne alındı.
- 4- Vialler 40 °C'de azot gazı altında uçuruldu ve neminin giderilmesi için 1 saat desikatörde bekletildi.
- 5- En son aşamada vialler tartılarak lipit miktarı gravimetrik olarak belirlendi.

Bligh Dyer yönteminde lipitleri içeren alttaki koyu renkli kloroform fazı alınırken, hekzan bazlı ekstraksiyonda, üsteki lipit içeren açık renkli hekzan fazı alınarak filtreden geçirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Lipit ekstraksiyon aşamaları

Mikroalg biyokütlesindeki lipit kütlesi hesaplanırken, yağ ekstraksiyonundan önce numune tüpünün ilk ağırlığı ve sonraki ağırlığı ölçüldü. Çıkan sonuç yüzde değeri olarak hesaplandı. Lipit verimi Denklem 3.3 kullanılarak hesaplandı (Oğuz ve diğ., 2024).

$$\text{Lipit verim \%} = \frac{\text{Lipit miktarı (mg)}}{\text{Mikroalg biyokütlesi (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.6 ÖN PARÇALAMA İŞLEMLERİ

En yüksek verimin elde edildiği lipit ekstraksiyon yöntemini belirlemek için liyofilizatörde kurutulan mikroalg örneklerine aşağıdaki hücre parçalama yöntemleri uygulandı. Bu amaçla Bligh Dyer (1959) lipit ekstraksiyonu metodu öncesinde kültürler öne parçalama tekniklerinden ultrasonikasyon, sonik banyoda ısıtma, bead beater gibi hücre parçalama teknikleri uygulandı. Bununla birlikte ön parçalama tekniklerinin etkisini incelemek amacıyla ekstraksiyon öncesinde herhangi bir ön işleme tabi tutulmayan bir kontrol seti oluşturuldu.

3.6.1 Ultrasonikasyon

100 mg liyofilize alg hücresi metanol:kloroform (2:1) içinde süspanse edilerek bir cam santrifüj tüpüne alındı. Cam santrifüj tüpü buzlu bir erlen içerisine yerleştirildi ve sonikatörde (Bandelin Sonopuls) soğuk koşullarda 10 dakika boyunca 37 ± 3 kHz frekansta parçalama işlemi gerçekleştirildi.

3.6.2 Sonik Banyoda Isıtma

100 mg liyofilize metanol:kloroform (2:1;V:V) içinde süspanse edilerek bir cam santrifüj tüpüne alındı. Sıcaklığı 60 °C dereceye ayarlanmış ultrasonik su banyosu 40 kHz frekansta 10 dk çalıştırılarak parçalama işlemi gerçekleştirildi.

3.6.3. Bead Beater

100 mg liyofilize alg hücresi tartırılarak içerisinde 200-300 μm çapında cam boncuklar (Sigma) bulunan tüplere yerleştirildi. Metanol:kloroform (2:1 ; V:V) içinde süspanse edilen tüpler 4800 rpm'de 10 dakika çalıştırılarak alglerin parçalanması sağlandı.

Ön parçalama işleminin ardından Bligh Dyer (1959) metoduna göre lipit ekstraksiyonu için gerekli miktarlarda solventler eklenerek lipit ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Yapılan işlemler Tablo 3.2'de verildi.

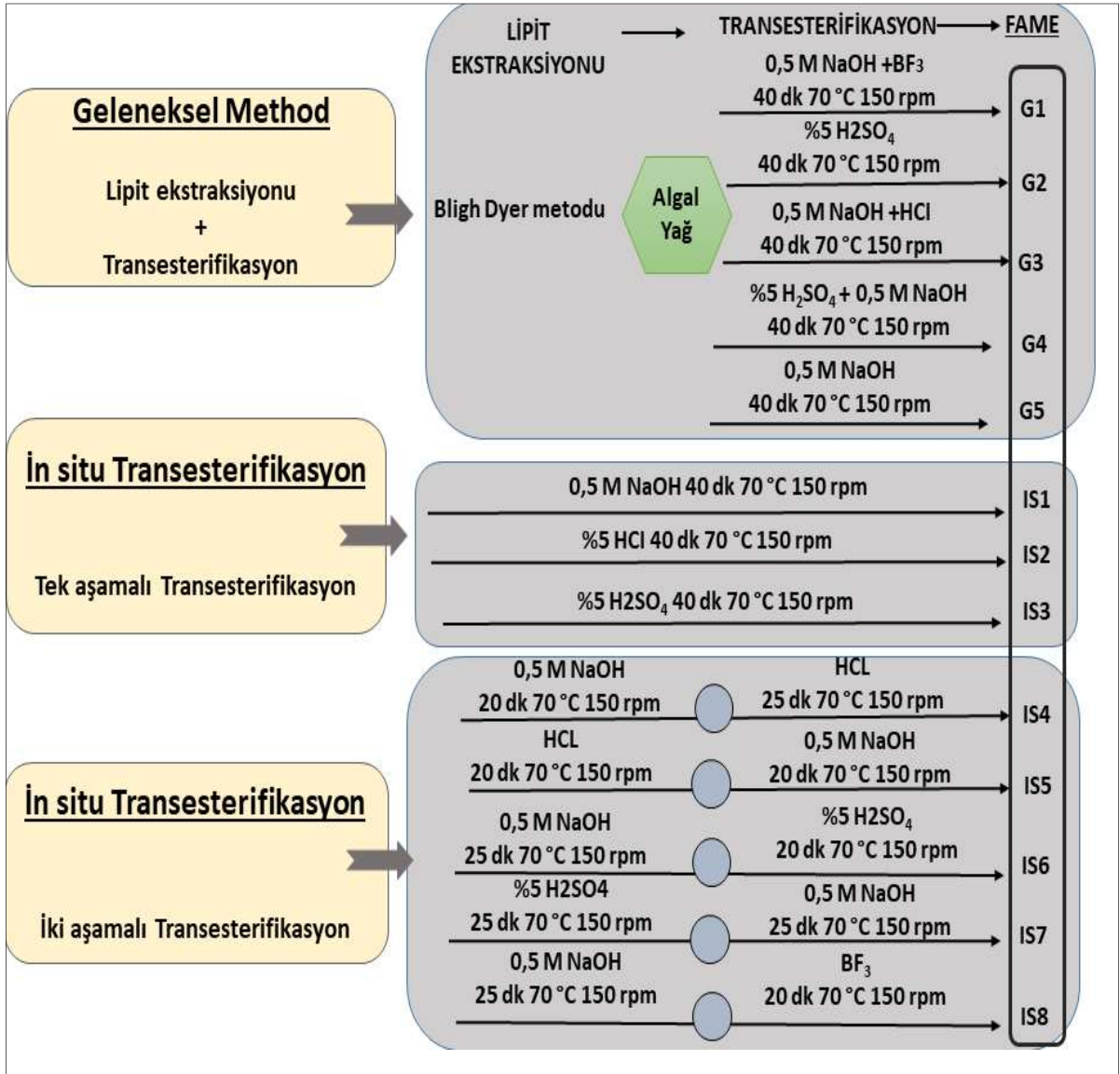
Tablo 3.2: *S.obliquus* için uygulanan ön parçalama ve lipit ekstraksiyon yöntemleri

Tür	Ön Parçalama İşlemi	Ekstraksiyon aşamaları	Solvent miktarı
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Yok	1,25 ml kloroform+2 ml metanol+ 1 ml su +2 dk vorteks	Kloroform:Metanol:Su (1:2:0,8 V:V:V)
	Sonikasyon	1,25 ml kloroform+2 ml metanol+2 dk vorteks + 10 dk buz ile sonikasyon+ 1ml su	Kloroform:Metanol:Su (1:2:0,8 V:V:V)
	Bead Beater	1,25 ml kloroform+2 ml metanol+2 dk vorteks +10 dk bead beater +1 ml su	Kloroform:Metanol:Su (1:2:0,8 V:V:V)
	Ultrasonik su banyosu	1,25 ml kloroform+2 ml metanol+2 dk +2 ml su +10 dk 60 °C ultrasonik su banyosu+1ml su	Kloroform:Metanol:Su (1:2:0,8 V:V:V)

3.7 TRANSESTERİFİKASYON İŞLEMLERİ

Geleneksel metotlar biyokütleden lipit ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesinin ardından transesterifikasyon ile lipitlerin biyodizel ürününe (yağ asidi metil esterlerine) dönüştürülmesini içermektedir. Bununla birlikte ekstraksiyon ve transesterifikasyon işleminin aynı anda gerçekleştiği ve farklı enzim ve solventlerin kullanıldığı biyodizel üretim aşamaları bulunmaktadır.

Bu amaçla literatürde kullanılan farklı metotlar (Christie 1989; Lee ve diğ., 1995; Burja ve diğ., 2007; Griffiths ve diğ., 2010; Cavonius ve diğ., 2014; Kumar ve diğ., 2014) modifiye edilerek transesterifikasyon yöntemleri denendi. Deneysel çalışmalarda BG-11 (Keriş-Şen ve diğ., 2014) besin ortamında yetiştirilen *Scenedesmus obliquus* türü kullanıldı. Transesterifikasyon aşamasında uygulanan kimyasallar Şekil 3.8’de gösterildi.



Şekil 3.8: *Scenedesmus obliquus* türü üzerinde gerçekleştirilen farklı transesterifikasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

Tüm transesterifikasyon uygulamaları aynı reaksiyon süresi ve sıcaklığında gerçekleştirilirken metotlar üzerindeki katalizörlerin bireysel etkisini belirlemek için farklı asit (HCL, H₂SO₄, BF₃) ve baz (NaOH) katalizörleri kullanıldı. Metilasyon işlemi öncesinde bu katalizörlerin sıraları değiştirilerek Geleneksel (Bligh Dyer + transesterifikasyon), tek ve iki aşamalı in situ transesterifikasyon metotlarında kullanılan katalizörlerin FAME verim ve kalitesi üzerine etkisi incelendi.

FAME üretimi için transesterifikasyon yöntemini belirlemek amacıyla 13 farklı transesterifikasyon yöntemi gerçekleştirildi (Şekil 3.8). G1-G5 Bligh ve Dyer (1959) tarafından önerilen geleneksel lipid ekstraksiyon yöntemini ve ardından transesterifikasyonu temsil ederken, geri kalan 8 yöntem (IS1-IS8), in situ transesterifikasyonu ve bunların bir (IS1-IS3) veya iki aşamalı (IS4-IS8) işlemdeki kombinasyonlarını temsil etmektedir.

Bu amaçla, mikroalg kuru biyokütlesi veya lipidler cam kapaklı viallerde metanolik asit veya baz çözeltisi ile 70 °C'de geleneksel ısıtma (ultrasonik su banyosunda) 150 rpm hızda toplam 45 dk olacak şekilde reaksiyona sokuldu. Her 5 dk da bir viallerin kapakları açılıp kapatılarak içerisindeki basınç düşürüldü. Reaksiyon tamamlandıktan sonra FAME'ler 5 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Faz ayrımı için 1 ml Milli-Q su ilave edildi ve hekzan tabakası susuz sodyum sülfat (Na_2SO_4) ile 0,22 şırınga filtreden süzüldü.

Daha sonra hekzan, N_2 gazı altında buharlaştırıldı ve kütle olarak transesterifiye edilmiş FAME miktarının belirlenmesi için tartıldı. Yağ asidi kompozisyonu belirlenene kadar -20 °C'de bekletildi.

3.7.1 Geleneksel Transesterifikasyon Yöntemleri (Lipit ekstraksiyonu-Transesterifikasyonu)

Bu yöntemde Bligh and Dyer (1956) metodu modifiye edildikten sonra lipidlerin ekstrakte edilmesi ve ardından farklı çözücü karışımlarının FAME verimi üzerine etkisi değerlendirildi.

Bu amaçla, Bligh ve Dyer yönteminde (G1-G5), 100 mg kuru biyokütleyle 3,75 mL 1:2 kloroform: metanol ilave edilerek Bölüm 3.5'de açıklandığı gibi lipid ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstrakte edilen lipidler tartılarak transesterifikasyon uygulamaları gerçekleştirildi. Tüm transesterifikasyon deneyleri, çözücü olarak metanol ve katalizör olarak asit (H_2SO_4 veya HCl ve BF_3) ve/veya baz (NaOH) ile, 70°C sıcaklıkta ve bir su banyosunda 150 rpm'lik sabit bir çalkalamayla gerçekleştirildi.

G1: lipid+ 1 ml 0,5 N metanolik $\text{NaOH-CH}_3\text{OH}$ çözeltisi ile 25 dk + 1 ml %14 lük BF_3 çözeltisi ile 20 dk

G2: lipid + 1 ml %5 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-CH}_3\text{OH}$ çözeltisi ile 45 dk

G3: lipit + 1 ml 0,5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 25dk + 1 ml %5 HCL- CH₃OH ile 20 dk

G4: : lipit+1 ml %5 H₂SO₄- CH₃OH çözeltisi ile 25 dk + 1 ml 0,5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 20 dk

3.7.2 İn Situ Transesterifikasyonu

Bu deneyde Lipit ekstraksiyonu ve Transesterifikasyonu tek bir adımda gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında 100 mg liyofilize edilmiş mikroalg biyokütlesinden in situ (direkt) transesterifikasyonu ve bunların bir (IS6-IS8) veya iki aşamalı (IS9-IS13) işlemdeki farklı co-solventlerin kombinasyonları incelendi.

In-situ transesterifikasyon prosesinde, reaksiyon solventi olarak metanol ve katalizör olarak da yine farklı asit veya baz kullanılarak, geleneksel ısıtma (su banyosu) yöntemi uygulandı Aynı reaksiyon şartlarında farklı co-solventlerin FAME verimi üzerine etkisi göz önüne alınarak değerlendirildi. Tüm transesterifikasyon deneyleri, çözücü olarak metanol ve katalizör olarak asit (H₂SO₄ veya HCL ve BF₃) ve/veya baz (NaOH) ile, 70°C sıcaklıkta ve bir su banyosunda 150 rpm'lik sabit bir çalkalamayla gerçekleştirildi. Reaksiyon süresince her 5 dk da kapakların ağzı gevşetilerek basınç düşürüldü.

IS1: Mikroalg biyokütlesi + 2 ml 0,5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 45 dk

IS2: Mikroalg biyokütlesi + 2 ml %5 metanolik HCl- CH₃OH ile 45 dk

IS3: : Mikroalg biyokütlesi + 2 ml %5 H₂SO₄- CH₃OH çözeltisi ile 45 dk

IS4: Mikroalg biyokütlesi + 1 ml 0,5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 25 dk+ 1 ml %5 HCl- CH₃OH ile 20 dk

IS5: Mikroalg biyokütlesi + 1 ml %5 HCl- CH₃OH ile 25 dk +1 ml 0,5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 20 dk

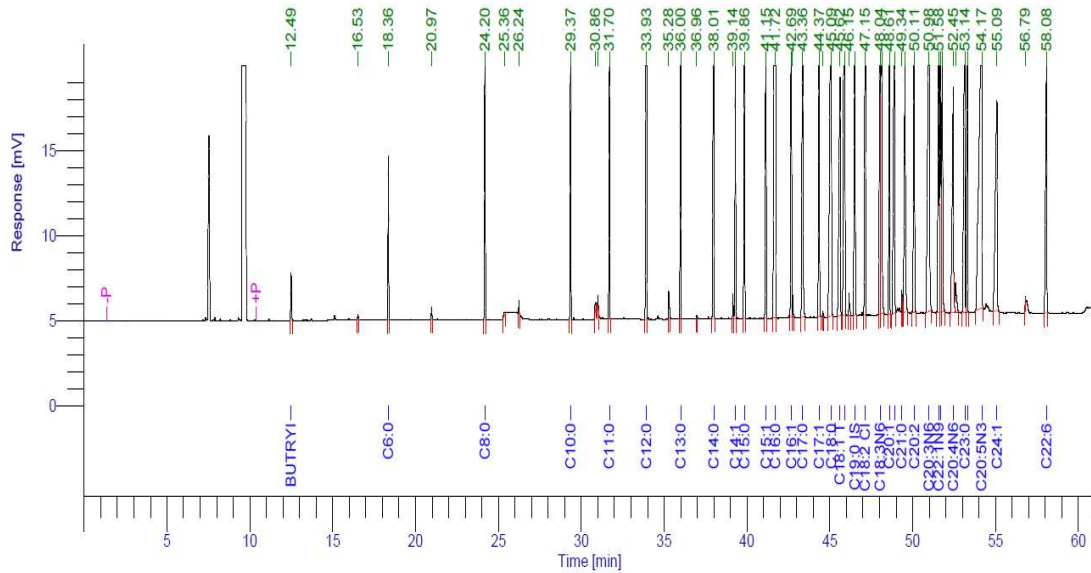
IS6: Mikroalg biyokütlesi + 1 ml 0,5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 25 dk+ 1 ml %5 H₂SO₄- CH₃OH çözeltisi ile 20 dk

IS7: Mikroalg biyokütlesi + 1 ml %5 H₂SO₄- CH₃OH çözeltisi ile 25 dk + 1 ml 0,5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 20 dk

IS8: Mikroalg biyokütlesi + 1 ml 5 N metanolik NaOH-CH₃OH çözeltisi ile 25 dk + 1 ml %14 lük BF₃ çözeltisi ile 20 dk

3.8 YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONUNUN BELİRLENMESİ

Transesterifikasyon işlemi gerçekleştikten sonra eksi 20 derecede bekletilen örnekler 1 ml hekzan içerisinde yeniden çözüldü. Yağ asidi kompozisyonu ve FAME verim miktarının belirlenmesi için hekzan (mg mL⁻¹) içindeki 1 ml metil nonadekanoat (C19:0) çözeltisi dahili bir standart olarak eklendi. FAME, bir HP-88 kolonu (100m uzunluk 0.25mm ID, 0.2um film kalınlığı) kullanılarak alev iyonizasyon detektörü (FID) ile donatılmış bir gaz kromatografisi (GC) (A Clarus 680, Perkin Elmer, ABD) ile analiz edildi. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL dk⁻¹ akış hızına sahip hidrojen kullanıldı. Bölünme oranı 50:1 idi. GC fırın sıcaklığı, 4 °C dk⁻¹ hızında 50 °C'den (5 dk) 230 °C'ye (11 dk) kadar programlandı. GC zirveleri, 37 yağ asidi metil esterinin (FAME 37 Supelco™) karışımıyla belirlendi.



Şekil 3.9: FAME 37 Standardının GC-FID cihazında ölçülen kromatografisi

Ağırlıkça FAME içerik yüzdesi, aşağıdaki Denklem 3.4 kullanılarak EN14103:20 yöntemine göre kütle yüzdesi olarak belirlendi.

$$\text{FAME içerik \%} = \frac{\sum(\text{AX} \times \text{RX}) - \text{AEI}}{\text{AEI}} \times \frac{\text{WEI}}{\text{W}} \times 100 \quad (3.4)$$

AX, bireysel meyl ester X'in tepe alanı,

RX, dahili standarda göre GC-FID düzeltici faktörü,

AEI, C19:0 standardına karşılık gelen tepe alanı,

WEI, dahili standart olarak kullanılan C19:0'ın mg cinsinden ağırlığı,

W, transesterifiye edilmiş yağ asidi metil esterinin mg cinsinden ağırlığıdır,

FAME verimi Denklem 3.5 kullanılarak şu şekilde hesaplandı:

$$\text{FAME verim (\%)} = \frac{\text{Lipit verim (\%)} \times \text{FAME içerik \%}}{100} \quad (3.5)$$

3.9 BİYODİZELİN KALİTE ÖZELLİKLERİ

Biyodizelin kalitesinin değerlendirilmesi için sabunlaşma değeri (SV), iyot değeri (IV), setan sayısı (CN), doymamışlık derecesi (DU), uzun zincirli doyma faktörü (LCSF), soğuk filtre tıkanma noktası (CFPP), yüksek ısıtma değeri (HHV) ve oksidatif stabilite (OS), aşağıdaki deneysel denklemler kullanılarak hesaplandı (Sandani ve diğ., 2020; Srinuanpan ve diğ., 2018; Valdez-Ojeda ve diğ., 2015): Biyodizel kalite özellikleri Denklem 3.6 - 3.10 'da verildi.

$$\text{SV} \left(\text{mg} \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \text{Yağ} \right) = \sum (560 \times \text{FA}) / M \quad (3.6)$$

$$\text{IV} \left(\frac{\text{g}}{12 \times 100 \text{ yağ}} \right) = \sum (254 \times D) / M \quad (3.7)$$

$$\text{CN} = 46,3 + \left(\frac{5458}{\text{SV}} \right) - (0,225 \times \text{IV}) \quad (3.8)$$

$$\text{DU (\%wt)} = \text{MUFAs(\%)} + (2 \times \text{PUFAs(\%)})$$

$$\text{LCSF (\%wt)} = (0,1 \times \text{C16}) + (0,5 \times \text{C18}) + (1 \times \text{C20}) + (1,5 \times \text{C22}) + (2 \times \text{C24}) \quad (3.9)$$

$$\text{CFPP} = (3,1417 \times \text{LCSF}) - 16,477 \quad (3.10)$$

Eşitliklerde belirtilen ;

FA (%) : her bir yağ asidi esterinin yüzdesi,

M: Her bir yağ asidi esterinin molekül ağırlığı,

D: çift bağların sayısıdır

MUFA (%) :tekli doymamış yağ asitlerinin ağırlık yüzdesidir,

PUFA'lar (%) :çoklu doymamış yağ asitlerinin ağırlık yüzdesidir,

C16, C18, C20, C22 ve C24 sırasıyla 16, 18, 20, 22 ve 24 karbon atomlu doymuş zincirlerin ağırlık yüzdeleridir.

3.10 AZOT MANİPÜLASYON DENEYLERİ

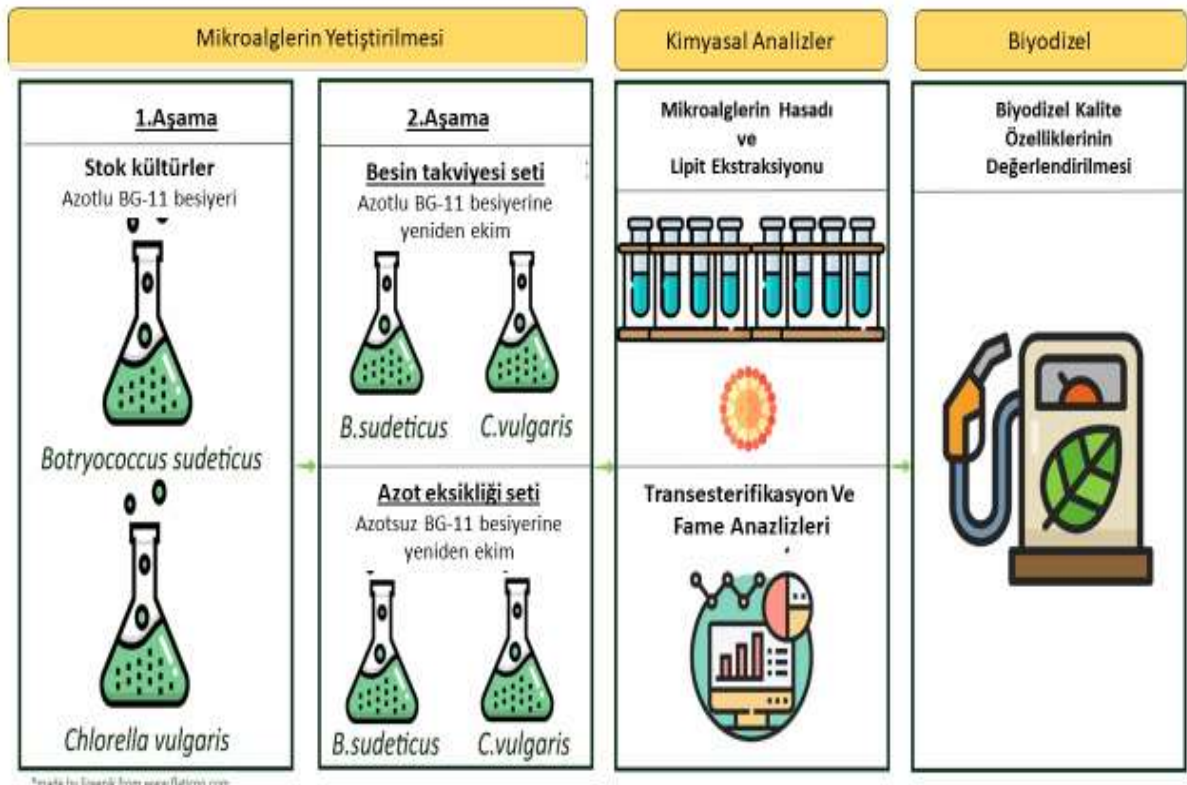
Birinci aşamadan yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda en uygun yöntemler belirlenerek, bu yöntemler *B. sudeticus* ve *C. vulgaris* türlerinin kültür koşullarındaki büyüme hızları, FAME verimi ve kalitesi gibi temel avantajları karşılaştırmak amacıyla azot manipülasyon deneylerinde kullanılmıştır.

