



**T.C.**

**ORDU ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN, *Chlorella* sp. BİYOKÜTLE VE YAĞ İÇERİĞİNİN NANOPARTİKÜL (Nano-Fe<sup>0</sup>) KATILMIŞ OTOTROFİK, HETEROTROFİK VE MİKSOTROFİK KOŞULLAR ALTINDA İNCELENMESİ**

**TALHA GİRAY DALKIRAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YENİLENEBİLİR ENERJİ ANABİLİM DALI**

**ORDU 2019**

## TEZ ONAY




Talha Giray DALKIRAN tarafından hazırlanan “BİYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN, *Chlorella* sp. BİYOKÜTLE VE YAĞ İÇERİĞİNİN NANOPARTİKÜL (Nano-Fe<sup>0</sup>) KATILMIŞ OTOTROFİK, HETEROTROFİK VE MİKSOTROFİK KOŞULLAR ALTINDA İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.12.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yenilenebilir Enerji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman  
Prof. Dr. Beyhan TAŞ

Jüri Üyeleri

Danışman  
Prof. Dr. Beyhan TAŞ  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,  
Ordu Üniversitesi  
Üye  
Prof. Dr. Tahsin TONKAZ  
Biyosistem Mühendisliği Bölümü,  
Ordu Üniversitesi  
Üye  
Prof. Dr. Yalçın TEPE  
Biyoloji Bölümü, Giresun Üniversitesi

İmza

12/12/2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20/12/2019 tarih ve 2019./755 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Selahattin MADEN

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



**Talha Giray DALKIRAN**

**Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün A-1821 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

# BIYODİZEL ÜRETİMİ İÇİN, *Chlorella* sp. BİYOKÜTLE VE YAĞ İÇERİĞİNİN NANOPARTİKÜL (Nano-Fe<sup>0</sup>) KATILMIŞ OTOTROFİK, HETEROTROFİK VE MİKSOTROFİK KOŞULLAR ALTINDA İNCELENMESİ

Talha Giray DALKIRAN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİLENEBİLİR ENERJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 55 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Beyhan TAŞ)

Mikroalgler yüksek yağ içeriğine sahip oldukları için, biyoyakıt üretimi açısından önemli bir alternatiftir ve yenilenebilir biyokütle enerji kaynağı olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Bu çalışmada, doğadan izole edilen mikroskobik tek hücreli yeşil alg *Chlorella* sp. türünün kültür ortamına sıfır değerlikli demir nanopatikül (nano-Fe<sup>0</sup>) eklentisinin çeşitli çevresel koşullarda yağ asiti kompozisyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çevresel parametreleri değiştirerek canlıda stres oluşturup mikroalgin yağ içeriğini artırılabilmesi için çalışmada, kontrol (K) grubu hariç, ototrofik (G1), mikсотrofik (G2) ve heterotrofik (G3) deney setlerinde nanoteknoloji ürünlerinden sıfır değerlikli demir nanopatikülü (nano-Fe<sup>0</sup>) kullanılmıştır. Mikсотrofik ve heterotrofik kültürlerde ise ilave karbon kaynağı olarak D-glikoz kullanılmıştır. 120 saat süren deney sonucunda farklı kültür ortamlarından hasat edilen mikroalgin yağ asiti kompozisyonu GC-FID ile belirlenmiştir. *Chlorella* sp. yağ asiti bileşimi doymuş yağ asitleri (SFA), tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) dahil toplam 13 yağ asitinden oluşmuştur. Farklı kültür ortamlarında yetiştirilen *Chlorella* sp. hücrelerinden elde edilen lipitlerin transesterifikasyon sonucu elde edilen yağ asiti metil esterlerinden C16 ve C18 karbon numaralarınınca zengindir. Çalışmamızda % alan olarak C16 ce C18 yağ asitleri değerleri sırasıyla 20.83 ila 25.37 ve 73.01 ila 78.1 aralığında kaydedilmiştir. C16 en yüksek G2'de, C18 en yüksek G1'de ölçülmüştür. Heterotrofik kültür SFA ile MUFA bakımından, ototrofik kültür ise PUFA bakımından zengindir. Bu çalışmanın nihayetinde, Turnasuyu'ndan elde edilen *Chlorella* sp. türüne sıfır değerlikli demir nanopatikül ve D-glikoz eklentisinin yüksek kaliteli biyodizel eldesi açısından pozitif bir etkisi olduğu görülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda farklı stres koşullarında bu türün yağ içeriğindeki değişim incelenmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyodizel, Biyokütle Enerjisi, Heterotrofik Büyüme, Mikroalgler, Nanopatikül, Yenilenebilir Enerji.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF *Chlorella* sp. BIOMASS AND LIPID CONTENTS UNDER NANOPARTICLES (Nano-Fe<sup>0</sup>) ADDED AUTOTROPHIC, HETEROTROPHIC AND MIXOTROPHIC CONDITIONS, FOR BIODIESEL PRODUCTION

Talha Giray DALKIRAN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

RENEWABLE ENERGY

MASTER THESIS, 55 PAGES

(SUPERVISOR: Prof. Dr. Beyhan TAŞ)

As microalgae have high lipid contents, they have potential as an alternative and renewable biomass energy source. In this study, we aim to investigate the fatty acid composition of a microscopic single-celled green alga *Chlorella* sp. isolated from the nature under the effects of the zero-valent iron nanoparticles (nano-Fe<sup>0</sup>) in different environmental conditions. Excluding control group, the zero-valent iron nanoparticles were used in autotrophic (G1), mixotrophic (G2) and heterotrophic (G3) groups to manipulate environmental conditions and create stress for the microalgae. D-Glucose was used in mixotrophic and heterotrophic cultures as an extra carbon source. At the end of the experiment, which took 120 hours, the microalgal fatty acid composition harvested from different cultural conditions was evaluated using GC-FID. *Chlorella* sp.'s fatty acid composition was found to consist of 13 different fatty acids including Saturated Fatty Acids (SFA), Monounsaturated Fatty Acids (MUFA) and Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA). C16 and C18 carbon numbers from lipids of *Chlorella* sp. cells cultivated under different culture conditions were rich in fatty acid methyl esters. In our study, C16 and C18 fatty acid % areas were found to be between 20.83-25.37 and 73.01-78.1 respectively. With C16 being highest in G2 and C18 highest in G1. The heterotrophic culture was rich in SFA and MUFA, while the autotrophic culture was rich in PUFA. The results of this study show that the addition of the zero valent iron nanoparticles and D-glucose in the medium of natural strain *Chlorella* sp. from Turnasuyu Creek seem to have a positive effect in producing high quality biodiesel. In future studies this species' lipid composition should be investigated under different stress conditions.

**Keywords:** Biodiesel, Biomass Energy, Heterotrophic Growth, Microalgae, Nanoparticles, Renewable Energy.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmam esnasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana sürekli yol gösterici ve destek olan sonsuz saygılarım ve minnettarlığım ile değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Beyhan TAŞ'a, hem bu zorlu ve uzun süreçte hem de her zaman yanımda olup çalışmalarım esnasında sabır gösterdiği ve bana katlandığı için eşim Jessica DALKIRAN'a, projemde sürekli çalışmama izin verdiği için oğlum Rüzgar DALKIRAN'a, istatistiksel analizlerde iş gücü olarak desteğini esirgemeyen ağabeyim Görkem DALKIRAN'a, hayatım boyunca yanımda olan ve ideallerimi gerçekleştirmemi sağlayan saygıdeğer aileme, projenin en önemli kısımlarından kaynak taramasının büyük bölümünü gerçekleştirebilmeme imkan sağlayan ve yurtdışı teknik gezi için beni yalnız bırakmayan beraber büyüdüğüm çocukluk arkadaşım sayın Burak Can FIÇI'ya, çalışmanın teknik desteğinin yürütülmesinde Ali Kadir SAVRANLIOĞLU'na, maddi ve manevi sürekli yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen GEÇİM ailesine sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	V
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VI
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	VII
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	VIII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1 Yağların (Lipidlerin) Kimyası.....	5
2.1.1 Lipidlerin Sınıflandırılması.....	5
2.1.2 Yağ Asitleri.....	5
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 <i>Chlorella</i> sp.'nin İzolasyonu ve Çoğaltılması.....	17
3.1.2 <i>Chlorella</i> sp. Üretiminde Kullanılan Düzeneklerin Hazırlanması.....	22
3.2 Analitik Yöntemler.....	23
3.2.1 pH Ölçümü.....	23
3.2.2 Hücre Büyümesinin Ölçümü.....	23
3.2.3 Hücre Sayımı.....	24
3.2.4 Kuru Madde Analizi.....	25
3.2.5 Fotosentetik Pigment Analizi.....	25
3.2.6 Hasat ve Kurutma.....	26
3.2.7 Lipit Ekstraksiyonu ve Analiz İşlemleri.....	26
3.2.7.1 Toplam Lipit Miktarı Analizi.....	26
3.2.7.2 Yağ Asitleri Kompozisyonunun Belirlenmesi.....	27
3.2.8 İstatistiksel Analizler.....	28
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b> .....	29
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	44
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	47
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	55

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 3.1 <i>Chlorella</i> Sp. (Turnasuyu Çayı, Ordu, Türkiye); 1-2: Kültürün Büyümesi	17
Şekil 3.2 <i>Chlorella</i> Sp.'nin Katı Ve Sıvı Besiyerlerinde Çoğaltılması.....	18
Şekil 3.3 İklimlendirme Kabininde Alg Kültür Setlerinin Geliştirilmesi.....	23
Şekil 3.4 Invert Mikroskopta Hücre Sayımı .....	24
Şekil 3.5 GC-2010 Plus Gaz Kromatografi Sistemi .....	28
Şekil 4.1 Farklı Kültür Ortamlarında Zamana Bağlı pH Değişimi.....	29
Şekil 4.2 680 nm Ve 720 nm'de <i>Chlorella</i> sp.'nin Zamana Bağlı Büyüme Performansı .....	30
Şekil 4.3 Kuru Ağırlık Ve Biyomasın Zamana Göre Değişimi.....	31
Şekil 4.4 Fotosentetik Pigment Miktarlarının Zamana Göre Değişimi .....	32
Şekil 4.5 Lipit İçeriği (%) Ve Lipit Üretimi .....	35
Şekil 4.6 SFA, MUFA, ve PUFA'nın Karşılaştırılması .....	36
Şekil 4.7 Farklı Deney Gruplarında Major Yağ Asitlerinin Dağılımı .....	40
Şekil 4.8 Farklı Deney Gruplarında Minör Yağ Asitlerinin Dağılımı.....	42



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Doğal Olarak Meydana Gelen Bazı Yağ Asitleri (Gözükara, 1989) .....	7
Çizelge 2.2. Yağ Asit Kompozisyonları (Ağırlık/Yağ) (Meng ve ark., 2009) .....	9
Çizelge 3.1. Bristol Medyum Hazırlamada Kullanılan Maddeler .....	19
Çizelge 3.2. Bold Basal Medium (BBM) Hazırlamada Kullanılan Maddeler .....	21
Çizelge 3.3. <i>Chlorella</i> sp. Kültürü Deney Setlerinin Hazırlanışı .....	23
Çizelge 4.1. SPSS İstatistiksel Analiz Sonuçları (Duncan'a göre) .....	34
Çizelge 4.2. Farklı Kültür Ortamlarında <i>Chlorella</i> sp.'nin % Yağ Asidi Kompozisyonu .....	36

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>BBM</b>	: Bold Basal Medyum
<b>BM</b>	: Bristol Medyum
<b>g</b>	: Gram
<b>dak.</b>	: Dakika
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Deiyonize Su (Distile Su, Saf Su)
<b>G1</b>	: Deney Grubu 1
<b>G2</b>	: Deney Grubu 2
<b>G3</b>	: Deney Grubu 3
<b>h</b>	: Saat
<b>K</b>	: Deney Kontrol Grubu
<b>L</b>	: Litre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>MUFA</b>	: Tekli Doymamış Yağ Asiti
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>nano-Fe<sup>0</sup></b>	: Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikülü
<b>NP</b>	: Nanopartikül
<b>OD</b>	: Optik Density (Optik Yoğunluk)
<b>PM</b>	: Proteoz Medyum
<b>PUFA</b>	: Çoklu Doymamış Yağ Asiti
<b>SFA</b>	: Doymuş Yağ Asiti
<b>S-R</b>	: Sedgewick-Rafter sayım hücresi

---

## 1. GİRİŞ

Konvansiyonel enerji kaynaklarından dünya petrol rezervinin 2050, doğal gazın 2070, kömürün de 2150 yılında tükeneceği beklenmektedir (Özemre, 2019). Bu durum, dikkatlerin alternatif enerji kaynaklarının üzerine odaklanmasına yol açmıştır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde fosil yakıt tüketimi her geçen gün artmaktadır. Petrol fiyatlarındaki aşırı artışlar ve fosil yakıtların yanmasıyla oluşan küresel ısınma tehlikeleri de günümüzün en önemli sorunları arasındadır. Doğanın korunması ve sürdürülebilirlik başta olmak üzere yeni enerji kaynaklarına yönelim, ülkemizin gerek ekonomik gerekse ekolojik geleceği ile birlikte enerji üretiminde dışa bağımlılığının azaltılması ve fiyatların düşürülmesi açısından hayati önem taşımaktadır. Bu açıdan yenilenebilir enerji kaynakları arasında yer alan mikroalg biyokütlesinden biyodizel üretimi yüksek potansiyeli olan bir yöntemdir.

Enerji ihtiyacının büyük bir bölümü yenilenemeyen enerji kaynakları olan fosil rezervlerden karşılanmaktadır ve bu rezervler hızla tükenmektedir. Bu nedenle gelişmiş ve gelişmekte olan dünya ülkeleri yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelmişler, bu enerji kaynaklarının ekonomiye kazandırılmasını, sürdürülebilir enerji üretiminin desteklenmesini ve çevrenin korunmasını amaçlamışlardır. “Biyokütle enerjisi” yenilenebilir enerji kaynaklarından bir tanesidir. Kaynak olarak bitkisel ve hayvansal kökenli tüm organik maddeler kullanılmaktadır. Biyodizel üretimi esas olarak kanola, soya fasulyesi, ayçiçeği ve hurma içeren uzun zincirli yağ asitleri (1. nesil hammadde), hayvansal yağ ve yağ geri kazanımı (2. nesil hammadde) gibi yağlara dayanmaktadır. Biyokütle enerji kaynakları içerisinde mikroalgler de (3. nesil hammadde) yer almaktadır. Yapılan çalışmalar mikroalglerden elde edilen biyoyakıtların hem konvansiyonel enerji kaynaklarına göre birçok avantajları olduğunu göstermektedir hem de çevre dostu sürdürülebilir enerji kaynaklarıdır. Mikroalglerin yüksek fotosentetik etkinlikleri, yüksek biyokütle üretimleri ve hızlı çoğalmaları gibi avantajlarıyla biyoyakıt üretimi için umut verici olduğunu göstermektedir. Mikroalglerin fotosentez hızı biyoyakıt üretiminde kullanılan diğer karasal bitkilere göre yaklaşık 50 kat daha fazladır (Suali ve Sarbatly, 2012). Biyoyakıt verimleri de (>12000 L/ha) karasal bitkilere göre oldukça yüksektir (Bahadar ve Bilal Khan, 2013). Trigliserit üretiminde ise karasal bitkilere göre 45-220 kat daha fazla

verim elde edilmektedir (Huber ve ark., 2006). Ekin bazlı biyoyakıtların üretimi için çok fazla arazi alanına ihtiyaç duyulurken, mikroalg yetiştiriciliği için verimli tarımsal topraklara ihtiyaç yoktur. Üretimi mevsimsel değildir, her mevsim üretilip günlük olarak hasat edilebilir. Bazı mikroalg cinsleri, lipit üretimini önemli ölçüde artırabilmektedir. Hatta mikroalg suşları, çevreye olumsuz etkileri olmadan istenen yağ asitlerini üretmek için genetik olarak yapılandırılabilir. Mikroalgler bu durumda biyokütle enerjisi olarak en mantıklı alternatif çözüm 3. nesil enerji kaynağı olarak dikkate alınmalıdır. Çünkü artan gıda ihtiyacı nedeniyle 1. nesil hammadde kaynağı biyodizel üretimi için sürdürülebilir değildir.

Mikroalglerden elde edilen biyoyakıtlar diğer tüm uygulamalarla karşılaştırıldığında, yüksek ham petrol fiyatları da göz önüne alındığında, mikroalg biyoteknolojisinde cazip bir seçenektir. Biyodizel, makine ve çevre için birçok avantajı nedeniyle petrol bazlı dizel yakıt için uygun bir alternatiftir (Perez-Garcia ve ark., 2011). Mikroalglerden biyokimyasal yöntemlerle elektrik, etanol, hidrojen, metan ve biyodizel üretilbildiği gibi termokimyasal yöntemler kullanılarak da sentez gazı, biyolojik kömür, biyodizel ve elektrik üretilmektedir (Elcik ve Çakmakçı, 2017). Yakın zamanda mikroalglerden elde edilen biyoyakıtlar, her açıdan geniş ölçüde gözden geçirilmiştir (Chisti, 2007, 2008; Li ve ark., 2008a, b; Hossain ve ark., 2008; Song ve ark., 2008; Khan ve ark., 2009; Huang ve ark., 2010; Mata ve ark., 2010; Sivakumar ve ark., 2010; Perez-Garcia ve ark., 2011; Özçimen ve ark., 2017).

Çevresel stres faktörleri altında lipit, karotenoid ve alg biyokütle üretimi artırılabilir (Mata ve ark., 2010; Mulders ve ark., 2014; González ve ark., 2015). Sıfır değerlikli demir nanopartikülleri (nano-Fe<sup>0</sup>) son yıllarda atık sulardan kirleticileri uzaklaştırmak için kullanılan zararsız ve pahalı olmayan bir nanoteknoloji ürünüdür. Demirin ucuz, toksik olmaması ve çevreye uygun olması gibi özellikleri nedeniyle nano-Fe<sup>0</sup> partiküllerinin kullanımı cazip bir arıtım alternatifidir. Nanopartiküllerin reaktivitesi, yüzey alanının artması ile artar. Son yıllarda suda bulunan klorlu bileşikler, pestisitler, ağır metaller, nitrat ve patlayıcıları içeren çeşitli yeraltı suyu kirleticilerini gidermek için mikropartiküller (mikro-Fe<sup>0</sup>) ve nano-Fe<sup>0</sup> partikülleri kullanılmaktadır. Küçük partikül boyutu ve yüksek reaktivitesi nedeniyle kirlenmiş toprakların, sedimentlerin ve biyoyakıtların ıslahında da kullanılmaktadır (Türk ve Hanay, 2017).

Yenilenemeyen fosil yakıt rezervlerinin tükenmesi ve artan çevresel sorunlar, karbon nötr veya yenilenebilir olan sürdürülebilir enerji kaynakları arayışını teşvik etmiştir. Bu bağlamda, fotosentetik mikroalgler umut verici bir enerji kaynağı olarak görülmektedir. Mikroalgler, yüksek özgül büyüme oranlarına sahiptir ve bazı türler kolayca biyodizele dönüştürülebilir yüksek lipit içeriği sunarlar. Çalışmamızda doğal ortamdan (Turnasuyu Çayı) izole edilen mikroskobik yeşil alg *Chlorella* sp. türünün farklı deney ortamlarında (ototrofik, miksotrofik ve heterotrofik) kültürü yapıp yağ içeriğinin incelenmesi hedeflenmiştir. *Chlorella* sp. türünün kültüründe çevresel stres faktörü olarak da nano-Fe<sup>0</sup> partikülleri kullanılmıştır. Bu türün seçilme sebebi, çoğu tatlısu ortamında bulanabilmesi ve aynı zamanda tedarikçi laboratuvarlardan veya şirketlerden stok kültürlerinin kolayca temin edilebilir olmasıdır. Bu tür, laboratuvarlarda çokça kullanılmış bir test organizmasıdır. Aynı zamanda *C. vulgaris* türü gıda takviyesi olarak üretimi yapılan, yüksek protein içeriğine sahip bir türdür.

