

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ATIKSU ORTAMINDA YETİŞTİRİLEN MİKROALGLERİN
YAĞININ KARAKTERİZASYONU ve DEĞERLENDİRİLMESİ**

**GÜLFEM SOYDEMİR
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2016**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATIKSU ORTAMINDA YETİŞTİRİLEN
MİKROALGLERİN YAĞININ
KARAKTERİZASYONU ve
DEĞERLENDİRİLMESİ

GÜLFEM SOYDEMİR
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MİRAT D. GÜROL

GEBZE
2016

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF
LIPIDS OF MICROALGAE GROWN IN
WASTEWATER**

GÜLFEM SOYDEMİR

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTORATE OF PHILOSOPHY
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING**

**THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MIRAT D. GUROL**

GEBZE

2016



DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 13/04/2016 tarih ve 2016/28 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28/04/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan GÜLFEM SOYDEMİR'in tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Mirat D. GÜROL

Mirat D. Gürol

ÜYE

: Prof. Dr. Z. Selma TÜRKAY

Selma Türkay

ÜYE

: Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

Bülent Keskinler

ÜYE

: Prof. Dr. Güleda ENGİN

Güleda Engin

ÜYE

: Prof. Dr. Ahmet KARAGÜNDÜZ

Ahmet Karagündüz

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, evsel atıksu arıtma tesisi ikincil arıtım deşarj suyu kullanılarak mikroalg biyokütlesi üretilmesi ve bu biyokütlenin biyodizel üretim potansiyelinin değerlendirilmesi araştırılmıştır.

Evsel atıksu ve karışık türlerden oluşan mikroalg biyokütlesi kullanılarak, laboratuvar şartlarında, açık havuzlarda yapay ışık ve sürekli CO₂ gazı ilavesiyle gerçekleştirilen biyokütle üretim çalışmalarında, mikroalgler için gereken besin ortamı sadece atıksudan sağlanmıştır. Atıksuda sabit büyüme koşullarında (ışık yoğunluğu, sıcaklık, pH) membran filtrasyonu kullanımı ile reaktörler yarı-kesikli çalıştırılarak biyokütle konsantrasyonu 3000 mg/L'ye kadar çıkartılmıştır.

Karışık kültürün toplam lipit (polar ve nötral) içeriğinin belirlenmesinde Bligh and Dyer metodu modifiye edilerek kullanılmış ve karışık kültürün toplam lipit yüzdesi biyokütlenin %26,2±0,6'sı olarak ölçülmüştür. Mikroalgal lipitlerin içinde toplam gliserit (nötral lipit) yüzdesi ise GC analizleri sonucunda %74,4 olarak belirlenmiştir.

Mikroalglerden biyodizel üretiminde, asit katalizör varlığında üç farklı transesterifikasyon yöntemi kullanılmış, mikroalg biyokütlesinin yağ asidi metil esteri (YAME) içeriği ve biyodizele dönüşüm verimleri belirlenmiştir. GC analizleriyle belirlenen yağ asidi profilinin temel olarak palmitik, palmitoleik, stearik, oleik, linoleik ve linolenik asit metil esterlerinden oluştuğu saptanmıştır. Bu sonuçlar ve gliserit yüzdesinin toplam lipit içinde yüksek olması üretilen kültürün biyodizel dönüşümü için uygun olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada en yüksek biyodizel dönüşüm verimi olan %93,0±4,1 (YAME/lipit) yüzdesine mikrodalga destekli in-situ transesterifikasyon yöntemi ile ulaşılmıştır.

Çalışma sonuçları, evsel atıksu arıtma tesisi ikincil arıtım deşarj suyuna adapte olarak üreyen karışık kültürün, sentetik besin ve temiz su kullanarak üretilen saf kültürlerle benzer kalitede ve miktarda lipit ürettiğini ve dolayısıyla daha az maliyetli bir alternatif ortaya koyduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Evsel Atıksu, İkincil Arıtım Çıkış Suyu, Mikroalg, Lipit, Biyodizel, Transesterifikasyon.

SUMMARY

In this thesis study, the biodiesel production potential of the microalgal biomass grown in secondary domestic wastewater was investigated.

The biomass production was carried out using mixed microalgae culture grown in domestic effluent, in lab-scale open ponds, under artificial light source, with continuous carbondioxide (CO₂) delivery and the wastewater with its constituents were the only nutrient source for the production of microalgal biomass. The biomass concentration could be increased to 3000mg/L in semi-continuous, membrane filtration reactors at constant growth conditions (constant pH, light density and temperature).

A modified Bligh and Dyer method was utilized for determination of total lipid content (polar and neutral lipids) of the mixed culture and the total lipid content was found as 26.2%±0.6 of dry weight biomass. Moreover, the GC results showed that the percent of glycerides in microalgal lipids were 74.4%.

In biodiesel production from microalgae, three different transesterification methods were used and, also the fatty acid methyl esters (FAME) content and biodiesel conversion yield of the FAMEs were determined. In GC analysis, it was found that the fatty acid profile of the microalgae mainly consists of palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids methyl esters. These results and high glyceride percentage in total lipids indicated that the microalgal biomass produced is suitable for biodiesel production. The highest biodiesel conversion yield of 93%±4.1 (FAME/lipid) was reached using microwave assisted in-situ transesterification.

The results of this study reveals that the mixed culture grown in secondary domestic wastewater effluent could have similar lipid content (both in quality and in quantity) with pure culture grown in artificial medium and, therefore it becomes a low-cost alternative for microalgal biomass production for biodiesel production.

Key Words: Domestic Wastewater, Secondary Effluent, Mixed Microalgae, Lipid, Biodiesel, Transesterification.

TEŞEKKÜR

Tüm çalışmalarımda bana sonsuz bir manevi güç veren ve tezimin sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde ve akademik olarak gelişmemde önemli bir desteği olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mirat D. GÜROL'a

Tez izleme komitesinde bulunan ve çalışmanın gelişmesinde büyük yararları olan saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Z. Selma TÜRKAY ve Prof. Dr. Bülent KESKİNLER'e,

Deneysel çalışmaların yürütülmesi ve analizlerin ölçülmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK ÇAYDAG'a (109Y296 Nolu proje),

Akademik olarak gelişmemi ve tecrübe sahibi olmamı sağlayan ve her daim desteklerini gördüğüm yüksek lisans tez danışmanım Sayın Prof Dr. Ahmet KARAGÜNDÜZ'e,

Deneysel çalışmalarımın uzun süren gece mesailerinde ve analizlerde bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Ar. Gör. Ülker Diler KERİŞ ŞEN ve Ar. Gör. Ünal ŞEN'e,

Tezimin yazımı aşamasında pozitif enerjisi ile desteğini her daim yanımda hissettiğim sevgili arkadaşım Doç Dr. Elif İNCE'ye,

Hayatım boyunca yanımda olan, bugünlere gelmemde maddi ve manevi olarak sonsuz katkıları bulunan, arkamda büyük bir güç olduklarını bildiğim; anneme, babama, eşim Mert SOYDEMİR'e ve canım oğlum Arda SOYDEMİR'e,

Bana inanan tüm akraba ve arkadaşlarıma...