Bu çalışmada *B. sudeticus* ve *C. vulgaris* türlerinin azotun sınırlı miktarda bulunduğu koşullar altında lipid ve FAME verimleri ile biyodizel kalite özelliklerinin karşılaştırılması amaçlandı. Bu kapsamda suşlar 24°C'lik sıcaklıkta 12:12 fotoperiyot rejimine göre beyaz ışık altında yetiştirildi. Kültürlerin büyümesi haftalık olarak Klorofil-*a* (kl-*a*) ölçümüyle izlendi. Spesifik büyüme oranı göre kl-*a* değerlerine göre hesaplandı (Rao ve diğ., 2007).

Deney iki aşamada gerçekleştirildi (Şekil 3.10). 6 hafta süren ilk aşamada, başlangıç hücre yoğunluğu yaklaşık 15×10^6 hücre ml^{-1} olan stok kültürler, NaNO_3 içeren BG-11 ortamına atıldı ve kültürler sabit faza kadar optimum koşullar altında yetiştirildi.

3 hafta süren ikinci aşamada ise kültürler besin ortamı takviyesi ve azot eksikliği olarak 2 farklı koşul uygulandı.

- **Besin takviyesi seti:** Kültürler 6. haftanın sonunda santrifüj edildi ve besiyerinden çıkarıldıktan sonra normal BG-11 besiyerine tekrar inoküle edildi.
- **Azot eksikliği seti:** Kültürler 6. haftanın sonunda santrifüj edildi ve besiyerinden çıkarıldıktan sonra NaNO_3 içermeyen BG-11 besiyerine tekrar inoküle edildi.



Şekil 3.10: Azot Manipülasyon Deneyinin Kurulması

10. haftanın sonunda tüm kültürler santrifüj ile hasat edilerek liyofilizatörde kurutuldu ve kloroform:metanol:su (1:2:0,8 h/h) ile modifiye edilerek Bligh ve Dyer (1959) protokolü kullanılarak Bölüm 3.5 de anlatıldığı gibi ekstrakte edildi.

Ekstrakte edilen lipitler modifiye Lepage ve Roy (1934)'a göre yağ asidi metil esteri (FAME) formuna transesterifiye edildi ve FAME'nin bileşimi ham biyodizelden belirlendi. Buna göre

Transesterifikasyon deneylerinde belirlenen G3 (2N metanolik NaOH-CH₃OH + %5 HCl) yöntemi ile Bölüm 3.7.1’ de belirtildiği şekilde transesterifiye edildi

Transesterifiye edilmiş lipidlerin FAME verimleri GC-FID cihazı kullanılarak Bölüm 3.9 ‘da belirtildiği gibi analiz edildi ve biyodizel kalite özellikleri bakımından karşılaştırıldı.

3.11 İSTATİSTİK ANALİZLER

Lipit ekstraksiyon, Yağ asidi kompozisyonu, Biyodizel kalite ve FAME verim analizlerinde farklılıkların önemi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve eğer farklılık önemli ise farklılığın kaynağı/ları Tukey HSD testi ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyiyle analiz edildi. İstatistiksel analizler SPSS 17.0 (İstatistiksel Ürün ve Hizmet Çözümleri) kullanılarak gerçekleştirildi.

Transesterifikasyon metotlarının Yağ asidi kompozisyonu Doymuş Yağ Asitleri (SFA), Tekli Doymamış Yağ Asitleri (MUFA), Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (PUFA), FAME verimi ve Biyodizel Kalite Parametreleri (IV, SV, CN, DU, LCSF, CFPP) üzerinde oluşturduğu farklılıklar küme analizi benzerliği Primer 6 programı kullanılarak Bray Curtis benzerlik analizi ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

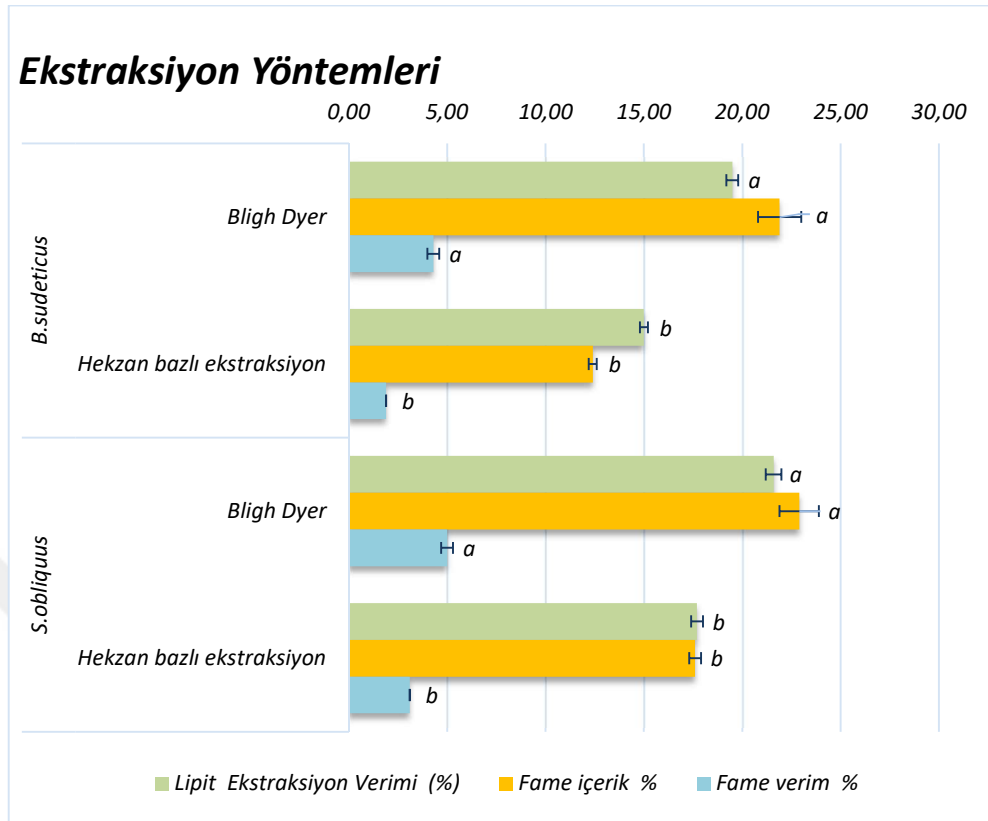
4.1 LİPİT EKSTRAKSİYON METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

4.1.1 Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyon metotlarının *B.sudeticus* ve *S. obliquus* türleri üzerindeki Lipit ve FAME verimlerine Etkisi

Botryococcus sudeticus ve *Scenedesmus obliquus* üzerinde gerçekleştirilen Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyon ve FAME verimleri Şekil 4.1’de verildi. Elde edilen sonuçlarda her iki tür üzerinde de uygulanan ekstraksiyon yöntemleri Lipit verimi, FAME içerik ve FAME verim miktarları üzerinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi (ANOVA $p < 0.05$).

Bligh Dyer (1959) lipit ekstraksiyon yönteminin hem lipit hem de FAME verimleri açısından daha yüksek olduğu görüldü. Bligh Dyer ekstraksiyonunda *B. sudeticus* ve *S. obliquus* türlerinin lipit verimleri sırasıyla % 19,5 ve % 21,6 tespit edilirken Hekzan bazlı ekstraksiyonda sırasıyla %15,0 ve %17,7 bulundu. Lipit ekstraksiyon yöntemlerinin FAME içerik yüzdeleri üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde *B. sudeticus* türünde %21,9 *S. obliquus* türünde ise %22,9 tespit edilirken, Hekzan bazlı ekstraksiyonda FAME içerik yüzdeleri sırasıyla %12,4 ve %17,6 olarak kaydedildi.

Her iki tür üzerinde de FAME verim yüzdeleri Bligh Dyer (1959) ekstraksiyonunda daha yüksek tespit edildi. Bununla birlikte her iki ekstraksiyon yönteminde de *S. obliquus* türünün hem lipit hem de FAME verim yüzdeleri *B. sudeticus* türüne göre daha yüksek bulundu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilen *B.sudeticus* ve *S.obliquus* türlerinin Lipit Ekstraksiyon, FAME içerik ve FAME verim miktarları (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: Sütunlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

4.1.2 Bligh Dyer ve Hekzan Bazlı Lipit Ekstraksiyonlarının *B. sudeticus* ve *C. vulgaris* Türlerinin Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi

Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyonu uygulanan *Scenedemus obliquus* ve *Botryococcus sudeticus* türlerinin Yağ asidi profilleri Tablo 4.1 'de gösterildi.

Her iki ekstraksiyon yönteminde de GC-FID analiz sonuçlarına göre, her iki türde C16:0 en yüksek tespit edilen yağ asidiyken bunu sırasıyla C18:0 ve C18:3n6 yağ asitleri izledi. Bununla birlikte ekstraksiyon yöntemleri *B. sudeticus* 'un C16:0, C18:0 ve C18;3n6 gibi ana yağ asitlerinin yüzde kompozisyon miktarlarında anlamlı fark oluşturmazken (ANOVA $p>0.05$), *Scenedemus obliquus* türünde C16:0 ve C18:3n6 üzerinde anlamlı fark tespit edilmiştir (ANOVA $p<0.05$)

Ekstraksiyon yöntemleri arasında *B. sudeticus* türünün Doymuş Yağ Asidi (SFA) oranları üzerinde anlamlı fark tespit edilmezken, Tekli Doymamış (MUFA) ve Çoklu Doymamış (PUFA) oranlarında anlamlı bir fark bulundu. *B. sudeticus* türünde toplam SFA oranı % 61,1 MUFA %14,1 ve PUFA %23,8 olarak tespit edilirken bu oran Hekzan bazlı ekstraksiyonda sırasıyla, %60,9, %12,6 ve %26,4 olarak ölçüldü. *S. obliquus* türünde ise ekstraksiyon metotları arasında SFA ve PUFA değerleri üzerinde anlamlı fark bulundu (ANOVA $p < 0.05$). Bligh Dyer ile ekstrakte edilen *S. obliquus* türünde SFA %63,7 MUFA %13,9 ve PUFA %21,1 olarak tespit edilirken Hekzan bazlı ekstraksiyonda ise doymuş yağ asidi 68,4 olarak kaydedildi. MUFA ve PUFA oranları ise sırasıyla %13,1 ve %18,2 olarak tespit edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Bligh Dyer ve Hekzan lipid ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen *B.sudeticus* ve *S.obliquus* türlerinin Yağ Asidi Profilleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b : ekstraksiyonlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

YAĞ ASİDİ	<i>B.sudeticus</i>		<i>S.obliquus</i>	
	Bligh Dyer	Hekzan	Bligh Dyer	Hekzan
c16:0 (Palmitic acid)	31,7 ± 1,7 ^a	31,1 ± 0,2 ^a	37,8 ± 0,7 ^a	45,1 ± 1,9 ^b
c16:1 (Palmitoleic acid)	1,1 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,3 ^b	1 ± 0 ^a	1,7 ± 0,1 ^b
c17:0 (Margaric acid)	1,3 ± 0,8 ^a	0 ± 0 ^b	0,3 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
c18:0 (Stearic acid)	26,8 ± 1,7 ^a	28,6 ± 0,4 ^a	24 ± 1,2 ^a	22,3 ± 1,4 ^a
c18:1 cis (Oleic acid)	9 ± 0,2 ^a	8,3 ± 0,2 ^b	4,8 ± 0,3 ^a	6,1 ± 0,3 ^b
c18:1 trans (Elaidic acid)	0,2 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b	1 ± 0 ^a	0 ± 0 ^b
c18:2 cis (linoleic acid)	3,6 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1 ^b	1,7 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^b
c18:3n6 (γ-Linoleic acid)	17,6 ± 1,1 ^a	18,7 ± 0,6 ^a	18,1 ± 0,1 ^a	13,8 ± 1,3 ^b
c20:0 (Arachidic acid)	0,3 ± 0 ^a	0,6 ± 0 ^b	0,3 ± 0 ^a	0,4 ± 0 ^b
c20:1 γ-(Linoleic acid)	4 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^b	8 ± 0,5 ^a	5,4 ± 0,6 ^b
c20:4n6 (Arachidonic acid)	2,1 ± 0 ^a	6,2 ± 0,9 ^b	1,4 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,1 ^b
c21:0 (Heneicosylic Acid)	2,3 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^b	1,7 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^b
c16-c18	91,2 ^a	90,7 ^a	88,6 ^a	90,2 ^a
SFA	61,1 ^a	60,9 ^a	63,7 ^a	68,4 ^b
MUFA	14,1 ^a	12,6 ^b	13,9 ^a	13,1 ^a
PUFA	23,3 ^a	26,5 ^b	21,1 ^a	18,2 ^b

4.1.3 Bligh Dyer ve Hekzan Bazlı Lipit Ekstraksiyon Yöntemlerinin *B. sudeticus* ve *C.vulgaris* Türlerinin Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi

Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyonu uygulanan *S. obliquus* ve *B. sudeticus* türlerinin biyodizel kalite parametrelerine etkisi Tablo 4.2' de verildi. Buna göre *Botryococcus sudeticus* türünde ekstraksiyon yöntemi setan sayısı (CN; 143,9; 137.7), ve doymamışlık derecesi (DU; 60,2-65,5), üzerinde anlamlı fark yaratmazken (ANOVA $p>0.05$), Hekzan bazlı ekstraksiyon, Bligh Dyer yöntemine göre iyot değeri (IV; 68,3-80,9), uzun zincirli doyma faktörü (LCSF; 17,5-19,1), ve soğuk filtre tıkanma noktası (CFPP, 38,6- 43,6), değerlerinde artış, sabunlaşma değerinde (SV; 143,9-137,7), ise azalışa neden oldu.

Scendesmus obliquus türünde ekstraksiyon yöntemleri ise SV (153,1-155,7) , LCSF (16,0-16,1) ve CFPP (33,8-34,1) değerlerinde anlamlı fark yaratmazken (ANOVA $p>0.05$), CN(67,4-69,2) Hekzan bazlı ekstraksiyon, Bligh Dyer yöntemine göre iyot değeri değerlerinde artış, DU (57,1-46,2) değerinde ise azalışa neden oldu.

Tablo 4.2: Bligh Dyer ve Hekzan bazlı lipit ekstraksiyon yöntemlerinin *B. sudeticus* ve *S. obliquus* türlerinin Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: ekstraksiyonlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

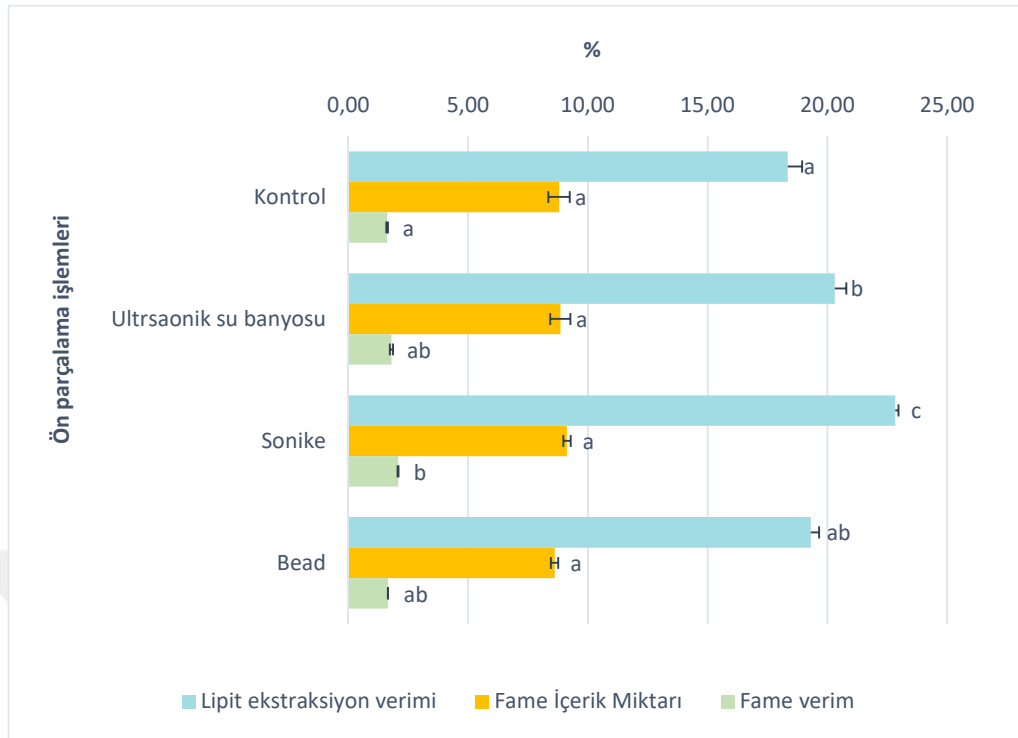
Tür	Ekstraksiyon metodu	Biyodizel Kalite Parametreleri					
		IV	SV	CN	DU	LCSF	CFPP
<i>B.sudeticus</i>	Bligh Dyer	68,3 ± 2,2 ^a	143,9 ± 1,5 ^a	68,9 ± 0,9 ^a	60,2 ± 2 ^a	17,5 ± 0,5 ^a	38,6 ± 1,7 ^a
	Hekzan bazlı	80,9 ± 2 ^b	137,7 ± 0,3 ^b	67,8 ± 0,4 ^a	65,5 ± 1 ^a	19,1 ± 0 ^b	43,6 ± 0,1 ^b
<i>S. obliquus</i>	Bligh Dyer	64,6 ± 0,7 ^a	153,1 ± 2,5 ^a	67,4 ± 0,7 ^a	57,1 ± 0,6 ^a	16 ± 0,5 ^a	33,8 ± 1,7 ^a
	Hekzan bazlı	54,1 ± 2,7 ^b	155,7 ± 3,2 ^a	69,2 ± 0,1 ^b	46,2 ± 1,8 ^b	16,1 ± 0,5 ^a	34,1 ± 1,7 ^a

4.2 HÜCRE ÖN PARÇALAMA İŞLEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

4.2.1 Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin *Scenedesmus obliquus* Türünün Lipit Ekstraksiyon, FAME Miktar ve FAME Verim Yüzdeleri Üzerindeki Etkisi

Dondurarak kurutulmuş 150 mg *S. obliquus* biyoması üzerinde lipit ekstraksiyonu öncesi uygulanan ön parçalama işlemlerinin lipit ekstraksiyon ve FAME içerik yüzdelere etkisi Şekil 4.2’de gösterildi.

En yüksek lipit ekstraksiyon ve FAME verim yüzdeleri Sonikasyon ile ön parçalama işleminde görülürken hiçbir ön işlem yapılmayan Kontrol grubunda en düşük değerler tespit edildi. Lipit ekstraksiyon verimleri arasında ön parçalama işlemlerinden Bead beater ile Kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı. Bununla birlikte Ultrasonik su banyosu ve Sonikasyon ön parçalama işlemleri Kontrol grubundan anlamlı farklı bulundu (ANOVA $p < 0.05$). FAME verimleri açısından değerlendirildiğinde ise Sonikasyon ile ön parçalama işlemi hem kontrol hem de diğer ön parçalama işlemlerinden anlamlı olarak farklı bulunurken (ANOVA $p < 0.05$) ön parçalama işlemleri ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (ANOVA $p > 0.05$).



Şekil 4.2: *Scenedesmus obliquus* biyoması üzerinde Lipit ekstraksiyonu öncesi uygulanan ön parçalama işlemlerinin lipit ekstraksiyon ve FAME miktar ve verim yüzdeleri (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b, c, ab; ön parçalama işlemleri arasındaki farklılığın istatistikî açıdan önemli olduğunu gösterir)

4.2.2 Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin *Scenedesmus obliquus* Türünün Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi

Lipit ekstraksiyon öncesi uygulanan ön parçalama işlemlerinin *S. obliquus* türünün yağ asidi profiline dağılımına etkisi Tablo 4.3’de verildi.

Scenedesmus obliquus türünün GC-FID analiz sonuçlarına göre ön parçalama işlemlerinin yağ asidi kompozisyonu üzerinde anlamlı fark oluşturmadığı tespit edildi (ANOVA $p > 0.05$) Buna göre *Scenedesmus obliquus* türü üzerinde gerçekleştirilen tüm ön parçalama işlemlerinde en yüksek yağ asidi C16:0 asidi bulunurken, bu yağ asidini C18:3n6 takip etti.

Tablo 4.3: Hücre Ön Parçalama İşlemlerine göre *S. obliquus* türünün Yağ Asidi Profili (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b: ön parçalama işlemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Yağ asidi	Ön parçalama işlemleri			
	Kontrol	Ultrasonik su banyosu	Sonikasyon	Bead Beater
c12:0 Lauric acid	1,5 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,5 ^a
c14:0 Myristic acid	1,6 ± 1,6 ^a	1,5 ± 1,1 ^a	1,4 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,8 ^a
c16:0 (Palmitic acid)	63,5 ± 3,3 ^a	63,0 ± 7,8 ^a	61,5 ± 5,5 ^a	64,2 ± 4,4 ^a
c16:1 (Palmitoleic acid)	3,3 ± 0,3 ^a	7,01 ± 2,6 ^a	3,4 ± 0,4 ^a	3,4 ± 0,6 ^a
c17:0 (Margaric acid)	5,3 ± 0,8 ^a	4,3 ± 1,7 ^a	7,4 ± 2,1 ^a	4,9 ± 1,0 ^a
C17:1 (Margaric acid)	2,1 ± 0,1 ^a	1,5 ± 1,1 ^a	2,7 ± 0,8 ^a	1,7 ± 0,3 ^a
c18:0 (Stearic acid)	1,5 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,6 ^a	1,3 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,1 ^a
c18:1 cis (Oleic acid)	5,1 ± 0,5 ^a	5,2 ± 2,8 ^a	6,5 ± 1,5 ^a	6,13 ± 1 ^a
c18:1 trans (Elaidic acid)	1,1 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,62 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,2 ^a
c18:3n6 (γ-Linoleic acid)	8,2 ± 0,5 ^a	9,5 ± 1,11 ^a	8,9 ± 0,8 ^a	9,4 ± 1,4 ^a
c20:1 γ-(Linoleic acid)	4,3 ± 0,1 ^a	2,9 ± 2,1 ^a	3,9 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,79 ^a
c20:4n6 (Arachidonic acid)	1,9 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,8 ^a	0,7 ± 0,7 ^a	1,5 ± 0,4 ^a
SFA	73,1 ± 5,7 ^a	71,9 ± 11,3 ^a	72,9 ± 7,9 ^a	72,3 ± 6,8 ^a
MUFA	14,8 ± 1,0 ^a	16,7 ± 8,5 ^a	16,5 ± 2,9 ^a	15,5 ± 2,7 ^a
PUFA	11,26 ± 0,7 ^a	11,3 ± 2,4 ^a	10,5 ± 1,5 ^a	12,3 ± 2,0 ^a

4.2.2 Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin *Scenedesmus obliquus* Türünün Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi

Lipit ekstraksiyon öncesi uygulanan ön parçalama işlemlerinin *Scenedesmus obliquus* türünün Biyodizel kalite parametreleri üzerinde oluşturduğu değişim Tablo 4.4’de gösterildi. Buna göre biyodizel kalite parametrelerine göre uygulanan ön parçalama teknikleri arasında anlamlı fark tespit edilemedi (ANOVA $p > 0.05$).

