

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Chlorella vulgaris MİKROALGİNDEN BİYODİZEL ÜRETİMİNE ZİRAİ ATIK
KULLANIMININ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Badel ERGÖRÜNLÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Chlorella vulgaris MİKROALGİNDEN BİYODİZEL ÜRETİMİNE ZİRAİ ATIK KULLANIMININ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Badel ERGÖRÜNLÜ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Gerçekleştirilen tez çalışmasında biyodizel üretimi için fotoheterotrofik koşullarda *Chlorella vulgaris*'in lipid birikimi üzerine havuç posası kullanımının etkisi incelenmiştir. Lipid birikimi ve transesterifikasyon reaksiyonunu etkileyen önemli parametreler optimize edilmiştir. Fotoototrofik koşullar ile karşılaştırıldığında 0.5 g/L havuç posası şekeri eklenmesi 1.38 kat daha yüksek mikrobiyel gelişime ve 2.07 kat daha yüksek lipid konsantrasyonuna neden olmuştur. En yüksek lipid birikimi 0.5 g/L havuç posası şekeri eklenen fotoheterotrofik koşullar ve azot sınırlaması altında %44.8 olarak gözlemlenmiştir. Test edilen yöntemler arasında en yüksek C16+C18 FAME içeriği çok kısa sürede ve 30°C gibi ortalama sıcaklıkta *in situ* transesterifikasyon ile %95.1 olarak belirlenmiştir. Sentezlenen metil esterlerin çoğu yakıt özelliğinin ASTM D6751 ve EN 14214 standartlarıyla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışması biyodizel üretimi için fotoheterotrofik koşullarda havuç posasının mikrobiyel gelişim ve lipid birimi üzerine etkisiyle ilgili ilk rapordur.

Mayıs 2021, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyodizel, havuç posası, mikrobiyel lipid, fotoheterotrofik, *C. vulgaris*

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF THE EFFECT OF AGRICULTURAL WASTE USAGE ON BIODIESEL PRODUCTION FROM *Chlorella vulgaris* MICROALGAE

Badel ERGÖRÜNLÜ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

The this thesis reports the usage of carrot pomace on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in photoheterotrophic conditions for biodiesel production. The important parameters which effect lipid accumulation and transesterification reaction were optimized. The addition of 0.5 g/L carrot pomace sugar caused 1.38 times higher microalgae growth and 2.07 time higher lipid concentration when compared with the photoautotrophic conditions. The highest lipid accumulation was observed as 44.8% under nitrogen limitation and photoheterotrophic conditions supplemented with 0.5 g/L pomace sugar. The highest C16+C18 FAME content was determined as 95.1% by *in situ* transesterification in a very short time and moderate temperature such as 30 °C among the tested approaches. It can be concluded that most fuel properties of synthesized methyl esters were found to well match with ASTM D6751 and EN 14214 standards. To the best of our knowledge, this is the first report about the effect of carrot pomace on microalgae growth and lipid accumulation in photoheterotrophic conditions for biodiesel production.

May 2021, 69 pages

Key Words: Biodiesel, carrot pomace, microbial lipid, photoheterotrophic, *C. vulgaris*

TEŞEKKÜR

Tezin gerçekleştirilmesinde fikir ve önerileriyle bana her konuda yardım eden, desteğini asla esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), tez çalışmam sırasında her konuda destek olan ve akademik gelişimime önemli katkılar sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), lisans eğitimim boyunca fikirleriyle beni aydınlatan, daima yol gösteren, bir anne gibi ilgisini ve şefkatini asla esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nevin KESKİN'e (Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında herhangi bir problem ile karşılaştığımda yardım eden, bilgileriyle bana yol gösteren, ilk geldiğim günden itibaren içten ve samimi bir ortamda çalışmamı sağlayan bütün laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca eğitimci olarak her daim bana ilham kaynağı olan, yol gösteren, maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, hakkını asla ödeyemeyeceğim annem Sayın Şükriye Ayten KARAMAN'a, her koşulda arkamda duran, desteğini asla esirgemeyen ve benim gurur kaynağım olan babam Sayın İhsan ERGÖRÜNLÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (20L0430004) ve TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiş olup, maddi desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak fikirleriyle bizleri aydınlatan Cumhuriyetimizin kurucusu ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

‘‘ Merhum dayım Abdullah KARAMAN'ın anısına’’

Badel ERGÖRÜNLÜ
Ankara, Mayıs 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Biyokütle Enerjisi	3
2.2 Biyoyakıt Üretiminde Kullanılan Ham madde Kaynakları	3
2.3 Biyodizel ve Özellikleri	5
2.4 Biyodizel Ham madde Kaynakları	7
2.4.1 Birinci nesil biyodizel ham madde kaynakları	7
2.4.2 İkinci nesil biyodizel ham madde kaynakları	9
2.4.3 Üçüncü nesil biyodizel ham madde kaynakları	11
2.4.4 Dördüncü nesil biyodizel ham madde kaynakları	14
2.5 Biyodizel Üretiminde Kullanılan Mikroalgler	15
2.6 Mikroalglerden Biyodizel Üretim Aşamaları	18
2.6.1 Mikroalglerin üretimi	18
2.7 Mikroalglerin Hasat Yöntemleri	22
2.7.1 Fiziksel hasat yöntemleri	22
2.7.2 Kimyasal hasat yöntemleri	24
2.7.3 Biyolojik hasat yöntemleri	24
2.8 Mikroalglerden Lipid Ekstraksiyonu	25
2.9 Mikroalglerden Biyodizel Üretimi	27
2.9.1 Mikro-emülsiyon	27
2.9.2 Seyreltme	27
2.9.3 Piroliz	28
2.9.4 Transesterifikasyon	28

3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Materyal	30
3.1.1 Mikroorganizma ve gelişim koşulları	30
3.1.2 Zirai atık	31
3.1.3 Havuç posası şekeri eklenmesi	31
3.1.4 Azot kaynağı eklenmesi	32
3.2 Yöntem	32
3.2.1 Zirai atığın ön işleme	32
3.3 Analitik Yöntemler	32
3.3.1 Mikroalgal gelişimin belirlenmesi	32
3.3.2 Havuç posasındaki şeker tayini	33
3.3.3 Mikroalg hücrelerinden lipid ekstraksiyonu	33
3.3.4 Mikrobiyel lipidlerin transesterifikasyonu	34
3.3.5 Mikrobiyel lipidlerin FAME içeriğinin belirlenmesi	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1 Farklı Gelişim Koşullarında <i>C. vulgaris</i>'in Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Biriktirme Kapasitesinin Araştırılması	36
4.1.1 Farklı gelişim koşullarının mikrobiyel gelişim üzerine etkisinin belirlenmesi	36
4.1.2 Farklı gelişim koşullarının lipid birikimi üzerine etkisinin belirlenmesi ...	37
4.1.3 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekerinin mikrobiyel gelişim üzerine etkisinin belirlenmesi	38
4.1.4 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekerinin lipid birikimi üzerine etkisinin belirlenmesi	39
4.1.5 Farklı konsantrasyonlarda NaNO₃'ün mikrobiyel gelişim üzerine etkisinin belirlenmesi	40
4.1.6 Farklı konsantrasyonlarda NaNO₃'ün lipid birikimi üzerine etkisinin belirlenmesi	41
4.2 Mikrobiyel Lipidlerin Transesterifikasyonu	43
4.2.1 Geleneksel transesterifikasyon yaklaşımı	43
4.2.2 <i>In situ</i> transesterifikasyon yaklaşımı	44
4.2.3 Süperkritik transesterifikasyon yaklaşımı	45

4.3 Farklı Transesterifikasyon Yaklaşımlarının C16+C18 FAME Dağılımına Etkisinin Belirlenmesi	46
4.4 Biodiesel Analyzer® Yazılımına Göre Yakıt Özellikleri	48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
5.1 Farklı Gelişim Koşullarının Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Birikimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	49
5.2 Farklı Konsantrasyonlarda Havuç Posası Şekerinin Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Birikimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	51
5.3 Farklı Konsantrasyonlarda NaNO₃'ün Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Birikimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	52
5.4 Mikrobiyel Lipidlerin Transesterifikasyonu	54
5.5 Biodiesel Analyzer® Yazılımına Göre Yakıt Özellikleri	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit
BiFeO ₃	Bizmut ferrit
Bp	Baz çifti
C	Karbon
°C	Santigrat derece
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum klorür monohidrat
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
cm ³	Santimetre küp
CaO	Kalsiyum oksit
CH ₂ Cl ₂	Diklorometan
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Kobalt(II) nitrat heksahidrat
CO ₂	Karbondioksit
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
d	Yoğunluk
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
g	Gram
ha	Hektar
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
H ₃ BO ₄	Fosforik asit
kg	Kilogram
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
Li	Lityum
M	Molar
mg	Miligram
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
MJ	Megajul
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mm ²	Milimetre kare
MnCl ₂ .4H ₂ O	Manganez (II) klorür tetrahidrat
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
Na ₂ EDTA	Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sodyum molibdat dihidrat
NaNO ₃	Sodyum nitrat
NaOH	Sodyum hidroksit
N ₂	Azot
nm	Nanometre
NO _x	Nitrit oksit

NO ₃	Nitrat
O ₂	Oksijen
P	Fosfor
rpm	Dakikadaki devir
R-SO ₃ H	Organik sülfonik asit
SO ₂	Kükürt dioksit
SO ₃ H	Sülfonik asit
SrO	Stronsiyum oksit
TiO ₂	Titanyum dioksit
v	Hacim
w	Ağırlık
W	Watt
ZnO	Çinko oksit
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko sülfat heptahidrat
ZrO ₂	Zirkonyum oksit

Kısaltmalar

ASTM D6751	Amerika standartlarına göre biyodizel yakıt özellikleri
cCA	Karbonik anhidraz kompleksi
CCH	Hindistan cevizi kabuğu
CFPP	Soğuk filtre tıkanma noktası
CJC	Kalsine jatropha keki
CP	Bulutlanma noktası
DNS	Dinitrosalisilik asit
EN 14214	Avrupa standartlarına göre biyodizel yakıt özellikleri
EPS	Hücre dışı polimer
FAME	Yağ asidi metil esteri
FFA	Serbest yağ asidi
FID	Alev iyonizasyon dedektör
GC	Gaz kromatografisi
GO	Grafen oksit
HHV	Yüksek ısıtma değeri
KJC	KOH aktive jatropha keki
LCSF	Uzun zincirli doymuş faktör
MAE	Mikrodalga destekli ekstraksiyon
ME	Malik enzim
MN	Meganükleaz
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri
POME	Palmye yağı değirmeni atığı
PP	Akma noktası
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
SFE	Süperkritik sıvı ekstraksiyonu
TAG	Triaçilgliserol
TALE	Yazım etkinleştirici benzeri etkileyici

UAE

Ultrasonik destekli ekstraksiyon



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Transesterifikasyon reaksiyonunun denklemleri.....	29
Şekil 4.1 Farklı gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim	37
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim	39
Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda NaNO_3 içeren fotoototrofik ve fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim	41



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı biyodizel kaynaklarının karşılaştırılması	12
Çizelge 2.2 Yüksek lipid üretimi için bazı potansiyel mikroalg türleri	16
Çizelge 4.1 Farklı gelişim koşullarında lipid birikimi	38
Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi	40
Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda NaNO_3 içeren fotoototrofik ve fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi	42
Çizelge 4.4 Geleneksel transesterifikasyon yönteminde NaOH katalizörünün kullanılmasıyla elde edilen FAME (C16+C18)	44
Çizelge 4.5 <i>In situ</i> transesterifikasyon yönteminde NaOH katalizörünün kullanılmasıyla elde edilen FAME (C16+C18)	45
Çizelge 4.6 Süperkritik transesterifikasyon yönteminde elde edilen FAME (C16+C18)	46
Çizelge 4.7 Farklı transesterifikasyon yaklaşımları sonucunda elde edilen yağ asitlerindeki C16+C18 oranları	47

1. GİRİŞ

Dünyada nüfus artış hızına bağlı olarak enerji tüketimi; konut, ulaşım, taşımacılık gibi sanayi faaliyetlerinin hızlanması ile giderek artmış ve buna bağlı enerji talebi ön plana çıkmıştır. Bu talebin 2040 yılına kadar yaklaşık %28 artması beklenmektedir (Kumar vd. 2020). Artan enerji ihtiyacının yaklaşık olarak %85'i fosil yakıtlardan sağlanmaktadır. Fosil yakıtlardan özellikle petrol ve gaz; ısınma, ulaşım, elektrik üretimi gibi günlük hayatımızın birçok alanında kullanılarak enerji ihtiyacının %45'ini oluşturmaktadır (Sharma ve Singh 2017, Shah vd. 2020). Özellikle 2019 yılında Türkiye'deki elektrik enerjisi üretiminin %37.1'i kömür ve %18.9'u doğalgaz olarak belirlenmiştir (Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=cevre-ve-enerji-103&dil=1>, 2021). Fosil yakıtların devamlı kullanımı sonucunda CO₂, SO₂ ve NO_x gibi çeşitli zehirli gazlar ortaya çıkarak çevresel kirliliğe ve küresel ısınmaya neden olmaktadır (Shahsavari ve Akbari 2018, Anto vd. 2019). Özellikle küresel ısınmanın temeli olan sera gazı emisyonunun %56.6'sı bu şekilde oluşmaktadır. Bu bağlamda CO₂ seviyesinin 2030 yılına kadar %80 artması beklenmektedir. Ayrıca SO₂ ve NO_x gibi kirleticilerin oluşturduğu asit yağmurları ekosistemi olumsuz yönde etkilemektedir (Shahsavari ve Akbari 2018). Bunların yanında fosil yakıtların devamlı kullanılması, fosil yakıt rezervlerini azalmasına neden olmaktadır. Bu durum tüm Dünya'da endişe verici boyutlara ulaşmaktadır. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda fosil yakıtlara alternatif olarak yenilenebilir enerji kaynakları ön plana çıkmıştır (Chi vd. 2019, Singh vd. 2020). Yenilenebilir enerji kaynakları sürdürülebilir, düşük maliyetli ve çevre dostu kaynaklardır. Fosil yakıtların neden olduğu olumsuz etkileri de en aza indirmektedir. Böylece yenilenebilir enerji kaynakları mevcut olan problemlerin çözümü için potansiyel bir kaynak olarak görülmektedir (Leong vd. 2018, Pradhan vd. 2018). Yenilenebilir enerji kaynakları genel olarak; hidroelektrik(su) enerjisi, rüzgâr enerjisi, jeotermal enerji, güneş enerjisi ve biyokütle enerjisi olmak üzere 5'e ayrılmaktadır. Son yıllarda yapılan literatür çalışmalarına baktığımız zaman özellikle biyokütle enerjisi ön plana çıkmaktadır (Singh vd. 2019, Shah vd. 2020).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, zirai atık kullanılarak geliştirilen *C. vulgaris*'ten elde edilen mikrobiyel lipidlerin ham madde olarak biyodizel üretiminde kullanılması hedeflenmiştir. Bu bağlamda mikrobiyel gelişim ve lipid birikimi üzerine farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir. Lipid biriktirme kapasitesinin maksimum olduğu koşullar optimize edildikten sonra elde edilen mikrobiyel lipidler, farklı transesterifikasyon yaklaşımlarına tabii tutulmuş ve oluşan yağ asidi metil esterleri Gaz Kromatografisinde analiz edilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyokütle Enerjisi

Yenilenebilir enerji kaynaklarının bir türü olan biyokütle enerjisi; orman ürünleri, tarımsal ürünler, bitki ve hayvan kalıntıları, mikroorganizma, gübre veya farklı atıklardan meydana gelen biyolojik organik maddelerden elde edilen enerji olarak tanımlanmaktadır (Rehan vd. 2018, Nunes vd. 2020). Biyokütle enerjisi sonucunda elde edilen biyoyakıtlarda çok sayıda eser elementler, organik bileşikler vs. bulunmaktadır. Bununla birlikte biyoyakıt eldesi için tarım dışı araziler, bozulmuş veya kontamine olmuş alanlar kullanılarak değerlendirilmektedir. Tüm bu olumlu yönlerinin yanında düşük maliyetli ve çevre dostu olması, fosil yakıtların neden olduğu CO₂ emisyonu gibi olumsuz çevresel koşulları azalttığı için biyoyakıtlar ön plana çıkmaktadır (Vassilev vd. 2015).

2.2 Biyoyakıt Üretiminde Kullanılan Ham madde Kaynakları

Biyoyakıt üretiminde kullanılan ham madde kaynakları temel olarak 4'e ayrılmaktadır. Bunlar birinci nesil biyoyakıtlar, ikinci nesil biyoyakıtlar, üçüncü nesil biyoyakıtlar ve son olarak dördüncü nesil biyoyakıtlardır.

Birinci Nesil Biyoyakıtlar: Bu grupta ham madde kaynağı olarak mısır, ayçiçeği, soya fasulyesi, hurma yağı, kanola yağı gibi bitkisel yağlar kullanılmaktadır (Leong vd. 2018, Singh vd. 2020). Bu ham madde kaynaklarının kullanılmasıyla özellikle biyoetanol ve biyodizel elde edilmektedir. Bu grupta daha çok mekanik yöntemler tercih edilmektedir. Bunun temel sebebi genellikle biyodizel üretiminde çoğunlukla kullanılan

bitkisel ham maddelerin tohumları veya parçalarının mekanik yöntemlerle elde edilmesidir (Li vd. 2019, Mahlia vd. 2020). Ayrıca bu gruptaki ham maddelerin biyoyakıtlara dönüşümü kolaydır. Fakat bu gruptaki ham madde kaynaklarının kullanımını bazı sorunlara yol açmaktadır. Bu ham maddeler çoğunlukla gıda olarak tüketilmekte ve üretiminde büyük tarım alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Buna bağlı olarak gıda sektörü yetersiz kalmakta ve geniş tarım alanları oluşturulması sonucu erozyon veya bölgenin ormansızlaşması gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır (Leong vd. 2018, Correa vd. 2019).

