

***Chlorella vulgaris*'DEN BİYODİZEL ÜRETİM
VERİMLİLİĞİNİN ARTTIRILMASI İÇİN
TRANSESTERİFİKASYON KOŞULLARININ
OPTİMİZASYONU**

**OPTIMIZATION OF TRANSESTERIFICATION
CONDITIONS FOR THE IMPROVEMENT OF
BIODIESEL PRODUCTIVITY FROM *Chlorella vulgaris***

BETÜL EGE YILMAZER

PROF. DR. HÜLYA YAVUZ ERSAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

ÖZET

***Chlorella vulgaris*'DEN BİYODİZEL ÜRETİM VERİMLİLİĞİNİN ARTTIRILMASI İÇİN TRANSESTERİFİKASYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

Betül Ege YILMAZER

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN

Ağustos 2024, 87 sayfa

Chlorella vulgaris mikroalg türünden asit katalizörü (H_2SO_4) ve baz katalizörü ($NaOH$) kullanılarak *in-situ* transesterifikasyon yöntemiyle biyodizel üretimi optimize edilmiştir. Optimum koşullar Merkezi Kompozit Tasarıma (CCD) dayalı Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM) yöntemi uygulanarak *in-situ* transesterifikasyon parametrelerinden olan alkol:biyokütle oranı (v/w), sıcaklık, katalizör konsantrasyonu (%) (katalizör:biyokütle) ve reaksiyon süresinin yağ asidi metil esteri (FAME) içeriğindeki C18:1 (%), C18:2+C18:3 (%) ve C16+C18 toplamına etkileri ve birbirleriyle etkileşimi incelenerek belirlenmiştir. Çalışmada biyodizel verimliliğinin artırılması amacıyla, FAME kompozisyonundaki C18:1 (%) ve toplam C16+C18 içeriği artarken C18:2+C18:3 (%) içeriğinin azalması hedeflenmiştir.

Optimum koşullar H_2SO_4 katalizörü için 5:1 (v/w biyokütle), ağırlıkça %85 katalizör konsantrasyonu (biyokütleye dayalı), 60°C reaksiyon sıcaklığı ve 72 dk reaksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullar için kuadratik yanıt yüzey modelinden elde edilen FAME içeriği; %49.71 C18:1, %1.40 C18:2+C18:3 ve 2.09556E+09 C16+C18 (total alan) olarak hesaplanmış olup, bu teorik sonuçlar %49.52±0.11 C18:1, %1.8±0.31 C18:2+C18:3 ve 2.08830E+09±1.70E+05 C16+C18 (total alan) deneysel sonuçlarıyla

tutarlılık göstermiştir. Bu koşullarda elde edilen FAME verimi %67.28 olarak hesaplanmıştır.

Optimum koşullar NaOH katalizörü için 39:1 (v/w biyokütle), %58 katalizör konsantrasyonu (biyokütleyle dayalı), 36°C reaksiyon sıcaklığı ve 64 dk reaksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullar için kuadratik yanıt yüzey modelinden elde edilen FAME içeriği; %48.46 C18:1, %3.03 C18:2+C18:3 ve 1.75019E+09 C16+C18 (total alan) olarak hesaplanmış olup, bu teorik sonuçlar %47.98±0.09 C18:1, %3.54±0.50 C18:2+C18:3 ve 1.74773E+09±1.54E+05 C16+C18 (total alan) deneysel sonuçlarıyla tutarlılık göstermiştir. Bu koşullarda elde edilen FAME verimi %38.68 olarak hesaplanmıştır.

H₂SO₄ katalizörü FAME kompozisyonu ve reaksiyon verimliliği bakımından NaOH katalizöründen daha iyi performans göstermiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, *Chlorella vulgaris* biyokütlesinin kaynağı hariç optimum *in-situ* transesterifikasyon koşulları aynı tutulmuş ve bu iki farklı biyokütle kaynağından üretilen FAME bileşimleri karşılaştırılmıştır. İlk kaynaktan elde edilen biyodizel ürünleri C18 yağ asitleri açısından yüksek içeriğe sahipken, ikinci kaynaktan elde edilen biyodizel ürünlerinin C16 yağ asitleri açısından yüksek içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma, optimize edilmiş *in-situ* transesterifikasyon yoluyla *Chlorella vulgaris* mikroalglerinden yüksek kaliteli FAME bileşiminin verimli bir şekilde üretilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Yanıt yüzey metodolojisi; optimizasyon; biyodizel; *in-situ* transesterifikasyon; *Chlorella vulgaris*

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF TRANSESTERIFICATION CONDITIONS FOR THE IMPROVEMENT OF BIODIESEL PRODUCTIVITY FROM *Chlorella vulgaris*

Betül Ege YILMAZER

Master of Science, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN

August 2024, 87 pages

Biodiesel production from microalgae species *Chlorella vulgaris* was optimized using *in-situ* transesterification with acid (H_2SO_4) and base (NaOH) catalysts. Response Surface Methodology (RSM) based on a Central Composite Design (CCD) was applied to investigate the effects and interactions of *in-situ* transesterification parameters; alcohol: biomass ratio (v/w), temperature, catalyst concentration (%) (catalyst:biomass), and reaction time on the responses of fatty acid methyl ester (FAME) content, specifically C18:1 (%), C18:2+C18:3 (%), and C16+C18 (total area). The study aimed to increase biodiesel yield by enhancing C18:1 (%) and total C16+C18 content while reducing C18:2 + C18:3 (%) content in the FAME composition.

For H_2SO_4 catalyst, the optimum conditions were determined as 5:1 (v/w biomass), 85% catalyst concentration by weight, 60°C reaction temperature, and 72 minutes reaction time. The FAME content obtained from the quadratic response surface model under these optimum conditions was calculated as 49.71% for C18:1 and 1.40% for C18:2+C18:3,

and a total area of $2.09556\text{E}+09$ for C16+C18. These theoretical results were in agreement with the experimental results of $49.52\pm0.11\%$ for C18:1, $1.80\pm0.31\%$ for C18:2+C18:3, and $2.08830\text{E}+09\pm1.70\text{E}+05$ for the total area of C16+C18. The FAME yield under these conditions was calculated as 67.28%.

For NaOH catalyst, the optimum conditions were determined as 39:1 (v/w biomass), 58% catalyst concentration by weight, 36°C reaction temperature, and 64 minutes reaction time. The FAME content obtained from the quadratic response surface model under these optimum conditions was calculated as 48.46% for C18:1 and 3.03% for C18:2+C18:3, and a total area of $1.75019\text{E}+09$ for C16+C18. These theoretical results were in agreement with the experimental results of $47.98\pm0.09\%$ for C18:1, $3.54\pm0.50\%$ for C18:2+C18:3, and $1.74773\text{E}+09\pm1.54\text{E}+05$ for the total area of C16+C18. The FAME yield under these conditions was calculated as 38.68%.

These results showed that H_2SO_4 catalyst had better performance in terms of FAME composition and reaction yield compared to NaOH catalyst.

In the second part of the study, all the *in-situ* transesterification conditions were kept the same except for the source of *Chlorella vulgaris* biomass to compare their FAME compositions by using these two different sources of biomass. Biodiesel products obtained from the first source were high in C18 fatty acids, while biodiesel products obtained from the second source had a high in C16 fatty acids.

This study confirms that an efficient production of high-quality FAME composition from microalgae *Chlorella vulgaris* could be possible through optimized *in-situ* transesterification.

Keywords: Response surface methodology; optimization; biodiesel; *in-situ* transesterification; *Chlorella vulgaris*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimini ve tecrübelerini her zaman paylaşan, fikir ve önerileriyle bana her konuda rehberlik edip yol gösteren, desteğini her daim hissettiğim tez danışmanım ve kıymetli hocam Prof. Dr. Hülya Yavuz Ersan’a,

Tez sürecim boyunca her an bilgi birikimi ve deneyimlerinden faydalandığım, desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Özge Yüksel Orhan’a,

Çalışmalarım süresince tecrübelerini paylaşarak çalışmama katkı sunan Araştırma Görevlisi Neslişah Cihan Ulus’a,

Tez çalışmamda mikroalgler konusundaki tecrübesiyle desteğini esirgemeyen Dr. Murat Yeşiltaş’a, mikroalg ünitesini kullanmama olanak sağlayan enstitü proje koordinatörümüz, Dr. Mehmet Ali Turan Koçer’e, tezim için gerekli analizlerin gerçekleşmesinde destek olan Dr. Faruk Pak’a ve Dr. Özgür Aktaş’a, tez çalışmamın desteklenmesini sağlayan Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü’ne,

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyerek bugünlere gelmemi sağlayan, en büyük motivasyon ve yaşam kaynaklarım, benim için tüm fedakarlıkları yapan ve tüm akademik bilgileriyle bana fikir veren canım ablalarım ve canım babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Betül Ege YILMAZER

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Küresel İklim Değişikliği Mitigasyonunda Biyoyakıtların Rolü	3
2.1.1. Biyoyakıtların Üretiminde Kullanılan Sürdürülebilir Biyokütle Kaynakları ..	4
2.1.2. Biyodizel: Alternatif Bir Yakıt Kaynağı	6
2.1.3. Mikroalglerin Biyodizel Üretimindeki Avantajları.....	7
2.2. Mikroalgler	10
2.2.1. Mikroalglerin Lipit Profili ve Biyodizel Üretimi Açısından Değerlendirilmesi.....	13
2.2.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	17
2.2.3. Mikroalg Biyoreaktör Sistemleri.....	18
2.2.3.1. Açık Havuz Sistemleri	19
2.2.3.2. Kapalı Sistemler	19
2.2.3.3. Hibrit Sistemler	20
2.3. Mikroalglerin Biyokonversiyonu: Biyodizel Üretim Yöntemi	21
2.3.1. <i>In-situ</i> Transesterifikasyon Prosesi	22
2.4. Yanıt Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM).....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Kimyasal Malzemeler	25

3.2. Mikroorganizma ve Kültür Ortamı	25
3.3. Analitik Yöntemler	27
3.3.1. pH Ölçümü.....	27
3.3.2. Hücre Sayımı.....	27
3.3.3. Optik Yoğunluk	28
3.4. Mikroalg Kültürlerinin Hasat Edilmesi	28
3.5. Mikroalglerin Kurutulması	28
3.6. Mikroalglerin Yağ Miktarının Tayin Edilmesi	29
3.7. <i>In-situ</i> Transesterifikasyon Prosesi	30
3.8. Biyodizelin Yağ Asidi Kompozisyonunun GC-FID ile Belirlenmesi	32
3.9. Biyodizelin Kimyasal Kompozisyonunun FTIR ile Belirlenmesi	32
3.10. <i>In-Situ</i> Transesterifikasyon Parametrelerinin RSM ile Optimizasyonu	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	33
4.1. <i>In-situ</i> Transesterifikasyon Prosesi Deneysel Sonuçları	33
4.2. <i>In-situ</i> Transesterifikasyon Parametrelerinin RSM Optimizasyonu	36
4.3. RSM Kullanılarak Optimize Edilen <i>In-situ</i> Transesterifikasyon Koşullarında Üretilen Biyodizel Ürünleri İçin GC-FID Analizi	49
4.4. RSM Kullanılarak Optimize Edilen <i>In-situ</i> Transesterifikasyon Koşullarında Üretilen Biyodizel Ürünleri İçin FTIR Analizi	52
4.5. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Mikrobiyal Gelişimi ve Stok Kültür Koşulları	54
4.6. Stok Kültüründe Yetiştirilen <i>Chlorella vulgaris</i> 'den Optimum <i>In-situ</i> Transesterifikasyon Koşullarında Üretilen Biyodizel Ürünleri İçin GC-FID Analizi	55
5. YORUM.....	56
6. KAYNAKLAR	58
EKLER.....	73
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	73
ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Atmosferdeki CO ₂ konsantrasyonu (ppm) (1980-2024).	4
Şekil 2.2. Son 40 yılda petrol kaynaklı (●) ve biyodizel (▲) yakıt üretimi (varil/gün) (noktalı çizgiler doğrusal regresyonu ifade etmektedir)	4
Şekil 2.3. Mikroalg türlerinin % CO ₂ biyofiksasyon kapasitesi	8
Şekil 2.4. Bitkisel ve mikroalg kaynaklı biyoyakıtların verim karşılaştırması.....	9
Şekil 2.5. Mikroalg türlerinin mikroskopik görüntüleri; (a) <i>Haematococcus pluvialis</i> , (b) <i>Chlorella vulgaris</i> , (c) <i>Dunaliella salina</i> , (d) <i>Ochromonas danica</i> , (e) <i>Euglena</i> <i>gracilis</i> ve (f) <i>Porphyridium cruentum</i>	11
Şekil 2.6. Filum ve hücre yapısı ile temsil edilen mikroorganizmalar: (A) <i>Arthrospira</i> <i>platensis</i> , (B) <i>Chlorella vulgaris</i> , (C) <i>Porphyridium purpureum</i> , ve (D) <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	12
Şekil 2.7. Lipitlerin Kimyasal Yapısı. (1) Palmitik asit (16:0); (2) Palmitoleik asit (16:1); (3) Linoleik asit (18:2); (4) DAG (16:0/16:1); (5) TAG (16:0/16:1/16:0). Kısaltmalar: DAG: diaçilgliserol; Free FA: Serbest yağ asidi; TAG: triaçilgliserol	14
Şekil 2.8. Mikroalg lipitlerinin yağ asidi profili.....	15
Şekil 2.9. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in mikroskopik görüntüsü.....	18
Şekil 2.10. Mikroalg türlerinin literatürden derlenen % lipit içeriği karşılaştırması.....	18
Şekil 2.11. Mikroalg yetiştirme sistemleri: a) raceway kanal tipi havuz (New Mexico State University) , b) horizontal tübüler fotobiyoreaktör.....	21
Şekil 2.12. Trigliseritten biyodizel üretiminin kimyasal denklemi.....	21
Şekil 2.13. Geleneksel transesterifikasyon süreci ile <i>in-situ</i> transesterifikasyon sürecinin karşılaştırılması.	22
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kesikli tip fotobiyoreaktörler.	26
Şekil 3.2. a) Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı, b) <i>C. vulgaris</i> hücrelerinin Thoma lamı üzerindeki mikroskop görüntüleri (40X).	27
Şekil 3.3. a) Hasat edilen <i>C. vulgaris</i> biyokütlesi, b) Santrifüj cihazı.	28
Şekil 3.4. Liyofilizatör.	29
Şekil 3.5. Yağ tayin ekstraksiyon cihazı.	30
Şekil 3.6. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in <i>in-situ</i> transesterifikasyon, FAME ekstraksiyonu ve GC- FID ile FAME bileşen analizi prosedürü.	31

Şekil 3.7. a) Çalkalamalı su banyosu, b) Rotary evaporatör.....	31
Şekil 4.1. Asit katalizör kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında FAME C18:1 içeriği (%) yanıt yüzey grafikleri. a) alkol-sıcaklık ilişkisi, b) alkol-asit konsantrasyonu ilişkisi, c) alkol-zaman ilişkisi, d) asit konsantrasyonu-zaman ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.....	39
Şekil 4.2. C18:2+C18:3 (%) için a) alkol-asit konsantrasyonu ilişkisine, b) alkol-sıcaklık ilişkisine, c) alkol-zaman ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.	40
Şekil 4.3. C16+C18 toplam alanı için; a) alkol-sıcaklık ilişkisine, b) alkol-asit konsantrasyonu ilişkisine, c) alkol-zaman ilişkisine, d) sıcaklık-asit konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.....	42
Şekil 4.4. C18:1 yüzde değeri için a) sıcaklık-alkol ilişkisine, b) baz konsantrasyonu-alkol ilişkisine, c) zaman-alkol ilişkisine, d) baz konsantrasyonu-sıcaklık ilişkisine, e) zaman-sıcaklık ilişkisine ve (f) zaman-baz konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.....	45
Şekil 4.5. C18:2+C18:3 yüzde değeri için a) alkol- baz konsantrasyonu ilişkisine, b) baz konsantrasyonu-sıcaklık ilişkisine, c) zaman-sıcaklık ilişkisine, d) zaman-baz konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.....	47
Şekil 4.6. C16+C18 total alanı için, a) baz konsantrasyonu-alkol ilişkisine, b) sıcaklık-zaman ilişkisine, c) zaman-baz konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.	48
Şekil 4.7. H ₂ SO ₄ katalizörü varlığında optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında (5:1 MeOH: biyokütle oranı (v/w), %85 katalizör, 60 °C, 72 dk) elde edilen FAME'in GC-FID kromatogramı.....	51
Şekil 4.8. NaOH katalizörü varlığında optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında (39:1 MeOH: biyokütle oranı (v/w), %58 katalizör, 36 °C, 64 dk) elde edilen FAME'in GC-FID kromatogramı.....	52
Şekil 4.9. H ₂ SO ₄ katalizörü varlığında optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında (5:1 metanol: biyokütle oranı (v/w), % 85 katalizör, 60 °C, 72 dk) elde edilen FAME'in FTIR spektrumu.	53
Şekil 4.10. NaOH katalizörü varlığında optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında (39:1 metanol: biyokütle oranı (v/w), % 58 katalizör, 36 °C, 64 dk) elde edilen FAME'in FTIR spektrumu.	53

Şekil 4.11. a) Stok kültürlerinin zamana bağlı hücre konsantrasyonu (hücre/mL), b) Stok kültürlerinin 750 nm'deki zamana bağlı optik yoğunluk değerleri, c) Stok kültürlerinin zamana bağlı pH değerleri.....54



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikroalgler ve bitkisel biyodizel kaynakları lipit içeriği ve biyodizel verimi karşılaştırması.	8
Çizelge 2.2. Mikroalg türlerinin biyokimyasal kompozisyonu.	12
Çizelge 2.3. Mikroalg türlerinin lipit içeriği ve lipit verimlilikleri.....	14
Çizelge 2.4. Biyodizel ham maddelerinin yağ asidi profili karşılaştırması.	16
Çizelge 3.1. Basal Medium (BBM) kültür ortamı içeriği.....	25
Çizelge 4.1. H ₂ SO ₄ katalizörü kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon deney sonuçları. ..	33
Çizelge 4.2. NaOH katalizörü kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon deney sonuçları. ..	35
Çizelge 4.3. Asit katalizör (H ₂ SO ₄) için üç seviyeli faktöriyel tasarıma dayalı faktör ve yanıtların kodlanmış ve elde edilmiş değerleri.	37
Çizelge 4.4. Asit katalizör kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon prosesi için C18:1 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.	38
Çizelge 4.5. Asit katalizör kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon prosesi için C18:2+C18:3 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.	39
Çizelge 4.6. Asit katalizör kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon prosesi için C16+C18 içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.	41
Çizelge 4.7. Baz katalizör (NaOH) için üç seviyeli faktöriyel tasarıma dayalı faktör ve yanıtların kodlanmış ve elde edilmiş değerleri.	43
Çizelge 4.8. Baz katalizör kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon prosesi için C18:1 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.	44
Çizelge 4.9. Baz katalizör kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon prosesi için C18:2+C18:3 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.	46
Çizelge 4.10. Baz katalizör kullanılan <i>in-situ</i> transesterifikasyon prosesi için C16+C18 içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.	47
Çizelge 4.11. <i>Chlorella vulgaris</i> mikroalginden biyodizel üretimi için RSM kullanılarak elde edilen optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşulları ve yanıtlar.	49
Çizelge 4.12. H ₂ SO ₄ kullanılarak optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında gerçekleşen biyodizel üretimi (n=4) GC-FID sonuçları.	50
Çizelge 4.13. NaOH kullanılarak optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında gerçekleşen biyodizel üretimi (n=4) GC-FID sonuçları.	51

Çizelge 4.14. BBM stok kültüründe çoğaltılan <i>Chlorella vulgaris</i> mikroalginden H ₂ SO ₄ ve NaOH katalizör kullanılarak optimum <i>in-situ</i> transesterifikasyon koşullarında üretilen biyodizel ürünlerinin FAME kompozisyonları.	55
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Derece Celcius
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µm	Mikrometre
CO ₂	Karbondioksit
-CH ₂ -	Metilen grubu
-CH ₃	Metil grubu
CH ₄	Metan
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
MeOH	Metanol (CH ₃ OH)
NaOH	Sodyum hidroksit
N ₂ O	Nitröz oksit
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat

Kısaltmalar

ANOVA	Varyans nalizi
BBM	Bold Basal Medium
ASTM	American Society for Testing and Materials
CCD	Merkezi Kompozit Tasarım
DAG	Diaçilgliserol

FAE	Yağ Asidi Esteri
FAME	Yağ Asidi Metil Esteri
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-FID	Gaz kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektör
MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asitleri
RSM	Yanıt Yüzey Metodolojisi
SFA	Doymuş Yağ Asitleri
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri



1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışı ve sanayileşmenin hızlanmasıyla birlikte, enerji talebindeki artış fosil yakıtlara olan bağımlılığı ve petrol ürünlerinin tüketimini önemli ölçüde artırmıştır. Küresel enerji arzını karşılamak için tüketilen fosil yakıt rezervlerinin giderek azalması yakıt maliyetlerinin artmasına sebep olmakta ve doğal kaynaklara sahip olmayan yoksul ülkelerin ekonomileri üzerinde büyük bir baskı oluşturmaktadır [1]. Fosil yakıtların yanmasıyla atmosfere salınan karbondioksit (CO₂), metan (CH₄), nitroz oksit (N₂O), hidroflorür karbon (HFC), perfloro karbon (PFC), ve sülfürhekza florid (SF₆) sera gazları iklim değişikliğine yol açmaktadır. Küresel iklim değişikliğinin etkilerini hafifletmek amacıyla, petrol ürünleri için alternatif ve yenilenebilir kaynakların araştırılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesine olan ilgi giderek artmaktadır.

Araştırmalar, biyodizelin ideal bir alternatif enerji kaynağı olarak sentezlenmesini sağlamıştır. Biyodizel dizel yakıtla benzer özellikler göstermesiyle birlikte biyolojik olarak parçalanabilir ve sürdürülebilir olmasına rağmen tüketimi yaygın değildir. Biyodizelin yaygın kullanımının önündeki en büyük engel, biyokütlenin ham madde olarak temin edilmesi ve biyodizele dönüştürülmesi sürecinden kaynaklanan üretim maliyetidir [2]. Biyodizel, üretim kaynaklarına bağlı olarak üç nesle ayrılmıştır. Birinci nesil biyoyakıtların, tarım ürünlerinden elde edilmesi nedeniyle arazi, gübre ve su gibi kaynaklara olan ihtiyaçları, gıda üretimiyle doğrudan rekabet yaratmaktadır. İkinci nesil biyoyakıtlar, tarımsal atıkların ve ahşap endüstrisinin selüloz ürünlerinden elde edilmekte olup, selülozun yakıtı dönüştürülmesi için ön işlem ve maliyetli süreçler gerektirdiğinden ekonomik değildir [3]. Üçüncü nesil biyoyakıtların ham maddelerini mikroalgler ve siyanobakteriler oluşturmaktadır. Mikroalgler birinci nesil biyoyakıtlara göre daha hızlı büyüme yeteneğine sahip olmaları ve ikinci nesil biyoyakıtlara kıyasla pahalı dönüşüm ve ön işlem süreçleri gerektirmemeleri nedeniyle biyoyakıt üretimi için oldukça değerli alternatif kaynaklar olarak öne çıkmaktadır [4,5].

Mikroalglerden biyodizel, mikroemülsiyon, katalitik kraking ve transesterifikasyon gibi çeşitli yöntemlerle üretilir. Biyodizel, transesterifikasyon prosesi kullanılarak mikroalg biyokütlesindeki lipidlerin FAME'e (yağ asidi metil esterleri) dönüştürülmesiyle elde edilir. Geleneksel transesterifikasyon yöntemiyle biyodizel üretimi lipid ekstraksiyonu ve transesterifikasyon reaksiyonu şeklinde iki basamaktan oluşur. Öncelikle biyokütle ham maddesindeki yağ kimyasal çözücüler kullanılarak

ekstrakte edilir. Daha sonra, lipitin (trigliserit) metanol (yaygın olarak) ve katalizör varlığında reaksiyonuyla yağ asidi esterleri (FAE) oluşarak transesterifikasyon süreci gerçekleşir. Transesterifikasyon prosesi, reaksiyon sıcaklığı, katalizör türü, katalizör konsantrasyonu, alkol türü ve yağın molar oranı, reaksiyon süresi ve karıştırma hızı gibi çeşitli parametrelerden etkilenir [1].

Transesterifikasyon prosesinin büyük miktarda tehlikeli çözücü atığı üretmesi ve yağ ekstraksiyonu ön süreci gerektirmesi nedeniyle bu sınırlamaları aşmak için mikroalglerden yağ ekstraksiyonu adımını elimine eden ve biyokütleden doğrudan transesterifikasyon gerçekleştirilen *in-situ* transesterifikasyon prosesi geliştirilmiştir.

Biyodizelin kinetik viskozite, yoğunluk, akma noktası, bulutlanma noktası, soğuk filtre tıkanma noktası, setan sayısı, oksidatif stabilite gibi özellikleri motorun uzun süreli çalışma performansı üzerinde güçlü bir etki göstermektedir. Biyodizel özellikleri büyük ölçüde FAME bileşimi tarafından belirlenir; burada yağ asidi zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi en etkili faktörlerdir [6]. Biyodizelin kimyasal özellikleri ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials) standardına göre belirlenmektedir. Tekli doymamış yağ asidi metil esterleri (C18:1), oksidasyon stabilitesi açısından çoklu doymamış olanlara (C18:2 ve C18:3) göre daha iyi olarak kabul edilir ve yakıtın soğuk akış özellikleri üzerinde olumsuz bir etki yaratmaz [7]. Biyodizelde doymamış yağ asitlerinin içeriği, oksidasyon stabilitesiyle doğrudan ilişkilidir. Yağ asidi zincirlerindeki çift bağların sayısı arttıkça oksidasyon hızı da artmaktadır [8].