Tablo 4.4: Hücre Ön Parçalama İşlemlerinin *Scenedesmus obliquus* türünün Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi (Veriler ort + stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a,b: ön parçalama işlemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Biyodizel Kalite Parametreleri	Kontrol	Ultrasonik Banyo	Sonikasyon	Bead Beater
IV	$43,8 \pm 0,4^a$	$45,7 \pm 3,6^a$	$42,7 \pm 2,2^a$	$46,6 \pm 7,4^a$
SV	$211,2 \pm 1,2^a$	$213,8 \pm 1,7^a$	$212,9 \pm 0,4^a$	$212,3 \pm 0,6^a$
CN	$62,3 \pm 0,0^a$	$61,5 \pm 2,1^a$	$62,3 \pm 0,4^a$	$61,5 \pm 1,6^a$
DU	$37,3 \pm 0,4^a$	$39,4 \pm 9,4^a$	$37,6 \pm 2,7^a$	$40 \pm 6,2^a$
LCSF	$7,1 \pm 0,3^a$	$7,3 \pm 1,0^a$	$6,8 \pm 0,5^a$	$7,1 \pm 0,4^a$
CFPP	$5,8 \pm 1^a$	$6,4 \pm 3,3^a$	$5,0 \pm 1,4^a$	$5,7 \pm 1,4^a$

4.3 FARKLI TRANSESTERİFİKASYON METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

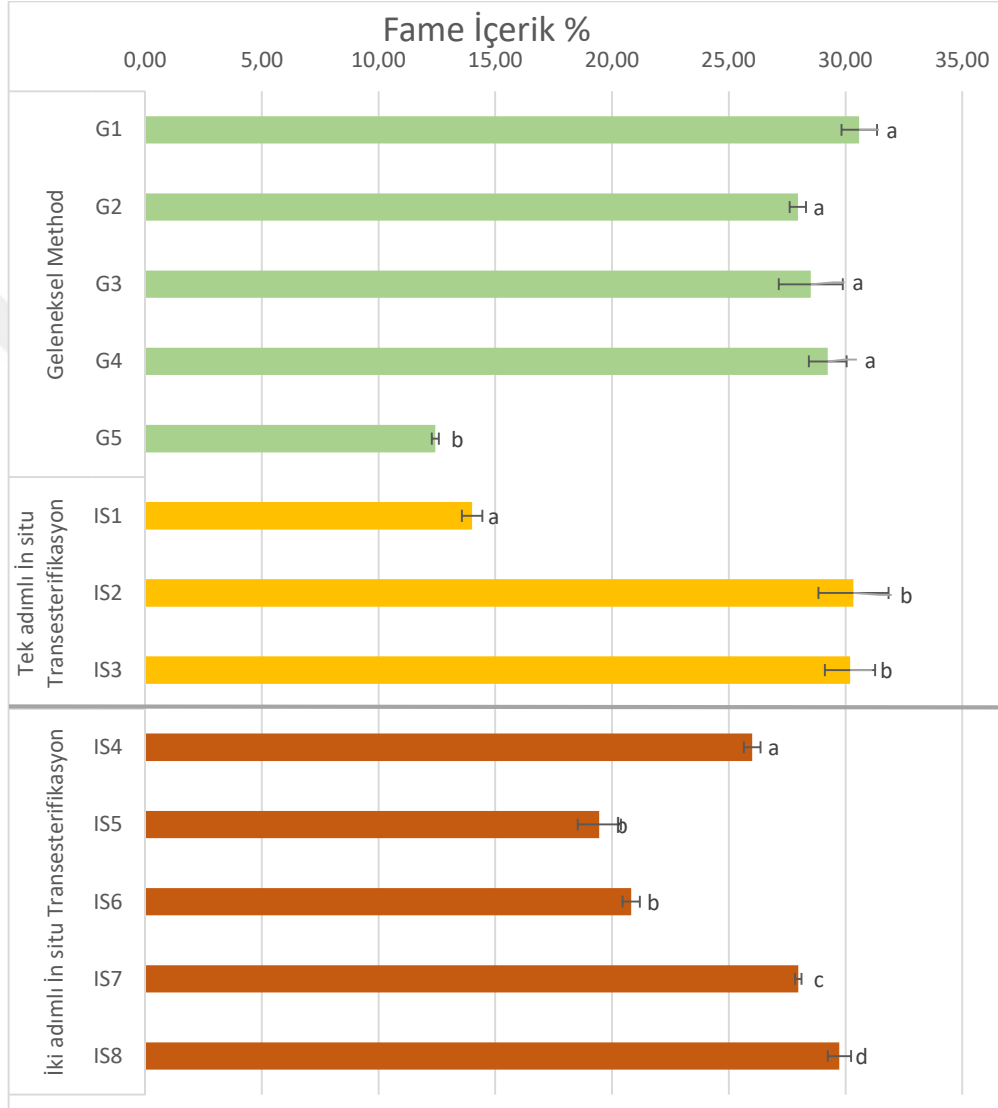
4.3.1 Transesterifikasyon Metotlarının Fame İçerik Miktarı Üzerine Etkisi

Toplam FAME içerik yüzdeleri transesterifikasyon metotları arasında %14,0 ile %30,6 arasında değişiklik gösterdi (Şekil 4.3). En yüksek FAME içerik yüzdeleri, geleneksel metotlardan BF_3 katalizörünün kullanıldığı G1(%30,5) ve tek adımlı in situ transesterifikasyonlarından HCL ve H_2SO_4 gibi asidik katalizörlerin kullanıldığı IS2(%30,3) ve IS3 (%30,1) reaksiyonlarında tespit edildi. En düşük FAME içerik yüzdesi ise NaOH ile tek adımlı in situ transesterikasyonu uygulanan IS1 (%14,0) yönteminde tespit edildi.

Scenedesmus obliquus türü üzerinde gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonlarında geleneksel yöntemlerden katalizör olarak tek başına NaOH kullanımı ile gerçekleşen G5 reaksiyonu %18 ile geleneksel yöntemler içerisindeki en düşük FAME içeriğine sahip olmuştur. G5 reaksiyonunun FAME içeriği, diğer dört reaksiyondan (G1-G4) anlamlı olarak farklı bulundu (ANOVA $p > 0.05$). Bununla birlikte, diğer geleneksel metotlar arasında (G1, G2, G3 ve G4) anlamlı fark tespit edilmedi (ANOVA $p > 0.05$).

Tek ve iki adımlı in situ transesterifikasyon yöntemleri arasında ise anlamlı anlamlı fark tespit edildi. ANOVA $p > 0.05$). Tek adımlı in-situ transesterifikasyonunda HCL ve H_2SO_4 kimyasallarının kullanıldığı asidik IS2 ve IS3 transesterifikasyon yöntemleri arasında istatistiksel

olarak anlamlı fark tespit edilmezken, NaOH kimyasalının kullanıldığı bazık IS1 yönteminde diğer iki yöntemden FAME içerik miktarları açısından anlamlı fark tespit edildi. Farklı katalizörlerin kullanılması ile gerçekleşen İki adımlı in-situ yöntemlerinin her biri ise birbirleriyle anlamlı olarak farklı bulundu (ANOVA $p>0.05$).

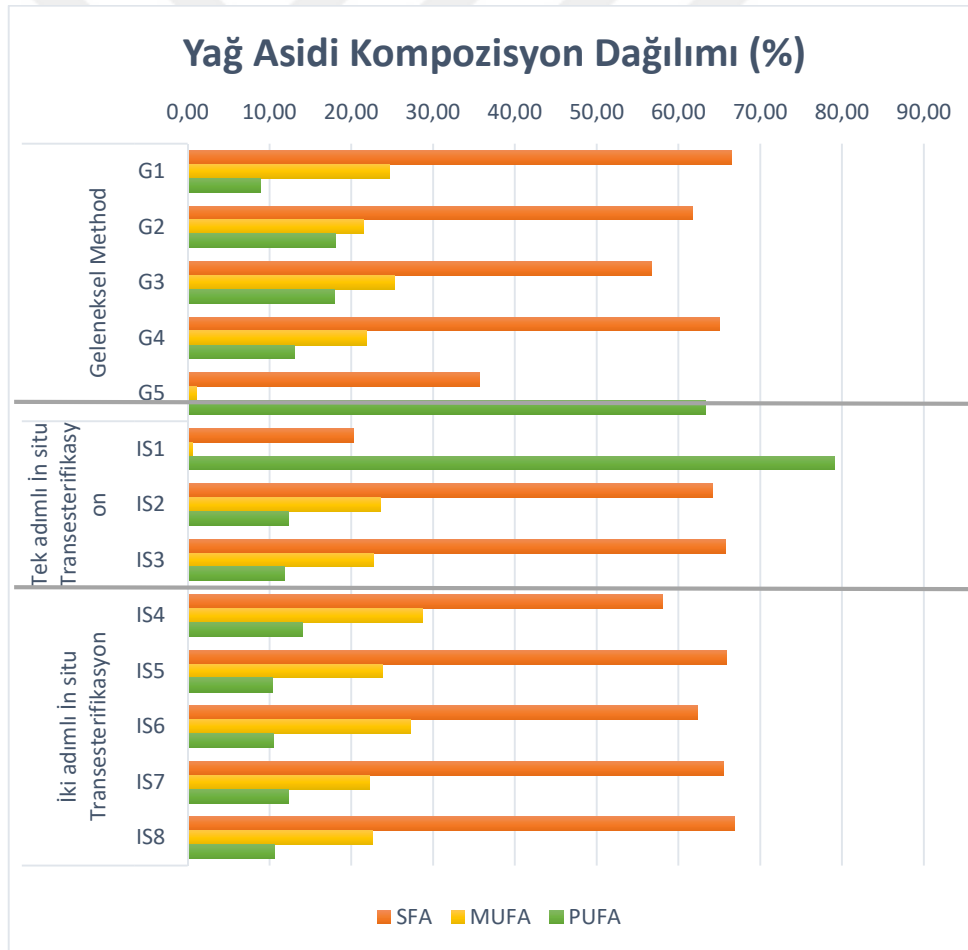


Şekil 4.3: Farklı Transesterifikasyon yöntemleri ile transesterifiye edilen *Scenedesmus obliquus* türünün FAME içerik Yüzde miktarları (Veriler ortalama±stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c; Geleneksel, Tek adımlı ve İki adımlı in situ yöntemlerinin kendi içlerindeki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

4.3.2 Farklı Transesterifikasyon Metotlarının Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi

Geleneksel, tek ve iki adımlı in situ transesterifikasyon yöntemleri kendi içlerinde kullanılan katalizörlere göre tespit edilen SFA, MUFA ve PUFA oranları Şekil 4.4’de gösterildi.

Geleneksel metotlar, tek ve iki adımlı in situ transesterifikasyonun gerçekleştirildiği metotlar ile karşılaştırıldığında en yüksek SFA oranı IS8 (%66,8) en düşük oran ise IS1 (%20,2) yönteminde gerçekleşti. Bununla birlikte doymamışlık oranlarına baktığımızda en yüksek MUFA IS4 (% 28,6) en düşük ise IS1 (%0,6) yönteminde tespit edildi PUFA bakımından ise en yüksek oran dikkat çekici bir şekilde IS1 (%79,2) yönteminde tespit edilirken, en düşük oran G1 (%8,9) yönteminde bulundu.



Şekil 4.4: Farklı Transesterifikasyon yöntemleri ile transesterifiye edilen *Scenedesmus obliquus* türünün Doymuş (SFA) Tekli Doymamış (MUFA) ve Çoklu Doymamış Yağ Asit Yüzdeleri (PUFA) (Veriler ort+-stdsapma değerleridir)

Geleneksel ve tek ve iki adımlı transesterifikasyon yöntemlerinde farklı kimyasalların kullanılması ile oluşturulan deneylerde tespit edilen yağ asidi kompozisyon yüzdeleri sırasıyla Tablo 4.5, 4.6 ve 4.7 'de gösterildi. Buna göre; NaOH katalizörünün tek aşamalı olarak uygulandığı geleneksel metotlardan G5 reaksiyonu ve in situ metotlarından IS1 reaksiyonu hariç tüm metotlarda en yüksek yüzde dağılımına C16:0 yağ asidinin sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, C18:3n6 , G5 ve IS1 metotlarında sırasıyla %48,2 ve %75,8 ile en yüksek tespit edilen en yüksek yağ asidi oldu.

Bununla birlikte bazı yağ asitlerinin yüzde miktarları transesterifikasyon yöntemleri arasında kullanılan katalizörlere göre farklılık gösterdi. Geleneksel yöntemler arasında yüksek miktarda tespit edilen C18:1 cis oranı G1 metodunda anlamlı farka neden olurken, tek adımlı in situ transesterifikasyonda C18:3n6, iki adımlı in situ transesterifikasyonunda ise C16:0 IS4 metodunda anlamlı fark kaydedildi (ANOVA $p>0.05$).

Tablo 4.5: Farklı Kimyasallar ile geleneksel transesterifikasyon yöntemi uygulanan *Scenedesmus obliquus* türünün yağ asidi (Veriler ort+-stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b, c, d, e, ab, bc, dc: geleneksel yöntemler arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Yağ Asidi Kompozisyonu	Geleneksel Metotlar				
	G1	G2	G3	G4	G5
c14:0 (Myristic acid)	1,2 ± 0,6 ^{ac}	1,8 ± 0 ^a	2,4 ± 0,3 ^b	1,9 ± 0 ^a	0,2 ± 0 ^c
c15:0 (Pentadecanoic acid)	0,9 ± 0,6 ^{ac}	1,1 ± 0 ^a	1,7 ± 0,3 ^b	1,4 ± 0 ^a	0 ± 0 ^c
c15:1 (Ginkgolic acid)	0,8 ± 0,8 ^a	2 ± 0 ^a	7,2 ± 0,7 ^b	2,4 ± 0,1 ^a	0 ± 0 ^a
c16:0 (Palmitic acid)	49,1 ± 2,9 ^a	45,5 ± 1,7 ^{ab}	41,3 ± 0,5 ^b	47,7 ± 0,8 ^a	20 ± 0 ^c
c16:1 (Palmetoleic acid)	2,2 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	1,8 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,1 ^b	1 ± 0,6 ^b
C16:2 (Palmitolinolenic acid)	1,4 ± 0,4 ^a	9,7 ± 0,1 ^{bc}	9,7 ± 0,7 ^c	3,9 ± 0,2 ^d	4,3 ± 0,1 ^d
C17:0 (Margaric acid)	1,1 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	1,4 ± 0 ^a	0,7 ± 0,2 ^b
C17:1 (heptadecenoic acid)	2,5 ± 1,4 ^a	2 ± 0 ^a	1,4 ± 1 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
C18:0 (Stearic acid)	9,9 ± 1,1 ^a	10,6 ± 0 ^a	10 ± 0,5 ^a	10,9 ± 0,5 ^a	14,7 ± 0,2 ^b
C18:1 cis (Oleic acid)	18,8 ± 0,9 ^a	14,8 ± 0,1 ^{bc}	14,5 ± 0,5 ^c	16,6 ± 0,4 ^d	0 ± 0 ^b
C18:1 trans (Elaidic acid)	0,4 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0 ^a	0,4 ± 0,3 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
C18:2 cis (linoleic acid)	2,7 ± 0,2 ^a	3,1 ± 0 ^{bc}	3 ± 0 ^c	3,5 ± 0 ^d	0 ± 0 ^c
C18:3n3 (α -linoleic)	4,4 ± 0,4 ^a	5,3 ± 0 ^{bd}	5,3 ± 0,2 ^c	5,7 ± 0 ^{dc}	0 ± 0 ^c
C18:3n6 (γ -Linoleic acid)	0,4 ± 0,1 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	48,2 ± 0,4 ^b
C21:0 (Heneicosanoic acid)	4,4 ± 0,4 ^a	1,4 ± 0 ^b	0,7 ± 0 ^c	1,6 ± 0 ^b	0 ± 0 ^d
C20:2 (Dihomo-linoleic acid)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	1,2 ± 0 ^b
C22:6 (Docosahexaenoic acid)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	3,2 ± 0 ^b
C20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	6,4 ± 0 ^b
SFA	66,4 ± 2,6 ^a	61,7 ± 1,6 ^a	56,7 ± 0,1 ^b	65 ± 0,2 ^a	35,6 ± 0,3 ^c
MUFA	24,7 ± 1,7 ^a	20,2 ± 1,6 ^b	25,3 ± 0,5 ^a	21,9 ± 0,4 ^{ab}	1,1 ± 0,6 ^c
PUFA	8,9 ± 1 ^a	18,1 ± 0 ^{bc}	18 ± 0,5 ^c	13,1 ± 0,2 ^d	52,5 ± 0,3 ^e

Tablo 4.6: Farklı Kimyasallar ile tek adımlı İn situ transesterifikasyonu uygulanan *Scenedesmus obliquus* türünün yağ asidi kompozisyonu (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b, c, ab, bc: Tek adımlı in situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Yağ Asidi Kompozisyonu	Tek adımlı İn situ Transesterifikasyon		
	IS1	IS2	IS3
c14:0 (Myristic acid)	0 ± 0^a	$3,5 \pm 0,1^b$	$3,7 \pm 0^c$
c15:0 (Pentadecanoic acid)	0 ± 0^a	$2,9 \pm 0,1^b$	$3,5 \pm 0^c$
c15:1 (Ginkgolic acid)	0 ± 0^a	$5,3 \pm 0,1^b$	$5,6 \pm 0,1^c$
c16:0 (Palmitic acid)	$13,2 \pm 0^a$	$51,3 \pm 1,5^{bc}$	$50,8 \pm 0,4^c$
c16:1 (Palmetoleic acid)	$0,6 \pm 0,6^a$	$4,2 \pm 0,9^{bc}$	$4,5 \pm 0,2^c$
C16:2 (Palmitolinolenic acid)	$3,4 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,1^{bc}$	$0,9 \pm 0,2^c$
C17:0 (Margaric acid)	$2,7 \pm 0,2^{ab}$	$1,2 \pm 0^b$	$2,6 \pm 0,1^a$
C17:1 (heptadecenoic acid)	0 ± 0^a	$1,4 \pm 1^a$	0 ± 0^a
C18:0 (Stearic acid)	$4,4 \pm 0,2^a$	$3,8 \pm 0,3^a$	$3,7 \pm 0,3^a$
C18:1 cis (Oleic acid)	0 ± 0^a	$12 \pm 0,2^{bc}$	$12,7 \pm 0,3^c$
C18:1 trans (Elaidic acid)	0 ± 0^a	$0,6 \pm 0,5^a$	0 ± 0^a
C18:2 cis (linoleic acid)	0 ± 0^a	$3,6 \pm 0,1^{bc}$	$3,7 \pm 0^c$
C18:3n3 (α -linoleic)	0 ± 0^a	$7,1 \pm 0,1^{bc}$	$7,2 \pm 0,1^c$
C18:3n6 (γ -Linoleic acid)	$75,8 \pm 0,4^a$	$0,4 \pm 0,6^{bc}$	0 ± 0^c
C21:0 (Heneicosanoic acid)	0 ± 0^a	$1,4 \pm 0^{bc}$	$1,4 \pm 0^c$
SFA	$20,3 \pm 0,3^a$	$64,1 \pm 1,7^{bc}$	$65,7 \pm 0,6^c$
MUFA	$0,6 \pm 0,6^a$	$23,6 \pm 1,2^{bc}$	$22,8 \pm 0,2^c$
PUFA	$79,1 \pm 0,3^a$	$12,3 \pm 0,5^{bc}$	$11,9 \pm 0,1^c$

Tablo 4.7: Farklı Kimyasallar ile iki adımlı İn situ transesterifikasyonu uygulanan *Scenedesmus obliquus* türünün yağ asidi kompozisyonu (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b, c, bd, cd, iki adımlı in situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Yağ Asidi Kompozisyonu	İki adımlı İn situ Transesterifikasyon				
	IS4	IS5	IS6	IS7	IS8
c14:0 (Myristic acid)	7,3 ± 0,4 ^a	3,2 ± 0,1 ^b	7,1 ± 0,6 ^a	3,5 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,1 ^b
c15:0 (Pentadecanoic acid)	1,7 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,1 ^{bc}	2,7 ± 0,3 ^c	4,5 ± 0,4 ^d	3,4 ± 0,2 ^b
c15:1 (Ginkgolic acid)	10,9 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0,1 ^{bc}	11,6 ± 0,8 ^a	7,2 ± 0,4 ^b	5,3 ± 0,3 ^c
c16:0 (Palmitic acid)	45,2 ± 0,8 ^a	53,7 ± 1,3 ^{bd}	48,3 ± 1 ^c	50,1 ± 0,5 ^c	51,3 ± 0,7 ^d
c16:1 (Palmetoleic acid)	3,5 ± 0,8 ^a	4,7 ± 0,2 ^a	3,1 ± 0,8 ^a	0 ± 0 ^b	3,7 ± 0,8 ^a
C16:2 (Palmitolinolenic acid)	1 ± 0,1 ^a	1 ± 0,1 ^a	1 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,1 ^a
C17:0 (Margaric acid)	0 ± 0 ^a	0,8 ± 0 ^b	0 ± 0 ^a	2,4 ± 0 ^{cd}	2,3 ± 0,1 ^d
C17:1 (heptadecenoic acid)	1,1 ± 0,8 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
C18:0 (Stearic acid)	3 ± 0 ^a	3,6 ± 0,1 ^b	3,1 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^b	5,3 ± 0,1 ^c
C18:1 cis (Oleic acid)	12,3 ± 0,2 ^a	12 ± 0,6 ^a	12 ± 0,2 ^a	14,6 ± 0,7 ^b	12,7 ± 0,8 ^a
C18:1 trans (Elaidic acid)	0,8 ± 0 ^a	0,9 ± 0 ^a	0,5 ± 0,4 ^a	0,5 ± 0,5 ^a	0,8 ± 0 ^a
C18:2 cis (linoleic acid)	3,6 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	4 ± 0 ^b	3,4 ± 0,1 ^a
C18:3n3 (α -linoleic)	7 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0 ^b	6,3 ± 0,3 ^b	7,2 ± 0,3 ^a	6,1 ± 0,1 ^b
C18:3n6 (γ -Linoleic acid)	2,4 ± 0,5 ^a	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b
C21:0 (Heneicosanoic acid)	0,8 ± 0 ^a	1,2 ± 0 ^b	1 ± 0 ^c	1,3 ± 0 ^b	1,2 ± 0 ^b
SFA	58,1 ± 1 ^a	65,8 ± 1,1 ^b	62,3 ± 1,4 ^c	65,5 ± 0,1 ^b	66,9 ± 0,5 ^b
MUFA	28,7 ± 0,6 ^a	23,8 ± 0,9 ^b	27,2 ± 1,2 ^a	22,2 ± 0,1 ^b	22,5 ± 0,5 ^b
PUFA	14 ± 0,7 ^a	10,4 ± 0,2 ^b	10,5 ± 0,4 ^b	12,3 ± 0 ^c	10,6 ± 0,2 ^b

4.3.2 Farklı Transesterifikasyon Metotlarının Biyodizel Kalitesi Üzerine Etkisi

Transesterifikasyon yöntemlerinin geleneksel yöntemler ve tek ve iki aşamalı in situ transesterifikasyon yöntemlerinin biyodizel kalite parametreleri üzerindeki değişimi Tablo 4.8, 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.

Buna göre, setan sayısı (CN) geleneksel transesterifikasyon yöntemleri arasında anlamlı farklılık gösterdi (ANOVA, $P<0,05$). Setan sayısının (CN) uygulanan yöntemlere göre 36,4 ile 74,6 arasında değişiklik gözlemlendi. En düşük setan sayısı NaOH ile transesterifiye edilen tek adımlı in situ transesterifikasyon yöntemi uygulanan IS1’de tespit edilirken en yüksek değer geleneksel metotlardan G3 metodunda bulundu. Gerçekleştirilen istatistiksel analizlere göre CN değeri geleneksel metotlar arasında kullanılan kimyasallara göre farklılık gösterirken (ANOVA, $P<0,05$) iki adımlı in situ transesterifikasyonunda fark tespit edilmedi. Bununla birlikte tek adımlı in situ transesterifikasyonunda ise IS1 mtodu IS2 ve IS3 metodundan farklı bulundu (ANOVA, $P<0,05$).