Sonsuz saygı ve sevgimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsamı	5
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1. Yenilenebilir ve Sürdürülebilir Enerji Kaynakları	6
2.2. Biyokütle Kaynakları ve Biyoyakıt Türleri	7
2.3. Mikroalgler	11
2.3.1. Mikroalglerin Tarihsel Gelişimi	11
2.3.2. Mikroalglerin Hücresel Bileşenleri	14
2.3.3. Mikroalg Biyokütlesi Üretimi	16
2.4. Atıksuda Mikroalg Üretimi	18
2.5. Mikroalg Biyokütlesinin Hasatlanması	22
2.6. Mikroalg Biyokütlesinden Lipitin Ekstraksiyonu	26
2.6.1. Mikroalglerin Lipit Bileşimi	26
2.6.2. Lipit Ekstraksiyonu Yöntemleri	29
2.7. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi	34
2.7.1. Biyodizelin Özellikleri	35
2.7.2. Biyodizel Hammaddesi Olarak Mikroalgler	38
2.7.3. Mikroalg Biyodizelin Özellikleri	40
2.7.4. Transesterifikasyon	44
2.7.4.1. Direkt (in-situ) Transesterifikasyon	48
2.7.4.2. Mikrodalga Destekli Direkt (in-situ) Transesterifikasyon	50

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL VE METOT	52
3.1. Atıksuda Karışık Kültür Üretimi Çalışmaları	52
3.2. Biyokütlenin Konsantre Edilmesi ve Hasatlanması	55
3.3. Mikroalglerden Lipitin Ekstraksiyonu Çalışmaları	56
3.4. Transesterifikasyon Uygulamaları	58
3.4.1. Ekstraksiyon – Transesterifikasyon Deneyleri	59
3.4.2. Direkt (in-situ) Transesterifikasyon Deneyleri	60
3.4.3. Mikrodalga Destekli Direkt (in-situ) Transesterifikasyon Deneyleri	61
3.5. Biyokütle Analizleri	63
3.5.1. Protein Analizi	63
3.5.2. Karbonhidrat Analizi	64
3.5.3. Klorofil-a Analizi	64
3.5.4. Isıl Değeri ve Kül İçeriği Analizi	65
3.5.5. Nötral Lipit ve Ester İçeriği Analizleri	65
3.5.5.1. GC ile Nötral Lipit Analizi	65
3.5.5.2. GC ile Yağ Asidi Metil Esteri Analizi	67
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	69
4.1. Karışık Mikroalg Biyokütlesi Üretimi	69
4.2. Mikroalg Biyokütlesinin Hücresel Bileşenleri	70
4.2.1. Lipit İçeriği	70
4.2.1.1. Toplam Lipit İçeriği	70
4.2.1.2. Nötral Lipit (Toplam Gliserit) İçeriği	75
4.2.2. Diğer Hücresel Bileşenler	77
4.3. Transesterifikasyon Uygulamaları	78
4.3.1. Ekstraksiyon-Transesterifikasyon	78
4.3.2. Direkt (in-situ) Transesterifikasyon	82
4.3.3. Mikrodalga Destekli Direkt (in-situ) Transesterifikasyon	87
4.4. Karışık Mikroalg Biyokütlesinden Üretilen Biyodizelin Yakıt Özelliklerinin Değerlendirmesi	97
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	101
5.1. Karışık Mikroalg Biyokütlesi Üretimi Çalışmaları	101

	<u>Sayfa</u>
5.2. Hücresel Bileşenlerin Belirlenmesi Çalışmaları	102
5.3. Transesterifikasyon Çalışmaları	104
5.4. Mikroalgal Biyodizelin Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi	107
KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ	124
EKLER	125



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
AKM	: Askıda Katı Madde
ASTM	: American Society for Testing and Materials
CHCl ₃ /MeOH	: Klorofom/Metanol
CO ₂	: Karbondioksit Gazı
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
FAEE	: Yağ Asidi Etil Esteri
GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IS-1	: Internal Standard#1
IS-2	: Internal Standard#2
MSTFA	: N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide
MD	: Mikrodalga
N	: Azot
NH ₄ ⁺ -N	: Amonyum Azotu
NO ₃ ⁻ -N	: Nitrat Azotu
NO _x	: Azot Oksitler
NR	: Nile Red Floresan Boya
P	: Fosfor
PES	: Polietersülfon
PO ₄ ⁻³ -P	: Fosfat Fosforu
<i>sp.</i>	: Türlerinden herhangi biri (<i>species</i>)
SYA	: Serbest Yağ Asidi
TG	: Toplam Gliseritler
YAME	: Yağ Asidi Metil Esteri

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyoyakıtların ve biyoyakıt kaynaklarının sınıflandırılması.	9
2.2: Transesterifikasyon reaksiyonu.	45
3.1: Karışık kültürün atıksuya aklımasyonunun gerçekleştirildiği cam reaktör.	54
3.2: Batık membran filtrasyonu sonrası elde edilen yoğun kültür.	55
3.3: Mikroalg biyokütlesi.	56
3.4: Mikrodalga destekli in-situ transesterifikasyon deneylerinde kullanılan mikrodalga fırını ve deney düzeneği.	62
4.1: Atıksuda karışık kültürü oluşturan türlerin mikroskop görüntüsü (x100 büyütme).	69
4.2: Ekstraksiyon sonrası kloroform fazında çöken hücreler.	71
4.3: Bligh and Dyer sonrası ekstrakte edilen lipit.	72
4.4: Kloroform ve n-hekzanın biyodizel verimine etkisi (Reaksiyon şartları; 5 mL metanol, 4 mL co-solvent (hekzan ya da kloroform) ve 50 µL H ₂ SO ₄ (metanol içindeki hacimsel oranı 1%, mL/mL), 65°C sabit sıcaklıkta).	84
4.5: MD destekli in-situ transesterifikasyonda a) katalizör oranı, b) reaksiyon süresi ve c) reaksiyon sıcaklığının YAME verimi üzerine etkisi.	90