In-situ transesterifikasyon prosesiyle üretilen FAME bileşimlerine yönelik reaksiyon parametreleri hakkında literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmaların büyük çoğunluğu, mikroalglerden elde edilen biyodizel verimini optimize etmeye odaklanmış olup, yağ asidi kompozisyonu üzerine çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

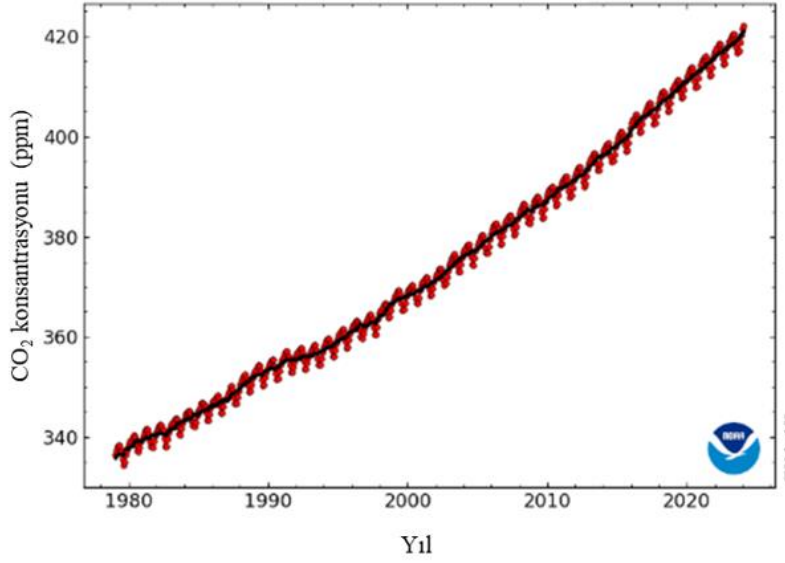
Bu tez çalışması *Chlorella vulgaris* mikroalg türünden *in-situ* transesterifikasyon prosesi ile biyodizel eldesi için alkol:biyokütle oranı (v/w), katalizör türü ve konsantrasyonu (biyokütleye dayalı), sıcaklık, reaksiyon süresi gibi önemli değişkenlerin, biyodizel kompozisyonunda C18:1 (%) ve toplam C16+C18 içeriğini (toplam alan) maksimize ederken C18:2+C18:3 (%) içeriğini minimize etmeyi amaçlayan Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM) ve Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) matrisi kullanılarak optimizasyonunu amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

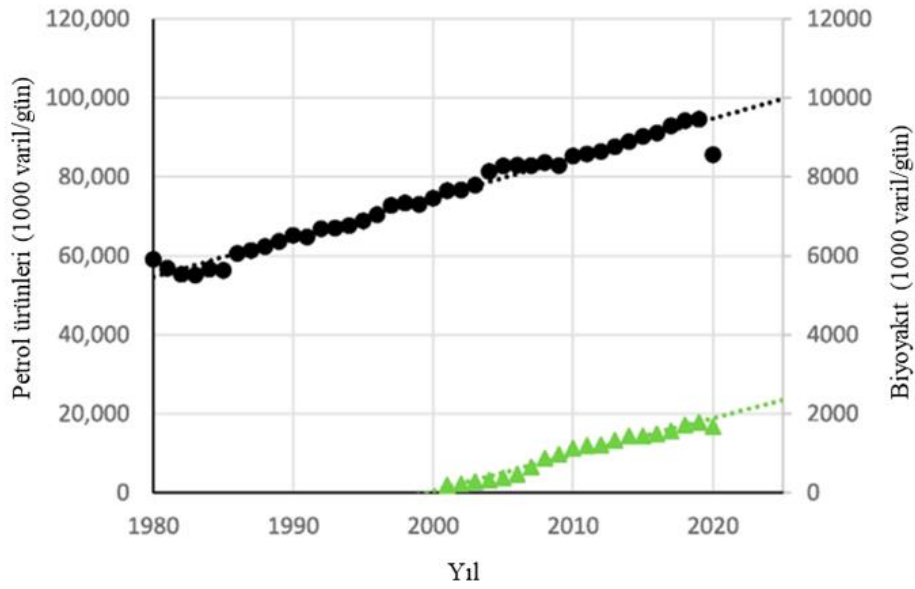
2.1. Küresel İklim Değişikliği Mitigasyonunda Biyoyakıtların Rolü

Dünya genelinde artan enerji ihtiyacı, fosil kaynaklı yakıtlar gibi geleneksel enerji kaynaklarına olan bağımlılığı beraberinde getirmekte, bu durum fosil kaynaklı yakıt rezervlerinin giderek azalması ve yakıt maliyetlerinin artmasına sebep olmaktadır. Küresel enerji talebinin 2040 yılına kadar %78 oranında fosil bazlı yakıtlar (kömür, doğal gaz ve petrol) tarafından karşılanması beklenmektedir [9]. Fosil yakıtların yanması sonucu atmosfere salınan yüksek miktarda CO₂, sera gazı etkisini tetikleyerek küresel ısınmaya neden olmakta ve iklim değişikliği gibi çevresel sorunları daha da derinleştirmektedir. İnsan kaynaklı faaliyetler tarafından salınan küresel CO₂'in yaklaşık %87'sinin fosil yakıtların kullanımından kaynaklandığı yakın zamanda bildirilmiştir; bu oran kömür için %43, petrol için %36 ve doğal gaz için ise %20 olarak tespit edilmiştir [10]. 1980 yılından günümüze kadar atmosferdeki CO₂ konsantrasyonu artışı Şekil 2.1'de gösterilmiş, Nisan 2024 için hesaplanan konsantrasyon 422.16 ppm olarak belirtilmiştir [11]. 2023 yılında CO₂ emisyonunun, 2022'ye göre %0.1 oranında artarak 35.8 Gt CO₂'e ulaştığı tespit edilmiştir [12]. Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli (The Intergovernmental Panel on Climate Change – IPCC)'nin hazırladığı 6. Değerlendirme Raporuna göre, CO₂, CH₄ ve N₂O'nun artan konsantrasyonlarının sanayi çağında küresel ortalama yüzey sıcaklığında 1.4°C'lik bir artışa neden olduğu, bunun 1.1°C'sinin insan faaliyetlerinden kaynaklandığı hesaplanmıştır [13]. IPCC raporuna göre mevcut küresel ısınma oranı devam ederse 2040 yılı civarında insan kaynaklı küresel ısınmanın 1.5°C'ye ulaşacağı belirtilmiştir. [14]. Kyoto Protokolü (1996) ve Paris Anlaşması (2015) ile IPCC tarafından hazırlanan son rapor göz önüne alındığında, bu senaryoyu değiştirmek için acil bir eylem planına ihtiyaç vardır.

Fosil yakıtların yerine geçebilecek yenilenebilir enerji kaynaklarının araştırılması, CO₂ emisyonunun azaltılması açısından büyük önem taşımaktadır. Biyoyakıtlar, konvansiyonel enerji kaynaklarının sebep olduğu çevresel endişelerin ve enerji talebinin artması ile birlikte fosil yakıtların alternatifi olarak önem kazanmaktadır (Şekil 2.2). Biyokütle, fosil yakıt emisyonlarını dengeleme potansiyeline sahip organik bir materyal olması sebebiyle son on yılda biyoyakıt kaynağı olarak giderek daha fazla ilgi çekmiştir. Rapor edilen tahmini hesaplamalara göre, biyokütle 2050 yılına kadar 3000 TWh elektrik enerjisi üreterek yılda 1.3 milyar ton CO₂ eşdeğeri emisyon tasarrufu sağlayabilir [15].



Şekil 2.1. Atmosferdeki CO₂ konsantrasyonu (ppm) (1980-2024) [11].



Şekil 2.2. Son 40 yılda petrol kaynaklı (●) ve biyodizel (▲) yakıt üretimi (varil/gün) (noktalı çizgiler doğrusal regresyonu ifade etmektedir) [16].

2.1.1. Biyoyakıtların Üretiminde Kullanılan Sürdürülebilir Biyokütle Kaynakları

Biyoyakıtlar, üretiminde kullanılan biyokütle ham maddesi türüne göre nesillere ayrılmaktadır. Birinci nesil biyoyakıtlar, tahıllardan elde edilen bitkisel yağ, şeker bitkileri ve yağ içeriği yüksek tohumlar gibi tüketilebilir ham maddelerden (kanola yağı, şeker kamışı, soya yağı, mısır yağı, palmiye yağı, hardal yağı, hindistan cevizi yağı, zeytin

yağı, pirinç yağı, vb.) elde edilir [17]. Biyokütleden yağlar çıkarılır ve fermentasyon ve transesterifikasyon yoluyla biyoetanol veya biyodizele dönüştürülür. Birinci nesil sıvı biyoyakıtlardan en bilinen, sakkaroz içeriği yüksek şeker veya nişastalı ürünlerin, sakkaroz içeriği ekstrakte edilerek fermentasyonu ile elde edilen biyoetanoldür [18]. Ancak birinci nesil biyoyakıtların kullanımının pratikte uygulanabilir olup olmadığı konusundaki tartışmalar devam etmektedir [19,20]. Bu tür biyoyakıtların üretimi için gerekli olan tüketilebilir ham maddeler, arazi, gübre ve su gibi kaynakları gerektirdikleri için, gıda üretimi ile rekabet halindedir. Bu durum yüksek üretim maliyetlerine ve tarımsal kaynakların etkin olmayan kullanımına yol açabilmektedir. Ayrıca biyoyakıtların sera gazı emisyonlarını gerçekten azaltıp azaltmadığı konusu da tartışmalıdır; zira bazı biyoyakıt çeşitleri, üretim sürecinde, kullanımdan daha fazla emisyonu sebep olacak şekilde negatif net enerji verimliliğine sahip olabilir [21]. Searchinger vd. tarafından yayınlanan çalışmaya göre, mısırdan üretilen etanolün prosesi, sera gazı emisyonunu iki katına çıkarmaktadır [22]. Bu kısıtlamaların önüne geçmek amacıyla tüketilmeyen ikinci nesil biyoyakıt ham maddeleri araştırılmıştır. İkinci nesil biyoyakıtlar, neem yağı, jatropha yağı, karanja yağı, *calophyllum inophyllum* yağı vb. gibi tüketilmeyen ham maddelerden elde edilmektedir [23,24]. İkinci nesil biyoyakıtların üretim süreçleri, genellikle daha karmaşık ve maliyetli teknolojiler gerektirir. Özellikle, biyoetanol üretimi sırasında lignoselülozik biyokütlenin parçalanması için gerekli olan ön işleme süreçleri (enzim üretimi, hidroliz, fermentasyon ve biyorafineri vb. [25,26]) yüksek teknoloji ve enerji tüketimi gerektirir [27]. Tüketilemeyen bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoyakıtlar, genellikle birinci nesil biyoyakıtlara kıyasla daha düşük enerji performansına sahiptir [28]. Transesterifikasyon işlemi için yüksek miktarda alkol gereksinimi, ikinci nesil biyoyakıtları dezavantajlı bir hale getirmektedir [29]. İkinci nesil biyokütleyi kullanmanın yüksek maliyeti nedeniyle araştırmacılar alternatif bir biyokütle kaynağı araştırması ortaya koymuşlardır. Mikroalg ve atık yağlardan üretilen biyoyakıtlar üçüncü nesil kategorisinde yer almaktadır. Mikroalg biyokütleleri yüksek lipid içerikleri nedeniyle biyokütle kaynağı olarak tercih edilmektedir. Mikroalglerin zor koşullara adaptasyonu, yüksek büyüme hızı dikkat çekmekte ve biyoyakıta dönüştürülerek fosil yakıtların yerini alabilecek sürdürülebilir bir enerji kaynağı olarak araştırma konusu olmaktadır. Üçüncü nesil biyoyakıtlar biyokimyasal özellikleri ve çevresel parametrelere esnekliğiyle ekonomik fizibilitiyi etkileyen önceki nesil ham maddelerin karşılaştığı sorunları yenmektedir [28]. Dördüncü nesil biyoyakıtlar, biyoyakıt verimini artırmak için yüksek lipid ve karbonhidrat içeriği biriktiren genetiği değiştirilmiş mikroalg

biyokütlesinin kullanımıyla üretilir [30]. Genetik olarak modifiye edilmiş mikroalglerden biyoyakıt üretimi diğer nesil biyoyakıtlara göre minimum çevresel etkiye sahip olmayı hedeflemekte olup hala araştırma aşamasındadır. Genetik olarak modifiye edilmiş mikroalglerin neden olabileceği potansiyel çevresel problemler (doğal çevredeki değişiklikler, toksisite, yatay gen transferi ve yerli türlerle rekabet vb.) araştırılmaktadır.

2.1.2. Biyodizel: Alternatif Bir Yakıt Kaynağı

Biyodizel, dizel yakıta benzer özelliklere sahip bir biyoyakıt türüdür. Dizel yakıta kıyasla başlıca avantajları çevre dostu, yenilenebilir, yüksek parlama noktasına sahip, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve toksik olmamasıdır [31]. Biyodizel terimi ASTM (American Society for Testing and Materials) tarafından, tüketilebilen yağlar, tüketilmeyen yağlar ve atık yağlar gibi trigliseritlerin metanol ve katalizör kullanılarak transesterifikasyon süreciyle üretilen uzun zincirli yağ asitlerinin monoalkil esterleri için kullanılır [32]. Biyodizelin saflığı, bileşimi, verimi (setan sayısı, oksidasyon stabilitesi, parlama, akma, bulutlanma noktası vb.) ve maliyeti üretildiği biyokütle kaynağına göre değişiklik gösterir [33]. Lim vd. yaptığı çalışmaya göre biyodizel maliyetinin %75'i yalnızca ham maddeden kaynaklanmaktadır [34]. Biyodizel kaynağı, yerel iklim şartlarıyla da ilişkilendirilir. Biyodizel üretimi için besin maddeleri bölgeye özgü olduğundan ve istenen özelliklerin aynı zamanda o bölgenin iklim koşullarına bağlı olduğundan, farklı ülkeler/bölgeler biyodizel için farklı standartlara sahiptir. ABD'de ASTM D6751, Avrupa Birliği'nde EN 14214 ve Hindistan'da IS 15607 standartları takip edilmektedir [35]. ABD'de biyodizel üretiminde sıkça kullanılan soya fasulyesi yağı, Avrupa ve tropikal bölgelerde yaygın olarak tercih edilen kanola ve palmiye yağına kıyasla farklı bir seçenektir [36,37].

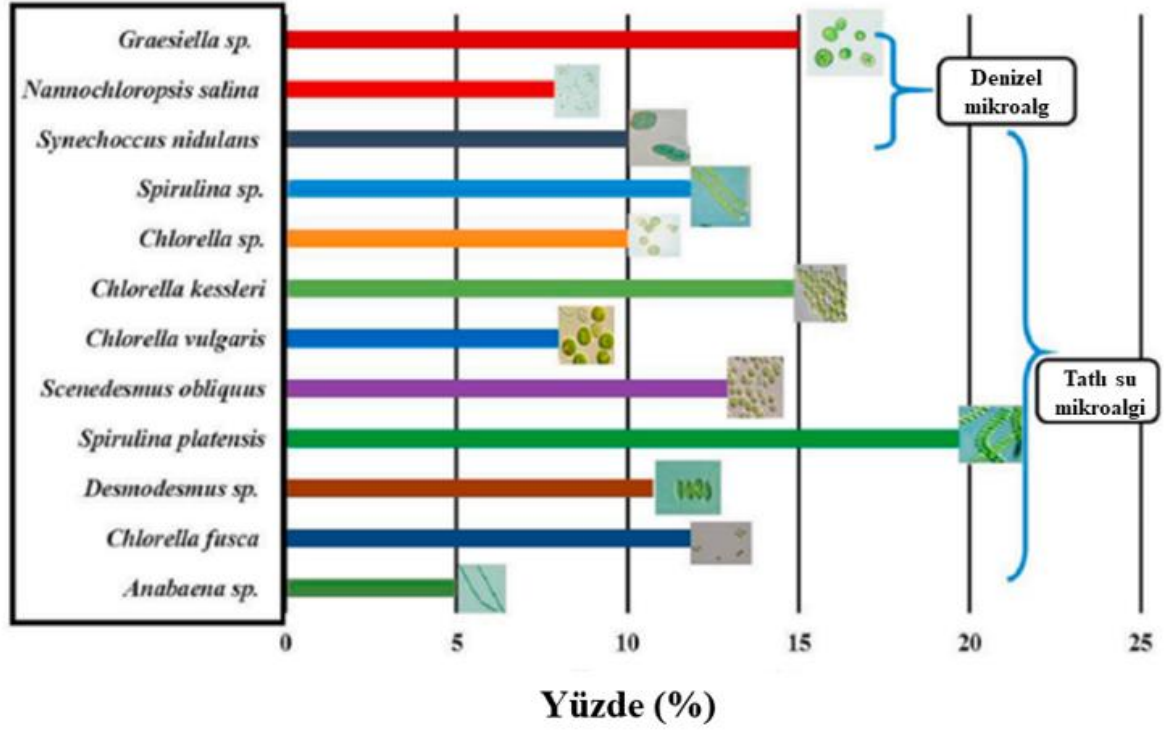
Biyodizel, besin maddesinin yağ asidi bileşimine bağlı olarak geniş bir özellik yelpazesine sahip olabilir. Biyodizel üretimi üzerine yapılan birçok çalışma, ham maddelerde bulunan en yaygın doymuş yağ asitlerinin palmitik, miristik, stearik, laurik, araşidik asit vb. olduğunu göstermiştir. Biyodizel üretimi için tercih edilen asitler, orta uzunlukta karbon zincirlerine sahip TAGlerdir (triacilgliserol): palmitik asit gibi 16 (C16) ve oleik, linoleik ve stearik asitler dahil 18 (C18). Bu esterler, biyodizelin bozunma ve oksidasyona karşı direncini sağlar ve bunun sonucu olarak setan sayısını artırır. Doymuş lipidlerin yüksek miktarda bulunması, düşük seviyelerde akma noktasına sebep olan bulutlanma noktasını değiştirir ve bu da biyodizelin yakıt hatlarını parafin kristalleşmesi nedeniyle tıkanmasına yol açar [38]. Diğer taraftan, iki çift bağdan fazla doymamış

lipitlerin varlığı, biyodizelin daha düşük bir erime noktasına sahip olmasına neden olur. Bu nedenle, daha iyi bir kalitede biyodizel elde etmek için doymuş ve doymamış yağ asitleri arasında iyi bir denge önemlidir.

Biyodizelin yaygınlaşması için düşük üretim maliyetleri ve büyük ölçekli üretime geçilebilmesi önemlidir. Biyodizel endüstrisindeki sürdürülebilirlik ve ekonomik etkinlik hedefleri, farklı biyokütle kaynaklarının kullanımını teşvik etmektedir. Tüketilebilir yağların kullanımından tüketilmeyen yağlara kadar, biyodizel ile ilgili ticarileştirme araştırmalarında zaman içinde birçok değişiklik görülmüştür. Biyodizel üretiminde ilk olarak palmye yağı, soya fasulyesi, kolza tohumu (kanola) ve ayçiçeğinden elde edilen tüketilebilir yağlar kullanılmıştır. Tüketilebilir yağların kullanılması, gıda güvenliği konusunda tartışmalara yol açmış ve biyodizelin yetiştirilmesi için gereken arazi miktarının sorgulanmasına neden olmuştur. İkinci nesil biyokütle, biyodizel ham maddesi için tüketilmeyen ve selüloz açısından zengin bitkileri kullanmış olup, gıda mahsullerinin yetiştirilmesi için kullanılan araziler ve pahalı biyokütleden biyodizel prosesine kadar olan süreci nedeniyle üçüncü nesil biyokütle arayışını ortaya çıkarmıştır [39]. Yüksek lipid içeriği, tarım arazisine ihtiyaç duymaması gibi özellikleriyle mikroalgler biyodizel üretimi için iyi bir alternatiftir [40]. Yenilenebilir enerji üretim kaynakları üzerine yapılan çalışmalarda mikroalg biyodizelinin en iyi alternatif enerji kaynağı olduğu sonucuna varılmıştır.

2.1.3. Mikroalglerin Biyodizel Üretimindeki Avantajları

Mikroalgler CO₂ biyofiksasyonu gerçekleştirme özellikleriyle sera gazı emisyonlarını azaltabilir (Şekil 2.3). Mikroalgler, karasal bitkilerden daha yüksek fotosentetik verime sahiptir ve diğer bitkilere göre 100 kat daha hızlı büyürler [41]. Geleneksel tarıma uygun olmayan su ortamlarında veya atık su kullanılarak yetiştirilebilirler, böylece potansiyel su rekabeti sorunun önüne geçilmiş olmakta ve sürdürülebilirlik artmaktadır [42]. Mikroalgler, gıda üretimi, için kullanılan araziler için rekabet etmez (Çizelge 2.1) böylece mikroalglerin yetiştirilmesi için pestisitler ve herbisitler gibi toksik kimyasalların da kullanılması gerekmemektedir. Mikroalglerin birinci ve ikinci nesil biyokütle kaynaklarına kıyasla biyodizel verimliliği Şekil 2.4.'de gösterilmiştir.

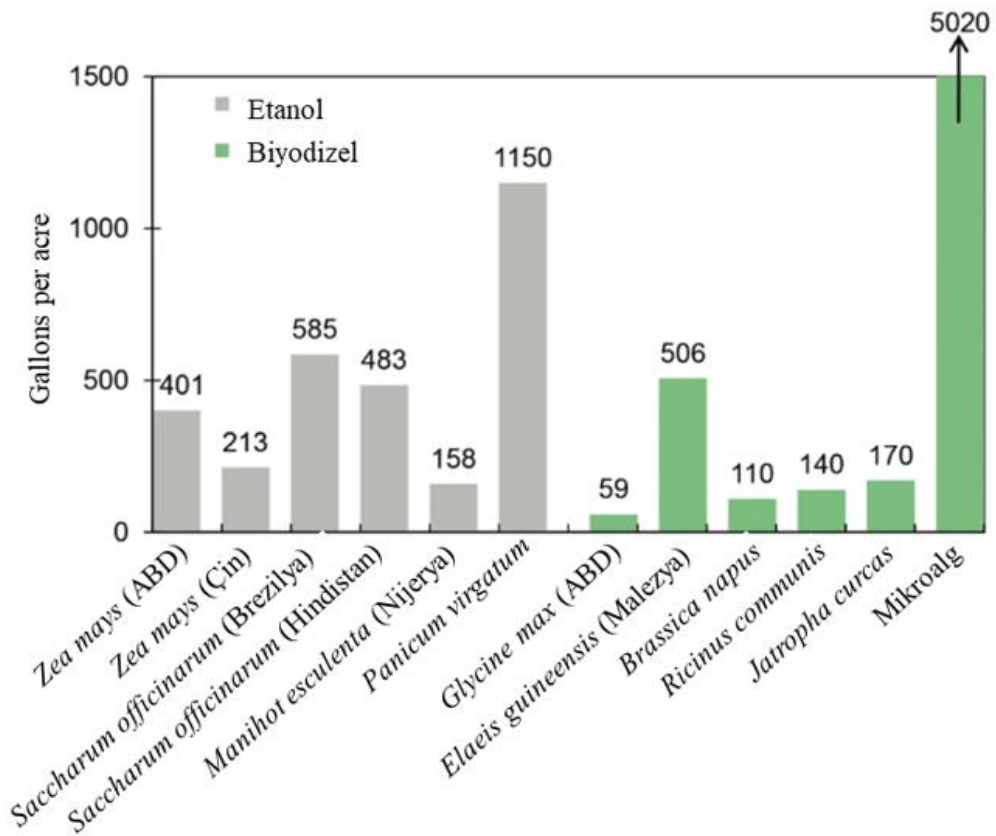


Şekil 2.3. Mikroalg türlerinin % CO₂ biyofiksasyon kapasitesi [43].

Çizelge 2.1. Mikroalgler ve bitkisel biyodizel kaynakları lipid içeriği ve biyodizel verimi karşılaştırması [44].

Biyokütle	Lipit İçeriği (%)	Lipit Verimi (L/ha)	Arazi Kullanımı (m ² /kg)	Biyodizel Verimi (kg/ha)
Mısır (<i>Zea mays</i>)	44	172	66	152
Kenevir (<i>Cannabis sativa</i>)	33	363	31	321
Soya (<i>Glycine max</i>)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i>)	28	741	15	656
Ketencik (<i>Camelina sativa</i>)	42	915	12	809
Kanola (<i>Brassica napus</i>)	41	974	12	862
Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i>)	40	1,070	11	946
Hintyağı (<i>Ricinus communis</i>)	48	1,307	9	1,156
Palmiye (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5,366	2	4,747
Mikroalg (düşük lipid içeriği)	30	58,700	0.2	51,927
Mikroalg (orta lipid içeriği)	50	97,800	0.1	86,515
Mikroalg (yüksek lipid içeriği)	70	126,900	0.1	121,104

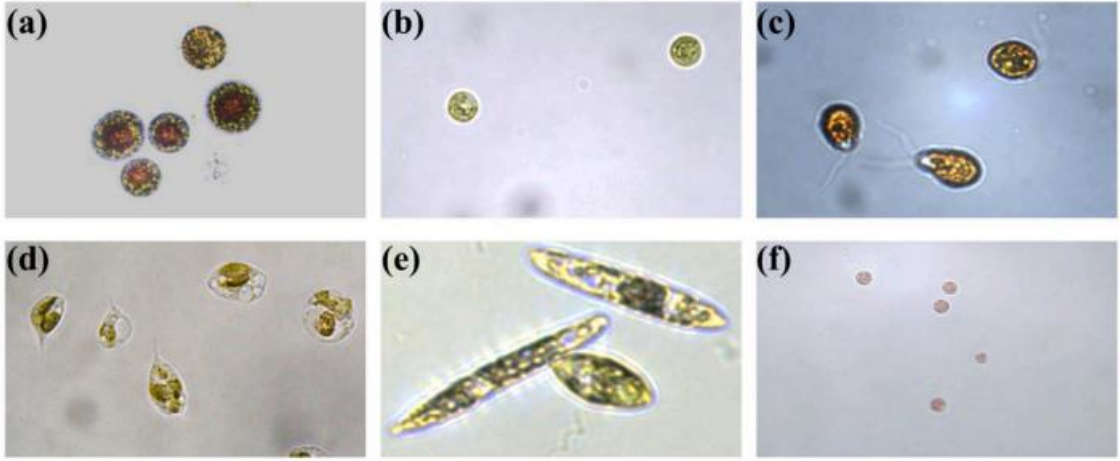
Mikroalgler, kuru biyokütlenin %20-50 oranında yağ içeriğine sahiptir [45]. Yüksek biyokütle verimliliği ve yüksek lipit içeriğinin birleşimi, mikroalgleri biyoyakıt üretimi için iyi bir alternatif kaynak haline getirmektedir. Nascimento vd. tarafından yapılan çalışmada farklı tür mikroalglerden üretilen biyodizelin daha yüksek doymuş/doymamış yağ oranına sahip olduğu ve veriminin karasal bitkilerden daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur [46]. Xu vd. yaptığı çalışmada *Chlorella protothecoid* mikroalginden üretilen biyodizelin, petrol türevi dizele benzer yoğunluk, viskozite, parlama noktası vb. gibi özelliklere sahip olduğu görülmüştür [47]. Eloka-Eboka ve Onunka'nın yaptığı benzer bir çalışmada *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella spp.*, *Synechococcus spp.* ve *Senedesmus spp.* mikroalg türleri kullanılarak üretilen biyodizel, ikinci nesil biyodizel ham maddesi olan jatropha, *Hura crepitans* (hura ağacı), kauçuk yağı vb. yerli biyokütle kaynaklarından üretilen biyodizel ile karşılaştırılmış, mikroalglerden elde edilen biyodizelin yağ profilinin ASTM standardıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir [48].



Şekil 2.4. Bitkisel ve mikroalg kaynaklı biyoyakıtların verim karşılaştırması [49].

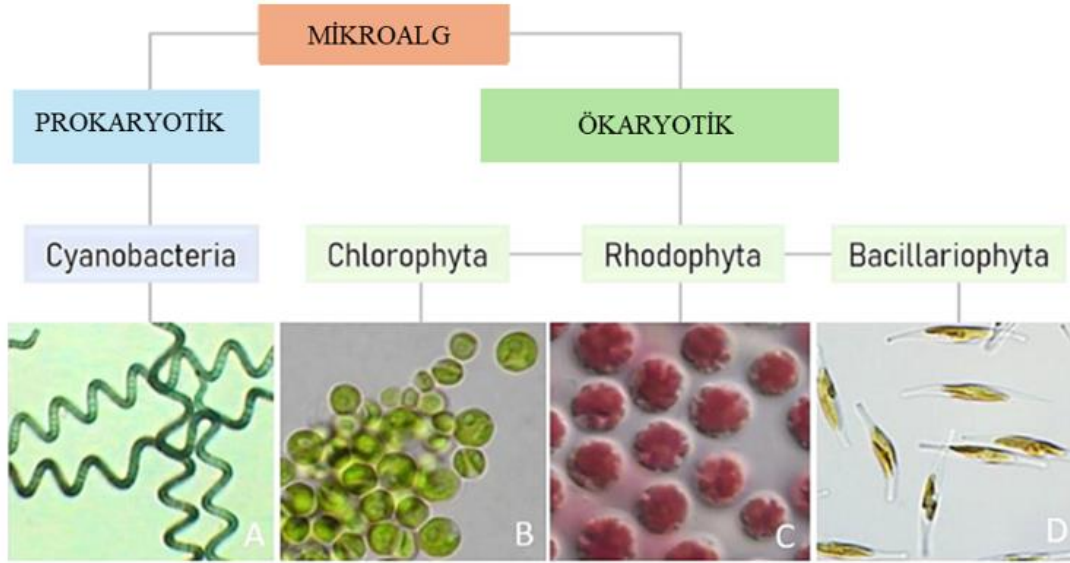
2.2. Mikroalgler

Mikroalgler, fotosentetik organizmalar olup, hem tatlı su hem de tuzlu su gibi çeşitli sucul habitatlarda büyüyebilirler ve hatta atık su ortamlarında da gelişim gösterebilirler (Şekil 2.5). Fotosentez için temel pigment olarak klorofil kullanırlar ve otofototrofik, heterotrofik veya melezotrofik olarak yetiştirilebilirler. Geniş sıcaklık, tuzluluk aralıklarına ve pH değerlerine; farklı ışık yoğunluklarına; radyasyon, basınç gibi zor koşullara dayanabilirler ve yalnız başlarına veya diğer organizmalarla simbiyoz halinde büyüyebilirler. Alg türlerinin sayısının 1 ile 10 milyon arasında olduğu tahmin edilmektedir; bunların yaklaşık 200.000 ila 800.000'i mikroalg türüdür ve sadece 35.000 kadarı araştırılmıştır [50]. Makroalgler (deniz yosunları), çok hücreli, büyük boyutlu alglerdir, mikroalgler ise mikroskobik tek hücrelilerdir ve siyanobakterilere (Chloroxybacteria) benzer şekilde prokaryotik veya yeşil algler (Chlorophyta) gibi ökaryotik olabilirler [51]. Prokaryotik hücre mikroalgleri, siyanobakteriler (bakteri filumu) şubesi tarafından temsil edilir ve ökaryotik türler Rhodophyta (kırmızı algler), Chlorophyta (yeşil algler) ve Bacillariophyta (diatom) olarak sınıflandırılır (Şekil 2.6). Makroalg türlerinden *Macrocystis pyrifera*, 60 metre uzunluğa ulaşabilir, mikroalgler ise 1 µm ile 1 mm arasında değişen boyutlarda organizmaları içeren daha küçük ve heterojen bir gruptur. Tatlı su veya toprakta yaşayan ve hücre çapı 2 µm ile 10 µm arasında değişen küresel hücrelere sahip *Chlorella* bu gruba dahildir [52]. Mikroalglerin renkleri, kloroplastta üretilen klorofil ve fikobiliproteinler gibi pigmentlerin bir sonucudur. Mikroalglerin ana bileşenleri proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerdir (Çizelge 2.2).