İyot sayısı yöntemler arasında 35,2 g I₂ ile 185,3 g I₂ arasında farklılık gösterirken en yüksek ve en düşük değerler setan sayısına benzer şekilde sırasıyla değere IS1 ve G3 yöntemlerinde tespit edildi. Bununla birlikte hem geleneksel hem de iki adımlı in situ transesterifikasyon yöntemleri arasında IV değerleri açısından anlamlı fark bulunmazken, tek adımlı in situ transesterifikasyon yönteminden IS1 yönteminde anlamlı fark tespit edildi (ANOVA, $P<0,05$).

Sabunlaşma sayısı (SV) 150,8 ile 208 arasında değişiklik gösterirken en yüksek değere H₂SO₄ ile gerçekleştirilen tek adımlı in situ transesterifikasyonunda en düşük değer ise yine geleneksel yöntemlerden G3 yönteminde bulunmuştur. Bununla birlikte tek ve iki adımlı in situ yöntemleri arasında IV değerleri açısından anlamlı fark tespit edilmezken, geleneksel yöntemlerin her birinde anlamlı fark tespit edildi.

Doymamışlık derecesi (DU) 42,5 ile 158,8 arasında değişiklik gösterirken en düşük doymamışlık değeri geleneksel metotlardan G1, en yüksek doymamışlık ise IS1 yönteminde tespit edilmiştir. LCSF ve CFPP değerleri ise birbirine paralel olarak en düşük değerler IS1, en yüksek değerler ise G4 yöntemlerinde bulundu. İki adımlı in situ deneylerinde Doymamışlık derecesi Geleneksel ve tek ve adımlı in situ deneyleri arasında kullanılan kimyasallara göre farklılık gösterdi.

Tablo 4.8: Farklı Kimyasallar ile geleneksel transesterifikasyon metotları uygulanan Scenedesmus obliquus türünün biyodizel kalite özellikleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, d, e: Geleneksel transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Parametreleri	Geleneksel				
	Transesterifikasyon Yöntemleri				
	G1	G2	G3	G4	G5
IV	$38,6 \pm 2,1^a$	$35,4 \pm 1,3^a$	$35,2 \pm 0,3^a$	$38,4 \pm 0,4^a$	$162,2 \pm 19,3^b$
SV	$182,5 \pm 2,2^a$	$161,6 \pm 0,5^b$	$150,8 \pm 1^c$	$171,4 \pm 0,9^d$	$153,8 \pm 2,8^c$
CN	$67,5 \pm 0,3^a$	$72,1 \pm 0,2^b$	$74,6 \pm 0,2^c$	$69,5 \pm 0,1^d$	$45,3 \pm 5^e$
DU	$42,5 \pm 3,5^a$	$56,4 \pm 1,6^b$	$61,3 \pm 0,6^b$	$48,1 \pm 0^a$	$106,1 \pm 2,5^c$
LCSF	$9,9 \pm 0,8^a$	$9,8 \pm 0,2^a$	$9,1 \pm 0,2^a$	$10,2 \pm 0,2^a$	$9,4 \pm 1,3^a$
CFPP	$14,6 \pm 2,5^a$	$14,4 \pm 0,5^a$	$12,3 \pm 0,7^a$	$15,7 \pm 0,6^a$	$12,9 \pm 4,1^a$

Tablo 4.9: Farklı Kimyasallar ile tek adımlı in situ transesterifikasyon metotları uygulanan Scenedesmus obliquus türünün biyodizel kalite özellikleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, bc: tek adımlı in-situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

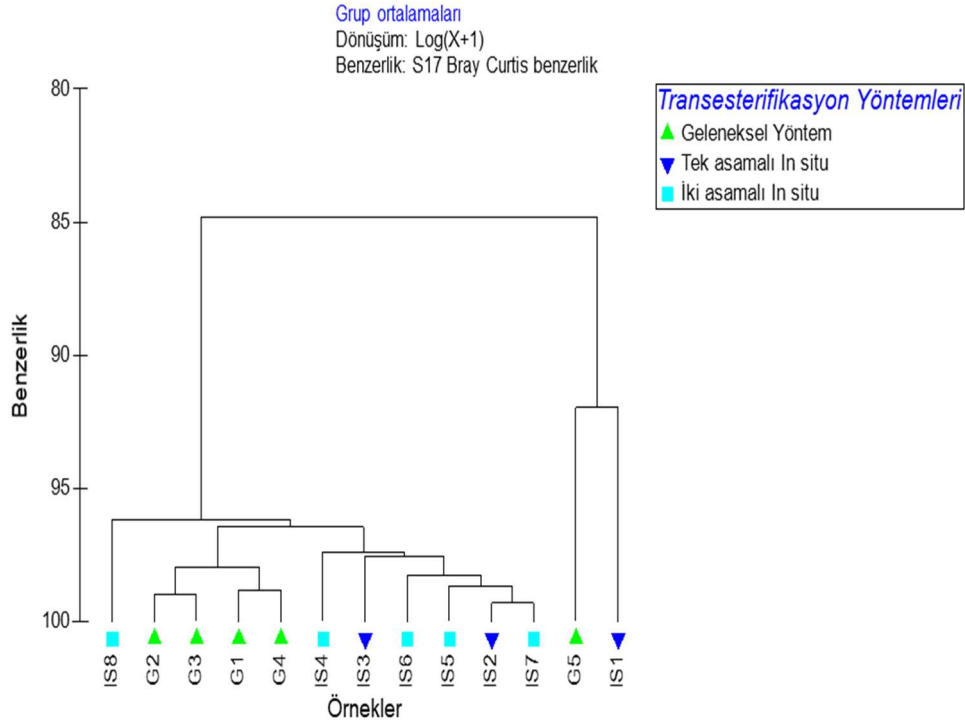
Parametreleri	Tek adımlı		
	İn situ Transesterifikasyon		
	IS1	IS2	IS3
IV	$185,3 \pm 0,4^a$	$42 \pm 2,4^{bc}$	$64,6 \pm 33,7^c$
SV	$171,4 \pm 0,2^a$	$183,5 \pm 0,1^a$	208 ± 35^a
CN	$36,4 \pm 0^a$	$66,6 \pm 0,5^{bc}$	$58,7 \pm 11,6^c$
DU	$158,8 \pm 0^a$	$48,2 \pm 2,2^{bc}$	$66,2 \pm 28^c$
LCSF	$3,5 \pm 0,1^a$	$7 \pm 0,3^{bc}$	$6,9 \pm 0,2^c$
CFPP	$-5,4 \pm 0,2^a$	$5,6 \pm 0,9^{bc}$	$5,3 \pm 0,5^c$

Tablo 4.10: Farklı Kimyasallar ile iki adımlı in situ transesterifikasyon metotları uygulanan *Scenedesmus obliquus* türünün biyodizel kalite özellikleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b, c, d,e : iki adımlı in-situ transesterifikasyon yöntemleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Biyodizel Kalite Parametreleri	İki adımlı				
	İn situ Transesterifikasyon				
	IS4	IS5	IS6	IS7	IS8
IV	$46,2 \pm 2^a$	$37,6 \pm 0,9^a$	$35,9 \pm 1,5^a$	$38,6 \pm 0,5^a$	$37,5 \pm 0,4^a$
SV	$178,6 \pm 2,7^a$	$182,8 \pm 0,9^a$	$174,4 \pm 2,2^a$	$176,3 \pm 0,7^a$	$180,3 \pm 0,9^a$
CN	$66,5 \pm 0,9^a$	$67,7 \pm 0^a$	$69,5 \pm 0,5^a$	$68,6 \pm 0^a$	$68,1 \pm 0,1^a$
DU	$56,7 \pm 1,5^a$	$44,6 \pm 1,3^b$	$48,2 \pm 1,6^b$	$46,8 \pm 0,1^b$	$44 \pm 0,5^b$
LCSF	$6 \pm 0,1^a$	$7,2 \pm 0,1^b$	$6,4 \pm 0,2^c$	$6,8 \pm 0,1^d$	$7,8 \pm 0,1^e$
CFPP	$2,5 \pm 0,2^a$	$6,1 \pm 0,3^b$	$3,6 \pm 0,5^c$	$5 \pm 0,4^d$	$7,9 \pm 0,4^e$

Bray Curtis benzerlik analizi ile gerçekleştirilen Yağ asidi kompozisyonu (SFA, MUFA, PUFA), FAME verimi ve Biyodizel Kalite Parametrelerinin (IV, SV, CN, DU, LCSF, CFPP) küme analizi benzerliği Şekil 4.5’de gösterilmiştir.

Kullanılan metotlarda elde edilen veriler 2 grup altında kümelendi. Buna göre birinci grupta, NaOH katalizörünün tek aşamalı transesterifikasyonu ile gerçekleşen G5 ve IS1 metodunda yer alırken, diğer metotlar ikinci grupta yer aldı. Bununla birlikte BF_3 kimyasalının kullanıldığı iki aşamalı in situ transesterifikasyon yöntemi olan IS8 ikinci grup altında diğer yöntemlerden ayrılırken, geleneksel ve in situ transesterifikasyon yöntemlerinin de kendi içlerinde gruplandığı tespit edildi.



Şekil 4.5: Yağ asidi kompozisyonu (SFA, MUFA, PUFA), FAME verimi ve Biyodizel Kalite Parametrelerinin (IV, SV, CN, DU, LCSF, CFPP) küme analiz benzerliği

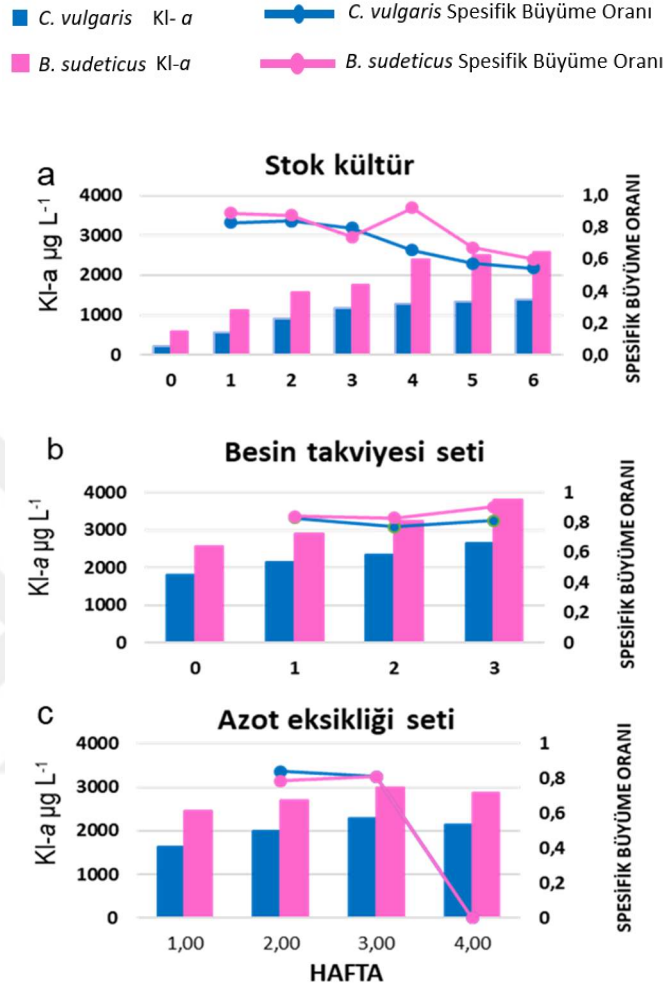
4.4 AZOT MANİPÜLASYON DENEYLERİ

4.4.1 Kültürlerin Büyümlerinin İzlenmesi

Kültürlere azot eksikliği uygulanmadan önce yüksek biyokütle üretimi elde etmek için yeterli azot konsantrasyonuna sahip BG-11 besiyerinde yetiştirilen stok kültürlerin büyüme eğrileri Şekil 4.6a'da gösterilmiştir. Buna göre, haftalık kl-a analizi ile belirlenen spesifik büyüme oranları, kültürlerin 6. haftanın sonunda durağan faza geçtiğini gösterdi. Deneyin ilk aşamasında kl- a değerlerinin haftalık değişimi *B. sudeticus* için 599 ila 2575 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve *C. vulgaris* için 222 ila 1377 $\mu\text{g L}^{-1}$ aralığında tespit edildi (Şekil 4.6b).

Deneyin ikinci aşamasında besin takviyesi setinde azot eksikliği setine göre daha yüksek kl-a değerleri gözlemlendi. Besin takviyesi setindeki kl-a değerleri *B. sudeticus*'ta 2553 ila 3796 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve *C. vulgaris*'te 1798 ila 2642 $\mu\text{g L}^{-1}$ arasında değişiklik gösterdi. Azot eksikliği setinde ise kl-a değerleri *B. sudeticus*'ta 2464 ile 2997 $\mu\text{g L}^{-1}$, *C. vulgaris*'te ise 1643 ile 2285 $\mu\text{g L}^{-1}$

arasında tespit edildi. Azot eksikliği setinde 2. haftadan sonra büyüme hızlarında azalma eğilimi görüldü ve hücre ölümü başladı



Şekil 4.6: Azot manipülasyon deneylerinde *Botryococcus sudeticus* ve *Chlorella vulgaris* türlerinin kl-a değerleri ve spesifik büyüme oranları (a) stok kültür, (b) besin takviyesi seti (c) azot eksikliği seti

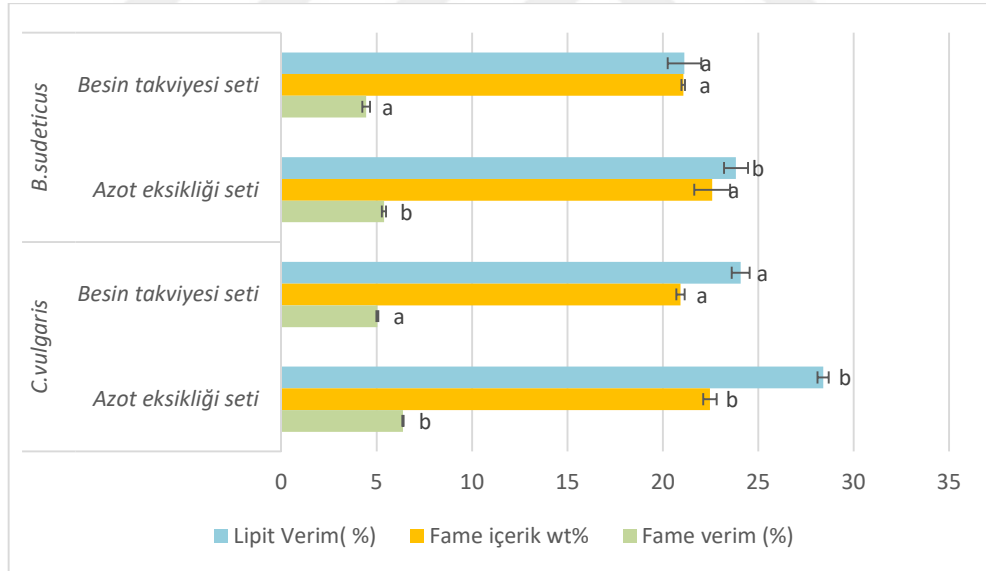
4.4.2 Azot Manipülasyon Deneylerinin Lipit, FAME İçerik ve FAME Verim Yüzdeleri

Azot eksikliği ve besin takviyesi setinde ölçülen lipit verim, FAME içerik miktarı ve FAME verim yüzdeleri Şekil 4.7’de gösterildi. FAME Azot eksikliği ile besin takviyesi seti arasında lipit verim açısından anlamlı bir fark tespit edildi (ANOVA $p < 0.05$). Her iki kültürde de en yüksek lipit verimi azot eksikliği setinde elde edildi. *C. vulgaris*’ın toplam lipit içeriği, besin takviyesi seti ile karşılaştırıldığında azot eksikliği setinde %24,1’den %28,4’e yükseldiği tespit gözlemlendi. Öte yandan her iki grupta da *B. sudeticus*, *Chlorella vulgaris*’e kıyasla daha düşük

toplam lipit içeriği sergiledi. Azot eksikliği setinde toplam lipit içeriği, besin takviyesi setine kıyasla %21,1'den %23,8'e yükseldi.

Toplam FAME içeriği (ağırlıkça %) besin takviyesi ve azot eksikliği setinde sırasıyla *C. vulgaris* türünde %20,9 ila %22,6 aralığında bulunurken *B. sudeticus*'ta 21,1 ila 22,5 aralığında tespit edildi (Şekil 4.7). *Chlorella vulgaris*'in toplam FAME içeriği (ağırlıkça %) besin takviyesi seti ile karşılaştırıldığında azot eksikliği setinde önemli ölçüde daha yüksekti (ANOVA $P < 0.05$). Öte yandan *B. sudeticus* türünde FAME içeriği açısından setler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (ANOVA $P > 0.05$).

Toplam FAME verimi yüzdesi, besin takviyesi ve azot eksikliği setlerinde sırasıyla *B. sudeticus*'ta 4,45 - 5,4 ve *C. vulgaris*'te 5,0 - 6,4 aralığında değişiklik gösterdi. Azot eksikliği her iki tür için de FAME veriminde artışa neden oldu. Spesifik olarak, *B. sudeticus*'ta azot eksikliği FAME veriminde %21'lik bir artışla sonuçlanırken, *C. vulgaris*'te verim, besin takviyesi setle karşılaştırıldığında azot eksikliği koşullarında %28 daha yüksek bulundu.



Şekil 4.7: Azot manipülasyon deneylerinde *Botryococcus sudeticus* ve *Chlorella vulgaris* türlerinin lipit verimi %, ağırlıkça FAME içerik yüzdesi ve FAME verimi. (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b: Setler arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

4.4.3 Azot Manipölasyon Deneylerinin *Botryococcus sudeticus* ve *Chlorella vulgaris* Türlerinin Yağ Asidi Kompozisyonu Üzerine Etkisi

Chlorella vulgaris ve *B. sudeticus*'un yağ asidi profili Tablo 14'de gösterilmiştir. C16:0 (palmitik asit), C18:0 (Stearik asit), C18:1cis (oleik asit) ve C18:3n6 (linolenik asit) her iki türdeki ana yağ asitleriydi. Bununla birlikte FAME bileşiminin yüzdesinin gruplar arasında değişiklik gösterdiği tespit edildi.

Azot eksikliği seti besin takviyesi seti ile karşılaştırıldığında, C16:0 (palmitik asit), C18:0 (Stearik asit), C18:1trans (Elaidik asit), C18:1cis (oleik asit), C18:2cis (linoleik asit), C18:2trans (linolelaidik asit), γ - C18:3n6 (linolenik asit) her iki türde de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu (Anova $p < 0.05$).

C16-C18 FAME zincir uzunluğu, *B. sudeticus*'ta 87,5 - 93,7, *C. vulgaris* türünde ise 90,2 - 91,9 arasında değişiklik gösterdi (Tablo 4.11). Toplam C16-C18 FAME aralığı her iki türde azot eksikliği deneyinde daha yüksek tespit edildi.

Toplam Doymuş Yağ oranları verilerine göre *B. sudeticus* türünde azot eksikliği seti ile besin takviyesi seti arasında anlamlı farklılık tespit edildi (ANOVA, $P < 0,05$). *B. sudeticus* türünün Toplam Doymuş Yağ oranı azot eksikliği setinde (%45) besin takviyesi setine (%57,4) kıyasla daha düşük tespit edildi. Bununla birlikte *C. vulgaris* türünde setler arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (ANOVA, $P > 0,05$).

Toplam Tekli Doymamış yağ oranları açısından değerlendirildiğinde *Botryococcus sudeticus* türünde setler arasında anlamlı fark tespit edilmezken (ANOVA, $P > 0,05$), *C. vulgaris*'de azot eksikliği setinde (%35,8) (besin takviyesi setine (%29,3) göre daha yüksek tekli doymamış yağ oranları görüldü.

Çoklu Doymamış Yağ oranlarında ise hem türler hem de setler arasından anlamlı fark tespit edilmiştir (ANOVA, $P < 0,05$). *B. sudeticus* türünde azot eksikliği seti çoklu doymamış yağ asidi oranını besin takviyesi setine göre arttırırken, *C. vulgaris* türünde azalmasına neden olmuştur. *Botryococcus sudeticus* türünde Çoklu Doymamış Yağ Asidi oranı setler arasında %20,0 - %32,2 aralığında tespit edilirken *C. vulgaris* türünde %16,8 - %23,6 aralığında değişiklik gösterdi.

Tablo 4.11: Besin takviyesi ve Azot eksikliği setlerinde *Botryococcus sudeticus* ve *Chlorella vulgaris*'in yağ asidi profilleri (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p < 0.05$; a, b, c, d, e, f, g: Sütunlar arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

FAME kompozisyonu	<i>B.sudeticus</i>		<i>C.vulgaris</i>	
	Besin takviyesi seti	Azot eksikliği seti	Besin takviyesi seti	Azot eksikliği seti
c14:0 (Myristic acid)	0.6 ± 0^a	0.5 ± 0.2^a	1.2 ± 0.1^a	1 ± 0.1^b
c16:0 (Palmitic acid)	41.1 ± 0.5^a	34.9 ± 1.9^b	36.3 ± 0.6^a	37.8 ± 1.2^a
c16:1 (Palmetoleic acid)	3 ± 0.1^a	2.2 ± 0.2^b	1.9 ± 0.2^a	1.7 ± 0^a
C17:0 (Margaric acid)	0.7 ± 0.5^a	0.2 ± 0.1^a	0.1 ± 0.1^a	0.3 ± 0^a
C17:1 (heptadecenoic acid)	1.0 ± 0.3^a	0.7 ± 0.1^a	1.6 ± 0.1^{bc}	1.5 ± 0.1^c
C18:0 (Stearic acid)	11.3 ± 0.3^a	9.7 ± 1.1^a	9.2 ± 1.1^a	8.3 ± 0.3^a
C18:1 trans (Elaidic acid)	0.8 ± 0^a	0.4 ± 0^b	2.2 ± 0.1^b	5.6 ± 0.2^c
C18:1 cis (Oleic acid)	11.5 ± 0.3^a	16.5 ± 1.7^b	15.3 ± 0.6^a	20.0 ± 0.2^b
C18:2 cis (linoleic acid)	3 ± 0^a	2.1 ± 0.2^b	4.8 ± 0.2^b	5.1 ± 0.1^{ab}
c20:0 (Arachidic acid)	0 ± 0^b	0 ± 0^b	0.2 ± 0^{bc}	0.1 ± 0.1^c
C18:3n6 (γ -Linoleic acid)	14.3 ± 0.6^b	26.7 ± 2.8^a	17.8 ± 0.7^a	11.5 ± 1^b
c20:1 (Eicosenoic acid)	6.2 ± 0.2^a	3 ± 1^b	8.4 ± 0.2^b	7.0 ± 0.2^c
C18:3n3 (α -linoleic)	1 ± 0^b	0.4 ± 0^c	1.0 ± 0.1^b	0.2 ± 0^c
C21:0 (Heneicosanoic acid)	2.7 ± 0.1^a	1.2 ± 0.3^b	0 ± 0^a	0 ± 0^a
c22:0 (Behenic acid)	1.1 ± 0.1^a	0.5 ± 0^b	0 ± 0^a	0 ± 0^a
c20:4n6 (Arachidonic acid)	0.7 ± 0.5^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a	0 ± 0^a
c22:2n6 (Docosadienoic acid)	0.9 ± 0.1^b	0.9 ± 0^b	0 ± 0^a	0 ± 0^a
C16-C18	87.5 ± 0.2^a	93.7 ± 2.2^b	90.2 ± 0.3^a	91.9 ± 0.2^b
SFA	57.5 ± 0.7^a	45.0 ± 3.1^b	47.1 ± 1.6^a	47.4 ± 1.2^a
MUFA	22.5 ± 0.2^a	22.8 ± 2.5^a	29.3 ± 0.8^a	35.8 ± 0.1^c
PUFA	20 ± 0.5^b	32.2 ± 2.6^c	23.6 ± 1^a	16.8 ± 1.1^b
FAME İçerik (wt%)	21.1 ± 0.1^a	22.6 ± 0.9^a	20.9 ± 0.2^a	22.5 ± 0.3^b

4.4.4 Azot Manipölasyon Deneylerinde *Botryococcus sudeticus* ve *Chlorella vulgaris* Türlerinin Yağ Asidi Kompozisyonu ve Biyodizel Özellikleri

B. sudeticus ve *C. vulgaris* türlerinin azot eksikliği koşullarında biyodizel özelliklerine dair gösterdiği değişimler Tablo 4.12'de gösterildi. Buna göre her iki türün CN değerleri 51'in üzerinde bulundu. *C. vulgaris* (57,5-58,5) setler arasında önemli bir değişim göstermezken (ANOVA $p>0,05$), *B. sudeticus* (55,6-61,9) için setler arasında anlamlı farklılık tespit edildi (ANOVA $p<0,05$).