İkinci Nesil Biyoyakıtlar: Bu grupta ham madde kaynağı olarak jatrofa, jojoba gibi gıda olarak tüketilmeyen maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin yanı sıra lignoselülozik yapıda olan odun, saman, tahta vb. maddeler ile atık yağlar ve kalıntılar kullanılmaktadır (Sharma ve Singh 2017, Mat Aron vd. 2020). Bu ham madde kaynaklarının kullanılmasıyla genellikle biyogaz veya biyoetanol elde edilmektedir. İkinci nesil biyoyakıtların üretiminde kullanılan ham maddeler gıda değeri olmayan, atık olarak ortaya çıkan ve ucuz maddelerdir. Bu olumlu özellikleri sayesinde birinci nesil ham maddeler gibi gıda sektöründe rekabete neden olmamakta ve biyoyakıt eldesinde kullanılarak çevrede oluşturacak zararı engellenmektedir (Correa vd. 2019, Singh vd. 2020). Fakat bu gruptaki ham maddelerinin kullanımındaki en büyük sorun lignoselülozik yapıda olduklarından dolayı doğrudan kullanılamazlar ve birtakım ön işlemlere maruz bırakılmalarıdır. Bu nedenle biyoyakıt üretiminde maliyet yükselmektedir. Ayrıca bu gruptaki ham maddelerin özellikle biyodizel üretiminde önemli bir parametre olan yağ içeriği, birinci ve üçüncü nesil biyoyakıtlara göre daha düşüktür. Bu nedenle mekanik yöntemler pek tercih edilmemektedir (Leong vd. 2018, Li vd. 2019).

Üçüncü Nesil Biyoyakıtlar: Bu grupta ham madde kaynağı olarak siyanobakteriler gibi prokaryotik veya yeşil algler, mayalar gibi ökaryotik mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Correa vd. 2019, Mahlia vd. 2020). Bu ham madde kaynaklarının kullanılmasıyla genellikle biyodizel, biyobütanol veya biyoetanol elde edilmektedir. Bu

grupta daha çok biyokimyasal veya termo-kimyasal yöntemler tercih edilmektedir. Üçüncü nesil ham maddeler olarak kullanılan mikroorganizmalar yüksek lipid, karbonhidrat vs. içeriğine sahiptir. Özellikle bu grupta yer alan fotosentetik mikroalgler, her türlü ortamda ve iklim koşullarında gelişebildikleri için birinci ve ikinci nesil biyoyakıt kaynaklarına göre oldukça avantajlıdır (Suganya vd. 2016, Singh vd. 2020). Fakat üçüncü nesil ham madde kaynaklarının kullanılmasındaki en büyük sorun geniş ölçekli üretimin maliyetli olmasıdır. Fakat tüm olumsuzluklara rağmen üçüncü nesil ham madde kaynakları son yıllarda biyoyakıt üretiminde oldukça tercih edilmektedir (Leong vd. 2018, Rezanian vd. 2019).

Dördüncü Nesil Biyoyakıtlar: Bu grupta genetik mühendisliği çalışmaları ile birlikte siyanobakteriler, mayalar veya algler gibi mikroorganizmaların lipid birikimini, biyoyakıt verimini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Abdullah vd. 2019). Bu ham madde kaynaklarının kullanılmasıyla genellikle biyodizel veya biyoetanol elde edilmektedir. Dördüncü nesil biyoyakıtların avantajlarına bakıldığında kullanılan ham maddelerin yüksek verimlilik göstermesi en önemli özelliğidir. Fakat en büyük sorun yeni ve geliştirilmekte olan bir alan olduğu için uygulama sırasında maliyet yükselmektedir (Dutta vd. 2014, Singh vd. 2020). Literatür çalışmalarına bakıldığında zaman günümüzde 4 temel ham madde kaynağından üretilen biyoyakıt çeşitleri arasında biyodizel önem kazanmaktadır (Abdullah vd. 2019).

2.3 Biyodizel ve Özellikleri

Biyodizelin ortaya çıkışı 1900'lere dayanmaktadır. Rudolph Diesel, bir motoru çalıştırmak için fıstık yağı kullanarak tarihteki ilk biyodizel üretimini 1912 yılında gerçekleştirmiştir. O dönemde yakıt olarak petrol kullanıldığı için biyodizel gibi farklı bir yakıt türü önem kazanamamıştır (Noor vd. 2018, Rehan vd. 2018). Fakat daha sonra 1970'lerde meydana gelen petrol krizi nedeniyle fosil yakıtların yerine alternatif olarak biyoyakıtların kullanımı önem kazanmış ve özellikle biyodizel üretimi ve kullanımı ön

plana çıkmıştır. Daha önceleri 1853 yılında, bitkisel yağ kullanılarak transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda metil esterler meydana gelmiştir. Biyodizel, kavram olarak ise 1937’te ortaya çıkmıştır. Küresel anlamda biyodizel üretimi 2016’da 32.6 milyon tondan daha fazladır. Günümüzde ise Amerika, Brezilya, Malezya gibi ülkeler biyodizel ihtiyacının %80’den fazlasını karşılamaktadır (Mahmudul vd. 2017, Rezanian vd. 2019).

Biyodizel temel olarak bitkisel, hayvansal, mikroorganizma veya atık yağlardan elde edilen uzun zincirli yağ asitlerinin mono alkil esterleridir. Biyodizelin kaliteli olması yağ asidi özelliğine bağlı olmakla beraber yağ asitlerinin kimyasal özelliği, hangi kaynaktan elde edildiğine göre değişmektedir. Biyodizelin kimyasal içeriğine bakıldığında çoğunlukla 16-18 karbonlu doymuş yağ asitleri, tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) veya çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) bulunmaktadır (Faried vd. 2017, Singh vd. 2019). Biyodizelin kimyasal özellikleri EN 14214 (Avrupa) ve ASTM D6751 (Amerika) standartlarına göre belirlenmektedir. Yüksek yanma noktası, yüksek setan sayısı, daha düşük egzoz gazı emisyonu gibi kimyasal özellikleri geleneksel dizelere göre daha üstündür. Biyodizel geleneksel dizelere göre daha yağlayıcıdır. Bu durum motorun aşınmasını önlemekte ve motorun ömrünü uzatmaktadır. Biyodizel %10-11 oranında O₂ ve gerekli miktarda N₂ içerir. Oksijen oranı, motorun yanma verimini artırır. Ayrıca biyodizel yandığı zaman geleneksel dizelin aksine %70-90 oranında daha az aromatik hidrokarbon üretmektedir (Singh vd. 2019, Mahlia vd. 2020). Biyodizel, benzer kimyasal özelliklerinden dolayı geleneksel dizel ile %100 veya farklı oranlarda karıştırılarak motorda herhangi bir modifikasyona gerek kalmadan kullanılabilir. Biyodizel yüksek parlama noktasına sahiptir. Böylece geleneksel dizelere göre daha az yanıcıdır ve bu nedenle hem kullanımı hem de depolanması daha güvenlidir. Tüm bu nedenlerden dolayı biyodizel hem ekosistemi düzeltmek hem de mevcut olan enerji ihtiyacını karşılayabilmek için son dönemde oldukça önem kazanmıştır (Noor vd. 2018, Chi vd. 2019).

2.4 Biyodizel Ham madde Kaynakları

Biyodizel üretiminde ham madde kaynağı oldukça önemlidir. Çünkü ham madde kaynağı biyodizel üretim maliyetinin %75'ini oluşturmaktadır ve bu nedenle uygun ham madde ile çalışmak gerekmektedir (Mahmudul vd. 2017). Biyodizel üretiminde ham madde seçimi üretildiği bölgeye göre değişmektedir. Biyodizel üretiminde kullanılan ham maddeler temelde birinci nesil, ikinci nesil, üçüncü nesil ve dördüncü nesil biyoyakıt kaynakları olarak sınıflandırılmaktadır (Singh vd. 2020).

2.4.1 Birinci nesil biyodizel ham madde kaynakları

Biyodizel üretiminde özellikle mısır, soya, hurma ve kolza yağı gibi ham maddeler yaygın olarak kullanılmıştır. Genellikle birinci nesil biyoyakıt kaynakları arasında olan bu ürünler, üretildiği bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Geçmişten günümüze bitkisel yağların kullanımı oldukça popüler olmuştur. Özellikle kolza yağı Avrupa'da yaygın olarak kullanılırken, soya fasulyesi Amerika veya Brezilya gibi ülkelerde başlıca biyodizel üretim kaynağı olarak kullanılmaktadır. Yapılan literatür çalışmalarına baktığımız zaman soya, hurma veya kolza yağı gibi bitkisel yağlar çalışmalarda sıkça yer almaktadır (Mahmudul vd. 2017, Rezania vd. 2019). Yapılan bir çalışmada biyodizel üretimi için hurma yağı kullanılmıştır. Bu çalışmada hurma meyveleri alınarak önce kurutulmuş ve ardından birtakım işlemler sonucunda yağ elde edilmiştir. Deneyde grafit tozları kullanıma hazır hale geldikten sonra SO_3H ile muamele edilerek grafen levhalar oluşturulmuş ve bu grafen levhalar transesterifikasyon için katalizör olarak kullanılmıştır. Bu deney sonucuna göre %98 oranında yağ asidi metil esteri (FAME) elde edilmiştir (Nongbe vd. 2017). Başka bir çalışmada kanola yağı kullanılarak biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada heterojen bir katalizör olan Li/TiO_2 transesterifikasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Bu deneyde farklı katalizör konsantrasyonları, reaksiyon sıcaklıkları, reaksiyon süreleri ve metanol:yağ oranları karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar;

katalizör konsantrasyonu %5 (wt), metanol:yağ oranı 24:1, reaksiyon süresi 3 saat ve reaksiyon sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %98 oranında FAME elde edilmiştir (Alsharifi vd. 2017).

Rajkumari ve Rokhum (2020) tarafından yapılan bir çalışmada biyodizel üretimi için soya yağı kullanılmıştır. Bu çalışmada önce muz kabukları kurutulmuş ve daha sonra birtakım işlemlerle muz kabuğu atığı külü katalizör olarak transesterifikasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Bu deney sonucuna göre %98.39 oranında FAME elde edilmiştir.

Salimi ve Hosseini (2019) tarafından yapılan bir çalışmada kanola yağı kullanılarak biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, BiFeO₃ nanopartikülleri birtakım işlemler sonucunda hazır hale gelmiş ve ardından ZnO ile birlikte manyetik bir ZnO/BiFeO₃ nanokatalizörü oluşturularak transesterifikasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Bu deneyde farklı katalizör konsantrasyonları, reaksiyon sıcaklıkları ve metanol:yağ oranları karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; reaksiyon sıcaklığı 65°C, metanol:yağ oranı 15:1, katalizör konsantrasyonu %4 (wt) olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %95.43 oranında FAME elde edilmiştir.

Thushari vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada hurma yağından biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hindistan cevizi kabuğu (CCH) toz haline getirilmiş ve H₂SO₄ ile birtakım işlemler sonucunda asidik bir katalizör elde edilmiştir. Bu deneyde; farklı katalizör konsantrasyonları, metanol:yağ oranları, reaksiyon sıcaklıkları, reaksiyon süreleri ve çalkalama hızları gibi parametreler karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; katalizör konsantrasyonu %10 (wt), metanol:yağ oranı 12:1, sıcaklık 130°C, reaksiyon süresi 3 saat ve çalkalama hızı 500 rpm olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %89.8 oranında FAME elde edilmiştir.

2.4.2 İkinci nesil biyodizel ham madde kaynakları

Genel olarak ikinci nesil biyoyakıt kaynakları arasında olan ham maddeler, yüksek oktan sayısı, yüksek buharlaşma ısısı ve setan sayısının düşük olması gibi nedenlerden dolayı biyoetanol üretiminde daha fazla tercih edilmektedir. Fakat biyodizel üretiminde de kullanılmaktadır (Dutta vd. 2014, Rehan vd. 2018). Özellikle birinci nesil biyoyakıt kaynaklarının kullanılmasıyla ortaya çıkan sorunlar nedeniyle son yıllarda biyodizel üretiminde tercih edilen ham madde kaynaklarıdır. Bu ham madde kaynakları genel olarak atık yağlardır (Rezania vd. 2019, Mat Aron vd. 2020).

Günümüzde atık yağlar bol miktarda bulunmaktadır ve bu nedenle diğer kaynaklara göre biyoyakıt üretiminde ham madde kaynağı olarak tercih edilmektedir. Özellikle literatür çalışmalarına baktığımız zaman atık yağlar sıkça biyodizel üretimi için kullanılmaktadır. Kullanılan ham madde kaynaklarındaki en büyük sorun ise biyodizele dönüşüm aşamasında maliyet yüksektir (Ghazali vd. 2015, Rehan vd. 2018). Hayvansal yağlara baktığımız zaman biyodizel eldesi bitkisel kaynaklara göre daha ekonomiktir. Ayrıca hayvansal yağların doymuş yağ asidi miktarı bitkisel kaynaklara göre daha fazladır. Bu durum hayvansal yağlardan elde edilen biyodizelin daha yüksek setan sayısına sahip olması demektir ve setan sayısının yüksek olması da bir avantajdır. (Rehan vd. 2018, Singh vd. 2020). Hayvansal atık yağların kullanılmasındaki en büyük sorun ise yüksek oranda doymuş yağ asitleri içermelerinden dolayı katı formda olmalarıdır. Bu durum biyodizele dönüşümü zorlaştırmaktadır. Özellikle literatür çalışmalarında don yağı, işlenmiş domuz yağı vs. yaygın olarak kullanılmaktadır (Ghazali vd. 2015, Rezania vd. 2019). Yapılan bir çalışmada biyodizel üretimi için koyun eti don yağı kullanılmıştır. Koyun eti don yağı özellikle sabun endüstrisinden elde edilen atık bir üründür. Bu çalışmada alkol olarak metanol ve katalizör olarak H_2SO_4 kullanılmıştır. Deneyde koyun eti don yağı ilk önce $60^\circ C$ ısıtılmış ve ardından transesterifikasyon reaksiyonuna girerek FAME içeriği belirlenmiştir. Bu deney sonucuna göre %83.3 oranında FAME elde edilmiştir (Faleh vd. 2018).

He vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada domuz yağı bir takım ön işlemler yapılarak biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Bu deneyde üç boyutlu ultrasonik destekli reaktör kullanılarak iki adımda biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde farklı katalizör konsantrasyonları, reaksiyon süreleri, metanol:yağ oranları ve reaksiyon sıcaklıkları gibi parametreler karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; katalizör konsantrasyonu %1.11 (wt), metanol:yağ oranı 7.42:1, reaksiyon süresi 116.14 dk ve sıcaklık 62.3°C olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %98 oranında FAME elde edilmiştir.

Atık yemek yağlarına baktığımızda ise yüksek oranda su ve serbest yağ asidi (FFA) içeriğine sahiptir. Atık yemek yağlarının maliyeti, bitkisel kaynaklara göre 2.5-3.5 kat daha ucuzdur ve bu nedenle literatür çalışmalarında da sıkça tercih edilmektedir. Atık yemek yağların biyodizele dönüşümündeki en büyük sorun ise birtakım işlemlerin zor olması ve maliyeti yükseltmesidir (Ghazali vd. 2015, Rehan vd. 2018). Yapılan bir çalışmada biyodizel üretimi için atık yemek yağı kullanılmıştır. Bu çalışmada tavuk fabrikasından tavuk gübresi alınmış ve ardından tavuk gübresinde bulunan CaCO_3 bileşiği kalsinasyon işlemi ile aktif kalsiyum karbonata dönüştürülerek heterojen bir katalizör elde edilmiştir. Bu deney sonucuna göre %90 oranında FAME elde edilmiştir (Maneerung vd. 2016).

Jume vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada atık yemek yağı kullanılarak biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada grafit tozundan çeşitli işlemler sonucunda grafen oksit elde edilmiş ve ardından farklı oranlarda bimetal stronsiyum nitrat ve zirkonyum oksohidrat eklenerek nanokatalizör elde edilmiştir. Deneyde farklı reaksiyon süreleri, reaksiyon sıcaklıkları, metanol:yağ oranları, materyal oranları gibi parametreler karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; metanol:yağ oranı 4:1, reaksiyon süresi 90 dk, reaksiyon sıcaklığı 120°C ve GO: $\text{ZrO}_2\text{-SrO}$ oranı 1:0.5 (w/w) olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %91 oranında FAME elde edilmiştir

Atık yağlar arasında gıda olarak tüketilmeyen bitkisel yağlar da bulunmaktadır. Özellikle Hindistan'da jatropha ve jojoba yağı kullanılırken, Avustralya'da çekirdek içi yağı ve karanja gibi yağlar kullanılmıştır (Ghazali vd. 2015, Rehan vd. 2018). Jatropha yağı %35 yağ içeriği nedeniyle biyodizel üretimi için en yaygın kullanılan ham maddelerden birisidir. Aynı şekilde karanja yağı da %27-39 oranında yağ içeriğine sahiptir ve birçok alanda yetiştirilebildiği için biyodizel üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rezania vd. 2019, Singh vd. 2020).

Kamel vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada biyodizel üretimi için *Jatropha curcas* L. kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Jatropha curcas* L. bitkisinin tohumu alınarak mekanik işlemler sonucunda yağ elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen yağ kalsine jatropha keki (CJC) ve KOH aktive jatropha keki (KJC) gibi farklı heterojen katalizörlerle transesterifikasyon reaksiyonuna tabii tutulmuştur. Bu deney sonucuna göre CJC katalizöründe %94 oranında FAME elde edilirken, KJC katalizöründe %96 oranında FAME elde edilmiştir.

Sánchez-Arreola vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada biyodizel üretimi için *Cascabela ovata* yağı kullanılmıştır. Bu çalışmada *Cascabela ovata* bitkisinin tohumları soyularak 60°C'de 12 saat kurutulmuş ve ardından öğütülerek yağ elde edilmiştir. Deneyde alkali ve asidik katalizör kullanılarak transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu deney sonucuna göre alkali transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda %95 oranında FAME elde edilmiştir.

2.4.3 Üçüncü nesil biyodizel ham madde kaynakları

Üçüncü nesil biyoyakıtların temel ham madde grubu olan algal yağlar biyodizel üretimi için potansiyel ham madde kaynağıdır. Diğer biyoyakıt kaynaklarına göre alglerin

birçok avantajı vardır. Öncelikle lipid içerikleri fazladır ve genellikle kuru ağırlıklarının %40-80 arasında lipid biriktirebilmektedirler. Bu oran geleneksel tahıllardan 15-300 kat daha yüksektir (Suganya vd. 2016, Mat Aron vd. 2020). Birinci ve ikinci nesil ham madde kaynakları ile karşılaştırıldığında mikroalglerden elde edilen yağ miktarı Çizelge 2.1’de gösterilmektedir. Mikroalglerde bulunan FFA, trimonogliseritler, dimonogliseritler ve karotenoidler gibi bileşenler sitoplazmada birikmektedir. Glikolipitler ve fosfolipitler gibi polar olan bileşenler ise hücre zarını oluşturmaktadır. Mikroalglerde bulunan FFA biyodizelin kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Kumar vd. 2016, Rezania vd. 2019). Mikroalglerde oluşan FFA içeriğine göre farklı katalizör türleri kullanılmaktadır. Örneğin; FFA içeriği %2’den yüksek olduğu zaman asidik katalizör tercih edilmektedir (Chen vd. 2018, Fazal vd. 2018).