Şekil 2.5. Mikroalg türlerinin mikroskobik görüntüleri; (a) *Haematococcus pluvialis*, (b) *Chlorella vulgaris*, (c) *Dunaliella salina*, (d) *Ochromonas danica*, (e) *Euglena gracilis* ve (f) *Porphyridium cruentum* [53].

Fosil kayıtları, yaklaşık 1,6 milyar yıl önce alg türlerinin var olduğunu göstermektedir [54]. Mikroalglerin büyümeleri için karbon veya nitrojene ihtiyaçları vardır ve 25 g/gün büyüme hızıyla, yılda 12 ton/ha CO₂'i bağlayabilirler [44]. Logaritmik büyüme evresinde yaklaşık 3.5 saatte ikiye katlanabilirler. Mikroalgler tüm enlemlerde bulunmalarına rağmen, kuzey yarımkürede daha yaygındırlar ve yılda yaklaşık 1.5 milyon ton çoğalırlar, bu da küresel organik karbonun yaklaşık yarısını bağlamaya yardımcı olur. Mikroalgler, lipidlerin transesterifikasyonu yoluyla biyodizel üretimi, biyokütle gazlaştırması yoluyla sentez gazı, karbonhidratların sakkarifikasyonu ile etanol, doğrudan hidrojen gazı sentezi ve hidrokarbonlardan ve izoprenoidlerden kraking yoluyla benzin üretimi gibi çeşitli enerji taşıyıcıları için kullanılabilirler [55]. Mikroalglerin, palm yağı gibi geleneksel biyodizel kaynaklarına kıyasla yağ verim potansiyeli 25 kat daha yüksektir. Kuru biyokütlenin ağırlığına göre en az %70 yağ üreten mikroalgler, yılda 121,104 kg biyodizel üretmek için sadece 0.1 m² arazi gerektirirler [50]. Hartman'ın raporuna göre, mikroalg biyoyakıtının ABD'deki tüm petrol yakıtının yerini alması durumunda, alg yetiştiriciliği için yaklaşık 39,000 km² alan gerekecektir, ve bu alan ABD yüz ölçümünün sadece %0.42'sidir [56].



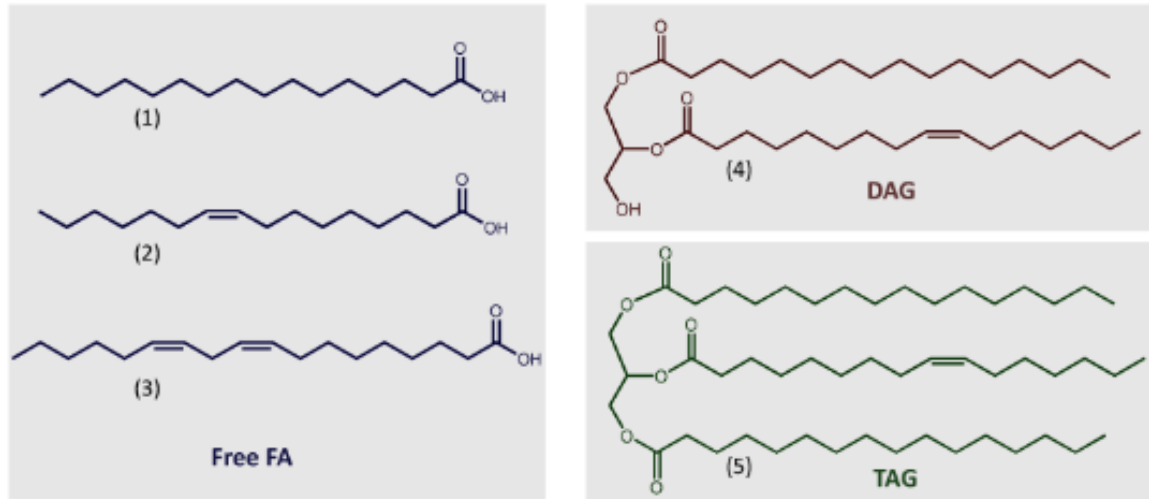
Şekil 2.6. Filum ve hücre yapısı ile temsil edilen mikroorganizmalar: (A) *Arthrospira platensis*, (B) *Chlorella vulgaris*, (C) *Porphyridium purpureum*, ve (D) *Phaeodactylum tricornutum* [57].

Çizelge 2.2. Mikroalg türlerinin biyokimyasal kompozisyonu [58].

Organizma	Karbonhidratlar (%)	Proteinler (%)	Lipitler (%)	Nükleik Asitler (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10–17	50–56	12–14	3–6
<i>Spirogyra sp.</i>	33–64	6–20	11–21	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	44–50	1.8–2.1	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21–52	8–18	16–40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	15–19	50–46	18–24	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	12–17	51–58	14–22	4–5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	24–28	55–59	1–3	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	3–5	47–51	6–10	-
<i>Dunaliella salina</i>	30–34	55–59	5–7	-
<i>Euglena gracilis</i>	14–18	39–61	14–20	-
<i>Spirulina platensis</i>	8–14	46–63	4–9	2–5
<i>Prymnesium parvum</i>	25–33	28–45	22–38	1–2
<i>Tetraselmis maculata</i>	14–16	50–54	2–4	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	40–57	28–39	9–14	-
<i>Spirulina maxima</i>	13–16	60–71	6–7	3–4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	14–16	62–64	10–12	4–6
<i>Anabaena cylindrica</i>	25–30	43–56	4–7	-

2.2.1. Mikroalglerin Lipit Profili ve Biyodizel Üretimi Açısından Değerlendirilmesi

Mikroalglerin lipit birikim potansiyeli türe özgüdür ve toplam kuru biyokütlesinde yüksek miktarda lipit biriktirme kapasitesine sahiptir. Mikroalg lipit fraksiyonu temel olarak açilgliseroller, serbest yağ asitleri ve karotenoidler gibi nötr lipitlerden ve fosfolipitler ve galaktolipitler gibi polar lipitlerden oluşur [59]. Mikroalgler, diğer organizmalar gibi, enerji depolamak için nötr lipitleri kullanırken, polar lipitler membran bileşenleridir [42]. Mikroalgler arasında lipit üretim performansı karşılaştırılırken, biyokütle verimliliği, lipit içeriği ve lipit üretim verimliliği (Çizelge 2.3) gibi üç önemli faktör incelenir [60]. Biyodizel üretim kapasitesi, lipit verimliliği ölçülerek tahmin edilir. Biyodizel üretimi için mikroalg seçimi, biyodizelin yakıt özelliklerini belirleyen yağ asidi profillerine dayanır [61]. Yağ asidi bileşimi, biyodizelin akış özelliği, ateşleme performansı ve oksidatif stabilitesi gibi kalite parametrelerini etkiler. Mikroalgler olumsuz çevresel koşullar altında, kloroplastta depo lipit olarak triaçilgliserol (TAG) üretme yeteneğine sahiptir [62]. TAG'ler biyodizele dönüştürülebilir ancak glikolipidler ve fosfolipidler gibi polar lipitler, yüksek derecede doymamış, çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle biyodizele dönüştürülemez [63]. Mikroalgler, kuru ağırlıklarının yaklaşık %20-50'si kadar TAG biriktirebilir. TAG birikimi beslenme kısıtlaması, yüksek sıcaklık ve yüksek tuzluluk gibi stres koşullarıyla tetiklenir. Mikroalglerdeki açilgliserollerini oluşturan yağ asitleri C12:0'dan C22:6'ya kadar değişir [42]. Yağ asitlerinin çoğu, palmitik (16:0), palmitoleik (16:1), oleik (18:1), linoleik (18:2) ve linolenik (18:3) asitler gibi doymuş ve doymamış C16 ve C18 karbon zincirlerine sahiptir. Lipitlerin kimyasal yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Mikroalg çalışmaları yağ asitleri arasında C16:0 ve C18:0'nın birçok mikroalg türündeki yağ asitlerinin büyük bir kısmını oluşturduğunu, onu takiben C18:1'in geldiğini, C18:2 ve C16:1'in daha az miktarda bulunan yağ asitleri olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 2.8). Mikroalg biyodizelinin FAME profilleri, esas olarak doymuş yağ asitleri (SFA) (C16:0 ve C18:0), tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) (C18:1) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) (C18:2 ve C18:3) içerir. Biyodizelde yüksek SFA ve MUFA içeriğinin soğuk iklimlerde akışkanlık sağlama ve oksidatif stabilite gibi özelliklerle biyodizel kalitesini artırdığı bildirilmiştir [64]. Çizelge 2.4 mikroalg türlerinin yağ asidi kompozisyonunu ve birinci ve ikinci nesil biyoyakıtlardan elde edilen biyodizelin yağ asidi kompozisyonunun karşılaştırmasını göstermektedir.



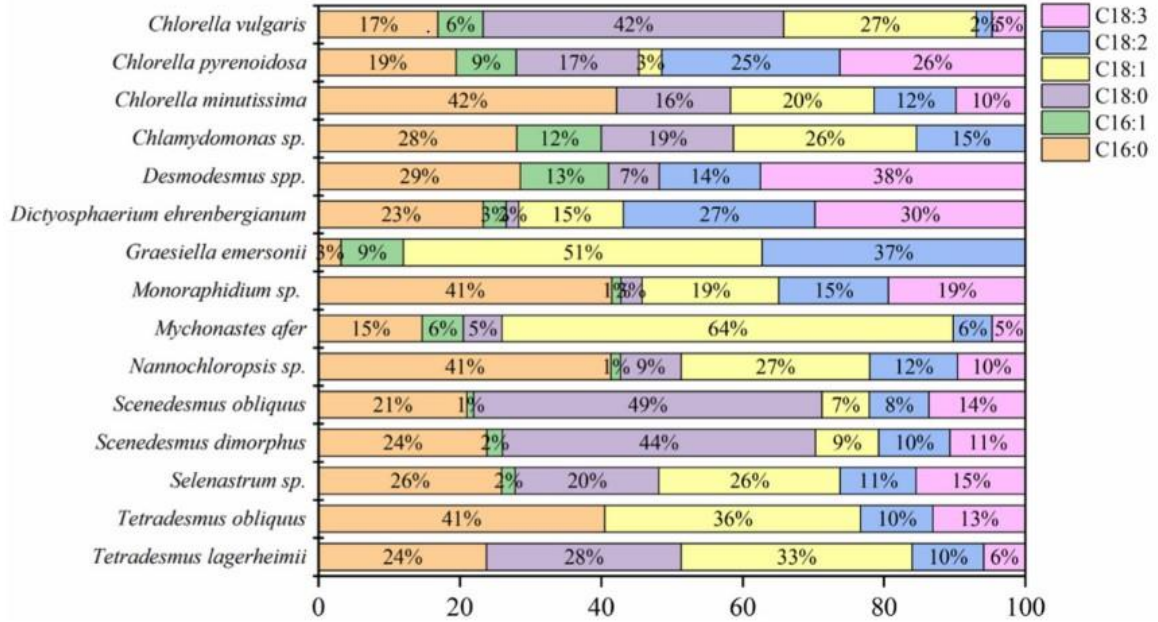
Şekil 2.7. Lipitlerin Kimyasal Yapısı. (1) Palmitik asit (16:0); (2) Palmitoleik asit (16:1); (3) Linoleik asit (18:2); (4) DAG (16:0/16:1); (5) TAG (16:0/16:1/16:0). Kısaltmalar: DAG: diaçilgliserol; Free FA: Serbest yağ asidi; TAG: triaçilgliserol [42].

Çizelge 2.3. Mikroalg türlerinin lipit içeriği ve lipit verimlilikleri [56-64].

Mikroalg Türü	Kültür Koşulu ^a	Biyokütle Hacimsel Verimliliği (g/l/gün)	Lipit İçeriği (% kuru hücre ağırlığı)	Lipit Verimliliği (mg/l/gün)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.[65]	F	0.29	24.0-31.0	12.4
<i>Botryococcus braunii</i> [66]	F	0.03	33.6	5.5
<i>Chaetoceros muelleri</i> [65]	F	0.07	25.0-63.0	21.8
<i>Chaetoceros calcitrans</i> [65]	F	0.04	19.0-22.0	17.6
<i>Chlorella emersonii</i> [67]	F	0.036-0.041	5.0-58.0	10.3-50.0
<i>Chlorella protothecoides</i> [68]	F	2.00-7.70	10.0-48.0	0.2-5.4
<i>Chlorella protothecoides</i> [69]	H	0.01	43.0-46.0	1881.3-1840.0
<i>Chlorella sorokinian</i> [68]	F	0.23-1.47	2.0	44.7
<i>Chlorella vulgaris</i> [67,68,70]	F	0.02-0.20	18.0-57.0	11.2-66.3
<i>Chlorella vulgaris</i> [69]	H	0.08-0.15	23.0-36.0	27.0-35.0
<i>Chlorella vulgaris</i> [69]	M	0.09-0.25	21.0-34.0	22.0-54.0
<i>Chlorella</i> sp. [65]	F	21.6-34.0	19.3	42.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> [65]	F	2.90-3.64	11.76	34.8
<i>Chlorococuum</i> sp. [65]	F	0.28	20.0-51.1	53.7
<i>Cryptocodinium cohnii</i> [71]	F	0.20	6.0-45.0	28.0
<i>Dunaliella salina</i> [71]	F	0.20-0.34	23.1	116.0
<i>Dunaliella primolecta</i> [65]	F	0.09	10-71	36.4
<i>Dunaliella tertiolecta</i> [70]	F	0.12	17.5-67.0	60.6-69.8
<i>Dunaliella</i> sp.[65]	F	0.20	27.4	33.5
<i>Ellipsoedrium</i> sp. [65]	F	0.17	14.0-20.0	47.3

<i>Euglena gracilis</i> [65]	F	7.70	25.0	32.4
<i>Isochrysis sp.</i> [65,71]	F	0.08-0.17	7.1-33	37.8
<i>Monodus subterraneus</i> [65]	F	0.19	16.0	30.4
<i>Nannochloropsis sp.</i> [72]	F	0.37-0.48	20.0-56.0	84.0-142.0
<i>Nannochloropsis oculata</i> [70]	F	0.17-1.43	22.7-29.7	37.6-90.0
<i>Nannochloropsis sp.</i> [65]	F	0.18	12.0-53.0	90.0-134.0
<i>Ocystis pusilla</i> [65]	F	0.16	10.5	49.4
<i>Pavlova salina</i> [65]	F	0.14	30.9	31.2
<i>Pavlova lutheri</i> [65]	F	0.18	35.5	40.2
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> [65]	F	0.14	18.0-57.0	29.2
<i>Porphyridium cruentum</i> [65]	F	0.13	10.37	40.2
<i>Scenedesmus obliquus</i> [70,73]	F	0.04-0.74	11.0-55.0	7.14
<i>Scenedesmus obliquus</i> [73]	M	0.10-0.51	6.6-11.8	11.6-58.6
<i>Scenedesmus quadricauda</i> [65]	F	0.19	1.9-18.4	35.1
<i>Scenedesmus sp.</i> [65,66]	F	0.03-0.26	19.6-21.1	40.8-53.9
<i>Skeletonema sp.</i> [65]	F	0.09	13.3-31.8	27.3
<i>Spirulina platensis</i> [65]	F	0.06-4.3	4.0-16.6	14.2
<i>Spirulina maxima</i> [70]	F	0.21-0.25	4.0-9.0	21.0
<i>Tetraselmis suecica</i> [65]	F	0.12-0.32	12.78	27.0-36.4
<i>Tetraselmis sp.</i> [65]	F	0.30	8.5-23.0	43.4

^a: F:fototrofik, M:miksotrofik, H:heterotrofik.



Şekil 2.8. Mikroalg lipidlerinin yağ asidi profili [74].

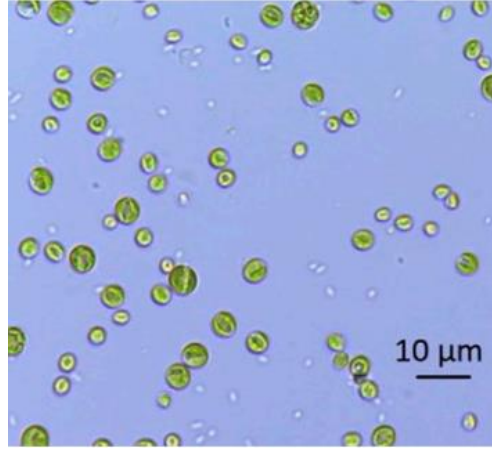
Çizelge 2.4. Biyodizel ham maddelerinin yağ asidi profili karşılaştırması [66-76].

Biyokütle	C14	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Diğer	SFA	MUFA	PUFA
Trebouxiophyceae											
<i>Chlorella protothecoides</i> [75]	0.27	13.42	-	3.4	58.94	19.86	-	-	19.79	58.94	19.86
<i>Chlorella vulgaris</i> [76]	2.3	6	16.4	10.3	26.5	-	20.8	-	18.6	42.9	20.8
<i>BTA4036 C. Variabilis</i> [77]	1.2	22.3	5.8	5.2	3.4	7.6	9.2	10.1 ^a	34.3	24.2	25.4
<i>Botryococcus braunii</i> [78]	0.73	7.17	-	1.59	77.22	5.16	5.34	-	9.49	77.22	10.5
Chlorophyceae											
<i>Ankistrodesmus falcatus</i> [78]	1.07	30.23	0.47	2.72	24.79	2.0	26.86	-	34.02	25.26	28.8
<i>Dunaliella salina</i> [79]	0.51	18.2	0.98	0	4.56	13.24	30.26	11.24 ^b	18.71	5.54	58.9
<i>Dunaliella sp.</i> [80]	-	9.19	0.8	4.27	22.51	3.84	44.31	-	13.47	24.74	48.15
<i>Chlamydomonas sp.</i> [78]	1.61	50.77	0.28	11.54	13.77	3.93	2.76	-	63.92	14.05	6.69
<i>Monoraphidium contortum</i> [81]	0.9	20.9	0.8	0.3	17.3	10.5	23.9	14.7 ^c	24.4	18.1	56.3
Eustigmatophyceae											
<i>Nannochloropsis oculata</i> [82]	3.9	20.5	25.2	1.8	4.1	2.2	0.9	29.7 ^d	10.4	39.5	36.9
Bacillariophyceae											
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> [82]	7.4	11.3	22.4	0.4	2.8	1.5	1.4	16.7 ^a , 28.4 ^d	20.2	25.3	49.8
Rhodophyceae											
<i>Porphyridium cruentum</i> [82]	0.5	28.6	2.9	0.8	2.0	8.2	0.7	21.1 ^d	31.1	5.0	40.8
2.Nesil Biyodizel Kaynakları											
<i>Jatropha</i> [83]	0.2	13.4	0.8	6.4	36.5	42.1	0.3	-	20	37.3	42.4
<i>Palm</i> [84]	1.22	47.9	0.04	4.23	37	9.07	0.26	-	54.12	37.04	9.33
<i>Kolza</i> [85]	-	3.49	-	0.85	64.4	22.3	8.23	-	4.34	64.4	30.53

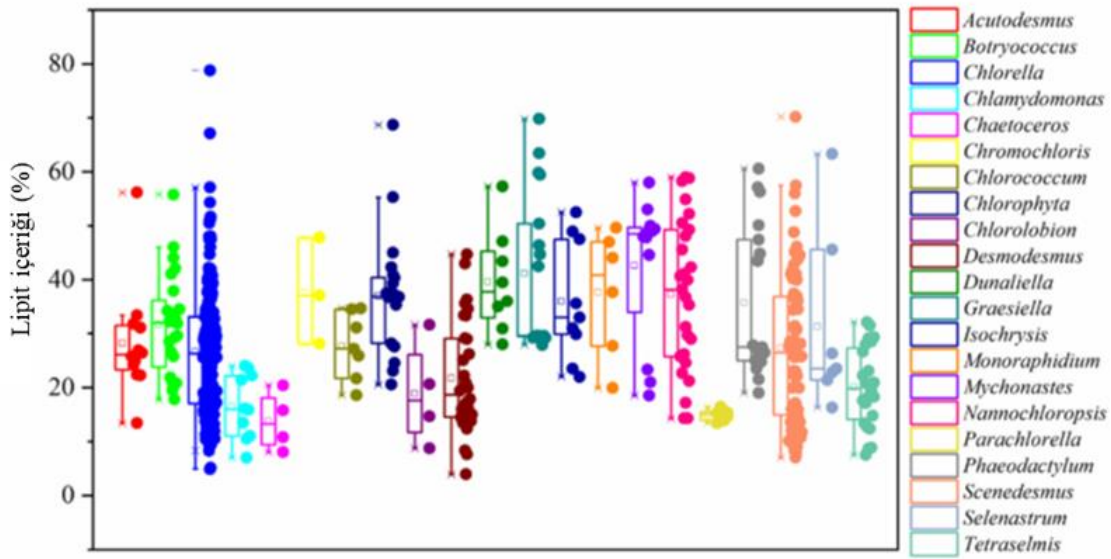
^a C16:2 ve C16:3, ^b C16:4, ^c C16:3, ^d C20:5

2.2.2. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris, Prekambriyen döneminden bu yana dünyada var olduğu tespit edilmiş, *Chlorella* cinsine ait yeşil ökaryotik bir mikroalgdır [86]. *Chlorella* türleri, düşük sıcaklıklara (10°C) tolerans gösterme yeteneği, atık su ortamına adaptasyon, heterotrofik büyüme sırasında yüksek hücre yoğunluğu (120 g L⁻¹) ve bakteri büyümesini engelleyen moleküllerin salgılanması gibi özellikleri nedeniyle biyoyakıt üretimi için ideal bir aday olarak araştırılmıştır [87]. Chlorellaceae familyasından *C. vulgaris* (Şekil 2.9), yüksek yağ içeriği nedeniyle biyodizel yakıtların üretimi için potansiyel bir mikroalg türü olarak kabul edilmektedir. *C. vulgaris*, ototrofik, heterotrofik veya miksotrofik olarak büyüyebilir. Optimum büyüme koşullarında biyokütle ağırlığının %5-40'ına kadar lipid üretebilirken olumsuz büyüme koşullarında (N kısıtlı koşullar gibi), lipid içeriği %58'e kadar ulaşabilir (Şekil 2.10) [88,89]. Biyoyakıt üretimi açısından, lipid üretimini en üst düzeye çıkarmak için gereken besin koşulları önemlidir [90]. Yetiştirme koşullarının lipid metabolizması üzerindeki etkisi ve lipid üretimini artırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Rosli vd. tarafından, *C. vulgaris*'in sağlanan CO₂ konsantrasyonu ve ışık yoğunluğuna göre biyokütle üretimini tahmin etmek için matematiksel model geliştirmiştir. Maksimum mikroalg biyokütle büyümesi için optimum ışık yoğunluğu (216 µmol/m²/sn) ve CO₂ konsantrasyonu (%9.1) tespit edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada yüksek miktarda nötr lipid (%97.7 wt lipid) üretilmiştir. Çalışmada üretilen biyodizelin yağ asidi kompozisyonu, yüksek miktarda C16 ve C18 içermektedir [91]. *C. vulgaris*, büyümesi için N ve P gibi besinleri kullanarak atık suda yetişebilir ve küçük hücre boyutu nedeniyle (2-10 µm) büyük ölçekli üretime uygundur. Biyodizel üretimi ve atık su arıtımının bu çift işlevi, yapay besin girdilerine olan ihtiyacı azaltarak süreci daha sürdürülebilir ve maliyet etkin hale getirmektedir [92]. *C. vulgaris*, açık havuz sistemleri ve kapalı fotobiyoreaktörler gibi çeşitli sistemlerde, çeşitli koşullar altında yetiştirilebilir. Bu çeşitlilik, üretim sistemlerinin yerel çevrelere ve kaynaklara uyum sağlamasını, verimi optimize etmesini ve maliyetleri düşürmesini sağlar [93].



Şekil 2.9. *Chlorella vulgaris*'in mikroskopik görüntüsü [94].



Şekil 2.10. Mikroalg türlerinin literatürden derlenen % lipit içeriği karşılaştırması [74].

2.2.3. Mikroalg Biyoreaktör Sistemleri

Biyodizel ticari üretimi, mikroalglerin büyük ölçekli kültürüyle sağlanan yüksek miktarda biyokütle ihtiyacı ile gerçekleşir. Mikroalg yetiştirme sistemlerinin seçimi, biyoyakıt üretim sürecinde önemli bir rol oynar. Açık havuz sistemleri, kapalı havuz sistemleri (fotobiyoreaktörler) ve hibrit sistemler, mikroalglerin büyük ölçekli üretimi için kullanılan üç yetiştirme yöntemidir. Yetiştirme sistemlerinin küçükten büyüğe ölçeklendirilmesi fotosentezi optimize etmek ve sistemlerin tasarımını iyileştirmek için bazı optimum koşulların sağlanmasına bağlıdır. Bunlar; (i) etkin ışık kaynağı yoğunluğu, (ii) ideal gaz-sıvı transferi (örneğin, CO₂ ve hava), (iii) kullanım kolaylığı, (iv) düşük kirlilik düzeyi, (v) azaltılmış üretim maliyetleri, (vi) azami düzeyde besin kullanımı,

(vii) minimum arazi kullanımı ve (viii) sıcaklık kontrolüdür; tüm bu faktörler olabildiğince fazla tür için optimize edilmelidir [95-100].

2.2.3.1. Açık Havuz Sistemleri

Mikroalg yetiştiriciliği için kullanılan ilk sistemler açık havuzlardır. Bu havuzlar, doğal (göller, lagünler, göletler) ve yapay havuzlar olarak kategorize edilir. Yapay havuzlar dairesel, eğimli, karıştırmasız (sığ) ve karıştırıcı raceway (kanal tipi) olarak sınıflandırılır [101]. Raceway kanal tipi havuzlar (Şekil 2.11a) en yaygın kullanılan kültür sistemleridir [93]. Kanal tipi havuzlar genellikle 1 fit derinliğinde (0.2-0.3 m su derinliği), birkaç dönüm büyüklüğünde ve doğal güneş ışığına maruz kalan bir açık havuz sistemi olarak tasarlanmıştır. Mikroalg hücrelerinin ve besin maddelerinin yetiştirme süreci boyunca sürekli olarak karıştırılması bir çark aracılığıyla veya hava pompasıyla sağlanır. Açık havuz sistemleri, inşaat ve işletiminin kolay olması ve düşük enerji maliyetleri nedeniyle tercih edilmektedir ancak yetersiz ışık yoğunluğu ve dağılımı, yüksek kontaminasyon riski gibi faktörler, açık sistemlerin önemli dezavantajlarıdır. Protozoa ve diğer mikroalglerin kontaminasyonu, yüksek oranda seçici kültür koşullarının kullanılmasıyla azaltılabilir. Bu türlere (i) besin açısından zengin ortam gerektiren *Chlorella* türleri, (ii) yüksek tuzluluğa uyum sağlayabilen *Dunaliella salina* ve (iii) yüksek alkalinite koşullarında iyi büyüyen *Spirulina* örnek verilebilir [93]. Yetiştirme yönteminin hava koşullarına duyarlı olması nedeniyle açık havuzlarda mikroalg yetiştiriciliğinin performansı bölgesel iklim koşullarına bağlıdır. Açık havuz sistemleri için en uygun yerler, yıl boyunca güneş ısınım şiddetinin yüksek olduğu, tropikal ve subtropikal bölgelerin kuru kıyı alanlarıdır [102]. Açık havuz sistemleri için diğer dezavantajlar; etkisiz karıştırma, zayıf kütle transferi, düşük biyokütle verimliliği, sıcaklık değişimi ve yoğun miktarda güneş ışığı gereksinimidir [103].