SV değerleri setler arasında *B. sudeticus*'ta 179,3-182,5 mg KOH/g yağ *C. vulgaris* türünde ise 183,4-185,0 mg KOH/g yağ aralığında tespit edildi. Sonuçlar azot eksikliğinin her iki türün SV değerleri üzerinde anlamlı bir fark göstermedi (ANOVA $p>0,05$).

Maksimum IV, her iki kültür için de azot eksikliği setinde tespit edilirken, *B. sudeticus* türünde 91,7 g I₂ 100 g⁻¹ ve *C. vulgaris* türünde ise 81,2 g I₂ 100 g⁻¹ değerleri tespit edildi.

DU değerleri *B. sudeticus* 'da 62,6 ile 87,2, *C. vulgaris* 'de ise 63,7 ile 74,6 aralığında değişiklik gösterdi. Her iki türün DU değerleri setler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (ANOVA $p<0,05$). *B. sudeticus* türünde azot eksikliği seti DU değerlerinde artışa neden olurken, *C. vulgaris* 'de azalma görüldü.

CFPP ve LCSF değerlerinin Bu çalışmada azot eksikliği seti altında hem *B. sudeticus* hem de *C. vulgaris* kültürlerinde daha düşük CFPP ve LCSF değerleri gözlemlendi.

Botryococcus sudeticus için LCSF değerleri %9,2 ile %11,5 arasında, *C. vulgaris* için ise %7,9 ile %8,4 arasında değişiklik gösterirken, CFPP değerleri ise *B. sudeticus* için 12,4°C ile 19,7°C ve *C. vulgaris* için ise 8,3°C ile 10,0°C arasında tespit edildi (Tablo 4.12). İstatistiksel olarak *C. vulgaris* türünde LCSF ve CFPP değerlerinde setler arasında anlamlı bulunmazken, *B. sudeticus* türünde azot eksikliği her iki değerinde düşmesine neden oldu.

Tablo 4.12: *B. sudeticus* ve *C. vulgaris* türlerinin Azot eksikliği ve Besin Takviyesi setlerine göre Biyodizel özellikleri ve EN14214 ve D6751 standardı ile karşılaştırılması (Veriler ort+stdsapma değerleridir; ANOVA $p<0.05$; a, b: Setler arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğunu gösterir)

Türler	Deney Setleri	CN	IV (I ₂ g/100 g oil)	DU (wt%)	SV (mg KOH/g yağ)	LCSF (°C)	CFPP (°C)
<i>B.sudeticus</i>	Azot eksikliği	58 ± 0.2 ^a	81.4 ± 0.3 ^a	74 ± 0.6 ^a	181.6 ± 0.8 ^a	10.2 ± 0.3 ^a	15.4 ± 1.1 ^a
	Besin takviyesi	61.5 ± 0.2 ^b	67.3 ± 1.3 ^b	62.5 ± 1.2 ^b	179.7 ± 0.9 ^a	11.5 ± 0.1 ^b	19.6 ± 0.4 ^b
<i>C.vulgaris</i>	Azot eksikliği	58.5 ± 0.1 ^a	76.2 ± 0.3 ^a	73.5 ± 0.3 ^a	185.8 ± 0.2 ^a	8 ± 0 ^a	8.8 ± 0.1 ^a
	Besin takviyesi	58.5 ± 0.9 ^a	78.1 ± 2.6 ^a	76.5 ± 2.4 ^a	183.4 ± 2 ^a	8.4 ± 0.6 ^a	10 ± 1.9 ^a
EN 14214 (Nayak ve Ghosh, 2019)		≥51	≤120	-	-	-	-
ASTM D6751 (Nayak and Ghosh, 2019)		≥47	-	-	-	-	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. LİPİT EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mikroalgler, biyoyakıt üretimi, gıda takviyeleri ve ilaç endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılan değerli biyoaktif bileşenlerin kaynağıdır (Fu ve diğ., 2017). Bu bileşenlerden biri olan lipitler, mikroalg hücrelerinde yüksek oranlarda bulunur ve biyoyakıt üretiminde kullanılan biyodizel gibi ürünlerin ana hammaddesini oluşturur (Bibi ve diğ., 2022). Mikroalglerden lipitlerin verimli bir şekilde elde edilmesi, üretim maliyetlerini düşürmek ve süreci verimli hale getirmek için kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte yüksek miktarlarda lipit eldesi sırasında oluşabilecek toksisiteyi en aza indirmek de süreç optimizasyonunda oldukça önemlidir (Tsukahara ve Sawayama, 2005; Islam ve diğ., 2013; Bibi ve diğ., 2022). Bu amaçla bu çalışma kapsamında mikroalglerden lipit eldesinde yaygın olarak kullanılan Bligh-Dyer (1959) ekstraksiyonuna alternatif bir yaklaşım olarak hekzan bazlı lipit ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

Lipit ekstraksiyonu sırasında lipit içeriğinin polaritesi ve/veya çözünürlüğüne bağlı olarak ekstraksiyon verimi değişiklik göstermektedir. Bu nedenle lipit verimliliğini artırmak için uygun ve yeterli miktarda çözücü kullanımı oldukça önemlidir (Zarrinmehr, ve diğ., 2022). Polar çözücüler (örn, metanol) polar lipitleri (örn; fosfolipitler, glikolipitler, steroller, karotenoidler) ve polar olmayan çözücüler (hekzan, kloroform) polar olmayan (örn, TAG'ler) lipitleri çözebilmektedir. Mikroalgal lipitlerin büyük bir kısmı biyodizel için önemli polar olmayan lipitlerden (esas olarak TAG'ler) oluşmakla birlikte polar lipitleri de içermektedir (Salam ve diğerleri, 2016). Bununla birlikte bazı polar olmayan lipitler (nötr lipitler yani TAG'ler), sitoplazmada polar lipitlerle kompleks halinde bulunur. Bu kompleks yapı hidrojen bağları yoluyla hücre zarındaki proteinlere güçlü bir şekilde bağlanır. Polar olmayan organik

çözücüler ve nötr lipidler arasında oluşan van der Waals etkileşimleri, bu membran bazlı lipid-protein ilişkilerini bozmak için yetersizdir, bu da metanol veya etanol gibi polar bir organik çözücünün kullanılmasını gerekli kılar (Salam ve diğerleri, 2016). Sonuç olarak, metanol, hücre zarlarının parçalanmasına ve hücre içi içeriğin serbest bırakılmasına yardımcı olarak lipidlerin kloroform ile ekstraksiyonu için daha erişilebilir olmasını sağlar. Bu nedenle bu çalışma kapsamında hekzan ve kloroform gibi polar olmayan çözücülerin yanında metanol gibi polar bir çözücü kullanıldı.

Yapılan çalışmalarda (Ryckebosch ve diğ. 2012; Zarrinmehr, ve diğ., 2022) ekstraksiyon aşamasında metanol, kloroform ve hekzan gibi çözücülerin hem tekli hem de karışımlarının kullanıldığı ekstraksiyonlar karşılaştırılmış ve en yüksek verimin kloroform: metanol karışımı ile elde edildiği rapor edilmiştir. Chen ve diğ., (2015), tarafından polar ve polar olmayan çözücü karışımının hem polar hem de polar olmayan lipidleri çıkarabildiğini ve bunun da toplam ekstrakte edilen lipid miktarını arttırdığı belirtilmiştir. Hekzan bazlı ekstraksiyonlar ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da kloroform ile ekstraksiyona göre hekzan kullanımının daha düşük lipid ve FAME verimi elde edildiği belirtilmiştir (Li ve diğ., 2014; Chen ve diğ., 2015). Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da *B. sudeticus* ve *S. obliquus* türlerinde lipid ekstraksiyon verimleri incelendiğinde, hekzan bazlı lipid ekstraksiyon veriminin her iki türde de oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Hekzan bazlı lipid ekstraksiyonunun, Bligh Dyer yöntemine kıyasla *B. sudeticus*'ta %23, *S. obliquus*'ta ise %18 oranında düşük lipid verimine yol açtığı tespit edilmiştir. Bu oran, FAME miktarına da yansımış; *B. sudeticus*'ta %45, *S. obliquus*' ta ise %23 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, kloroform:metanol karışımlarında polar lipidleri metanol ile ekstrakte ederken, sitoplazmada polar lipidlerle kompleks halinde bulunan nötr lipidlerin de parçalanarak FAME üretimini teşvik etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Bununla birlikte, sonuçlar *B. sudeticus* türünde hekzan bazlı ekstraksiyon verimi *S. obliquus* a göre çok daha fazla düşmesine neden oldu. *Botryococcus sudeticus* türü özellikle kalın hücre duvarına sahip koloni oluşturan bir türdür (Concha ve diğ., 2018). Bu nedenle bu türün sahip olduğu nötral lipidlerin hücre duvarından geçebilmesi için hücre duvarının parçalanmasında daha fazla polar çözücüye ihtiyacı olabilir. Bu çalışmada ise kloroform:metanol oranı 1:2 iken, hekzan:metanol oranı 1:1 şeklinde kullanılmıştır yani Bligh Dyer yönteminde daha fazla polar çözücü(metanol) kullanımı gerçekleştirildi. Bu durum *B. sudeticus* gibi daha kalın hücre zarına sahip türlerde metanol oranının daha yüksek kullanılması gerektiğini düşündürdü.

Ekstraksiyon sırasında kullanılan çözücülerin, mikroalglerden elde edilen yağ asidi profili ve buna bağlı olarak da biyodizel kalitesi üzerindeki etkileri de türlere göre farklılık gösterebilmektedir (Li ve diğ., 2014). Bu kapsamda gerçekleştirilen bu çalışmada da her iki türün yağ asidi kompozisyon dağılımında farklılık tespit edildi.

Biyodizel kalite parametreleri üzerinde önemli etkiye sahip olan C16:0 yağ asidi oranı, dolayısıyla da SFA oranı *S. obliquus* türünde hekzan ile ekstraksiyon yönteminde daha yüksek tespit edilmiştir. SFA oranı en önemli biyodizel kalite parametrelerinden biri olan CN değerinin artmasını sağlamaktadır. CN değeri ise ateşleme gecikme süresini ve yanma kalitesini yansıtır. CN ne kadar yüksek olursa, ateşleme o kadar iyi olur (Meher ve diğ., 2006). Sonuç olarak daha uzun yağ asidi zinciri ve daha fazla doymuş bağ, daha yüksek CN'ye yol açtığından hekzan kullanımının bu türden elde edilen biyodizelin ateşleme süresi üzerinde olumlu etkiye neden olduğu tespit edilmiştir.

Avrupa Standartlarına (EN14214) göre biyodizelin belirtilen %12 linolenik asit metil ester (C18:3n6) limitlerine sahip olması gerekmektedir. Daha yüksek miktarlarda C18:3n6'un varlığı, oksidasyon nedeniyle biyodizelin daha düşük stabilitesine yol açtığı için tercih edilmez

(Ashokkumar ve diğ., 2012). Bu çalışmada da Bligh Dyer ekstraksiyonunda her iki türde bu sınırın üstünde (%17-%18) bir oran tespit edilse de *Scenedesmus obliquus* türünde Hekzan bazlı lipit ekstraksiyonu C18:3n6 oranını Bligh Dyer yöntemine göre %18,1 oranından %13 oranına düşürürerek olumlu bir etki yaratmıştır. Salam ve diğ., (2016) ekstraksiyon sırasında polar çözücü miktarlarını artmasının mikroalglerdeki MUFA VE PUFA içeriğinde artışa neden olabileceğini belirtmişlerdir. Hücre duvarının ana yapısal lipitleri olarak iyi bilinen fosfolipitler ve glikolipitler gibi polar lipitlerin yüksek miktarda doymamış yağ asidi içerdiği (UFA) rapor edilmiştir. Bu nedenle metanol gibi polar çözücülerin kullanılması ile daha yüksek UFA değerlerinin oluşması, polar lipitlerin polar çözücülerde çözünmesi gerçeğiyle ilişkili olabilir. Bu çalışmada ise *B. sudeticus* türünde başlıca çoklu doymamış yağ asiti olan C18:3n6 değerinde anlamlı bir fark tespit edilmezken, *Scenedesmus obliquus* türünde metanol oranının 2 kat daha fazla kullanıldığı Bligh dyer yönteminde daha yüksek C18:3n6 değerleri tespit edilmiştir. Bligh Dyer ekstraksiyonunda hekzan ekstraksiyonuna göre daha yüksek metanol kullanımı PUFA içeriğininin daha yüksek çıkmasına neden olmuş olabilir.

Yağ asidi bileşimindeki yüksek PUFA (≥ 2 çift bağ) içeriği, biyodizelin oksidatif stabilitesini olumsuz yönde etkileyerek onları oksidasyona ve serbest radikal saldırılarına karşı daha duyarlı hale getirir (Rai ve Gupta 2017). Özellikle depolama sırasında biyodizelin yüksek PUFA içeriği oksidasyon reaksiyonlarına uğrayarak peroksitlerin ve diğer bozunma ürünlerinin oluşmasına neden olur (Knothe 2005). Bu nedenle, iyi oksidatif stabilite sağlamak ve biyodizelin kalitesini arttırmak için genellikle bileşimde doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin daha yüksek oranda bulunması tercih edilir. Avrupa yönetmeliği EN 14214'e göre üçten fazla çift bağa sahip (≥ 4 çift bağ) yağ asitleri %1'i geçmemelidir. Bu çalışmada ise her iki ekstraksiyon yönteminde de C20:4n6 yağ asidinde tespit edilen değerlerin %1 in üzerinde olduğu görüldü (Tablo 4.11).

Sonuç olarak lipit ekstraksiyonunda kullanılan çözücü türlerin yağ asidi kompozisyonu üzerinde türe bağlı olarak farklılık göstermiştir. Biyodizel üretiminde kullanılan türlerin yağ asidi profiline bağlı olarak kalitenin geliştirilmesinde farklı kimyasalların kullanılması mümkün olsa da Bligh Dyer metodunda kullanılan kloroform çözücüsünün hekzan ile kıyaslandığında toplam lipit ve FAME veri açısından çok daha yüksek bulunması Bligh Dyer metodunu tercih edilebilir kılmaktadır.

5.2 ÖN PARÇALAMA İŞLEMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Genel olarak mikroalglerin hücre duvarları yapısal olarak sağlam, karmaşık ve kimyasal olarak çeşitlidir ve bu nedenle mikroalg hücre duvarının parçalanarak değerli biyomoleküllerin elde edilmesi biyodizel üretiminde önemli bir adımdır (Karim ve diğ., 2020).

Bu nedenle bu çalışma kapsamında lipit ekstraksiyonu öncesinde ön parçalama teknikleri uygulanmış ve sonikasyon işlemi diğer tekniklere göre daha yüksek lipit verimi eldesi sağlamıştır. Bununla birlikte yüksek lipit eldesinin FAME e dönüşme oranında anlamlı bir fark oluşmadığı görülmüştür. Yüksek lipit üretimi, biyodizel üretim sürecinde önemli bir faktör olarak kabul edilmekle birlikte, bu durum her zaman gerekli yüksek FAME üretimini garanti etmez (Xu ve diğ., 2014). Lipitlerin yapısı ve içeriği, FAME verimliliğini doğrudan etkileyen önemli faktörlerdendir (Chisti, 2007). Lipitler serbest yağ asitleri (FFA'lar), glikolipitler, fosfolipitler, asilgliseritler, lipoprotein, hidrokarbonlar, steroller ve pigmentler gibi geniş bir yelpazeyi içerdiğinden biyodizel üretiminde sadece lipit miktarına odaklanmak yeterli olmayabilir (Chisti, 2007). Lipit ekstraksiyonu sırasında kullanılan çözücülerin polaritesi veya uygulanan ön parçalama işlemleri, pigmentler gibi sabunlaşamayan bileşiklerin ya da diğer polar lipitlerin de eş zamanlı olarak daha fazla ekstrakte edilebilmesine neden olmaktadır (Pruvost ve diğ., 2009). Bu bileşikler lipit veriminde artışa neden olurken, lipitlerin FAME 'e

dönüştürülmesinde FAME verimini düşürebilmektedir (Kumar ve diğ., 2014). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlarda ise ön parçalama koşullarının toplam lipit veriminde artışı sağlasa bile biyodizel için gerekli olan TAG gibi nötral lipitler yerine polar lipitlerin ekstraksiyonunu teşvik etmiş olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları, özellikle düşük alg biyomasları ile çalışıldığında hücre parçalaması sırasında meydana gelen biyomas kayıpları nedeniyle hücre parçalama tekniklerinin etkinliğinin azaldığını göstermektedir. Bununla birlikte, optimizasyon çalışmaları kapsamında düşük miktarlarda alg biyoması kullanılması, hücre parçalanması için harcanan enerji ile ekstraksiyon sonucunda elde edilen FAME verimi artışı arasındaki maliyet etkinliğini düşürmektedir. Bu nedenle, az miktarda alg biyoması ile çalışıldığında ön parçalama işlemlerinin kullanılmasına gerek duyulmamıştır.

5.3 TRANSESTERİFİKASYON YÖNTEMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Biyodizel üretiminde, Bligh Dyer gibi lipit ekstraksiyonu yöntemlerinin ardından gerçekleştirilen transesterifikasyon süreçlerinin yanı sıra, lipit ekstraksiyon aşamasının atlandığı in situ transesterifikasyon yöntemleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu süreçlerde en sık kullanılan katalizörler hidroklorik asit (HCl), bor triflorür (BF₃), sülfürik asit (H₂SO₄) ve sodyum hidroksit (NaOH) gibi maddelerdir (Carrapiso ve Garcia, 2000; Cavonius ve diğ. 2014). Katalizörlerin esterifikasyon ve metilasyon aşamalarındaki kullanım sırası, reaksiyon süresi ve sıcaklığı gibi parametrelerin optimizasyonu konusunda net bir fikir birliği sağlanamamıştır (Carrapiso ve Garcia, 2000; Ryckebosch ve diğ., 2012). Bu nedenle, morfolojik olarak farklı alg türleri kullanılarak yağ asidi ölçüm prensiplerinin daha fazla karşılaştırılması gerekmektedir (Griffiths, 2010; Cavonius ve diğ. 2014). Bu optimizasyonlar,

daha düşük maliyetli, daha az toksik ve daha yüksek FAME verimi elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Cavonius ve diğ. 2014).

Bu amaçla farklı yöntem ve katalizörlerin *Scenedesmus obliquus* türü üzerindeki FAME verim ve yağ asidi kompozisyonu üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmada, tüm transesterifikasyon deneyleri içerisinde tek aşamalı bazik (NaOH) katalizör kullanılan reaksiyonlarda en düşük FAME verimleri elde edildi. Buna karşılık, iki aşamalı reaksiyonlarda katalizör olarak NaOH kullanıldığında FAME verimi üzerinde dikkat çekici artış olduğu görüldü. Örneğin, geleneksel metotlar içerisinde NaOH katalizörünün tek aşamalı reaksiyonu (G5; %18) diğer yöntemlere göre oldukça düşük FAME verimine yol açarken, iki aşamalı (NaOH+HCl) reaksiyonunda (G3; %27,5) verimin %34 oranında arttığı tespit edildi. Benzer şekilde tek aşamalı in situ deneylerinden IS1 reaksiyonunda tek başına NaOH kullanımı ile %14 gibi düşük bir verim tespit edilirken, NaOH katalizörünün iki aşamalı in situ deneylerinde kullanılması, IS4 (%26) ve IS6 (%20,1)'da daha yüksek FAME verimlerinin elde edilmesini sağladı. Aynı şekilde, NaOH katalizörünün tek başına kullanıldığında çok düşük biyodizel oranlarının elde edildiğini ve daha yüksek biyodizel verimi için iki aşamalı NaOH katalizörlerin (NaOH-HCl; NaOH-H₂SO₄) kullanılması gerektiğini vurgulayan çalışmalarda (Griffith ve diğ.,2010; Kumar ve diğ., 2014; Teo ve İdris, 2014) benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda (Knothe ve diğ., 2005; Hidalgo ve diğ., 2014; Teo ve İdris, 2014) lipitlerin serbest yağ asidi içeriğinin %5'ten fazla olduğu durumlarda, serbest yağ asidi içeriğini azaltmak için asidik katalizör kullanılması gerektiği vurgulanmıştır. Mikroalglerin içeriğinde yüksek miktarda serbest yağ asitleri bulunduğundan alkali katalizörlerin kullanımı sabunlaşma reaksiyonuna neden olmaktadır (Hidalgo ve diğ., 2014). Bu çalışmada kullanılan mikroalglerin yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitlerine (>%8) sahip olduğu bilindiğinden, iki aşamalı transesterifikasyonlarda, ilk aşamada reaksiyonu hızlandırmak için alkali bir katalizör

kullanımının daha sonra ise serbest yağ asitlerinin de FAME'e dönüştürülmesinde asit katalizörden faydalanmanın FAME veriminin geri kazanımında çok daha etkili olduğu sonucuna varıldı. Bu sonuçlar, katalizör olarak NaOH kullanıldığında, hem geleneksel hem de in situ yöntemlerle daha yüksek transesterifikasyon verimi elde etmek için iki aşamanın gerekli olduğunu gösterdi.

Bununla birlikte, tek aşamalı in situ yöntemleri içerisinde asidik estefirifikasyon sırasında H_2SO_4 ile katalize edilen reaksiyonlarının (IS2; IS3), NaOH (IS1) ile katalize edilen reaksiyonlara kıyasla daha yüksek bir FAME verimine sahip olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde, Chen ve Lee (2018), optimum transesterifikasyon reaksiyonlarını belirlemek amacıyla asit (H_2SO_4) ve baz (NaOH) katalizörlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, asit katalizörünün daha yüksek FAME verimi sağladığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da asit katalizli reaksiyonların daha yüksek tespit edilmesi, asit katalizli reaksiyonların hem trigliseritleri hem de serbest yağ asitlerini FAME'lere dönüştürmede daha etkili olması ile ilişkilendirildi.

BF_3 katalizörü ile gerçekleşen hem geleneksel (G1; 31,2) hem de iki aşamalı in situ (IS8; %29,7) reaksiyonlarda nispeten yüksek bir FAME içerik miktarı tespit edilse de özellikle geleneksel metotlarda kullanılan katalizörler arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bununla birlikte BF_3 kullanılarak gerçekleştirilen G1 reaksiyonunda hem lipit ekstraksiyonu sırasında kloroform: metanol solventlerinin kullanılması hem de transesterifikasyon aşamasında iki aşamalı reaksiyon olarak NaOH+ BF_3 'ün kullanılması yüksek toksiteye sahip kimyasalların (kloroform ve BF_3) daha fazla kullanılması ile sonuçlanmıştır. Cavonius ve diğ. (2014), BF_3 işlenmesinin tehlikeli ve pahalı olması aynı zamanda raf ömrünün de sınırlı olması nedeniyle bu katalizörün ancak anlamlı bir fark yaratacak şekilde yüksek FAME elde edildiği takdirde tercih edilebilir olabileceğini belirtilmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada da BF_3 katalizöründen daha yüksek FAME verimi elde etmek için özellikle reaksiyon süresi, sıcaklığı

gibi parametrelerinde daha fazla optimizasyon çalışması gerektiği belirlenmiş, daha kısa ve optimal reaksiyon süre ve sıcaklıklar için daha uygun fiyatlı asidik veya bazik katalizörlerin kullanımının daha uygun olabileceği sonucuna varıldı.

Transesterifikasyon süreçlerinde farklı katalizörlerin kullanılması yağ asidi kompozisyonu üzerinde önemli etkilere sahip olduğu gözlemlendi. NaOH katalizörünün tek başına kullanıldığı her iki yöntemde (G5 ve IS1) en düşük SFA (sırasıyla %35.6 ve %20.3) oranlarının elde edildiği görüldü. Bununla birlikte, G5 ve IS1 yöntemlerinde düşük SFA oranlarına karşılık yüksek oranda C18:3n6 (sırasıyla %48.2 ve %75.8) tespit edildi. Benzer şekilde, Tsavatopoulou ve diğ., (2021), *Scenedesmus sp.* üzerinde H₂SO₄ ve NaOH katalizörlerinin tek ve iki aşamalı reaksiyonlarını uyguladıkları çalışmalarında, NaOH katalizörünün tek aşamalı reaksiyonlarda yağ asidi kompozisyonunun SFA içeriğinin C18:3n6'ya doğru kaydığını belirtmişler ve toplam çoklu doymamışlık oranını (PUFA) %73 olarak bulduklarını vurgulamışlardır.