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Bazı mikroalg türlerine ait biyokimyasal bileşenler (% kuru hücre ağırlığı bazında).	14
2.2: Mikroalglerde bulunabilecek lipit sınıfları.	27
2.3: Bazı mikroalg türlerinin lipit içerikleri (% kuru biyokütle ağırlığı bazında).	28
2.4: Petrol dizeli ve bitkisel kökenli biyodizelin ASTM ve EN 14214 biyodizel standartları ile karşılaştırılması.	36
2.5: Bazı mikroalg türlerinin yağ asidi bileşimleri.	41
2.6: Mikroalg yağından elde edilen biyodizelin dizel yakıt ve ASTM Biyodizel Standardı ile karşılaştırılması.	44
3.1: Çalışmada kullanılan ikincil arıtım deşarj suyunun karakterizasyonu.	53
3.2: Mikroalg biyokütlesinden lipit ekstraksiyonu çalışmaları.	58
4.1: Bu çalışmada ve farklı besin ortamlarında yetiştirilen mikroalg türlerinin lipit içeriklerinin karşılaştırması.	75
4.2: Mikroalg biyokütlesinin kuru biyokütle ağırlığı bazında hücrenel bileşimi (protein, karbonhidrat, lipit, klorofil ve kül) ve yüksek ısıl değeri.	77
4.3: Farklı besin ortamlarında yetiştirilen karışık mikroalg kültürlerinden ekstraksiyon-transesterifikasyon yöntemi ile elde edilen biyodizel verimleri.	78
4.4: Ekstraksiyon-transesterifikasyon sonrası üretilen iki mikroalgal biyodizel örneğinin YAME karakterizasyonu.	81
4.5: Direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemiyle karışık kültürden elde edilen YAME bileşimi ve literatür değerleri ile karşılaştırılması.	86
4.6: Kuru mikroalg biyokütlesinin MD destekli in-situ transesterifikasyonu için kullanılan deneysel veriler ve elde edilen YAME verimleri (200 mg sabit biyokütle miktarı ve 400 W sabit MD gücünde).	88
4.7: Karışık mikroalg biyokütlesinin MD destekli direkt transesterifikasyonu sonucu elde edilen YAME bileşimi.	96

Tablo No:**Sayfa**

4.8: Eysel atıksuda yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin farklı transesterifikasyon yöntemleri sonucu elde edilen yağ asidi profili.	98
4.9: Eysel atıksuda yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin transesterifikasyon uygulamaları sonrası elde edilen yağ asidi profilinin literatürdeki farklı mikroalg türleri ile karşılaştırılması.	100



1.GİRİŞ

Günümüzde nükleer enerji ve hidroelektrik enerjisi dışında dünya enerji ihtiyacının büyük çoğunluğu petrol, kömür ve doğal gazdan sağlanmaktadır. Fakat ilerleyen teknoloji ve artan nüfus oranı göz önüne alındığında, bu kaynakların mevcut kullanım oranlarının sınırlı ve kısa süre sonra tükenecek olması nedeniyle enerjiye olan ihtiyaç gün geçtikçe daha da artmaktadır. Yerli sektördeki ve endüstrileşen dünyadaki büyük enerji ihtiyacı ve fosil yakıtların yaygın kullanımı nedeniyle oluşan kirlilik problemleri (sera etkisine bağlı olarak atmosferin ısınması ve iklim değişiklikleri, yağış anormallikleri, kirli sis, asit yağmurları, sağlık problemleri), sınırsız süre kullanım imkanı sunacak, daha düşük çevresel etkileri olan ve daha büyük enerji güvenliği bulunan yenilenebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu durumun petrol bazlı yakıtlara alternatif olan yenilenebilir yakıtlara olan ilgiyi bu noktada canlandığı belirtilmektedir. Bu yakıtlar arasında özellikle biyokütleden üretilen biyodizel, biyoetanol, biyogaz ve biyohidrojen gibi farklı tipteki biyoyakıtların en uygun yenilenebilir ve alternatif enerji kaynaklarından biri olduğu belirtilmektedir [Meher et al., 2006], [Pragya et al., 2013].

Biyokütle enerjisi küresel yenilenebilir enerji arzının %77,4'ünü temsil eden en büyük yenilenebilir enerji kaynağı olarak gösterilmektedir [Suganya et al., 2016]. Farklı biyokütle enerjisi kaynaklarından son yıllarda ön plana çıkan ve önemi giderek artan yenilenebilir hammadde kaynaklarından birisi mikroalglerdir. Mikroalg gibi yenilenebilir kaynaklardan biyoyakıt üretimi, sera gazı emisyonlarının azaltılmasına yardımcı olmak ve ekonomik sürdürülebilirlik için fosil yakıtların yerini alabilecek potansiyele sahip olan biyodizel ve biyoetanol üretimi için en sürdürülebilir seçenek olarak değerlendirilmektedir [Maity et al., 2014]. Mikroalg üretimi için ekilebilir araziye ihtiyaç duyulmaması, sahip oldukları yüksek büyüme hızları, yüksek biyokütle verimliliği, yüksek lipit içerikleri ve atık baca gazlarından karbondioksiti (CO₂) özümleme yetenekleri nedeniyle mikroalgler biyodizel üretimi için alternatif bir hammadde kaynağı olarak gösterilmektedir [Sturm and Lamer, 2011], [Chen et al., 2015]. Ancak şimdiye kadar mikroalglerden biyodizel üretimi için ticari bir tesis kurulmamıştır. Mikroalgal biyokütleden biyodizel üretimi biyokütlenin üretimi, hasatlanması, hücrelerden lipitin ekstraksiyonu ve lipitin biyodizele dönüşümünü

içeren sıralı bir süreçtir [Kim et al., 2013]. Mikroalglerden biyodizel üretim süreci, genel olarak prosten kaynaklanan zorluklardan dolayı teknolojik açıdan fazla gelişmemiş, sadece laboratuvar çalışmaları, pilot ve küçük ölçekli denemelerle sınırlı kalmıştır. Prosesle ilgili zorlukların büyük bölümü sürecin toplam maliyetinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır [Say vd. 2010], [Yang et al., 2011]. Mikroalg üretimi haricindeki diğer süreçlerin (hasatlama, ekstraksiyon ve biyodizele dönüşüm) toplam biyodizel üretimi maliyetinin %60'ına tekabül ettiği belirtilmektedir [Kim et al., 2013]. Çoğu araştırmacı tarafından petrol bazlı dizelle ekonomik olarak rekabet edebilecek bir tür biyodizel elde edebilmek amacıyla, mikroalg üretim maliyetinin düşürülmesinin gerekli olduğuna dikkat çekilmektedir [Chisti, 2007], [Li et al., 2008], [Pittman et al., 2011], [Sturm and Lamer, 2011].