Çizelge 2.1 Farklı biyodizel kaynaklarının karşılaştırılması (Faried vd. 2017)

Mahsul	Yağ eldesi (L/ha)
Mısır	172
Soya	446
Kanola	1190
Jatrofa	1892
Hindistan cevizi	2689
Hurma yağı	5950
Mikroalg (%70 yağ ağırlık)	136,900
Mikroalg (%30 yağ ağırlık)	58,700

Alglar makroalgler ve mikroalgler olmak üzere 2’ye ayrılmaktadır. Makroalglerin lipid içeriği mikroalglere göre oldukça düşüktür. Ancak yüksek miktarda karbonhidrat içerdikleri için özellikle biyoetanol ve biyogaz üretimine uygun oldukları için sadece biyodizel kaynağı olarak kullanılmamaktadırlar. Yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında mikroalg biyokütleden biyodizel üretimi ile ilgili çok fazla çalışma mevcuttur (Javed vd. 2019, Singh vd. 2020). Yapılan bir çalışmada *Nannochloropsis gaditana* mikroalgi ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde yağ biyokütle ile çalışılarak HCI ve FFA farklı konsantrasyonlarında *in situ* transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu deney sonucuna göre HCI katalizörü kullanılarak

yapılan *in situ* transesterifikasyon reaksiyonunda 95°C'de %90'dan fazla FAME elde edilmiştir (Kim vd. 2015).

Ghosh vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada *Chlorella sp.* MJ 11/11 ile farklı transesterifikasyon yöntemleri kullanılarak biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada farklı katalizör çeşidi (HCl ve H₂SO₄), reaksiyon süreleri, biyokütle:metanol oranları, reaksiyon sıcaklıkları gibi parametreler değerlendirilmiştir. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; *in situ* transesterifikasyon reaksiyonunda HCl konsantrasyonu 4 M, biyokütle:metanol oranı 1:5, reaksiyon süresi 7 saat ve reaksiyon sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %95 oranında FAME elde edilmiştir.

Mamo ve Mekonnen (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *Scenedesmus sp.* mikroalginden biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada katalizör olarak keçi kemiğinden elde edilen CaO nanokatalizör kullanılarak transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada farklı katalizör konsantrasyonları, reaksiyon süreleri, metanol:oranı, reaksiyon sıcaklıkları gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; %2 (wt) CaO konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı 60°C, metanol:yağ oranı 1:11 ve reaksiyon süresi 3 saat olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %92 oranında FAME elde edilmiştir.

Turkkul vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *Spirulina sp.* ve *Nannochloropsis oculata* mikroalgleri ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada katalizör olarak 700°C'de kalsinasyona uğrayan ve ağırlıkça %60 CaO içeren CaO/Al₂O₃ katalizörü kullanılarak transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde farklı etanol:yağ oranları, reaksiyon süreleri, katalizör konsantrasyonları gibi parametreler değerlendirilmiştir. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; etanol:yağ oranı 48:1, %6 (wt) katalizör konsantrasyonu, reaksiyon süresi 60 dk olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında iki mikroalgden %90-99 oranında FAME elde edilmiştir.

Lin ve Wu (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Chlorella sp.* Y8-1 mikroalginin farklı gelişim koşullarında biyokütle ve lipid birikimi incelenmiştir. Bu deney sonucuna göre; fotoototrofik gelişim koşullarında biyokütle, sükroz içeren heterotrofik gelişim koşullarına kıyasla 0.17 g/L'den 0.22 g/L'ye yaklaşık 1.3 kat artarken, lipid birikimi %5.9'dan %16.5'e yaklaşık 2.8 kat artmıştır. En yüksek biyokütle ve lipid birikimi sırasıyla 0.45 g/L ve %35.5 ile mikсотrofik gelişim koşullarında belirlemiştir.

2.4.4 Dördüncü nesil biyodizel ham madde kaynakları

Dördüncü nesil biyodizel ham madde kaynakları temel olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Özellikle *Chlorella sp.* gibi lipid içeriği yüksek mikroorganizmalara odaklanılarak daha fazla biyodizel üretimi hedeflenmiştir (Dutta vd. 2014, Abdullah vd. 2019). Yapılan mühendislik çalışmaları sadece lipid içeriğini arttırmak değil aynı zamanda fotosentez için gerekli olan CO₂ alımını artırarak sera gazı emisyonunu da azaltmayı hedeflemektedir. Böylece diğer biyodizel kaynaklarına kıyasla ortaya çıkan sorunlara alternatif bir çözüm olmuştur. Özellikle literatürde alglerin fotosentetik verimini arttırmak, algin daha fazla ışık almasını sağlamak gibi çalışmalar oldukça popülerdir (Karmakar ve Halder 2019, Mat Aron vd. 2020). Yapılan bir çalışmada *Chlorella protothecoides*'in genetik çalışmalar ile lipid birikimi artırılmıştır. Bu deneyde lipid birikimini etkileyen malik enzim (ME) üzerinde birtakım çalışmalar yapılmıştır. Lipid birikimi tetikleyen malik enzimin tüm geni, plazmit pBI121'e klonlanmış ve böylece rekombinant bir plazmit elde edilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmitin konak hücreye aktarılmasıyla transgenik bir mikroalgin oluşturulması hedeflenmiştir. Malik enzimin 1530 bp (509 aminoasit kalıntısı) açık okuma çerçevesiyle elde edilmiş ve tanımlanmıştır. Tanımlanan bu genin *Chlamydomonas reinhardtii*'deki malik enzim ile %73 oranında homolog olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan deney sonucunda *C. protothecoides*'in lipid birikimi 2.8 kat artmıştır. Deney sonucuna göre %93-98 oranında FAME elde edilmiştir (Yan vd. 2019).

Daboussi vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada deniz diatomu olan *Phaeodactylum tricornutum*'un genetiği üzerinde çalışılarak lipid birikimini arttırmak hedeflenmiştir. Bu çalışmanın temel amacı fotosentetik mikroalg olan diatomların tam olarak yararlanılamayan biyodizel üretim potansiyellerini göstermektir. Bu çalışmada hem meganükleaz (MN) hemde yazım etkinleştirici benzeri etkileyici (TALE) nükleazı kullanılarak lipid birikimini etkileyen 7 tane gende birtakım modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Deney sonucuna göre özellikle UDP-glukoz pirofosforilaz geninde meydana gelen bozulma sonucunda geliştirilen Tn19745_1 mutanıtı kontrole göre %45 daha fazla triaçilgliserol (TAG) üretmiştir.

You vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *C. vulgaris*'in karbonik anhidraz kompleksi (cCA) ile CO₂ fiksasyonu ve lipid birikimini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada konakçı hücre olarak *Escherichia coli* DH5a, ekspresyon vektörleri olarak pCold II ve pET-22b (+) ve *E. coli* BL21 (DE3) suşu da enzim proteinlerini üretmek için kullanılmıştır. *Hydrogenovibrio marinus*'tan elde edilen ve karbonik anhidrazı kodlayan hmCA geni ile *Clostridium cellulovorans*'dan elde edilen docB, cCA oluşturmak için birleştirilmiş ve daha sonra ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda kohezın-dokerin etkileşimiyle oluşan cCA ile büyüme hızı 1.6 kat ve lipid birikimi 1.7 kat (%23.3) artmıştır.

2.5 Biyodizel Üretiminde Kullanılan Mikroalgler

Mikroalgler, yüksek oranda lipid, karbonhidrat, protein içeren ökaryotik hücre yapısına sahip ve birçok farklı ortamda yaşayabilen fotosentetik mikroorganizmalardır (Anto vd. 2019). Mikroalgler; genel olarak fotoototrofik şekilde gelişebilmelerinin yanında ayrıca, fotoheterotrofik, heterotrofik, miksotrofik gibi farklı koşullarda gelişebilmektedir. Bu ortamlardaki temel fark, karbon kaynağı ve ışık kullanımındır. Fotoototrofik koşullarda inorganik karbon kaynağı olan CO₂ ve ışık kaynağı bulunmaktadır. Fotoheterotrofik koşullarda organik karbon kaynağı ile birlikte ışık kaynağı kullanılmaktadır.

Heterotrofik koşullarda ışık olmayan ortamda organik karbon kaynağı kullanılmasıyla mikroalg üretimi gerçekleştirilmektedir. Miksotrofik koşullarda ise hem organik hem de inorganik (CO₂) karbon kaynakları ile birlikte ışık kaynağı kullanılmaktadır. Bu gibi farklı ortamların kullanılması mikroalg türüne göre değişmektedir (Fazal vd. 2018, Yin vd. 2020). Farklı koşullarda mikroalg gelişimi, hücre içerisindeki lipid birikimini de etkilemektedir. Mikroalgler genellikle kuru ağırlıklarının %40-80'i lipid biriktirirler. Bu oran, karasal bitkilerden 15-300 kat daha yüksektir. Elde edilen lipid içeriği mikroalg türüne göre değişmektedir ve genellikle *Chlorella sp.* biyodizel üretiminde sıkça kullanılmaktadır (Çizelge 2.2) (Suganya vd. 2016, Anto vd. 2019).

Çizelge 2.2 Yüksek lipid üretimi için bazı potansiyel mikroalg türleri (Kumar vd. 2016)

Mikroorganizmalar	Biyokütle verimliliği (g/L d)	Lipid içeriği (% , w/w)	Lipid verimliliği (mg/L d)
<i>Botryococcus brauni</i>	0.02	25.0-75.0	5-15
<i>Chlorella emersonii</i>	0.036-0.041	25.0-63.0	10.3-50.0
<i>Chlorella protothecoides</i>	2.00-7.70	14.6-57.8	1214
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.90-3.64	2.0	58-72.8
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0.23-1.47	19.0-22.0	43.7-323.4
<i>Chlorella sp.</i>	0.02-2.5	10.0-48.0	2-1200
<i>Chlorococcum sp.</i>	0.28	19.3	54
<i>Dunaliella salina</i>	0.22-0.34	6.0-25.0	13.2-85
<i>Euglena gracilis</i>	7.70	14.0-20.0	1078-1540
<i>Nannochloropsis sp</i>	0.17-1.43	12.0-53.0	20.4-757.9
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.003-1.9	18.0-57.0	0.54-1083
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.004-0.74	11.0-55.0	0.44-407
<i>Scenedesmus sp</i>	0.03-0.26	19.6-21.1	5.88-54.6
<i>Spirulina platensis</i>	0.06-4.3	4.0-16.6	2.4-713.8
<i>Spirulina maxima</i>	0.21-0.25	4.0-9.0	0.84-2.25
<i>Tetraselmis sp</i>	0.30	12.6-14.7	43.4

Mikroalglerin biyodizel üretiminde kullanımıyla sera gazı emisyonu azaltılmaktadır. Çünkü mikroalgler fotosentetik mikroorganizmalar olduğu için CO₂'yi karasal bitkilerin aksine yaklaşık 5-20 kat daha fazla depo eder. Ayrıca mikroalgler güneş enerjisini yaklaşık %9-10 oranında biyokütleyle çevirebilmekte ve böylece güneş enerjisi daha verimli bir şekilde kullanabilmektedir (Suparmaniam vd. 2019). Bunlara ek olarak laboratuvar koşullarında bile gelişebildikleri için bitkisel yağlar gibi fazla tarım alanlarına ihtiyaç yoktur. Ayrıca yüksek gelişme oranları sayesinde bitkilere göre daha hızlı biyokütle üretimi gerçekleştirilebilmektedirler (Chen vd. 2018, Singh vd. 2020). Mikroalgler hızlı bir büyüme oranına sahip olduğu için hasat süreleri kısadır. Bazı türler bir günde bile hasat edilebilmektedir. Böylece diğer ham madde kaynaklarına göre daha etkin bir şekilde biyodizel üretim sürecine katılabilmektedirler (Faried vd. 2017, Chew vd. 2017).

Mikroalglerin biyodizel üretimi için potansiyel kaynak olmalarının bir diğer sebebi ise %20-50 arasında TAG biriktirebilmeleridir. Çünkü yüksek TAG birikimi biyodizel üretiminde oldukça önemlidir ve TAG içeriği de biyodizelin kalitesini etkilemektedir. Tüm bu özelliklerden dolayı biyodizel üretiminde algal yağların kullanımı pek çok olumlu etkiyi beraberinde getirmektedir (Kumar vd. 2016). Mikroalglerin lipid birikimini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlardan bazıları; pH, ışık yoğunluğu, sıcaklık, tuz, C/N oranı gibi faktörlerdir. Bu faktörler mikroalglerde strese neden olarak lipid birikimini arttırabilmektedir. (Chen vd. 2017, Liao vd. 2018). Çünkü mikroalglerin çoğu birtakım stres koşullarında hücre bölünmesini yavaşlatıp biyoyakıtlar üretebilecek lipid veya karbonhidrat gibi yüksek enerjili bileşikler oluşturabilirler. Özellikle ortamdaki azot eksikliği lipid birikimini arttırıcı önemli bir faktördür. Ayrıca azot eksikliği sadece lipid birikimini değil aynı zamanda hücrenin boyutunu, sayısını vs. birçok durumu etkilemektedir (Zhu vd. 2014, Baroni vd. 2019).

Mikroalgler ışık, CO₂ ve temel besinlerin varlığında kapalı veya açık sistemlerde kolayca yetiştirilebilmektedir. Mikroalglerin gelişiminde genellikle karbon kaynağı olarak glukoz kullanılmaktadır. Fakat son dönemde zirai atıklar ön plana çıkmaktadır.

Tarımsal veya endüstriyel birçok atık madde içerdikleri karbonhidrat, protein, organik asit gibi temel besin maddelerinden dolayı oldukça önemlidir. Organik karbon kaynaklarının kullanılmasıyla karbon asimilasyonu artarak TAG veya karbonhidrat gibi farklı yapıların oluşumu da hızlanmaktadır. Ayrıca tarımsal atıkların kullanılmasıyla da atık maddelerin geri dönüşümü sağlanmakta ve çevresel kirliliğin önüne geçilmektedir (Chew vd. 2018).

Mikroalglerden elde edilen biyodizel kükürt gibi zararlı bileşikler içermez ve biyodegrede olabilmektedir. Bu sayede çevresel anlamda toksik etki oluşturabilecek maddelerin ortama karışması engellenmekte ve karışsa dahi kolaylıkla parçalanabilmektedir. Mikroalg tabanlı biyodizel geleneksel petrol dizel ile benzer kimyasal özelliklere sahiptir (Shah vd. 2018, Li vd. 2019). Ayrıca tüm bunların yanında mikroalgler sadece biyodizel üretiminde kullanılmamaktadır. Yüksek oranda vitamin bulundurmaları ve ürettikleri çoklu doymamış yağ asitleri sayesinde çeşitli kalp rahatsızlıklarının tedavisinde mikroalglerden yararlanılmaktadır. Fakat mikroalglerin geniş ölçekte kullanımının oldukça pahalı olması ve görece yeni bir yöntem olması da dezavantajlarıdır. Ancak her kadar olumsuz durumlar da olsa mikroalgler birçok avantajlı özellikleri nedeniyle günümüzde her alanda kullanılan mikroorganizmalardır (Chew vd. 2017, Shah vd. 2018).

2.6 Mikroalglerden Biyodizel Üretim Aşamaları

2.6.1 Mikroalglerin üretimi

Mikroalglerden biyodizel üretiminin ilk aşamasıdır. Mikroalgler birçok alanda kullanılabilen mikroorganizmalar olmaları sebebiyle, yüksek oranda üretilebilmeleri büyük önem arz etmektedir. Bu anlamda mikroalg üretimi özellikle biyodizelin elde

edilmesinde önemli bir aşamadır (Adeniyi vd. 2018). Mikroalgler, fotosentetik mikroorganizmalar olduğu için yapay veya doğal ortamlarda yetiştirilebilmektedir. Mikroalglerin; fotoototrofik, miksotrofik gibi farklı gelişim ortamına göre açık, kapalı ve hibrit sistemler kurularak üretimi yapılmaktadır (Kiran vd. 2014, Javed vd. 2019).

Açık Sistemler: Mikroalg üretiminde en çok tercih edilen yöntemlerden birisidir. Açık sistemler arasında dairesel havuzlar, kanal tipi havuzlar, eğimli sistemler gibi üretim tipleri bulunmaktadır. Özellikle kanal tipi ve dairesel havuzlar sıkça tercih edilmektedir. Açık sistemlerin tercih edilme nedenleri basit yapılı olmalarıdır ve maliyet açısından daha uygundur (Fazal vd. 2018, Suparmaniam vd. 2019). Mikroalg üretiminde kanalizasyon veya arıtma tesisleri gibi yerlerden gelen sular potansiyel bir besin kaynağı olarak kullanılabilir. Açık sistemlerin kullanılmasında birtakım sorunlar ortaya çıkmaktadır. Açık sistemlerde mikroalg üretimi çevresel koşullara bağlıdır ve iklimsel durumlardan etkilenebilmektedir. Ayrıca hava ile temas halinde oldukları için kontaminasyon durumu ortaya çıkabilir (Correa vd. 2019, Patle vd. 2020). Bu sistemlerde güneş ışığının dağılımı her yerde eşit olmamakta veya az ışık yoğunluğu olmaktadır. Bu durum mikroalgin gelişimini fotosentetik aktivitesini etkileyerek gelişimini yavaşlatmaktadır. Ayrıca ortamın sıcaklık ayarı da suyun buharlaşmasına neden olabilir. Bu anlamda açık sistemlerde tüm bu durumlar dikkate alınarak mikroalg üretimi gerçekleştirilmelidir. Açık sistemlerde; eğimli sistem, dairesel havuzlar ve kanal tipi havuz sistemleri kullanılmaktadır (Kiran vd. 2014, Suparmaniam vd. 2019).

Eğimli Sistem (Kademeli Sistem): Bu sistemde eğimli yüzey sayesinde mikroalgal gelişme ortamı yukarıdan aşağıya doğru akmaktadır. Böylelikle yerçekimi sayesinde mikroalg ve gelişme ortamı birbirleri ile karışmaktadır. Bu döngü aynı şekilde devam ederek algin üretimi sağlanmaktadır. Özellikle *Chlorella sp.* ve *Scenedesmus sp.* gibi mikroalgere göre bir sistemdir (Kiran vd. 2014).