Çalışmamızın başlıca amaçlarını şu şekilde sıralayabiliriz: *i*) mikroalgin izolasyonu, *ii*) mikroalgden biyokütle üretimi, *iii*) biyokütlenin arttırılmasında kullanılan yöntemler ve *iv*) farklı kültür ortamlarındaki mikroalgin yağ asidi kompozisyonunun incelenmesi. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında, doğadan izole edilen mikroskobik yeşil alg *Chlorella* sp.'nin sıfır değerlikli demir nanopartikülü (nano-Fe<sup>0</sup>) içeren ototrofik, miksotrofik ve heterotrofik koşullarda, aksenik yığın kültürü yapıp lipit içeriği incelenmiştir. Çalışma sonucunda, biyodizel üretimi için *Chlorella* sp.'nin farklı ortamlardaki yağ asitleri kompozisyonu tespit edilmiştir. *Chlorella* sp. doğal suşunun yenilenebilir biyokütle enerji kaynağı olarak kullanılması umulmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Algler ve alglerden elde edilen ürünler sanayinin birçok alanında kullanılan biyolojik orijinli doğal kaynaklardır. Algler atıksu arıtımı, gübre, insan gıdası, tek hücre proteini, hayvan yemi, tıp, eczacılık, kozmetik, ekotoksikoloji gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Son yıllarda alg lipidlerinden elde edilen ve enerji sektöründe gelecek için umut verici bir kaynak olarak görülen algler 3. nesil enerji kaynakları içinde yer alır. Yenilenebilir ve toksik olmayan biyoyakıt kaynağı olarak alglerin mevcut potansiyelleri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Mikroalgler yüksek biyokütle lipit üretimi ve çevre dostu olmaları nedeniyle alternatif bir kaynaktır. Mikroalgler üzerine geniş çaplı araştırmalar yapılmış ve çok çeşitli süreçlerde nasıl kullanılabilceği ya da birçok pratik ve ekonomik önemli ürünün nasıl üretilbileceği araştırılmıştır (Al-Iwayzy, 2014; Al-Shammari, 2017; Chen ve ark., 2018; Durmaz ve Temli, 2018; Yaşar, 2018; Yaşar ve Altun 2018; Deshmukh ve ark., 2019; León-Vaz ve ark. 2019). 1970'lerdeki petrol krizinde yenilenebilir enerji için mikroalgin kullanılmasına olan ilgi artmıştır (Spolaore ve ark., 2006).

Mikroalgler, farklı organik maddelere uyum sağlayabilir ve bu durum biyodizel üretiminin genel maliyetini azaltma fırsatı sağlayabilir. Özellikle organik substratlar, hayvan ve belediye atıksuları, anaerobik sindirimden çıkan atıklar, gıda işleme atıkları, vb. gibi atık sularda gelişebilirler. Bu yönüyle mikroalglerden biyokütle üretimi oldukça avantajlıdır.

Mikroalgler yapılarındaki yağı üretirken, yağ bitkilerine göre, güneş ışığını ve CO<sub>2</sub>'i daha etkili kullanan organizmalardır. Bölünme potansiyelleri ve büyüme hızları da oldukça yüksektir. Hızlı büyüme sırasında mikroalgin biyokütleyi ikiye katlama süresi 3.5 saattir. Bu nedenlerle, mikroalgler, geniş tarımı yapılan yağ bitkilerine oranla, küçük alanlarda, daha büyük hızda ve daha düşük maliyetlerle üretilbilme olanağı vardır (Çılgin, 2015). Mikroalglerden yakıt eldesi yeni bir fikir olmamakla birlikte, son zamanlarda petrol fiyatlarının artışı, küresel ısınmanın nedenlerinden biri olan yakıtlardan çıkan gazların zarar verici özellikleri ve su sıkıntısı konuya olan ilgiyi giderek artırmıştır. Yeni bir kaynak olarak düşünülen mikroalgler, tek başına biyodizel için kullanılabilir potansiyele sahiptir (Chisti ve ark., 2007).

## 2.1. Yağların (Lipitlerin) Kimyası

Yağlar (lipitler) canlı organizmaların en önemli enerji kaynaklarından birisidir. Lipitler suda çözünmeyen organik biyomoleküllerdir. Hücre ve dokulardan ancak kloroform, eter ve benzen gibi polar olmayan organik solventler kullanılarak elde edilmektedirler. Lipitleri birkaç sınıfa ayırarak incelemek mümkündür. Lipitlerin her bir grubuna ayrı bir özellik kazandıran ve onların yapılarının esasını oluşturan uzun hidrokarbon zincirlerdir. Lipitlerin canlı hayatında birçok biyolojik fonksiyonu bulunmaktadır.

- Hücre membranının yapısal komponenti olarak rol oynarlar.
- Biyolojik enerji için depo ve transport maddesi olarak kullanılırlar.
- Pek çok canlı organizmanın dışında koruyucu bir kılıf teşkil ederler.
- Hücre-yüzey komponenti olarak hücrelerin birbirini tanınmasında, tür özgüllüğünde ve doku immünitesinde önemli roller oynamaktadırlar.

Hormonlar ve vitaminler gibi bazı maddeler de lipitler sınıfına konulmakla beraber önemli biyolojik aktivitesi olan moleküllerdir. Lipitler biyolojik bakımdan ayrı moleküller olmakla beraber, proteinlerle kovalent veya zayıf bağlar yaparak lipoproteinleri, karbonhidratlara bağlanarak glikolipitleri oluşturmaktadırlar (Gözükara, 1989).

### 2.1.1 Lipitlerin Sınıflandırılması

Lipitleri birçok şekilde sınıflandırmak mümkündür. Ana iskelet yapısı esas alınarak yapılan sınıflandırmada lipitler iki ana sınıfa ayrılmıştır (Gözükara, 1989):

- *Kompleks lipitler:* Bu sınıf lipitlerde esas madde yağ asidi olmakla beraber, onunla çeşitli şekilde akil-gliseroller, fosfogliseridler, sfingolipitler ve mumların birleşmesiyle kompleks lipitler meydana gelmiştir. Bunlara, sabun yapılabilir lipitler adı da verilmektedir. Çünkü bunlar yağ asitlerinin tuzları haline dönüştürülerek sabun yapılmaktadır.
- *Basit lipitler:* Bu tip lipitler yağ asidi içermediği gibi bunlardan sabun da yapılmaz. Bu grupta terpenler, steroller, steroidler ve prostaglandinler yer alır.

### 2.1.2 Yağ Asitleri

Yağ asitlerinin pek çoğu organizmada hücresel yapı elemanı olarak kompleks lipitler halinde bulunmakta, ancak çok az bir kısmı ise hücre ve dokularda serbest yağ asidi

halinde bulunmaktadır. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan yaklaşık 100'den fazla yağ asiti izole edilmiştir. Bütün yağ asitleri bir ucunda metil grubu, uzun hidrokarbon zinciri ve diğer uca ise karboksil grubu ihtiva etmektedir. Hidrokarbon zinciri ya palmitik asitte olduğu gibi doymuştur veya oleik asitte olduğu gibi bir veya birden fazla çift bağ ihtiva etmektedir. Yağ asitleri ya ihtiva ettikleri karbon zinciri uzunluğu veya ihtiva ettikleri çift bağ sayısı ile birbirinden ayrılmaktadır. Doymuş yağ asitlerinde karbon (C) atomları arasında tek bağ bulunur ve genelde 4-18 C atomu kapsarlar. Doymamış yağ asitlerinde ise C atomları arasında çift bağ bulunur ve 16-20 C atomu kapsarlar (Gözükara, 1989).

Yağ asitleri genellikle kısa sembollerle ifade edilmektedir. Bu sembollerde yağ asitlerinin ihtiva ettiği karbon sayısı belirtilir ve ihtiva ettiği çift bağın sayısı ve konfigürasyonu ifade edilir. Örneğin onaltı karbona sahip palmitik asit, 16:0 şeklinde gösterilir. Onsekiz karbon atomuna ve çift bağa sahip oleik asit ise 18:1 $\Delta^9$  şeklinde ifade edilir. Semboldeki birinci rakam (18) yağ asitinde bulunan karbon sayısını, ikinci rakam (1) çift bağların sayısını ve  $\Delta$  bu bağın 9 ila 10'uncu karbon arasında bulunduğunu ve çift bağların geometrik pozisyonunu (cis-trans konfigürasyonu) ifade etmektedir. Çizelge 2.1'de bazı doğal olarak meydana gelen önemli doymuş ve doymamış yağ asitlerinin adları ve karbon atomu sayıları gösterilmektedir (Gözükara, 1989).

Yağ asitleri zincir yapısına göre sınıflandırıldığında; kısa zincirli, orta zincirli, uzun zincirli ve çok uzun zincirli yağ asitleri olarak gruplandırılmaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri, 2 C sayısından 10 C sayına kadar olan yağ asitlerini kapsar. Orta zincirli yağ asitleri 12 C-14 C, uzun zincirli yağ asitleri 16 C-18 C, çok uzun zincirli yağ asitleri ise >18 C yağ asitlerinden oluşmaktadır (Gurr ve ark., 2016).



**Çizelge 2.1** Doğal Olarak Meydana Gelen Bazı Yağ Asitleri (Gözükara, 1989)

Karbon Atomu Sayısı	Genel Adı	Sistematik Adı
1	Folmik Asit	---
2	Asetik Asit	Etanoik Asit
3	Propionik Asit	n-Propionik Asit
4	n-Butirik Asit	n-Butanoik Asit
6	Kaproik Asit	n-Heksanoik Asit
8	Kaprilik Asit	n-Oktanoik Asit
9	Pelargonik Asit	n-Nonanoik Asit
10	Kaprik Asit	n-Dekanoik Asit
12	Laurik Asit	n-Dodekanoik Asit
14	Miristik Asit	n-Tetradekanoik Asit
16	Palmitik Asit	n-Heksadekanoik Asit
18	Stearik Asit	n-Oktadekanoik Asit
20	Arakidik Asit	n-Eikosenoik Asit
22	Behenik Asit	n-Dokosanik Asit
24	Lignoserik Asit	n-Tetrakosanoik Asit
26	Serotik Asit	n-Heksakosanoik Asit
28	Montanik Asit	n-Oktakosanoik Asit

**DOYMAMIŞ YAĞ ASİTLERİ**

16	Palmitoleik Asit	9rHeksadekenoik Asit
18	Oleik Asit	Cis-9-Oktadkenoik Asit
18	Linoleik Asit	Cis,Cis12,12-Oktadekadienoik Asit
18	$\alpha$ – Linolenik Asit	9,12,15-Oktadekatrienoik Asit
18	$\gamma$ - Linolenik Asit	6,9,12-Oktadekatrienoik Asit
18	Eleostearik Asit	9,11,13-Oktadekatrienoik Asit

**Çizelge 2.1** Doğal Olarak Meydana Gelen Bazı Yağ Asitleri (Gözükara, 1989)  
(devamı)

20	Arakidonik Asit	5,8,11,14-Eikosatetraenoik Asit
BAZI NADİR YAĞ ASİTLERİ		
16	Trans-Heksadekenoik Asit	-
18	Elaidik Asit	-
19	Laktobasillik Asit	-
19	Tüberkülostearik Asit	-
24	Serebronik Asit	-

Mikroalglerin temel bileşenlerini karbonhidratlar (%6-57) (Yeh ve ark., 2010; Hariskos ve Posten, 2014), lipitler (%4-55) ve proteinler oluşturur (%10-63) (Miao ve Wu, 2004; Becker, 2007). Bazı mikroalg türlerinin kuru ağırlığında %70'den fazla lipit bulunduğu bildirilmiştir (Suali ve Sarbatly, 2012; Bahadar ve Khan, 2013). Mikroalgler, yüksek lipit içerikleri (kuru ağırlığın %20 ila %50'si) ve yüksek büyüme oranları ile biyodizel üretimi için umut verici bir yağ kaynağı olarak bilinir (Chisti, 2007; Mercer ve Armenta, 2011). Alglerin biyodizel üretiminde bir substrat olarak kullanımı halen yeni olmakla birlikte, bu işlemin etkinliğini artırmak için hala üstesinden gelmesi gereken engeller bulunmaktadır. Ancak, 0.5 hektarlık bir alan üzerinde karşılaştırıldığında, alglerden yağ içeriği çok zengin olan soya fasulyesine oranla 250 kat daha fazla yağ verimi elde edilmekte ve alglerden palm yağına oranla 7 ila 31 kat daha fazla yağ üretilebilmektedir. Mikroalglerin yağ veriminin çok fazla oluşu alglerden biyodizel üretiminde keşfedilen en önemli noktadır (Jarméus, 2013). Mikroalgler bünyesinde yaklaşık %80'den fazla miktarda bulunan oleik asit (C18:1) ve palmitoleik asit (C16:1) gibi yağ asitleri sayesinde yüksek enerji içerirler. Bu sebeple mikroalgleri yakıtla çevirmek oldukça elverişlidir (Eliçin ve ark., 2009). Çizelge 2.2'de mikroorganizmaların biyodizel üretiminde birinci derecede önemli olan yağ asit kompozisyonları görülmektedir.

**Çizelge 2.2** Yağ Asit Kompozisyonları (Ağırlık/Yağ) (Meng ve ark., 2009)

	<b>16:0</b>	<b>16:1</b>	<b>18:0</b>	<b>18:1</b>	<b>18:2</b>	<b>18:3</b>
Mikroalg	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
Maya	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
Mantar	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
Bakteri	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

Son yarı yüzyılda mikroalg yağlarının yenilenebilir enerji üretiminde önemli bir alternatif kaynak olduğu görülmektedir. Mikroalgler 3. nesil biyoyakıt teknolojisinde kullanılan ve biyodizel üretiminde yüksek verim (biyokütle lipit üretimi) ve enerji sağlayan önemli bir kaynaktır. Ayrıca, çevre dostu olmaları dolayısıyla da umut vericidirler.

Son yıllarda nanoteknolojinin gelişmesiyle nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller de fen ve mühendislik alanlarının çoğunda büyük önem kazanmıştır ve kullanılmaktadır. Çalışmamızda, lipit verimine etkisini değerlendirmek için mikro yeşil alg *Chlorella* sp. kültürüne nano-Fe<sup>0</sup> partikülü kullanılmıştır. Mikroalgler üzerinde nanopartiküllerle yapılan çalışmaların geneli toksisite çalışmalarıdır. Nano-Fe<sup>0</sup> partikülleri ise diğer metal nanopartiküllerine göre çok az çalışılmıştır. Daha çok suların remediasyonunda kullanılmaktadır. Mikroalglerde lipit üretiminin artırılması üzerinde bu nanopartikülün etkisinin incelendiği yeteri kadar literatür olmaması ve enerji ihtiyacı çok fazla olan Türkiye’de alternatif bir biyokütle enerji kaynağı oluşturulması ümidiyle, çalışmamızın yapılacak yeni araştırmalara katkı sağlaması düşünülmüştür. Çalışmada farklı çevresel koşullar altında, yani nanopartikül içeren fotoototrof, mikсотrof ve heterotrof koşullarda *Chlorella* sp.’nin yağ kompozisyonuna etkisi tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin organizmalara etkisi türe özgü olsa da türün yaşam ortamlarına adaptasyonları tepkilerinin farklılaşmasına sebep olabilir. Çalışmada kullanılan doğal suş *Chlorella* sp. türünün değişen ortam koşullarına verebileceği tepkilerin ve lipit veriminin anlaşılmasına bütüncül bir yaklaşım getirecektir.

Bazı mikroalg türlerinin lipit metabolizmalarının efektifliği çevresel koşullarla modifiye edilebilir. Mikroalg bazlı yağlardan elde edilen biyodizeli endüstriyel bağlamda üretmek isteyen birinin farkında olması gereken şey şu ki yüksek yağ oranı elde etmek için dışarıdan kuvvet veya lipit indüksiyon tekniklerinin uygulanması gerekmektedir. Birçok mikroalg türü ideal büyüme koşullarında geliştirilmesine rağmen lipitlerinin gıdasal değeri yüksek olmakta, ancak biyodizel için ideal seviyenin altında kalmaktadır. Bununla birlikte çoğu alg türü dış kuvvetlerle ve lipit indüksiyonlarıyla biyodizel için çok cazip hale gelmektedir. Örneğin tatlısu mikroalg türü *C. vulgaris*'in lipit içeriği düşük azot medyumlarıyla %40'a kadar arttırılabilmektedir. Buna ek olarak kadmiyum, demir, bakır ve çinko gibi ağır metallere de bazı mikroalglerin lipit içeriğini arttırdığı bilinmektedir. *C. vulgaris*'e  $Fe^{3+}$  eklentisi biyokütlenin kuru ağırlığındaki toplam yağ oranını %56.6'ya kadar arttırdığı görülmüştür (Sharma ve ark., 2012).

*Chlorella*, tek hücreli, 3 ila 12 µm çapında elipsoidal bir yapıya sahip yeşil bir algdır. *Chlorella* türleri, dünya çapında birçok durumda büyüeyebilen güçlü mikroorganizmalardır. Biyodizel üretimi için lipitleri biriktiren karbon kaynağı olarak sıfır veya negatif maliyetlerle atık kaynaklardan glikoz, gliserol, asetat veya atık kaynaklardan elde edilen diğer organik bileşiklerle sağlanan heterotrofik ve mikotrofik büyümeler için bir örnek olarak kullanılabilirler (Heredia-Arroyo ve ark., 2010). *Chlorella* türlerinin, farklı kültür koşullarına uyum sağlamada yüksek esnekliğe sahip oldukları ve biyoyakıt hammaddesi olarak fototrofik ve heterotrofik koşullar altında yetiştirilebilen mikroalg türleri arasında olduğu bildirilmiştir (Xu ve ark., 2006; Xiong ve ark., 2008). Heterotrofik *C. protothecoides* %40-60 oranında lipit, %10-28 oranında protein, %11-15 oranında karbonhidrat ve %6 kül içerir (Xu ve ark., 2006).

Mikroalgin kimyasal kompozisyonu çoğunlukla türe ve kültür şartlarına göre değişiklik göstermektedir (Zhu, 2015). Mikroalgler, genellikle ototrofik olarak yaşarlar, yani ışığı ve inorganik maddeleri kullanarak fotosentez yapıp biyokütlesini artırırlar. Ancak, bazı türler spesifik özelliklere sahiptir. Ototrofik koşulların dışında heterotrofik (ışıksız ortamda hazır beslenme) veya miksotrofik (ışıklı ortamda karışık beslenme) olarak da gelişebilirler. Örneğin, mikro yeşil alglerden *Haematococcus pluviialis* (Kobayashi ve ark., 1992), *Chlorella pyrenoidosa* (Wang ve ark., 2012), *C.*

*sorokiniana* (Kim ve ark., 2013), *C. vulgaris* (Mitra ve ark., 2012) ototrofik, heterotrofik ve mikсотrofik şartlarda gelişebilmektedir.

Heterotrofik yetiştirme üretkenliği arttırmanın en pratik ve umut verici yolu olarak kabul edilmektedir. Ototrofik büyüme koşulları altında, *Chlorella vulgaris*'in hem biyokütle hem de lipit verimleri heterotrofik büyümeden daha düşük kaydedilmiştir (Liang ve ark., 2009).

Mayo ve Noike (1994), granüler glikozun günlük 25-700 mg/L arasında değişen konsantrasyonunda organik karbon kaynağı olarak *Chlorella vulgaris* türüne verilmesinin yükleme hızı ile arttığını, ancak aşırı yüklemenin alg sağlığına zarar verdiğini bildirmiştir.

Bir başka çalışmada, ototrofik şartlar altında büyütülen *Chlorella protothecoides*, kültürlerde ışığın ve CO<sub>2</sub> kullanımının büyüme-uyarıcı etkilerinin, neredeyse aynı spesifik büyüme oranlarına sahip olan heterotrofik ve mikсотrofik kültürlerden daha düşük bir büyüme hızına ve daha düşük nihai hücre konsantrasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Heredia-Arroyo ve ark., 2010).