Doymuş yağ asitleri (SFA) çift bağ içermedikleri için yanma sırasında daha hızlı reaksiyona girerler. Bu hızlı yanma, daha kısa tutuşma gecikmesi ve dolayısıyla daha yüksek setan sayısı ile sonuçlanır (Knothe, 2005). Öte yandan, doymamış yağ asitleri (MUFA ve PUFA), özellikle linoleik ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri, moleküler yapılarındaki çift bağlar nedeniyle daha düşük setan sayısına sahip olma eğilimindedirler. Çift bağlar, molekülün yanma sırasında daha yavaş ve düzensiz bir şekilde reaksiyona girmesine neden olabilir, bu da tutuşma gecikmesini artırır ve setan sayısını düşürür (Mishra ve diğ., 2016). Bu nedenle, G5 ve IS1 yöntemlerinde düşük SFA oranlarına karşılık yüksek oranda C18:3n6 tespit edilmesi, biyodizelin ateşleme gecikme süresi ile ilgili olan CN değerleri üzerinde olumsuz etki yaratmıştır. G5 ve IS1 yöntemlerinde CN değerleri sırasıyla 45 ve 36 olarak ölçülmüş olup, bu değerler EN14214 standardının önerdiği 51 sınır değerinin altında kalmıştır. Sonuç olarak, NaOH katalizörünün tek aşamalı transesterifikasyonlarının (G5 ve IS1), hem düşük FAME

verimine hem de CN değerleri açısından düşük motor performansına neden olması, bu yöntemlerin transesterifikasyon aşamalarındaki kullanımı açısından uygun olmadığını göstermektedir.

Geleneksel yöntemler arasında G5 (tek aşamalı NaOH reaksiyonu) yöntemi haricinde toplam FAME içerik miktarı açısından anlamlı fark tespit edilmemesine rağmen, geleneksel yöntemlerde in situ yöntemlere kıyasla daha yüksek CN değerleri kaydedildi. Bununla birlikte geleneksel yöntemler arasında G3 (NaOH +HCL reaksiyonu) yöntemi diğer geleneksel yöntemlerden daha yüksek CN ve daha düşük CFPP ve LCSF değerleri göstermesi bakımından ayrıldı. Bu özellikler geleneksel yöntemler içerisinde G3 yönteminin tercih edilebilir olmasını sağladı. Biyodizelin soğuk akış özelliklerinden biri olan CFPP değerlerinin düşük olması, düşük sıcaklıktaki biyodizel özelliklerinin daha iyi olmasını sağlamaktadır. Elde edilen sonuçlarda G3 yönteminde CFPP değerlerinin daha düşük olması biyodizelin soğuk iklimlerde kullanılabilirliğini arttırması bakımından önemlidir.

Bu veriler biyodizel üretiminde farklı katalizörlerin ve transesterifikasyon yöntemlerinin yağ asidi kompozisyonu ve FAME verimi üzerinde belirgin etkileri olduğunu göstermiştir. NaOH katalizörünün tek aşamalı kullanımı, düşük FAME verimi ve SFA oranlarına, buna karşılık yüksek PUFA (C18:3n6) içeriğine yol açarak biyodizelin setan sayısını düşürmüş ve motor performansını olumsuz etkilediği sonucun varıldı. Ayrıca, alkali katalizli transesterifikasyon sırasında meydana gelen hidroliz ve sabunlaşma reaksiyonları biyodizel verimini azaltma eğiliminde bulunması (Hidalgo ve diğ., 2014) transesterifikasyon aşamasında asit kullanımının gerekliliğini göstermiştir. BF₃ katalizörünün kullanımı ile yüksek verimler elde edilse de toksisite ve maliyet gibi dezavantajlar nedeniyle sınırlı bir tercih olarak görülmektedir.

Elde edilen veriler, biyodizel üretiminde optimal verim ve yakıt kalitesi elde etmek için katalizör seçimi ve transesterifikasyon koşullarının dikkatli bir şekilde optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle biyodizel üretiminde hem ekonomik hem de çevresel sürdürülebilirliği sağlamak için en uygun katalizör ve yöntemlerin belirlenmesinin önemi bu çalışma ile de kanıtlandı.

5.4 AZOT MANİPÜLASYON DENEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

5.4.1 Büyüme Koşullarının Değerlendirilmesi

Mikroalg yetiştirme koşullarının optimizasyonu, biyokütle verimi ve lipit miktarlarının yanı sıra maliyet etkinliğinde de önemli bir rol oynar (Sharma ve diğ., 2016). Mikroalglerde hızlı büyüme ve yüksek lipit içeriği elde etmek için uygun ortamın seçilmesi önemlidir (Cheng ve diğ., 2013). Önceki çalışmalar, biyokütle üretimini teşvik etmek için ortamda belirli bir azot konsantrasyonunun varlığının önemini vurgulamıştır. Choi ve diğ., (2011), 0,37 mM'nin altındaki başlangıç nitrat konsantrasyonunun düşük biyokütleye ancak yüksek lipit üretimine yol açtığını bildirmiştir. Benzer şekilde Vishwakarma ve diğ. (2019), BG-11 besiyeri ortamının 1,5 g L⁻¹ NaNO₃ konsantrasyonunun, BBM (Bold's Basal Medium) besiyerine ortamına kıyasla biyokütle verimini arttırdığını buldu. BG-11 besiyerinin yeşil alglerin büyümesi için gerekli besinler olan azot (N), fosfor (P) ve karbon (C) açısından zengin olduğu bilinmektedir (Vishwakarma ve diğ., 2019). Bu nedenle bu çalışmada ilk aşamada yüksek biyokütle üretimi elde etmek için yeterli azot konsantrasyonuna sahip BG-11 besiyeri kullanıldı.

Haftalık klorofil-*a* (kl-*a*) analizi ile belirlenen büyüme oranlarına göre kültürlerin gelişimleri 6. haftanın durağan faza geçtiği tespit edildi. Azot eksikliği setinin büyüme hızlarında azalma eğilimi görüldü ve 2. haftadan sonra hücre ölümü başladı. Bu gözlemler, azot eksikliğinin

mikroalglerin hem canlılığı hem de büyümesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu gösterdi.

Genel olarak alg büyümesinin durağan fazı sırasında azot ve fosfor gibi temel besin maddelerinin tükenmesi muhtemeldir. Bu aşamada mikroalgler, fotosentetik olarak indirgenmiş karbonun önemli bir kısmını hidrokarbonların biyosentezine ayırırlar (Dunstan ve diğ., 1993). Azot eksikliğinin mikroalglerdeki klorofil içeriğini azalttığı gösterilmiştir (Syrett, 1962). Ayrıca, azot eksikliği altında, fotosentezin metabolik ürünleri protein sentezinden karbonhidrat ve lipit üretimine doğru yönelim göstermektedir (Mandalam, 1998). Bu metabolik ayarlama, mikroalglerin kaynaklarını, biyodizel üretimi için özellikle ilgi çekici olan lipitler gibi enerji açısından zengin bileşiklerin birikimine yönlendirmesine olanak tanır.

Deney setlerinin kl-a içerikleri karşılaştırıldığında *B. sudeticus*' un *C. vulgaris*'e göre daha yüksek kl-a değerlerine ulaştığı ortaya çıktı. Çeşitli çalışmalar *Botryococcus* suşlarının hücre büyüme hızının diğer yeşil alglere göre daha yavaş olduğunu göstermiştir (Jin ve diğ., 2016; Sun ve diğ., 2013; Tanoi ve diğ., 2011). Ancak, kültür koşullarına (ışık, sıcaklık vb.) bağlı olarak hücre büyüme hızı ile klorofil içeriği arasında doğrusal bir ilişki olmayabilir (Mohsenpour ve diğ., 2012). Ek olarak, diğer çalışmalar ışık kaynaklarının fotosentetik aktif radyasyon (PAR) üzerindeki önemini vurgulamıştır (Chai ve diğ., 2007; Nigam ve Singh 2011; Mohsenpour ve diğ., 2012). *Botryococcus sudeticus*'un daha yüksek kl-a içeriğine sahip olmasında beyaz ışık kaynağının kullanımının *B. sudeticus*'ta PAR açısından önemli olabileceğini düşündürmektedir.

5.4.2 Lipit ve FAME İçeriklerinin Değerlendirilmesi

Mikroalglerin Lipit ve FAME verimleri üzerinde de azot eksikliğinin açık bir etkiye sahip olduğu görüldü. *C. vulgaris*'in toplam lipit içeriği, besin takviyesi seti ile karşılaştırıldığında

azot eksikliği setinde %24,1'den %28,4'e yükseldi. Bu sonuçlar Converti ve diğ. (2009) 'nın azot eksikliği koşullarında *C. vulgaris*'in toplam lipit içeriği üzerinde önemli etkisini vurguladığı çalışmayı desteklemektedir. Bu çalışmada Optimum azot değerine (1,5 g L⁻¹ NaNO₃) kıyasla azot konsantrasyonunun %75 azaltılmasıyla *C. vulgaris*'in toplam lipit içeriğinin %5,90'dan %16,41'e önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca Tan ve diğ. (2018) kültür ortamına çeşitli miktarlarda besin ilavesi ile ağırlıkça %26 ila %37 arasında değişen daha geniş bir toplam lipit içeriği aralığı elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Genel olarak bu bulgular, azot konsantrasyonunun ve diğer kültür koşullarının manipüle edilmesinin, *C. vulgaris*'in toplam lipit içeriğini önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir.

Öte yandan her iki grupta da *B. sudeticus*, *C. vulgaris*'e kıyasla daha düşük toplam lipit içeriği sergiledi. Azot eksikliği setinde toplam lipit içeriği, besin takviyesi setine kıyasla %21,1'den %23,8'e yükseldi. Bu, Ashokkumar ve diğ. (2014)'nın önceki bulgularıyla uyumludur. *B. sudeticus* için toplam lipit içeriğinin ağırlıkça %22,6 olduğunu bildirmiştir. Ancak *B. sudeticus*'un azot eksikliğine tepki olarak yağ asidi bileşimi ve biyodizel kalitesi hakkında çok sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Azot sınırlayıcı koşullar altında hücreler, proteinler, nükleik asitler ve klorofil gibi N içeren bileşiklerin sentezi yerine, verimli karbon ve enerji depolama aracı olarak yağ asitleri ve lipitlerin sentezine öncelik verir (Hasnain ve diğ., 2023; Bibi ve diğ., 2022). Biyodizel için gerekli olan yağ asitleri, çok fazla azot gerektirmeden üretilebilen verimli bir karbon ve enerji kaynağı olarak hizmet vermektedir (Piorreck ve diğ., 1984). Birçok mikroalgdeki FAME içeriği, kültür koşullarındaki farklı çevresel faktörlere yanıt olarak değişebilir (Choi ve diğ.; 2011; Yoo ve diğ., 2010). Çeşitli çalışmalar, ortamdaki azot konsantrasyonundaki bir azalmanın, mikroalglerdeki FAME içeriği yüzdesinde bir artışa yol açtığını göstermiştir (Ruangsomboon ve diğ., 2015; Choi ve diğ., 2011). *Chlorella vulgaris*'in toplam FAME içeriği

(ağırlıkça %) besin takviyesi seti ile karşılaştırıldığında azot eksikliği setinde önemli ölçüde daha yüksek bulundu (Anova $P < 0.05$). Öte yandan *B. sudeticus*'taki setler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Anova $P > 0.05$).

Bununla birlikte Azot eksikliği her iki tür için de FAME veriminde artışa neden oldu. Spesifik olarak, *B. sudeticus*'ta azot eksikliği, FAME veriminde %21'lik bir artışla sonuçlanırken, *C. vulgaris*'te, besin takviyesi seti ile karşılaştırıldığında azot eksikliği koşulları altında FAME verimi %28 daha yüksek bulundu.

5.4.3. Yağ Asidi Profili ve Biyodizel Kalitesine Etkisinin Değerlendirilmesi

FAME'in karbon zinciri uzunluğunun, doymamışlık derecesinin ve yüzde bileşiminin biyodizel özelliklerini etkilediği bilinmektedir (Ikaran ve diğ., 2015). C16-C18 zincir uzunluğu, biyodizel uygulaması için FAME bileşiminin en önemli aralığıdır (Rai ve Gupta 2017; Knothe 2005). Bu çalışmada C16-C18 zincir uzunluğu *B. sudeticus*'ta 87,5 - 93,7, *C. vulgaris*'te 90,2 - 91,9 arasında değişti. Bu sonuçlar Ashokkumar ve diğ., (2014), 'nin yaptığı çalışmaların bulgularıyla uyumludur. *B. sudeticus*'ta toplam FAME C16-C18 yüzdesinin %87,4 olduğunu bulurken, Moradi-Kheibari ve diğ. (2017), *C. vulgaris*'te %87,7-89,4 aralığında olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca önceki çalışmalarda, C16:0 ve C18:1 gibi yağ asitlerinin Chlorophyceae familyası tarafından yaygın olarak sentezlenen ve biyodizel üretimi için arzu edilen yağ asitleri olduğu bildirilmiştir (Ruangsomboon, 2015; Rao ve diğ., 2007; Ashokkumar ve diğ., 2014). Sonuçlarımız aynı zamanda C16'nın en yüksek FAME bileşimi yüzdesine sahip olduğu, C18:1'in ise her iki kültürde önemli bir yağ asidi olduğu çalışmalarla da uyumludur. Toplam FAME bileşiminin C16-C18'i, her iki türde belirlenen azot eksikliğinde daha yüksekti; bu, azot stresinin, biyodizel üretimi için uygun yağ asitlerinin birikimini teşvik ettiğini ortaya koymaktadır.

Biyodizelin kalitesini belirlemede anahtar parametrelerden biri olan CN (Islam ve diğ., 2013; Ruangsomboon, ve diğ., 2013) değerin yüksek olması biyodizelin aynı zamanda daha iyi ateşleme özelliklerine sahip olduğu ve daha iyi motor performansı sağladığı daha önce yapılan birçok araştırmada vurgulandı (Ruangsomboon, ve diğ., 2013). Biyodizeldeki doymuş yağ asitlerinin (SFA) yüksek yüzdesi, daha iyi yanma özellikleri için arzu edilen daha yüksek setan sayısına katkıda bulunabilir (Deshmukh ve diğ., 2019). ASTM D6751 gibi dünya çapındaki biyodizel kalite standartlarına ve Yakıt Standardı (Biyodizel) Tayini'ne göre minimum CN değerleri sırasıyla 47 ve 51'in üzerinde olmalıdır. Tablo 4.12'de görüldüğü gibi her iki türün CN değerleri 51'in üzerinde olup, CN değerleri *C. vulgaris* setlerinde önemli bir değişim gösterdi (ANOVA $p > 0,05$). Bununla birlikte *B. sudeticus* türünde azot eksikliği CN değerlerinde düşüşe neden olarak yakıtın motor performans açısından istenmeyen bir etki yarattığı gözlemlendi.

Mikroalgler genellikle palmitik (C16:0) ve stearik (C18:0) asitler olmak üzere yüksek miktarda doymuş yağ asitleri içerdiğinden bu yağ asitlerinin setan sayısı üzerinde büyük etkisi vardır. Önceki araştırmalar azot eksikliğinin yağ asidi doymunluğunu artırma eğiliminde olduğunu göstermiştir (Singh ve diğ., 2015; Xin ve diğ., 2010). Ancak bu yağ asitlerinin üretimini optimize etmek için gereken azot eşiği mikroalg türleri arasında farklılık gösterebilir. Örneğin Wu ve diğ. (2014), *S. obliquus*'ta azot içermeyen ortamın (0 g L^{-1} azot) C16:0 ve toplam SFA'larda bir azalmaya yol açtığını ve maksimum C16'ya ulaşmak için minimum $0,3 \text{ g L}^{-1}$ azotun gerekli olduğunu bildirirken, *Chlorella pyrenoidosa*'da aksine azot içermeyen ortamın maksimum SFA değerlerine yol açtığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise *B. sudeticus*'ta azot eksikliği setinin (ağırlıkça %45) besin takviyesi setine (ağırlıkça %57,4) kıyasla daha düşük SFA yüzdesiyle sonuçlandığı kaydedildi. *Botryococcus sudeticus* durumunda azot içermeyen bir ortamın (0 g L^{-1} azot) kullanılması, C16:0 gibi doymuş yağ asitlerinin (SFA'lar) artışı sınırlamış olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, ortamda belirli miktarda azot varlığının,

B. sudeticus'ta daha yüksek doymunluk seviyelerini ve setan sayısı (CN) değerlerini desteklemesinin muhtemel olduğuna işaret etmektedir. Öte yandan azot eksikliği *C. vulgaris*'te yağ asitlerinin doymunluğunu önemli ölçüde etkilemedi (ANOVA $p>0.05$). Bu ayrıca azot eksikliğinin mikroalgler üzerindeki etkilerinin türe özgü bir şekilde değişebileceği fikrini desteklemektedir.

Avrupa Standartlarına (EN14214) göre biyodizelin belirtilen %12 linolenik asit metil ester (C18:3) limitlerine sahip olması gerekmektedir. Daha yüksek miktarlarda C18:3'ün varlığı, oksidasyon nedeniyle biyodizelin daha düşük stabilitesine yol aıtığı için tercih edilmez (Ashokkumar ve diğ., 2012). Bu çalışmamızda C18:3 *B. sudeticus*'ta %14,3 - 26,7, *C. vulgaris*'te ise %11,5 - 17,8 arasında değerler kaydedildi (Stephenson ve diğ., 2010), *C. vulgaris*'in C18:3 yağ asidi yüzdesinin, azot sınırlama koşulları nedeniyle ağırlıkça %21'den ağırlıkça %15'e düştüğünü gösterdi. Bu çalışmada ise α -linolenik asit (C18:3) *C. vulgaris*'te %17,8'den (besin takviyesi seti) %11,5'e (azot eksikliği seti) düşerek Avrupa'daki standartlara (EN14214) göre %12'lik üst limiti karşılayabilir hale geldi. Diğer taraftan tüm *B. sudeticus* setlerinin %C18:3 içeriği biyodizel üretimi için tercih edilen sınırın üzerinde bulundu. *B. braunii*'nin yağ asidi bileşimi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda, C18:3 yağ asidinin ana bileşenlerden biri olduğu rapor edilse de (Kalacheva ve diğ., 2002; Fang ve diğ., 2004) *B. sudeticus*'ta C18:3'ün varlığı şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bildirilmemiştir.

Yağ asidi bileşimindeki yüksek PUFA (≥ 2 çift bağ) içeriği, biyodizelin oksidatif stabilitesini olumsuz yönde etkileyerek onları oksidasyona ve serbest radikal saldırılarına karşı daha duyarlı hale getirir (Rai ve Gupta 2017). Özellikle depolama sırasında biyodizelin yüksek PUFA içeriği oksidasyon reaksiyonlarına uğrayarak peroksitlerin ve diğer bozunma ürünlerinin oluşmasına neden olur (Knothe 2005). Bu nedenle, iyi oksidatif stabilite sağlamak ve biyodizelin kalitesini arttırmak için genellikle bileşimde doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin daha yüksek

oranda bulunması tercih edilir. Avrupa yönetmeliği EN 14214'e göre üçten fazla çift bağa sahip (≥ 4 çift bağ) yağ asitleri %1'i geçmemelidir. Bu çalışmada, besin takviyesi seti altında *B. sudeticus*'ta üçten fazla çift bağa sahip FAME miktarı maksimum 0,7 olarak ölçülürken, *C. vulgaris*'te tespit edilmedi ve her iki kültürün de bu oran içerisinde bir yüzdeye sahip olduğunu gösterdi.

İyot değeri (IV), doymamış yağ asitlerinin içeriğini tanımlar. IV, yağ asidi zincirindeki çift bağların sayısı ile artar ve 100 g kimyasal madde tarafından tüketilen iyot kütlesini gram cinsinden ifade eder (Knothe 2009). Daha yüksek doymamış yağ asitleri ısıtıldığında, gliseritlerin polimerizasyonuna neden olur ve yağlama yağında tortu oluşumuna veya bozulmasına yol açar (Francisco ve diğ., 2010). Sonuç olarak, daha yüksek doymamışlığa işaret eden daha yüksek IV değerine sahip biyodizelin oksidatif bozunmaya uğrama olasılığı daha yüksektir. Yağ asidi bileşiminde daha düşük doymamışlığa ve daha az çift bağa işaret eden daha düşük IV değerine sahip biyodizel, daha yüksek oksidatif stabiliteye sahip olma eğiliminde olduğu ve önemli bir bozulma olmaksızın uzun süreli depolama için daha uygun olduğu rapor edilmiştir (Wu ve diğ., 2014). Bu nedenle biyodizel yakıtın uygunluğu açısından IV'ün belli bir miktarın üzerinde olması istenmemektedir. Avrupa standardı (EN 14214), biyodizel için IV için maksimum değeri 120 g I₂ 100 g⁻¹ olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada maksimum IV, her iki kültür için de azot eksikliği setinde, *B. sudeticus*'ta 91,7 g I₂ 100 g⁻¹ ve *C. vulgaris*'te 81,2 g I₂ 100 g⁻¹ ile bulundu. Her iki grupta da her iki tür tarafından üretilen biyodizel örneklerinin tamamının, Avrupa standartlarının (EN14214) belirlediği üst limitlerin altında IV değerine sahip olduğu belirlendi.

Doymamışlık derecesi (DU), biyodizel koşullarının oksidatif stabilitesini etkiler ve düşük DU, uzun süreli depolamada biyodizelin daha stabil olmasını sağlar (Ruangsomboon 2015). Avrupa standartları (EN 14214) ve Amerikan Biyodizel Standartları ASTM D6751 DU için herhangi

bir sınır içermese de biyodizelin iyot sayısının belirlenmesine doğrudan etkisi vardır (Mandotra 2016). Çalışmamızda DU değerleri *B. sudeticus*'ta 62,6 ile 87,2, *C. vulgaris*'te 63,7 ile 74,6 aralığında bulundu. Azot eksikliğinin *B. sudeticus* ve *C. vulgaris*'in DU değerleri üzerindeki etkileri birbirine zıt olarak gerçekleşti. *B. sudeticus*'ta azot eksikliği DU değerlerinde artışa neden oldu, bu da oksidatif stabilitede azalmaya işaret etti. Öte yandan *C. vulgaris*'te azot eksikliğinin DU değerlerinde azalmaya neden olması oksidatif stabilitede iyileşme olduğunu düşündürmektedir. Bu gözlem, azot eksikliğinin *B. sudeticus*'da oksidatif stabiliteyi olumsuz etkilediğini, uzun süreli depolama sırasında *C. vulgaris*'de oksidatif stabilitenin artmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Soğuk Filtre Tıkanma Noktası (CFPP), esas olarak biyodizelin düşük sıcaklıktaki akış performansını belirlemek için kullanılan önemli biyodizel kalite parametrelerinden biridir (Ruangsomboon 2015). CFPP, 40 mL yağın 60 saniye içinde filtreden güvenli bir şekilde geçtiği en düşük sıcaklık olarak tanımlanır. Biyodizelin soğuk akış özelliklerinin bir göstergesidir ve belirli iklim koşullarına uygunluğunun belirlenmesine yardımcı olur (Dunn ve Bagby 1995). Biyodizelin düşük sıcaklık özellikleri, toplam FAME içindeki doymuş yağ asitlerinin yüzdesinden etkilenir. Daha yüksek bir CFPP değeri, düşük sıcaklıktaki biyodizel özelliklerinin zayıf olduğunu gösterir bu da biyodizelin çökelme ve filtreyi tıkaama eğiliminin daha yüksek olduğunu gösterir (Mittelbach ve Remschmidt 2005). CFPP, uzun zincirli doymuş faktör (LCSF) ile ilişkilidir. Bu çalışmada azot eksikliği seti altında hem *B. sudeticus* hem de *C. vulgaris* kültürlerinde daha düşük CFPP ve LCSF değerleri gözlemlendi. Azot stresinin biyodizelin CFPP değerlerini düşürdüğü, dolayısıyla soğuk iklimlerde kullanılabilirliğini arttırdığı bulunmuştur. Bulgular, *C. vulgaris*'in, *B. sudeticus*'a kıyasla daha düşük CFPP değerleri nedeniyle daha soğuk iklimlerde daha iyi akış performansı sergileyebileceğini gösterdi.