Fotosentetik sucul mikroorganizmalar olan mikroalglerin endüstriyel ölçekte üretimi için CO₂ ve ışık kaynağının yanısıra, yüksek miktarda temiz su ve tipik olarak nitrat ve orta-fosfat formundaki azot (N) ve fosfor (P) gibi nütrient kaynaklarını içeren önemli miktarda kimyasal veya inorganik gübre kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat evrensel olarak bugün her zamankinden daha fazla stratejik öneme sahip olan temiz su kaynaklarının mikroalg üretimi için kullanılması, su kaynaklarını nicelik ve nitelik olarak ciddi anlamda tehdit altına sokmaktadır [Abdel-Raouf et al., 2012]. Yine mikroalglerin üretimi için gerekli sentetik olarak üretilen azot ve fosfor kaynaklarının üretimi ve kullanımı sırasında çevreye verdikleri zararlar nedeniyle, uzun vadede kimyasal gübre kullanımı biyodizel üretimi amacıyla mikroalg yetiştirilmesinde sürdürülebilir olmaktan çıkmaktadır [Lam and Lee, 2012]. Bu amaçla mikroalglerin ihtiyacı olan su ve temel besin maddelerinin evsel ve bazı endüstriyel atıksu ortamlarından sağlanması, hem temiz su kullanımını azaltmak, hem sentetik azot ve fosfor kullanımını en aza indirmek, hem de alıcı ortamın kirlilik yükünü hafifletmek için önemli bir girişim olarak sayılmaktadır [Wu et al., 2012]. Birçok atıksu kaynağı yüksek N ve P konsantrasyonu içermektedir ve mikroalgler nütrient bakımından zengin bu ortamlarda etkili bir şekilde büyüme ve bu nütrientleri metabolizmalarına katma yeteneğine sahiptirler [Pittman et al., 2011], [Lam and Lee, 2012].

Algal biyokütleden biyodizel elde etme sürecinde biyokütlenin hasatlanması, genel olarak zorlu ve ürün maliyetini arttıran bir aşama olarak değerlendirilmektedir. Hasatlama yönteminin toplam biyokütle üretim maliyetinin yaklaşık %20 – 30'unu kapsadığı, bu işlem daha sonraki kurutma proseslerini de içeriyorsa üretim

maliyetinin daha da arttığı belirtilmektedir [Brennan and Owende, 2010], [Sturm and Lamer, 2011], [Rajvanshi and Sharma, 2012], [Suali and Sarbatly, 2012], [Pragya et al., 2013]. Bu nedenle sürecin başarısı için mikroalg biyokütlesinin işletme, bakım ve enerji maliyetlerini arttırmayacak bir yöntemle sudan ayrılması önemlidir. Bununla birlikte mikroalg hasatlamasında evrensel bir yöntem bulunmamakla birlikte, uygun ve ekonomik bir hasatlama metodunun geliştirilmesi yönündeki çalışmaların da halen devam ettiği bildirilmektedir [Sim et al., 1988], [Mata et al., 2010], [Velasquez-Orta et al., 2014], [Barros et al., 2015]. Maliyeti ve enerjiyi düşürmek için kullanılacak hasatlama yönteminin mikroalg biyokütlesinin kirlenmesine ya da zarar görmesine izin vermemesi ve daha sonraki lipit ekstraksiyonu adımını da zorlaştırmaması gerekmektedir. Ayrıca düşük enerjili hasatlama seçeneklerinin mikroalg hücre boyutu ile sınırlı olduğu da belirtilmektedir. Örneğin filtrasyon ile hasatlama yapılacaksa, mikroalg hücre boyutunun 70 mikrondan büyük olması önerilmektedir [Aitken and Antizar-Ladislao, 2012].

Mikroalg biyokütlesinden biyodizel üretiminin bir sonraki aşaması hücreden lipitin ekstraksiyonudur. Lipit ekstraksiyonunda tüketilen enerji, mikroalg biyodizel üretimi için harcanan toplam enerji tüketiminin %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır [Kim et al., 2015]. Lipit ekstraksiyonu sırasındaki yüksek enerji tüketiminin temel nedeni olarak mikroalg biyokütlesinin kompleks karbonhidrat ve glikoproteinlerden oluşan kalın ve sert bir hücre duvarına sahip olması gösterilmektedir [Kim et al., 2013]. Mikroalg biyokütlesinden lipitin ekstraksiyonunda laboratuvar ölçekli bir çok yöntem kullanılmasına rağmen, standart ve düşük enerjili bir yöntem bulunmamaktadır. Literatürde, çeşitli solventler yardımıyla mikroalglerden lipit ayrıştırılması konusunda pek çok çalışma yer almakta ve en çok kullanılan iki metodun Soxhlet (hekzanın kullanıldığı) ve Bligh and Dyer (kloroform/metanolün kullanıldığı) metotları olduğu görülmektedir [Mansour, 2005], [Johnson and Wen, 2009], [Sanchez et al., 2012]. Ayrıca hücresel lipitin ekstraksiyonunu kolaylaştırmak amacıyla ultrases, mikrodalga ve bead-beating gibi çeşitli hücre parçalama metotlarının kullanılarak lipit ekstraksiyonu veriminin artırılmasının hedeflendiği çalışmalar da mevcuttur [Shen et al., 2009], [Lewis et al., 2000], [Lee et al., 2010], [Chen et al., 2015].