Demir, yer kabuğunun dördüncü en bol bulunan elementidir (%5.63) ve yaygın birçok olarak kullanılmaktadır. Ancak, bir nanoparçacık olarak demir; kobalt, nikel, altın ve platin gibi diğer metallerle karşılaştırıldığında bir ölçüde ihmal edilmiştir. Demir çok güçlü manyetik ve katalitik özellikleri de dahil olmak üzere nano ölçekte sunacak çok özelliklere sahiptir (Huber, 2005). Son çalışmalarda demir nanoparçacıkları farklı uygulama alanlarında kullanılmaya başlanmış ve bu alanda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Son yıllarda yeraltı sularından ve atık sulardan kirleticilerin başarılı bir şekilde arıtımında sıfır değerlikli demir nanopartiküllerinin kullanımının arttığı görülmektedir (Fu ve ark., 2014). Sıfır değerlikli demir kullanırken partikül boyutunun oldukça önemli olduğu görülmüştür. Sıfır değerlikli demir nanopartiküllerinin fosfat uzaklaştırımı için kullanıldığı bir çalışmada, verimliliğin mikro ölçekli sıfır değerlikli demir partiküllerine oranla 13.9 kere daha fazla etkili olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmada 10 m<sup>2</sup>/L olan yüzey alanında fosfat uzaklaştırılması için kullanılan sıfır değerlikli demir nanopartikülleri (yaklaşık 16 nm) 30 dakikalık bir süre içerisinde yaklaşık %96'lık uzaklaştırım gerçekleştirirken, mikro ölçekli sıfır

değerlikli demir partikülleri (<10 µm) %23'lük bir fosfat ( $C_0 = 5 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P/L}$ ) uzaklaştırımı gerçekleştirmiştir (Almeelbi ve Bezbaruah, 2012).

Alg biyoteknolojisinde nanomalzemelerin uygulanması henüz çok yenidir. Alg kültürlerinde nanopartiküllerin uygulanmasını kolaylaştırmak için, bunların özelliklerinin deneysel yaklaşımları ve kontrolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, alglerden biyodizel üretiminde nanopartiküller uygulandığında risklerin çok daha düşük olduğu düşünülmektedir. Fakat yüksek konsantrasyonlu nanoparçacıkların alg veya biyokütle tarafından emilmesinin ya da gıda veya ilaçlarda kullanıldığında halk sağlığı risklerine neden olabileceğinin dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir (He ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda sıfır-değerlikli demir nanoparçacıklarının (5.1 mg/L) çeşitli yeşil alg ve *Eustigmatophyceae* alglerinin büyümesini artırdığı tespit edilmiştir (Pádrová ve ark., 2015).

Pádrová ve ark. (2015) nano-Fe<sup>0</sup> partikülü Nanofer 25 (katkı maddesi içermeyen nanopartiküllerin saf su süspansiyonu) ve Nanofer 25S (Nanoiron Ltd., Rajhrad, Çekya) ile yaptıkları çalışmada, Nanofer 25'in büyüme inhibisyonunun Nanofer 25S'den düşük olduğunu göstermişlerdir.

Padrova ve ark. (2015) yeşil mikroalg *Parachlorella kessleri* ile yaptığı çalışmada, kontrol kültürü ile nano-Fe<sup>0</sup> partikülleri eklenmiş (5.1 mg/L konsantrasyonlu) kültürü karşılaştırdığında, nano-Fe<sup>0</sup> partikülü bulunan kültürün hem biyokütlesinin (19.4 g/L'den 29.3 g/L'ye) hem de yağ içeriğinin (%27.1'den %30.9'a) artış gösterdiğini bildirmiştir. Aynı konsantrasyonda nano-Fe<sup>0</sup> partikülleri eklenmiş *Trachydiscus minutus* kültüründe kontrol kültürüne nazaran biyokütlenin 10.4'ten 13.7 g/L'ye, yağ içeriğinin ise %26'dan %35'e yükseldiği kaydedilmiştir. Siyanobakteri türü olan *Arthrospira maxima* türünde ise nano-Fe<sup>0</sup> partiküllerine maruz bırakıldığında yağ içerikleri artarken, biyokütle oranında değişim olmamıştır. Toplam yağ oranına olumlu etkisiyle birlikte değerlendirildiğinde, bu demir kaynağı (sıfır değerlikli demir nanopartikülleri) yağ asitlerinin üretimini arttırmada etkin rol oynayabilir (Padrova ve ark., 2015).

Bharte ve Desai (2019), *Chlorella* türlerine demir oksit nanopartikülü eklentisinin manyetik hasat yönetiminde hasat maliyetlerini düşürmekle birlikte enerji ve zaman tasarrufu da sağlamakta olduğunu bildirmişlerdir.

Yağ asitlerinin kompozisyonu (zincir uzunluğu, çift bağ sayıları) kalite ve özellikleri bakımından ilgili trigliseritlerden üretilen biyodizeli tanımlar (setan sayısı, yoğunluk, viskozite, kayganlık, ısıl değer, NO<sub>x</sub> emisyonları). Metal stresine karşı yağ asitlerinin kompozisyonunu değiştirmek için mikroalg hücreleri biyodizel üretiminin kalitesini ve özelliklerini arzu edilen seviyeye çekmek için uygulanabilir. Yakın dönemde, nano-Fe<sup>0</sup> partiküllerinin *Arthrospira maxima* (mavi-yeşil alg), *Desmodesmus subspicatus* (yeşil alg) ve *Parachlorella kessleri* (yeşil alg) kültürlerinde lipit üretimini sırasıyla %40, %2.75 ve %60 arttırdığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda nano-Fe<sup>0</sup> partiküllerinin (5.1 mg/L) *Desmodesmus subspicatus* türünün büyümesini %73 oranında arttırdığı rapor edilmiştir. Metal stresi bununla beraber mikroalg hücrelerinin yağ asiti profillerinde değişikliğe sebep olmaktadır (Miazek ve ark., 2015).

Subramaniyam ve ark. (2016) atıksuda yetiştirdikleri *Chlorella* sp.'nin azot, toplam fosfor ve toplam organik karbon gibi kirleticileri tamamen temizlediği ve bu stoklardan yararlandığını bildirmiştir. Çalışmada, *Chlorella* sp. biyokütlesi organik küre şeklinde demir nanopartikülleri sentezlemiş ve ağır metal kirliliğine çare olma yolunda bu türün büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir.

Alglerin mevcut lipit içeriğini artırmaya yönelik incelenen çevresel parametreler çoğunlukla ışık (şiddeti, süresi, rengi, mesafesi gibi), sıcaklık ve besi ortamlarıdır (farklı kültür ortamları, nütrient eksikliği veya fazlalığı). Ancak farklı türler farklı değişkenlere farklı şekillerde yanıt verirler.

Tsuzuki ve ark. (1990), farklı CO<sub>2</sub> konsantrasyonu uygulanan *Chlorella vulgaris* türünde yağ asitleri içeriğini incelemişler, CO<sub>2</sub> miktarı artışının yağ asitleri oranını arttırdığını ve linoleik asit ile  $\alpha$ -linoleik asit oranının önemli derecede değiştiğini tespit etmişlerdir.

Loseva ve ark. (1998), yüksek sıcaklığın (45 °C) ve yüksek tuz oranının (NaCl, 450  $\mu$ M) *Chlorella* hücrelerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada belirli aralıklarda yüksek sıcaklık ve yüksek NaCl uygulamaları yapılmış ve sonra tekrar normal koşullar sağlanarak *Chlorella* hücrelerinin durumu gözlenmiştir. Çalışmada canlılığın stres faktörlerine adaptasyon sürecinin uzunluğu ortaya çıkarılmıştır.

Illman ve ark. (2000), eksik azot uygulamasının büyüme ve lipit içeriğine etkisini farklı *Chlorella* türlerinde (*C. emersonii*, *C. minutissima*, *C. protothecoides*, *C. vulgaris*)

incelemişlerdir. Çalışma sonunda hem normal koşullarda hem de düşük N uygulamasında *C. vulgaris* türünün çalışılan diğer türlere göre en iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir.

Scragg ve Shales (2003), dizel motorların yağları gibi iş görecektir, parça içerikli uzun süre korunan yakıtlar üzerinde çalışmışlardır. Birçok alg, örneğin *Chlorella vulgaris* gibi tek hücreli ve 5-10 µm boyutundaki tür, emülsiyonun içeriği bakımından uygun bulunmuştur. Araştırma sonucunda değişiklik yapılmayan tek silindirik dizel bir motorda *C. vulgaris*'in yakıt olarak kullanılabilirliğini belirlemişlerdir.

Bazı mikroalglerin heterotrofik gelişimi, biyokütlenin ve lipit gibi bazı metabolitlerin verimli üretimi için kullanılmıştır (Shi et al., 2000, 2002; Wen et al., 2002). Miao ve Wu (2006), *Chlorella protothecoides* türünden yüksek kalitede biyodizel üretimi için entegre bir yöntem ortaya koymuşlardır. *C. protothecoides*'in heterotrofik büyümesinin, yüksek lipit içeriğinin (%55) hücrelerde birikmesine neden olduğunu, hücre yoğunluğunun ise önemli düzeyde arttığı (15.5 g/L) belirlenmiştir. Büyük miktarda mikroalg yağı, bu heterotrofik hücrelerden n-heksan kullanılarak verimli bir şekilde ekstrakte edilmiştir.

Liu ve ark. (2008), yüksek demir konsantrasyonunun *C. vulgaris* türünde önemli ölçüde lipit birikimi oluşturabileceğini göstermiştir.

Bulut (2009), *C. vulgaris* türünün yağ içeriği ve protein miktarı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla besin eksikliği ve farklı azot kaynağı faktörlerini kullanmıştır. Çalışmada %50 N, %100 N, %50 P + %50 N, %50 P eksikliği ve nitrit eklemesi uygulanmıştır. Deney sonunda en yüksek yağ içeriği %100 N eksikliği uygulanan grupta tespit edilmiştir. Bu grupta kuru madde 0.18 g/L, klorofil-a değeri ise 9.252 mg/L olarak saptanmıştır.

Farklı deniz ve tatlısu mikroalg türlerinin üretimi ve yağ içerikleri incelendiğinde *Chlorella*'nın biyodizel üretimi için iyi bir seçenek olduğu görülmektedir. Çünkü lipit içeriği 2.0 – 63.0 (% kuru ağırlık biyokütle), lipit üretimi 11.2 – 50.0 (mg/L/gün), biyokütlenin hacimsel verimliliği 0.02 – 7.70 (g/L/gün), biyokütlenin bölgesel verimliliği 0.57 – 130 (g/m<sup>2</sup>/gün) arasındadır (Mata ve ark., 2010).



Düşük maliyetli alg yağı üretimi geliştirmek için mikroalg, şeker ve organik asitler gibi organik karbonların karbon kaynağı olarak işlev gördüğü heterotrofik koşullarda kültürlenebilir. Bu kültür modu ışık gereksinimini ortadan kaldırır ve bu nedenle hücre yoğunluğunu ve üretkenliğini büyük ölçüde artırır (Liang et al., 2009).

Ototrofik, heterotrofik ve karbondioksit koşullarında *Chlorella sorokiniana*'nın büyüme hızı, organik karbon ve besin giderim etkinliğinin incelendiği çalışmada, mikroalglerin büyüme oranı, N ve P giderimi heterotrofik koşullar altında büyütülen kültürde anlamlı olarak daha yüksek kaydedilmiştir (Kim ve ark., 2013).

Hızlı biyokütle birikimini kolaylaştıracak ve daha sonra maksimum lipit üretkenliği elde etmek için lipit birikimini indükleyecek bir besin yönetimi stratejisinin geliştirilmesi gerekmektedir (Wu ve ark., 2012). Mikroalglerin heterotrofik kültürü uzun zincirli yağ asitleri kaynağı için iyi bir yoldur (Wen ve Chen, 2003). Hatta heterotrofik koşullarda mikroalg yetiştiriciliği daha ucuz olmaktadır. Ancak mikroalglerden biyodizel üretimi için şimdiye kadar bu yöntem çok az tercih edilmiştir.

Al-Iwayzy ve ark. (2014), kontrol gruplarına nazaran FeCl<sub>3</sub> katılmış *C. vulgaris* numunesinin sonuçları, lipit içeriğinin ve lipit verimliliğinin sırasıyla %8.9'dan %19.3'e ve 0.74 mg/L ila 2.19 mg/L arasında anlamlı bir şekilde arttırdığını bildirmişlerdir.

Glikoz, mikroalg yetiştiriciliğinde karbon kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, ancak heterotrofik büyüme için CO<sub>2</sub> yerine glikoz ihtiyacı, küresel ısınma sorunu açısından daha az ilgi çekmektedir (Widjaja et al., 2009). Yüksek lipit üretimi için en uygun glikoz konsantrasyonunun %2 olduğu bildirilmiştir (Suali ve Sarbatly, 2012).

Mikroalglerden elde edilen biyodizel üretiminin daha çok fotoototrofik yetiştirme üzerine yoğunlaştığı bildirilmiş, miksotrofik yetiştirme nadiren araştırılmıştır. Wang ve ark. (2013), *Chlorella sorokiniana*'nın biyokütle verimi, lipit içeriği ve lipit verimini fotoototrofik, heterotrofik ve miksotrofik yetiştirme yöntemleri ile karşılaştırmıştır. Glikoz, beş farklı konsantrasyonda (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0; %w/v) organik karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, glikozun kültürlerde mikroalg büyümesini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. En yüksek biyokütle verimi, 1.178

g/L/gün ve en yüksek lipit verimi olan 582 mg/L/gün, %2.0 glikoz ilavesi ile mikсотrofik kültürde gözlenmiştir. *C. sorokiniana*'nın lipit içeriği, üstel faza göre durağan fazda daha yüksek kaydedilmiştir. En yüksek lipit içeriği %49.37 ile %2.0 mikсотrofik kültürde, %47.09 oranı ile de %2.0 heterotrofik kültürde gözlenmiştir.

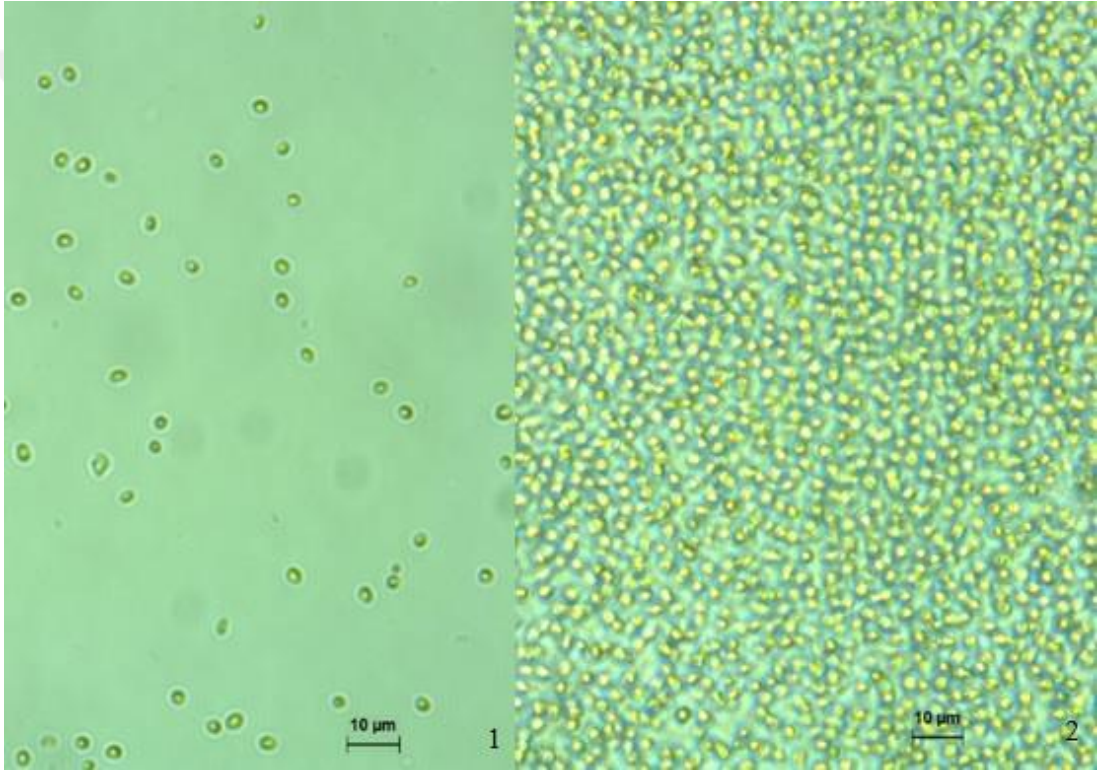
Moleküler seviyede araştırma, yağ asiti bileşimini iyileştirmek ve yüksek kalitede biyodizel üretmek için yararlı bir araç olabilir (Dünahay ve ark., 1992)

Biyodizel üretimi için en uygun mikroalg türlerinin seçiminde sadece yüksek yağ içeriği ve yüksek büyüme hızı olan mikroalg türlerinin belirlenmesi değil, bununla birlikte, hücre içinde mevcut yağ içeriğinin arttırılmasını uyaran stres faktörlerinin de hesaba katılması gerekir. Mikroalglerin spesifik çevresel koşullar altında gelişebilme yetenekleri vardır. Tüm bu parametreler, biyodizel üretimi için en uygun tür veya suşların seçiminde eş zamanlı olarak düşünölmelidir. Doğal mikroalg suşlarının potansiyel yenilenebilir enerji kaynağı olarak yağ içeriği ve yağ asiti kompozisyonunun ortaya konulması oldukça önemlidir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Yeşil alglerden *Chlorella* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellales, Chlorellaceae) tatlısularda yaygın bulunan mikroskopik bir türdür. Çalışmada *Chlorella* sp.'nin seçilme nedeni yüksek protein içeriğinin yanında, yüksek lipit üretkenliği, ototrofik, miksotrofik ve heterotrofik şartlarda büyüme yeteneği olan türler içermesidir. Çalışmamızda kullanılan *Chlorella* sp. Ordu ili sınırları içinde bulunan Turnasuyu Çayı'ndan plankton ağı ile toplanan örneklerden izole edilmiştir. Şekil 3.1'de *Chlorella* sp.'nin kültür ortamındaki mikroskopik görüntüsü verilmiştir.



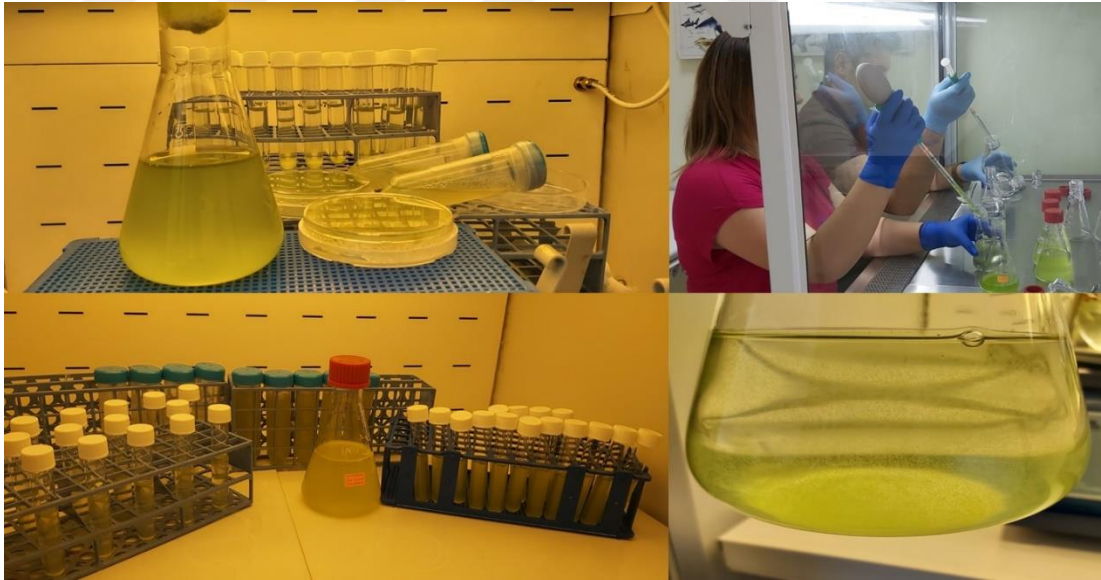
Şekil 3.1 *Chlorella* sp. (Turnasuyu Çayı, Ordu, Türkiye); 1-2: Kültürün büyümesi

#### 3.1.1 *Chlorella* sp.'nin İzolasyonu ve Çoğaltılması

Alg kültürüne başlamadan önce kullanılacak tüm ekipman, cam malzemeler ve kültür ortamları sterilize edilerek aksenik kültür koşulları sağlanmıştır. *Chlorella* sp. türünün izolasyonu ve çoğaltılması için proteoz medyum (PM) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Aksenik kültürler için uygun, genel amaçlı bir tatlısu ortamı olan PM Bristol medyumun (BM) (Bold, 1949) modifiye edilmiş şeklidir. *Chlorella* içeren plankton ağı örneği PM içinde tek koloniden üretme temeline dayalı saf kültür elde etme yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır (Sukatar, 2004; Parvin ve ark., 2007). Petrilere

hazırlanan proteoz medyumlu agarlı katı besiyerleri üzerine steril biyogüvenlik kabininde (Class II tip, Bilser BLF2000) *Chlorella* sp. içeren plankton ağı örneklerinden steril öze yardımıyla çizgi ekim ve yayma yöntemleriyle inokülasyon (ekim) yapılmıştır. Katı besiyerindeki *Chlorella* sp. kültürlerinin yaklaşık iki hafta boyunca iklimlendirme kabininde (GROTECH/GR08, UNITRONIKS® VISION350™)  $28\pm 1$  °C'de gelişmesi sağlanmıştır. Agar plakları üzerinde üreyen *Chlorella* kolonileri tekrar ön zenginleştirme besi ortamına (PM) alınarak saf kültürleri elde edilmiştir (Şekil 3.1 ve 3.2). Daha sonra PM içeren 10 mL'lik kapaklı steril cam tüplere steril öze yardımıyla yüzeyden dikkatlice mikroalg örneği alınıp tüp içindeki ortama ekilmiştir. Bir kısım petri kültürü parafilm ile kapatılıp buzdolabında saklanmıştır. Elde edilen stok kültür deneysel çalışmalarda ve kesikli kültürlerde kullanılmıştır.