Bu araştırma sonucunda elde edilen verilerde, biyodizel verimini arttırmaya yönelik optimizasyon çalışmalarının toplam FAME verim ve kalitesi üzerinde büyük etkileri olduğu ve bu etkilerin türe bağlı olarak değişiklik gösterebildiği tespit edildi. Bununla birlikte, sürdürülebilir ve ticari ölçekli biyodizel üretimi için, kullanılan mikroalg türlerinin spesifik ihtiyaçlarına ve özelliklerine göre stres koşullarının belirlenmesine ve yöntem optimizasyon çalışmalarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Sonuç olarak, alg bazlı biyodizelin ekonomik fizibilitesi, yüksek biyokütle, FAME verimi ve kalitesine bağlıdır. Bu nedenle, FAME içeriğini artırmak ve genel sürecin çevresel etkilerini ve maliyetlerini azaltmak için süreç optimizasyonu gereklidir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların, mikroalg bazlı biyodizel üretiminde ihtiyaç duyulan bilgi birikimine önemli katkıda bulunacağı ve hem lipit içeriğini hem de biyodizel kalitesini en üst düzeye çıkarmak için türe özgü çalışmalara yeni bir bakış açısı getireceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Amigun, B., Müller-Langer, F. and Von Blottnitz, H., 2008, Predicting the costs of biodiesel production in Africa: learning from Germany. *Energy for Sustainable Development*, 12(1), 5-21.
- Abomohra, A.E.F., El-Sheekh, M., Hanelt, D., 2017, Screening of marine microalgae isolated from the hypersaline Bardawil lagoon for biodiesel feedstock. *Renewable Energy*, 101:1266–1272.
- Abou-Shanab, R., 2015, Green renewable Energy for Sustainable socio-economic development. *14th International Conference on Environmental Science and Technology*, Rhodes, Greece (pp. 3-5).
- Agarwal, A.K., 2007, Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines, *Progress in Energy Combustion Science*, 33:233–71.
- Akoh, C.C., Chang, S.W., Lee, G.C. and Shaw, J.F., 2007, Enzymatic Approach to biodiesel production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8995–9005.
- Al-Humairi, S. T., Lee, J. G., Harvey, A. P., Salman, A. D., Juzsakova, T., Van, B. and Nguyen, D.D., 2023, A foam column system harvesting freshwater algae for biodiesel production: An experiment and process model evaluations. *Science of the Total Environment*, 862, 160702
- Amorim, M.L., Soares, J., Vieira, B. B., Batista-Silva, W. and Martins, M. A., 2020, Extraction of proteins from the microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 followed by lipid extraction of the wet deproteinized biomass using hexane and ethyl acetate. *Bioresource technology*, 307, 123190.
- Ananthi, V., Raja, R., Carvalho, I. S., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A. and Arun, A., 2021, A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel, *Fuel*, 284, 118965.
- Arutselvan, C., Narchonai, G., Pugazhendhi, A., LewisOscar, F. and Thajuddin, N., 2021, Evaluation of microalgal strains and microalgal consortium for higher lipid

productivity and rich fatty acid profile towards sustainable biodiesel production. *Bioresource Technology*, 339, 125524.

Ashokkumar, V., Agila, E., Sivakumar, P., Salam, Z., Rengasamy, R. and Ani, F. N., 2014, Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system, *Energy Conversion and management*, 88, 936-946.

American Society for Testing and Materials (ASTM) D6751, 2008, Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels, *ASTM International*, West Conshohocken, PA.

Atabani, A.E., Silitonga, A.S., Badruddin, I. A., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. And Mekhilef, S., 2012, A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2070-2093.

Balasubramanian S., Allen J.D., Kanitkar A., Boldor D., 2011, Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system—design, optimization, and quality characterization, *Bioresource Technology*, 102, 3396–3403.

Barua, P., Hossain, N., Chowdhury, T. and Chowdhury, H., 2020, Commercial diesel application scenario and potential of alternative biodiesel from waste chicken skin in Bangladesh, *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101139.

Bergthorson, J. M. and Thomson, M.J., 2015, A review of the combustion and emissions properties of advanced transportation biofuels and their impact on existing and future engines, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1393-1417.

Bhuyar, P., Sundararaju, S., Rahim, M.H.A., Maniam, G.P. and Govindan, N., 2021, Enhanced productivity of lipid extraction by urea stress conditions on marine microalgae *Coelastrum* sp. for improved biodiesel production, *Bioresource Technology Reports*, 15, 100696.

- Bibi, F., Ishtiaq Ali, M., Ahmad, M., Bokhari, A., Shiong Khoo, K., Zafar, M., Asif, S., Mubashir, M., Han, N., Loke Show, P., 2022, Production of lipids biosynthesis from *Tetrademus nygaardii* microalgae as a feedstock for biodiesel production, *Fuel*, 326,124985
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*, 37(8), 911-917.
- Borowitzka, M.A., 1992, Algal biotechnology products and processes—matching science and economics, *Journal of Applied Phycology*, 4, 267-279.
- Borowitzka, M.A., 2010, Algae oils for biofuels: chemistry, physiology, and production. *In Single Cell Oils*, 271-289, AOCS Press.
- Bruwer J.J., van d. Boshoff, B., Hugo, F.J.C., du Plessis, L.M., Fuls, J., Hawkins C, 1980, Sunflower seed oil as an extender for diesel fuel in agricultural tractors, *Symposium South African Institute of Agricultural Engineers*.
- Burja, A.M., Armenta, R.E., Radianingtyas, H., Barrow, C.J., 2007, Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium* sp. ONC-T18, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4795-4801.
- Canakci, M., Monyem, A., Van Gerpen, J., 1999, Accelerated oxidation processes in biodiesel. *Transactions of the ASAE*, 42(6), 1565-1572.
- Canakci, M. & Van Gerpen, J., 2003, A pilot plant to produce biodiesel from high free fatty acid feedstocks, *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 46(4): 945–54.
- Canakci M., Sanli H., 2008, Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 431-441.
- Carrapiso A.I., Garcia, C., 2000, Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification, *Lipids*, 35(11):1167–1177

- Cavonius, L.R., Carlsson, N. G., Undeland, I., 2014, Quantification of total fatty acids in microalgae: comparison of extraction and transesterification methods, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 7313-7322.
- Cequier-Sánchez, E., Rodriguez, Covadonga Ravelo, Á.G., Zarate, R., 2008, Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4297-4303.
- Chai, F., Cao, F., Zhai, F., Chen, Y., Wang, X., Su, Z., 2007, Transesterification of vegetable oil to biodiesel using a heteropolyacid solid catalyst, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(7), 107-1065.
- Chandra, M.S., Srinivasulu, M., Yadav, P.S., Ramesh, B., Narasimha, G., Chandrasekhar, T., 2021, Value added products from agriculture, paper and food waste: a source of bioenergy production. *Bioenergy Research: Commercial Opportunities & Challenges*, 91-126.
- Chavanne G., 1937, Procedure for the transformation of vegetable oils for their uses as fuels, *Belgian Patent* 422, 31.
- Chen, H., Qiu, T., Rong, J., He, C., Wang, Q., 2015, Microalgal biofuel revisited: an informatics-based analysis of developments to date and future prospects, *Applied Energy*, 155, 585-598.
- Chen, J.J., and Lee, Y.R., 2018, Optimization of the transesterification reaction of microalgal *Monoraphidium* sp., *Renewable Energy*, 129, 717-723.
- Cheng, P., Ji, B., Gao, L., Zhang, W., Wang, J., Liu, T., 2013, The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation, *Bioresource Technology*, 138, 95-100.
- Chini Zittelli, G., Lauceri, R., Faraloni, C., Silva Benavides, A. M., Torzillo, G., 2023, Valuable pigments from microalgae: phycobiliproteins, primary carotenoids, and fucoxanthin, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 22(8), 1733-1789.

- Chisti Y., 2007, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25:294–306.
- Choi, G.G., Kim, B.H., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2011, Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*, *Journal of Applied Phycology*, 23, 1031-1037.
- Choi, C.Y. and Reitz, R.D., 1999, An experimental study on the effects of oxygenated fuel blends and multiple injection strategies on DI diesel engine emissions, *Fuel*, 78(11), 1303-1317.
- Christie, W.W., 1989, Silver ion chromatography using solid-phase extraction columns packed with a bonded-sulfonic acid phase, *Journal of Lipid Research*, 30(9), 1471-1473.
- Chu, F.F., Chu, P.N., Cai, P.J., Li, W.W., Lam, P.K.S., Zeng, R.J., 2013, Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency, *Bioresource Technology*, 2013, 134, 341-346.
- Ciurli, A., Di Baccio, D., Scartazza, A., Grifoni, M., Pezzarossa, B., Chiellini, C., Pardossi, A., 2021, Influence of zinc and manganese enrichments on growth, biosorption and photosynthetic efficiency of *Chlorella* sp., *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 8539-8555.
- Concha, E., Heipieper, H. J., Wick, L. Y., Ciudad, G. A., Navia, R., 2018, Effects of limonene, n-decane and n-decanol on growth and membrane fatty acid composition of the microalga *Botryococcus braunii*, *AMB Express*, 8, 1-8.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
- Couto, R. M., Simoes, P. C., Reis, A., Da Silva, T. L., Martins, V. H., & Sánchez-Vicente, Y., 2010, Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*, *Engineering in Life Sciences*, 10(2), 158-164.

- Demirbaş, A., 2003, Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and noncatalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey, *Energy conversion and Management*, 44:2093–2109.
- Demirbaş, A., 2007, Importance of biodiesel as transportation fuel, *Energy Policy*, 35:4661–70.
- Demirbas, A., Demirbas, M.F., 2010, Algae energy: Algae as a new source of biodiesel, *Springer Science & Business Media*, Berlin, Germany.
- Deshmukh, S., Bala, K., Kumar, R., 2019, Selection of microalgae species based on their lipid content, fatty acid profile and apparent fuel properties for biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, 26,24462-24473.
- Diesel, R., 1913, Die entstehung des dieselmotors (pp. 267-367). Springer Berlin Heidelberg.
- Dragone G., Fernandes B., Vicente A., Teixeira J., 2010, Third generation biofuels from microalgae, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1355-1366.
- Dunn, R.O. and Bagby, M.O., 1995, Low-temperature properties of triglyceride-based diesel fuels: transesterified methyl esters and petroleum middle distillate/ester blends, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 895-904.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., Garland, C.D., 1993, Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5, 71–83 (1993)
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., 2010, Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids, *Fuel*, 89(3), 677-684.
- EC, Directive , 2009, 2009/28/EC on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing, Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC.

- EIA, U., 2017, International—US energy information administration (EIA), <https://www.eia.gov/outlooks/archive/ieo17/>
- EIA, U., 2023, International—US energy information administration (EIA), <https://www.eia.gov/outlooks/ieo/>
- El-Sheekh, M., Abomohra, A.E.F., Hanelt, D., 2013, Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 915-922.
- European Standard EN 14214, 2004, Automotive fuels-fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines-requirements and test methods, *European Committee for Standardization*, Brussels.
- European Parliament, 2015, [/http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=TA&reference=P8-TA-2015-0100&language=EN&ring=A8-20150025S](http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=TA&reference=P8-TA-2015-0100&language=EN&ring=A8-20150025S).
- Eroglu, E., Okada, S., Melis, A., 2011, Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification. *Journal of Applied Phycology*, 23, 763-775.
- Fang, X., Wei, C., Zhao-Ling, C., Fan, O., 2004, Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp., *Journal of Applied Phycology*, 16, 499-503.
- Farese, R.V., Cases, S., Smith, S.J., 2000, Triglyceride synthesis: Insights from the cloning of diacylglycerol acyltransferase, *Current opinion in lipidology*, 11(3), 229-234.
- Fazal M.A., Haseeb, A.S.M.A., Masjuki, H.H., 2013, Investigation of friction and wear characteristics of palm biodiesel, *Energy conversion and management*, 67, 251–256.
- Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T., 2010, Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production

and biofuel quality, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(3), 395-403.

Fritsch, F.E., 1935, The structure and reproduction of algae. Vol. I. Cambridge University Press, London.

Fu, W., Nelson, D.R., Yi, Z., Xu, M., Khraiwesh, B., Jijakli, K., Salehi-Ashtiani, K., 2017, Bioactive compounds from microalgae: Current development and prospects. *Studies in Natural Products chemistry*, 54, 199-225.

Goering, C.E., Schwab, A.W., Daugherty, M.J., Pryde, E.H., Heakin, A.J., 1982, Fuel properties of eleven vegetable oils, *Transactions of the ASAE*, 25, 1472± 1483.

Goh, B.H.H., Ong, H.C., Cheah, M.Y., Chen, W.H., Yu, K.L., Mahlia, T.M.I., 2019, Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 59-74.

Ganev, E.I., Ivanov, B.B., Dobrudzhaliev, D.G., Dzhelil, Y.R., Nikolova, D., 2018, Adopting environmental transportation practice in biodisel production as key factor for sustainable development: A Bulgarian case study. *Bulgarian Chemical Communications*, 50, 106-111.

Gong, Y., Jiang, M., 2011, Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel, *Biotechnology Letters*, 33, 1269-1284.

Gouveia, L., Marques, A.E., Da Silva, T.L., Reis, A., 2009, *Neochloris oleabundans* UTEX# 1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(6), 821-826.

Graboski M.S., McCormick R.L., 1998, Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines, *Progress in Energy and Combustion Science*, 24, 125- 164.

Griffiths, M.J., Van Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2010, Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae, *Lipids*, 45, 1053-1060.

- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., 2009, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21 (5), 493e507.
- Grima, E.M., Medina, A.R., Giménez, A.G., Sánchez Pérez, J.A., Camacho, F.G., García Sánchez, J.L., 1994, Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(9), 955-959.
- Haas, M.J., Scott, K.M., Foglia, T.A., Marmer, W.N., 2007, The general applicability of in situ transesterification for the production of fatty acid esters from a variety of feedstocks. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84:963–70.
- Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review, *Biotechnology Advances*, 30:709–32.
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S., 2010, Biofuels from algae: challenges and potential, *Biofuels* 1(5):763–784.
- Hasnain, M., Abideen, Z., Hashmi, S., Naz, S., Munir, N., 2023, Assessing the potential of nutrient deficiency for enhancement of biodiesel production in algal resources, *Biofuels*, 14(1), 1-34.
- Heywood, J.B., 1988, Combustion engine fundamentals. 1ª Edição. *Estados Unidos*, 25, 1117-1128.
- Hidalgo, P., Toro, C., Ciudad, G., Schober, S., Mittelbach, M., Navia, R., 2014, Evaluation of different operational strategies for biodiesel production by direct transesterification of microalgal biomass, *Energy & Fuels*, 28(6), 3814-3820.
- Hsieh, C.H., Wu, W.T., 2009, Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation, *Bioresource Technology*, 100:3921–3926
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *The Plant Journal*, 54(4), 621-639.

- Huang, R., Cheng, J., Qiu, Y., Li, T., Zhou, J., Cen, K., 2015, Using renewable ethanol and isopropanol for lipid transesterification in wet microalgae cells to produce biodiesel with low crystallization temperature, *Energy Conversion and Management*, 105, 791-797.
- İçingür, Y., Altıparmak, D., 2003, Effect of fuel cetane number and injection pressure on a DI Diesel engine performance and emissions, *Energy Conversion and Management*, 44(3), 389-397.
- Ikaran, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I., Castañón, S., 2015, The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3, *Algal Research*, 10, 134-144.
- Islam, M.A., Magnusson, M., Brown, R.J., Ayoko, G.A., Nabi, M.N., Heimann, K., 2013, Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles, *Energies*, 6(11), 5676-5702.
- ISO 10260, 1992, Water quality, measurement of biochem. parameters; spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration, Beuth Verlag GmbH Berlin-Vien – Zürich.
- Jin, J., Dupré, C., Yoneda, K., Watanabe, M.M., Legrand, J., Grizeau, D., 2016, Characteristics of extracellular hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* for biofuels production: Recent advances and opportunities, *Process Biochemistry*, 51(11), 1866-1875.
- Khan, M.A.H., Bonifacio, S., Clowes, J., Foulds, A., Holland, R., Matthews, J.C., Shallcross, D.E., 2021, Investigation of biofuel as a potential renewable energy source, *Atmosphere*, 12(10), 1289.
- Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., Volova, T.G., Gladyshev, M.I., 2002, The effect of temperature on the lipid composition of the green alga *Botryococcus*, *Microbiology*, 71, 286-293.
- Kalghatgi, G., 2019, Development of fuel/engine systems—the way forward to sustainable transport, *Engineering*, 5(3), 510-518.

- Karim, A., Islam, M.A., Khalid, Z.B., Faizal, C.K.M., Khan, M.M.R., Yousuf, A., 2020, Microalgal cell disruption and lipid extraction techniques for potential biofuel production. In *Microalgae cultivation for biofuels production*, *Academic Press*, 129-147.
- Keris-Sen, U.D., Sen, U., Soydemir, G., Gurol, M.D., 2014, An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. *Bioresource Technology*, 152, 407-413.
- Khoo, H.H., Sharratt, P.N., Das, P., Balasubramanian, R.K., Naraharisetti, P.K., Shaik, S., 2011, Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary results and comparisons, *Bioresource Technology*, 102, 5800–5807.
- Kim, W.S., Lee, K.Y., Ryu, E.H., Gu, J.M., Kim, Y., Lee, S.J., Huh, S., 2013, Catalytic transesterifications by a Zn–BisSalen MOF containing open pyridyl groups inside 1D channels, *European Journal of Inorganic Chemistry*, (24), 4228-4233.
- Kim, B., Heo, H.Y., Son, J., Yang, J., Chang, Y.K., Lee, J.H., & Lee, J.W., 2019, Simplifying biodiesel production from microalgae via wet in situ transesterification: A review in current research and future prospects, *Algal Research*, 41, 101557.
- Kim, J.Y., Jung, J.M., Jung, S., Park, Y.K., Tsang, Y.F., Lin, K.Y.A., Kwon, E.E., 2022, Biodiesel from microalgae: Recent progress and key challenges, *Progress in Energy and Combustion Science*, 93, 101020.
- Knothe, G., 2005, Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters, *Fuel Processing Technology*, 86(10), 1059-1070.
- Knothe, G., 2007, Some aspects of biodiesel oxidative stability, *Fuel Processing Technology*, 88(7), 669-677.
- Knothe, G., 2008, “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties, *Energy & Fuels*, 22(2), 1358-1364.

- Knothe, G., 2009, Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition, *Energy & Environmental Science*, 2(7), 759-766.
- Knothe, G., Sharp, C. A., & Ryan, T. W., 2006, Exhaust emissions of biodiesel, petrodiesel, neat methyl esters, and alkanes in a new technology engine, *Energy & Fuels*, 20(1), 403-408.
- Komárek, J., Fott, B., 1983, Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In Huber-Pestalozzi, G. [Ed.] *Das Phytoplankton des Süßwassers*, 7. Teil, 1. Hälfte, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1044.
- Komárek, J., Marvan, P., 1992, Morphological differences in natural populations of the genus *Botryococcus* (Chlorophyceae), *Archiv für Protistenkunde*, 141(1-2), 65-100.
- Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Ghoshal, A. K., & Das, D., 2014, Evaluation and optimization of two stage sequential in situ transesterification process for fatty acid methyl ester quantification from microalgae, *Renewable Energy*, 68, 560-569.
- Lam, M. K., & Lee, K. T., 2012, Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances*, 30(3), 673-690.
- Lee, I., Johnson, L. A., & Hammond, E.G., 1995, Use of branched-chain esters to reduce the crystallization temperature of biodiesel, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1155-1160.
- Lee, K.T., Foglia, T.A., Chang, K.S., 2002, Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 191-195.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010, Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresource Technology*, 101(1), S75-S77.

- Lepage, G., Roy, C.C., 1984, Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification, *Journal of Lipid Research*, 25(12), 1391-1396.
- Levasseur, W., Perr'e, P., Pozzobon, V.J.B.A., 2020, A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification, *Biotechnology Advances*, 107545.
- Lewis, T., Nichols, P.D., McMeekin, T.A., 2000, Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs, *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 107-116.
- Li, Y., Fine, F., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M., Carre, P., Pages, X., Chemat, F., 2014, Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds, *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 242-251.
- Li, B., Linghu, Z., Hussain, F., Smith, S. J., Amamcharla, J. K., 2016, Extraction of phospholipids from procream using supercritical carbon dioxide and ethanol as a modifier, *Journal of Animal Science*, 94, 256-256.
- Likozar, B., Pohar, A., Levec, J., 2016, Transesterification of oil to biodiesel in a continuous tubular reactor with static mixers: Modelling reaction kinetics, mass transfer, scaleup and optimization considering fatty acid composition, *Fuel Processing Technology*, 142:326–36.
- Lin, L., Cunshan, Z., Vittayapadung, S., Xiangqian, S., & Mingdong, D., 2011, Opportunities and challenges for biodiesel fuel, *Applied Energy*, 88(4), 1020-1031.
- Lupette, J., Benning, C., 2020, Biochimie human health benefits of very-long-chain polyunsaturated fatty acids from microalgae, *Biochimie*, 178, 15–25.
- Lürling, M.F.L.L.W., 2006, Effects of a surfactant (FFD-6) on *Scenedesmus* morphology and growth under different nutrient conditions, *Chemosphere*, 62(8), 1351-1358.

- Mahfouz, A.B., Ali, A., Crocker, M., Ahmed, A., Nasir, R., Show, P.L., 2023, Neural-network-inspired correlation (N2IC) model for estimating biodiesel conversion in algal biodiesel units, *Fermentation*, 9(1), 47.
- Mahmudul, H.M., Hagos, F.Y., Mamat, R., Adam, A.A., Ishak, W. F. W., Alenezi, R., 2017, Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72: 497-509.
- Maity, J.P., Bundschuh, J., Chen, C.-Y., Bhattacharya, P., 2014, Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emission and wastewater treatment: present and future perspectives – a mini review, *Energy*, 78,104-113.
- Mandalam, R.K., Palsson, B., 1998, Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, 59(5), 605–611 (1998)
- Mandotra, S.K., Kumar, P., Suseela, M.R., Nayaka, S., Ramteke, P.W., 2016, Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities, *Bioresource Technology*, 201, 222-229.
- Massana, R., Terrado, R., Forn, I., Lovejoy, C., Pedrós-Alió, C., 2006, Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans, *Environmental Microbiology*, 8:1515–1522.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Oliveira, O., Oliveira, S., Mendes, A.M., Caetano, N.S., 2016, Lipid content and productivity of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris* under mixotrophic conditions and salinity stress, *Chemical Engineering Transactions*.
- Mata, T.M., Melo, A.C., Simões, M., Caetano, N.S., 2012, Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*, *Bioresource Technology*, 107, 151-158.

- Mata, T.M., Martins, A.A., 2010, Biodiesel production processes, *Current Trends in Chemical Engineering*, 2(4), 313-343.
- Mehariya, S., Goswami, R.K., Karthikeysan, O.P., Verma, P., 2021, Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds, *Chemosphere*, 280, 130553.
- Meher, L.C., Sagar, D.V., Naik, S.N., 2006, Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3), 248-268.
- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P., Lopes da Silva, T., 2009, *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review, *Journal of Applied Phycology*, 21:199–214.
- Metzger, P., Casadevall, E., Pouet, M. J., Pouet, Y., 1985, Structures of some botryococcenes: branched hydrocarbons from the B-race of the green alga *Botryococcus braunii*, *Phytochemistry*, 24(12), 2995-3002.
- Metzger, P., Largeau, C., Casadevall, E., 1991, Lipids and macromolecular lipids of the hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii*: Chemical structure and biosynthesis; Geochemical and biotechnological importance, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1-70.
- Miao, X., Wu, Q., 2006, Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil, *Bioresource Technology*, 97(6), 841-846.
- Minhas, A.K., Barrow, C.J., Hodgson, P., Adholeya, A., 2020, Microalga *Scenedesmus bijugus*: Biomass, lipid profile, and carotenoids production in vitro, *Biomass and Bioenergy*, 142, 105749.
- Mirzadeh, S., Casazza, A.A., Converti, A., Nosrati, M., Shojaosadati, S.A., 2021, Repetitive non-destructive extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* grown under stress conditions, *Bioresource Technology*, 326, 124798.