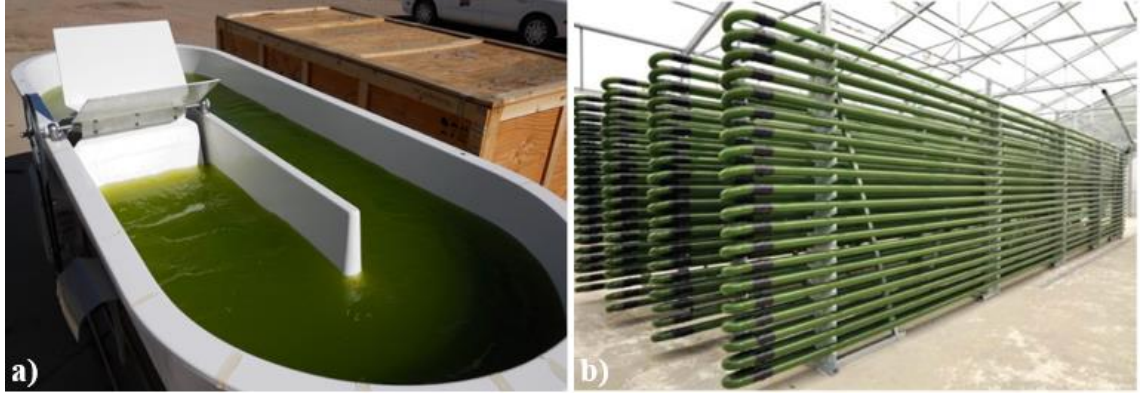
2.2.3.2. Kapalı Sistemler

Kapalı fotobiyoreaktörler, yüksek biyokütle verimliliği, kültür koşullarının (pH, sıcaklık, CO₂ ve O₂) ve büyüme parametrelerinin daha kolay kontrol edilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Mikroalg yetiştiriciliği için en popüler iki tasarım tübüler ve düz levha fotobiyoreaktörleridir. Tübüler fotobiyoreaktörler, en yaygın kullanılan horizontal, (Şekil 2.11b) vertikal ve sarmal olarak dizayn edilmiş biyoreaktör tasarımlarıdır. Fotobiyoreaktörün temel tasarım ilkesi, ışık yolunu azaltmak ve her hücre tarafından alınan ışık miktarını artırmaktır. Fotobiyoreaktörler, ışık yolunun uzunluğunu optimize

etme ve böylece biyokütle verimliliğini artırma fırsatı sunar [104]. Kapalı sistemlerde kontaminasyon açık sistemlere kıyasla kontrol altına alınabilir ve biyodizel gibi yüksek değerli ürünler hedefleniyorsa biyokütle kalitesini artırarak daha iyi bir hücre konsantrasyonu sağlanabilir. Fotobiyoreaktörler buharlaşma yoluyla daha az su kaybeder ve CO₂ fiksasyon seviyelerini artırır [105]. Fotobiyoreaktörler, daha yüksek verimlilik ve kontrol seviyesi sağlarken, mikroalg biyodizel üretimi için raceway kanal tipi havuzlara kıyasla çok daha yüksek sermaye ve işletme maliyetlerine sahiptir. Pawar vd. biyodizel üretiminde kullanılan kanal tipi havuzlar ve fotobiyoreaktörler için farklı ekonomik modelleri değerlendirmiş ve CO₂ ve besinlerin sırasıyla baca gazından ve atık sudan elde edilmesi durumunda bile fotobiyoreaktörlerin tahmin edilen maliyetlerinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur [106]. Çalışmalar yüksek verimlilikte ancak maliyet etkin bir reaktör tasarımı konusunda hala bilgi boşluğu bulunduğunu göstermektedir.

2.2.3.3. Hibrit Sistemler

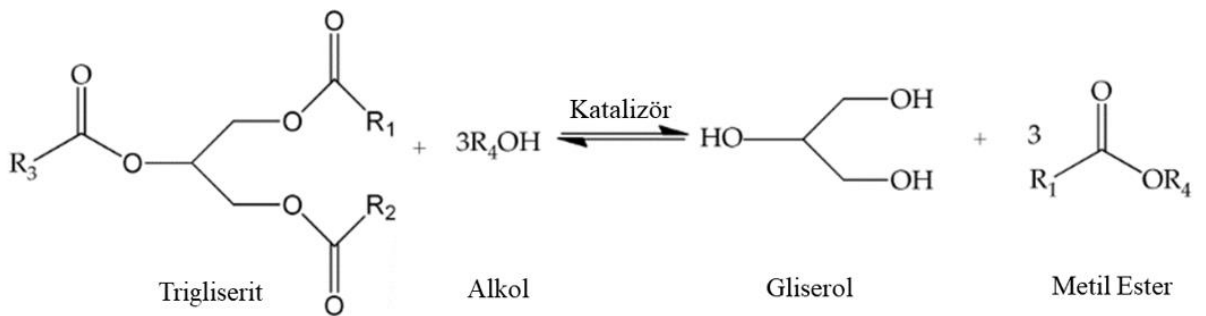
Hibrit sistemler, mikroalglerin fotobiyoreaktörlerde ve açık havuzlarda biyokütle büyümesini birleştiren iki aşamalı bir yetiştirme sürecidir. İlk aşamada, kültür saflığını korumak, yüksek biyokütle konsantrasyonlarına ulaşmak ve kontaminasyonu engellemek amacıyla yetiştirme fotobiyoreaktör içinde gerçekleştirilir, ikinci aşamada üretilen biyokütle, stres koşulları uygulayarak yüksek lipid birikimine ulaşmak için kanal tipi açık havuz sistemine aktarılır. Heidari vd.'nin yaptığı çalışmada *Chlorella vulgaris*'in yetiştirilmesi için iki aşamalı bir hibrit sistem kullanılmış, dördüncü günde açık havuz sistemine yapılan biyokütle transferinin, optimal lipid üretimini sağlayarak $9.21 \pm 0.64 \text{ mg L}^{-1}$ gün bulunduğu tespit edilmiştir [107]. Yüksek biyokütle verimliliği ve düşük maliyetin yanı sıra, hibrit sistem üretim sürecinde daha az karbon ayak izine de sahiptir. Adesanya vd.'nin yaptığı çalışmada 1 ton mikroalg kaynaklı biyodizel üretimine dayalı olarak, bir hibrit sistem kullanımının fosil türevli dizel ile karşılaştırıldığında küresel ısınma potansiyelinde %42 ve fosil enerji gereksinimlerinde %38 tasarruf sağladığı kanıtlanmıştır. [108]. Hibrit sistemler büyük ölçekli yetiştirme için umut verici olarak değerlendirilebilir ancak uygulanabilirliklerini netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



Şekil 2.11. Mikroalg yetiştirme sistemleri: a) raceway kanal tipi havuz (New Mexico State University) [109], b) horizontal tübüler fotobiyoreaktör [110].

2.3. Mikroalglerin Biyokonversiyonu: Biyodizel Üretim Yöntemi

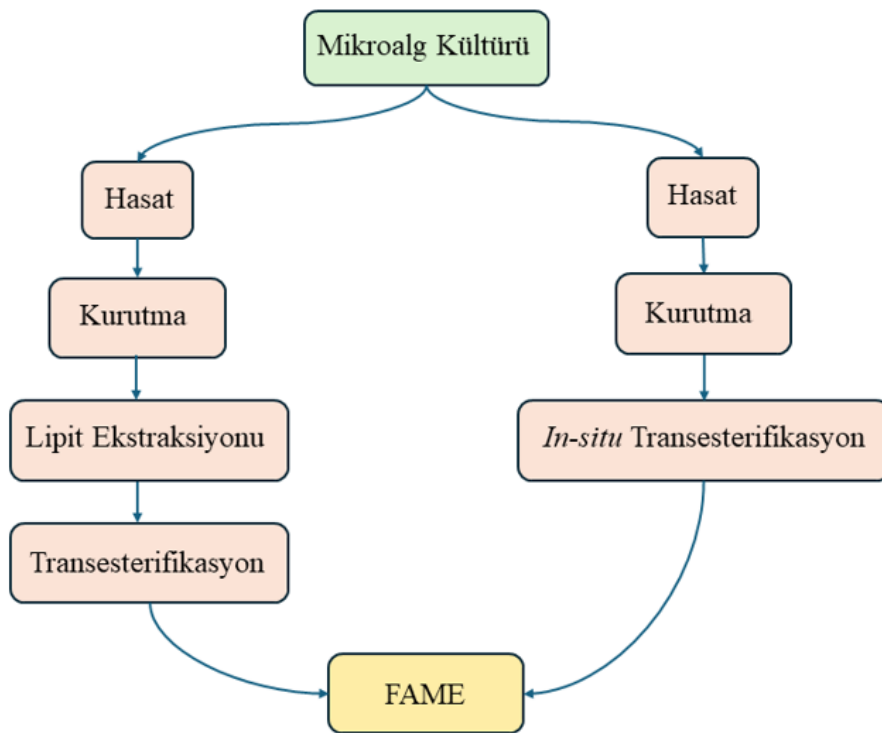
Transesterifikasyon, laboratuvar ve endüstriyel ölçekteki biyodizel üretim sürecidir. Mikroalglerdeki lipidlerin (triasilgliseroller ve/veya serbest yağ asitleri) katalizör varlığında veya yokluğunda alkolle reaksiyona girmesi ve metil esterlerin oluşması şeklinde gerçekleşir (Şekil 2.122). Transesterifikasyon reaksiyonu üç aşamada gerçekleşir: trigliseritler digliseritlere dönüştürülür, ardından monogliseritlere ve sonunda esterlere (biyodizel) ve gliserole (yan ürün) dönüşür. Transesterifikasyon prosesi için MeOH, EtOH, PrOH veya diğer daha uzun zincirli alkoller gibi çeşitli alkoller kullanılabilir [111]. MeOH, maliyet etkinliği ve kolay erişilebilirliği nedeniyle transesterifikasyon reaksiyonlarında yaygın olarak kullanılır [112]. Transesterifikasyon reaksiyonunda kullanılan katalizörler homojen, heterojen ve biyokatalizörler olarak sınıflandırılır.



Şekil 2.12. Trigliseritten biyodizel üretiminin kimyasal denklemi [113].

Homojen katalizörler, yüksek reaksiyon hızları ve kısa reaksiyon süreleri gibi özellikleri nedeniyle biyodizel endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyodizel üretiminde

en yaygın kullanılan homojen katalizörler H_2SO_4 , $NaOH$, KOH , $KOCH_3$, $NaOCH_3$, $Mg(OH)_2$, H_3PO_4 ve HCl 'dir [114]. Geleneksel transesterifikasyon yöntemi kullanılarak biyodizel üretimi, mikroalglerin yetiştirilmesinden itibaren, hasat edilmesi, kurutulması, yağ ekstraksiyonu, transesterifikasyon ve biyodizel eldesi aşamalarından oluşur. *In-situ* transesterifikasyon yöntemi, lipit ekstraksiyonunu ve transesterifikasyonu tek bir adımda gerçekleştiren yöntemdir (Şekil 2.13). Tek tür ve karışık tür mikroalg kültürlerinde etkinlik ve maliyet açısından avantaj sağlayan bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır.



Şekil 2.13. Geleneksel transesterifikasyon süreci ile *in-situ* transesterifikasyon sürecinin karşılaştırılması.

2.3.1. *In-situ* Transesterifikasyon Prosesi

Mikroalglerden biyoyakıt üretimi, yüksek potansiyeli nedeniyle önemli bir araştırma alanı olmasına rağmen, pahalı işleme teknolojisi nedeniyle henüz tam olarak ticarileştirilmemiştir. Mevcut işlem maliyetleri biyoyakıtların büyük ölçekte uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Biyoyakıt üretim sürecinin her aşamasında maliyeti düşürebilmek için teknolojik optimizasyonlar yapılması gerekmektedir. Proses optimizasyonu, biyoyakıt üretimini genişletmek ve yaygınlaştırmak için önemlidir; bu sayede fosil yakıtlara olan bağımlılığın azaltılması ve çevresel sürdürülebilirliğin artırılması mümkün hale gelebilir. *In-situ* teknolojisinin uygulanması, ham madde

ekstraksiyonundan biyoyakıtlar üretimine kadar belirli aşamaların ortadan kaldırılmasını sağlayarak, ekipman kurulum ve bakımı ile enerji tüketim maliyetlerini azaltabilir [115]. *In-situ* transesterifikasyon prosesi ıslak veya kuru biyokütle ile gerçekleştirilebilir ve biyodizel üretimi için adımları ve sürecin enerji tüketimini azaltmanın yanı sıra nihai maliyeti de düşürür. Johnson ve Wen tarafından *Schizochytrium limacinum* üzerine gerçekleştirilen karşılaştırmalı bir çalışmada, *in-situ* transesterifikasyon yöntemiyle % 66.97 biyodizel verimi sağlanırken, geleneksel iki aşamalı esterifikasyon-transesterifikasyon yöntemiyle % 59.73 verim elde edilmiştir [116]. Viêgas vd., biyodizel üretimi için *Chlorella* türünün *in-situ* transesterifikasyonunu gerçekleştirmiştir. Maksimum FAME verimi, 60 °C'de, 4 saatte, % 20 ağırlıkça H₂SO₄ ile %98 olarak elde edilmiş ve 100 °C'de de benzer sonuçlar alınmıştır [117]. Vicente vd. tarafından yapılan araştırma verilerine göre, *in-situ* transesterifikasyon prosesinde, 8 saatlik reaksiyon süresinde 65 °C'de BF₃, H₂SO₄ ve HCl asit katalizörlerinin varlığında, her üç durumda da %99'dan fazla saflıkta FAME üretilirken, geleneksel yöntem uygulandığında FAME saflığı %91.4 ile %98 arasında değişmiştir. *In-situ* transesterifikasyondaki FAME verimi de geleneksel yöntemden daha yüksek bulunmuştur [118]. Haas ve Wagner'in çalışmasında *in-situ* transesterifikasyon yöntemiyle MeOH/yağ asidi mol oranı 220:1, 65 °C reaksiyon sıcaklığında ve 2 saatlik reaksiyon süresi ile *Chlorella pyrenoidosa* biyokütlesinden maksimum %83 biyodizel verimi elde edilmiştir [119]. Suganya vd.'nin çalışmasında *Enteromorpha compressa*'nın ultrasonik destekli *in-situ* transesterifikasyonunda maksimum biyodizel verimi %98.89 olarak hesaplanmıştır [120]. Biyodizel üretim reaksiyonu için optimum işletme koşullarını bulmak önemlidir. Alkol/yağ oranı, reaksiyon sıcaklığı, katalizör türü, katalizör konsantrasyonu, ve reaksiyon süresi gibi parametrelerin biyodizel verimini etkilediği kanıtlanmıştır.

Verma ve Sharma, katalizör türü, katalizör konsantrasyonu, alkol/yağ mol oranı, karıştırma hızı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi gibi parametrelerin biyodizel verimi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışma, reaksiyon sıcaklığının, reaksiyon süresinin ve alkol/yağ mol oranının en önemli parametreler olduğunu ortaya koymuştur [121]. Transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanılan katalizör türü de prosesi ve son ürünü büyük ölçüde etkilemektedir. *In-situ* transesterifikasyon yöntemi kullanılarak FAME eldesine yönelik reaksiyon parametreleriyle ilgili çalışmalar literatürde hala yetersizdir. Çalışmaların çoğu mikroalglerden nihai biyodizel verimini optimize etmeye yönelik olup, *in-situ* transesterifikasyon koşullarının biyodizelin yağ asidi profiline

etkisine yönelik çalışmalar oldukça azdır [122]. *In-situ* transesterifikasyon yöntemiyle üretilen FAME bileşiminin C16 ve C18 içeriği bakımından ASTM D6751 standartlarına uygunluğu üzerine reaksiyon parametrelerini anlamak ve optimize etmek, elde edilen biyodizel kalitesini değerlendirmek için son derece önemlidir.

2.4.Yanıt Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM)

Yanıt yüzey metodolojisi (RSM), deney tasarımı ve analizinde bir veya daha fazla yanıt değişkeni üzerinde etkisi olan bağımsız değişkenlerin etkilerini modellemek ve optimize etmek için kullanılır. Yanıt yüzey metodolojisi (RSM), belirli bir deney tasarımı ile başlar. Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design - CCD) ve Box-Behnken Tasarımı en yaygın kullanılan tasarımlar arasında bulunmaktadır. Bu tasarımlar, faktörlerin farklı seviyelerdeki varyasyonlarını kapsar ve deneylerin hangi kombinasyonlarla gerçekleştirileceğini belirler. RSM, yanıt değişkeni ile faktörler arasındaki etkileşimi modellemek için genellikle ikinci dereceden (kuadratik) polinom modelleri kullanır. Genel bir ikinci dereceden model şu şekildedir:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2.1)$$

Y tahmin edilen yanıt değişkenini, X_i ve X_j bağımsız değişkenleri (faktörleri), β 'lar model katsayılarını, ε ise gözlemdaki rastgele hatayı ifade etmektedir [123].

Belirlenen tasarım çerçevesinde deneyler gerçekleştirilir ve yanıt değişkeninin değerleri kaydedilir. Deneylerden elde edilen veriler kullanılarak model katsayıları tahmin edilir ve modelin anlamlılığı R^2 ve çeşitli istatistiksel testler (örneğin, ANOVA (varyans analizi)) ile kontrol edilerek değerlendirilir. Optimum koşulu belirlemek için yanıt yüzey grafikleri elde edilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Malzemeler

Sıvı Bold Basal Medium (BBM) kültür ortamı (Çizelge 3.1) hazırlanırken ve transesterifikasyon reaksiyonu sırasında kullanılan kimyasallar; NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NaCl , KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MoO_3 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , EDTA, KOH, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , NaOH , Sigma-Aldrich markasından; HCl (%37), H_2SO_4 ($\geq$ %98.0), hekzan ($>$ %99.8), MeOH ($\geq$ %99.9) Merck markasından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Basal Medium (BBM) kültür ortamı içeriği.

Kimyasal	g/400 ml BBM
NaNO_3	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3
K_2HPO_4	4
NaCl	1
KH_2PO_4	6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Eser Element Karışımı	1 ml/l BMM
Eser Element Karışımı	g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.82
MoO_3	0.71
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.49
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.44
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.57
H_3BO_3	11.42
EDTA	50
KOH	31
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.98
HCl	1 ml

3.2. Mikroorganizma ve Kültür Ortamı

Optimum koşulları belirlemek için 52 deney seti ile gerçekleştirilen *in-situ* transesterifikasyon prosesinde Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü'nden temin edilen, besin ortamları için kullanılan, hazır *Chlorella vulgaris* kuru kütlesi kullanılmıştır. Deney setindeki (alkol:biyokütle oranı (v/w), sıcaklık, asit/baz katalizör konsantrasyonu (%)) (katalizör:biyokütle oranı) ve reaksiyon süresi parametreleri ve nihai ürün biyodizel bileşiminin GC-FID FAME kompozisyonu sonuçlarına göre, Design-Expert® (Sürüm 12) yazılımında merkezi kompozit tasarıma

dayalı yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak *in-situ* transesterifikasyon koşulları optimize edilmiştir. Modelin tespit ettiği optimum koşullarda deneyler tekrarlanarak (n=4) hazır olarak temin edilen toz biyokütlede validasyonu gerçekleştirilmiş olup ayrıca yine enstitüden temin edilen, tatlı su kaynağından izole edilmiş farklı kaynağa ait *Chlorella vulgaris* biyokütlesi BBM kültür ortamında çoğaltılarak bu biyokütleden *in-situ* transesterifikasyon prosesiyle biyodizel eldesi optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir. İki farklı *Chlorella vulgaris* kaynağından elde edilen biyodizel bileşimi GC-FID sonuçları FAME bileşimi bakımından kıyaslanmıştır. Tatlı su kaynağından izole edilen *Chlorella vulgaris* kültürünü çoğaltmak için, Çizelge 3.1'deki kimyasal malzemeler ve distile su ile hazırlanmış sıvı BBM kültür ortamı otoklavda 121 °C'de 20 dk boyunca sterilize edilmiştir. Steril ortam buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir. *C. vulgaris* BBM kültür ortamında kesikli fotobiyoreaktörlerde yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kesikli tip fotobiyoreaktörler.

Chlorella vulgaris mikroalgi için sıvı besi ortamının pH değeri 7.00 olarak ayarlanmıştır. Mikroalg kültürleri $80 \pm 2 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ ışık şiddetine sahip led ampüller kullanılarak 24 saat süre ile aydınlatılmıştır. Işık şiddeti LI-COR marka LI-1500 model ışık sensörü kullanılarak ölçülmüştür. Kültür ortamının sıcaklığı 25 ± 2 °C olacak şekilde sabit tutulmuştur. Sıvı kültürler hava beslemesi (2.4 L/dk) hava pompası ile sağlanmıştır. Sıvı kültürlerin 750 nm'deki [124] absorbansları UV-VIS yardımıyla gün aşırı ölçülmüştür.

Stok kültürleri gün içerisinde 2-3 defa elle çalkalama işlemi yapılarak mikroalg kütlelerinin dibe çökmesi engellenmiştir. Kültürler durgunluk fazına ulaştıklarında yenilenmiştir.

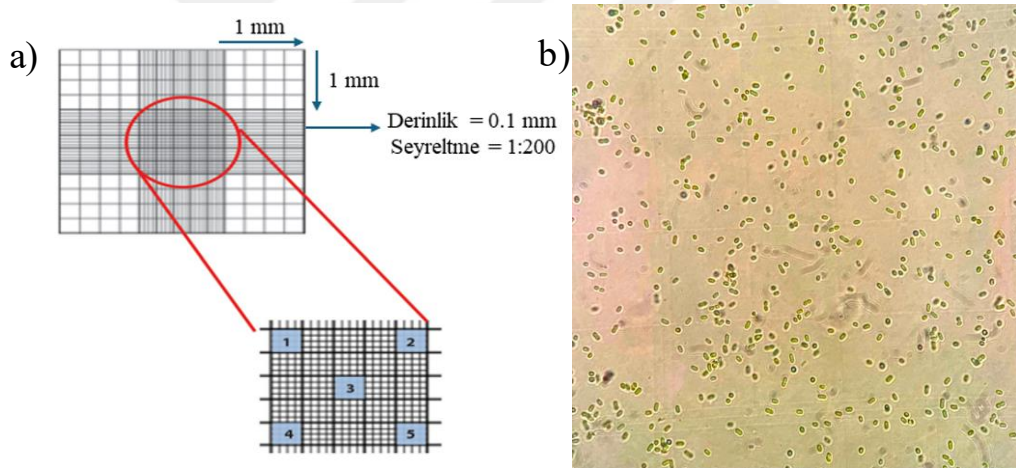
3.3. Analitik Yöntemler

3.3.1. pH Ölçümü

Kültür ortamlarının pH kontrolü başlangıçta ve yetiştirme periyodu boyunca WTW ProfiLine pH/Cond 3320 pH metre kullanılarak gün aşırı yapılmıştır.

3.3.2. Hücre Sayımı

Birim hacimdeki (hücre/mL) *Chlorella vulgaris* biyolojik kütlelerini tespit etmek ve kontaminasyonu kontrol altında tutmak için tüm kültür gruplarının hücre yoğunluğu Thoma (Neubauer) lamı kullanılarak Leica marka DM2000 model ışık mikroskobu altında gün aşırı tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. a) Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı [125], b) *C. vulgaris* hücrelerinin Thoma lamı üzerindeki mikroskop görüntüleri (40X).

Mikroalg hücre konsantrasyonu için Thoma lamındaki 25 kareden 5'i rastgele seçilerek her bir kare için hücreler sayılır (Şekil 3.2a). Mikroalg kültürünün hücre yoğunluğu aşağıdaki denklem 3.1 kullanılarak hesaplanır:

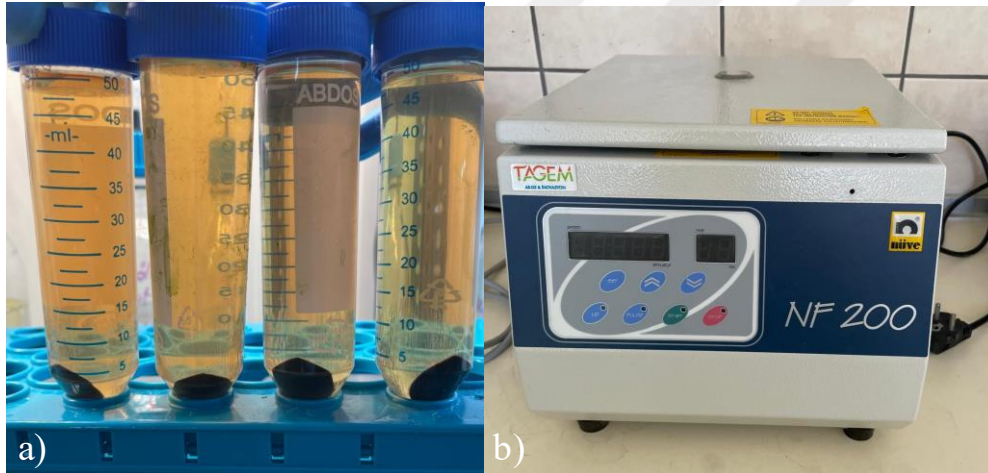
$$\text{Hücre konsantrasyonu (hücre/mL)} = (N1 + \dots + N5) / 5 \times 25 \times 10,000 \quad (\text{denklem 3.1})$$

3.3.3. Optik Yoğunluk

Sıvı kültürlerin hücresel büyüme oranlarını tespit etmek için 750 nm'deki (OD₇₅₀) [124] optik yoğunlukları, belirli zaman aralıklarında Hach DR 6000 UV-VIS spektrofotometre kullanılarak gün aşırı ölçülmüştür.

3.4. Mikroalg Kültürlerinin Hasat Edilmesi

Mikroalg kültürlerinde logaritmik evrenin sona ermesi ve duraklama evresinin takip edilmesi optik yoğunluk değerleri ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Durgun faza ulaşan mikroalgler, 50 ml falcon tüplerine aktararak 6000 rpm, 4 °C'de 10 dk süre ile santrifüjlenerek hasat edilmiştir. Hasat işlemi Nüve marka NF 200 model santrifüj kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3b).



Şekil 3.3. a) Hasat edilen *C. vulgaris* biyokütlesi, b) Santrifüj cihazı.

3.5. Mikroalglerin Kurutulması

Santrifüjlenen biyokütle sabit tartıma ulaşmaya kadar Telstar marka Cryodos model liyofilizatör (Şekil 3.4) kullanılarak -50 °C'de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kuruyan biyokütle -80 °C'de *in-situ* transesterifikasyon prosesi için muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Liyofilizatör.