Dairesel Havuzlar: Dairesel havuz sisteminde yuvarlak havuzun ortasındaki bir karıştırıcı yardımıyla besin ve mikroalgin karışması sağlanmaktadır. Böyle dairese havuzları yapmak oldukça maliyetlidir. Ayrıca bu havuzu karıştırmak için de gereken enerji miktarı fazladır. Bu nedenle çok tercih edilen bir yöntem değildir (Faried vd. 2017, Suparmaniam vd. 2019).

Kanal Tipi Havuz (Yarış Pisti): Açık sistemler içinde en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu sistemde havuzlar genellikle oval şekindedir ve dairese havuzlarda olduğu gibi içinde çark bulunmaktadır. Bu çark sayesinde besin ve mikroalgin sirkülasyonu sağlanmakta ve böylece mikroalgin çökmesi engellenmektedir (Faried vd. 2017, Javed vd. 2019). Bu havuzların derinliği 0.3 m'dir. Bunun nedeni güneş ışığından daha fazla faydalanmaktır. Kanal tipi havuzlar maliyet açısından daha uygundur. Fakat elde edilen biyokütle fotobiyoreaktörlere göre daha düşüktür (Kiran vd. 2014, Suparmaniam vd. 2019).

Kapalı Sistemler: Açık sistemlerde yaşanan sorunlar nedeniyle mikroalg üretiminde son yıllarda kapalı sistemler önem kazanmıştır. Kapalı sistemler genel olarak fotobiyoreaktörler olarak bilinmektedir (Adeniyi vd. 2018). Fotobiyoreaktörlerde yapay ışık sayesinde kapalı bir ortamda mikroalgin üretimi sağlanmakta ve böylece yapay ışık her yere eşit bir şekilde ulaşarak verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca kapalı sistemlerde CO₂ kaybı da engellenerek mikroalgin fotosentez aktivitesi desteklenmektedir (Faried vd. 2017, Javed vd. 2019). Bu sistemler tek bir mikroalgin veya aksenik suşların herhangi bir kontaminasyona uğramadan gelişmesini sağlamaktadır. Kapalı sistemlerde, açık sistemlerin aksine fazla bir alana ihtiyaç yoktur. Bu sistemleri kurmak yüksek maliyet gerektirdiği için ekonomik anlamda sorunlara neden olmaktadır. Kapalı sistemlerde en çok tercih edilen fotobiyoreaktörler, tübüler ve düz tabaka fotobiyoreaktörlerdir (Suparmaniam vd. 2019, Javed vd. 2019).

Tübüler Fotobiyoreaktör: Tübüler fotobiyoreaktörler, geniş aydınlatıcı yüzey alanından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu reaktörler genellikle cam veya şeffaf plastikten yapılmaktadır (Faried vd. 2017, Fazal vd. 2018). Bunun nedeni güneş ışığından maksimum faydalanarak yüksek biyokütle elde etmektir. Bu sistemde bulunan hava pompaları sayesinde CO₂'nin ve fotosentez sonucunda oluşan O₂'nin kütle transferi gerçekleşmektedir. Ayrıca mikroalgin ve besinlerin sirkülasyonu da sağlanmaktadır (Kiran vd. 2014, Suparmaniam vd. 2019).

Düz Tabaka Fotobiyoreaktör: Kapalı sistemlerde en çok tercih edilen fotobiyoreaktörden biridir. Bu sistemde fotobiyoreaktörler genellikle cam veya polikarbonattan yapılan şeffaf bir tabakadan oluşmaktadır (Faried vd. 2017). Düz tabaka fotobiyoreaktörler yüksek yüzey/hacim oranı nedeniyle, yoğun kültürler ve saf mikroalg gelişimi için sıkça tercih edilmektedir. Tübüler fotobiyoreaktörün aksine daha az çözünmüş O₂ biriktirirler ve daha fazla yüksek verimlilik göstermektedir (Suparmaniam vd. 2019, Javed vd. 2019).

Hibrit Sistem: Hibrit sistem; hem açık havuzlarda hem de fotobiyoreaktörlerde ortaya çıkan sorunları önlemek amacıyla, iki sisteminde kombinasyonu olan bir sistemdir. Bu sistemde ilk önce mikroalgin üretimi sırasında meydana gelebilecek kontaminasyonları önleyebilen fotobiyoreaktörler kullanılmaktadır (Fazal vd. 2018, Correa vd. 2019). Daha sonra mikroalgin lipid içeriğini arttırmak için gerekli koşulların sağlandığı açık havuzlar kullanılarak üretim sağlanmaktadır. Bu sistemin en büyük avantajı ise yüksek verimlilik sağlayarak ve daha az enerji tüketerek mikroalg gelişimini gerçekleştirmektir. Hibrit sistemlerin en büyük dezavantajı ise maliyetinin yüksek olmasıdır (Dickinson vd. 2017, Javed vd. 2019).

2.7 Mikroalglerin Hasat Yöntemleri

Mikroalglerden biyodizel üretiminin ikinci aşaması hasat işlemidir. Mikroalglerden lipid ekstraksiyonu yapabilmek için öncelikle belirli bir miktarda biyokütle elde etmek gerekmektedir. Mikroalgere uygulanan hasat yöntemleri toplam maliyetin neredeyse %20-30'unu oluşturmaktadır. Bu nedenle düşük biyokütle konsantrasyonu maliyetin artmasına neden olmaktadır. Fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal vb. birçok hasat yöntemi vardır. Hangi yöntemin uygulanacağı da türe ve istenilen ürüne göre değişiklik göstermektedir (Sharma ve Singh 2017, Fasaei vd. 2018).

2.7.1 Fiziksel hasat yöntemleri

Sedimentasyon: Bu yöntem esasen yerçekimi kuvvetinin etkisi ile alg hücrelerinin farklı yoğunluktaki ortamlara geçmesidir. Bu yöntem ile algal hücreler bir araya toplanmakta ve toplanma hızı sedimentasyon hızına göre değişmektedir. Fakat bu süre 10 saat veya daha uzun olabilir ve %2-3 oranında düşük bir katı madde elde edilmektedir (Fasaei vd. 2018, Javed vd. 2019). Sedimentasyon hızı sadece mikroalgere göre değişmez, aynı tür mikroalgler arasında bile farklılıklar olabilmektedir. Ayrıca bu yöntemi geniş ölçekte yapabilmek için fazla alanlara ihtiyaç vardır ve maliyet açısından uygun değildir. Bu nedenle çok tercih edilen bir hasat yöntemi değildir (Sharma ve Singh 2017, Roy ve Mohanty 2019).

Santrifüj: Bu yöntem de merkezkaç kuvveti sayesinde mikroalgal biyokütle elde edilmektedir. Santrifüj yöntemi; hücre boyutuna, santrifüj süresine, hücre ile kültür ortamı arasındaki yoğunluk farkı vb. birçok parametreye bağlıdır. Hasat işleminde çok çeşitli santrifüjler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları delikli sepet santrifüj, deliksiz sepet santrifüj, hidrosiklon vb. türlerdir (Singh ve Patidar 2018, Suparmaniam vd.

2019). Santrifüj yöntemi, mikroalglerin hasat edilmesinde kullanılan etkili ve kısa sürede sonuç veren bir yöntemdir. Fakat merkezkaç kuvvetinin fazla olması bazı durumlarda mikrobiyel hücre yapısına zarar verebilir. Ayrıca büyük ölçekli kullanım için uygun değildir (Barros vd. 2015, Javed vd. 2019).

Flotasyon: Bu yöntem temel olarak yüzdürme ile askıda kalan mikroalg hücrelerini kabarcık vb. yardımıyla sıvı bir yüzeyin üzerine taşımayı amaçlamaktadır. Bu yöntemde esas olan mikroalg yoğunluğunun düşük olmasıdır. Böylece sedimentasyon yöntemine kıyasla daha hızlı bir şekilde biyokütle elde edilebilmektedir. Özellikle düşük yoğunluğa sahip *Microcystis* ve *Spirulina* gibi bazı siyanobakteriler için uygun bir yöntemdir (Suparmaniam vd. 2019, Roy ve Mohanty 2019). Bu yöntemde verimi arttırmak amacıyla flokülantlar kullanılabilir. Flotasyon yöntemi, başlangıç maliyetinin ucuz olması ve geniş ölçekte hasat yapabilme avantajlarından dolayı çoğunlukla tercih edilmektedir (Dickinson vd. 2017, Singh ve Patidar 2018).

Filtrasyon: Bu yöntemde yarı geçirgen bir zar sayesinde katı olan kısım sıvıdan ayrılmakta ve böylece istediğimiz biyokütle elde edilmektedir. Filtrasyon yöntemi yaygın olarak kullanılan hasat yöntemlerinden birisidir ve vakumlu filtrasyon, mikrofiltrasyon, ultra filtrasyon vb. birçok çeşidi mevcuttur (Fasaei vd. 2018, Suparmaniam vd. 2019). Bu yöntem basit ve maliyet gerektirmeyen bir yöntem olduğu için tercih edilmektedir. Fakat büyük ölçekli üretim de maliyet artmakta ve özellikle vakumlu filtrasyon yönteminde yüksek enerji tüketimi oluşmaktadır (Barros vd. 2015, Singh ve Patidar 2018).

2.7.2 Kimyasal hasat yöntemleri

Flokülasyon: Bu yöntem mikroalg hücrelerin boyutlarını arttırmak amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Yöntem, mikroalg hücre yüzeyi negatif olduğu için çok değerlikli katyonlar eklenerek mikroalglerin bir yerde toplanmasını hedeflemektedir. Toplanan mikroalg hücreleri ise sedimentasyon işlemi ile tekrar ortamdan ayrılmaktadır (Fasaei vd. 2018, Javed vd. 2019). Eklenen flokülantlar inorganik ve organik olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. İnorganik flokülantlar dediğimiz alüminyum sülfat, demir klorür gibi çok değerlikli katyonlardır. Bu maddeler mikroalg hücrelerin sahip olduğu negatif yükleri nötralize eder veya azaltır. İnorganik flokülantların en büyük dezavantajı pH'ya karşı hassasiyet göstermeleri ve kirlenmeye neden olmalarıdır (Sharma ve Singh 2017, Singh ve Patidar 2018). Diğer bir grup olan organik flokülantlar ise doğal veya sentetik olarak üretilmektedir. Bu gruptaki maddelerin inorganik flokülantlardan avantajı ise düşük dozlarda bile oldukça etkili olabilmesidir. Sonuç olarak flokülasyon yöntemi farklı mikroalg türlerinin geniş ölçekte hasadını yapabilmek için uygun bir yöntemdir (Suparmaniam vd. 2019, Javed vd. 2019).

2.7.3 Biyolojik hasat yöntemleri

Otoflokülasyon: Bu yöntemde mikroalg hücreleri herhangi bir flokülant eklenmeden doğal yolla topaklanma oluşturmaktadır. Bunun nedeni; pH, nitrojen, besin içeriğinin değişmesi, çözünmüş oksijen miktarı gibi çevresel koşullara tepki olarak mikroalg hücrelerinin floklaşmasıdır (Barros vd. 2015, Suparmaniam vd. 2019). Bu yöntem kimyasal içermediği için çevre dostu bir yöntemdir ve diğer hasat yöntemleri arasında maliyeti en az olan yöntemdir. Fakat yöntem birkaç mikroalg türü için idealdir. Bundan dolayı büyük ölçekli hasat için güvenilir bir yöntem değildir (Singh ve Patidar 2018, Roy ve Mohanty 2019).

Biyoflokülasyon: Bu yöntem temel olarak mikroalg hücrelerinin başka mikroorganizmalarla birlikte floktan oluşturulmasıdır. Özellikle bakteri veya mantar gibi organizmalar ile mikroalgler bir araya gelerek doğal yolla topaklanma oluşturur. Bu yöntemde mikroalglerin topaklanmasını sağlayan durum, başka bir organizmadan elde edilen hücre dışı polimer (EPS) ve proteinlerdir (Singh ve Patidar 2018, Suparmaniam vd. 2019). Biyoflokülasyon yönteminin verimi üretilen EPS miktarına, mikroalg ve polimer arasındaki ilişkiye vb. birçok parametreye bağlıdır. Bu yöntem herhangi bir kimyasal madde içermediği için çevre dostu bir yöntemdir. Fakat büyük ölçekli mikroalg hasadı için uygun bir yöntem değildir. Ayrıca flokülasyonu sağlayan organizmaları geliştirmek için yüksek oranda karbon kaynağı gerekmektedir (Roy ve Mohanty 2019, Javed vd. 2019).

Sonuç olarak birçok farklı hasat yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemlerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları vardır. Çalışmak istediğimiz organizmanın morfolojisine, özelliklerine bakarak ve elde etmek istediğimiz ürüne göre en uygun olan hasat yöntemi seçilmelidir. Uygulanacak yöntemin ekonomik olması için farklı yöntemlerle birlikte kombinasyon da yapılabilmektedir. Mikroalgler hasat edildikten sonra biyodizel eldesi için lipid ekstraksiyonu yapılmalıdır (Barros vd. 2015, Suparmaniam vd. 2019).

2.8 Mikroalglerden Lipid Ekstraksiyonu

Mikroalgler; protein, lipid veya karbonhidrat gibi birçok bileşik içermektedir. Bu bileşiklerin arasında lipidler büyük bir öneme sahiptir. Mikroalglerden elde edilen lipidler biyodizel üretiminde kullanılmakta ve yüksek lipid içeriği biyodizelin kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle uygun ekstraksiyon yöntemini kullanmak gerekmektedir (Kumar vd. 2017, Karmakar ve Halder 2019). Günümüzde fiziksel veya kimyasal birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en bilindikleri Soxhlet

yöntemi, Bligh & Dyer yöntemi, Süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) vb. yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında Bligh & Dyer (1959) yöntemi, mikroalgal biyokütleden lipid ekstraksiyonunda en yaygın kullanılan yöntemdir. Fakat son zamanlarda süperkritik yöntem de yaygın olarak kullanılmaktadır (Dickinson vd. 2017, Deshmukh vd. 2019).

Bligh & Dyer yöntemi: Kuru ve ıslak mikroalgal biyokütleyle uygulanarak yaklaşık %95 lipid eldesini sağlayan bir yöntemdir ve lipid ekstraksiyonu için yaygın olarak tercih edilmektedir (Pragya vd. 2013). Bu yöntem de çözücü olarak kloroform-metanol ve su kullanılmaktadır. Bu çözücülerin ve suyun oranı kullandığımız biyokütleyle bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntemde çözücü ve su ile mikroalgal kütle homojenize olduktan sonra, lipidler damıtma yoluyla veya kurutularak elde edilmektedir. Bu yöntemin dezavantajı, kullanılan çözücülerin toksik madde olmasıdır. Fakat yüksek verimlilik göstermesi ve hızlı bir lipid ekstraksiyonu gerçekleştiği için sıkça tercih edilmektedir (Kumar vd. 2017, Fazal vd. 2018).

Süperkritik yöntem: Bu yöntem, geleneksel lipid ekstraksiyon yöntemlerine alternatif bir yöntemdir. Yöntemde, katalizör olmadan yüksek sıcaklık ve basınç altında yağ asidi metil esterleri oluşmaktadır. Böylelikle istenilen ham maddeki yağ kolaylıkla elde edilebilmektedir. Katalizör kullanımı olmadığı için maliyet açısından daha uygun bir yöntemdir. Süperkritik yöntem; kullanılan sıcaklık, reaksiyon süresi, alkol:yağ oranı gibi birçok parametreye bağlıdır (Zhou vd. 2017, Son vd. 2018).

2.9 Mikroalglerden Biyodizel Üretimi

Mikroalglerden biyodizel üretiminde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler genellikle kullandığımız ham maddeye göre değişmektedir. Bazı yöntemler gıda olarak tüketilen ham maddeler için uygun olurken, bazı yöntemler de gıda olarak tüketilmeyen bitkisel ham maddelerin kullanımında uygundur. Biyodizel üretiminde kullanılan yöntemler temel olarak; mikro emülsiyon, piroliz, seyreltme ve transesterifikasyon yöntemi olmak üzere 4'e ayrılmaktadır (Ghazali vd. 2015, Mahmudul vd. 2017).

2.9.1 Mikro-emülsiyon

Bu yöntem daha çok bitkisel veya hayvansal ham maddeler için kullanılmaktadır. Bu yöntemde amaç yüksek viskoziteye sahip bitkisel kaynakların, alkol veya yüzey aktif maddeleri ile çözünmesini sağlamaktır. Mikro-emülsiyonlar yağ fazı, su fazı ve yüzey aktif cismin olduğu 3 farklı kısımdan oluşmaktadır. Alkol olarak genellikle etanol ve metanol kullanılmaktadır. Bu yöntem sonucunda oluşan yakıtlar "hibrit yakıt" olarak da isimlendirilmektedir (Ghazali vd. 2015, Rezanian vd. 2019).

2.9.2 Seyreltme

Bitkisel yağların motorda doğrudan kullanımını bazı sorunlara yol açtığı için bitkisel yağlar ile dizel seyreltilerek kullanılmaktadır. Seyreltme sonucunda biyodizelin viskozitesi düşmekte ve böylece motor performansı artmaktadır. Bu yöntem biyodizel eldesinde kullanılan eski ve basit bir yöntemdir (Mahmudul vd. 2017, Noor vd. 2018).

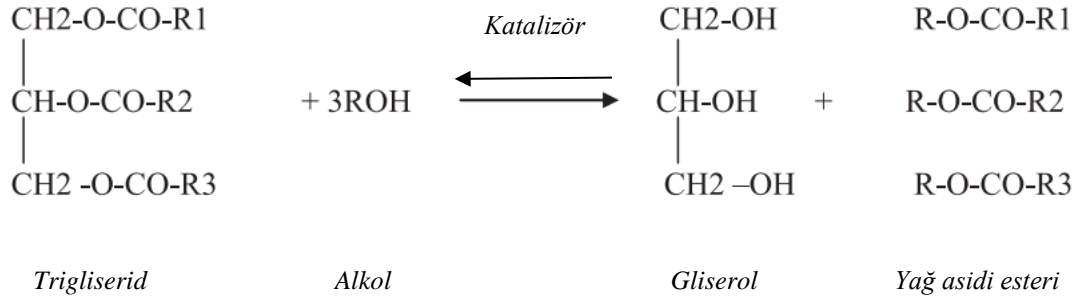
2.9.3 Piroliz

Bu yöntem temel olarak herhangi bir maddenin gaz yoğunlaşmasıyla belirli bir sıcaklığa ulaştığında termal olarak ayrışmasıdır. Bu yöntemin amacı; özellikle O₂'siz ortamda bitkisel veya hayvansal yağların termal yöntemlerle biyodizel dönüşmesini sağlamaktır. Sadece bitkisel ve hayvansal yağlar için değil aynı zamanda gıda olarak tüketilmeyen ham maddelere de uygulanmaktadır. Piroliz yöntemi ucuz ve başka yöntemlere kıyasla kirliliğin az olduğu bir yöntemdir (Ghazali vd. 2015, Suganya vd. 2016).