*Chlorella* sp.'nin izolasyon ve çoğaltma aşamalarında kullanılan proteoz medyumun hazırlanışı (UTEX, 2019) aşağıda açıklanmıştır (Çizelge 3.1). PM hazırlanırken kullanılan tüm kimyasallar Merck Life Science'dan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) temin edilmiştir.



Şekil 3.2 *Chlorella* sp.'nin katı ve sıvı besiyerlerinde çoğaltılması

**Çizelge 3.1** Bristol Medyum Hazırlamada Kullanılan Maddeler

No	Bileşik	Miktar	Stok Solüsyon Konsantrasyonu
1.	NaNO <sub>3</sub>	10 mL/L	10 g/400 mL dH <sub>2</sub> O
2.	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mL/L	1 g/400 mL dH <sub>2</sub> O
3.	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mL/L	3 g/400 mL dH <sub>2</sub> O
4.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mL/L	3 g /400 mL dH <sub>2</sub> O
5.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mL/L	7 g /400 mL dH <sub>2</sub> O
6.	NaCl	10 mL/L	1 g /400 mL dH <sub>2</sub> O

➤ Her bir stok solüsyon 400'er mL distile su (dH<sub>2</sub>O) içinde belirtilen miktarlarda hazırlanır.

Toplam 1 L proteoz medyum (PM) hazırlamak için aşağıdaki prosedür takip edilir:

- 1 L'lik ölçekli silindire 940 mL dH<sub>2</sub>O konur.
  - Üzerinde yukarıdaki bileşenlerin (1-6 nolu) her biri sırayla sürekli karıştırılarak ilave edilir.
  - Toplam hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlanır.
  - Bristol ortamına 1 g/L proteoz pepton (HIMEDIA®) eklenir.
  - Hazırlanan medyum otoklavlanır cam şişeye (boro 3.3) aktarılır. ~pH 6.8 olarak ayarlanır. Ağzı kapatıldıktan sonra ortam otoklavlanır (121 °C, 15 dak.).
  - Steril ortam oda sıcaklığına soğutulduktan sonra buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilir.
- Bu medyumdan %1.5'lik agarlı katı besiyeri hazırlamak için ortama 15 g/L (w/v) agar (Bacto™ Agar) ilave edilir, karıştırılmadan ortam 121 °C'de 15 dak. otoklavlanarak sterilize edilir.

*Chlorella* sp.'nin gelişmesi için iklimlendirme kabininin ortam sıcaklığı 28±1 °C, ışıklandırma periyodu 16/8 saat aydınlık/karanlık ve 4500 lux (max) ışık yoğunluğu uygulanmıştır. Işık kaynağı olarak flüoresan lambalar kullanılmıştır ve dikey olarak konumlanmıştır.

Stok kültürleri hazırlamak için iki aşamalı ön kültür hazırlanmıştır (Sánchez ve ark., 2000). Birinci aşamada, 10-20 adet 10 mL'lik steril cam tüplere 6 mL PM ve 2 mL

stok (*Chlorella* sp.) aşılanmıştır. İklimlendirme kabiniinde oda sıcaklığında, sürekli aydınlatma altında 7 gün boyunca gelişmesi sağlanan küçük hacimli kültürler (10 mL cam tüpler) günde iki kez el ile çalkalanarak dibe çökmeleri engellenmiştir.

İkinci aşamada, bir hafta sonra gelişen kültürlerden 40 mL alınarak (5 test tüpü) içinde 100 mL PM bulunan 250 mL vida kapaklı erlenmayer şişelere (boro 3.3) aktarılmıştır (toplam hacim 140 mL). Erlenmayerler steril iklimlendirme kabiniinde  $28\pm 1$  °C sıcaklık, 18/6 aydınlık/karanlık periyodunda kabin içinde bulunan bir dijital orbital çalkalayıcıya (SHO-2D, DAIHAN Scientific Co., Ltd., S. Korea) yerleştirilerek, 180 rpm'de 5-7 gün boyunca mikroalgin çoğalması sağlanmıştır. Hücresel büyüme oranlarını tespit etmek için UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UV-1800, Japan) kullanılarak 680 nm'de ( $OD_{680}$ ) optik yoğunluk ölçülmüştür.  $OD_{680}$ 'de 0.9-1.0 aralığında okunan gelişmiş kültürler stok olarak kullanılmak üzere buzdolabında (+4 °C) muhaza edilmiştir. Bu stoklar haftada en az bir kez çalkalanmıştır (stok yüksek kondisyonu sürdürülebilirse, buzdolabında altı ay muhafaza edilebilir). Alt kültürlerin çoğaltılması işlemi deney boyunca sürdürülmüştür.

Yapılan ön çalışmalarda, *Chlorella* sp. kültürleri 500 mL ve 1000 mL yüksek hacimli ortamlarda yukarıdaki kültür koşullarında çoğaltılmıştır. Yapılan kesikli kültür tekniğinde kültür büyüdükçe yığın kültürlerin (bach kültür) süspansiyon halinde tutulması için akvaryum motoru ile kültürlere sürekli hava verilerek sistem havalandırılmıştır. Ancak ön çalışmalarda, yığın kültürlerin gelişimi istenilen düzeyde olmayınca kullanılan ortam (medium) ve sıcaklık değerleri değiştirilmiştir. Kültür ortamı olarak Bold Basal Medyum (BBM) hazırlanmış (UTEX, 2019b), kabin sıcaklığı da  $25\pm 1$ 'ye ayarlanmıştır. Çizelge 3.2'de BBM içindeki maddeler ve stok konsantrasyonları verilmiş ve ortamın hazırlanış prosedürü açıklanmıştır. BBM hazırlanırken kullanılan tüm kimyasallar Merck Life Science'dan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) temin edilmiştir.

**Çizelge 3.2 Bold Basal Medium (BBM) Hazırlamada Kullanılan Maddeler**

<b>Bileşik</b>	<b>Ağırlık (g)</b>	<b>Distile Su (mL)*</b>	<b>mL Stok / 1L dH<sub>2</sub>O</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.875	250	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.375	250	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.875	250	10
NaNO <sub>3</sub>	6.250	250	10
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.625	250	10
NaCl	0.625	250	10
EDTA-Na <sub>4</sub>	5.000	100	1
KOH	3.100		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.498	100	1
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 mL		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.142	100	1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.353	25	0.1
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.058	25	0.1
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.063	25	0.1
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.020	25	0.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.048	25	0.1

\*Her bir stok solüsyon sırasıyla 250 mL, 100 mL ve 25 mL dH<sub>2</sub>O içinde belirtilen miktarda hazırlanır.

Toplam 1 L BBM hazırlamak için şu prosedür takip edilir:

- Ölçekli silindire (1000 mL) 900 mL dH<sub>2</sub>O konur.
- Çizelge 3.2’de belirtilen stok solüsyonların her biri sırasıyla belirtilen miktarlarda ilave edilerek karıştırılır.
- Toplam hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 L’ye tamamlanır.
- Hazırlanan ortam otoklavlanır cam şişeye (boro 3.3) konulup ağzı kapatıldıktan sonra otoklavlanır (121 °C, 20 dak.).
- Steril ortam buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilir.

- Deney düzeneğinde, farklı kültür ortamlarını hazırlamak için, BBM ortamına 5 mg/L NP-Fe<sup>0</sup> (Nanografi Co. Ltd.) ve/veya 5 g/L susuz D(+)-glukoz (dekstroz) (Merck Millipore GmbH) ilave edilip aynı koşullarda otoklavda sterilize edilir.
- Çalışmamızda *Chlorella* sp. biyokütlesine ve özellikle lipit içeriğine etkisi tespit etmek için nano-Fe<sup>0</sup> partikülü (30-40 nm, %99.55 saflıkta) kullanılmıştır. Nanopartikül Türkiye'den Nanografi Co. Ltd.'den satın alınmıştır. Nanopartiküller BBM içerisine katılmadan önce ayrı ayrı 100 mL dH<sub>2</sub>O içinde 10 dak. süre ile ultrasonik banyoda (WUC-A02H, Witeg Labortechnik GmbH, Germany) tutularak süspansiyon edilmiştir. Aglomerasyonu azaltmak için yapılan bu işlemden sonra hazırlanan ortama ilave edilmiştir.
- 96 kuyucuklu mikropalakalarda mikroalg için optimum nano-Fe<sup>0</sup> konsantrasyonlarının taranması gerçekleştirilmiştir. Yapılan güncel çalışmalar da dikkate alınarak (Pádrová ve ark., 2015), litrede 5 mg nano-Fe<sup>0</sup> konsantrasyonunun en uygun miktar olduğuna karar verilmiştir.

### 3.1.2 *Chlorella* sp. Üretiminde Kullanılan Düzeneklerin Hazırlanması

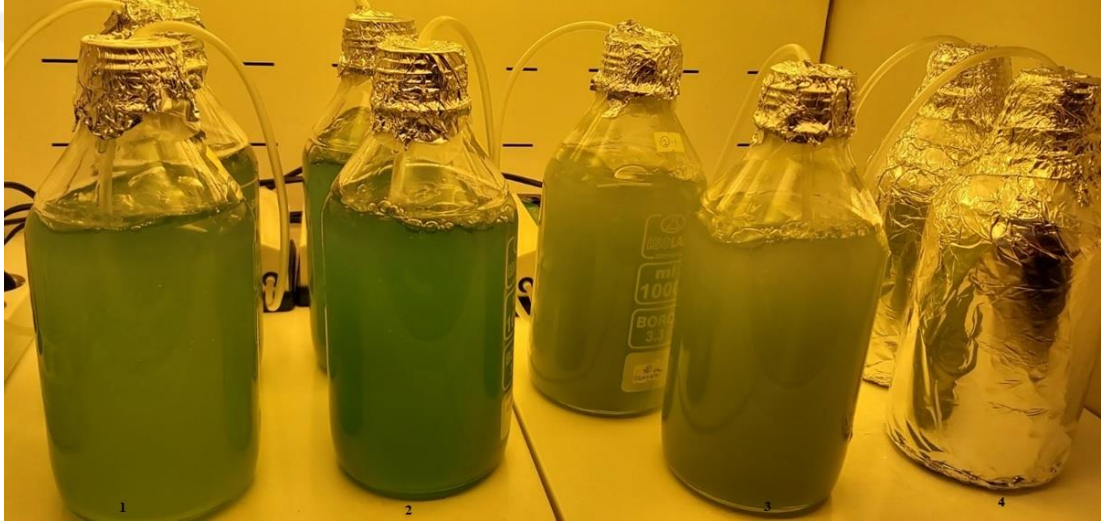
*Chlorella* sp. yığın kültüründe, farklı koşullar altında, mikroalgin büyüme performansını, yağ verimini ve yağ asiti içeriğini test etmek amacıyla kontrol grubu ve üç farklı deney grubu oluşturulmuştur. Çalışma hacmi 2 L olan borosilikat şeffaf cam şişelerde (ISOLAB, Germany) 1 L'lik ortama *Chlorella* sp. stok kültürlerinden %10 oranında aşılama (OD<sub>680</sub> nm'de ~0.25 yoğunlukta) yapılarak ayarlanmıştır. Işığa ve kullanılan maddelere bağlı olarak kontrol (K), ototrofik (Grup 1, G1), mikсотrofik (Grup 2, G2) ve heterotrofik (Grup 3, G3) deney setleri sonuç hacimleri 1 L olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışmada; stres faktörü olarak sıfır değerlikli demir nanopartikülü (NP-Fe<sup>0</sup>), karbon kaynağı olarak da D-glikoz kullanılmıştır. Kültür ortamına ilave edilen NP-Fe<sup>0</sup> miktarı 5 mg/L, glikoz miktarı ise 5 g/L'dir. İklim kabinin ortam koşulları sıcaklık, nem, ışılama periyodu ve ışık şiddeti sırasıyla 25°C±1, %50 nem, 16/8 aydınlık/karanlık ve 4500 lux şeklinde ayarlanmıştır. Alglerin medyum içinde çökmesini engellemek için hava motoruyla sürekli havalandırılmıştır. Toplam 120 saat (5 gün) boyunca süren kontrollü deneyler iki set halinde yapılmıştır. Çizelge 3.3'te deney setlerinin hazırlanması, Şekil 3.3'te ise iklimlendirme kabininde kültürün gelişimi görülmektedir.



**Çizelge 3.3** *Chlorella* sp. Kültürü Deney Setlerinin Hazırlanışı

	Kontrol (K)	Ototrofik Kültür (G1)	Miksotrofik Kültür (G2)	Heterotrofik Kültür (G3)
BBM	✓	✓	✓	✓
Işık	✓	✓	✓	.*
NP- Fe <sup>0</sup>	-	✓	✓	✓
D-Glikoz	-	-	✓	✓

\*Heterotrofik mikroalg kültürünün etrafı alüminyum folyo ile sarılarak kapatılmış ve karanlık ortamda mikroalgın gelişmesi sağlanmıştır.



**Şekil 3.3** İklimlendirme kabini içinde alg kültür setlerinin geliştirilmesi (1: Kontrol, 2: Grup 1 (G1, ototrofik kültür), 3: Grup 2 (G2, miksotrofik kültür), 4: Grup 3 (G3, heterotrofik kültür).

### 3.2. Analitik Yöntemler

#### 3.2.1 pH Ölçümü

Kültür ortamlarının hazırlanmasında ve gün aşırı kültür deney setlerinden alınan numunelerin pH ölçümünde HANNA HI 2020 edge® pH metre ( $\pm 0.01$  pH) kullanılmıştır.

#### 3.2.2 Hücre Büyümesinin Ölçümü

Biyokütle büyümesinin etkinliği, görünür radyasyonun absorpsiyonu olarak tanımlanan optik yoğunluğun (OD) ölçülmesiyle kontrol edilmiştir. OD<sub>680</sub> ve OD<sub>720</sub> nm dalga boylarından ölçüm yapılmıştır. 680 nm'deki optik yoğunluk klorofil emilimini, 720 nm'deki optik yoğunluk ışık saçılımını ifade etmektedir (Zuliani ve

ark., 2016). Gün aşırı olarak, kültür setleri homojen olarak karıştırıldıktan sonra steril serolojik pipet yardımıyla 2 mL örnek alınıp kuvars küvetlere konularak optik yoğunluk UV-VIS spektrofotometre kullanılarak (Shimadzu UV-1800, Japan) ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Kör olarak her bir deney grubunun medyumu kullanılmıştır. *Chlorella* sp. kültürlerinin büyümesi bu şekilde takip edilmiştir.

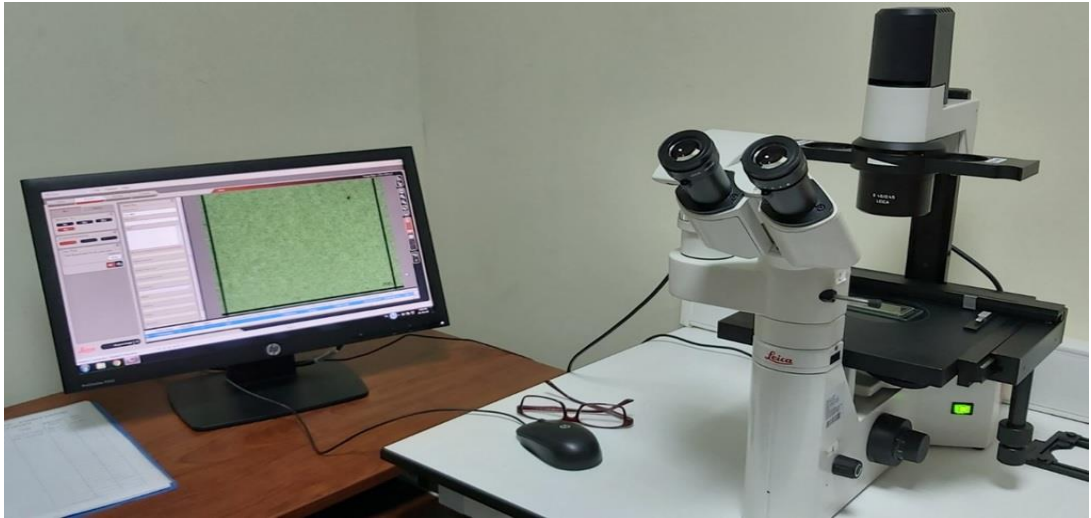
### 3.2.3 Hücre Sayımı

Birim hacimdeki (hücre/mL) *Chlorella* sp. biyolojik kütleini belirlemek için 1 mL hacimli Sedgewick-Rafter (S-R) sayım kamarası kullanılmıştır. Kültür setlerinden gün aşırı alınan numunelerden 1 mL örnek S-R sayım kamarasına yerleştirildikten sonra, sayım işlemi Leica DM IL LED inverted mikroskopta (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 200'lük (10x20) büyütmede yapılmıştır. Toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Her set için 2 tekerrürlü sayımları yapıp ortalaması alınmıştır (APHA, 1995).

$$\text{Hücre/mL} = \frac{C \times V_2 \times F_1}{V_1 \times F_2} \quad (1.1)$$

- C : Sayım sonucunda bulunan organizma sayısı  
V<sub>1</sub> : Sedimentasyondan önceki örneğin ilk hacmi (mL)  
F<sub>1</sub> : S-R sayım hücresinin toplam kare sayısı (1000)  
V<sub>2</sub> : Sedimentasyondan sonra kalan örneğin hacmi (mL)  
F<sub>2</sub> : S-R sayım hücresinin incelenen kare sayısı

Şekil 3.4'te hücre sayım işleminde kullanılan düzenek görülmektedir.



Şekil 3.4 Invert mikroskopta hücre sayımı

### 3.2.4 Kuru Madde Analizi

Kuru madde analizi “single-step” yani tek adım metoduyla belirlenmiştir (Pszczółkowska ve ark., 2019). Deney setlerinden gün aşırı alınan numunelerden 1 mL mikroalg süspansiyonu önceden tartılan 1.5 mL hacimli endorf tüplerine aktarılmıştır. Mikro santrifüjde (KUBOTA 3500, Japan) 3000 RCF hızda 18 °C’de 15 dak. santrifüjlenmiştir. Süpernatant çıkarılıp hücre topağı saf su ile yıkanıp aynı hızda tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatant çıkarıldıktan sonra endorf tüpler 7 saat boyunca 60 °C’de etüvde (Memmert, Germany) kurutulmuştur (Hosseinizand ve ark., 2018). Sabit ağırlığa kadar kurutulan örnekler desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulup 0.0001 g duyarlı hassas terazide (Radwag AS 220/C/2, Poland) tartılmıştır. Kuru madde miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kuru ağırlık (mg/L)} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Örnek hacmi (mL)}} \quad (3.1)$$

A : Kabın ağırlığı + kuru tortu (mg)

B : Kabın ilk ağırlığı (mg)

### 3.2.5 Fotosentetik Pigment Analizi

Biyomas tahmini için klorofil-*a* (kl-*a*) analizi en iyi yöntemlerden biridir. Bunun için her bir kültür setinden 8 mL numune Whatman GF/F filtre kağıdından (0.7 µm, 47 mm çap, Whatman, Maidstone, UK) vakum filtrasyon setinde süzölmüştür. Asiditenin artmasını ve pigmentin zarar görmesini önlemek amacıyla filtrasyon sırasında 2 damla % 1’lik MgCO<sub>3</sub> solüsyonu eklenmiştir. Filtreler analiz yapılıncaya kadar kapaklı 15 mL’lik santrifüj tüpüne alınıp etrafı alüminyum folyo ile sarılarak analiz yapılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Analiz yapılacağı zaman üzerine 10 mL %90’lık aseton eklenip tüplerin kapakları kapatılmış, tüpler şiddetle çalkalanıp ışıktan korunması için alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra buzdolabında (+4 °C) 24 saat ekstraksiyon için bekletilmiştir. Tüpler 3500 rpm’de +4 °C’de 10 dakika santrüjlendikten sonra süpernatant temiz bir kuvars küvete dökülüp analize hazır hale getirilmiştir. Bu işlemler yapılırken ortamdaki ışığın oldukça düşük olmasına dikkat edilmiştir. UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japan), her bir okuma yapılmadan önce blank ile sıfırlama yapıldıktan sonra (%90’lık aseton), süpernatantların 630, 645, 665 ve 750 nm’de absorpsiyon değerleri kaydedilmiştir.