3.6. Mikroalglerin Yağ Miktarının Tayin Edilmesi

Yaklaşık 1 g kuru mikroalg biyokütleleri 4 N HCl'de (20 ml) ve 70 °C'de kaynatılarak filtre kağıdında süzölmüş, filtre kağıtları 1 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Filtre kağıtları tartılmış ve XT4 filtre torbası içerisine konularak ağzı yapıştırılmıştır. Numuneler, 105 °C'ye ayarlanmış etüvde 3 saat bekletilmiş ve tartımları alınmıştır. Filtre torbaları yağ tayin cihazına (ANKOM XT15) (Şekil 3.5) yerleştirilmiş ve dietil eter ile 30 dakika ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi bittikten sonra, numuneler 105 °C'ye ayarlanmış etüvde 30 dakika daha bekletilmiş ve tekrar tartım alınmıştır. Tartımlar arasındaki farktan, 3.2 numaralı denklem kullanılarak ham yağ içeriği hesaplanmıştır:

$$\text{Lipit (\%)} = \frac{([\text{Filtre torbasının ağırlığı (g)} + \text{Lipit (g)}] - [\text{Filtre torbasının ağırlığı}])}{(\text{Numune miktarı})} \times 100$$

(denklem 3.2)

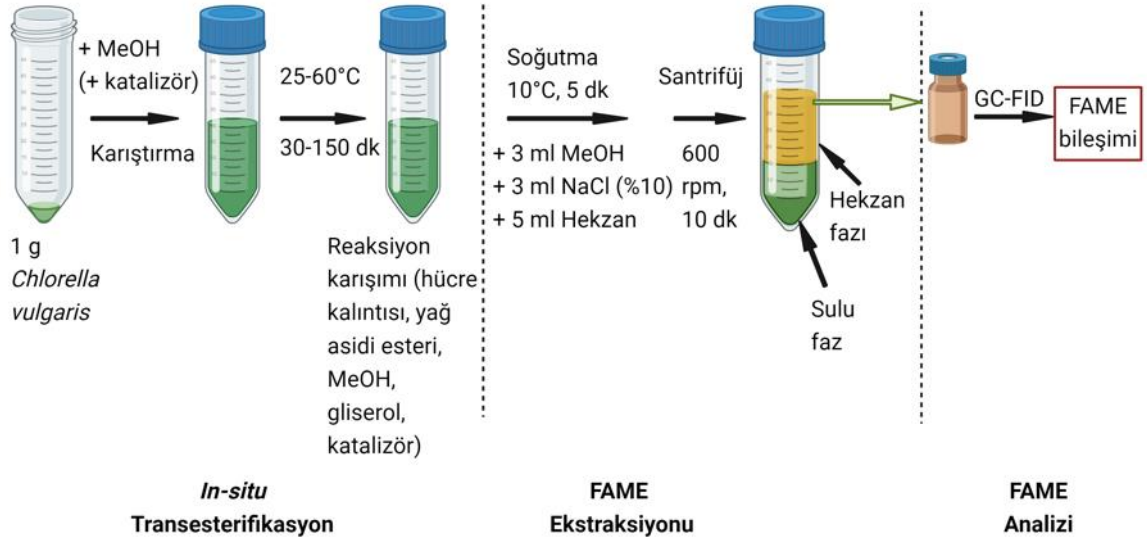


Şekil 3.5. Yağ tayin ekstraksiyon cihazı.

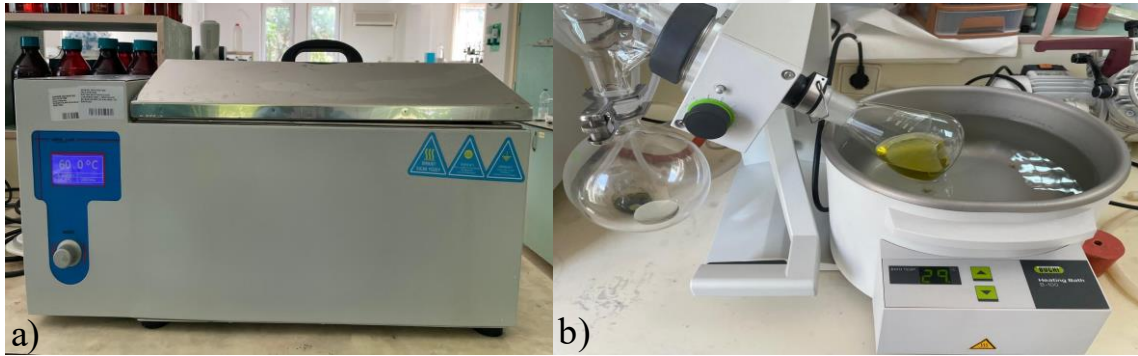
3.7. *In-situ* Transesterifikasyon Prosesi

In-situ transesterifikasyon prosesi için reaksiyon koşulları alkol:biyokütle oranı (v/w), sıcaklık, asit/baz katalizör konsantrasyonu (%) (biyokütleyle dayalı) ve reaksiyon süresi parametreleri için literatürden araştırılmış olup, her bir parametre için en yüksek, en düşük ve orta nokta olmak üzere 3'er değer elde edilmiş, toplamda 26 asit katalizör (H_2SO_4) ve 26 baz katalizör (NaOH) için olmak üzere 52 deney seti elde edilmiştir. Deney seti parametreleri, *in-situ* transesterifikasyon reaksiyonunu optimize etmeyi amaçlamıştır.

In-situ transesterifikasyon prosesinin prosedürü Nguyen vd.'nin çalışmasından [126] modifiye edilmiş ve reaksiyon aşamaları Şekil 3.6'da gösterilmiştir. *Chlorella vulgaris* biyokütlesi (1 g), farklı konsantrasyonlarda (%10, %50 veya %100, sırasıyla biyokütle ağırlığına göre) H_2SO_4 veya NaOH katalizörü ve 5 ml, 20 ml veya 40 ml MeOH içeren reaksiyon ortamında 25°C, 45°C veya 60°C 'de 30, 90 veya 150 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda (Şekil 3.7a) 200 rpm'de tepkimeye bırakılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra çözelti 10 °C'de 5 dk süreyle soğumaya bırakılmıştır. Yağ asidi metil esteri ekstraksiyonu için, soğuyan reaksiyon karışımına 3 ml MeOH, 3 ml NaCl (%10) ve 5 ml hekzan ilave edilerek 6000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiş ve sulu faz ile hekzan fazı ayrımı sağlanmıştır. Ekstrakte edilen yağ asidi metil esteri (biyodizel) kompozisyonunun tespit edilmesi için GC-FID'de analiz edilmek üzere viallere aktarılmıştır.



Şekil 3.6. *Chlorella vulgaris*'in *in-situ* transesterifikasyon, FAME ekstraksiyonu ve GC-FID ile FAME bileşen analizi prosedürü.



Şekil 3.7. a) Çalkalamalı su banyosu, b) Rotary evaporatör

FAME verimini hesaplamak amacıyla, santrifüj işlemi sonrasında biyokütleyi uzaklaştırmak için numune filtre edilmiştir. Reaksiyon karışımı ayırma hunisine aktarılmış ve distile su ile hekzan kullanılarak yıkanmıştır. Ekstrakte edilen FAME, hekzan ile üç kez yıkanmış ve fazla suyu uzaklaştırmak için sodyum sülfat anhidrus (Na_2SO_4) eklenmiştir. Hekzan fazı buharlaştırılmadan önce, numune kabı tartılmıştır. Son olarak, FAME kütlesini belirlemek amacıyla rotary evaporatör (Şekil 3.7b) kullanılarak hekzan buharlaştırılmıştır. Biyodizel (FAME) üretim verimliliği denklem 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Biyodizel (FAME) verimi (\%)} = \frac{\text{Biyodizel (FAME) miktarı (g)}}{\text{Mikroalg miktarı (g)} \times \text{Lipit içeriği (\%)}} \times 100$$

(denklem 3.3)

3.8. Biyodizelin Yağ Asidi Kompozisyonunun GC-FID ile Belirlenmesi

Elde edilen biyodizelin (FAME) içerikleri ve miktarı, Thermo Focus GC kullanılarak doğrulanmıştır. GC cihazı, bir FID dedektörü ve 0.25 µm film kalınlığı ile 0.32 mm iç çaplı, 50 m uzunluğunda bir kolondan oluşmaktadır. Dedektör sıcaklığı 250°C olup, ayırma oranı 1:10'dur. Kolon sıcaklığı, 5 dakika boyunca 140°C'de tutulmuş, ardından 4°C/dakika hızla 200°C'ye ve sonra 1°C/dakika hızla 220°C'ye ısıtılmıştır. GC-FID'nin taşıyıcı gazı olarak helyum kullanılmıştır. *In-situ* transesterifikasyon işlemi sonrası viallere aktarılan FAME numuneleri, kolon hazır hale geldikten sonra GC'ye yerleştirilmiştir. Zirveleri tanımlayabilmek için standart olarak 37 komponentli FAME (Supelco FAME-37) karışımı kullanılmıştır. Zirveler, standart metil esterlerin izomerlerinin tutulma süreleri ile ayırt edilmiştir.

3.9. Biyodizelin Kimyasal Kompozisyonunun FTIR ile Belirlenmesi

Biyodizelin yapısal karakterizasyonu, fonksiyonel grupların ve ester içeriğinin anlaşılması için FTIR spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. FTIR analizi, biyodizel numuneleri için Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Thermo Fisher Scientific, Nicolet 6700 cihazı kullanılarak 4000-400 cm⁻¹ spektral aralığında gerçekleştirilmiş ve FTIR spektrumları elde edilmiştir.

3.10. *In-Situ* Transesterifikasyon Parametrelerinin RSM ile Optimizasyonu

Optimum koşulları elde etmek için Design-Expert yazılımı kullanılarak merkezi kompozit tasarıma (Central Composite Design - CCD) dayalı, indirgenmiş kuadratik modele sahip yanıt yüzey metodolojisi (RSM), (+1), (0), (-1) üç seviyeli-dört faktörle (MeOH:biyokütle oranı, sıcaklık, asit veya baz katalizör konsantrasyonu (%) ve reaksiyon süresi) 52 deney seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmasında R1 (C18:1 içeriği (%)) ve R3 (C16+C18 toplam alanı) yanıtlarını maksimize eden, R2 (C18:2+C18:3 içeriği (%)) yanıtını minimize eden bir metodoloji kullanılmıştır. Parametrelerin polinom modelleri varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. Modelin uygunluğu ANOVA analizi sonuçları; Fisher test değeri (F değeri), regresyon katsayısı (R²), değerlerine göre; anlamlılık seviyeleri %95 güven aralığında değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. *In-situ* Transesterifikasyon Prosesi Deneysel Sonuçları

Yapılan çalışmada *Chlorella vulgaris* biyokütlesi (1 g), farklı konsantrasyonlarda (%10, %50 veya %100, biyokütle ağırlığına göre) H₂SO₄ veya NaOH içeren 5 ml, 20 ml veya 40 ml (v/w) MeOH:biyokütle ilave edilerek 25°C, 45°C veya 60°C 'de 30, 90 veya 150 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda 200 rpm'de tepkimeye bırakılmıştır. Çizelge 4.1'de H₂SO₄ katalizörü kullanılan, Çizelge 4.2'de NaOH katalizörü kullanılan *in-situ* transesterifikasyon prosesi sonuçları; faktörler MeOH:biyokütle oranı, sıcaklık, asit konsantrasyonu (%), süre ve yanıtlar C18:1 (%), C18:2+C18 (%) ve C16+C18 toplam alanı için sunulmuştur.

Çizelge 4.1. H₂SO₄ katalizörü kullanılan *in-situ* transesterifikasyon deney sonuçları.

	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Yanıt 1 (R1)	Yanıt 2 (R2)	Yanıt 3 (R3)
Run	A:alkol	B:sıcaklık	C:asit	D:zaman	C18:1	C18:2 + C18:3	C16 + C18 (Toplam Alan)
	ml	°C	%	dk	%	%	
1	40	45	100	90	42,93	1,96	2267537620
2	20	45	10	30	29,09	40,5	41641977.13
3	20	25	50	30	49,71	9,01	389451413.1
4	5	60	50	90	46,54	2,45	1723504208
5	20	60	10	90	24,09	44,62	10905863.97
6	20	25	100	90	47,94	6,39	912487969.1
7	20	60	50	30	46,44	4,31	862918637.4
8	5	25	50	90	45,98	8,47	287632645
9	5	45	100	90	46,86	2,52	1376618536
10	20	45	10	150	42,61	23,12	36959214.49
11	40	45	50	150	46,83	2,96	1157240158
12	40	25	50	90	29,1	1,13	398379835.6
13	5	45	10	90	35,47	33,34	32779064.19
14	20	60	50	150	46,05	2,62	1230243801
15	20	45	50	90	47,01	4,14	1240857492

16	5	45	50	150	46,11	2,54	1715707415
17	40	45	50	30	26,52	2,27	186331186.3
18	20	60	100	90	46,22	2,39	593799814.4
19	40	45	10	90	43,2	12,54	18554646.79
20	20	45	100	30	47,14	4,76	1123074348
21	40	60	50	90	46,05	2,77	743898969.9
22	5	45	50	30	46,88	6,1	776690698.3
23	20	25	50	150	48,29	6,41	678086996
24	20	45	100	150	46,27	2,38	2045368845
25	20	25	10	90	31,36	34,22	48750932.8
26	20	45	50	90	46,84	4,55	1119580593

Çizelge 4.1'deki H_2SO_4 katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon sonuçlarına göre yüksek asit konsantrasyonunun (%) (katalizör:biyokütle) genellikle biyodizel içeriğinin C16+C18 toplam alanını arttırırken, C18:2+C18:3 (%) içeriğini düşürdüğü tespit edilmiştir. Düşük asit konsantrasyonunun C18:2+C18:3 (%) içeriğini arttırdığı gözlemlenmiştir. Genellikle yüksek alkol seviyelerinden (40 ml) düşük alkol seviyelerine (5 ml) doğru C18:1 (%) içeriği artma eğilimindedir.

Çizelge 4.2'deki NaOH katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon sonuçlarına göre düşük alkol:biyokütle oranı biyodizel kompozisyonunda düşük C18:1 (%) içeriği ve yüksek C18:2+C18:3 (%) içeriği ile ilişkili bulunmuştur. Sıcaklık faktörünün de alkol oranı ile benzer şekilde C18:1 (%) içeriğini düşürürken C18:2+C18:3 (%) içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir. Düşük baz konsantrasyonu (%10) genellikle yüksek C18:1 (%) içeriği ve yüksek toplam C16+C18 alanı ile ilişkilidir. Yüksek baz konsantrasyonu (%100) ise genellikle düşük toplam C16+C18 alanı ile ilişkilidir. Bu durumun sabunlaşma (saponifikasyon) reaksiyonunun gerçekleşmesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Çizelge 4.2. NaOH katalizörü kullanılan *in-situ* transesterifikasyon deney sonuçları.

	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Yanıt 1 (R1)	Yanıt 2 (R2)	Yanıt 3 (R3)
Run	A:alkol	B:sıcaklık	C:baz	D:zaman	C18:1	C18:2 + C18:3	C16 + C18 (Toplam Alan)
	ml	°C	%	dk	%	%	
1	40	45	100	90	46,98	5,62	649056724.1
2	20	45	10	30	48,03	4,81	1715788807
3	20	25	50	30	47,23	6,35	1288941925
4	5	60	50	90	0,29	97,09	128821292.4
5	20	60	10	90	44,86	11,56	94644823.21
6	20	25	100	90	45,31	10,56	573393377.4
7	20	60	50	30	44,52	13,15	703705612
8	5	25	50	90	20,08	55,01	149776741.9
9	5	45	100	90	-----	95,58	81518188.27
10	20	45	10	150	47,38	6,76	1722763806
11	40	45	50	150	47,97	4,79	1174607527
12	40	25	50	90	47,41	3,24	1677556701
13	5	45	10	90	44,8	11,13	1231342765
14	20	60	50	150	11,0	77,17	100681382.6
15	20	45	50	90	45,2	11,76	824697783
16	5	45	50	150	0,64	96,84	120133761.3
17	40	45	50	30	47,09	3,61	1367392794
18	20	60	100	90	0,33	96,47	55777900.7
19	40	45	10	90	46,84	4,02	1384474917
20	20	45	100	30	43,11	15,44	386353258.3
21	40	60	50	90	47,22	6,28	772529442.4
22	5	45	50	30	8,76	80,3	131505428.1
23	20	25	50	150	46,66	8,17	1319830963
24	20	45	100	150	2,83	92,06	92048248.34
25	20	25	10	90	47,84	6,29	1562559523
26	20	45	50	90	45,69	10,93	955666363.2

4.2. *In-situ* Transesterifikasyon Parametrelerinin RSM Optimizasyonu

Biyodizel üretiminin optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarını belirlemek için Design Expert yazılımı kullanılarak üç seviyeli-dört faktör merkezi kompozit tasarımı 52 deney setinin sonuçlarına göre uygulanmıştır. *In-situ* transesterifikasyon parametrelerinin (alkol:biyokütle oranı, sıcaklık, asit/baz katalizör konsantrasyonu (%) ve reaksiyon süresi) ve bunların etkileşimlerinin yanıt parametreleri (R1: C18:1 içeriği (%), R2: C18:2+C18:3 içeriği (%) ve R3: C16+C18 toplamı üzerindeki etkilerini belirlemek için ANOVA kullanılmıştır. Analiz sonucunda kuadratik model denklemleri önerilmiştir. Üç seviyeli faktöriyel optimizasyon için tasarlanan faktörlerin yüksek (+1), orta (0) ve düşük (-1) değerleri asit katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon için Çizelge 4.3'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.3. Asit katalizör (H₂SO₄) için üç seviyeli faktöriyel tasarıma dayalı faktör ve yanıtların kodlanmış ve elde edilmiş değerleri.

Faktörler	Birim	Minimum	Maksimum	Coded Low	Coded High	Ortalama	Standart Sapma
A:alkol	ml	5,00	40,00	-1 ↔ 5,00	+1 ↔ 40,00	21,15	12,19
B:sıcaklık	°C	25,00	60,00	-1 ↔ 25,00	+1 ↔ 60,00	43,85	12,19
C:asit	%	10,00	100,00	-1 ↔ 10,00	+1 ↔ 100,00	52,31	31,28
D:zaman	dk	30,00	150,00	-1 ↔ 30,00	+1 ↔ 150,00	90,00	41,57
Yanıtlar	Birim	Analiz	Minimum	Maksimum	Standart Sapma	Transform	Model
R1: C18:1	(%)	Polynomial	24,09	49,71	7,67	Base 10 Log	İndirgenmiş kuadratik
R2: C18:2+C18:3	(%)	Polynomial	1,13	44,62	13,04	Base 10 Log	İndirgenmiş kuadratik
R3: C16+C18 (Toplam Alan)	a.u.	Polynomial	1,09059E+07	2,26754E+09	6,642E+08	Base 10 Log	İndirgenmiş kuadratik

Alkol:biyokütle oranı (v/w), sıcaklık, asit katalizör konsantrasyonu (%) (ağırlıkça) ve reaksiyon süresi parametrelerinin C18:1 (%) içeriği yanıtı üzerindeki etkileri Çizelge 4.4’de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Asit katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon prosesi için C18:1 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.

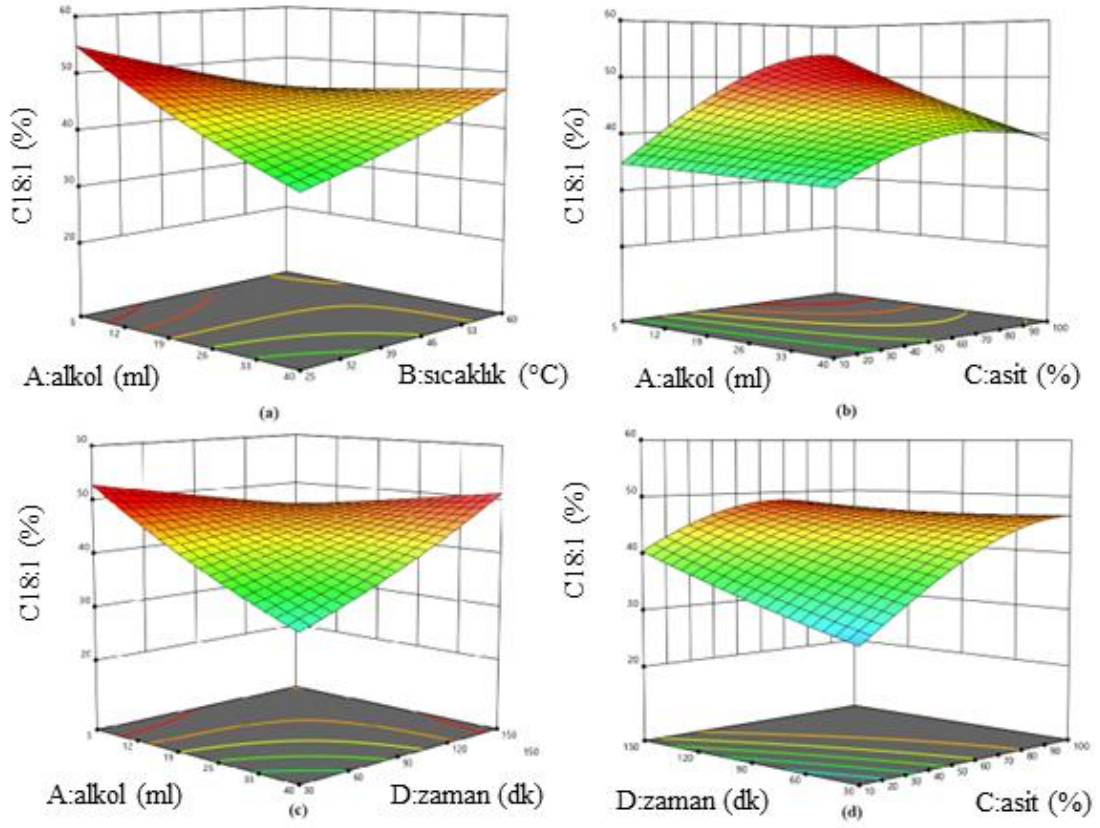
Kaynak	Kareler Toplamı	Desorpsiyon Faktörü	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	0,1380	9	0,0153	3,40	0,0160
A-alkol	0,0202	1	0,0202	4,48	0,0503
B-sıcaklık	0,0009	1	0,0009	0,1960	0,6639
C-asit	0,0514	1	0,0514	11,39	0,0039
D-zaman	0,0141	1	0,0141	3,12	0,0965
AB	0,0133	1	0,0133	2,94	0,1058
AC	0,0038	1	0,0038	0,8498	0,3703
AD	0,0179	1	0,0179	3,96	0,0639
CD	0,0071	1	0,0071	1,57	0,2283
C ²	0,0175	1	0,0175	3,87	0,0666

Asit katalizör sistemi ile, biyodizel içeriğindeki C18:1 (%) yanıtı için öngörülen model aşağıdaki gibidir. RSM ilişkisine ait 3D model grafikleri Şekil 4.1’de incelenmiştir.

$$\text{Biyodizel C18:1 (\%)} = +1,64445 - 0,013823x_{\text{alkol}} - 0,003679x_{\text{sıcaklık}} + 0,006619x_{\text{asit}} + 0,000013x_{\text{zaman}} + 0,000186x_{\text{alkol}}x_{\text{sıcaklık}} - 0,000039x_{\text{alkol}}x_{\text{asit}} + 0,000063x_{\text{alkol}}x_{\text{zaman}} - 0,000016x_{\text{asit}}x_{\text{zaman}} + 0,000026x_{\text{asit}}^2$$

$$(R^2=0.81, p= 0,0160)$$

Şekil 4.1’deki yanıt yüzey grafikleri, reaksiyon parametrelerinin aynı anda nasıl etkileştiğini ve biyodizel içeriğindeki C18:1 yüzdesi üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 4.1b’deki alkol-asit konsantrasyonu ilişkisi C18:1 (%) içeriğinin düşük alkol:biyokütle oranı ve yüksek asit konsantrasyonunda arttığını göstermektedir.



Şekil 4.1. Asit katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon koşullarında FAME C18:1 içeriği (%) yanıt yüzey grafikleri. a) alkol-sıcaklık ilişkisi, b) alkol-asit konsantrasyonu ilişkisi, c) alkol-zaman ilişkisi, d) asit konsantrasyonu-zaman ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.

Asit katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon proses parametrelerinin C18:2 +C18:3 (%) içeriği yanıtı üzerindeki etkileri Çizelge 4.5’de sunulmuştur.

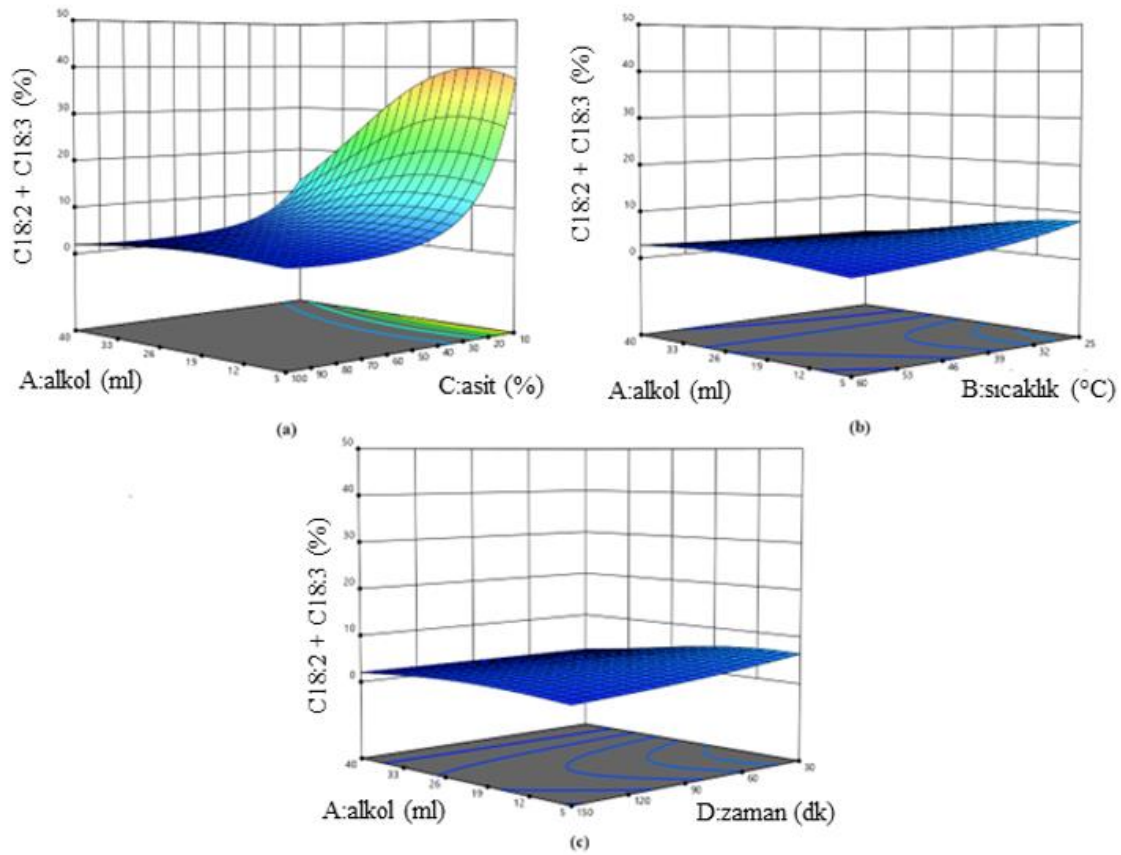
Çizelge 4.5. Asit katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon prosesi için C18:2+C18:3 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.

Kaynak	Kareler Toplamı	Desorpsiyon Faktörü	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	5,02	9	0,5572	60,91	< 0.0001
A-alkol	0,2968	1	0,2968	32,44	< 0.0001
B-sıcaklık	0,0671	1	0,0671	7,33	0,0155
C-asit	2,69	1	2,69	293,98	< 0.0001
D-zaman	0,0859	1	0,0859	9,39	0,0074
AB	0,2431	1	0,2431	26,57	< 0.0001
AC	0,0246	1	0,0246	2,69	0,1204
AD	0,0651	1	0,0651	7,12	0,0169
A ²	0,2075	1	0,2075	22,68	0,0002
C ²	1,06	1	1,06	115,41	< 0.0001

Asit katalizör sistemi ile, biyodizel içeriğindeki C18:2+C18:3 (%) yanıtı için öngörülen model aşağıdaki gibidir. RSM ilişkisine ait 3D model grafikleri Şekil 4.2’de incelenmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Biyodizel (C18:2+C18:3) (\%)} &= +3,16098 - 0,031381x_{\text{alkol}} - 0,022178x_{\text{sıcaklık}} - \\ &0,035851x_{\text{asit}} - 0,004144x_{\text{zaman}} + 0,000794x_{\text{alkol}x_{\text{sıcaklık}}} + 0,000099x_{\text{alkol}x_{\text{asit}}} + \\ &0,000121x_{\text{alkol}x_{\text{zaman}}} - 0,000618x_{\text{alkol}}^2 + 0,000209x_{\text{asit}}^2 \end{aligned}$$

$$(R^2=0.97, p < 0.0001)$$



Şekil 4.2. C18:2+C18:3 (%) için a) alkol-asit konsantrasyonu ilişkisine, b) alkol-sıcaklık ilişkisine, c) alkol-zaman ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.