Mikroalglerden biyodizel üretim sürecinin son adımı hücreden ekstrakte edilen lipitlerin transesterifikasyon yöntemi ile biyodizele dönüştürülmesidir. Transesterifikasyon kısa zincirli bir alkol (metanol ya da etanol) ve katalizör (asit,

baz ya da enzim) varlığında mikroalgallipitlerin (trigliseritler ve serbest yağ asitleri) düşük molekül ağırlıklı yağ asidi metil/etil esterlerine dönüştürülmesi prosesidir [Pragya et al., 2013]. Mikroalglerden biyodizel üretimi çalışmalarında çoğunlukla mikroalg lipitinin yüksek serbest yağ asidi (SYA) içeriği nedeniyle homojen asit katalizörlü transesterifikasyon yöntemi önerilmektedir [Miao and Wu, 2006], [Sanchez et al., 2011]. Ayrıca son yıllarda biyodizel üretim maliyetini azaltmak için lipit ekstraksiyonu adımının ihmal edilerek tek adımda biyodizel üretiminin gerçekleştirildiği direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemi de kuru ve ıslak mikroalg biyokütlesine uygulanmaktadır [Johnson and Wen, 2009], [Ehimen et al., 2010], [Kim et al., 2013]. Bununla birlikte yine biyodizel üretimi veriminin artırılması amacıyla kimyasal (co-solvent kullanımını içeren) [Ehimen et al., 2012], [Martinez-Guerra et al., 2014a], [Najafabadi et al., 2015] ve mekanik destekli (ultrases ve mikrodalga kullanımını içeren) in-situ transesterifikasyon yöntemlerinin de uygulandığı görülmektedir [Ehimen et al., 2012], [Kim et al., 2013], [Ma et al., 2015].

Mikroalg biyokütlesinin yağ asidi kompozisyonunun ve yakıt özelliklerinin sistematik analizi, biyodizel üretimi için uygun türlerin seçimi için çok önemlidir. Kullanılan mikroalg türü ve bunun yanısıra kültür ortamının, mikroalglerin lipit içeriğini ve yağ asitlerinin yapısını etkilediği bilinmektedir [Islam et al., 2013]. Yağ asitlerinin doymamışlık derecesi, zincir uzunluğu ve karbon zincirinin dallanması gibi yapısal özellikleri, biyodizelin fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemektedir. Bu yüzden mikroalgall yağ asidi profilinin biyodizel karakterizasyonu için uygun olup olmadığının analiz edilmesi gerekmektedir [Bucy et al., 2012].

1.1. Amaç ve Kapsamı

Bu tez çalışmasında mikroalg üretimi maliyetinin düşürülmesi için evsel atıksu arıtma tesisi ikincil arıtım deşarj suyunu kullanarak mikroalg biyokütlesi üretimi ve üretilen biyokütlenin biyodizel üretimi potansiyelinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Literatürde mikroalglerle yapılan çalışmalarda çoğunlukla tek veya birkaç tür üzerinde denemeler gerçekleştirilmiş ve mikroalglerin kültür ortamı olarak sentetik kültür ortamı ya da steril edilmiş atıksu ortamları kullanılmıştır. Bu çalışmada ise literatürdeki çalışmalardan farklı olarak gerçek atıksu ve karışık mikroalg biyokütlesi birlikte kullanılmıştır. Çalışma kapsamında laboratuvar şartlarında, cam reaktörler içinde yapay ışık ve sürekli CO₂ gazı ilavesi ile gerçekleştirilen biyokütle üretimi çalışmalarında, mikroalgler için gereken besin maddeleri atıksudan karşılanmıştır. Üretilen biyokütlenin konsantre edilmesi ve hasatlanmasında ise batık membran filtrasyonu kullanılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında elde edilen karışık mikroalg biyokütlesinden lipitin ekstraksiyonu için çalışmalar yürütülmüş ve güvenilir bir ekstraksiyon metodunun oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla literatürde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan Bligh and Dyer metodu modifiye edilmiş ve karışık mikroalg biyokütlesine uygulanmıştır. Ayrıca ekstrakte edilen lipitin biyodizele dönüşüm için uygun bir hammadde kaynağı olup olmadığının belirlenmesi için Gaz Kromatografisi (GC) ile toplam gliserit analizi çalışmaları yürütülmüştür.

Tez çalışmasının üçüncü aşamasında biyodizel üretimi amacıyla asit katalizör varlığında farklı transesterifikasyon yöntemleri kullanılarak karışık mikroalg biyokütlesinin yağ asidi metil esteri (YAME) içeriğinin ve biyodizele dönüşüm verimlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Yürütülen deneyler sonrasında yapılan GC analizleriyle belirlenen yağ asidi profiline göre, karışık mikroalg biyokütlesinin biyodizele dönüşüm için uygun olup olmadığının değerlendirmesi yapılmıştır.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Yenilenebilir ve Sürdürülebilir Enerji Kaynakları

Dünyada başlıca enerji tüketiminin %88'i, yakıt kaynağı olan petrol (%35), kömür (%29) ve doğal gaz (%24) gibi fosil yakıtlardan, geriye kalanı nükleer enerji (%5) ve hidroelektrikten (%6) sağlanmaktadır [Brennan and Owende, 2010]. Fakat fosil yakıtların enerji üretimi için yoğun kullanımının fosil yakıt rezervlerinin azalmasına, sağlık risklerine ve küresel iklim değişikliği tehdidi ile sonuçlanan olumsuz çevresel etkilere yol açtığı uzun zamandır bilinmektedir [Hughes and Beneman, 1997], [Panwar et al., 2011], [Maity et al., 2014]. Fosil yakıt kullanımı, küresel ısınma ile direkt bağlantısı olan atmosferdeki CO₂ seviyesinin artmasına neden olmaktadır [Naik et al., 2010]. Ulaşım, elektrik ve ısı üretimi için fosil yakıtların büyük ölçekte kullanımı sonucu insan kaynaklı sera gazı emisyonlarındaki artış nedeniyle, sera gazı emisyonlarını azaltma tekniklerinin geliştirilmesi ve küresel ısınmanın etkilerini en aza indirecek politikaların benimsenmesi bu nedenle giderek daha önemli olmaktadır [Brennan and Owende, 2010]. Ayrıca halen kullanılabilir durumdaki bu enerji kaynaklarının azalması, ham petrol fiyatlarının ve enerji güvensizliğinin artması ve enerjiye olan ihtiyacın gün geçtikçe artmaya devam etmesi, dünya genelinde yenilenebilir, temiz ve sürdürülebilir enerji kaynaklarının ve teknolojilerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir [Maity et al., 2014], [Wahidin et al., 2014]. Çevresel iyileştirmelere yönelik değişiklikler dünya çapında özellikle gelişmiş ülkelerde politik olarak daha kabul edilebilir olmaya başlamıştır [Panwar et al., 2011]. Örneğin iklim değişikliğine ve küresel ısınmaya yönelik uluslararası düzeydeki ilk çevre sözleşmesi olan Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi (BMİDÇS), 1992'de Rio'da imzaya açılmıştır. 1994 yılında yürürlüğe giren sözleşme insan kaynaklı çevre kirliliğinin neden olduğu iklim değişikliğine çözüm getirmek amacıyla, sera gazlarının neden olduğu küresel ısınmanın etkilerini azaltmayı ve sera gazı emisyonlarını belirli bir seviyede tutmayı amaçlamaktadır [Web 1, 2016]. Yine 1997 yılında BMİDÇS ile kararlaştırılmış sürdürülebilirlik hedeflerini karşılamak amacıyla Kyoto Protokolü (3. Taraflar Konferansı olarak da adlandırılan) kapsamında, dünyadaki birçok ülke ve bölge atmosfere verilecek CO₂ gazının azaltılması için hedefler belirlemiştir [Mata et