Klorofil-*a* konsantrasyonu aşağıdaki eşitlikten yararlanarak hesaplanmıştır (Parsons ve Strickland, 1963).

$$\text{Klorofil-}a \text{ (Kl-}a\text{)} = 11.6 \times \text{OD}_{665} - 0.14 \times \text{OD}_{630} - 1.31 \times \text{OD}_{645} \quad (3.2)$$

$$3.3. \text{ Klorofil-}a \text{ (}\mu\text{g/L)} = \text{Kl-}a \times v / l \times V \quad (3.3)$$

$$3.4. \text{ Toplam karotenoit (}\mu\text{g/L)} = [10 \times (\text{OD}_{480} - 3 \times \text{OD}_{750}) \times v] / V \times l \quad (3.4)$$

*v* : Kullanılan asetonun hacmi (mL)

*V* : Filtre edilen su örneği hacmi (L)

*l* : Küvetten geçen ışık yolu uzunluğu (1 cm)

### 3.2.6 Hasat ve Kurutma

Kültürlerde logaritmik evrenin bitimi ve duraklama evresinin izlenmesi, klorofil-*a* ve optik yoğunluk değerlerine göre yapılmıştır. Hasat işlemi santrifüj tekniği ile yapılmıştır. Her bir deney setindeki kültürler 50 mL falkon tüplere alınıp 15 dak. boyunca 4000 rpm'de +18 °C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dH<sub>2</sub>O ile iki kez yıkama işlemi yapılmıştır. Hasat sonrası elde edilen yaş alg pastası önceden tartımları kaydedilmiş tüpler içinde tartılmıştır. Bir sonraki önemli bir adım olan biyokütlenin kurutulması işlemi için Ordu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'ndaki liyofilizatör (LABCONCO Freezone 12 Plus, 0.110 mBar, -85°C) kullanılmıştır. 28 saat boyunca sabit ağırlığa kadar kurutulan örnekler daha sonra hassas terazide (RADWAG AS 220/C/2) tartılmıştır. Lipit ekstraksiyonu yapılmaya kadar kuru numuneler -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Numunelerin nem içeriği (%) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Nem içeriği (\%)} = [M_{\text{yaş alg}} - M_{\text{kuru alg}}] \times 100 / M_{\text{yaş alg}} \quad (3.4)$$

M: Alg ağırlığı

### 3.2.7 Lipit Ekstraksiyonu ve Analiz İşlemleri

#### 3.2.7.1 Toplam Lipit Miktarı Analizi

Lipit üreten mikroalglerden tam olarak yararlanmanın önündeki en önemli engellerden biri, hücre biyokütlesinden elde edilen yağı başarılı ve verimli bir şekilde çıkarma kabiliyetidir. Toplam lipit değeri % kuru biyomas oranına göre hesaplanmıştır. Lipit ekstraksiyonu ve toplam lipit analizi için Folch Metodu (Folch ve ark., 1957) modifiye edilerek uygulanmıştır. Hasat ve kurutma işleminin ardından elde edilen kuru maddeler porselen havanda dövülüp toz haline getirildikten sonra hassas terazide

(Radwag AS 220/C/2) her bir gruptan 200 mg tartılarak cam şişelere (boro 3.3) alınmış ve üzerine 120 mL kloroform:methanol (2:1) karışımı eklenmiştir. Daha sonra bu karışım 30 dak. boyunca ultrasonik banyoda (Daihan WiseClean® WUC-A02H, Daihan Scientific, S. Korea) hücrelerin fiziksel olarak parçalanması için bekletilmiştir. Ekstraksiyonu sürdürmek için karışım +18 °C'de karanlık ortamda bulunan dijital orbital çalkalayıcıda (SHO-2D, DAIHAN Scientific Co., Ltd., S. Korea) 30 dakika boyunca 140 rpm'de çalkalanmıştır. Ardından karışıma 20 mL %0.73'lük NaCl çözeltisi eklenip Whatman GF/F filtre kağıdından (1.5 µm, 47 mm çap, Whatman, Maidstone, UK) vakum filtrasyon seti kullanılarak katı partiküllerin ayrılması işlemi yapılmıştır. Filtrasyon sırasında filtre kağıdı üzerine 1 g susuz sodium sülfat (anhydrous NaSO<sub>4</sub>) ilave edilmiştir (Prommuak ve ark., 2012). Filtrasyon sonucu elde edilen süzüntü numunelerin faz ayrımının gerçekleştirilmesi için 3000 rpm'de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Faz ayrımı gerçekleşen numunelerin üst fazları cam pastör pipetleri kullanılarak dikkatlice çekilmiş ve uzaklaştırılmıştır. Alt kloroform fazı önceden 105°C'de 2 saat tutulan ve darası alınan balon jojelerde toplanmıştır. Balon jojelerde toplanan kloroform-toplam yağdan çözücüyü uzaklaştırmak için evaporatör kullanılmıştır (Heidolph rotay evaporatör, Laborota 4000). Döner buharlaştırıcının sıcaklığı 60 °C, dönüş hızı 150 rpm olarak ayarlanmıştır. Balon içinde kalan kloroformun tamamının uçurulması için balon jojeler 60 °C'de 1 saat etüvde tutulmuştur. Ardından balon jojeler hassas teraziye alınıp çıkan ham lipid miktarı gravimetrik olarak ölçülmüştür. Toplam lipid (%) ve lipid produktivitesi aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam Lipit (TL, \%)} = \frac{[(\text{Balon darası} + \text{toplam lipid, g}) - \text{Balon darası, g}] \times 100}{\text{Örnek miktarı, g}} \quad (3.5)$$

$$\text{Lipit Produktivitesi (LP, mg/L)} = \text{Lipit içeriği (\%)} \times \text{Kuru biyomas (mg/L)} \quad (3.6)$$

### 3.2.7.2 Yağ Asitleri Kompozisyonunun Belirlenmesi

Lipitlerin yapısında çeşitli yağ asitleri bulunur. Bu yağ asitlerinin gaz kromatografi cihazında analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip olan metil esterleri gibi türevlerine dönüştürülmesi gerekir. Bu çalışmada lipitler içindeki yağ asitlerini metil esteri türevlerine dönüştürmek için AOAC 996.06 (1990) yöntemi kullanılmıştır. Yağ asitleri kompozisyonu Ordu Üniversitesi Merkezi

Araştırma Laboratuvarı'ndaki Gaz Kromatografi-Alev İyonizasyon Dedektörü (GC-FID, SHIMADZU GC-2010 Plus) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.5). Kolon olarak Teknokroma TR-CN 100 (100 m x 0.25 mm x 0.2 µm) kullanılmıştır.

Yağ asitleri analizi için öncelikle numuneler hazırlanmıştır. Deney setlerindeki ham lipit örneklerinden 35 µL alınıp bir vialle aktarılmış, üzerine 750 µL türevlendirici (0.5 g sodium metoksit, 80 mL metanol, 20 mL n-hekzan) ilave edilmiştir. Karışım karanlık bir ortamda 12 saat bekletildikten sonra üzerine 750 µL n-hekzan ilave edilip çalkalanmıştır. Faz oluşması için 3 dak. beklenmiş ve oluşan üst fazdan 700 µL alınıp ayrı bir vialle aktarılmıştır. GC analizi için bu numune kullanılmıştır. GC-FID otomatik örnekleycisine (AOC-20i) 1 µL hacminde numune yerleştirilmiştir. Standart olarak Restek-FAME MIX 37 kullanılmıştır.



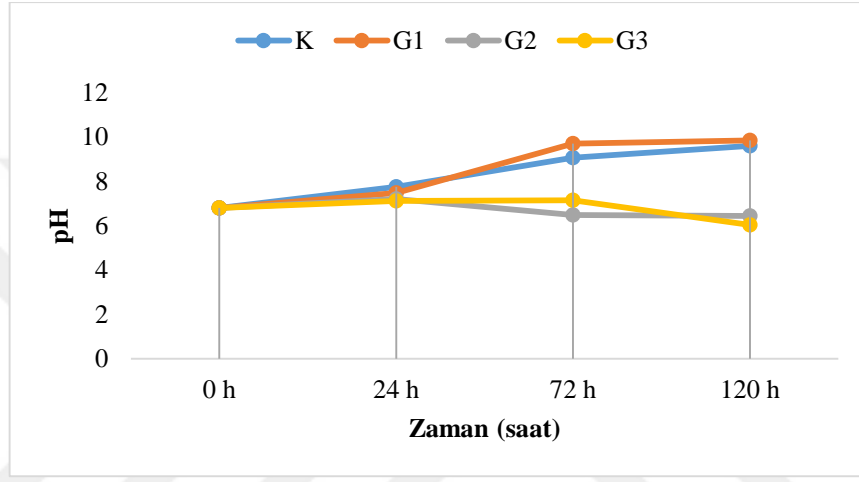
Şekil 3.5 GC-2010 Plus Gaz Kromatografi Sistemi

### 3.2.8 İstatiksel Analizler

Verilerin tanımlayıcı istatistiksel analizleri, gruplar arasındaki benzerlik/farklılık analizleri için SPSS ver. 22.0 (IBM Co., Armonk, NY, ABD) kullanılmıştır. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

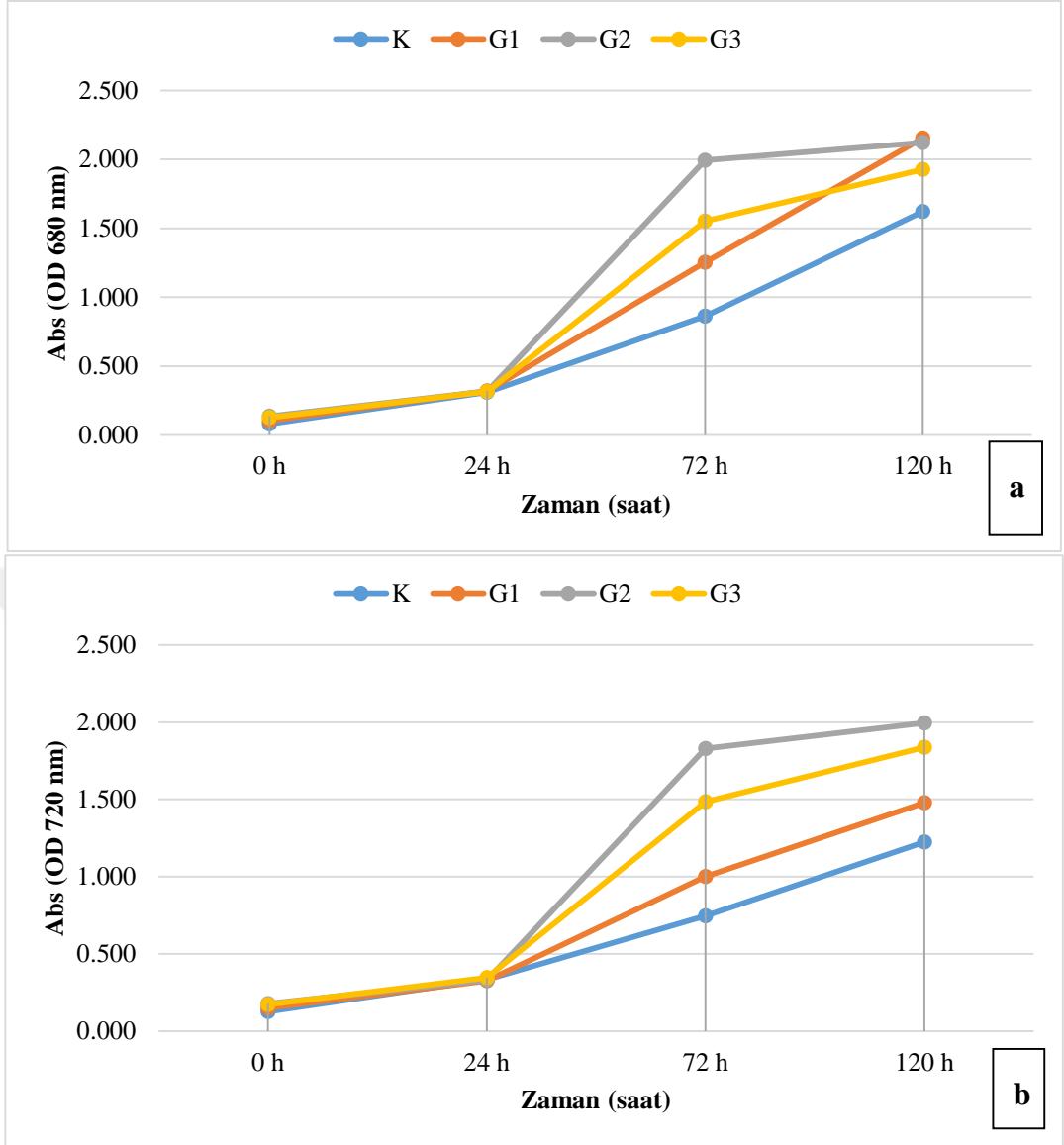
#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Deney periyodu boyunca farklı kültür ortamlarında ölçülen pH değerlerinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.1’de görülmektedir. Zamana bağlı olarak nano-Fe<sup>0</sup> eklentisinin pH oranında çok değişikliğe yol açmadığı, kontrol grubu ile birlikte doğru orantılı olarak bazik yöne doğru değiştiği, ancak glikoz eklenen gruplarda (G2 ve G3) bu durumun tersi yönünde kültür ortamının asitliğinin artmasına neden olduğu gözlemlenmiştir.



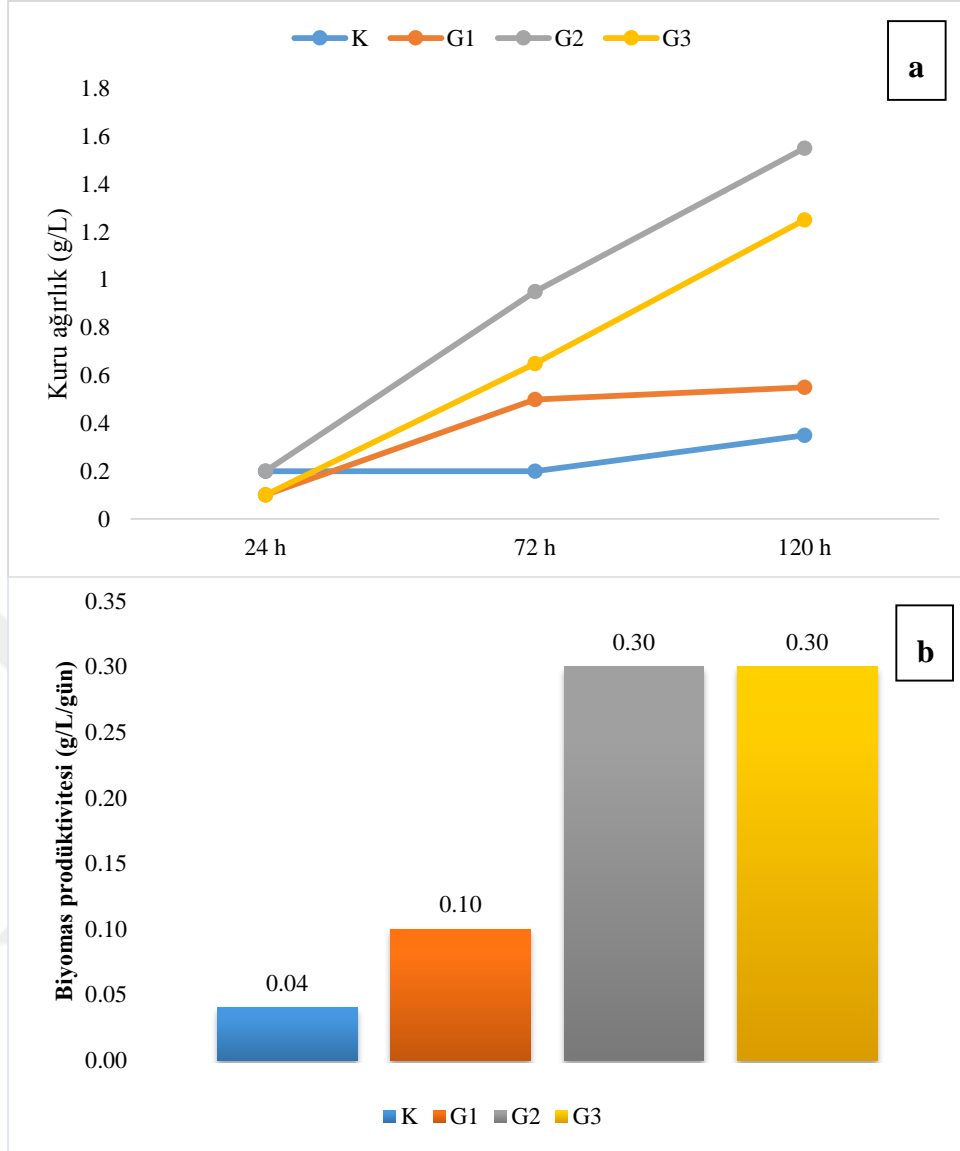
Şekil 4.1 Farklı Kültür Ortamlarında Zamana Bağlı pH Değişimi

*Chlorella* sp.’nin büyüme performansı OD<sub>680</sub> ve OD<sub>720</sub> nm’de ölçülmüştür (Şekil 4.2). Zamana bağlı olarak alg kuru ağırlığı da OD gibi artış göstermiştir (Şekil 4.3). Mikroalg kültürlerinin büyümeleri gözlemlenirken yapılan ölçümlerde kontrol ve G1’deki düzenli artış hücrelerin büyümesinden kaynaklıdır. Ancak bununla birlikte 72 ve 120’nci saatlerde D-glikoz katılan G2 ve G3 deney setlerinde alg artışının yanı sıra fungal büyüme de gözlemlenmiş ve biyokütlenin yüksek çıkmasına dolayısıyla da optik yoğunluğun fazla ölçülmesine neden olmuştur. Glikozun fungal üremeye yol açması ve mikroalglerin 5 günün sonunda durgunluk fazına geçmesiyle deney sonuçlandırılmıştır. Tüm deney setleri 120 saatin sonunda (5 gün) tamamlanmış ve hasat işlemi yapılmıştır. Optik yoğunluk grafiklerinde de görüldüğü gibi, nano-Fe<sup>0</sup> katılmış G1 setinde kontrol grubuna göre daha fazla büyüme ölçülmüştür.