Şekil 4.2’deki yanıt yüzey grafikleri, reaksiyon parametrelerinin aynı anda nasıl etkileştiğini ve biyodizel içeriğindeki C18:2+C18:3 yüzdesi üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 4.2a’ya göre düşük asit konsantrasyonları biyodizel kompozisyonundaki çoklu doymamış yağ asitleri C18:2+ C18:3’nin artmasına sebep olmaktadır.

Alkol:biyokütle oranı, sıcaklık, asit katalizör konsantrasyonu ve reaksiyon süresi parametrelerinin C16+C18 toplam alan yanıtı üzerindeki etkileri Çizelge 4.6’da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Asit katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon prosesi için C16+C18 içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.

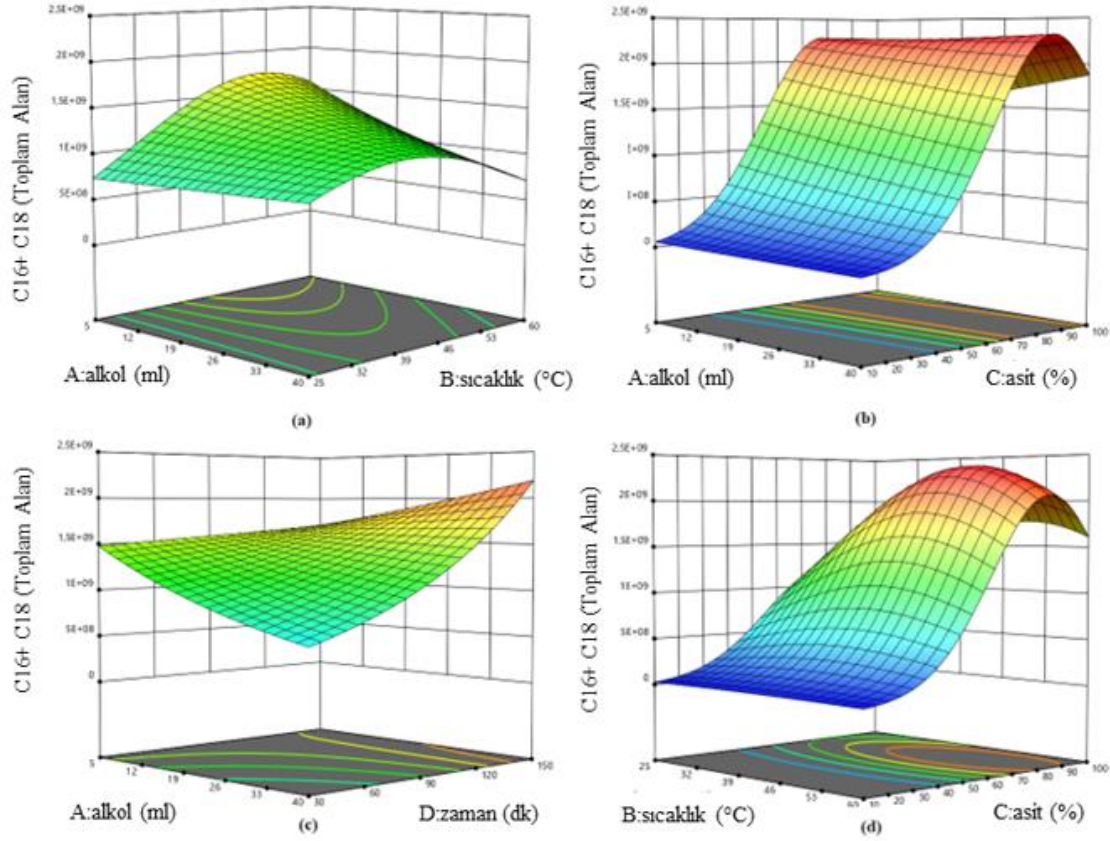
Kaynak	Kareler Toplamı	Desorpsiyon Faktörü	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	11,27	10	1,13	19,47	< 0.0001
A-alkol	0,0605	1	0,0605	1,05	0,3227
B-sıcaklık	0,0490	1	0,0490	0,8456	0,3724
C-asit	7,82	1	7,82	135,07	< 0.0001
D-zaman	0,2898	1	0,2898	5,01	0,0409
AB	0,0423	1	0,0423	0,7300	0,4063
AC	0,0767	1	0,0767	1,32	0,2678
AD	0,0689	1	0,0689	1,19	0,2925
BC	0,0352	1	0,0352	0,6075	0,4479
B ²	0,1513	1	0,1513	2,61	0,1268
C ²	3,25	1	3,25	56,20	< 0.0001

Asit katalizör sistemi ile, biyodizel içeriğindeki C16+C18 total alanı yanıtı için öngörülen model aşağıdaki gibidir. RSM ilişkisine ait 3D model grafikleri Şekil 4.3’de incelenmiştir.

$$\text{Biyodizel içeriğinin C16+C18 total alanı} = +6,10646 - 0,010793x_{\text{alkol}} + 0,049591x_{\text{sıcaklık}} + 0,049823x_{\text{asit}} - 0,000169x_{\text{zaman}} - 0,000331x_{\text{alkol}}x_{\text{sıcaklık}} + 0,000174x_{\text{alkol}}x_{\text{asit}} + 0,000124x_{\text{alkol}}x_{\text{zaman}} + 0,000118x_{\text{asit}}x_{\text{sıcaklık}} + 0,000528x_{\text{sıcaklık}}^2 - 0,000367x_{\text{asit}}^2$$

$$(R^2=0.94, p < 0.0001)$$

Şekil 4.3’deki yanıt yüzey grafikleri, reaksiyon parametrelerinin aynı anda nasıl etkileştiğini ve biyodizel içeriğindeki C16+C18 toplam alanı üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. C16+C18 toplam alanı için; a) alkol-sıcaklık ilişkisine, b) alkol-asit konsantrasyonu ilişkisine, c) alkol-zaman ilişkisine, d) sıcaklık-asit konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.

Model yanıtlar için anlamlı olup, R1, R2 ve R3 yanıtları için H_2SO_4 katalizörü varlığında en güçlü etkiye sahip faktörün asit konsantrasyonu (%) olduğu ANOVA sonuçlarına göre tespit edilmiştir. Asit konsantrasyonu (%) (p -değeri < 0.0001) ve alkol:biyokütle oranı (p -değeri < 0.0001) faktörleri ANOVA sonuçlarına göre R2 yanıtı, biyodizel içeriğindeki C18'in çoklu doymamış yağ asitleri (C18:2 + C18:3) (%) üzerinde en önemli etkiye sahip olmak üzere (Çizelge 4.5) sıcaklık ($^{\circ}C$) (p -değeri = 0,0155) ve zaman (dk) faktörünün de (p -değeri = 0,0074) R2 yanıtı üzerinde etkiye sahip olduğu görülmektedir. Asit konsantrasyonu (%) faktörü (p -değeri < 0.0001) R3 yanıtı, yüksek C16+C18 içeriğine sahip biyodizel oluşumunda güçlü bir etkiye sahiptir (Çizelge 4.6).

Üç seviyeli faktöriyel optimizasyon için tasarlanan faktörlerin yüksek (+1), orta (0) ve düşük (-1) değerleri baz katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon için Çizelge 4.7'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.7. Baz katalizör (NaOH) için üç seviyeli faktöriyel tasarıma dayalı faktör ve yanıtların kodlanmış ve elde edilmiş değerleri.

Faktörler	Birim	Minimum	Maksimum	Coded Low	Coded High	Ortalama	Standart Sapma
A:alkol	ml	5,00	40,00	-1 ↔ 5,00	+1 ↔ 40,00	21,15	12,19
B:sıcaklık	°C	25,00	60,00	-1 ↔ 25,00	+1 ↔ 60,00	43,85	12,19
C:baz	%	10,00	100,00	-1 ↔ 10,00	+1 ↔ 100,00	52,31	31,28
D:zaman	dk	30,00	150,00	-1 ↔ 30,00	+1 ↔ 150,00	90,00	41,57
Yanıtlar	Birim	Analiz	Minimum	Maksimum	Standart Sapma	Transform	Model
R1: C18:1	(%)	Polynomial	0,29	48,03	18,77	Natural Log	İndirgenmiş kuadratik
R2: C18:2+C18:3	(%)	Polynomial	3,24	97,09	37,80	Base 10 Log	İndirgenmiş kuadratik
R3: C16+C18 (Toplam Alan)	a.u.	Polynomial	5,57779E+07	1,72276E+09	6,050E+08	Natural Log	İndirgenmiş kuadratik

Alkol:biyokütle oranı, sıcaklık, baz katalizör konsantrasyonu (%) ve reaksiyon süresi parametrelerinin C18:1 (%) içeriği yanıtı üzerindeki etkileri Çizelge 4.8’de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Baz katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon prosesi için C18:1 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.

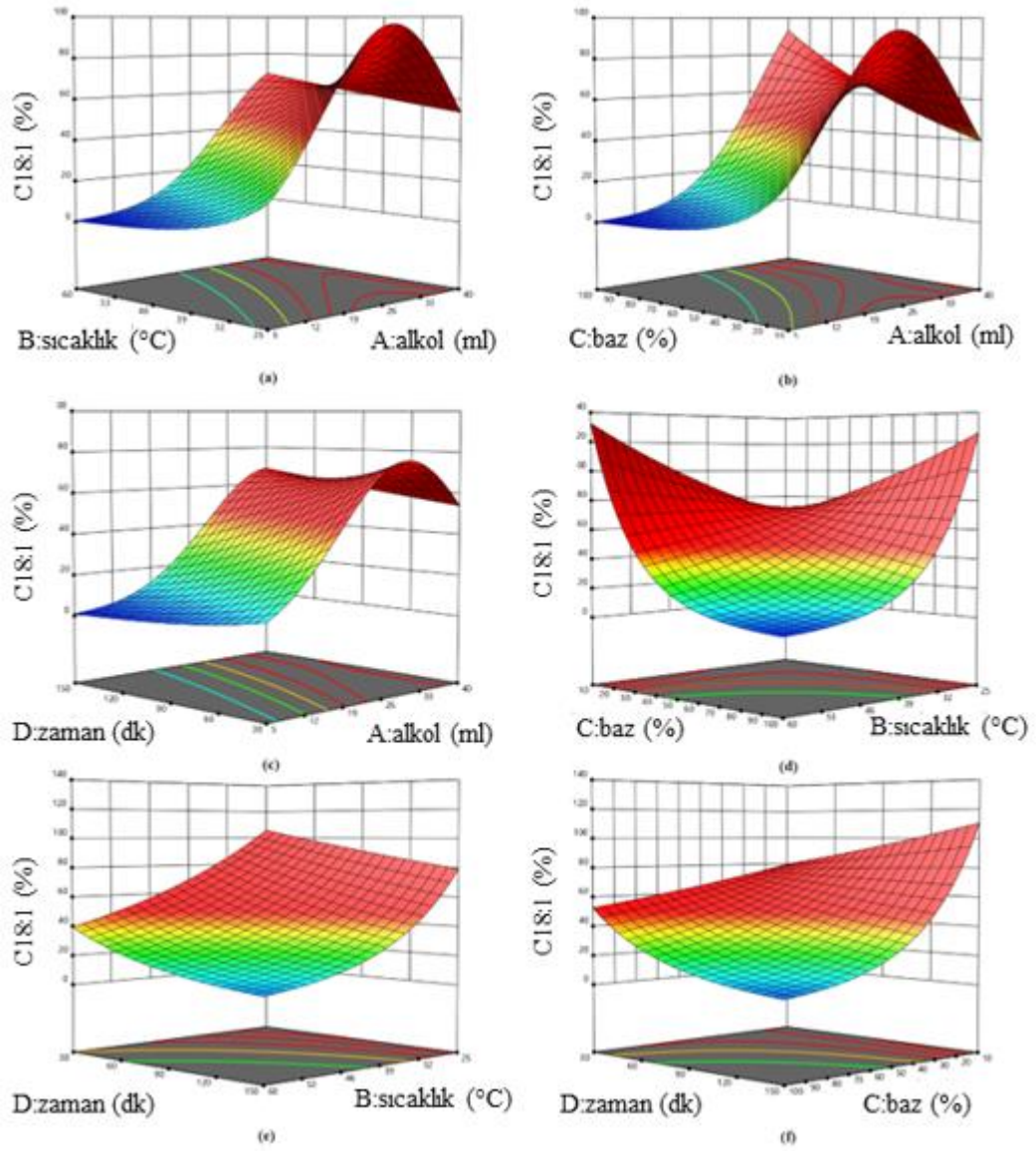
Kaynak	Kareler Toplamı	Desorpsiyon Faktörü	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	57,86	11	5,26	10,80	< 0.0001
A-alkol	20,10	1	20,10	41,28	< 0.0001
B-sıcaklık	8,66	1	8,66	17,79	0,0010
C-baz	8,24	1	8,24	16,92	0,0012
D-zaman	2,99	1	2,99	6,14	0,0277
AB	4,02	1	4,02	8,26	0,0130
AC	4,81	1	4,81	9,89	0,0078
AD	1,64	1	1,64	3,37	0,0892
BC	5,96	1	5,96	12,24	0,0039
BD	0,5613	1	0,5613	1,15	0,3025
CD	1,87	1	1,87	3,83	0,0721
A ²	5,55	1	5,55	11,40	0,0050

Baz katalizör sistemi ile, biyodizel içeriğindeki C18:1 (%) yanıtı için öngörülen model aşağıdaki gibidir. RSM ilişkisine ait 3D model grafikleri Şekil 4.4’de incelenmiştir.

$$\ln(\text{C18:1}) = +4,00738 - 0,051672x_{\text{alkol}} - 0,005776x_{\text{sıcaklık}} + 0,030719x_{\text{baz}} + 0,006667x_{\text{zaman}} + 0,003232x_{\text{alkol}}x_{\text{sıcaklık}} + 0,001663x_{\text{alkol}}x_{\text{baz}} + 0,000606x_{\text{alkol}}x_{\text{zaman}} - 0,001534x_{\text{baz}}x_{\text{sıcaklık}} - 0,000354x_{\text{zaman}}x_{\text{sıcaklık}} - 0,000252x_{\text{baz}}x_{\text{zaman}} - 0,003290x_{\text{alkol}}^2$$

$$(R^2=0.91, p < 0.0001)$$

Şekil 4.4’deki yanıt yüzey grafikleri, reaksiyon parametrelerinin aynı anda nasıl etkileştiğini ve biyodizel içeriğindeki C18:1 (%) üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Grafikler tüm parametrelerin C18:1 (%) içeriği üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Şekil 4.4d grafiği yüksek sıcaklık ve baz konsantrasyonunun C18:1 (%) içeriğini azalttığını ifade etmektedir. ANOVA sonuçlarına göre (Çizelge 4.8) reaksiyon süresinin C18:1 (%) üzerindeki en az etkili faktör olduğu bilinmekle birlikte Şekil 4.4f baz konsantrasyonu ve reaksiyon süresi arttıkça C18:1 (%) içeriğinin azaldığını ifade etmektedir.



Şekil 4.4. C18:1 yüzde değeri için a) sıcaklık-alkol ilişkisine, b) baz konsantrasyonu-alkol ilişkisine, c) zaman-alkol ilişkisine, d) baz konsantrasyonu-sıcaklık ilişkisine, e) zaman-sıcaklık ilişkisine ve f) zaman-baz konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.

Alkol:biyokütle oranı, sıcaklık, baz katalizör konsantrasyonu ve reaksiyon süresi parametrelerinin C18:2+C18:3 (%) içeriği yanıtı üzerindeki etkileri Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. Baz katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon prosesi için C18:2+C18:3 (%) içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.

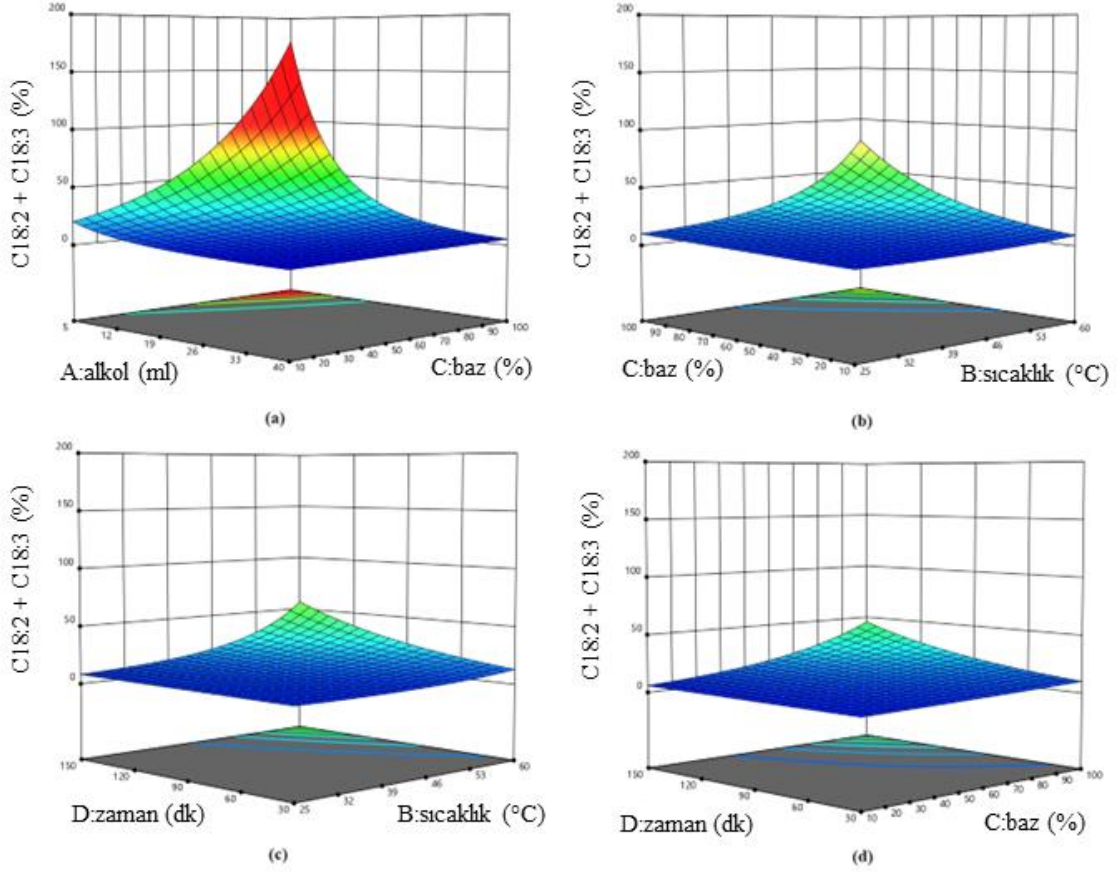
Kaynak	Kareler Toplamı	Desorpsiyon Faktörü	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	6,65	10	0,6651	21,71	< 0.0001
A-alkol	3,92	1	3,92	127,88	< 0.0001
B-sıcaklık	0,8462	1	0,8462	27,63	< 0.0001
C-baz	0,9229	1	0,9229	30,13	< 0.0001
D-zaman	0,3109	1	0,3109	10,15	0,0061
AC	0,1430	1	0,1430	4,67	0,0473
BC	0,1351	1	0,1351	4,41	0,0530
BD	0,0966	1	0,0966	3,15	0,0961
CD	0,1056	1	0,1056	3,45	0,0831
A ²	0,1376	1	0,1376	4,49	0,0511
B ²	0,0830	1	0,0830	2,71	0,1206

Baz katalizör sistemi ile, biyodizel içeriğindeki C18:2+C18:3 yanıtı için öngörülen model aşağıdaki gibidir. RSM ilişkisine ait 3D model grafikleri Şekil 4.5’de incelenmiştir.

$$\log_{10}(\text{C18:2+C18:3}) = + 2,57555 - 0,043868x_{\text{alkol}} - 0,043868x_{\text{sıcaklık}} - 0,003554x_{\text{baz}} - 0,006803x_{\text{zaman}} - 0,000238x_{\text{alkol}}x_{\text{baz}} + 0,000231x_{\text{baz}}x_{\text{sıcaklık}} + 0,000147x_{\text{zaman}}x_{\text{sıcaklık}} - 0,000252x_{\text{baz}}x_{\text{zaman}} + 0,000504x_{\text{alkol}}^2 + 0,000391x_{\text{sıcaklık}}^2$$

$$(R^2=0.94, p < 0.0001)$$

Şekil 4.5’deki yanıt yüzey grafikleri, reaksiyon parametrelerinin aynı anda nasıl etkileştiğini ve biyodizel içeriğindeki C18:2+ C18:3 (%) üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 4.5a düşük alkol:biyokütle oranı ve yüksek baz konsantrasyonunda biyodizel içeriğindeki çoklu doymamış yağ asitleri yüzdesinin arttığını göstermektedir. Şekil 4.5b sıcaklık ve baz konsantrasyonu arttıkça C18:2+ C18:3 (%) içeriğinin arttığını ifade etmektedir. Şekil 4.5c grafiği yüksek sıcaklık ve reaksiyon sürelerinde C18:2+ C18:3 (%) içeriğinin arttığını göstermektedir. Şekil 4.5d yanıt yüzey grafiği reaksiyon süresi ve baz konsantrasyonu arttıkça C18:2+ C18:3 (%) içeriğinin arttığını göstermektedir.



Şekil 4.5. C18:2+C18:3 yüzde değeri için a) alkol- baz konsantrasyonu ilişkisine, b) baz konsantrasyonu-sıcaklık ilişkisine, c) zaman-sıcaklık ilişkisine, d) zaman-baz konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.

Alkol:biyokütle oranı, sıcaklık, baz katalizör konsantrasyonu ve reaksiyon süresi parametrelerinin C16+C18 toplam alan yanıtı üzerindeki etkileri Çizelge 4.10'da sunulmuştur.

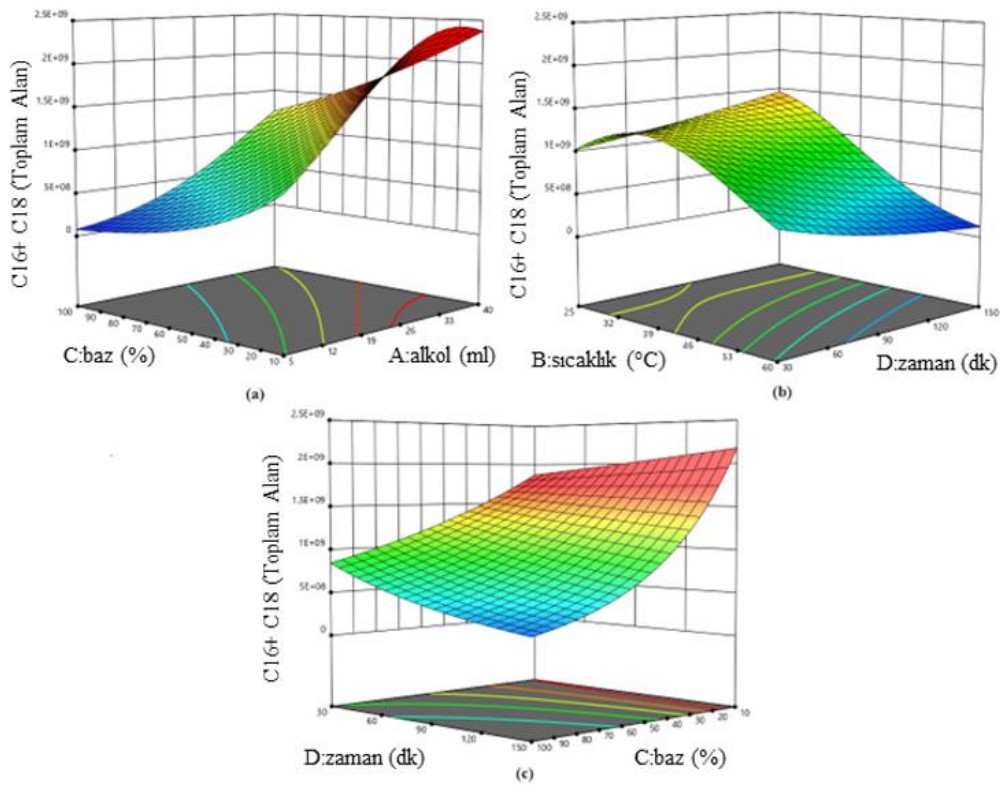
Çizelge 4.10. Baz katalizör kullanılan *in-situ* transesterifikasyon prosesi için C16+C18 içeriğine ilişkin etkileşim parametrelerinin ANOVA sonuçları.

Kaynak	Kareler Toplamı	Desorpsiyon Faktörü	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	28,99	9	3,22	7,71	0,0002
A-alkol	10,67	1	10,67	25,52	0,0001
B-sıcaklık	7,11	1	7,11	17,02	0,0008
C-baz	6,72	1	6,72	16,08	0,0010
D-zaman	0,9182	1	0,9182	2,20	0,1577
AC	0,7588	1	0,7588	1,82	0,1966
BD	0,8507	1	0,8507	2,04	0,1728
CD	0,5247	1	0,5247	1,26	0,2790
A ²	0,7308	1	0,7308	1,75	0,2046
B ²	1,50	1	1,50	3,60	0,0759

Baz katalizör sistemi ile, biyodizel içeriğindeki C16+C18 total alanı yanıtı için öngörülen model aşağıdaki gibidir. RSM ilişkisine ait 3D model grafikleri Şekil 4.6’da incelenmiştir.

$$\ln(\text{C16+C18 total alanı}) = +17,20663 + 0,076436x_{\text{alkol}} + 0,136808x_{\text{sıcaklık}} - 0,017089x_{\text{baz}} + 0,021179x_{\text{zaman}} + 0,000547x_{\text{alkol}}x_{\text{baz}} - 0,000436x_{\text{zaman}}x_{\text{sıcaklık}} - 0,000134x_{\text{baz}}x_{\text{zaman}} - 0,001161x_{\text{alkol}}^2 + 0,001665x_{\text{sıcaklık}}^2$$

$$(R^2=0.83, p = 0,0002)$$



Şekil 4.6. C16+C18 total alanı için, a) baz konsantrasyonu-alkol ilişkisine, b) sıcaklık-zaman ilişkisine, c) zaman-baz konsantrasyonu ilişkisine ait yanıt yüzey grafikleri.

Şekil 4.6’daki yanıt yüzey grafikleri, reaksiyon parametrelerinin aynı anda nasıl etkileştiğini ve biyodizel içeriğindeki C16+C18 toplam alanı üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 4.6a düşük alkol:biyokütle oranı ve düşük baz konsantrasyonunda C16+C18 toplam alanının arttığını göstermektedir. Şekil 4.6b grafiğinden yüksek sıcaklık ve uzun reaksiyon süresinin C16+C18 toplam alanını azalttığı görülmektedir. Şekil 4.6c grafiği de reaksiyon süresi ve baz konsantrasyonu arttıkça biyodizel içeriğindeki C16+C18 toplam alanının azaldığını ifade etmektedir.