2.9.4 Transesterifikasyon

Transesterifikasyon biyodizel üretiminde en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntem Şekil 2.1'de görüldüğü gibi alkol varlığında trigliseridlerin asit veya baz bir katalizör ile birlikte reaksiyona girerek ester ve gliserolün meydana geldiği kimyasal bir reaksiyondur (Dickinson vd. 2017, Noor vd. 2018). Bu yöntemde katalizör kullanılmasının nedeni reaksiyon süresini azaltmaktır. Kullanılan katalizör çeşidine göre temel olarak asidik, alkali ve enzimatik olarak ayrılmaktadır. Transesterifikasyon yönteminin verimi; reaksiyon süresi, kullanılan katalizörün türü, alkol- yağ oranı gibi birçok parametreye bağlıdır (Suganya vd. 2016, Amin 2019).

İn situ transesterifikasyon yöntemi: Yöntem, hem lipid ekstraksiyonunun hem de transesterifikasyon reaksiyonunun tek adımda gerçekleştiği bir yöntemdir. Bu yöntemde lipid ekstraksiyonuna gerek kalmaz ve böylece geleneksel transesterifikasyon yöntemine göre daha hızlı ve maliyeti daha düşüktür. Ayrıca elde edilen biyodizel verimi geleneksel transesterifikasyonda elde edilen verime göre daha yüksektir (Adeniyi vd. 2018, Patle vd. 2020).



Şekil 2.1 Transesterifikasyon reaksiyonunun denklemini (Fazal vd. 2018)

Asidik katalizörlü transesterifikasyon: Bu yöntemde genellikle H_2SO_4 , HCl , organik sülfonik asitler ($\text{R-SO}_3\text{H}$) vb. katalizörler kullanılmaktadır. Asidik katalizör kullanıldığı için reaksiyon süresi alkali katalizöre göre daha uzundur. Ayrıca asidik katalizörün kullanımı aşınmaya neden olmaktadır ve bu durum ek işlemler gerektirdiği için maliyeti yükseltmektedir (Gardy vd. 2019, Amin 2019).

Alkali katalizörlü transesterifikasyon: Bu yöntemde genellikle KOH , NaOH vb. katalizörler kullanılmaktadır. Asidik transesterifikasyona göre daha etkili bir yöntem olduğu için daha fazla tercih edilmektedir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, bazı durumlarda FFA içeriğinin yüksek olması gliserol miktarını artırarak sabunlaşmaya neden olmaktadır. Bu durum biyodizel verimini olumsuz yönde etkilemektedir (Razzak vd. 2013, Amin 2019).

Enzimatik transesterifikasyon: Enzimin katalizör olarak kullanıldığı transesterifikasyon yöntemidir ve çoğunlukla lipaz enzimi ile gerçekleştirilmektedir. Enzimatik transesterifikasyon sürecinde sabunlaşma durumu meydana gelmediği için daha avantajlı bir yöntemdir. Ayrıca FFA içeriğinin yüksek olduğu ham maddelere uygulanmaktadır. Fakat bu yöntem, enzimin yüksek maliyetli olmasından dolayı yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir (Razzak vd. 2013, Gardy vd. 2019).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma ve gelişim koşulları

Yapılan tez çalışmasında kullanılan *C. vulgaris* Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Mikroalg kültürasyonu için, önceden geliştirilmiş 10 mL mikroalg, 250 mL'lik erlenlerin içerisinde 100 mL'lik hacimli azotlu BG-11 ortamına (Rippka 1988) inokule edilmiştir.

BG-11 Besiyeri Bileşimi

Bileşen	Miktar (g/L)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1.25
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.45
Na ₂ CO ₃	0.33
Sitrik asit.....	0.1
Ferrik amonyum sitrat.....	0.1
Na ₂ EDTA.....	0.016
Eser element A ₅ karışımı.....	100 mL/L

Eser element A₅ karışımı

Bileşen	Miktar (g/L)
H ₃ BO ₄	0.286
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0.181
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0.022
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0.036
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0.008
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O.....	0.005
dH ₂ O.....	40 mL/L

Hazırlanan 250 mL'lik erlenler, 30°C ve 2400 lux ışık altında 14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sadece BG-11 içeren fotoototrofik gelişim koşullarında inkübasyon devamlı ışık varlığında gerçekleşmiştir. Heterotrofik gelişim koşullarında BG-11 ortamına, 0.5 g/L glukoz ve 0.5 g/L havuç posası şekeri eklenmiş ve inkübasyon karanlıkta gerçekleşmiştir. Fotoheterotrofik gelişim koşullarında BG-11 ortamına, 0.5 g/L glukoz ve 0.5 g/L havuç posası şekeri eklenmiş ve inkübasyon devamlı ışık varlığında gerçekleşmiştir.

3.1.2 Zirai atık

Yapılan tez çalışmasında kullanılan havuç posası BELSO A.Ş'den alınmış ve planlanan deneylerde kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.1.3 Havuç posası şekeri eklenmesi: Yapılan tez çalışmasında fotoheterotrofik gelişim koşullarına, glukoz miktarına denk gelen farklı konsantrasyonlarda (0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 g/L) havuç posası şekeri eklenmiştir.

3.1.4 Azot kaynağı eklenmesi: Yapılan tez çalışmasında azot sınırlamasının lipid birikimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, optimum konsantrasyonda havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarına farklı konsantrasyonlarda (0, 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 g/L) NaNO₃ eklenmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Zirai atığın ön işleme

Havuç posası 80°C etüvde (Nüve FN400, Turkey) kurutulmuş ve ardından öğütülmüştür. Öğütüldükten sonra içerisindeki şekerin mikroalgin kullanabileceği forma dönüştürülmesi için ön işleme tabi tutulmuştur (Broxterman vd. 2017). Seyreltik asit ön işleminde, 100 g/L kurutulmuş havuç posasına %1 H₂SO₄ (v/v) eklenerek 121°C’de 15 dk otoklavlanmış (ALP, Germany) ve otoklavdan çıktıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdı ile süzme işlemi yapılarak stok halde 4°C’de saklanmıştır.

3.3 Analitik Yöntemler

3.3.1 Mikroalgal gelişimin belirlenmesi

Yapılan tez deneyleri kapsamında farklı gelişim koşullarında 14 günlük inkübasyon süresi boyunca her 24 saatte bir alınan örnekler 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Shimadzu UV 2001, Japan) olarak ölçülmüştür (Church vd. 2017).

Daha sonra kuru ve yaş biyokütle standartına göre gerekli hesaplamalar yapılarak gram cinsinden belirlenmiştir.

3.3.2 Havuç posasındaki şeker tayini

Havuç posasındaki indirgeyici şeker miktarını belirlemek amacıyla 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS) metodu kullanılmıştır. Bu yöntem temel olarak indirgeyici şekerlerin varlığını belirlemek için kullanılır. Yöntemde 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS), indirgeyici şekerle reaksiyona girerek turuncu renkli 3-amino, 5-nitrosalisilik aside dönüşür. Gerçekleşen reaksiyonda, sıcaklık ve koyduğumuz örneğin yoğunluğuna bağlı olarak renk değişimi meydana getirir. Oluşan bu renk değişimine göre 540 nm dalga boyunda spektrometrik ölçümler yapılarak koyduğumuz örnekteki şeker miktarı belirlenmektedir (Miller 1959).

3.3.3 Mikroalg hücrelerinden lipid ekstraksiyonu

Yapılan tez çalışmasında lipid ekstraksiyonu için Bligh & Dyer (1959) yöntemi uygulanmıştır. Başlangıçta mikroalgal biyokütle 6000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj (Hettich EBA12, Germany) edilmiştir. Hasat edilen yaş biyokütle 80°C etüvde kurutulmuş ve kuru biyokütleler 2:1 oranında kloroform:metanol (v/v) ile muamele edilerek 1 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde (GFL 3005, Germany) reaksiyona bırakılmıştır (Zhu vd. 2008). Çalkalama sonrası faz ayrımını görebilmek için bir miktar su eklenmiş ve sonra 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilerek istenilen lipid tabakası elde edilmiştir. Ardından 1 gece etüvde 70°C'de kurumaya bırakılarak solventin uçması sağlanmış ve önceden darası alınan falkon tekrar ölçülerek lipid miktarı belirlenmiştir.

3.3.4 Mikrobiyel lipidlerin transesterifikasyonu

Yapılan tez çalışmasında geleneksel, *in situ* ve süperkritik olmak üzere farklı transesterifikasyon yaklaşımları uygulanmıştır.

Geleneksel transesterifikasyon: Yapılan tez çalışmasında 0.5, 1.0 ve 2.0 g/L kuru biyokütlelerin Bligh & Dyer (1959) yöntemine göre lipid içeriği belirlenmiş ve elde edilen mikrobiyel lipidlere NaOH-H₂SO₄ katalizörleri (%1, %2 ve %3) ve hekzan eklendikten sonra 30 dk boyunca çalkalamalı inkübatörde reaksiyona bırakılmıştır. Daha sonra 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra lipidlerin bulunduğu üst fazdan 1 mL alınıp ayrı bir ependorfa aktarılmış ve böylece transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

***In situ* transesterifikasyon:** Yapılan tez çalışmasında 0.5, 1.0 ve 2.0 g/L kuru biyokütleler herhangi bir lipid ekstraksiyon işlemine tabii tutulmadan NaOH katalizörü (%1, %2 ve %3) ve hekzan eklendikten sonra 30 dk boyunca çalkalamalı inkübatörde reaksiyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir örnekten 1 mL alınıp 15'lik falkon tüpüne aktarılıp üzerine 2 mL distile su eklenmiş ve ardından 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra lipidlerin bulunduğu üst fazdan 1 mL alınıp ayrı bir ependorfa aktarılmış ve böylece transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Sung ve Han 2016).

Süperkritik transesterifikasyon: Yapılan tez çalışmasında 4 g/L yaş biyokütle kullanılarak; reaksiyon sıcaklığı 240-250°C, reaksiyon süresi 10-20 dk, 80-100 bar basınç ve biyokütle:metanol oranı 1:4-1:12 olacak şekilde farklı parametreler ile çalışılmıştır (Patil vd. 2011). Daha sonra elde edilen mikrobiyel lipidler, katalizör

kullanmadan yüksek sıcaklık ve basınç altında transesterifikasyon reaksiyonuna tabii tutulmuştur.

3.3.5 Mikrobiyel lipidlerin FAME içeriğinin belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında farklı yaklaşımlar sonucu elde edilen mikrobiyel lipidlerin FAME kompozisyonunu belirlemek amacıyla her bir örnekten 1 µl alınıp GC-2010 Gaz Kromatografisi (Shimadzu, Japan) ile ölçüm yapılmıştır. Gaz Kromatografi cihazında analizler için; alev iyonizasyon dedektör (FID) 240°C, kolon TR-CN100, 60 m x 0.25 mm x 0.20 mm (Teknokroma) ve taşıyıcı gaz (N₂) kullanılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen yağ asidi pikleri, karışık yağ asidi metil esteri kromatogramına göre belirlenmiştir (37 Comp. FAME Mix 10 mg/mL in CH₂Cl₂; Supelco, USA).

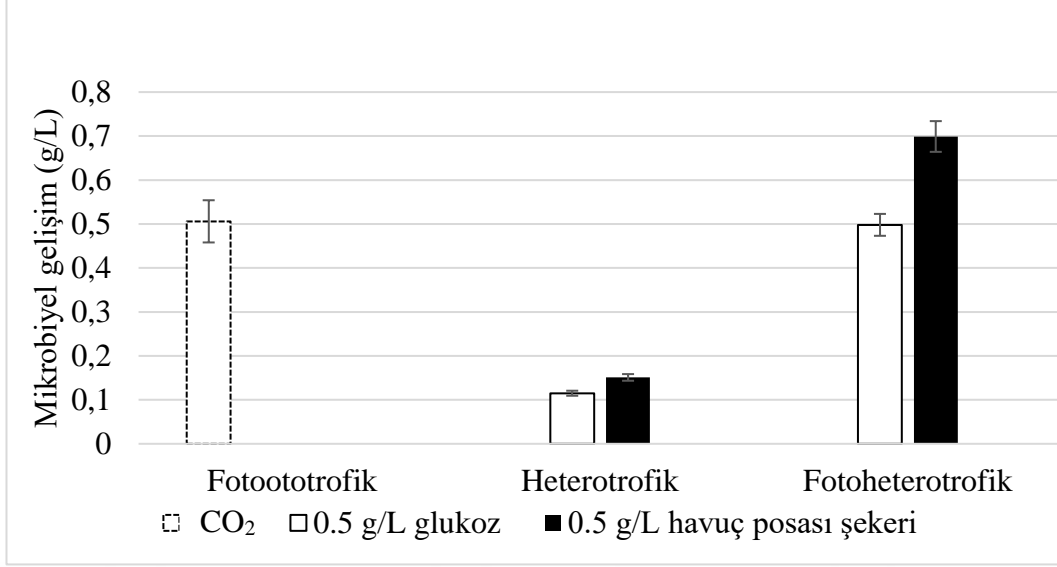
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan tez çalışmasında, *C.vulgaris*'in en yüksek kapasite ile lipid biriktirdiği koşullar optimize edilmiştir. Daha sonra ekstrakte edilen lipidler, farklı transesterifikasyon yaklaşımlarına tabii tutulmuş ve mikrobiyel lipidlerin yağ asidi metil esterleri Gaz Kromatografisinde analiz edilmiştir.

4.1 Farklı Gelişim Koşullarında *C. vulgaris*'in Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Biriktirme Kapasitesinin Araştırılması

4.1.1 Farklı gelişim koşullarının mikrobiyel gelişim üzerine etkisinin belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında Şekil 4.1'de görüldüğü gibi fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.506 g/L, 0.5 g/L glukoz içeren heterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.115 g/L, 0.5 g/L havuç posası şekeri içeren heterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.151 g/L, 0.5 g/L glukoz içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.498 g/L ve 0.5 g/L havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.699 g/L olarak belirlenmiştir. Bu deneyin sonucuna göre maksimum mikrobiyel gelişim 0.699 g/L ile 0.5 g/L havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiş ve sonraki deneyler bu gelişim koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.



2400 lux ışık, 30°C, pH:7, inkübasyon süresi: 14 gün

Şekil 4.1 Farklı gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim

4.1.2 Farklı gelişim koşullarının lipid birikimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında izelge 4.1’de görüldüğü gibi fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %19.3, 0.5 g/L glukoz içeren heterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %12.5, 0.5 g/L havuç posası Şekeri içeren heterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %11.1, 0.5 g/L glukoz içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %33.6 ve 0.5 g/L havuç posası Şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %40.0 olarak belirlenmiştir. Bu deneyin sonucuna göre maksimum lipid birikimi %40.0 ile 0.5 g/L havuç posası Şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiş ve sonraki deneyler bu gelişim koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.

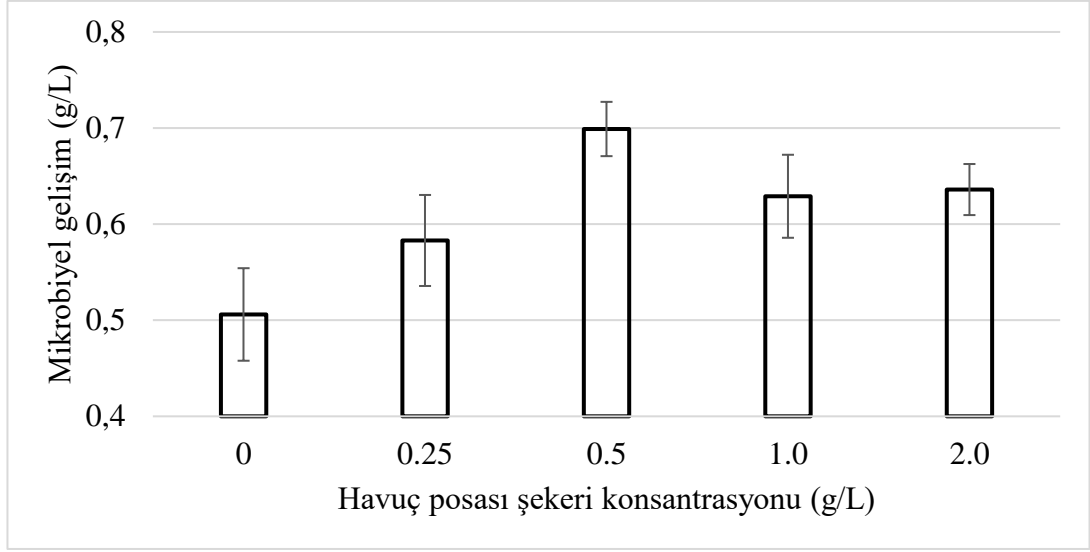
Çizelge 4.1 Farklı gelişim koşullarında lipid birikimi

Gelişim ortamı	Karbon kaynağı	Lipid birikimi (%)
Fotoototrofik	CO ₂	19.3 ±1.00
Heterotrofik	0.5 g/L glukoz	12.5 ±1.48
	0.5 g/L havuç posası şekeri	11.1 ±0.49
Fotoheterotrofik	0.5 g/L glukoz	33.6 ±1.55
	0.5 g/L havuç posası şekeri	40.0 ±1.20

2400 lux ışık, 30°C, pH:7, inkübasyon süresi: 14 gün

4.1.3 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekerinin mikrobiyel gelişim üzerine etkisinin belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında Şekil 4.2’de görüldüğü gibi kontrol grubu olan ve havuç posası şekeri içermeyen fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.506 g/L, 0.25 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.583 g/L, 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.699 g/L, 1.0 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.629 g/L ve 2.0 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.636 g/L olarak belirlenmiştir. Bu deneyin sonucuna göre maksimum mikrobiyel gelişim 0.699 g/L ile 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiş ve sonraki deneyler bu gelişim koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.