al., 2010]. 1994 yılından beri her yıl düzenlenen Taraflar Konferansı'nın bugüne kadar düzenlenen en geniş kapsamlı uluslararası konferansı olan 21. Taraflar Konferansı ise 2015 yılında Paris'te yapılmıştır. Paris İklim Değişikliği Konferansı'nda küresel ısınmayı 2°C'nin altında tutmak amacıyla iklim üzerinde yasal olarak bağlayıcılığı olan uluslararası bir anlaşma imzalanması hedeflenmiştir. Bu çerçevede, 2030 yılına kadar küresel yıllık sera gazı emisyonlarının sınırlandırılması, yenilenebilir enerjilere geçişin hızlandırılması ve iklim değişikliği tehdidine karşı sürdürülebilir kalkınmanın güçlendirilmesi hedeflenmektedir [WEO, 2015].

Dünya geleceği için önemli rol oynayan yenilenebilir enerji kaynakları; güneş enerjisi, rüzgar enerjisi, jeotermal enerji, biyokütle enerjisi gibi tekrar tekrar enerji üretmek için kullanılabilen ve alternatif enerji kaynağı olarak adlandırılan kaynaklardır [Panwar et al., 2011]. Bu alternatifler arasında son dönemlerde değerlendirilen ve umut vaadeden enerji kaynağı olarak biyokütle enerjisinin ve biyokütleden fermentasyon, piroliz, gazlaştırma ve transesterifikasyon gibi farklı enerji dönüşüm prosesleri ile biyoetanol, biyometanol, biyodizel, hidrojen gibi yakıtların ön plana çıktığı görülmektedir.

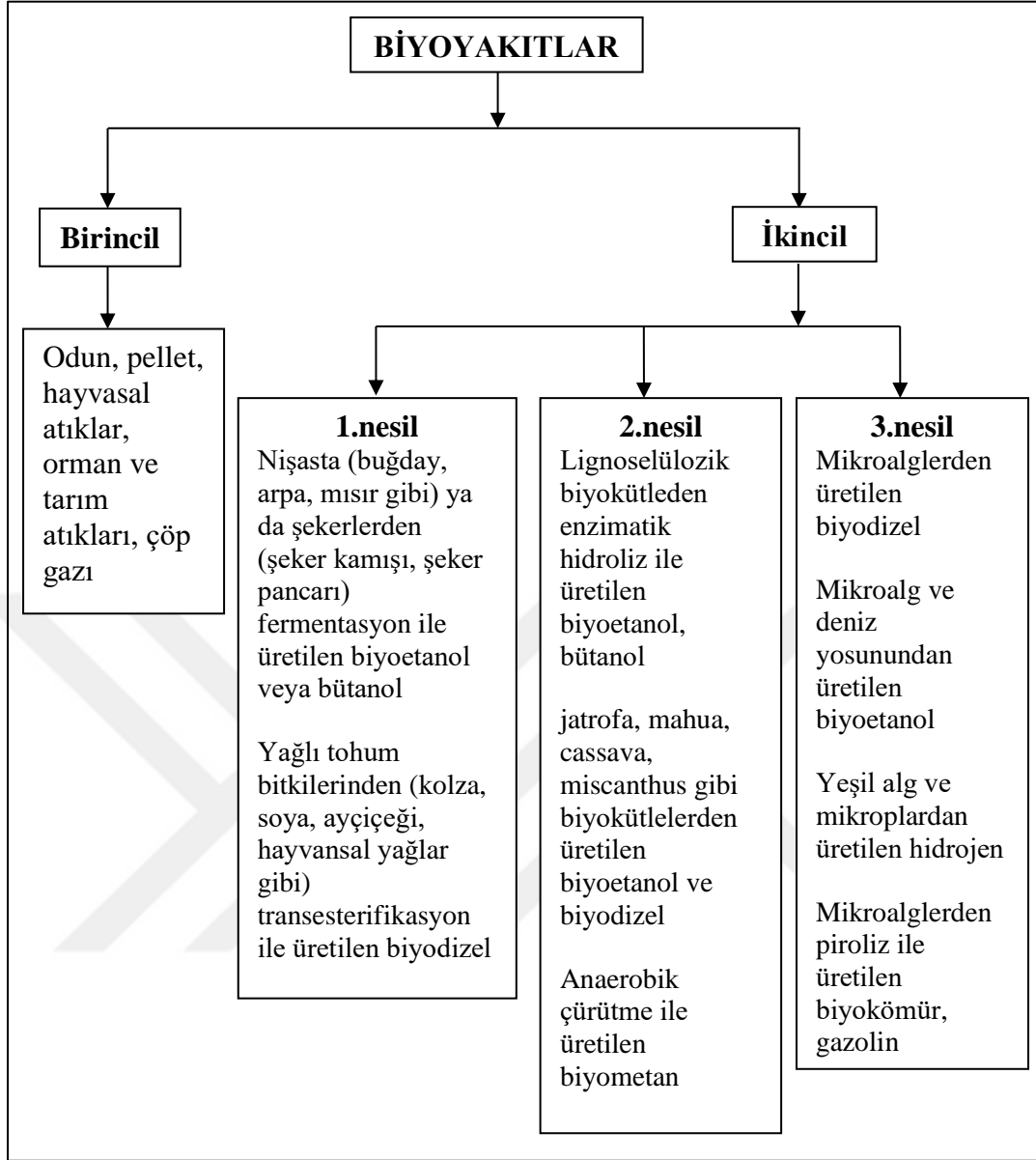
2.2. Biyokütle Kaynakları ve Biyoyakıt Türleri

Yenilenebilir enerji seçeneklerinden biri olması ve sıfır karbon ayak izi nedeniyle biyokütle enerjisi, enerji üretiminin olumsuz etkilerini azaltmak ve küresel çevre üzerindeki baskıları gidermek amacıyla kullanılacak önemli bir enerji kaynağı olarak görülmektedir [McKendry, 2002], [Sharma et al., 2015]. Çok çeşitli biyokütle kaynakları elektrik üretimi, ısınma, taşıt yakıtı ve endüstriyel proseslerde ısıtma gibi çeşitli enerji gereksinimleri karşılamak için kullanılabilir [Field et al., 2008], [Balat, 2005]. Farklı biyokütle kaynaklarından biyoetanol, biyometanol, biyodizel, Fischer-Tropsch yakıtı, hidrojen ve metan gibi sıvı, gaz ya da katı yakıtlar üretilmektedir [[Naik et al., 2010], Nigam et al., 2011].