Model yanıtlar için anlamlı olup, alkol:biyokütle oranı, baz konsantrasyonu (%), sıcaklık (°C) faktörlerinin R1, R2 ve R3 yanıtları üzerinde güçlü etkiye sahip olduğu ANOVA sonuçlarına göre tespit edilmiştir. Alkol:biyokütle oranı R1 (p -değeri < 0.0001), R2 (p -değeri < 0.0001), R3 (p -değeri $= 0.0001$) yanıtları için en güçlü etkiye sahip faktördür. Doymamış yağ asitleri (C18:2 + C18:3) (%) içeriği üzerinde alkol:biyokütle oranı, baz konsantrasyonu (%), sıcaklık (°C) faktörleri < 0.0001 p -değeriyle (Çizelge 4.9) önemli etkiye sahiptir. R1 ve R2 yanıtları üzerinde zaman (dk) faktörünün diğer faktörlere göre önemsiz derecede etkisi görülmekte olup R3 yanıtı C16+C18 total alanı üzerinde zaman (dk) faktörünün anlamlı bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

4.3. RSM Kullanılarak Optimize Edilen *In-situ* Transesterifikasyon Koşullarında Üretilen Biyodizel Ürünleri İçin GC-FID Analizi

Deney seti verilerine göre Design Expert yazılımının RSM optimizasyonuna dayanan deney koşulları ve yanıtlar Çizelge 4.11’de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. *Chlorella vulgaris* mikroalginden biyodizel üretimi için RSM kullanılarak elde edilen optimum *in-situ* transesterifikasyon koşulları ve yanıtlar.

Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Yanıt 1 (R1)	Yanıt 2 (R2)	Yanıt 3 (R3)
A:alkol	B:sıcaklık	C:asit	D:zaman	C18:1	C18:2 + C18:3	C16 + C18 (Toplam Alan)
ml	°C	%	dk	%	%	
5	60	85	72	49,71	1,40	2,09445E+09
Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Yanıt 1 (R1)	Yanıt 2 (R2)	Yanıt 3 (R3)
A:alkol	B:sıcaklık	C:baz	D:zaman	C18:1	C18:2 + C18:3	C16 + C18 (Toplam Alan)
ml	°C	%	dk	%	%	
39	36	58	64	48,46	3,03	1,75019E+09

Çizelge 4.11’de yer alan optimum *in-situ* transesterifikasyon sonuçlarına göre deneyler tekrarlanmış olup (n=4) GC-FID sonuçları H₂SO₄ ve NaOH katalizör için sırasıyla Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Asit ve baz katalizör varlığında gerçekleşen *in-situ* transesterifikasyon biyodizel ürünlerinin GC-FID kromatogramları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 gösterilmekte olup, her iki kromatogramda da baskın metil ester pikleri C18:1 oleik asittir (~19.52. dakikada gelen pikler). H₂SO₄ katalizörü kullanılarak optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında elde edilen biyodizelin C18:1 içeriği (%49.52±0.11) NaOH katalizörü kullanılarak elde edilen biyodizelin C18:1 içeriğinden (%47.98±0.09) yüksek olup yanıt yüzey metodolojisine ait teorik sonuçlar deney sonuçları ile uyumludur. FAME içeriğindeki toplam C16+C18 pik alanı da asit katalizör varlığında baz katalizör performansından yüksektir. Doymamış yağ asitleri C18:2 linoleik asit ve C18:3 linolenik asit içeriği NaOH katalizör kullanılarak gerçekleştirilen *in-situ* transesterifikasyon proses ürünü biyodizel içeriğinde (%3.54±0.50) ve H₂SO₄ katalizörü kullanılan biyodizele göre (%1.80±0.31) daha fazladır.

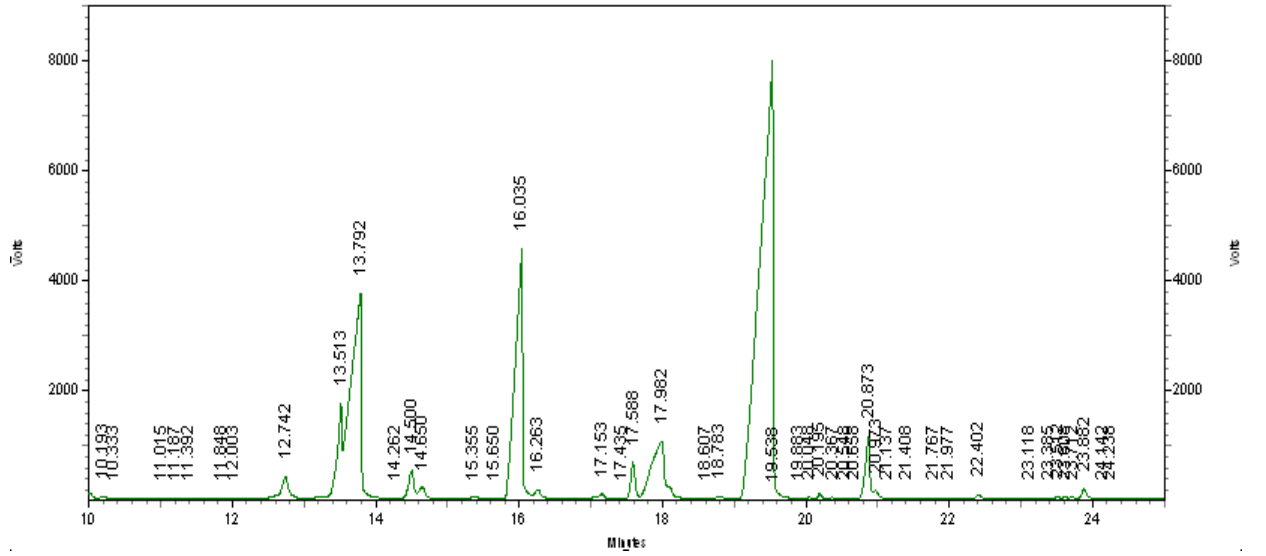
Biyodizel üretim verimliliği H₂SO₄ katalizörü kullanılarak gerçekleştirilen *in-situ* transesterifikasyon prosesi için %67.28 (yağ oranına dayalı) ve NaOH katalizörü kullanılarak gerçekleştirilen *in-situ* transesterifikasyon prosesi için %38.68 olarak denklem 3.3'den hesaplanmıştır. Nguyen vd. tarafından yapılan çalışmada KOH katalizörü kullanılan *in-situ* transesterifikasyon ile *Chlorella vulgaris*'den biyodizel verimi %70.5 iken H₂SO₄ katalizörü kullanılan proseste verim %94.6 bulunmuştur [127]. Asit katalizörün *in-situ* transesterifikasyon prosesi için baz katalizörden daha iyi performans gösterdiği bu çalışmada da gözlenmiştir. Baz katalizör kullanıldığında elde edilen düşük biyodizel üretim verimliliği transesterifikasyon yerine sabunlaşma reaksiyonu gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.12. H₂SO₄ kullanılarak optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında gerçekleşen biyodizel üretimi (n=4) GC-FID sonuçları.

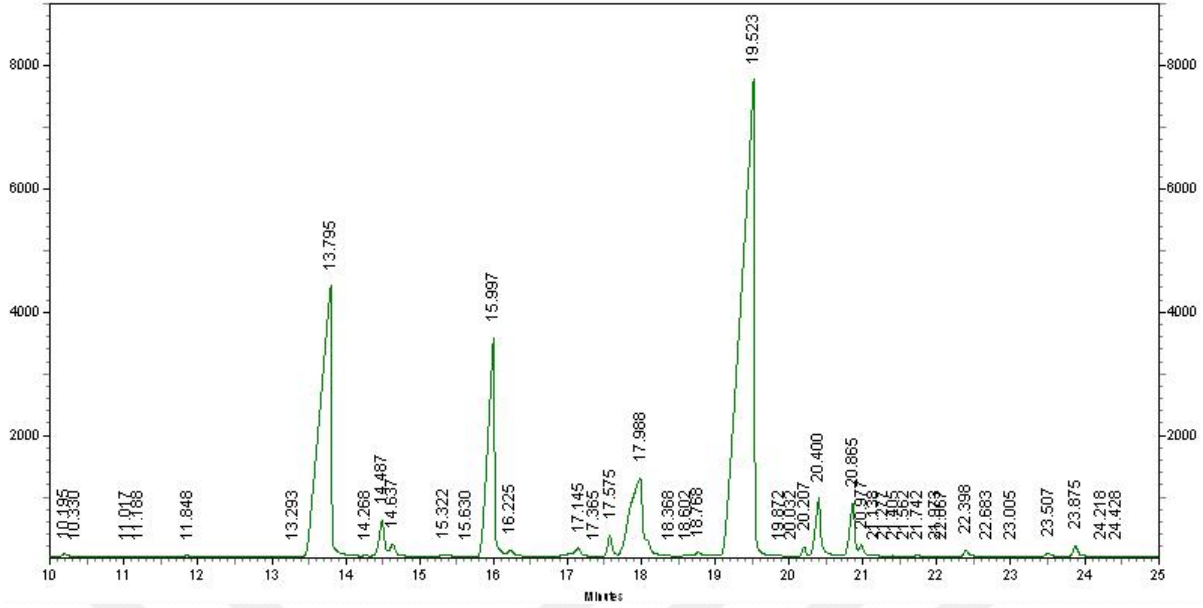
Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Yanıt 1 (R1)	Yanıt2 (R2)	Yanıt 3 (R3)	
A:alkol	B:sıcaklık	C:asit	D:zaman	C18:1	C18:2 + C18:3	C16 + C18 (Toplam Alan)	FAME Verim'i
ml	°C	%	dk	%	%		%
5	60	85	72	49,52	1,8	208830249	67,28

Çizelge 4.13. NaOH kullanılarak optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında gerçekleşen biyodizel üretimi (n=4) GC-FID sonuçları.

Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Yanıt 1 (R1)	Yanıt 2 (R2)	Yanıt 3 (R3)	
A:alkol	B:sıcaklık	C:baz	D:zaman	C18:1	C18:2 + C18:3	C16 + C18 (Toplam Alan)	FAME Verim'i
ml	°C	%	dk	%	%		%
39	36	58	64	47,98	3,54	174772987	38,68



Şekil 4.7. H₂SO₄ katalizörü varlığında optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında (5:1 MeOH: biyokütle oranı (v/w), %85 katalizör, 60 °C, 72 dk) elde edilen FAME'in GC-FID kromatogramı.

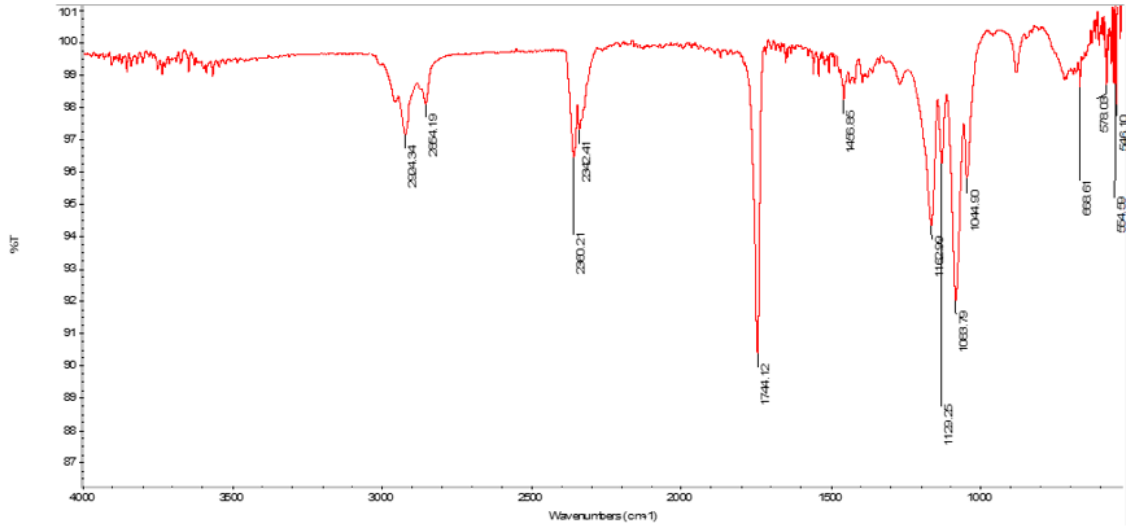


Şekil 4.8. NaOH katalizörü varlığında optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında (39:1 MeOH: biyokütle oranı (v/w), %58 katalizör, 36 °C, 64 dk) elde edilen FAME'in GC-FID kromatogramı.

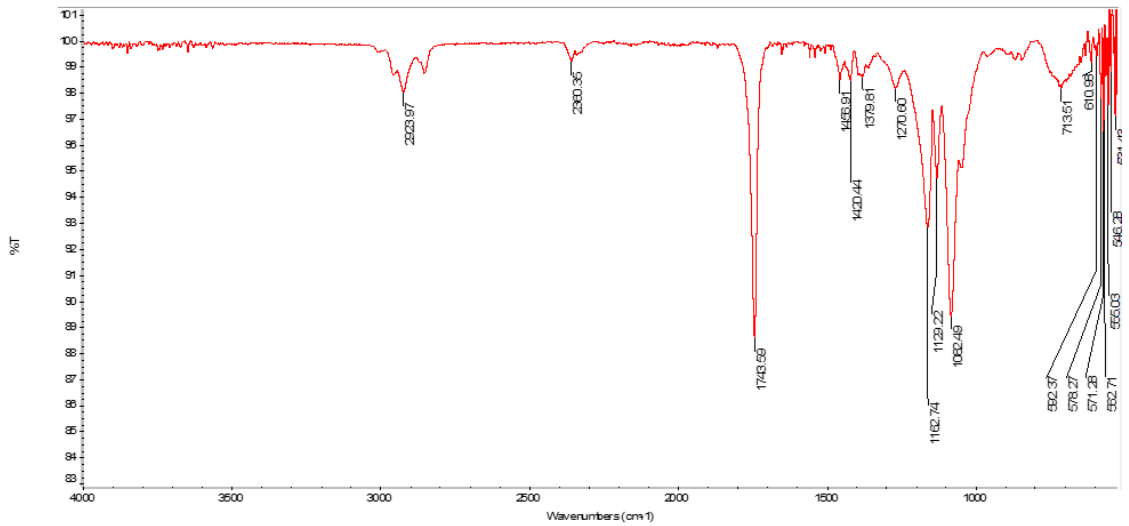
4.4. RSM Kullanılarak Optimize Edilen *In-situ* Transesterifikasyon Koşullarında Üretilen Biyodizel Ürünleri İçin FTIR Analizi

Optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında üretilen biyodizel içeriğindeki fonksiyonel grupları ve esterleşme performansını incelemek amacıyla FAME numunelerine FTIR analizi gerçekleştirilmiştir.

H₂SO₄ katalizör varlığında ve optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında elde edilen biyodizele ait FTIR spektrumunda 1744.12 cm⁻¹ civarındaki bant (C=O titreşimi) güçlü ester (metil ester) grubunu temsil etmektedir. Spektrumdaki 1044.90 cm⁻¹-1162.99 cm⁻¹ aralığındaki pikler alkoksi (C-O) gerilme titreşiminden kaynaklanır. Spektrumdaki 2854.19 cm⁻¹ ve 2924.34 cm⁻¹ pikleri yağ asidi metil esterinin metilen grubuna bağlı alkan (C-H) gerilme titreşimi ile ilişkilendirilebilir [128]. Şekil 4.9'daki ~1456.85 cm⁻¹ civarındaki küçük pik, ester ile ilişkili alken (C=C) bağına işaret etmektedir.



Şekil 4.9. H_2SO_4 katalizörü varlığında optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında (5:1 metanol: biyokütle oranı (v/w), % 85 katalizör, 60 °C, 72 dk) elde edilen FAME'in FTIR spektrumu.



Şekil 4.10. $NaOH$ katalizörü varlığında optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında (39:1 metanol: biyokütle oranı (v/w), % 58 katalizör, 36 °C, 64 dk) elde edilen FAME'in FTIR spektrumu.

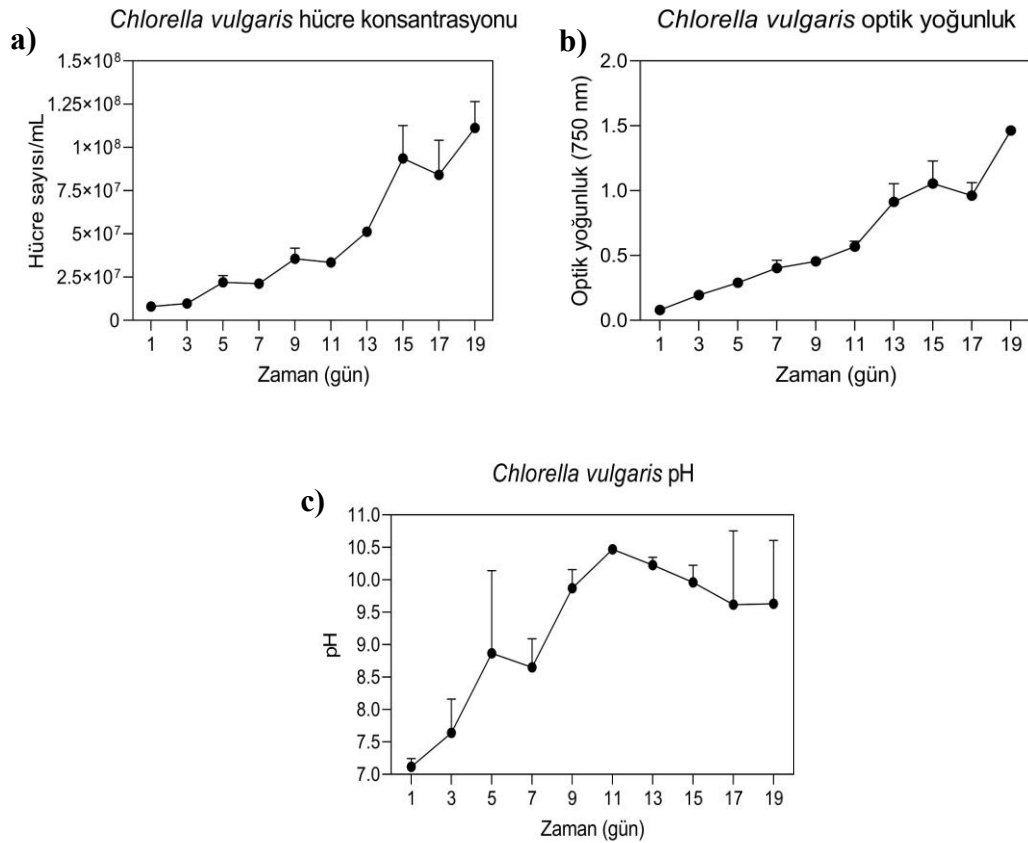
$NaOH$ katalizör varlığında ve optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında elde edilen biyodizele ait FTIR spektrumunda (Şekil 4.10) 1743.59 cm^{-1} 'da civarındaki pik karbonil ($C=O$) grubunun varlığından kaynaklanır. Spektrumdaki 1082.49 cm^{-1} - 1270.60 cm^{-1} aralığındaki pikler ($C-O$) gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Şekil 4.10'daki 2923.97 cm^{-1} 'daki pik $C-H$ gerilme titreşimine ait olup trigliserit yapısının kırılmasıyla oluşan alkan gruplarının artışından kaynaklanmaktadır. Şekil 4.10'daki 1379.81 cm^{-1} -

1456.91 cm^{-1} civarındaki küçük pikler ester ile ilişkili alken ($\text{C}=\text{C}$) bağına işaret etmektedir.

Her iki spektrumda yer alan 1744 cm^{-1} civarındaki pikler ester gruplarının varlığını net bir şekilde göstermektedir. C-H ve C-O gerilme titreşimlerinin varlığı, alkan zincirleri ve ester gruplarının biyodizel içeriğinde bulunduğunu ifade etmektedir.

4.5. *Chlorella vulgaris*'in Mikrobiyal Gelişimi ve Stok Kültür Koşulları

Chlorella vulgaris, laboratuvar ölçekli fotobiyoreaktörlerde kontrollü koşullar altında 19 gün boyunca yetiştirilmiştir. pH ölçümleri 7.0 ve 10.6 arasında değişmiş olup, 1 N HCl ilave edilerek kontrol sağlanmıştır. Hücre yoğunluğu maksimum 111253333 hücre/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 4.11a).



Şekil 4.11. a) Stok kültürlerinin zamana bağlı hücre konsantrasyonu (hücre/mL), b) Stok kültürlerinin 750 nm'deki zamana bağlı optik yoğunluk değerleri, c) Stok kültürlerinin zamana bağlı pH değerleri.

4.6. Stok Kültüründe Yetiştirilen *Chlorella vulgaris*'den Optimum *In-situ* Transesterifikasyon Koşullarında Üretilen Biyodizel Ürünleri İçin GC-FID Analizi

BBM stok kültür koşullarında yetiştirilen *Chlorella vulgaris*'den H₂SO₄ ve NaOH katalizör kullanılarak optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında üretilen biyodizel ürünlerinin FAME kompozisyonları Çizelge 4.14'de sunulmuştur.

Çizelge 4.14. BBM stok kültüründe çoğaltılan *Chlorella vulgaris* mikroalginden H₂SO₄ ve NaOH katalizör kullanılarak optimum *in-situ* transesterifikasyon koşullarında üretilen biyodizel ürünlerinin FAME kompozisyonları.

Biyodizel Numuneleri	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
H ₂ SO ₄ katalizör	17,53	35,78	3,04	1,07	–	2,42
NaOH katalizör	18,79	30,89	3,46	0,95	6,61	1,74

Hazır olarak temin edilen ve yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak *in-situ* transesterifikasyon koşulları optimize edilen *Chlorella vulgaris* biyokütlesinden üretilen FAME bileşimi yüksek C18 içeriğine sahipken (Çizelge 4.12, Çizelge 4.13) BBM stok kültüründe yetiştirilen *Chlorella vulgaris*'den optimum koşullarda elde edilen FAME bileşimi yüksek C16 içeriğine sahiptir. FAME karakteristiği arasındaki farklılığın yetiştirilme koşullarından kaynaklandığı öngörülmektedir. Biyodizel içeriğindeki C16 ve C18'lerin uyumlu bir dağılım göstermesi ve C18:1 içeriğinin yüksek olması yakıt performansı ve oksidatif stabilite açısından önemlidir. Önceki çalışmalar yağ asidi kompozisyonunun transesterifikasyon koşullarına bağlı olduğu kadar mikroalglerin kültür koşullarına da (tuzluluk, ışık döngüsü, karbon ve azot kaynakları vb.) bağlı olduğunu göstermiştir [129,130]. Salama vd. yaptığı çalışmada *Chlamydomonas mexicana* ve *Scenedesmus obliquus* türlerinde tuz stresinin, C18:1 ve C18:3 yağ asitlerinin konsantrasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [131]. Bir diğer çalışmada *Auxenochlorella protothecoides*'den elde edilen FAME kompozisyonu farklı Fe kaynağı ve konsantrasyonlarının kullanıldığı kültür ortamları için incelenmiştir. Kültür ortamına eklenen 1.15 mM FeCl₃ bileşiğinin %78.5 ile en yüksek doymuş yağ asidi oranına sahip FAME ürettiği tespit edilmiştir [132]. Tang vd. tarafından yapılan bir başka çalışmada *Chlorella minutissima* türü için ışık kaynağı, yoğunluğu ve N yoksunluğunun FAME kompozisyonunu C16:0, C18:1, C18:2 ve C18:3 bakımından etkilediği ortaya konmuştur [133]. Biyodizel kalitesinin iyileştirilmesi için *in-situ* transesterifikasyon koşullarıyla birlikte mikroalg kültür koşullarına da optimizasyon uygulanması gereklidir.

5. YORUM

Chlorella vulgaris mikroalg türünden asit katalizörü (H_2SO_4) ve baz katalizörü (NaOH) kullanılarak *in-situ* transesterifikasyon yöntemi ile biyodizel kalitesi optimize edilmiş, *in-situ* transesterifikasyon parametrelerinin FAME içeriğine etkisi araştırılmıştır. *In-situ* transesterifikasyon parametrelerinin (alkol:biyokütle oranı (v/w), sıcaklık, asit/baz katalizör konsantrasyonu (%) (biyokütleyle dayalı) ve reaksiyon süresi) FAME içeriğindeki C18:1 (%), C18:2+C18:3 (%) ve toplam C16+C18 alanı yanıtlarına etkileri ve etkileşimleri, 52 deneysel sonuç ve CCD'ye dayalı RSM kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmada FAME içeriğindeki C18:1 (%) ve toplam C16+C18 alanını maksimize ederken C18:2+C18:3 (%) içeriğini minimize etmeyi amaçlayan CCD matrisine dayalı RSM uygulanmıştır.

H_2SO_4 katalizörü için optimum koşullar; alkol:biyokütle oranı 5:1 (v/w), %85 ağırlıkça katalizör konsantrasyonu, 60°C sıcaklık ve 72 dakika reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, kuadratik yanıt yüzey modelinden elde edilen teorik FAME içeriği %49.71 oleik asit (C18:1), %1.40 linoleik asit (C18:2) + linolenik asit (C18:3) ve 2.09556E+09 C16+C18 toplam alanı olarak hesaplanmış ve bu sonuçlar deneysel verilerle (%49.52±0.11 C18:1, %1.8±0.31 C18:2+C18:3 ve 2.08830E+09±1.70E+05 C16+C18 toplam alanı) uyumlu bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen FAME verimi %67.28 olarak hesaplanmıştır. Model proses parametrelerinden oleik asit (C18:1) (%) içeriğine en çok etki eden parametrenin ağırlıkça H_2SO_4 konsantrasyonu olduğunu, C18:2+C18:3 (%) içeriği üzerinde etkili parametrelerin alkol:biyokütle oranı ve H_2SO_4 konsantrasyonu olduğunu, toplam C16+C18 içeriğinde en önemli parametrenin H_2SO_4 konsantrasyonu olduğunu göstermiştir.

NaOH katalizörü için ise optimum koşullar; alkol:biyokütle oranı 39:1 (v/w), %58 katalizör konsantrasyonu, 36°C sıcaklık ve 64 dakika reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, teorik FAME içeriği %48.46 C18:1, %3.03 C18:2+C18:3 ve 1.75019E+09 C16+C18 toplam alanı olarak hesaplanmış ve deneysel verilerle (%47.98±0.09 C18:1, %3.54±0.50 C18:2+C18:3 ve 1.74773E+09±1.54E+05 C16+C18 toplam alanı) uyumlu bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen FAME verimliliği %38.68 olarak hesaplanmıştır. FAME'in C18:1 (%) ve C18:2+C18:3 (%) içeriğinde tüm

parametreler etkili olup en önemli parametre alkol:biyokütle oranı, toplam C16+C18 içeriği için en önemli parametre alkol:biyokütle oranı olup zamanın istatistiksel olarak etkisi olmadığı tespit edilmiştir. H₂SO₄ katalizörü, FAME kompozisyonu ve reaksiyon verimliliği açısından NaOH katalizörüne göre daha iyi performans göstermiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, farklı bir kaynağa ait *Chlorella vulgaris* biyokütlesine RSM kullanılarak elde edilen optimum *in-situ* transesterifikasyon koşulları uygulanarak biyodizel elde edilmiş ve bu iki farklı biyokütle kaynağından üretilen FAME bileşimleri karşılaştırılmıştır. İlk kaynaktan elde edilen biyodizel ürünleri C18 yağ asitleri açısından yüksek içeriğe sahipken, ikinci kaynaktan elde edilen biyodizel ürünlerinin C16 yağ asitleri açısından yüksek içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma, asit ve baz katalizörlerin ve reaksiyon parametrelerinin *in-situ* transesterifikasyon yöntemiyle biyodizel üretimindeki etkilerini karşılaştırarak, optimum koşulları belirlemeyi ve işlem verimliliğini yüksek kalitede FAME kompozisyonu bakımından artırmayı hedeflemektedir. Daha önceki çalışmalar FAME miktarını artırmaya yönelik olup bu çalışmanın bulguları, *Chlorella vulgaris*'den *in-situ* transesterifikasyon yoluyla biyodizel üretiminde FAME kompozisyonunun kalitesinde artış sağlanmasının optimizasyon yoluyla mümkün olabileceğini vurgulamaktadır. Çalışma ayrıca, gelecekteki araştırmalarda istenilen yağ asidi kompozisyonuna sahip mikroalglerin üretilmesi için yetiştirme aşamasında da optimizasyon uygulanmasını önermektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Anwar, M.G. Rasul, N. Ashwath, Production optimization and quality assessment of papaya (*Carica papaya*) biodiesel with response surface methodology, *Energy Convers. Manage.*, 156 **(2018)** 103-112.
- [2] A. Tizvir, M.H. Shojae fard, G.R. Molaeimanesh, A.R. Zahedi, S. Labbafi, Optimization of biodiesel production from microalgae and investigation of exhaust emissions and engine performance for biodiesel blended, *Process Saf. Environ. Prot.*, 175 **(2023)** 319-340.
- [3] A. Sharma, G. Singh, S.K. Arya, Biofuel from rice straw, *Journal of Cleaner Production*, 277 **(2020)**.
- [4] G. Li, R. Hu, N. Wang, T. Yang, F. Xu, J. Li, J. Wu, Z. Huang, M. Pan, T. Lyu, Cultivation of microalgae in adjusted wastewater to enhance biofuel production and reduce environmental impact: Pyrolysis performances and life cycle assessment, *Journal of Cleaner Production*, 355 **(2022)**.
- [5] M. Abbasi, M.S. Pishvae, S. Mohseni, Third-generation biofuel supply chain: A comprehensive review and future research directions, *Journal of Cleaner Production*, 323 **(2021)**.
- [6] C.J. Chuck, Bannister, C.D., Hawley, J.G., Davidson, M.G., La Bruna, I. and Paine, A., Predictive model to assess the molecular structure of biodiesel fuel, *Energy & Fuels*, 23(4) **(2009)** 2290-2294.
- [7] H. Imahara, E. Minami, S. Saka, Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition☆, *Fuel*, 85 **(2006)** 1666-1670.
- [8] J.-K. Kim, C.-H. Jeon, H.W. Lee, Y.-K. Park, K.-i. Min, I.-h. Hwang, Y.-M. Kim, Effect of Accelerated High Temperature on Oxidation and Polymerization of Biodiesel from Vegetable Oils, *Energies*, 11 **(2018)**.