**Şekil 4.2** 680 nm ve 720 nm'de *Chlorella* sp.'nin Zamana Bağlı Büyüme Performansı  
a) 680 nm'de Zamana Bağlı Değişim b) 720 nm'de Zamana Bağlı Değişim



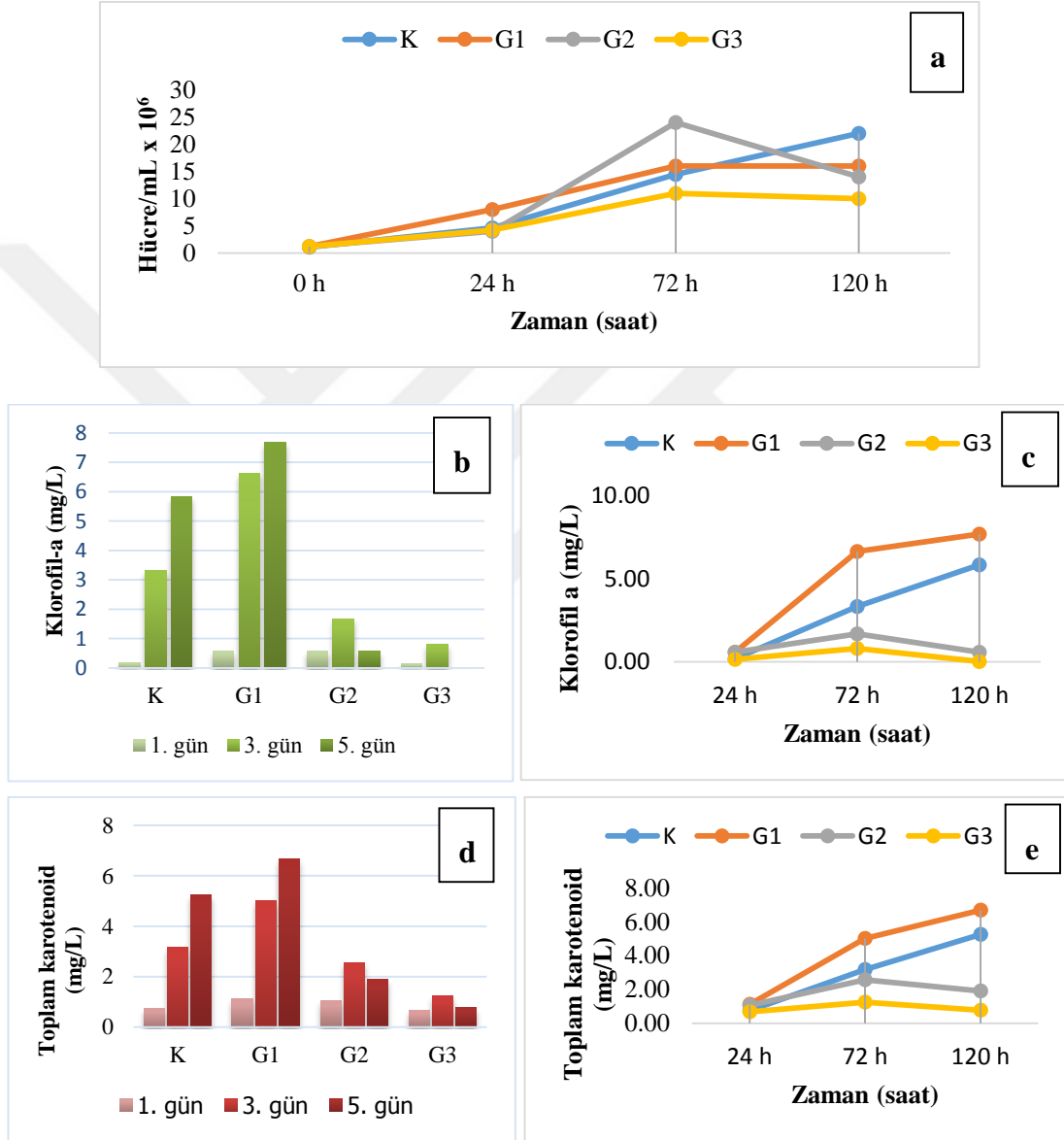


**Şekil 4.3** Kuru Ağırlık ve Biyomasın Zamana Göre Değişimi a) Zamana Bağlı Kuru Ağırlık Değişimi b) Biyomas Üretkenliği

Ekim yapıldıktan 24 saat sonra birbirine oldukça yakın olan kuru madde miktarları 72'nci saatte belirgin şekilde üç grupta da kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Yalnızca nano-Fe<sup>0</sup> bulunan birinci grupta biyomas miktarı kontrole nazaran iki kattan fazla artış göstermiş ve ortamda yalnızca nano-Fe<sup>0</sup> bulunmasının *Chlorella* sp. türünde biyokütle artışını sağladığı ortaya konulmuştur. Hem nano-Fe<sup>0</sup> hem de glikoz bulunan mikсотrofik grupta (G2) ise bu artış dört kattan fazla, 120'nci saatte ise bu artış 4.5 kata yakın olmakla birlikte; heterotrofik grupta (G3) biyomas artışının yine kontrol ve ototrofik gruptan (G1) fazla olduğu göze çarpmaktadır. Kontrol ve G1'e kıyasla G2 ve

G3'te kuru madde ağırlığında yukarı yönde değişime sebep olan durum ise ortamda glikoz bulunmasının fungal üremeye yol açmasından kaynaklı olabileceğidir.

Farklı deney setlerinde hücre sayısı ve fotosentetik pigment analizleri sonuçları zamana bağlı değişim göstermiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4** Fotosentetik Pigment Miktarlarının Zamana Göre Değişimi a) Zamana Bağlı Hücre Büyümesi b-c) Zamana Bağlı Klorofil-a Değişimi d-e) Zamana Bağlı Toplam Karotenoid Miktar Değişimi

Hücre sayısı zamana bağlı olarak tüm gruplarda artış göstermiştir. K grubu doğrusal bir artış çizgisi gösterirken, G1 grubu 72'nci saatten sonra duraklama göstermiştir. G2 grubunda ise 24 ila 72 arasında hızla artmış ancak sonrasında kuvvetle muhtemel fungal üreme sebebiyle azalmıştır. G3 grubu ise G1'e benzer bir grafik gösterse de toplam hücre sayısı olarak ondan geride kalmıştır.

Bu grafikler göstermektedir ki nano-Fe<sup>0</sup> katkısının fotosentezi hızlandırdığı ve buna müteakip biyokütle artışına sebep olduğudur. Ancak G2 ve G3'te ortamda bulunan glikoz klorofil sentezlenmesini sınırlandırmıştır. Beşinci günde klorofil-a konsantrasyonundaki azalmanın nedeni olarak, fungal üremenin fotosentezi sınırlaması da olabilir. Ortamdaki glikozu fungal hücrelerin de kullanması ve ışığı sınırlandırması da kültürün erken duraklama fazına girmesine yol açtığı düşünülmektedir. G3'te ise (heterotrofik grup) ışık olmamasına karşın klorofil-a miktarında bir miktar artma ve yine ikinci gruba benzer fungal çoğalma sebepli ortamda başka bir tüketicinin bulunması kaynaklı azaldığı düşünülmektedir.

Toplam karotenoid üretiminde ise G1 (ototrofik grup) zamana bağlı olarak diğer gruplara nazaran en yüksek üretimi gerçekleştirmiştir. G2 ve G3 setlerinde ise 72'nci saatten sonra toplam karotenoid üretiminde azalma eğilimi gözlemlenmiştir. Yukarıda da değinildiği üzere, sadece nano-Fe<sup>0</sup> katılan grupta fotosentezin hızlanması, toplam karotenoid üretiminin de artmasına yol açmıştır.

120 saat sonunda hasattan elde edilen K, G1, G2 ve G3 *Chlorella* sp. alg pastasının ortalama yaş ağırlıkları sırasıyla 1.74 g/L, 2.03 g/L, 8.8 g/L ve 5.6 g/L; kuru ağırlıkları ise sırasıyla 0.3 g/L, 0.33 g/L, 0.782 ve 0.916 g/L olarak ölçülmüştür. Kültürlerin % nem içeriği de sırasıyla %82.8, %83.7, %91.1 ve %83.6 olarak hesaplanmıştır.

Deney setlerinde analizleri yapılan bazı parametrelerin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

OD<sub>680nm</sub> ve OD<sub>720nm</sub> ölçüm sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir (OD<sub>680nm</sub>: 0.794, p>0.05, OD<sub>720nm</sub>: 0.523, p>0.05). pH ölçümlerinde K ile G1 birbirine benzer, G2 ile G3 birbirine benzerdir ve istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).

**Çizelge 4.1.** SPSS İstatistiksel Analiz Sonuçları (Duncan'a göre)

	<b>Klorofil-a (Ort±S.H.)</b>	<b>Toplam Karetanoid</b>	<b>Kuru Madde</b>	<b>pH</b>	<b>Yaş Ağırlık</b>	<b>Kuru Ağırlık</b>
<b>Kontrol</b>	3.11±1.11 <sup>a,b</sup>	3.06 <sup>a,b</sup>	250.00 <sup>a</sup>	8.80 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>
<b>G1</b>	4.97±1.41 <sup>a</sup>	4.26 <sup>a</sup>	383.33 <sup>a</sup>	9.01 <sup>a</sup>	2.08 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a,b</sup>
<b>G2</b>	0.78±0.18 <sup>b</sup>	1.84 <sup>b,c</sup>	900.00 <sup>a</sup>	6.71 <sup>b</sup>	8.31 <sup>b</sup>	0.78 <sup>c</sup>
<b>G3</b>	0.33±0.16 <sup>b</sup>	0.89 <sup>c</sup>	666.67 <sup>a</sup>	6.76 <sup>b</sup>	4.27 <sup>c</sup>	0.72 <sup>b,c</sup>

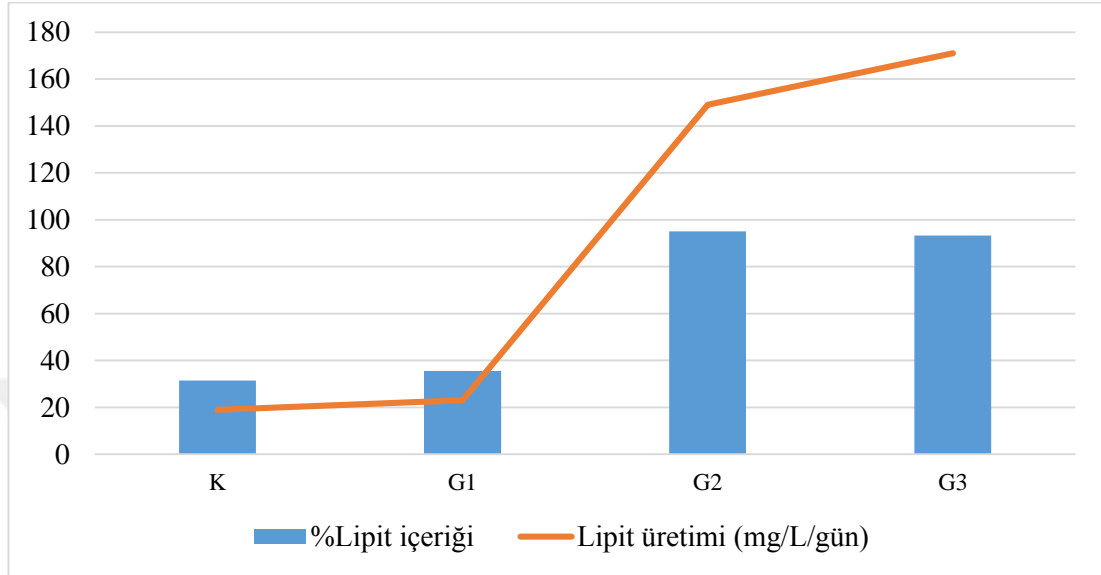
➤ Aynı sütunda farklı üst karakterlerle ifade edilen gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

Yaş ağırlıkta K ile G1 birbirlerine benzerken, G2 ile G3 bunlardan farklı ve istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Kuru madde değişiminin istatistiksel açıdan önemsiz olduğu görülmüştür. Fotosentetik pigment klorofil-a'da ise G2 ile G3, K ile G1 ve K ile G2 birbirlerine benzerken, toplam karetanoid miktarında ise K ile G1, G2 ile G3 ve K ile G2'nin benzer ve istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).

Deney setlerindeki lipit içeriği (% kuru ağırlık) K, G1, G2 ve G3'te sırasıyla 31.5, 35.5, 95.1 ve 93.3 olarak hesaplanmıştır. Lipit prodüktivitesi ise sırasıyla 19, 23, 149 ve 171 mg/L/gün'dür. Miksotrofik ve heterotrofik grupların lipit üretiminin ototrofik gruplardan yüksek olduğu görülmektedir. Lipit üretimi ve yüzde lipit içerikleri kontrol grubuna nazaran G1'de kısmen de olsa artış gösterirken G2 ve G3'te kayda değer bir artış sergilemiştir. Günlük lipit üretiminin nano-Fe<sup>0</sup> eklentisiyle az da olsa arttığı, buna ilaveten glikoz eklenmesiyle ışıklı (G2) ortamda 8, ışıksız (G3) ortamda ise 9 kata yakın arttığı görülmüştür (Şekil 4.5).

Yapılan benzer çalışmalarda ototrofik koşullarda büyüme ve lipit veriminin miksotrofik ve heterotrofik koşullardan düşük kaydedildiği bildirilmiştir (Liang ve ark., 2009; Heredia-Arroyo ve ark., 2010). Mata ve arkadaşlarının (2010) biyodizel üretiminde en yaygın kullanılan bazı alg türlerinin lipit içeriği ve lipit verimlerini inceledikleri çalışmasında, lipit içeriklerinin %20-50 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda G2 ve G3'te %90'ın üzerindeki yüksek lipit içeriğinin

nanopartikülün yanısıra C kaynağı olarak glikozun etkisinin ve bu kültür ortamlarında fungal büyümenin katkısının olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 4.5** Lipit içeriği (%) ve Lipit Üretimi

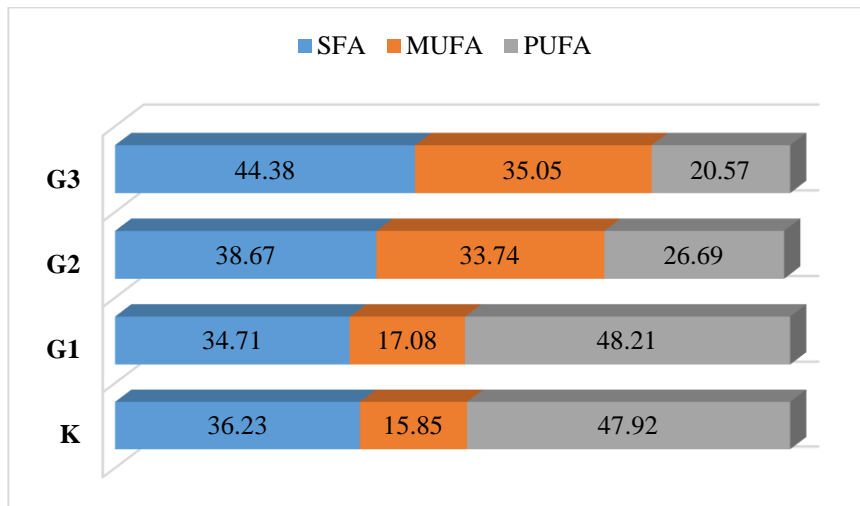
Deneyler 120 saatin sonunda sonlandırıldıktan sonra kuru biyokütleden ham yağ ekstrakte edilmiştir. Ham yağlar metil esterlerine dönüştürüldükten sonra GC-FID cihazında yağ asitleri kompozisyonu tespit edilmiştir. *Chlorella* sp. yağ asiti bileşimi doymuş yağ asitleri (SFA), tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) dahil toplam 13 farklı yağ asitinden oluşmuştur (Çizelge 4.2). Farklı kültür ortamlarında yetiştirilen *Chlorella* sp. hücrelerinden elde edilen lipitlerin transesterifikasyon sonucu elde edilen yağ asiti metil esterlerinden C16 ve C18 karbon numaralarınca zengindir. C16 ve C18 yağ asitleri değerleri (% alan olarak) sırasıyla 20.83 ila 25.37 ve 73.01 ila 78.1 aralığında kaydedilmiştir. C16 en yüksek G2'de, C18 en yüksek G1'de ölçülmüştür. Heterotrofik kültür SFA ile MUFA bakımından, ototrofik kültür ise PUFA bakımından zengindir (Şekil 4.5).

GC-FID analiz sonuçlarına göre deney setlerinin yağ asitleri kompozisyonu (% alan olarak) Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre kontrol grubuna kıyasla değişimlerin kaliteli biyoyakıt eldesi için umut vaat edici olduğu düşünülmektedir.

**Çizelge 4.2** Farklı Kültür Ortamlarında *Chlorella* Sp.'nin Yağ Asiti Kompozisyonu

Yağ asitleri	K	G1	G2	G3
C12:0	nd	nd	0.092	nd
C14:0	nd	nd	0.2	0.197
C16:0	21.251	20.297	25.17	22.97
C16:1	0.732	0.53	0.197	0.304
C17:1	0.462	0.81	0.201	0.205
C18:0	14.649	14.153	12.979	19.609
C18:1n9c	14.657	15.737	33.339	34.538
C18:2n6c	18.502	19.145	21.616	18.641
C18:3n6	29.414	29.065	5.076	1.93
C20:0	nd	0.263	0.487	0.818
C21:0	0.157	nd	nd	nd
C22:0	0.175	nd	0.321	0.442
C24:0	nd	nd	0.322	0.346
SFA	36.232	34.713	38.671	44.382
MUFA	15.851	17.077	33.737	35.047
PUFA	47.916	48.21	26.692	20.571

Biyodizel çoğunlukla 16 ile 18 C atomu içeren yağ asit esterleri karışımıdır. Çalışmamızda % alan olarak bu karbon numaralı yağ asitlerinin fazlalığı yenilebilir enerji kaynağı olarak, Turnasuyu Çayı'ndan izole edilen doğal suş *Chlorella* sp. türünün biyodizel üretiminde kullanılabilir biyokaynak olarak önemli bir potansiyel olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.6** SFA, MUFA, ve PUFA'nın karşılaştırılması

Günümüzde küresel ısınmayla birlikte yenilebilir enerji kaynaklarına yönelim hızla teşvik edilmektedir. Küresel biyoenerji araştırmalarında ise mikroalgelere dayalı biyoyakıt üretimi oldukça dikkat çekmektedir. Birçok çalışmada da belirtildiği üzere, mikroalgler birçok tarım ürününden daha fazla yağ içeriğine sahip olduğu için alternatif biyoyakıt üretiminde oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Besin eksikliği ya da farklı stress koşullarında üretildiklerinde ise lipit içeriği artırılabilir. Örneğin, en uygun koşullarda %90 oranında lipit biriktiren algler vardır. Mikroalglerde genellikle lipitler triaçilgliserol formunda olup C16-18 yağ asitlerince zengindirler. Mikroalglerin lipit içeriği ve verimi ise sürdürülebilir ve yenilenebilir enerji açısından oldukça önemlidir.

Fotoototrofi, heterotrofi ve miksotrofi yoluyla büyüme için üç beslenme modu geliştirmiş olan mikroalgler, aynı zamanda yaşam ortamlarına uygun olarak beslenme modlarını değiştirebilecek kapasiteye sahip özel bir gruptur. Pek çok mikroalg aşırı hızlı büyür ve bu nedenle tarla bazlı ürünlerden çok daha verimlidir ve yağ asitleri içeriği bazı alg türlerinde % 60-70 kuru ağırlık kadar olabilir (Hu ve ark., 2008). Bununla birlikte, lipidlerin birikmesine neden olan biyolojik tetikleyiciler hakkında hala pek bir şey bilinmemektedir, özellikle, yağ biyosentezini ve mikroalgde depolamayı kontrol eden düzenleyici mekanizmaların anlaşılması oldukça sınırlıdır (Fan ve ark., 2014).

*Chlorella* gibi fotosentetik mikroalgler, besinsel yağlar ve biyoyakıtlar için hammadde görevi görürken, heterotrofik yetiştirme büyüme oranlarını arttırabilir, yüksek hücre yoğunluklarını destekleyebilir ve triaçilgliserol (TAG) lipid içeriğini artırabilir. Bununla birlikte, bu türler fotoototrofik ve heterotrofik özelliklerine göre önemli ölçüde farklılık gösterirler. Çoğu tatlı su yeşil algleri karakteristik ve tipik olarak C16 ile C18 yağ asitleri ile doymamış yağ asitleri bakımından zengin olup, tüm *Chlorella* türleri toplam yağ oranlarını ve TAG seviyelerini heterotrofik ortamda arttırmaktadır (Rosenberg ve ark., 2014).

Mevcut çalışmamızda da görüldüğu üzere, % alan olarak tüm *Chlorella* sp. kültür setlerinde en fazla C18 yağ asitleri elde edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek C18 yağ asitleri nano-Fe<sup>0</sup> katılmış fotoototrofik grupta (%78.1) kaydedilmiştir. Sonra sırasıyla kontrol (%77.22), heterotrofik (%74.72) ve miksotrofik grup (%73.01) gelmiştir. C16

yağ asitleri ise en yüksek mikсотrofik (%25.37), sonrasında sırayla heterotrofik (%23.27), kontrol (%21.98) ve fotoototrofik grupta (%20.83) kaydedilmiştir. Doymamış yağ asitlerine bakıldığında (MUFA+PUFA), en yüksek değer nano-Fe<sup>0</sup> katılmış fotoototrofik grupta elde edilmiştir (%65.29). Kontrol, mikсотrofik ve heterotrofik gruplarda sırasıyla bu oran %63.77, %60.429 ve %55.618'dir.