Biyokütleden üretilen biyoyakıtlar genel olarak birincil ve ikincil biyoyakıtlar olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Yakacak odun, pellet, hayvansal atıklar ve bitki artıkları gibi birincil biyoyakıtlar esas olarak ısıtma, pişirme ve elektrik üretimi için işlenmemiş biçimde kullanılırken, biyokütlenin işlenmesi ile üretilen biyoetanol,

biyodizel ve biyogaz gibi ikincil biyoyakıtlar taşıtlarda ve değişik endüstriyel proseslerde kullanılmaktadırlar [Dragone et al., 2010], [Nigam et al., 2011], [Maity et al., 2014]. Biyokütlenin işlenmesi ile üretilen ikincil biyoyakıtlar da üretim teknolojilerine, hammadde türüne veya hammaddenin gelişim seviyesine göre Şekil 2.1’de görüldüğü üzere birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyoyakıtlar olarak sınıflandırılmaktadırlar [Dragone et al., 2010], [Nigam et al., 2011]. Biyoenerji olarak tanımlanan biyokütle kaynakları orman, tarım ve balıkçılık ürünlerinden ya da tarım endüstrisi, gıda endüstrisi ve gıda hizmetlerinden kaynaklanan atıkları ve yan ürünleri de içeren evsel atıklardan elde edilebilmektedirler [Dragone et al., 2010], [Nigam et al., 2011].





Şekil 2.1: Biyoyakıtların ve biyoyakıt kaynaklarının sınıflandırılması.

Birinci nesil biyoyakıt üretimi için mısır, arpa, şeker kamışı, ayçiçeği, kolza tohumu, soya, kanola, palm yağı gibi gıda bitkileri ve yağlı tohum bitkileri temel hammadde olarak kaynağı olarak kullanılmıştır [Lam and Lee, 2012], [Sims et al., 2010]. Birinci nesil biyoyakıtların yerli enerji güvenliğinin artırılması, CO₂ emisyonlarının azaltılması ve bu sayede karbon-nötral bir yol izlenmesi açısından avantajlı olduğu belirtilmektedir [Naik et al., 2010], [Dragone et al., 2010] Fakat enerji kaynağı olarak bu yeniler yağların kullanımının önemli ekonomik ve çevresel sınırlamaları da beraberinde getirdiği görülmüş ve bu olumsuzluklar kamu ve sivil toplum kuruluşlarından gelen itirazları arttırmıştır [Dragone et al., 2010], [Lam and Lee, 2012], [Maity et al., 2014]. Bu hammadde kaynaklarının yetiştirilmesi sırasında

doğaya verdikleri zararlar (gübre kullanımı, verimli tarım alanı gereksinimleri gibi) ve gıda sektöründe yarattıkları rekabet, biyodizel ve biyoetanol gibi biyoyakıtların üretiminde kullanılmalarını sınırlandırmıştır [Naik et al., 2010], [Dragone et al., 2010], [Maceiras et al., 2010]. Bu nedenle gıda sektöründeki rekabetin önüne geçmek amacıyla, sadece biyodizel üretimi için yüksek yağ içeriğine sahip belirli bitkilerin yetiştirilmesi veya yeni biyokütle kaynaklarının bulunması için araştırmalara başlanmıştır [Maceiras et al., 2010]. Birinci nesil biyoyakıt üretiminin getirdiği bu kaygıların kümülatif etkileri, son otuz yıldır devam eden bir araştırma konusu olarak gıda dışı biyokütleden biyoyakıt üretiminin gelişimine olan ilgiyi canlandırmıştır [Sims et al., 2010], [Maity et al., 2014].

İkinci nesil biyoyakıtlar gıda üretimi ile rekabet yaratmayan bitkilerin odunsu kısmını içeren lignoselülozik biyokütlelerden biyoyakıt üretimi için tasarlanmıştır [Dragone et al., 2010], [Abou-Shanab et al., 2015]. İkinci nesil biyoyakıt hammaddesi olarak nitelendirilen bu biyokütleler mısır ve şeker kamışının yenilir olmayan bileşenlerinin yanı sıra, orman atıkları gibi yan ürünleri, evsel katı atıkların organik bileşenleri ve jatrofa, mahua, cassava, miscanthus gibi özel amaçlar için yetiştirilen bitkileri içeren lignoselülozik maddeleri içermektedir [Sims et al., 2010], [Maity et al., 2014], [Abou-Shanab et al., 2015]. İkinci nesil biyoyakıt üretiminin temel avantajı yenilmeyen biyokütle kaynaklarının kullanılması nedeniyle gıda ve yakıt üretimi arasındaki rekabeti ortadan kaldırması olmuştur [Nigam et al., 2011]. Fakat biyokütleden yüksek yağ verimi sağlamak için düzenli sulama, ağır gübreleme ve doğru yönetim politikalarının gerekli olduğu belirtilmektedir [Lam and Lee, 2012]. Ayrıca bu lignoselülozik biyokütleleri fermente şekerlere dönüştürme prosesi özel enzimlerle ön arıtım gibi maliyetli teknolojiler gerektirdiği için, ikinci nesil biyoyakıt üretiminin büyük ölçekte gerçekleştirilmesinin ekonomik olmadığı bildirilmiştir [Dragone et al., 2010].