2400 lux ışık, 30°C, pH:7, 1.5 NaNO₃, inkübasyon süresi: 14 gün

Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim

4.1.4 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekerinin lipid birikimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi kontrol grubu olan ve havuç posası şekeri içermeyen fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %19.3, 0.25 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %25.6, 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %40.0, 1.0 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %29.9 ve 2.0 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %29.5 olarak belirlenmiştir. Bu deneyin sonucuna göre maksimum lipid birikimi %40.0 ile 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiş ve sonraki deneyler bu gelişim koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi

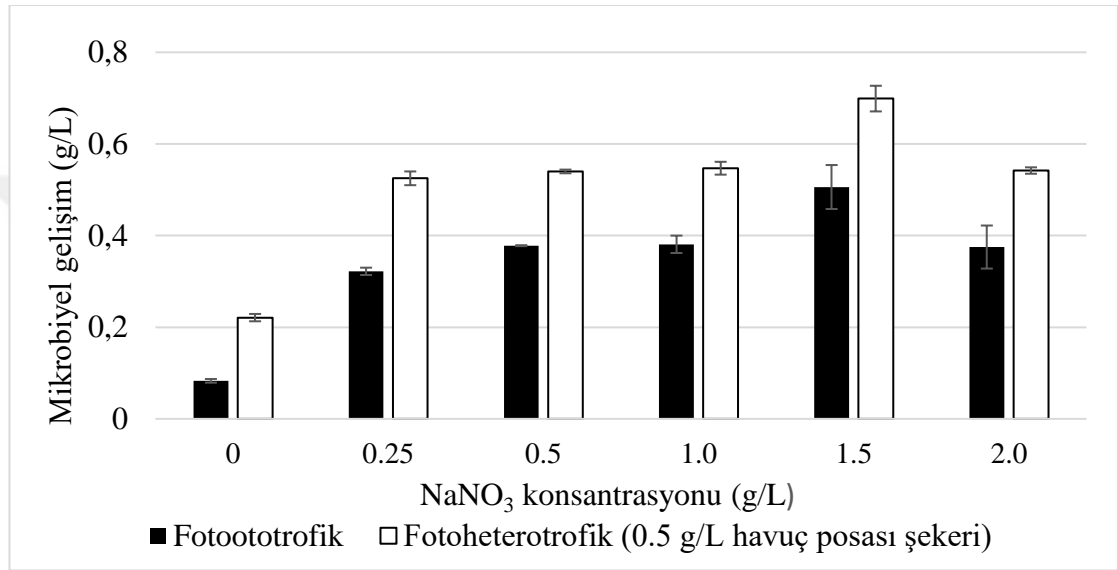
Havuç posası şekeri konsantrasyonu (g/L)	Lipid birikimi (%)
0	19.3 ±1.00
0.25	25.6 ±2.00
0.5	40.0 ±1.20
1.0	29.9 ±2.00
2.0	29.5 ±1.00

2400 lux ışık, 30°C, pH:7, 1.5 NaNO₃, inkübasyon süresi: 14 gün

4.1.5 Farklı konsantrasyonlarda NaNO₃'ün mikrobiyel gelişim üzerine etkisinin belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında Şekil 4.3'te görüldüğü gibi NaNO₃ içermeyen fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.083 g/L, 0.25 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.322 g/L, 0.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.378 g/L, 1.0 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.381 g/L, 1.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.506 g/L ve 2.0 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoototrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.375 g/L olarak belirlenmiştir. Fotoheterotrofik gelişim koşullarında ise Şekil 4.3'te görüldüğü gibi NaNO₃ içermeyen ortamda mikrobiyel gelişim 0.221 g/L, 0.25 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.525 g/L, 0.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.540 g/L, 1.0 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.547 g/L, 1.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.699 g/L ve 2.0 g/L

konsantrasyon NaNO_3 içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim 0.542 g/L olarak belirlenmiştir. Bu deneylerin sonucuna göre maksimum mikrobiyel gelişim 0.699 g/L ile 1.5 g/L konsantrasyon NaNO_3 ve 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiş ve sonraki deneyler bu gelişim koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.



2400 lux ışık, 30°C, pH:7, inkübasyon süresi: 10 gün

Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda NaNO_3 içeren fotoototrofik ve fotoheterotrofik gelişim koşullarında mikrobiyel gelişim

4.1.6 Farklı konsantrasyonlarda NaNO_3 'ün lipid birikimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi NaNO_3 içermeyen fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %10.0, 0.25 g/L konsantrasyon NaNO_3 içeren fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %39.1, 0.5 g/L konsantrasyon NaNO_3 içeren fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %36.7, 1.0 g/L konsantrasyon NaNO_3 içeren fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %28.4, 1.5 g/L konsantrasyon NaNO_3 içeren fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %19.3 ve

2.0 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoototrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %19.5 olarak belirlenmiştir. Fotoheterotrofik gelişim koşullarında ise Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi NaNO₃ içermeyen ortamda lipid birikimi %28.8, 0.25 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %44.6, 0.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %44.8, 1.0 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %41.7, 1.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %40.0 ve 2.0 g/L konsantrasyon NaNO₃ içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi %37.15 olarak belirlenmiştir. Bu deneyin sonucuna göre maksimum lipid birikimi %44.8 ile 0.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ ve 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiş ve sonraki deneyler bu gelişim koşullarına göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda NaNO₃ içeren fotoototrofik ve fotoheterotrofik gelişim koşullarında lipid birikimi

NaNO ₃ konsantrasyonu (g/L)	Lipid birikimi (%)	
	Fotoheterotrofik gelişim koşulları (0.5 g/L havuç posası şekeri)	Fotoototrofik gelişim koşulları
0	28.8 ±1.55	10.0 ±0.003
0.25	44.6 ±3.60	39.1 ±0.02
0.5	44.8 ±3.95	36.7 ±0.001
1.0	41.7 ±3.53	28.4 ±0.032
1.5	40.0 ±1.20	19.3 ±1.00
2.0	37.15 ±4.17	19.5 ±0.034

2400 lux ışık, 30°C, pH:7, inkübasyon süresi: 10 gün

4.2 Mikrobiyel Lipidlerin Transesterifikasyonu

Yapılan tez çalışmasında biyokütle konsantrasyonu, katalizör çeşidi, katalizör konsantrasyonu ve reaksiyon süresinin etkisi incelenmiştir. Bu bağlamda ekstrakte edilen lipidler; geleneksel, *in situ* ve süperkritik olmak üzere farklı transesterifikasyon yaklaşımlarına tabii tutulmuş ve mikrobiyel lipidlerin yağ asidi metil esterleri Gaz Kromatografisinde analiz edilmiştir.

4.2.1 Geleneksel transesterifikasyon yaklaşımı

Yapılan tez çalışmasında 30 dk boyunca NaOH katalizörü kullanımı sonucu elde edilen mikrobiyel lipidlerin içerisindeki 16 ve 18 karbonlu olan yağ asitlerinin toplam miktarı Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. Yapılan deneylerde her bir biyokütle için en yüksek FAME yüzdesinin elde edildiği alkali katalizör konsantrasyonu belirlendikten sonra asidik katalizör denenmiştir. Deney sonucuna göre en yüksek FAME eldesi; 1.0 g/L kuru biyokütleyle uygulanan %2 NaOH konsantrasyonunda %93.3 olarak belirlenmiştir. Asidik katalizörün etkisini belirlemek amacıyla; 30 dk boyunca 0.5 g/L'ye %1 H₂SO₄, 1.0 g/L'ye %2 H₂SO₄, 2.0 g/L'ye %3 H₂SO₄ uygulanmış ve sırasıyla %17.6, %79.8 ve %78.7 oranında FAME elde edilmiştir.

Çizelge 4.4 Geleneksel transesterifikasyon yönteminde NaOH katalizörünün kullanılmasıyla elde edilen FAME (C16+C18)

Kuru biyokütle konsantrasyonu (g/L)	NaOH konsantrasyonu (%)	FAME (C16+C18) (%)
0.5	1	84.6
	2	61.1
	3	43.1
1.0	1	60.3
	2	93.3
	3	81.9
2.0	1	70.3
	2	68.7
	3	87.6

Yağ:alkol oranı 1:5, 30°C

4.2.2 *In situ* transesterifikasyon yaklaşımı

Yapılan tez çalışmasında önceki deneylerde alkali katalizör daha etkili olduğu için 30 dk boyunca NaOH katalizörü uygulanmıştır. Elde edilen mikrobiyel lipidlerin içerisindeki 16 ve 18 karbonlu olan yağ asitlerinin toplam miktarı Çizelge 4.5'te gösterilmektedir. Deney sonucuna göre en yüksek FAME eldesi; 1.0 g/L kuru biyokütleyle uygulanan %2 NaOH konsantrasyonunda %95.1 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 *İn situ* transesterifikasyon yönteminde NaOH katalizörünün kullanılmasıyla elde edilen FAME (C16+C18)

Kuru biyokütle konsantrasyonu (g/L)	NaOH konsantrasyonu (%)	FAME (C16+C18) (%)
0.5	1	92.8
	2	91.5
	3	89.5
1.0	1	83.7
	2	95.1
	3	93.1
2.0	1	94.8
	2	93.7
	3	93.0

Yağ:alkol oranı 1:5, 30°C

4.2.3 Süperkritik transesterifikasyon yaklaşımı

Yapılan tez çalışmasında süperkritik koşullarda elde edilen mikrobiyel lipidlerin içerisindeki 16 ve 18 karbonlu olan yağ asitlerinin toplam miktarı Çizelge 4.6'da gösterilmektedir. Deney sonucuna göre en yüksek FAME eldesi; biyokütle:metanol oranı 1:12 ve reaksiyon süresi 20 dk'da %75.7 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 Süperkritik transesterifikasyon yönteminde elde edilen FAME (C16+C18)

Biyokütle:metanol (w/v)	Reaksiyon süresi (dk)	FAME (C16+C18) (%)
1:4	10	39.3
1:12	20	75.7

4 g/L yaş biyokütle, yağ:alkol oranı 1:5, 250°C, 82 bar

4.3 Farklı Transesterifikasyon Yaklaşımlarının C16+C18 FAME Dağılımına Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında uygulanan farklı transesterifikasyon yaklaşımları sonucunda elde edilen C16 ve C18 karbonlu yağ asitlerinin yüzdesi Çizelge 4.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7 Farklı transesterifikasyon yaklaşımları sonucunda elde edilen yağ asitlerindeki C16+C18 oranları

FAME	FAME Dağılımı		
	(%)		
	Geleneksel transesterifikasyon	<i>İn situ</i> transesterifikasyon	Süperkritik transesterifikasyon
C16:0 (Palmitik asit)	15.07	8.34	11.07
C16:1 (Palmiteloik asit)	6.89	5.00	7.94
C18:0 (Stearik asit)	4.07	1.81	1.92
C18:1 (Cis oleik asit)	18.15	15.25	19.71
C18:2 (Cis linoleik asit)	10.26	10.70	11.16
C18:3 (Gama linolenik asit)	38.84	54.00	23.93
Toplam (C16+C18)	93.3	95.1	75.73

4.4 Biodiesel Analyzer® Yazılımına Göre Yakıt Özellikleri

Yapılan tez çalışmasında elde edilen mikrobiyel lipidlerdeki FAME bileşimi; yoğunluk (g/cm^3), viskozite (mm^2/s), uzun zincirli doymuş faktör (LCSF), soğuk filtre tıkanma noktası (CFPP, $^{\circ}\text{C}$), yüksek ısıtma değeri (HHV, MJ / kg), bulutlanma noktası (CP, $^{\circ}\text{C}$), akma noktası (PP, $^{\circ}\text{C}$) gibi önemli yakıt özellikleri bakımından Biodiesel Analyzer® yazılımı ile test edilmiştir (Talebi vd. 2014). Bu yazılıma göre, kinematik viskozite $3.001 \text{ mm}^2/\text{s}$ bulunmuştur ve ABD Standartı ASTM D6751'e göre $1.9\text{-}6.0 \text{ mm}^2/\text{s}$ arasında olması gerekmektedir (Silitonga vd. 2017). Yoğunluk 0.857 g/cm^3 olarak bulunmuştur ve EN Standartına göre bu değerin $0.86\text{-}0.90 \text{ g/cm}^3$ arasında olması gerekmektedir (Mathimani vd. 2017). Yapılan analizlere göre; CFPP, LCSF, CP ve PP değerleri sırasıyla -11.023°C , 1.736 , -0.614°C ve -7.487°C olarak bulunmuştur. EN Standartına göre, CFPP değerinin $\leq 0^{\circ}\text{C}$ olması gerekmektedir (Mathimani vd. 2015). Ayrıca HHV değeri 37.798 MJ/kg olarak bulunmuştur ve bu değer ABD Standartı ASTM D6751'e göre $> 35 \text{ MJ/kg}$ olarak belirtilmiştir (Bagul vd. 2017).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyodizel üretiminde mikroalgler potansiyel bir ham madde kaynağı olarak ön plana çıkmaktadır. Özellikle literatür çalışmalarında *Chlorella sp.* yüksek lipid içerikleriyle tercih edilen mikroalgler arasındadır. Gerçekleştirilen tez çalışmasında düşük maliyetli zirai bir atık kullanılarak azot sınırlaması varlığında *C. vulgaris*'in mikrobiyel gelişim ve en yüksek lipid biriktirme kapasitesi incelenmiştir. Mikrobiyel gelişim ve lipid birikiminin maksimum olduğu koşullar optimize edildikten sonra ekstrakte edilen lipidler, farklı transesterifikasyon yaklaşımlarına tabii tutulmuş ve mikrobiyel lipidlerin yağ asidi metil esterleri Gaz Kromatografisinde analiz edilmiştir.

5.1 Farklı Gelişim Koşullarının Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Birikimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Biyodizel üretiminde en yaygın kullanılan karbon kaynağı glukozdur. Fakat glukozun kullanımını maliyeti arttırdığı için özellikle son yıllarda zirai atıklar içerdikleri önemli maddelerden karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca literatürde organik karbon kaynağı ve ışığın kullanıldığı fotoheterotrofik gelişim koşullarının hasat süresini azaltmanın yanısıra mikrobiyel gelişim ve lipid birikimini desteklediği belirlenmiştir (Yang vd. 2011). Bu bağlamda literatürde farklı gelişim koşullarında zirai atıkların kullanılmasıyla biyodizel üretime yönelik yapılan çalışmalar tez sonuçları ile uyumludur. Yapılan bir çalışmada karışık kültür içeren *C. protothecoides* ve *Ettlia sp. 'nin* fotoototrofik ve fotoheterotrofik gelişim ortamında lipid verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre fotoheterotrofik gelişim koşullarında fotoototrofik gelişim koşullarına kıyasla FAME eldesi *C. protothecoides* için %6.4'ten %30.6'ya 4.8 kat artmıştır (Ryu vd. 2014).

Krzemińska vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *C. protothecoides*'in fotoheterotrofik koşullarda lipid birikimi incelenmiştir. Bu çalışmada farklı ışık yoğunlukları (35, 130, ve 420 μmol fotonlar $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kullanılmıştır. Bu deney sonucuna göre maksimum lipid birikimi %37.53 ile ışık yoğunluğunun en yüksek olduğu (420 μmol fotonlar $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fotoheterotrofik gelişim koşullarında belirlenirken, gerçekleştirilen tez çalışmasında maksimum lipid birikimi %40.0 ile 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında belirlenmiştir.

Cheah vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *C. sorokiniana* CY-1'in biyokütle ve lipid birikimine palmiye yağı değirmeni atığının (POME) etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada fotoototrofik gelişim koşulları; CO_2 + ışık ve miksotrofik gelişim koşulları; %30 POME + 100 mg/L glukoz + CO_2 + ışık karşılaştırılmıştır. Ayrıca deneyde 200, 500, 1000 mg/L^{-1} farklı konsantrasyonlarda gliserol, üre ve glukozun etkisi de incelenmiştir. Bu deney sonucuna göre maksimum biyokütle 1.68 g/L ve lipid birikimi %15.07 ile %30 POME, 200 mg/L üre, gliserol ve glukoz içeren miksotrofik gelişim koşullarında belirlenirken, gerçekleştirilen tez çalışmasında; maksimum mikrobiyel gelişim ve lipid birikimi 14 günlük inkübasyon sonucu sırasıyla 0.699 g/L ve %40.0 ile 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiştir.

Yapılan tez çalışmasında fotoototrofik, heterotrofik ve fotoheterotrofik olmak üzere 3 farklı gelişim koşullarına eklenen 0.5 g/L glukoz ve 0.5 g/L havuç posası şekerinin etkisi incelenmiştir. Mikrobiyel gelişim en düşük 0.115 g/L ile 0.5 g/L glukoz içeren heterotrofik gelişim koşullarında, lipid birikimi en düşük %11.1 ile 0.5 g/L havuç posası şekeri içeren heterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiştir. Bunun en önemli nedeni mikroalgler fotosentetik mikroorganizmalar oldukları için ışık varlığında daha iyi gelişim gösterirler. Fotoototrofik gelişim koşullarında 14 günlük inkübasyon sonunda mikrobiyel gelişim, 0.5 g/L glukoz içeren heterotrofik gelişim koşullarına kıyasla 0.115 g/L'den 0.506 g/L'ye 4.4 kat artmıştır. Aynı zamanda lipid birikiminde de

yaklaşık 1.5 kat artış gözlemlenmiştir. Heterotrofik gelişim koşullarına eklenen 0.5 g/L glukoz ve 0.5 g/L havuç posası şekerinde sırasıyla %12.5 ve %11.1 olarak birbirine yakın değerlerde lipid elde edilmiştir. Fotoheterotrofik ve heterotrofik gelişim koşullarına eklenen 0.5 g/L havuç posası şekerinin glukozla kıyasla her iki ortamda mikrobiyel gelişimi arttırdığı gözlemlenmiştir. Çünkü havuç posasında; mikroalgin gelişimini destekleyen fermente olabilen glukoz, ksiloz gibi şekerler ile mineraller, vitaminler, karotenoid ve üronik asit gibi temel elementler bulunmaktadır (Clementz vd. 2019, Wan vd. 2019). Böylece maksimum mikrobiyel gelişim ve lipid birikimi 14 günlük inkübasyon sonunda sırasıyla 0.699 g/L ve %40.0 ile 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiştir. Havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarının *C.vulgaris*'in mikrobiyel gelişim ve lipid biriktirme kapasitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir.