Biyodizelin özellikleri yağ asitlerinin kompozisyonuna bağlıdır. Biyodizel yakıtının özellikleri, her bir yağ esterinin; zincir uzunluğu, doymamışlık derecesi ve zincir dallanması gibi özelliklerinin ve yapısının sonucudur. Yağ asiti esterleri bu parametreleri, setan sayısı, yanma ısısı, soğuk akış viskozitesi ve egzoz emisyonlarını etkiler. Mikroalglerden elde edilen biyodizel; yenilenebilirlik, emisyon azaltma ve ekonomi açısından potansiyel bir yakıt olarak kabul edilir ve mevcut teknolojiye uyarlanabilir (Al-Iwayzy ve ark., 2014).

Mikroalgal biyokütlenin biyodizele dönüştürülmesi tek sorumluluk değildir. Gelişmiş biyoyakıtın geleneksel dizelin alternatifi olarak uygunluk kontrolü yapılmalıdır. Bu, biyodizelin önemli termo-fiziksel özelliklerini ölçerek ve ASTM D 675 veya EN 14214 gibi uluslararası standartlarla karşılaştırılarak kontrol edilir. Bu standartların amacı, ulaşım yakıtı olarak ekonomik ve çevre dostu biyodizel kullanımını garanti altına almaktır (Deshmukh ve ark., 2019).

Buradan yola çıkarak mikroalgal biyokütlenin yağlarından elde edilen yağ asiti metil esterlerinin kısaca biyodizelin ticari anlamda kullanılması isteniyorsa ve petrol bazlı biyodizelin yerini alması umut ediliyorsa verimli ve kaliteli bir yakıt olması gerekmektedir. Biyodizelin petrol bazlı biyodizele alternatif olabilmesi için öncelikle dünyaca kabul görmüş standartları yakalaması gereklidir. Bu yakıtlar arasındaki kalite farklarını ölçmek adına çeşitli parametreler (setan sayısı, viskozite, kalorifik değer vb.) bulunmaktadır. Bu noktada ise yağ içeriğindeki yağ asitlerinin miktarları, karbon sayıları ve türleri (doymuş veya doymamış yağ asitleri) devreye girmektedir. Biyokütleden elde edilen yağ içeriklerinin çevresel faktörlerle değiştirilebileceği hem kaynak taramalarımızda hem de deneylerimiz sonucunda görülmüştür. Örneğin, nano-Fe<sup>0</sup> katılmış fotoototrofik kültür hem C18 yağ asitleri hem de doymamış yağ asitlerince zengindir. Bu da biyodizel üretimi için *Chlorella* sp.'nin kullanılabileceğini göstermektedir.

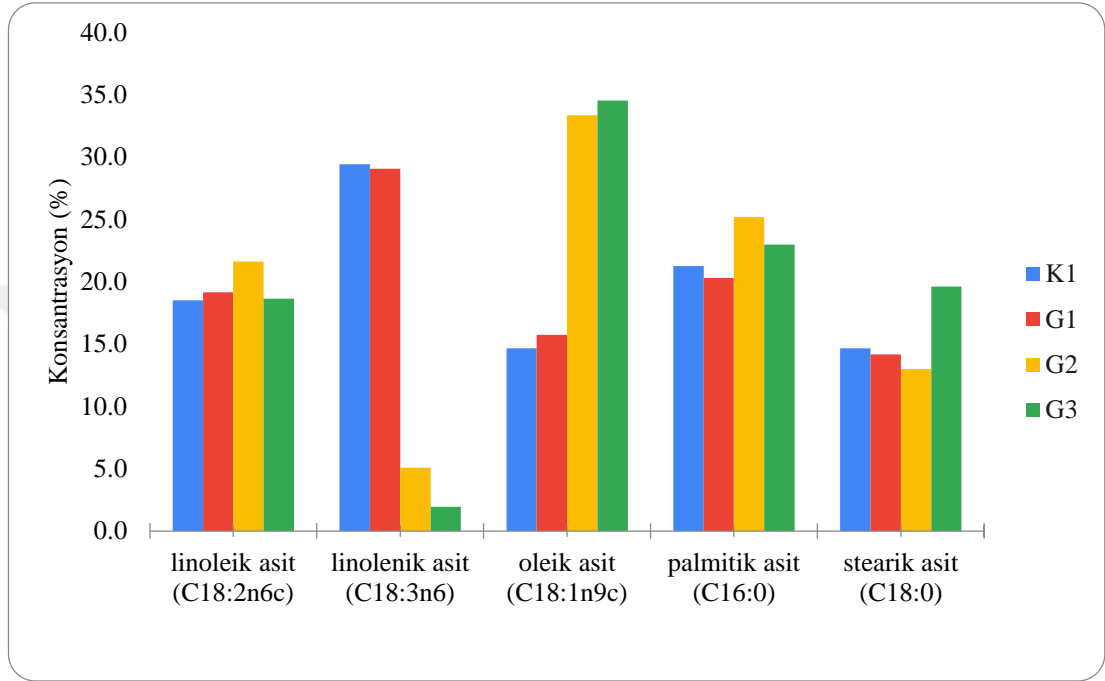


Setan sayısı ismi dizel yakıtla birlikte anılır. Avrupa’da geçerli olan EN590 standart içinde setan sayısının 51’den yukarıda olması gerektiği görülmektedir. Setan sayısı bir dizel yakıtın tutuşma kalitesinin ifadesidir. Setan sayısı yüksek olan yakıtın tutuşma kalitesi yüksek demektir (Öcal, 2007). Dolayısıyla, daha yüksek hacimli ortamlarda yapılacak olan mevcut çalışmamızdan elde edilecek olan biyodizelin bu analizlerinin yapılıp yakıt kalitesinin belirlenmesi ve standartlarla uygunluğunun karşılaştırılması gerekir.

Biyodizel çoğunlukla 16 ile 18 karbon atomu içeren yağ asit esterleri karışımıdır. Yağ asiti içerisinde bulunan karbon atomlarının sayısı ve türleri (doymuş yağ asitleri, tekli doymamış yağ asitleri ve çoklu doymamış yağ asitleri) biyodizelin özelliklerini kontrol eden başlıca faktörlerdir. Tek tek yağ asiti metil esterleri göz önüne alındığında, setan sayısı, erime noktası, kaynama noktası, kalorifik değer ve vizkozite gibi özellikleri yağ asitlerinin zincir uzunluğu ile birlikte artan eğilim göstermektedir. Sadece bir tür yağ asitinin yüzdesinin yüksek olması (yani doymuş, tekli doymamış veya çoklu doymamış yağ asitleri) iyi bir biyodizel eldesi için cazip değildir. İdeal olarak uzun zincirli doymuş yağ asitleri ile kısa zincirli tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asitlerinin iyi bir karışımı olmalıdır. Bu özelliklerinin bazılarının motor performansı ve emisyon karakteristiği gibi etkileri göz önüne alındığında biyodizelde sadece doymuş veya sadece çoklu doymamış yağ asitlerinin bulunması bu olumsuz etkisiyle uç sınır değerlere yol açacağından arzu edilmez (Deshmukh ve ark., 2019). Çalışmamızda tüm kültür setlerinde en fazla bulunan doymuş yağ asiti (SFA) palmitik asittir (C16:0); en yüksek mikсотrofik grupta (%25.17), sonra sırasıyla heterotrofik (%22.97), kontrol (21.25) ve fotoototrofik (%20.30) gruplarda bulunmuştur. Tekli doymamış yağ asiti (MUFA) olan oleik asit (C18:1n9c) tüm kültür setlerinde en fazla bulunan yağ asitidir. En yüksek değer heterotrofik grupta kaydedilmiştir (%34.54). Bu yağ asiti mikсотrofik grupta %33.34, ototrofik grupta %15.74 ve kontrol grubunda %14.66 oranında alan kaplamıştır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) ise linolenik asit (C18:3n6) ile linoleik asit (C18:2n6c) en yüksek ölçülen yağ asitleridir. Linolenik asit en yüksek kontrol (%29.42) ve fotoototrofik (%29.07), linoleik asit ise en yüksek mikсотrofik (%21.62) ve heterotrofik (%18.64) gruplarda kaydedilmiştir.

Çalışmamızda, nano-Fe<sup>0</sup> partikülünün ototrof, heterotrof ve mikсотrofik kültürde yetiştirilen *Chlorella* sp. üzerindeki etkisi biyomas ölçüm metotları ve yağ içeriği

kompozisyonu analizi ile belirlenmiş ve sonuçlar her bir kültür grubunun yukarıda da açıklandığı gibi biyodizel üretimi için etkili yağ asitlerini içerdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, doğadan izole edilen bu türün biyoyakıt olarak değerlendirilebilme potansiyeli ortaya konulmaktadır. Şekil 4.6’da major ve Şekil 4.7’de minor yağ asitlerinin dağılımı görülmektedir.



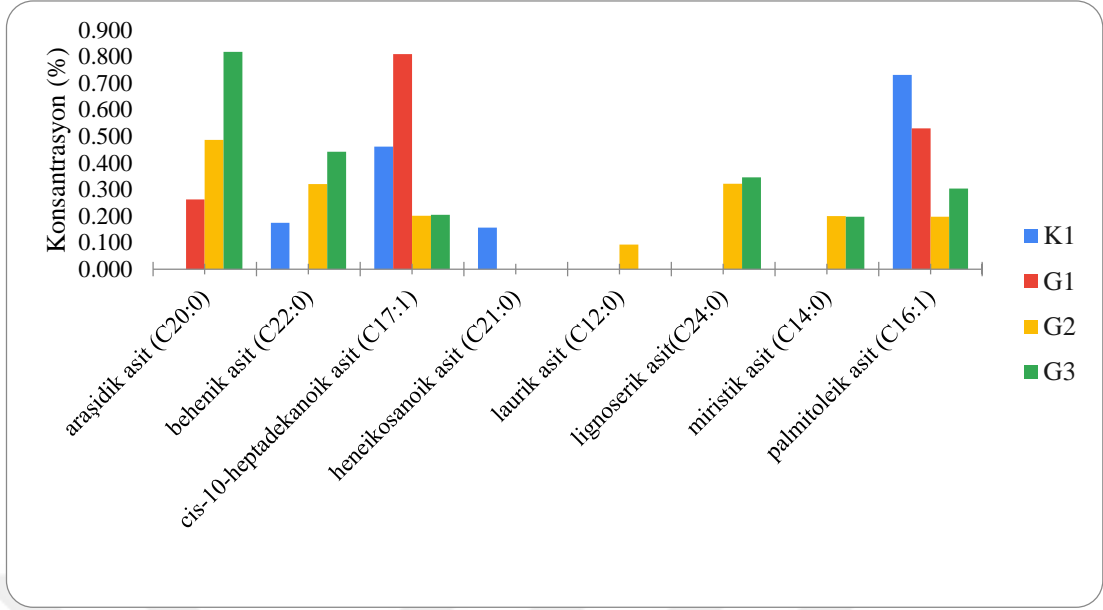
**Şekil 4.7** Farklı Deney Gruplarında Major Yağ Asitlerinin Dağılımı

Genel olarak yağ asidi karbon zincirindeki artış, daha fazla miktarda CO, yanmamış hidrokarbon ve duman emisyonuna neden olur. Ancak, NO<sub>x</sub> emisyonları azaltılmıştır. Parçacık halindeki emisyonlar, daha yüksek zincirli yağ asiti ester molekülleri içerdikçe çok sayıda çekirdeklenme modu (5 ila 40 nm çapında) parçacıkları içerir. Dizel yakıt biyodizel kuyasla çok sayıda birikim modu partikülü nedeniyle daha yüksek toplam partikül emisyon kütlesi yayar. Doymuş ve doymamış yağ asitleri bileşiminin belirli bir mikroalg sınıfı arasında bile büyük ölçüde değiştiği açıktır. C16 serisi yağ asiti esas olarak doymuş yağ asidi (palmitik asit, C16:0) formunda bulunur ve az sayıda türde palmitik asit yüzdesi %50 seviyelerine kadar bulunur. Oysa C18 serisi temel olarak doymamış formda bulunur (C18:1, C18:2 ve C18:3). Bazı türlerde, oleik asit içeriği %60’a kadar bile bulunabilir (Deshmukh ve ark., 2019). Çalışmamızda en yüksek oleik asit içeriği nano-Fe<sup>0</sup> ve glikoz katılmış heterotrofik ve

miksotrofik ortamlarda yetiştirilen *Chlorella* sp. kültürlerinde kaydedilmiştir (%34.54 ve %33.34). Ototrofik kültürlerde oleik asit içeriği %15 civarındadır.

Deshmukh ve ark. (2019)'na göre mikroalglerde linolenik asitin daha yüksek olması, mikroalgal biyodizelin ana sınırlayıcı parametresidir. Özelliklerin bazıları, çok yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitlerinden dolayı verilen standartların getirdiği sınırlamaları karşılamayabilir. Bu nedenle, mikroalgler biyodizel yakıt üretmek için yüksek potansiyele sahip olsa da, düşük kalite sunabilmesi dizel motor yakıtı olarak kullanılmasında bir barikat görevi oluşturabilir. Buna istinaden yaptığımız deneyler sonucunda Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, GC-FID yağ asiti analizlerinde kontrol ve fotoototrofik gruplarda %29 oranlarındaki linolenik asit içeriği kaynak taramalarıyla örtüşmekte ve en yüksek yüzdeye sahip yağ asiti olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak ortama nano-Fe<sup>0</sup> ve glikoz katılması biyodizel yakıt kalitesinde sınırlayıcı olan linolenik asitin %5'e (miksotrofik grupta), heterotrofik grupta ise ışığın kesilmesiyle birlikte %2'ye düştüğü görülmektedir. G2 ve G3'te biyodizel kalitesinde sınırlayıcı parametre olarak karşımıza çıkan ve biyodizel Avrupa standardı EN 14214 (yağ asiti metil esterleri) kapsamında linolenik asit esterlerinin maksimum %12 olarak belirlenmiş limitin oldukça altındadır. Bununla birlikte kontrol ve diğer gruplar karşılaştırıldığında, nano-Fe<sup>0</sup> eklentisinin palmitik asit metil esterinde büyük ölçülerde değişim yaratmaması sebebiyle kaliteli biyodizel eldesi açısından uzun zincirli doymuş yağ asiti dengesinin korunduğu düşünülmektedir.

Lin ve Lin (2012)'e göre yağ asitleri %38.91 oleik asit (C18:1), %25.38 linoleik asit (C18:2) ve %22.31 palmitik asit (C16:0) içeren biyodizel, yüksek asit yağından elde edilen biyodizel olarak anılmaktadır. Deneylerimiz sonucunda yapılan yağ asitleri analizlerine göre G2 (miksotrofik) ve G3 (heterotrofik) oleik asit, linoleik asit ve palmitik asit oranlarının yüksekliği ve genel konsantrasyonun 3/4'ünü oluşturduğundan yüksek asitli yağ olarak tanımlanabileceği düşünülmektedir. Deneylerimiz sonrasında çıkan sonuçlara göre doymamış yağ asiti içerikleri G2 ve G3'te oldukça fazladır.



**Şekil 4.8** Farklı Deneç Grularında Minör Yağ Asitlerinin Dağılımı

Yine, Lin ve Lin (2012) çalışmalarında yüksek asitli yağdan elde edilen biyodizelde, doymuş yağ asiti içeriğinin süperkritik metanol transesterifikasyonu sonucunda yaklaşık %82 oranında arttığını belirtmişlerdir. Bu da doymuş yağ asiti içeriğinin artmasının yakıtta yüksek oksidatif ve termal kararlılığa neden olacağını ve lipit karakteristiklerinin daha yavaş bir bozulma oranına yol açacağını belirtmişlerdir. Atık yağdan elde edilen biyodizeldeki çoğunluk olan yağ asiti çeşitleri ise oleik asit, linoleik asit ve palmitik asit olarak karşımıza çıkmaktadır.

Buradan hareketle, deneylerimiz sonucunda yağ asitlerine bakarak G2 ve G3'te yağ asit dağılımlarının dünya genelinde kullanımı yaygın olan atık yağdan biyodizel yakıtının yağ asit parametrelerine yakın olduğu görülmektedir. Bu da nano-Fe<sup>0</sup> ve glikoz ilave edilmiş *Chlorella* sp. mikotrofik ve heterotrofik grupların yağ asit içeriklerinin biyodizel üretiminde kullanılmasının daha uygun olduğu kanaatine yol açmaktadır.

Yüksek asit yağından elde edilen biyodizel en iyi termal ve oksidatif kararlılığa sahip olmasına ilaveten, yüksek sıcaklıktaki ortamlarda veya uzun süreli yakıt depolamada bozulmayı geciktirir. Yakıtın düşük damıtma sıcaklığı genel olarak ağır bileşikleri az içermesi anlamına gelir ve bu da daha uzun ateşleme gecikmesi ile motor vuruntu seviyesinin de yukarı çekilmesine yol açar. Damıtma sıcaklığı sıvı yakıtta hafif ve ağır

kimyasal bileşiklerin uçuculuğunun ve dağılımının ana göstergelerinden biridir. (Lin ve Lin, 2012). G2 ve G3 yüksek asitli olarak değerlendirildiğinde; termal ve oksidatif kararlılığının yanında, uzun süreli depolamada bozulmayı geciktirebilmesi sebebiyle de umut vaat etmektedir. Ayrıca yüksek asitli yağdan elde edilen biyodizelde daha uzun ateşleme gecikmesi ile motor vuruntu seviyesinin de yukarı çekilebileceği anlamını doğurmaktadır.

Knothe (2005) oleik asit (C18:1) gibi daha yüksek miktarda tekli doymamış yağ asiti içeren biyodizelin genellikle daha yüksek bir damıtma sıcaklığına sahip olduğunu bulmuştur. Yapılan deneylerimiz sonucunda, kontrol grubumuzdaki % 14.66 olan oleik asit miktarı, sırasıyla G1’de % 15.74’e, G2’de % 33.34’e ve nihayet G3’te ise % 34.54 seviyesine çıkmıştır. Bu da kanaatimizce oleik asitin kontrol grubuna kıyasla mikсотrofik (G2) ve heterotrofik (G3) gruptaki iki kattan fazla artışı damıtma sıcaklığının da yukarı çekilebileceği sonucunu doğurmaktadır.

Viskozite sıvı yakıtta direkt olarak atomizasyon, akışkanlık, çarpma mesafesi ve yanma efektifliğiyle ilgilidir. Biyodizel genel olarak petrol bazlı dizelden daha az viskoziteye sahiptir. Yüksek asitli yağdan elde edilen biyodizel ana içerik olarak uzun karbon zincirli ve yüksek molekül ağırlıklı trigliseritlerden oluştuğundan bu durumu tersine çevirmemiştir (Lin ve Lin, 2012).

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde kullanılan enerji kaynaklarının çoğunluğunu fosil enerji kaynakları oluşturmaktadır. Bu kaynakların tükenebilir olması ve doğaya verdiği zararlar nedeniyle dünya genelinde yenilenebilir enerji kaynaklarına eğilim başlamıştır. Birinci ve ikinci nesil yakıtlar, özellikle fosil yakıtlar yenilenebilir değildir. Bunun yanında, çevre ve insan üzerinde, gıda güvenliği gibi konularda olumsuz etkileri vardır. İkinci nesil yakıtların üretimi için de geniş tarım arazilerine olan ihtiyaç vb. nedenlerden dolayı, hem avantajlı hem de yenilenebilir olması bakımından üçüncü nesil olarak tanımlanan alg biyokütlelerden enerji kaynağı olarak yararlanmak günümüzün en popüler konularındandır. Mikroalgler yüksek yağ içeriğine sahip oldukları için, biyoyakıt üretimi açısından önemli bir alternatif olarak görülmektedir. Dolayısıyla, yenilenebilir biyokütle enerji kaynağı olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Bu kapsamda, biyodizel potansiyelini araştırmak için Turnasuyu Çayı'ndan (Ordu) izole edip sıvı kültür ortamında farklı koşullarda çoğalttığımız mikroalglerden *Chlorella* sp. türünün yağ asiti kompozisyonu incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Gelişme periyodu izlenerek 120 saat süren deney sonucunda farklı kültür ortamlarından hasat edilen mikroalgin yağ asiti metil esterleri kompozisyonu incelendiğinde; SFA, MUFA ve PUFA dahil toplam 13 yağ asitinden oluştuğu tespit edilmiştir. *Chlorella* sp. türünün C16 ve C18 yağ asitleri bakımından zengin olduğu görülmüştür. Bu karbon atomlarınca zengin olması ilgili mikroalgin biyodizel üretimi için kullanılabilir türlerden olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda % alan olarak C16 ve C18 yağ asitleri değerleri sırasıyla 20.83 ila 25.37 ve 73.01 ila 78.1 aralığında kaydedilmiştir. C16 en yüksek mikсотrofik koşullarda, C18 en yüksek ototrofik koşullarda elde edilmiştir. Heterotrofik kültür SFA ile MUFA bakımından, ototrofik kültür ise PUFA bakımından zengindir.