- Mishra, S., Anand, K., Mehta, P.S., 2016, Predicting the cetane number of biodiesel fuels from their fatty acid methyl ester composition, *Energy & Fuels*, 30(12), 10425-10434.
- Mittelbach, M., Remschmidt, C., 2005, Biodiesel the comprehensive handbook second edit. Boersdruck Ges. mbH, Vienna.
- Mizik, T., Gyarmati, G., 2021, Economic and sustainability of biodiesel production—a systematic literature review, *Clean Technologies*, 3(1), 19-36.
- Mofijur, M., Masjuki, H.H., Kalam, M.A., Atabani, A.E., Arbab, M.I., Cheng, S.F., Gouk, S.W., 2014, Properties and use of Moringa oleifera biodiesel and diesel fuel blends in a multi-cylinder diesel engine *Energy Conversion and Management*, 82, 169-176.
- Mohsenpour, S.F., Richards, B., Willoughby, N., 2012, Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology*, 125, 75-81.
- Moradi-Kheibari, N., Ahmadzadeh, H., Hosseini, M., 2017, Use of solvent mixtures for total lipid extraction of *Chlorella vulgaris* and gas chromatography FAME analysis, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40, 1363-1373.
- Mubarak, M., Shaija, A., & Suchithra, T.V., 2015, A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production, *Algal Research*, 7, 117-123.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A., Bux, F., 2011, Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production, *Bioresource Technology*, 102:57–70.
- Nagappan, S., Bhosale, R., Duc Nguyen, D., Pugazhendhi, A., Tsai, P.-C., Chang, S.W., Ponnusamy, V.K., Kumar, G., 2020, Nitrogen-fixing cyanobacteria as a potential resource for efficient biodiesel production, *Fuel*, 279, 118440.

- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai, A.K., 2010, Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energ*, 14(2), 578-597.
- Nayak, J.K., Ghosh, U.K., 2019, Post treatment of microalgae treated pharmaceutical wastewater in photosynthetic microbial fuel cell (PMFC) and biodiesel production, *Biomass and Bioenergy*, 131, 105415.
- Nguyen, T.T., Lam, M.K., Uemura, Y., Mansor, N., Lim, J. W., Show, P. L., Lim, S., 2020, High biodiesel yield from wet microalgae paste via in-situ transesterification: effect of reaction parameters towards the selectivity of fatty acid esters, *Fuel*, 272, 117718.
- Nigam, P.S., Singh, A., 2011, Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68.
- Nunez, V. J., Voltolina, D., Nieves, M., Pina, P., Medina, A., & Guerrero, M., 2001, Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater, *Bioresource Technology*, 78(2), 161-164.
- Oğuz, A., Köker, L., Ozbayram, E.G., Akcaalan, R., Albay, M., 2024, Biodiesel Production from *Botryococcus sudeticus* and *Chlorella vulgaris*: Assessment of Nitrogen Deficiency on Lipid, Fatty Acid Yield and Biodiesel Properties, *Waste and Biomass Valorization*, 15(5), 2757-2768.
- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J.P., del Pino, V., Uronen, P., Legrand, C., 2012, Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors, *Energies*, 5, 1577–1592.
- Omar, H.H., 2002, Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(2), 95-100.
- Öğüt, H., Oğuz, H., Arısoy, H., 2003, Kolzadan Biyodizel Üretimini Analizi, *Tarımsal Mekanizasyon 21. Ulusal Kongresi*, 3-5 Eylül 2003, Konya.

- Packer, M., 2009, Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy, *Energy Policy*, 37(9), 3428-3437.
- Piligaev, A.V., Sorokina, K.N., Bryanskaya, A.V., Peltek, S.E., Kolchanov, N.A., Parmon, V.N., 2015, Isolation of prospective microalgal strains with high saturated fatty acid content for biofuel production, *Algal Research*, 12, 368-376.
- Piorreck, M., Baasch, K.H., Pohl, P., 1984, Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes, *Phytochemistry*, 23(2), 207-216.
- Plain, N., Largeau, C., Derenne, S., Couté, A., 1993, Variabilité morphologique de *Botryococcus braunii* (Chlorococcales, Chlorophyta): corrélations avec les conditions de croissance et la teneur en lipides, *Phycologia*, 32(4), 259-265.
- Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M.A., Thajuddin, N., 2012, Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: evaluation for biodiesel production, *Biomass and Bioenergy*, 37, 60-66.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., & Legrand, J., 2009, Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor, *Bioresource technology*, 100(23), 5988-5995.
- Pulz, O., Gross, W., 2004, Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 635-648.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, M.C., 2010, Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production, *Eukaryotic Cell*, 9, 486-501.
- Rai, M.P., Gupta, S., 2017, Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*, *Energy Conversion Management*, 141, 85-92.

- Ramos, A., Rouboa, A., 2020, Renewable energy from solid waste: life cycle analysis and social welfare, *Environmental impact assessment review*, 85, 106469.
- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., Ravishankar, G.A., 2006, Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents, *Bioresource Technology*, 98(3), 560-564.
- Renaud, S.M., Parry, D.L., Thinh, L.V., Kuo, C., Padovan, A., Sammy, N., 1991, Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture, *Journal of Applied Phycology*, 3, 43-53.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979, Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Microbiology*, 111(1), 1-61.
- Robles Medina, A., Molina Grima, E., Giménez Giménez, A., Ibáñez González, M.J., 1998, “Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids”, *Biotechnology Advances*, 16 (3), 517-580.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009, Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112.
- Ruangsomboon, S., 2015, Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition, *Bioresource Technology*, 191, 377-384.
- Ruangsomboon, S., Ganmanee, M., Choochote, S., 2013, Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. *J. Applied Phycology*, 25, 867–874.

- Ryckebosch, E., Muylaert, K., Foubert, I., 2012, Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 189-198.
- Sadvakasova, A.K., Akmukhanova, N.R., Bolatkhan, K., Zayadan, B.K., Ussebayeva, A.A., Bauenova, M.O., Allakhverdiev, S.I., 2019, Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(12), 5844-5853.
- Salam, K.A., Velasquez-Orta, S.B., Harvey, A.P., 2016, A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-product-a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 1179-1198.
- Sandani, W.P., Nishshanka, G.K.S.H., Premaratne, R.G. M.M., Wijayasekera, S.C.N., Ariyadasa, T.U. Premachandra, J.K., 2020, Comparative assessment of pretreatment strategies for production of microalgae-based biodiesel from locally isolated *Chlorella homosphaera*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(3), 295-305.
- Sarayloo, E., Simsek, S., Unlu, Y.S., Cevahir, G., Erkey, C., Kavakli, I.H., 2018, Enhancement of the lipid productivity and fatty acid methyl ester profile of *Chlorella vulgaris* by two rounds of mutagenesis, *Bioresource Technology*, 250, 764-769.
- Sathish, A., Smith, B.R., Sims, R.C., 2014, Effect of moisture on in situ transesterification of microalgae for biodiesel production, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(1), 137-142.
- Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J., 2010, Biodiesel from algae: challenges and prospects, *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 277-286.
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R.A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., ... & Yu, T. H. 2008. Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science*, 319(5867), 1238-1240.

- Senousy, H.H., Beakes, G.W., Hack, E., 2004, Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate utex 2629 (chlorophyceae), *Journal of Phycology*, 40(2), 412-423.
- Shanmugam, S., Mathimani, T., Anto, S., Sudhakar, M.P., Kumar, S.S., Pugazhendhi, A., 2020, Cell density, lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 304, 123061.
- Sharma, K.K., Schuhmann, H., Schenk, P.M., 2012, High lipid induction in microalgae for biodiesel production, *Energies*, 5(5), 1532-1553.
- Sharma, A.K., Sahoo, P.K., Singhal, S., Patel, A., 2016, Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp., 3 *Biotech*, 6, 1-12.
- Sheehan, J., Camobreco, V., Duffield, J., Graboski, M., Shapouri, H., 1998, An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles.
- Shen, X.F., Liu, J.J., Chu, F.F., Lam, P.K.S., Zeng, R.J., 2015, Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation, *Applied Energy*, 158, 348-354.
- Siddiki, S.Y.A., Mofijur, M., Kumar, P.S., Ahmed, S.F., Inayat, A., Kusumo, F., Mahlia, T.M.I., 2022, Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept, *Fuel*, 307, 121782.
- Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., Bux, F., 2015, Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal*, 94, 22-29.

- Skorupskaite, V., Makareviciene, V., Gumbyte, M., 2016, Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae: a review, *Fuel Processing Technology*, 150 (2016) 78–87.
- Soeder, C.J., Hegwald, E., 1992, *Scenedesmus* in Micro-algal biotechnology, *Hal*, 122-134.
- Spain, O., Plöhn, M., Funk, C., 2021, The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal, *Physiologia Plantarum*, 173(2), 526-535.
- Srinuanpan, S., Cheirsilp, B., Prasertsan, P., Kato, Y., Asano, Y., 2018, Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: nutrient starvations and cost-effective harvesting process, *Renewable Energy*, 122, 507-516.
- Srivastava, A., Prasad, R., 2000, Triglycerides-based diesel fuels, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4(2), 111–133.
- Stephenson, A.L., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G., 2010, Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks, *Biofuels*, 1(1), 47-58.
- Stern, R.F., Horak, A., Andrew, R.L., Coffroth, M.A., Andersen, R.A., Küpper, F.C., Jameson, I., Hoppenrath, M., Véron, B., Kasai, F., Brand, J., James, E.R., Keeling, P.J., 2010, Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine environments, *PLoS One*, 5:e13991.
- Sun, D., Zhu, J., Fang, L., Zhang, X., Chow, Y., Liu, J., 2013, De novo transcriptome profiling uncovers a drastic downregulation of photosynthesis upon nitrogen deprivation in the nonmodel green alga *Botryosphaerella sudeticus*, *BMC Genomics*, 14, 1-18.
- Sun, J., Xiong, X., Wang, M., Du, H., Li, J., Zhou, D., Zuo, J., 2019, Microalgae biodiesel production in China: a preliminary economic analysis, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 104, 296-306.

- Syrett, P.J., 1962, Nitrogen assimilation. In: Lewin, R.A. (ed.) *Physiology and Biochemistry of Algae*, 171–188. Academic Press, Newyork.
- Szybist, J.P., Song, J., Alam, M., Boehman, A.L., 2007, Biodiesel combustion, emissions and emission control, *Fuel Processing Technology*, 88(7), 679-691.
- Tan, X.B., Lam, M.K., Uemura, Y., Lim, J.W., Wong, C.Y., Ramli, A., Kiew, P.L., Lee, K.T., 2018, Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken compost as nutrients source: Growth optimization study and fatty acid composition analysis, *Energy Conversion Management*, 164, 363-373.
- Tanoi, T., Kawachi, M., Watanabe, M.M., Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*, *Journal of Applied Phycology*, 23, 25-33.
- Tejada-Ruiz, S., Gonzalez-Lopez, C., Rojas, E., Jiménez-Becker, S., 2020, Effect of the foliar application of microalgae hydrolysate (*Arthrospira platensis*) and silicon on the growth of *Pelargonium hortorum* LH Bailey under salinity conditions, *Agronomy*, 10(11), 1713.
- Teo, C.L., Idris, A., 2014, Evaluation of direct transesterification of microalgae using microwave irradiation, *Bioresource Technology*, 174, 281-286.
- Thompson, G.A., 1996, Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1302 (1), 17–45.
- Trainor, F.R., 1993, Cyclomorphosis in *Scenedesmus subspicatus* (Chlorococcales, Chlorophyta): stimulation of colony development at low temperature, *Phycologia*, 32(6), 429-433.
- Tsavatopoulou, V.D., Aravantinou, A.F., Manariotis, I.D., 2021, Biofuel conversion of *Chlorococcum* sp. and *Scenedesmus* sp. biomass by one-and two-step transesterification, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11, 1301-1309.
- Tsukahara, K., Sawayama, S., 2005, Liquid fuel production using microalgae, *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 48(5), 251-259.

- Valez-ojeda, R., Gonzalez-Munoz, M., Vs-Vazquez, R., Zapat, J.N., Chavarria-herandez, J.C., Adrian, S. L., Medrano, R.M E.G., 2015, Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production, *Algal Research*, 7, 33-44.
- Vazquez-Duhalt, R., Arredondo-Vega, B.O., 1991, Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (race A), *Phytochemistry*, 30(9), 2919-2925.
- Vazquez-Duhalt, R., Greppin, H. (1987). Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochemistry*, 26(4), 885-889.
- Vishwakarma, R., Dhar, D.W., Saxena, S., 2019, Influence of nutrient formulations on growth, lipid yield, carbon partitioning and biodiesel quality potential of *Botryococcus* sp and *Chlorella* sp., *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 7589-7600.
- Voltolina, D., Gómez-Villa, H., Correa, G., 2005, Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle, *Bioresource Technology*, 96(3), 359-362.
- Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K., Collet, C., 2005, Microalgae as bioreactors, *Plant Cell Reports*, 24:629–641.
- Walton, J., 1938, The fuel possibilities of vegetable oils, *Gas Oil Power*, 33:167–168.
- Wu, Y.H., Yu, Y., Hu, H.Y., 2014, Effects of initial phosphorus concentration and light intensity on biomass yield per phosphorus and lipid accumulation of *Scenedesmus* sp. LX1, *BioEnergy Research*, 7, 927-934.
- Xia, X., Xu, X., Lin, C., Yang, Y., Zeng, L., Zheng, Y., Chen, Q., 2020, Microalgal-immobilized biocomposite scaffold fabricated by fused deposition modeling 3D printing technology for dyes removal, *ES Materials & Manufacturing*, 7(8), 40-50.
- Xiao, M., Ma, H., Sun, M., Yin, X., Feng, Q., Song, H., Gai, H., 2019, Characterization of cometabolic degradation of p-cresol with phenol as growth substrate by *Chlorella vulgaris*, *Bioresource Technology*, 281, 296-302.

- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., Ying-Xue, S., 2010, Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp., *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500.
- Xu, W., Gao, L., Wang, S., Xiao, G., 2014, Biodiesel production in a membrane reactor using MCM-41 supported solid acid catalyst, *Bioresource Technology*, 159, 286-291.
- Yeh, K.L., Chang, J.S., 2012, Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31, *Bioresource Technology*, 105, 120-127.
- Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J., Chang, J.S., 2013, Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products, *Bioresource Technology*, 135, 166-174.
- Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., Li, B., 2020, A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions, *Bioresource Technology*, 301, 122804.
- Yoo, C., Jun, S. Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010, Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide, *Bioresource Technology*, 101(1), S71-S74.
- Zarrinmehr, M.J., Daneshvar, E., Nigam, S., Gopinath, K. P., Biswas, J. K., Kwon, E. E., Bhatnagar, A., 2022, The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties, *Bioresource Technology*, 344, 126303.
- Zhang, Y., Niu, S., Han, K., Li, Y., Lu, C., 2021, Synthesis of the SrO–CaO–Al₂O₃ trimetallic oxide catalyst for transesterification to produce biodiesel, *Renewable Energy*, 168, 981-990.

Zhou, S., Dai, F., Dang, C., Wang, M., Liu, D., Lu, F., Qi, H., 2019, Scale-up biopolymer-chelated fabrication of cobalt nanoparticles encapsulated in N-enriched graphene shells for biofuel upgrade with formic acid, *Green Chemistry*, 21(17), 4732-4747.



EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	AYÇA OĞUZ ÇAM
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Su Ürünleri Fakültesi
Bölümü	Su Ürünleri Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	15.06.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı
Programı	İçsu Kaynakları Yönetimi

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Deniz ve İçsu Kaynakları Yönetimi Anabilim Dalı
Programı	İçsu Kaynakları ve Yönetimi Programı

Makale ve Bildiriler	
Makaleler;	
Oğuz, A., Köker, L., Ozbayram, E. G., Akcaalan, R., & Albay, M. (2024). Biodiesel Production from Botryococcus sudeticus and Chlorella vulgaris: Assessment of Nitrogen Deficiency on Lipid, Fame Yield and Biodiesel Properties. <i>Waste and Biomass Valorization</i> , 15(5), 2757-2768.	
Akcaalan, R., Ozbayram, E. G., Kaleli, A., Cam, A. O., Koker, L., & Albay, M. (2023). Does environmental DNA reflect the actual phytoplankton diversity in the aquatic environment? case study of marine mucilage in the Sea of Marmara. <i>Environmental Science and Pollution Research</i> , 30(28), 72821-72831.	
Köker, L., Özbayram, E. G., Çam, A. O., Akçaalan, R., & Albay, M. (2023). Cyanocidal Effect of H ₂ O ₂ on the Bloom-Forming Microcystis aeruginosa and	

Sphaerospermopsis aphanizomenoides. *Aquatic Sciences and Engineering*, 38(4), 205-211.

Ozbayram, E. G., Köker, L., Çam, A. O., Akçaalan, R., & Albay, M. (2022). Temporal and Spatial Variations of the Bacterial Diversity in a Deep Alkaline Lake. *Water*, 14(24), 4097.

Özbayram, E. G., Çamur, D., Köker, L., Çam, A. O., Akçaalan, R., & Albay, M. (2022). The effects of climate change on aquatic ecosystems in relation to human health. *Aquatic Sciences and Engineering*, 37(3), 123-128.

Köker, L., Çam, A. O., Akçaalan, R., & Albay, M. (2022). Cyanobacterial Diversity and the Presence of Microcystins in the Küçük Menderes River Basin, Türkiye. *Aquatic Sciences and Engineering*, 37(3), 129-139.

Oğuz, A., ALBAY, R. A., KÖKER, L., GÜREVİN, C., Dorak, Z., & Albay, M. (2020). Driving factors affecting the phytoplankton functional groups in a deep alkaline lake. *Turkish Journal of Botany*, 44(6), 633-646.

Ayça, O. Ğ. U. Z., KALELİ, M. A., ALBAY, R. A., DEMO, L. K., Dorak, Z., Gaygusuz, Ö., ... & Albay, M. (2020). Composition and distribution of benthic diatoms in different habitats of Burdur River Basin. *Turkish Journal of Water Science and Management*, 4(1), 31-57.

Koker, L., Akcaalan, R., Oguz, A., Gaygusuz, O., Gurevin, C., Akat Kose, C., ... & Kinaci, C. (2017). Distribution of toxic cyanobacteria and cyanotoxins in Turkish waterbodies. *Journal of environmental protection and ecology*, 18(2), 425-432.

Akcaalan, R., Köker, L., Oğuz, A., Spoof, L., Meriluoto, J., & Albay, M. (2014). First report of cylindrospermopsin production by two cyanobacteria (*Dolichospermum mendotae* and *Chrysosporum ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey. *Toxins*, 6(11), 3173-3186.

Bildiriler;

The Effect of Seasonal Changes on the Phytochemical Analysis of Dominant Macroalgal Species at the Marmara Sea Özyurt D., OğuzÇam A., KökerDemo L., ÖzbayramE.G.,ÖztürkB.,AkçaalanAlbayR., AlbayM. 12th Aegean Analytical ChemistryDays, İstanbul,Türkiye,19 -22Ekim2023, ss.150

Development of a newmethod for determination of total antioxidant capacity of themacroalgae using fiber optic reflectance spectrophotometer ÖzyurtD., İmert E.,ÖztürkB., KökerDemoL., OğuzÇamA., ÖzbayramE.G., Berker ÇetinK. I., AkçaalanAlbay R., Albay M. Euro Analysis2023 Geneve, İsviçre,27 - 31Ağustos2023, ss.122

Siyanobakteri Aşırı Artışları ile Mücadelede Çevre Dostu Bir YöntemOlarak Hidrojen Peroksit Uygulaması KökerDemo L.,ÖzbayramE.G.,OğuzÇamA., AkçaalanAlbayR., AlbayM. 10.Ulusal Limnoloji Sempozyumu, Çankırı,Türkiye,4 -06Eylül2023, ss.14

IV. Tatlısu Ekosistemlerinde Yaygın Olarak Bulunan Chlorella vulgaris ve Botryococcus sudeticus Kültürlerinin Azot Eksikliği Koşullarında Biyodizel Verimlerinin İncelenmesi OğuzÇamA., KökerDemo L.,ÖzbayramE.G.,

- Akçaalan Albay R., Albay M. Ulusal Limnoloji Kongresi, Çankırı, Türkiye, 4 - 06 Eylül 2023, ss.15
- V. Variation of Water Quality in an Impacted Coastal Lagoon over the last decade (Küçükçekmece Lagoon, Turkey) Köker Demo L., Özbayram E.G., Oğuz Çam A., Akçaalan Albay R., Albay M. The 7th International Electronic Conference on Water Sciences session Water Ecosystems and Environmental Protection, 15 - 30 Mart 2023, ss.1-5
- VI. Water Quality and Risk Assessment in Rainwater Harvesting Ponds Özbayram E.G., Köker Demo L., Oğuz Çam A., Akçaalan Albay R., Albay M. 7th International Electronic Conference on Water Sciences (ECWS-7), 15 - 30 Mart 2023, ss.1-5
- Environmental friendly management of cyanobacteria blooms in rainwater harvesting ponds used for agricultural irrigation Özbayram E.G., Köker Demo L., Oğuz Çam A., Akçaalan Albay R., Albay M. 11th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industry, Gdansk, Polonya, 26 - 28 Ekim 2022, ss.42-44
- VII. Seçilen Antifauling Biyositlerin Sucul Ortamda Etkisi Albay M., Özbayram E.G., Köker Demo L., Oğuz Çam A., Akçaalan R. 5. Uluslararası Biyosidal Kongresi, Antalya, Türkiye, 5 - 07 Mart 2021, ss.80
- IX. Türkiye'deki İçme Su Kaynakları Ve Arıtma Tesislerinde Siyanobakteri Risklerinin Değerlendirilmesi OĞUZÇAM A., AKÇAALAN ALBAY R., KÖKER DEMO L., ÖZÜDOĞRU A., KARAASLANY., DİKMEN B., ALBAY M. 3rd International Water And Health Congress, İstanbul, Türkiye, 12 Kasım - 15 Eylül 2019, Ss.721-724
- X. Susurluk Havzası Balık Faunasına Katkılar Ve Bazı Türlerin Boy-Ağırlık İlişkisi Değerleri Gaygusuz Ö., Akçaalan Albay R., Albay M., Saç G., Dorak Z., Köker Demo L., Gürevin C., Oğuz Çam A., Fındık Çınar N., Bahçeci H. 20. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Mersin, Türkiye, 24 Eylül 2019, Ss.41
- XI. Beş Baraj Gölü Ve İki Doğal Gölde Siyanobakteri Ve Siyanotoksin Değişiminin İncelenmesi Köker Demo L., Oğuz Çam A., Dorak Z., Gaygusuz Ö., Aydın F., Saç G., Akçaalan Albay R., Albay M. 20. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Mersin, Türkiye, 24 Eylül 2019, Ss.29
- XI . Küçükmenderes Havzasındaki Göl Erde Su Kalitesinin Fitoplankton Kompozisyonu Açısından Değerlendirilmesi OĞUZÇAM A., AKÇAALAN ALBAY R., ALBAY M. 20. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Adana, Türkiye, 24 - 26 Eylül 2019, ss.42
- XI I. Diversity of cyanobacterial and cyanotoxins in Küçük Menderes basin, Turkey. Köker Demo L., Oğuz Çam A., Dorak Z., Gaygusuz Ö., Aydın F., Saç G., Akçaalan Albay R., Albay M. 11. International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC), Krakow, Polonya, 5 - 10 Mayıs 2019, ss.163
- XIV. The occurrence of toxic cyanobacteria blooms in Turkish freshwaters with the emphasis of emerging toxins AKÇAALAN ALBAY R., KÖKER DEMO L., OĞUZ ÇAM A., AYDIN E., ALBAY M. 16th International Conference on Chemistry and the Environment, Oslo, Norveç, 18 - 22 Haziran 2017, cilt.1, ss.5