5.2 Farklı Konsantrasyonlarda Havuç Posası Şekerinin Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Birikimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında fotoheterotrofik gelişim koşullarına eklenen farklı konsantrasyonlarda havuç posası şekerinin mikrobiyel gelişim ve lipid birikimine etkisi incelenmiştir. Mikrobiyel gelişim ve lipid birikimine baktığımız zaman en düşük sırasıyla 0.506 g/L ve %19.3 ile kontrol grubu olan ve havuç posası şekeri içermeyen fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiştir. Ortamda havuç posası şekeri olmadığından dolayı mikrobiyel gelişim ve lipid birikimi oldukça düşüktür. Aynı zamanda 0.25 g/L düşük konsantrasyonda havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında %25.6 oranında düşük lipid birikimi gözlemlenmiştir. Havuç posası şekeri konsantrasyonunun 0 g/L'den 0.5 g/L'ye artmasıyla mikrobiyel gelişime paralel olarak lipid birikiminin de arttığı gözlemlenmiştir. Yani ortama eklenen havuç posası şekeri konsantrasyonunun artması olumlu bir etki göstermektedir. Fakat havuç posası şekeri konsantrasyonunun 0.5 g/L'den 2.0 g/L'ye artmasıyla mikrobiyel gelişim 0.699 g/L'den 0.636 g/L'ye azalırken, lipid birikimi %40.0'tan %29.5'e düşmüştür. Çünkü fazla miktardaki havuç posası şekeri inhibe edici bir etki yaratmaktadır. Maksimum mikrobiyel gelişim ve lipid birikimi 14 günlük inkübasyon sonunda

sırasıyla 0.699 g/L ve %40.0 ile 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında gözlemlenmiştir. Yani fotoheterotrofik gelişim koşullarına kıyasla; mikrobiyel gelişim 1.38 kat artarken, lipid birikimi 2.07 kat artmıştır. Sonuç olarak havuç posası, içerdiği temel elementlerden dolayı önemli bir karbon kaynağıdır.

5.3 Farklı Konsantrasyonlarda NaNO₃'ün Mikrobiyel Gelişim ve Lipid Birikimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Mikroalglerin mikrobiyel gelişimini ve lipid üretimini arttırmak için ışık yoğunluğu, sıcaklık, pH gibi birçok faktör vardır. Özellikle azot sınırlaması önemli bir etkidir. Çünkü azot sınırlaması durumunda metabolik aktiviteler azaldığı için mikrobiyel hücreler lipid gibi makromoleküllerin sentezine yönelir ve böylece lipid birikiminde artış gözlemlenmektedir (Zhu vd. 2014). Literatür çalışmalarına bakıldığında azot sınırlamasının sadece lipid üretimi değil hücre morfolojisi gibi birçok faktöre etkisi olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda birçok çalışma yapılmıştır (Chew vd. 2018, Baroni vd. 2019). Yapılan bir çalışmada azot ve fosforun *C.vulgaris*'in lipid birikimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre lipid birikimi; azot içermeyen ve fosfor içeren (N-P+) ortamda, azot ve fosfor içeren (N+P+) ortama göre 4.6 kat daha fazladır. Bu deney sonucuna göre maksimum lipid birikimi azot eksikliğinde (N-P+) %40.8 olarak belirlenmiştir (Chu vd. 2020). Gerçekleştirilen tez çalışmasında maksimum lipid birikimi, azot sınırlaması varlığında 10 günlük inkübasyon sonunda %44.8 ile 0.5 g/L konsantrasyon NaNO₃ ve 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada *C.vulgaris*'in lipid birikimine azot sınırlama rejiminin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada 0-0.55 g/L farklı konsantrasyonlarda NO₃ kullanılmıştır. Bu deney sonucuna göre maksimum lipid birikimi 10-20 günlük inkübasyon sonucu %46 olarak belirlenmiştir (Stephenson vd. 2010). Gerçekleştirilen tez çalışmasında maksimum lipid birikimi, azot sınırlaması varlığında 10 günlük inkübasyon sonunda

%44.8 ile 0.5 g/L konsantrasyon NaNO_3 ve 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası Şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında belirlenmiştir.

Li vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada *C. vulgaris*'in miksotrofik koşullar altında lipid birikimine karbon, azot ve fosfor etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda NaNO_3 (0.1, 1.5 ve 3.75 g/L), KH_2PO_4 (0, 0.2 g/L) ve glukoz (5, 10 ve 20 g/L) kullanılmıştır. Bu deney sonucuna göre maksimum lipid birikimi %23.9 ile 0.1 g/L NaNO_3 ve 10 g/L glukoz içeren miksotrofik gelişim koşullarında belirlenirken, gerçekleştirilen tez çalışmasında maksimum lipid birikimi, azot sınırlaması varlığında 10 günlük inkübasyon sonunda %44.8 ile 0.5 g/L konsantrasyon NaNO_3 ve 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası Şekeri içeren fotoheterotrofik gelişim koşullarında belirlenmiştir.

Yapılan tez çalıŐmasında fotoototrofik ve fotoheterotrofik geliŐim koŐullarına eklenen farklı konsantrasyonlarda NaNO_3 'n mikrobiyel geliŐim ve lipid birikimine etkisi incelenmiŐtir. Mikrobiyel geliŐim ve lipid birikimine baktığımız zaman en düŐük sırasıyla 0.083 g/L ve %10.0 ile NaNO_3 içermeyen fotoototrofik geliŐim koŐullarında gözlemlenmiŐtir. Yani ortamda hem havuç posası Őekeri hem de ek bir azot kaynağı olmadığı için BG-11'den gelen azot miktarı mikrobiyel geliŐim ve lipid birikimini yeterince desteklememektedir. Fotoheterotrofik geliŐim koŐullarına baktığımız zaman mikrobiyel geliŐim ve lipid birikimi fotoototrofik geliŐim koŐullarına kıyasla önemli ölçüde artmıŐtır. Çünkü ortamda bulunan havuç posası Őekeriyle birlikte NaNO_3 'n kullanımı olumlu bir etki göstermektedir. Fotoototrofik ve fotoheterotrofik geliŐim koŐullarında NaNO_3 konsantrasyonunun azalmasıyla lipid birikimi artmıŐtır. Havuç posası içerisinde nitrat ve amonyum Őeklinde bir miktar azot bulunur ve bu nedenle artan lipid birikimleri arasında önemli farklar gözlemlenmemiŐtir (Domagała ve Gąstoł 2012). Maksimum lipid birikimi, azot sınırlaması varlığında 10 günlük inkübasyon sonunda %44.8 ile 0.5 g/L konsantrasyon NaNO_3 ve 0.5 g/L konsantrasyon havuç posası Őekeri içeren fotoheterotrofik geliŐim koŐullarında belirlenmiŐtir.

5.4 Mikrobiyel Lipidlerin Transesterifikasyonu

Yapılan tez çalışmasında optimum koşullar belirlendikten sonra geleneksel, *in situ* ve süperkritik transesterifikasyon yöntemlerinin etkisi incelenmiştir. Yapılan deneylerde Çizelge 4.4 ve 4.5'te görüldüğü gibi her iki transesterifikasyon yönteminde 0.5 g/L kuru biyokütleye uygulanan artan NaOH konsantrasyonu FAME miktarını düşürmüştür. *In situ* transesterifikasyon yöntemine baktığımız zaman düşük biyokütle ve katalizör varlığında bile yüksek oranda etkili olmaktadır. Örneğin; 0.5 g/L kuru biyokütle uygulanan %1 NaOH ile %92.8 oranında FAME elde edilmiştir. Biyokütle miktarının artmasına bağlı olarak reaksiyonun etkinliğini arttırmak için katalizör konsantrasyonunu arttırmak gerekir ve fazla miktardaki NaOH katalizörü sabun oluşumuna yol açarak reaksiyonun verimliliğini olumsuz yönde etkiler. Fakat artan alkali katalizör konsantrasyonunda reaksiyon süresi azaltılarak sabunlaşmanın önüne geçilebilmektedir. Bu bağlamda reaksiyonun 30 dk gibi kısa bir sürede olması avantajdır. Ayrıca alkali katalizör kullanımı, asidik katalizöre göre transesterifikasyon reaksiyonunu 4000 kat gibi yüksek bir oranda hızlandırmaktadır (Fazal vd. 2018). Reaksiyon süresinin FAME üzerine etkisine baktığımızda, sürenin artmasının FAME miktarına önemli bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Örneğin; geleneksel transesterifikasyon yönteminde 0.5 g/L'ye uygulanan %2 NaOH konsantrasyonunda 30 dk ve 2 saat sonunda sırasıyla %61.1 ve %67.8 oranında FAME elde edilmiştir. Geleneksel transesterifikasyon yönteminde kullanılan H₂SO₄ katalizöründe NaOH katalizörüne göre çok daha düşük verim elde edilmiştir. Bunun nedeni asidik katalizör uzun süre kullanılırsa korozyona neden olup reaksiyon verimini düşürmektedir. Yüksek FFA ve su içeriğinde asidik bir katalizör kullanmak daha uygundur. Ayrıca yüksek sıcaklık ve asidik katalizör varlığında, alkol dehidrasyonu meydana gelir ve bu durum FAME verimi azaltmaktadır (Eze vd. 2018, Gardy vd. 2019). Her iki transesterifikasyon yönteminde en yüksek FAME eldesi 30 dk sonunda 1.0 g/L kuru biyokütleye uygulanan %2 NaOH konsantrasyonunda geleneksel transesterifikasyon yöntemi için %93.3, *in situ* transesterifikasyon yöntemi için %95.1 olarak belirlenmiştir. Literatürde alkali katalizörünün yer aldığı çalışmalar tez sonuçları ile uyumludur. Yapılan bir çalışmada *C.vulgaris*'ten *in situ* transesterifikasyon ile alkali bir katalizör kullanılarak biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada farklı katalizör konsantrasyonları, reaksiyon

süreleri ve metanol:yağ oranları karşılaştırılmıştır. Deney sonucuna göre optimum koşullar; reaksiyon süresi 125 dk, metanol:yağ oranı 3.2:10 (v/v), katalizör konsantrasyonu %1.56 (w/w) ve 50°C olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %88.89 oranında FAME elde edilmiştir (Narula vd. 2017). Gerçekleştirilen tez çalışmasında *in situ* transesterifikasyon yönteminde; yağ:alkol oranı 1:5, 1.0 g/L kuru biyokütleye uygulanan %2 NaOH konsantrasyonu, 30°C ve 30 dk sonunda maksimum FAME %95.1 olarak belirlenmiştir.

Pandit ve Fulekar (2019) tarafından yapılan bir çalışmada *C. vulgaris*'ten biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada alkali katalizör olan CaO kullanılarak transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde farklı reaksiyon süreleri, metanol:biyokütle oranları, katalizör konsantrasyonları ve sıcaklık parametreleri karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; metanol:biyokütle oranı 10:1, katalizör konsantrasyonu %1.39 (wt), reaksiyon süresi 3 saat ve reaksiyon sıcaklığı 70°C olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %92.03 oranında FAME elde edilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında *in situ* transesterifikasyon yönteminde; yağ:alkol oranı 1:5, 1.0 g/L kuru biyokütleye uygulanan %2 NaOH konsantrasyonu, 30°C ve 30 dk sonunda maksimum FAME %95.1 olarak belirlenmiştir.

Geleneksel ve *in situ* transesterifikasyon yöntemlerini kıyasladığımız zaman, *in situ* transesterifikasyon yöntemi tek adımda gerçekleştiği için geleneksel transesterifikasyon yöntemine göre oldukça yüksek FAME eldesiyle sonuçlanmıştır. Çünkü aynı anda hem lipid ekstraksiyonu hem de transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştiği için zaman ve verimlilik açısından bir kayıp olmamaktadır. Bunlara ek olarak geleneksel transesterifikasyon yöntemine göre daha ekonomiktir. Ayrıca *in situ* transesterifikasyon yönteminde geleneksel transesterifikasyon yöntemine göre metanol kullanımı daha fazla olduğu için suyu tolere ederek sabunlaşma önlenir ve böylece yüksek oranda FAME elde edilmektedir (Velasquez-Orta vd. 2013, Adeniyi vd. 2018). Gerçekleştirilen tüm deneylerde Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi 30 dk gibi kısa bir sürede yaklaşık %90'dan fazla verim elde edilmiştir. Literatürde *in situ* transesterifikasyon reaksiyonuyla yapılan

çalışmalar tez sonuçları ile uyumludur. Yapılan bir çalışmada *in situ* transesterifikasyon reaksiyonu ile *C. vulgaris*'ten biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Deneyde farklı katalizör konsantrasyonları, reaksiyon süreleri, reaksiyon sıcaklıkları gibi parametreler değerlendirilmiştir. Bu deney sonucuna göre; %96 (w/w) NaOH katalizörü kullanılarak 60°C ve 10 dk gibi kısa bir sürenin sonunda %96 oranında FAME elde edilmiştir (Salam vd. 2016).

Başka bir çalışmada *C.vulgaris* kullanılarak *in situ* transesterifikasyon yöntemi ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde bir takım kalsinasyon işlemleri sonucunda elde edilen KOH/Al₂O₃ katalizörü kullanılmıştır. Ayrıca farklı biyokütle:metanol oranları, katalizör konsantrasyonları, reaksiyon sıcaklıkları ve reaksiyon süreleri karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; %10 (wt) katalizör konsantrasyonu, biyokütle:metanol oranı 1:8 g/mL reaksiyon sıcaklığı 60°C ve reaksiyon süresi 5 saat olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %89.53 oranında FAME elde edilmiştir (Ma vd. 2015). Gerçekleştirilen tez çalışmasında *in situ* transesterifikasyon yönteminde; yağ:alkol oranı 1:5, 1.0 g/L kuru biyokütleyle uygulanan %2 NaOH konsantrasyonu, 30°C ve 30 dk sonunda maksimum FAME %95.1 olarak belirlenmiştir.

Martínez vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada *Spirulina sp.* LEB 18'in ultrason destekli *in situ* transesterifikasyon yöntemi ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada alkali katalizör olarak KOH kullanılmıştır. Deneyde farklı reaksiyon süreleri (15, 30, 60, 120 dk), ultrason yoğunlukları (80 W, 108 W, 144 W ve 180 W) karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; %2 KOH konsantrasyonu, ultrason yoğunluğu 80 W, reaksiyon süresi 2 saat ve 55°C olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %97.6 oranında FAME elde edilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında *in situ* transesterifikasyon yönteminde; yağ:alkol oranı 1:5, 1.0 g/L kuru biyokütleyle uygulanan %2 NaOH konsantrasyonu, 30°C ve 30 dk sonunda maksimum FAME %95.1 olarak belirlenmiştir.

Süperkritik transesterifikasyon yöntemine baktığımız zaman Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi metanol miktarı ve süre arttıkça FAME veriminin arttığı gözlemlenmiştir. Fakat süperkritik transesterifikasyon yöntemi ile elde edilen verim hem geleneksel hem de *in situ* transesterifikasyon yöntemlerinden oldukça düşüktür. Literatürde süperkritik transesterifikasyon yöntemi ile ilgili yapılan çalışmalar tez sonuçları ile uyumludur. Yapılan bir çalışmada *C. vulgaris*'ten süperkritik koşullar altında biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde; 5 g/mL yaş biyokütle kullanılarak farklı reaksiyon süreleri (0, 2, 4, 6, 8 saat), farklı metanol (2, 4, 6, 8, 10 mL) miktarları gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; yaş biyokütle:metanol oranı 1:4 g/mL, 22 bar, reaksiyon sıcaklığı 175°C ve reaksiyon süresi 4 saat olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %89.71 oranında FAME elde edilmiştir (Tsigie vd. 2012). Gerçekleştirilen tez çalışmasında süperkritik transesterifikasyon yönteminde; biyokütle:metanol oranı 1:12 (w/v), 82 bar, 250°C ve 20 dk sonunda maksimum FAME %75.7 olarak belirlenmiştir.

Reddy vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *Nannochloropsis Salina*'nın biyodizel üretimine süperkritik yöntemin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada; farklı yaş biyokütle:etanol oranları (1:6, 1:9, 1:12, 1:15 (w/v)), reaksiyon süreleri (2, 5, 10, 20, 30 dk), reaksiyon sıcaklıkları (245-270°C) karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre optimum koşullar; yaş biyokütle:etanol oranı 1:9, reaksiyon sıcaklığı 265°C, reaksiyon süresi 20 dk olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında %67 oranında FAME elde edilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında süperkritik transesterifikasyon yönteminde; biyokütle:metanol oranı 1:12 (w/v), 82 bar, 250°C ve 20 dk sonunda maksimum FAME %75.7 olarak belirlenmiştir.

5.5 Biodiesel Analyzer® Yazılımına Göre Yakıt Özellikleri

Yapılan Biodiesel Analyzer® yazılımına göre, elde edilen yağ asidi metil esterlerinin belirli yakıt özellikleri ASTM D6751 ve EN 14214 standartlarıyla uyumlu bulunmuştur. Bu özellikler; kinematik viskozite 3.001 mm²/s, yoğunluk 0.857 g/cm³, CFPP, LCSF, CP ve PP değerleri sırasıyla -11.023 ° C, 1.736, -0.614 ° C ve -7.487 °C ve HHV değeri 37.798 MJ/kg olarak bulunmuştur. Sonuç olarak literatürde, havuç posası içeren ortamda geliştirilen *C.vulgaris*'ten elde edilen mikrobiyel lipidlerin biyodizel üretiminde ham madde olarak kullanıldığı herhangi bir çalışma yoktur. Bu bağlamda gerçekleştirilen tez çalışması oldukça özgündür.