- [9] M. Cao, L. Zhao, D. Xu, R. Ciora, P.K.T. Liu, V.I. Manousiouthakis, T.T. Tsotsis, A carbon molecular sieve membrane-based reactive separation process for pre-combustion CO₂ capture, *J. Membr. Sci.*, 605 **(2020)**.
- [10] A. Goli, A. Shamiri, A. Talaiekhosani, N. Eshtiaghi, N. Aghamohammadi, M.K. Aroua, An overview of biological processes and their potential for CO₂ capture, *J Environ Manage*, 183 **(2016)** 41-58.
- [11] NOAA, Trends in Atmospheric Carbon Dioxide (CO₂), **(2024)** <https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/global.html> (April 27, 2024).
- [12] Z. Liu, Z. Deng, S.J. Davis, P. Ciais, Global carbon emissions in 2023, *Nature Reviews Earth & Environment*, **(2024)**.
- [13] M.W. Jones, G.P. Peters, T. Gasser, R.M. Andrew, C. Schwingshackl, J. Gutschow, R.A. Houghton, P. Friedlingstein, J. Pongratz, C. Le Quere, National contributions to climate change due to historical emissions of carbon dioxide, methane, and nitrous oxide since 1850, *Sci Data*, 10 **(2023)** 155.
- [14] IPCC, Summary for Policymakers. In: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty, 2018.
- [15] M. Antar, D. Lyu, M. Nazari, A. Shah, X. Zhou, D.L. Smith, Biomass for a sustainable bioeconomy: An overview of world biomass production and utilization, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 139 **(2021)**.
- [16] J. Marousek, A. Marouskova, B. Gavurova, D. Tucek, O. Strunecky, Competitive algae biodiesel depends on advances in mass algae cultivation, *Bioresour. Technol.*, 374 **(2023)** 128802.
- [17] M. Mahdavi, E. Abedini, A.h. Darabi, Biodiesel synthesis from oleic acid by nano-catalyst (ZrO₂/Al₂O₃) under high voltage conditions, *RSC Advances*, 5 **(2015)** 55027-55032.

- [18] M.V. Rodionova, R.S. Poudyal, I. Tiwari, R.A. Voloshin, S.K. Zharmukhamedov, H.G. Nam, B.K. Zayadan, B.D. Bruce, H.J.M. Hou, S.I. Allakhverdiev, Biofuel production: Challenges and opportunities, *Int. J. Hydrogen Energy*, 42 **(2017)** 8450-8461.
- [19] A. Paschalidou, M. Tsatiris, K. Kitikidou, Energy crops for biofuel production or for food? - SWOT analysis (case study: Greece), *Renewable Energy*, 93 **(2016)** 636-647.
- [20] P. Thompson, The Agricultural Ethics of Biofuels: The Food vs. Fuel Debate, *Agriculture*, 2 **(2012)** 339-358.
- [21] N.S. Mat Aron, K.S. Khoo, K.W. Chew, P.L. Show, W.H. Chen, T.H.P. Nguyen, Sustainability of the four generations of biofuels – A review, *International Journal of Energy Research*, 44 **(2020)** 9266-9282.
- [22] T. Searchinger, R. Heimlich, R.A. Houghton, F. Dong, A. Elobeid, J. Fabiosa, S. Tokgoz, D. Hayes, T.H. Yu, Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change, *Science*, 319 **(2008)** 1238-1240.
- [23] M.S. Peer, R. Kasimani, S. Rajamohan, P. Ramakrishnan, Experimental evaluation on oxidation stability of biodiesel/diesel blends with alcohol addition by rancimat instrument and FTIR spectroscopy, *Journal of Mechanical Science and Technology*, 31 **(2017)** 455-463.
- [24] P.M. Shameer, K. Ramesh, Green technology and performance consequences of an eco-friendly substance on a 4-stroke diesel engine at standard injection timing and compression ratio, *Journal of Mechanical Science and Technology*, 31 **(2017)** 1497-1507.
- [25] C.A. Cardona, J.A. Quintero, I.C. Paz, Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives, *Bioresour. Technol.*, 101 **(2010)** 4754-4766.
- [26] K. Karimi, M.J. Taherzadeh, A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity, *Bioresour. Technol.*, 200 **(2016)** 1008-1018.
- [27] O.J. Sanchez, C.A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour. Technol.*, 99 **(2008)** 5270-5295.

- [28] D. Singh, D. Sharma, S.L. Soni, S. Sharma, P. Kumar Sharma, A. Jhalani, A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel, *Fuel*, 262 (2020).
- [29] M. Tariq, S. Ali, N. Khalid, Activity of homogeneous and heterogeneous catalysts, spectroscopic and chromatographic characterization of biodiesel: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16 (2012) 6303-6316.
- [30] V. Godbole, M.K. Pal, P. Gautam, A critical perspective on the scope of interdisciplinary approaches used in fourth-generation biofuel production, *Algal Research*, 58 (2021).
- [31] W. Shi, J. Li, B. He, F. Yan, Z. Cui, K. Wu, L. Lin, X. Qian, Y. Cheng, Biodiesel production from waste chicken fat with low free fatty acids by an integrated catalytic process of composite membrane and sodium methoxide, *Bioresour. Technol.*, 139 (2013) 316-322.
- [32] S.P. Singh, D. Singh, Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2010) 200-216.
- [33] R. D, N. Ghosh, S. Lalthazuala Rokhum, G. Halder, Current progress and future outlooks of microwave-irradiated biodiesel production: A holistic review, *Chem. Eng. J.*, 482 (2024).
- [34] S. Lim, L.K. Teong, Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: An overview, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2010) 938-954.
- [35] D. Singh, D. Sharma, S.L. Soni, S. Sharma, D. Kumari, Chemical compositions, properties, and standards for different generation biodiesels: A review, *Fuel*, 253 (2019) 60-71.
- [36] D.S. Kim, M. Hanifzadeh, A. Kumar, Trend of biodiesel feedstock and its impact on biodiesel emission characteristics, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37 (2017) 7-19.

- [37] U.S. Umana, M.S. Ebong, E.O. Godwin, Biomass Production from Oil Palm and Its Value Chain, *Journal of Human, Earth, and Future*, 1 **(2020)** 30-38.
- [38] J.K. Suastes-Rivas, R. Hernández-Altamirano, V.Y. Mena-Cervantes, E.J. Barrios Gómez, I. Chairez, Biodiesel production, through intensification and profitable distribution of fatty acid methyl esters by a microalgae-yeast co-culture, isolated from wastewater as a function of the nutrients' composition of the culture media, *Fuel*, 280 **(2020)**.
- [39] M. Rahul S, S. Ma, S. Cs, S.K. R, V. P, K. S, K. J, V.K. R, S. S, G.M. I, P. A, Insights about sustainable biodiesel production from microalgae biomass: A review, *International Journal of Energy Research*, 45 **(2020)** 17028-17056.
- [40] S.M. Farouk, A.M. Tayeb, S.M.S. Abdel-Hamid, R.M. Osman, Recent advances in transesterification for sustainable biodiesel production, challenges, and prospects: a comprehensive review, *Environ Sci Pollut Res Int*, 31 **(2024)** 12722-12747.
- [41] N. Rashid, M.S. Ur Rehman, M. Sadiq, T. Mahmood, J.-I. Han, Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40 **(2014)** 760-778.
- [42] L.M. Casanova, L.B.B. Mendes, T.S. Correa, R.B. da Silva, R.R. Joao, A. Macrae, A.B. Vermelho, Development of Microalgae Biodiesel: Current Status and Perspectives, *Microorganisms*, 11 **(2022)**.
- [43] H.M. Singh, R. Kothari, R. Gupta, V.V. Tyagi, Bio-fixation of flue gas from thermal power plants with algal biomass: Overview and research perspectives, *J Environ Manage*, 245 **(2019)** 519-539.
- [44] S. Zhang, L. Zhang, G. Xu, F. Li, X. Li, A review on biodiesel production from microalgae: Influencing parameters and recent advanced technologies, *Front Microbiol*, 13 **(2022)** 970028.
- [45] A.L. Ahmad, N.H.M. Yasin, C.J.C. Derek, J.K. Lim, Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 **(2011)** 584-593.

- [46] I.A. Nascimento, S.S.I. Marques, I.T.D. Cabanelas, G.C. de Carvalho, M.A. Nascimento, C.O. de Souza, J.I. Druzian, J. Hussain, W. Liao, Microalgae Versus Land Crops as Feedstock for Biodiesel: Productivity, Quality, and Standard Compliance, *BioEnergy Research*, **(2014)**.
- [47] H. Xu, X. Miao, Q. Wu, High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *J. Biotechnol.*, 126 **(2006)** 499-507.
- [48] A.C. Eloka-Eboka, C. Onunka, Fuel properties comparison of species of microalgae and selected second-generation oil feedstocks, *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 8 **(2016)** 221-232.
- [49] Biofuels Factsheet. Center for Sustainable Systems, University of Michigan, **(2023)** <https://css.umich.edu/publications/factsheets/energy/biofuels-factsheet> (May 1, 2024).
- [50] E.G. Arenas, M.C. Rodriguez Palacio, A.U. Juantorena, S.E.L. Fernando, P.J. Sebastian, Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods, and other challenges, *International Journal of Energy Research*, 41 **(2017)** 761-789.
- [51] M.I. Khan, J.H. Shin, J.D. Kim, The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products, *Microb Cell Fact*, 17 **(2018)** 36.
- [52] B. Klamczynska, W.D. Mooney, Heterotrophic Microalgae, *Sustainable Protein Sources* 2017, pp. 327-339.
- [53] J.Y. Kim, J.-M. Jung, S. Jung, Y.-K. Park, Y.F. Tsang, K.-Y.A. Lin, Y.-E. Choi, E.E. Kwon, Biodiesel from microalgae: Recent progress and key challenges, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 93 **(2022)**.
- [54] S. Bengtson, T. Sallstedt, V. Belivanova, M. Whitehouse, Three-dimensional preservation of cellular and subcellular structures suggests 1.6 billion-year-old crown-group red algae, *PLoS Biol.*, 15 **(2017)** e2000735.

- [55] A.E.-F. Abomohra, W. Jin, R. Tu, S.-F. Han, M. Eid, H. Eladel, Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64 (2016) 596-606.
- [56] S.F. Han, W.B. Jin, R.J. Tu, W.M. Wu, Biofuel production from microalgae as feedstock: current status and potential, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 35 (2015) 255-268.
- [57] A.P. Ferreira de Oliveira, A.P.A. Bragotto, Microalgae-based products: Food and public health, *Future Foods*, 6 (2022).
- [58] A. Demirbas, G. Edris, Biofuels production from microalgae by liquefaction and supercritical water pyrolysis, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39 (2017) 827-834.
- [59] J. Mathushika, C. Gomes, Development of Microalgae-based Biofuels as a Viable Green Energy Source: Challenges and Future Perspectives, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12 (2021) 3849-3882.
- [60] S. Dickinson, M. Mientus, D. Frey, A. Amini-Hajibashi, S. Ozturk, F. Shaikh, D. Sengupta, M.M. El-Halwagi, A review of biodiesel production from microalgae, *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19 (2016) 637-668.
- [61] G. Yadav, M. Sekar, S.H. Kim, V.E. Geo, S.K. Bhatia, J.S.M. Sabir, N.T.L. Chi, K. Brindhadevi, A. Pugazhendhi, Lipid content, biomass density, fatty acid as selection markers for evaluating the suitability of four fast growing cyanobacterial strains for biodiesel production, *Bioresour. Technol.*, 325 (2021) 124654.
- [62] S.A. Lee, S.R. Ko, N. Lee, J.W. Lee, V.V. Le, H.M. Oh, C.Y. Ahn, Two-step microalgal (*Coelastrella* sp.) treatment of raw piggery wastewater resulting in higher lipid and triacylglycerol levels for possible production of higher-quality biodiesel, *Bioresour. Technol.*, 332 (2021) 125081.
- [63] M. Arif, Y. Bai, M. Usman, M. Jalalah, F.A. Harraz, M.S. Al-Assiri, X. Li, E.S. Salama, C. Zhang, Highest accumulated microalgal lipids (polar and non-polar) for biodiesel production with advanced wastewater treatment: Role of lipidomics, *Bioresour. Technol.*, 298 (2020) 122299.

- [64] M.K. Mandal, N.K. Chanu, N. Chaurasia, Exogenous addition of indole acetic acid and kinetin under nitrogen-limited medium enhances lipid yield and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase & diacylglycerol acyltransferase genes in indigenous microalgae: A potential approach for biodiesel production, *Bioresour. Technol.*, 297 **(2020)** 122439.
- [65] L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 102 **(2009)** 100-112.
- [66] C. Yoo, S.Y. Jun, J.Y. Lee, C.Y. Ahn, H.M. Oh, Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide, *Bioresour. Technol.*, 101 Suppl 1 **(2010)** S71-74.
- [67] A.H. Scragg, Illman, A.M., Carden, A. and Shales, S.W., Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor, *Biomass Bioenergy*, 23(1) **(2002)** 67-73.
- [68] A.M. Illman, Scragg, A.H. and Shales, S.W., Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme Microb. Technol.*, 27(8) **(2000)** 631-635.
- [69] J.R. Caicedo, van Der Steen, N.P., Arce, O. and Gijzen, H.J., Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*), *Water Res.*, 34(15) **(2000)** 3829-3835.
- [70] L. Gouveia, A.C. Oliveira, Microalgae as a raw material for biofuels production, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36 **(2009)** 269-274.
- [71] S.M. Renaud, Thinh, L.V. and Parry, D.L., , The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture, *Aquaculture*, 170(2) **(1999)** 147-159.
- [72] M.R. Andrade, J.A.V. Costa, Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate, *Aquaculture*, 264 **(2007)** 130-134.

- [73] G. Hodaifa, M.A. Martinez, S. Sanchez, Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*, *Bioresour. Technol.*, 99 (2008) 1111-1117.
- [74] Y. Yang, S. Ge, Y. Pan, W. Qian, S. Wang, J. Zhang, L.L. Zhuang, Screening of microalgae species and evaluation of algal-lipid stimulation strategies for biodiesel production, *Sci. Total Environ.*, 857 (2023) 159281.
- [75] W. Xiong, X. Li, J. Xiang, Q. Wu, High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78 (2008) 29-36.
- [76] S.B. Velasquez-Orta, J.G.M. Lee, A. Harvey, Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*, *Fuel*, 94 (2012) 544-550.
- [77] S.K. Sinha, A. Gupta, R. Bharalee, Production of biodiesel from freshwater microalgae and evaluation of fuel properties based on fatty acid methyl ester profile, *Biofuels*, 7 (2016) 69-78.
- [78] I.A. Nascimento, S.S.I. Marques, I.T.D. Cabanelas, S.A. Pereira, J.I. Druzian, C.O. de Souza, D.V. Vich, G.C. de Carvalho, M.A. Nascimento, Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria, *BioEnergy Research*, 6 (2012) 1-13.
- [79] A. Shenbaga Devi, P. Santhanam, V. Rekha, S. Ananth, B.B. Prasath, R. Nandakumar, S. Jeyanthi, S.D. Kumar, Culture and biofuel producing efficacy of marine microalgae *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis* sp., *Journal of Algal Biomass Utilization* 3(4) (2012) 38-44.
- [80] A.F. Talebi, S.K. Mohtashami, M. Tabatabaei, M. Tohidfar, A. Bagheri, M. Zeinalabedini, H. Hadavand Mirzaei, M. Mirzajanzadeh, S. Malekzadeh Shafaroudi, S. Bakhtiari, Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production, *Algal Research*, 2 (2013) 258-267.
- [81] C.D. Calixto, J.K. da Silva Santana, V.P. Tibúrcio, L.d.F.B.L. de Pontes, C.F. da Costa Sassi, M.M. da Conceição, R. Sassi, Productivity and fuel quality parameters of

lipids obtained from 12 species of microalgae from the northeastern region of Brazil, *Renewable Energy*, 115 **(2018)** 1144-1152.

[82] N.V. Zhukova, N.A. Aizdaicher, Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae., *Phytochemistry*, 39(2) **(1995)** 351-356.

[83] K. Becker, H.P.S. Makkar, *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow' s oil and biodiesel, *Lipid Technology*, 20 **(2008)** 104-107.

[84] E. Crabbe, C. Nolasco-Hipolito, G. Kobayashi, K.a.I. Sonomoto, A., Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties, *Process biochemistry*,, 37(1) **(2001)** 65-71.

[85] A.S. Ramadhas, C. Muraleedharan, S. Jayaraj, Performance and emission evaluation of a diesel engine fueled with methyl esters of rubber seed oil, *Renewable Energy*, 30 **(2005)** 1789-1800.

[86] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, C. Vaca-Garcia, Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35 **(2014)** 265-278.

[87] J. Liu, Y. Song, Y. Liu, R. Ruan, Optimization of growth conditions toward two-stage cultivation for lipid production of *chlorella vulgaris*, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34 **(2015)** 1801-1807.

[88] E.W. Becker, *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Cambridge University Press, **1994**.

[89] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 **(2010)** 217-232.

[90] S. Chatterjee, S. Guha, Potential of algal oil production from secondary treated sewage: a study using *Chlorella vulgaris* and synthetic wastewater, *Environ. Technol.*, **(2023)** 1-15.

[91] S.-S. Rosli, J.-W. Lim, K. Jumbri, M.-K. Lam, Y. Uemura, C.-D. Ho, W.-N. Tan, C.-K. Cheng, W.-N.-A. Kadir, Modeling to enhance attached microalgal biomass growth

onto fluidized beds packed in nutrients-rich wastewater whilst simultaneously biofixing CO₂ into lipid for biodiesel production, *Energy Convers. Manage.*, 185 **(2019)** 1-10.

[92] L. Wang, M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Y. Wang, R. Ruan, Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162 **(2010)** 1174-1186.

[93] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 **(2010)** 557-577.

[94] G. Detrell, *Chlorella Vulgaris* Photobioreactor for Oxygen and Food Production on a Moon Base—Potential and Challenges, *Frontiers in Astronomy and Space Sciences*, 8 **(2021)**.

[95] L. Novoveská, A.K.M. Zapata, J.B. Zabolotney, M.C. Atwood, E.R. Sundstrom, Optimizing microalgae cultivation and wastewater treatment in large-scale offshore photobioreactors, *Algal Research*, 18 **(2016)** 86-94.

[96] J. Wang, T. Rosov, P. Wensel, J. McGowen, W.R. Curtis, A preliminary implementation of metabolic-based pH control to reduce CO₂ usage in outdoor flat-panel photobioreactor cultivation of *Nannochloropsis oceanica* microalgae, *Algal Research*, 18 **(2016)** 288-295.

[97] L. Wang, J. Liu, Q. Zhao, W. Wei, Y. Sun, Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems, *Bioresour. Technol.*, 211 **(2016)** 1-5.

[98] N.G. Schoepp, R.L. Stewart, V. Sun, A.J. Quigley, D. Mendola, S.P. Mayfield, M.D. Burkart, System and method for research-scale outdoor production of microalgae and cyanobacteria, *Bioresour. Technol.*, 166 **(2014)** 273-281.

[99] C.G. Khoo, M.K. Lam, K.T. Lee, Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer study, *Algal Research*, 15 **(2016)** 65-76.

- [100] J. Wolf, E. Stephens, S. Steinbusch, J. Yarnold, I.L. Ross, C. Steinweg, A. Doebbe, C. Krolovitsch, S. Müller, G. Jakob, O. Kruse, C. Posten, B. Hankamer, Multifactorial comparison of photobioreactor geometries in parallel microalgae cultivations, *Algal Research*, 15 (2016) 187-201.
- [101] H. Kargın, Akuakültürde Kullanılan Mikroalg Üretim Sistemleri Fotobiyoreaktörler Dünyada ve Ülkemizde Kullanımı, *Mediterranean Fisheries And Aquaculture Research*, (2020) 114-115.
- [102] D.F. Correa, H.L. Beyer, H.P. Possingham, S.R. Thomas-Hall, P.M. Schenk, Global mapping of cost-effective microalgal biofuel production areas with minimal environmental impact, *GCB Bioenergy*, 11 (2019) 914-929.
- [103] M. Faried, M. Samer, E. Abdelsalam, R.S. Yousef, Y.A. Attia, A.S. Ali, Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79 (2017) 893-913.
- [104] H.M. Amaro, A.C. Guedes, F.X. Malcata, Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *Applied Energy*, 88 (2011) 3402-3410.
- [105] E. Sierra, F.G. Acién, J.M. Fernández, J.L. García, C. González, E. Molina, Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae, *Chem. Eng. J.*, 138 (2008) 136-147.
- [106] S. Pawar, Effectiveness mapping of open raceway pond and tubular photobioreactors for sustainable production of microalgae biofuel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 62 (2016) 640-653.
- [107] M. Heidari, H.-R. Kariminia, J. Shayegan, Effect of culture age and initial inoculum size on lipid accumulation and productivity in a hybrid cultivation system of *Chlorella vulgaris*, *Process Saf. Environ. Prot.*, 104 (2016) 111-122.
- [108] V.O. Adesanya, E. Cadena, S.A. Scott, A.G. Smith, Life cycle assessment on microalgal biodiesel production using a hybrid cultivation system, *Bioresour. Technol.*, 163 (2014) 343-355.

- [109] K. Liffman, D.A. Paterson, P. Liovic, P. Bandopadhyay, Comparing the energy efficiency of different high rate algal raceway pond designs using computational fluid dynamics, *Chem. Eng. Res. Des.*, 91 **(2013)** 221-226.
- [110] X. Zhang, *Microalgae removal of CO₂ from flue gas*, London, UK: IEA Clean Coal Centre., **2015**.
- [111] K. Singh, D. Kaloni, S. Gaur, S. Kushwaha, G. Mathur, Current research and perspectives on microalgae-derived biodiesel, *Biofuels*, 11 **(2017)** 1-18.
- [112] A. Demirbas, Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods, *Prog. Energy Combust. Sci.*, 31 **(2005)** 466-487.
- [113] P.A. Alaba, Y.M. Sani, W.M. Ashri Wan Daud, Efficient biodiesel production via solid superacid catalysis: a critical review on recent breakthrough, *RSC Advances*, 6 **(2016)** 78351-78368.
- [114] A. Galadima, O. Muraza, Biodiesel production from algae by using heterogeneous catalysts: A critical review, *Energy*, 78 **(2014)** 72-83.
- [115] V. Skorupskaite, V. Makareviciene, M. Gumbyte, Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae: A review, *Fuel Process. Technol.*, 150 **(2016)** 78-87.
- [116] M.B. Johnson, Z. Wen, Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass, *Energy & Fuels*, 23 **(2009)** 5179-5183.
- [117] C.V. Viêgas, I. Hachemi, S.P. Freitas, P. Mäki-Arvela, A. Aho, J. Hemming, A. Smeds, I. Heinmaa, F.B. Fontes, D.C. da Silva Pereira, N. Kumar, D.A.G. Aranda, D.Y. Murzin, A route to produce renewable diesel from algae: Synthesis and characterization of biodiesel via in situ transesterification of *Chlorella* alga and its catalytic deoxygenation to renewable diesel, *Fuel*, 155 **(2015)** 144-154.

- [118] G. Vicente, L.F. Bautista, R. Rodríguez, F.J. Gutiérrez, I. Sádaba, R.M. Ruiz-Vázquez, S. Torres-Martínez, V. Garre, Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus, *Biochem. Eng. J.*, 48 **(2009)** 22-27.
- [119] M.J. Haas, K. Wagner, Simplifying biodiesel production: The direct or in situ transesterification of algal biomass, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 113 **(2011)** 1219-1229.
- [120] T. Suganya, R. Kasirajan, S. Renganathan, Ultrasound-enhanced rapid in situ transesterification of marine macroalgae *Enteromorpha compressa* for biodiesel production, *Bioresour. Technol.*, 156 **(2014)** 283-290.
- [121] P. Verma, M.P. Sharma, Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 62 **(2016)** 1063-1071.
- [122] N. Tien Thanh, M. Mostapha, M.K. Lam, S. Ishak, Y. Kanna Dasan, J.W. Lim, I.S. Tan, S.Y. Lau, B.L.F. Chin, T. Hadibarata, Fundamental understanding of in-situ transesterification of microalgae biomass to biodiesel: A critical review, *Energy Convers. Manage.*, 270 **(2022)**.
- [123] C. Saenge, B. Cheirsilp, T.T. Suksaroge, T. Bourtoom, Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids, *Process Biochem.*, 46 **(2011)** 210-218.
- [124] A. Richmond, Q. Hu, *Handbook of microalgal culture*, John Wiley & Sons, Limited, **2013**.
- [125] F.A. Thesseling, P.W. Bircham, S. Mertens, K. Voordeckers, K.J. Verstrepen, A Hands-On Guide to Brewing and Analyzing Beer in the Laboratory, *Current protocols in microbiology*, 54 **(2019)** e91.
- [126] T.T. Nguyen, M.K. Lam, Y.W. Cheng, Y. Uemura, N. Mansor, J.W. Lim, P.L. Show, I.S. Tan, S. Lim, Reaction kinetic and thermodynamics studies for in-situ transesterification of wet microalgae paste to biodiesel, *Chem. Eng. Res. Des.*, 169 **(2021)** 250-264.

- [127] T.T. Nguyen, Y. Uemura, M.K. Lam, N. Mansor, J.W. Lim, Revealing the effect of reaction parameters towards alkyl group distribution in in-situ transesterification of *Chlorella vulgaris*, *Energy Convers. Manage.*, 185 (2019) 223-231.
- [128] S. Dalvi, S. Sonawane, Biodiesel (fatty acid methyl ester) from Chlorococcalean *Chlorella vulgaris* by single step in-situ transesterification, *Indian Journal of Science and Technology*, 15 (2022) 535-541.
- [129] N.O. Zhila, G.S. Kalacheva, T.G. Volova, Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252, *J. Appl. Phycol.*, 23 (2010) 47-52.
- [130] A.R. Rao, C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala, G.A. Ravishankar, Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents, *Bioresour. Technol.*, 98 (2007) 560-564.
- [131] S. Salama el, H.C. Kim, R.A. Abou-Shanab, M.K. Ji, Y.K. Oh, S.H. Kim, B.H. Jeon, Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress, *Bioprocess Biosyst Eng*, 36 (2013) 827-833.
- [132] E. Polat, E. Yüksel, M. Altınbaş, Effect of different iron sources on sustainable microalgae-based biodiesel production using *Auxenochlorella protothecoides*, *Renewable Energy*, 162 (2020) 1970-1978.
- [133] H. Tang, M. Chen, M.E. Garcia, N. Abunasser, K.Y. Ng, S.O. Salley, Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production, *Biotechnol. Bioeng.*, 108 (2011) 2280-2287.