Çalışmamızda farklı kültür gruplarında en fazla bulunan doymuş yağ asiti palmitik asit olup, en yüksek mikсотrofik grupta (G2, %25.17), sonra sırasıyla heterotrofik (G3, %22.97), kontrol (K, 21.25) ve fotoototrofik (G1, %20.30) gruplarda kaydedilmiştir. Oleik asit (tekli doymamış yağ asiti) tüm kültür setlerinde en fazla bulunan yağ asitidir. En yüksek değer heterotrofik (%34.54) ve mikсотrofik (%33.34) grupta kaydedilmiştir. Ototrofik ve kontrol grubunda ise sırasıyla, %15.74 ve %14.66 oranında alan kaplamıştır. *Chlorella* sp. kültürlerinde en yüksek ölçülen çoklu

doymamış yağ asitleri linolenik asit ile linoleik asittir. Linolenik asit en yüksek kontrol (%29.42) ve fotoototrofik (%29.07), linoleik asit ise en yüksek mikсотrofik (%21.62) ve heterotrofik (%18.64) gruplarda kaydedilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, farklı kültür koşullarında *Chlorella* sp. yağ asitleri kompozisyonuna bakarak mikсотrofik ve heterotrofik grupların yağ asit dağılımlarının dünya genelinde kullanımı yaygın olan atık yağdan biyodizel yakıtının yağ asit parametrelerine yakın olduğu görülmektedir. Bu da nano-Fe0 ve glikoz ilave edilmiş *Chlorella* sp. mikсотrofik ve heterotrofik gruplarının yağ asit içeriklerinin biyodizel üretiminde kullanılmasının daha uygun olduğunu göstermektedir.

Çalışma sonucu, Turnasuyu Çayı'ndan izole edilen doğal suş *Chlorella* sp. türünün biyodizel üretiminde kullanılabilir biyokaynak olduğu gösterilmiştir. Alg kültür ortamında nanopartikül (nano-Fe0) kullanmanın özellikle C18 yağ asitleri ile PUFA içeriğini zenginleştirdiği, nanopartikül ile glikozun birlikte kullanılması durumunda ise SFA ve MUFA bakımından zenginleştiği tespit edilmiştir.

Bundan sonra yapılacak araştırmalarda, çalışmamızda doğal tür olarak seçtiğimiz *Chlorella* sp.'nin moleküler analizi yapıp türü belirlendikten sonra, diğer mikroalglerle performansı karşılaştırılıp, farklı kültür koşullarında veya farklı stress altında lipit içeriği, verimliliği ve yağ asitleri kompozisyonu değerlendirilebilir.

Mikroalglerden ticari boyut biyodizel üretiminde hasat ile birlikte yağ çıkarımı ve transesterifikasyon konuları halen daha üzerinde çalışılması gereken noktalar. Mikroalgal biyokütlenin hasatı, kurutulması, yağının çıkartılıp biyoyakıt dönüştürülmesi maliyetli işlemler olarak karşımıza çıkabilmektedir. Bu maliyetlerin düşürülmesi için biyokütlenin hasatı ve algal pastadan direkt yağ çıkarımına istinaden transesterifikasyonu halen üzerinde çalışılması gereken diğer konular olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikroalglerden elde edilen yağların taşıtlarda %100 yağ asiti metil esteri yakıtı olarak kullanımından ziyade petrol bazlı dizele katılmasıyla kullanılması daha uygun olacaktır. Keza buna istinaden 16 Haziran 2017 tarihinde Resmi Gazete'de 30098 sayı ile yayınlanan ve 1 Ocak 2018 tarihinde yürürlüğe giren "Motorin Türlerine Biodizel Harmanlanması Hakkında Tebliğ" içeriğinde belirtildiği gibi ilgili tarihten sonra, dağıtıcı lisansı sahipleri tarafından bir takvim yılı içerisinde sattıkları motorinin toplamına en az %0.05 (v/v) oranında yerli tarım ürünlerinden ve/veya atık yağlardan

Üretilmiş biyodizelin hamanlanmış olması zorunlu hale getirilmiştir. Bu noktada ülkemizin dışa bağımlılığının azaltılması adına biyodizel üretim faaliyeti gelecek vaat eden bir fırsat kapısı olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikroalglerden biyodizel üretim kapasitesi diğer yağ bitkileriyle karşılaştırıldığında birim alandan en yüksek yağ almak ise diğer bir fırsat kapısıdır. Mikroalg retimi; ülkemizdeki su potansiyeli, belediyelerin mevcut su arıtım tesisleri, gıda işleme atıkları, hayvan ve belediye atıksuları gibi yerlerde üretim yapılabilme potansiyeli, ülkemizin iklim şartlarının uygunluğu, olası yatırım kapsamında yatırımın en az %50'sinin geri ödemesiz devlet desteği kapsamında olması (Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu) gibi konular birlikte ele alındığında çok büyük umut vaat eden bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır.



## 6. KAYNAKLAR

- Abdelaziz, A. E., Leite, G. B. & Hallenbeck, P. C. (2013). Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels. *Environmental Technology*, 34(13-14), 2801-1836.
- Al-Iwayzy, S.H., Yusaf, T. & Al-Juboori, R.A. (2014). Biofuels from the fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* for diesel engines. *Energies*, 7, 1829-1851.
- Almeelbi, T. & Bezbaruah, A. (2014). Nanoparticle-sorbes phosphate: iron and phosphate bioavailability studies with *Spinacia oleracea* and *Selenastrum capricornutum*. *American Chemical Society Sustainable Chemical Engineering*, 2, 1625-1632.
- Almeelbi, T. B. (2012). Phosphate removal and recovery using iron nanoparticles and iron cross-linked biopolymer. PhD Thesis, North Dakota State University, Agriculture and Applied Science, Fargo/North Dakota, USA.
- Almeelbi, T., & Bezbaruah, A. (2012). Aqueous phosphate removal using nanoscale zero-valent iron. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(7), 900.
- Al-Shammari, R. H. H. (2018). Harvesting of *Chlorella* sp. by so-cultivation with some filamentous fungi. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 28(2), 35-42.
- APHA (1995). American Public Health Association, 10200 F. Phytoplankton Counting Techniques. Washington, DC, USA.
- Bahadar, A. & Khan, M. B. (2013). Progress in energy from microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 128-148.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.
- Bergmann, M. & Peters, R. H. (1980). A simple reflectance method for the measurement of particulate pigment in lake water and its application to Phosphorus-Chlorophyll-Seston Relationships. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*, 37, 111-114.
- Bharte, S. & Desai, K. (2019). Harvesting *Chlorella* species using magnetic iron oxide nanoparticles. *Phycological Research*, 67, 128-133.
- Bold, H. C. (1949). The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 101-108.
- Bulut, Y. (2009). *Chlorella*'da (Chlorophyceae) yağ miktarını arttırma olanaklarının araştırılması. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.

- Chen, Z., Wang, L., Qiu, S. & Ge, S. (2018). Determination of microalgal lipid content and fatty acid for biofuel production. *BioMed Research International*, 3 (2018), 1-17.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology*, 26(3), 126-131.
- Çılgın, E. (2015). 3. Nesil biyoyakıt teknolojisi alglerin bir dizel motorunda performans ve egzoz emisyonlarına etkisinin araştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(3), 33-41.
- 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.
- Dünahay, T.G., Jarvis, E.E., Zeiler, K.G., Roessler P.G. & Brown L.M. (1992). Genetic engineering of microalgae for fuel production – scientific note, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 34-35, 331-339.
- Durmaz, Y. & Temli, G. (2018). Farklı besin ortamının ve farklı ışık yolu uzunluğunun *Chlorella vulgaris* kültüründe etkisi. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 35(2), 169-174.
- Ebrahiminezhad, A., Zare-Hoseinabadi, A., Sarmah, A. K., Taghizadeh, S., Ghasemi, Y. & Berenjian, A. (2018). Plant-Mediated synthesis and application of iron nanoparticles. *Molecular Biotechnology*, 60, 154-168.
- Elcik, H. & Çakmakçı, M. (2017). Mikroalglerden yenilenebilir biyoyakıt üretimi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32(3), 795-820.
- Eliçin, A. K., Kılıçkan, A. & Onurbaş Avcıoğlu, A. (2009). Mikroalglerden biyodizel üretimi. 25. tarımsal mekanizasyon ulusal kongresi, 01-03 Ekim, Isparta.
- Fan, J., Cui, Y., Zhou, Y., Wan, M., Wang, W., Xie, J. & Li, Y. (2014). The effect of nutrition pattern alteration on *Chlorella pyrenoidosa* growth, lipid biosynthesis-related gene transcription. *Bioresource Technology*, 164, 214-220.
- Fu, F., Dionysiou, D. D. & Liu, H. (2014). The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 267, 194-205.
- Gökpınar, Ş., Işık, O., Göksan, T., Durmaz, Y., Uslu, L., Ak, B., Önalın, S.K. & Akdoğan, P. (2013). Algal biyoteknoloji çalışmaları. *Yunus Araştırma Bülteni*, 4, 21-26.

- González, L. E., Díaz, G. C., Aranda, D. A. G., Cruz, Y. R. & Fortes, M. M. (2015). Biodiesel production based in microalgae: a biorefinery approach. *Natural Science*, 7(07), 358.
- Gözükara, E.M. (1989). *Biyokimya*. Ofset Reptomat Ltd. Şti, Ankara, 1104s.
- Guiry, M. D. & Guiry, G. M. (2018). AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>-(Erişim tarihi:15 Mart 2018).
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J. & Michell, R. H. (2016). *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health*. John Wiley & Sons.
- Hariskos, I. & Posten, C. (2014). Biorefinery of microalgae—opportunities and constraints for different production scenarios. *Biotechnology Journal*, 9(6), 739-752.
- He, M., Yan, Y., Pei, F., Wu, M., Gebreluel, T., Zou, S. & Wang, C. (2017). Improvement on lipid production by *Scenedesmus obliquus* triggered by low dose exposure to nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 15526.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W. & Hu, B. (2010). Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), 1978-1995.
- Hindak, F. (1990). Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae). *Biologické Prace*, 36, 1-227.
- Hossain, A. S., Salleh, A., Boyce, A. N., Chowdhury, P. & Naquiuddin, M. (2008). Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), 250-254.
- Hosseinzand H., Sokhansanj S. & Lim C.J. (2018). Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Drying Technology*, 36:9, 1049-1060.
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87(1), 38-46.
- Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and application of iron nanoparticles. *Small*, 1(5), 482-501.
- Huber, G. W., Iborra, S. & Corma, A. (2006). Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical Reviews*, 106(9), 4044-4098.
- Illman, A. M., Scragg, A. H. & Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 631-635.

- Jarméus, C. (2013). Energy Analysis of Biodiesel and Biogas Production from Baltic Sea Macro Algae. Master Thesis, Royal Institute of Technology, Industrial Ecology, Stockholm/Sweden.
- Khan, S. A., Hussain, M. Z., Prasad, S. & Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2361-2372.
- Kim, S., Park, J. E., Cho, Y. B. & Hwang, S. J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 144, 8-13.
- Knothe G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86, 1056-1070.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N. & Nagai, S. (1992). Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(1), 61-63.
- Krienitz, L., Bock, C., Nozaki, H. & Wolf M. (2011). SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga "*Selenastrum capricornutum*" recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped Chlorophyta. *Journal of Phycology*, 47, 880-893.
- León-Vaz, A., León, R., Díaz-Santos, E., Vígara, J. & Raposo, S. (2019). Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. *New Biotechnology*, 51, 31-38.
- Li, Q., Du, W. & Liu, D. (2008a). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5), 749-756.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q. & Dubois-Calero, N. (2008b). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24(4), 815-820.
- Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043-1049.
- Lin C.Y. & Lin Y.W. (2012). Fuel characteristics of biodiesel produced from a high-acid oil from soybean soapstock by supercritical-methanol transesterification. *Energies*, 5, 2370-2380.
- Liu, Z. Y., Wang, G. C. & Zhou, B. C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99, 4717-4722.
- Loseva, N. L., Alyabyev, A. J., Rachimova, G. G. & Estrina, R. I. (1998). The effect of high temperature and salt on the metabolic heat rate of *Chlorella* cells. *Thermochimica Acta*, 309(1-2), 129-131.

- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other application: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
- Mayo, A.W. & Noike, T. (1994). Effect of glucose loading on the growth behavior of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria in mixed culture. *Water Research*, 28-5, 1001-1008.
- McLarnon-Riches, C. J., Rolph, C. E., Greenway, D. L. & Robinson, P. K. (1998). Effects of Environmental Factors and Metals on *Selenastrum Capricornutum*. *Phytochemistry*, 49(5), 1241-1247.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1-5.
- Mercer, P. & Armenta, R. E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(5), 539-547.
- Miao, X. & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97(6), 841-846.
- Miao, X., Wu, Q. & Yang, C. (2004). Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71(2), 855-863.
- Miazeck, K., Waldemar, I., Remacle, C., Richel, A. & Goffin, D. (2015). Effects of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23929-23969.
- Mitra, D., van Leeuwen, J. H. & Lamsal, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1(1), 40-48.
- Mulders, K. J., Lamers, P. P., Martens, D. E. & Wijffels, R. H. (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of phycology*, 50(2), 229-242.
- Mulders, K. M., Lamers, P. P., Martens, D. & Wijffels, R. H. (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of Phycology*, 50, 229-242.
- Nygaard, G., Komarek, J., Kristiansen, J. & Skulberg, O. M. (1987). Taxonomic designation of the biomass alga NIVA-CHL1 ("*Selenastrum capricornutum*") and some related strains. *Opera Botanica*, 90, 1-46.
- Öcal, M. (2007). Setan Sayısı Hakkında 6 Soru. *Mühendis ve Makina*, 48, 568, 25. [http://www1.mmo.org.tr/resimler/dosya\\_ekler/9892a989183de32\\_ek.pdf?dergi=98](http://www1.mmo.org.tr/resimler/dosya_ekler/9892a989183de32_ek.pdf?dergi=98) (Erişim Tarihi 05.11.2019).


- Özçimen, D., Gülyurt, M. & Inan, B. (2017). Optimization of biodiesel production from *Chlorella protothecoides* oil via ultrasound assisted transesterification. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 23(3).
- Özemre A.Y. (2019). Konvansiyonel ve Alternatif Enerji Kaynakları Açısından Dünya'nın Geleceği. International Atomic Energy Agency, [https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/29/033/29033637.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/29/033/29033637.pdf) (Erişim Tarihi: 28.11.2019).
- Padrova, K., Lukavsky, J., Nedbalova, L., Cejkova, A., Cajthaml, T., Sigler, K., Vitova M. & Rezanka, T. (2015). Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 27, 1443-1451.
- Parsons, T.T. & Strickland, J.D.H. (1963). Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journal of Marine Research*, 21, 155-163.
- Parvin, M., Zannat, M. N. & Habib, M. A. B. (2007). Two important techniques for isolation of microalgae. *Asian Fisheries Science*, 20(1/2), 117.
- Perez, L., Cancela, A., Maceiras, R., Salgueiro, J. L. & Sanchez, A. (2015). *Selenastrum capricornutum*: Harvesting and oil extraction, for biodiesel production. *European Journal of Sustainable Development*, 4, 2, 97-102.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E. & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
- Prommuak C., Pavasant P., Quitain T.A., Goto M. & Shotipruk A. (2012). Microalgal lipid extraction and evaluation of single-step biodiesel production. *Engineering Journal*, 16-6, 157-165p.
- Pszczolkowska A., Pszczolkowski W. & Romanowska-Duda Z. (2019). Potential of *Chlorella vulgaris* culture for waste treatment from anaerobic biomass biodigestion at the Piaszczyzna (Poland) integrated facility. *Journal of Phycology*, 55, 816-829.
- Rosenberg, J.N., Kobayashi, N., Barnes, A, Noel, E.A., Betenbaugh, M.J. & Oyler, G.A. (2014). Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *C. sorokiniana*. *Plos One* 9(4): 1-13.
- Sánchez, S., Martínez, M. & Espinola, F. (2000). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6(1), 13-18.

- Scragg, A. H., Morrison, J. & Shales, S. W. (2003). The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(7), 884-889.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. & Schenk, P. M. (2012). High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*, 5, 1532-1553.
- Shi, X. M., Zhang, X. W. & Chen, F. (2000). Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(3-5), 312-318.
- Sivakumar, G., Vail, D. R., Xu, J., Burner, D. M., Lay, J. O., Ge, X. & Weathers, P. J. (2010). Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. *Engineering in Life Sciences*, 10(1), 8-18.
- Song, D., Fu, J. & Shi, D. (2008). Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(3), 341-348.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Stevenson, L. M., Adeleye, A. S., Su, Y., Zhang, Y., Keller, A. A. & Nisbet, R. M. (2017). Remediation of Cadmium Toxicity by Sulfidized Nano-Iron: The Importance of Organic Material. *American Chemical Society Nano*, 11, 10558-10567.
- Suali, E. & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316-4342.
- Subramaniam, V., Subashchandrabose, S. R., Ganeshkumar, V., Thavamani, P., Chen, Z., Naidu, R. & Megharaj, M. (2016). Cultivation of *Chlorella* on brewery wastewater and nano-particle biosynthesis by its biomass. *Biosource Technology*, 211, 698-703.
- Sukatar, A. (2002). Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları: 184, İzmir.
- Tsuzuki, M., Ohnuma, E., Sato, N., Takaku, T. & Kawaguchi, A. (1990). Effects of CO<sub>2</sub> concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. *Plant Physiology*, 93(3), 851-856.
- Türk, H. & Hanay, Ö. (2017). Nano boyutlu sıfır değerlikli demir ile sulu ortamlarda klortetrasiklin giderim mekanizmasının incelenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(5), 1000-1007.
- UTEX, 2019a. Bristol Medium. <https://utex.org/products/bristol-medium?variant=30991782838362> (Erişim Tarihi 05.05.2019).

- UTEX, 2019b. Bold Basal Medium. <https://utex.org/products/bold-basal-medium?variant=30991127609434> (Erişim Tarihi 24.06.2019).
- Viswanathan, T., Mani, S., Das, K., Chinnasamy, S. & Bhatnagar, A. (2011). Thin layer drying kinetics and chemical composition of microalgae consortium. *Transaction of ASABE*, 54(6), 2245-2252.
- Wang, H., Xiong, H., Hui, Z. & Zeng, X. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggy wastewater to produce lipids. *Bioresource Technology*, 104, 215-220.
- Wang, Y., Rischer, H., Eriksen, N. T. & Wiebe, M. G. (2013). Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids. *Bioresource Technology*, 144, 608-614.
- Wen, Z. Y. & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21(4), 273-294.
- Widjaja, A., Chien, C. C. & Ju, Y. H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13-20.
- Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T., Zhang, Y. & Li, A. (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology*, 110, 496-502.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J. & Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(1), 29-36.
- Xu, H., Miao, X. & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 499-507.
- Yaşar, F. & Altun, Ş. (2018). Biodiesel properties of microalgae (*Chlorella protothecoides*) oil for use in diesel engines. *International Journal of Green Energy*, 15(14-15), 941-946.
- Yaşar, F. (2018). Evaluation and advantages of algae as an energy source. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(3), 1309-1318.
- Yeh, K. L., Chang, J. S. & Chen, W. M. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences*, 10(3), 201-208.



## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Talha Giray DALKIRAN
Doğum Yeri	Şahinbey
Doğum Tarihi	13.02.1989
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0 507 574 8663
E-Posta Adresi	giray.dalkiran@gmail.com
	
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ege Üniversitesi
Fakülte	Su Ürünleri Fakültesi
Bölümü	Su Ürünleri Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	12.09.2013
Yüksek Lisans	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Program Adı	
Mezuniyet Tarihi	
Yayınlar	