KAYNAKLAR

- Abdullah, B., Muhammad, S. A. F. A. S., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., & Aziz, M. M. A. (2019). Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and sustainable energy reviews*, 107, 37-50.
- Adeniyi, O. M., Azimov, U., & Burluka, A. (2018). Algae biofuel: Current status and future applications. *Renewable and sustainable energy reviews*, 90, 316-335.
- Alsharifi, M., Znad, H., Hena, S., & Ang, M. (2017). Biodiesel production from canola oil using novel Li/TiO₂ as a heterogeneous catalyst prepared via impregnation method. *Renewable Energy*, 114, 1077-1089.
- Amin, A. (2019). Review of diesel production from renewable resources: catalysis, process kinetics and technologies. *Ain Shams Engineering Journal*, 10(4), 821-839.
- Anonim. 2019. Web Sitesi: <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=cevre-ve-enerji-103&dil=1> Erişim Tarihi: 18.04.2021
- Anto, S., Pugazhendhi, A., & Mathimani, T. (2019). Lipid enhancement through nutrient starvation in *Chlorella* sp. and its fatty acid profiling for appropriate bioenergy feedstock. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101179.
- Bagul, S. Y., K. Bharti, R., & Dhar, D. W. (2017). Assessing biodiesel quality parameters for wastewater grown *Chlorella* sp. *Water Science and Technology*, 76(3), 719-727.
- Baroni, É. G., Yap, K. Y., Webley, P. A., Scales, P. J., & Martin, G. J. (2019). The effect of nitrogen depletion on the cell size, shape, density and gravitational settling of *Nannochloropsis salina*, *Chlorella* sp.(marine) and *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*, 39, 101454.
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 41, 1489-1500.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37; 911-917.
- Broxterman, S. E., Picouet, P., & Schols, H. A. (2017). Acetylated pectins in raw and heat processed carrots. *Carbohydrate polymers*, 177, 58-66.
- Cheah, W. Y., Show, P. L., Juan, J. C., Chang, J. S., & Ling, T. C. (2018). Enhancing biomass and lipid productions of microalgae in palm oil mill effluent using carbon and nutrient supplementation. *Energy Conversion and Management*,

164, 188-197.

- Chen, H., Zheng, Y., Zhan, J., He, C., & Wang, Q. (2017). Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-20.
- Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R. D., Drogui, P., & Surampalli, R. Y. (2018). The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 336-346.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Ling, T. C., Arya, S. S., & Chang, J. S. (2018). Food waste compost as an organic nutrient source for the cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 267, 356-362.
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., ... & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource technology*, 229, 53-62.
- Chi, N. T. L., Duc, P. A., Mathimani, T., & Pugazhendhi, A. (2019). Evaluating the potential of green alga *Chlorella* sp. for high biomass and lipid production in biodiesel viewpoint. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, 184-188.
- Chu, F., Cheng, J., Li, K., Wang, Y., Li, X., & Yang, W. (2020). Enhanced lipid accumulation through a regulated metabolic pathway of phosphorus luxury uptake in the microalga *Chlorella vulgaris* under nitrogen starvation and phosphorus repletion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(22), 8137-8147.
- Church, J., Hwang, J. H., Kim, K. T., McLean, R., Oh, Y. K., Nam, B., ... & Lee, W. H. (2017). Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. *Bioresource technology*, 243, 147-153.
- Clementz, A., Torresi, P. A., Molli, J. S., Cardell, D., Mammarella, E., & Yori, J. C. (2019). Novel method for valorization of by-products from carrot discards. *Lwt*, 100, 374-380.
- Correa, D. F., Beyer, H. L., Fargione, J. E., Hill, J. D., Possingham, H. P., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. (2019). Towards the implementation of sustainable biofuel production systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 250-263.
- Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., ... & Duchateau, P. (2014). Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nature communications*, 5(1), 1-7.

- Deshmukh, S., Kumar, R., & Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel processing technology*, 191, 232-247.
- Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., ... & El-Halwagi, M. M. (2017). A review of biodiesel production from microalgae. *Clean technologies and environmental policy*, 19(3), 637-668.
- Domagała-Świątkiewicz, I., & Gąstoł, M. (2012). Comparative study on mineral content of organic and conventional carrot, celery and red beet juices. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 11(2), 173-183.
- Dutta, K., Daverey, A., & Lin, J. G. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable energy*, 69, 114-122.
- Eze, V. C., Phan, A. N., & Harvey, A. P. (2018). Intensified one-step biodiesel production from high water and free fatty acid waste cooking oils. *Fuel*, 220, 567-574.
- Faleh, N., Khila, Z., Wahada, Z., Pons, M. N., Houas, A., & Hajjaji, N. (2018). Exergo-environmental life cycle assessment of biodiesel production from mutton tallow transesterification. *Renewable Energy*, 127, 74-83.
- Faried, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R. S., Attia, Y. A., & Ali, A. S. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and sustainable energy reviews*, 79, 893-913.
- Fasaei, F., Bitter, J. H., Slegers, P. M., & Van Boxtel, A. J. B. (2018). Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Research*, 31, 347-362.
- Fazal, T., Mushtaq, A., Rehman, F., Khan, A. U., Rashid, N., Farooq, W., ... & Xu, J. (2018). Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3107-3126.
- Gardy, J., Rehan, M., Hassanpour, A., Lai, X., & Nizami, A. S. (2019). Advances in nano-catalysts based biodiesel production from non-food feedstocks. *Journal of environmental management*, 249, 109316.
- Ghazali, W. N. M. W., Mamat, R., Masjuki, H. H., & Najafi, G. (2015). Effects of biodiesel from different feedstocks on engine performance and emissions: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 585-602.
- Ghosh, S., Banerjee, S., & Das, D. (2017). Process intensification of biodiesel production from *Chlorella* sp. MJ 11/11 by single step transesterification. *Algal Research*, 27, 12-20.

- He, C., Mei, Y., Zhang, Y., Liu, L., Li, P., Zhang, Z., ... & Jiao, Y. (2020). Enhanced biodiesel production from diseased swine fat by ultrasound-assisted two-step catalyzed process. *Bioresource technology*, 304, 123017.
- Javed, F., Aslam, M., Rashid, N., Shamair, Z., Khan, A. L., Yasin, M., ... & Bazmi, A. A. (2019). Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: a pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel*, 255, 115826.
- Jume, B. H., Gabris, M. A., Nodeh, H. R., Rezanian, S., & Cho, J. (2020). Biodiesel production from waste cooking oil using a novel heterogeneous catalyst based on graphene oxide doped metal oxide nanoparticles. *Renewable Energy*, 162, 2182-2189.
- Kamel, D. A., Farag, H. A., Amin, N. K., Zatout, A. A., & Ali, R. M. (2018). Smart utilization of jatropha (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism. *Industrial Crops and Products*, 111, 407-413.
- Karmakar, B., & Halder, G. (2019). Progress and future of biodiesel synthesis: advancements in oil extraction and conversion technologies. *Energy Conversion and Management*, 182, 307-339.
- Kim, B., Im, H., & Lee, J. W. (2015). In situ transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid. *Bioresource technology*, 185, 421-425.
- Kiran, B., Kumar, R., & Deshmukh, D. (2014). Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy conversion and management*, 88, 1228-1244.
- Krzemińska, I., Piasecka, A., Nosalewicz, A., Simionato, D., & Wawrzykowski, J. (2015). Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. *Bioresource technology*, 196, 72-77.
- Kumar, K., Ghosh, S., Angelidaki, I., Holdt, S. L., Karakashev, D. B., Morales, M. A., & Das, D. (2016). Recent developments on biofuels production from microalgae and macroalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 235-249.
- Kumar, R., Strezov, V., Weldekidan, H., He, J., Singh, S., Kan, T., & Dastjerdi, B. (2020). Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 123, 109763.
- Kumar, S. J., Kumar, G. V., Dash, A., Scholz, P., & Banerjee, R. (2017). Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Research*, 21, 138-147.

- Leong, W. H., Lim, J. W., Lam, M. K., Uemura, Y., & Ho, Y. C. (2018). Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 91, 950-961.
- Liao, Q., Chang, H. X., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., Zhu, X., & Zhong, N. (2018). Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients. *Bioresource technology*, 250, 583-590.
- Li, C., Yu, Y., Zhang, D., Liu, J., Ren, N., & Feng, Y. (2016). Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(3), 680-684.
- Lin, T. S., & Wu, J. Y. (2015). Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource technology*, 184, 100-107.
- Li, P., Sakuragi, K., & Makino, H. (2019). Extraction techniques in sustainable biofuel production: A concise review. *Fuel Processing Technology*, 193, 295-303.
- Ma, G., Hu, W., Pei, H., Jiang, L., Ji, Y., & Mu, R. (2015). Study of KOH/Al₂O₃ as heterogeneous catalyst for biodiesel production via in situ transesterification from microalgae. *Environmental technology*, 36(5), 622- 627.
- Mahlia, T. M. I., Syazmi, Z. A. H. S., Mofijur, M., Abas, A. P., Bilad, M. R., Ong, H. C., & Silitonga, A. S. (2020). Patent landscape review on biodiesel production: Technology updates. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118, 109526.
- Mahmudul, H. M., Hagos, F. Y., Mamat, R., Adam, A. A., Ishak, W. F. W., & Alenezi, R. (2017). Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, 497-509.
- Mamo, T. T., & Mekonnen, Y. S. (2019). Microwave-Assisted Biodiesel Production from Microalgae, *Scenedesmus* Species, Using Goat Bone-Made Nano-catalyst. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-16.
- Maneerung, T., Kawi, S., Dai, Y., & Wang, C. H. (2016). Sustainable biodiesel production via transesterification of waste cooking oil by using CaO catalysts prepared from chicken manure. *Energy Conversion and Management*, 123, 487-497.
- Martínez, N., Callejas, N., Morais, E. G., Costa, J. A. V., Jachmanián, I., & Vieitez, I. (2017). Obtaining biodiesel from microalgae oil using ultrasound-assisted in- situ alkaline transesterification. *Fuel*, 202, 512-519.

- Mat Aron, N. S., Khoo, K. S., Chew, K. W., Show, P. L., Chen, W. H., & Nguyen, T. H. P. (2020). Sustainability of the four generations of biofuels—A review. *International Journal of Energy Research*, 44(12), 9266-9282.
- Mathimani, T., Kumar, T. S., Chandrasekar, M., Uma, L., & Prabakaran, D. (2017). Assessment of fuel properties, engine performance and emission characteristics of outdoor grown marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 biodiesel. *Renewable energy*, 105, 637-646.
- Mathimani, T., Uma, L., & Prabakaran, D. (2015). Homogeneous acid catalysed transesterification of marine microalga *Chlorella* sp. BDUG 91771 lipid—an efficient biodiesel yield and its characterization. *Renewable Energy*, 81, 523-533.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Narula, V., Khan, M. F., Negi, A., Kalra, S., Thakur, A., & Jain, S. (2017). Low temperature optimization of biodiesel production from algal oil using CaO and CaO/Al₂O₃ as catalyst by the application of response surface methodology. *Energy*, 140, 879-884.
- Nongbe, M. C., Ekou, T., Ekou, L., Yao, K. B., Le Grogne, E., & Felpin, F. X. (2017). Biodiesel production from palm oil using sulfonated graphene catalyst. *Renewable Energy*, 106, 135-141.
- Noor, C. M., Noor, M. M., & Mamat, R. (2018). Biodiesel as alternative fuel for marine diesel engine applications: A review. *renewable and sustainable energy reviews*, 94, 127-142.
- Nunes, L. J. R., Causer, T. P., & Ciolkosz, D. (2020). Biomass for energy: A review on supply chain management models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 120, 109658.
- Pandit, P. R., & Fulekar, M. H. (2019). Biodiesel production from microalgal biomass using CaO catalyst synthesized from natural waste material. *Renewable Energy*, 136, 837-845.
- Patil, P. D., Gude, V. G., Mannarswamy, A., Deng, S., Cooke, P., Munson-McGee, S., ... & Nirmalakhandan, N. (2011). Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. *Bioresource technology*, 102(1), 118-122.
- Patle, D. S., Pandey, A., Srivastava, S., Sawarkar, A. N., & Kumar, S. (2020). Ultrasound-intensified biodiesel production from algal biomass: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-21.
- Pradhan, P., Mahajani, S. M., & Arora, A. (2018). Production and utilization of fuel

- pellets from biomass: A review. *Fuel Processing Technology*, 181, 215-232.
- Pragya, N., Pandey, K. K., & Sahoo, P. K. (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171.
- Rajkumari, K., & Rokhum, L. (2020). A sustainable protocol for production of biodiesel by transesterification of soybean oil using banana trunk ash as a heterogeneous catalyst. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(4), 839-848.
- Razzak, S. A., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S., & de Lasa, H. (2013). Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 622-653.
- Reddy, H. K., Muppaneni, T., Patil, P. D., Ponnusamy, S., Cooke, P., Schaub, T., & Deng, S. (2014). Direct conversion of wet algae to crude biodiesel under supercritical ethanol conditions. *Fuel*, 115, 720-726.
- Rehan, M., Gardy, J., Demirbas, A., Rashid, U., Budzianowski, W. M., Pant, D., & Nizami, A. S. (2018). Waste to biodiesel: A preliminary assessment for Saudi Arabia. *Bioresource technology*, 250, 17-25.
- Rezania, S., Oryani, B., Park, J., Hashemi, B., Yadav, K. K., Kwon, E. E., ... & Cho, J. (2019). Review on transesterification of non-edible sources for biodiesel production with a focus on economic aspects, fuel properties and by-product applications. *Energy Conversion and Management*, 201, 112155.
- Rippka, R. (1988). [1] Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in enzymology*, 167, 3-27.
- Roy, M., & Mohanty, K. (2019). A comprehensive review on microalgal harvesting strategies: Current status and future prospects. *Algal Research*, 44, 101683.
- Ryu, B. G., Kim, J., Farooq, W., Han, J. I., Yang, J. W., & Kim, W. (2014). Algal–bacterial process for the simultaneous detoxification of thiocyanate-containing wastewater and maximized lipid production under photoautotrophic/ photoheterotrophic conditions. *Bioresource technology*, 162, 70-79.
- Salam, K. A., Velasquez-Orta, S. B., & Harvey, A. P. (2016). Kinetics of fast alkali reactive extraction/in situ transesterification of *Chlorella vulgaris* that identifies process conditions for a significant enhanced rate and water tolerance. *Fuel Processing Technology*, 144, 212-219.
- Salimi, Z., & Hosseini, S. A. (2019). Study and optimization of conditions of biodiesel

- production from edible oils using ZnO/BiFeO₃ nano magnetic catalyst. *Fuel*, 239, 1204-1212.
- Sánchez-Arreola, E., Bach, H., & Hernández, L. R. (2019). Biodiesel production from *Cascabela ovata* seed oil. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100220.
- Shahsavari, A., & Akbari, M. (2018). Potential of solar energy in developing countries for reducing energy-related emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 275-291.
- Shah, S. H., Raja, I. A., Rizwan, M., Rashid, N., Mahmood, Q., Shah, F. A., & Pervez, A. (2018). Potential of microalgal biodiesel production and its sustainability perspectives in Pakistan. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 76-92.
- Shah, S. Z., Chughtai, S., & Simonetti, B. (2020). Renewable energy, institutional stability, environment and economic growth nexus of D-8 countries. *Energy Strategy Reviews*, 29, 100484.
- Sharma, Y. C., & Singh, V. (2017). Microalgal biodiesel: a possible solution for India's energy security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 72-88.
- Silitonga, A. S., Mahlia, T. M. I., Ong, H. C., Riayatsyah, T. M. I., Kusumo, F., Ibrahim, H., ... & Gumilang, D. (2017). A comparative study of biodiesel production methods for *Reutealis trisperma* biodiesel. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(20), 2006-2014.
- Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Sharma, S., & Kumari, D. (2019). Chemical compositions, properties, and standards for different generation biodiesels: A review. *Fuel*, 253, 60-71.
- Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Sharma, S., Sharma, P. K., & Jhalani, A. (2020). A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. *Fuel*, 262, 116553.
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of environmental management*, 217, 499-508.
- Son, J., Kim, B., Park, J., Yang, J., & Lee, J. W. (2018). Wet in situ transesterification of spent coffee grounds with supercritical methanol for the production of biodiesel. *Bioresource technology*, 259, 465-468.
- Stephenson, A. L., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2010). Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*, 1(1), 47-58.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. H., & Renganathan, S. (2016). Macroalgae and

microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909-941.

Sung, M., & Han, J. I. (2016). Alkaline in situ transesterification of *Aurantiochytrium* sp. KRS 101 using potassium carbonate. *Bioresource technology*, 205, 250-253.

Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T., & Shuit, S. H. (2019). Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109361.

Talebi, A. F., Tabatabaei, M., & Chisti, Y. (2014). BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. *Biofuel Research Journal*, 1(2), 55-57.

Thushari, I., Babel, S., & Samart, C. (2019). Biodiesel production in an autoclave reactor using waste palm oil and coconut coir husk derived catalyst. *Renewable energy*, 134, 125-134.

Tsigie, Y. A., Huynh, L. H., Ismadji, S., Engida, A. M., & Ju, Y. H. (2012). In situ biodiesel production from wet *Chlorella vulgaris* under subcritical condition. *Chemical Engineering Journal*, 213, 104-108.

Turkkul, B., Deliismail, O., & Seker, E. (2020). Ethyl esters biodiesel production from *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis oculata* microalgal lipids over alumina-calcium oxide catalyst. *Renewable Energy*, 145, 1014-1019.

Vassilev, S. V., Vassileva, C. G., & Vassilev, V. S. (2015). Advantages and disadvantages of composition and properties of biomass in comparison with coal: An overview. *Fuel*, 158, 330-350.

Velasquez-Orta, S. B., Lee, J. G. M., & Harvey, A. P. (2013). Evaluation of FAME production from wet marine and freshwater microalgae by in situ transesterification. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 83-89.

Wan, Y. J., Xu, M. M., Gilbert, R. G., Yin, J. Y., Huang, X. J., Xiong, T., & Xie, M. Y. (2019). Colloid chemistry approach to understand the storage stability of fermented carrot juice. *Food Hydrocolloids*, 89, 623-630.

Yang, J., Rasa, E., Tantayotai, P., Scow, K. M., Yuan, H., & Hristova, K. R. (2011). Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 102(3), 3077-3082.

Yan, J., Kuang, Y., Gui, X., Han, X., & Yan, Y. (2019). Engineering a malic enzyme to enhance lipid accumulation in *Chlorella protothecoides* and direct

production of biodiesel from the microalgal biomass. *Biomass and Bioenergy*, 122, 298-304.

Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., ... & Li, B. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource technology*, 301, 122804.

You, S. K., Ko, Y. J., Shin, S. K., Hwang, D. H., Kang, D. H., Park, H. M., & Han, S. O. (2020). Enhanced CO₂ fixation and lipid production of *Chlorella vulgaris* through the carbonic anhydrase complex. *Bioresource technology*, 318, 124072.

Zhou, D., Qiao, B., Li, G., Xue, S., & Yin, J. (2017). Continuous production of biodiesel from microalgae by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions. *Bioresource technology*, 238, 609-615.

Zhu, L. Y., Zong, M. H., & Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99(16), 7881-7885.

Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 152, 292-298.