Daha sürdürülebilir ve ekonomik olarak rekabetçi yeni biyokütle kaynakları arayışları, araştırmacıların dikkatini mikroskobik organizmalara yönlendirmiştir. Mevcut bilimsel bilgi ve teknolojik gelişmeler ışığında, mikrop ve mikroalglerden elde edilen üçüncü nesil biyoyakıtların, birinci ve ikinci nesil biyoyakıtlardaki dezavantajları içermeyen alternatif bir enerji kaynağı olarak ön plana çıktığı görülmüştür [Nigam et al., 2011]. Özellikle mikroalgler, diğer enerji bitkilerine kıyasla daha yüksek fotosentetik verim, daha yüksek biyokütle üretimi, daha hızlı büyümeleri ve alan gereksinimine ihtiyaç duymamaları nedeniyle, alternatif enerji

kaynağı olarak önem kazanmaktadır [Johnson and Wen, 2009]. Alternatif bir enerji kaynağı olarak tekrar gündeme gelmesinden çok daha önce mikroalglerin enerji kaynağı olarak kullanılması birçok araştırmacı tarafından yıllardır önerilmektedir [Nagle and Lemke, 1990], [Robles Medina et al., 1999], [Chisti, 2007]. Uzun yıllar hayvan yetiştiriciliğinde besin katkısı olarak üretilen mikroalgler, son yıllarda artan petrol fiyatlarının da etkisiyle hızlanan biyokütle enerjisi araştırmaları sonucunda umut vadeden bir enerji kaynağı olarak görülmeye başlanmıştır [Say vd., 2010]. Mikroalgler biyometanol, biyodizel, biyo-yağ, biyohidrojen gibi farklı tipte yenilenebilir biyoyakıtlara dönüştürülebilmektedirler [Chisti, 2007], [Dragone et al., 2010], [Pragya et al., 2013]. Özellikle mikroalg biyokütlesinden üretilen biyodizel, petrol bazlı yakıtların yerini tamamen alabilecek potansiyele sahip yenilenebilir bir biyoyakıt olarak son yıllarda bir çok araştırmacının araştırma konusu olmuştur [Chisti, 2008], [Hossain et al., 2008], [Halim et al., 2011], [Kim et al., 2015].

2.3. Mikroalgler

2.3.1. Mikroalglerin Tarihsel Gelişimi

Algler en eski yaşam formları olarak kabul edilmektedirler. Birincil fotosentetik pigmentleri olarak klorofil-a'ya sahip olan ilkel bitkiler olarak da bilinmektedirler [Dragone et al., 2010], [Brennan and Owende, 2010]. Tek hücreli ya da basit çok hücreli yapıları nedeniyle hızlı bir şekilde çoğalabilen ve zor şartlar altında yaşayabilen ökaryotik ya da prokaryotik fotosentetik mikroorganizmalardır. Prokaryotik mikroalglere siyanobakteriler (*Cyanophyceae*) örnek olarak verilmektedir ve bunların algden ziyade bakteri hücrelerine daha benzer organizmalar olduğu rapor edilmektedir. Ökaryotik mikroalglerin en önemli sınıflarına ise yeşil algler (*Chlorophyta*), kırmızı algler (*Rhodophyta*) ve diatomlar (*Bacillariophyta*) örnek verilmektedir [Brennan and Owende, 2010].

İnsanlar tarafından mikroalglerin kullanımları Çin'de 2000 yıl kadar öncesine dayanmakla birlikte, mikroalgal biyoteknolojinin gelişiminin geçen yüzyılın ortalarında başladığı belirtilmektedir. 1950'lerin başında iyi bir protein kaynağı olarak insanlar tarafından kullanılan mikroalglerin, ticari olarak büyük ölçekli ilk kültürü (*Chlorella*) ise 1960'ların başında Japonya'da yapılmıştır. Daha sonrasında

bir mikroalg hasatlama ve üretim tesisi 1970'lerin başında Meksika'daki bir gölde kurulmuş ve ilk su kültürü alanları 1970'lerde görülmüştür [Borowitzka, 1999], [Spolaore et al., 2006]. Bunların dışında mikroalglerin yoğun kültürü ilk defa atıksu arıtımı ve üretilen alglerden enerji elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir [Oswald ve Golueke, 1960], [Oswald ve Golueke, 1962], [Oswald, 1963], [Negoro et al., 1991]. Dünya çapındaki enerji sıkıntısı ve 1970'lerdeki petrol ambargosu bir çok ulusu enerji kaynaklarını değerlendirme ve alglerden enerji üretimi konusunda zorlamıştır [Nagle and Lemke 1990], [Spolaore et al., 2006]. 1973 yılındaki petrol krizi sonrasında, petrol kaynaklarının güvenlik açığının tanımlanmasına yanıt olarak, bir araştırma ve mühendislik firmasının alglerden lipit üretilmesi konusunda finansman olduğu belirtilmektedir [Williams and Laurens, 2010]. Ayrıca Amerika Enerji Bakanlığı'nın 1978'de kurulup 1996'da sonlandırılan "Akuatik Türler Programı" alglerden yakıt üretimi ile ilgili çok kapsamlı araştırmalar gerçekleştirmiştir. Yapılan yoğun araştırmalar sonucunda alglerden elde edilen biyoyakıtın geleneksel yakıtlara alternatif değerli bir yakıt olduğu, fakat 1990'ların başındaki petrol fiyatları göz önünde bulundurulduğunda, ekonomik olarak uygulanabilir olmayacağı ortaya çıkarılmıştır [Williams and Laurens, 2010], [Xu and Mi, 2011]. Bununla birlikte mikroalglerin biyolojileri, tür seçimi, metabolik mühendislik ve seçilen türlerin büyük ölçekte büyütülmesi konusunda önemli ilerlemeler de kaydedildiği görülmüştür [Williams and Laurens, 2010].

Çevre mühendisliği açısından biyokütle bazlı biyodizel üretiminde mikroalglerin son yıllarda ön plana çıkmasının en önemli sebeplerinden biri de, CO₂ başta olmak üzere çeşitli sera gazlarının atmosferdeki aşırı birikiminden kaynaklanan küresel iklim değişikliğine çözüm arama çabalarıdır. Mikroalgler büyümeleri için gereken inorganik karbon kaynağı olan atmosferdeki mevcut CO₂'i, enerji bitkilerine kıyasla etkili bir şekilde özümseme yeteğine sahip olduklarından, atmosferde biriken fazla CO₂'i tutarak küresel ısınmanın önlenmesine katkıda bulunabilirler. Ayrıca mikroalglerin yüksek CO₂ konsantrasyonlarına karşı toleranslı olmaları, atık baca gazlarından CO₂ özümsemelerine de olanak sağlamaktadır. Bu nedenle mikroalg bazlı biyodizel, hem atmosfere karbon salınımının azaltılması ve küresel karbon dengensinin korunması, hem de küresel enerji ihtiyacının karşılanması açısından büyük faydalar sağlayabilecek yenilenebilir bir enerji kaynağıdır [Say vd., 2010].

Mikroalglerin çok uzun bir süredir lipit, hidrokarbon, karotenoid, enzim ve diğer kompleks yağları ürettikleri bilinmektedir. Bu değerli biyolojik ürünlerin üretiminin yanısıra mikroalgler su kültüründe hammadde kaynağı olarak endüstriyel uygulamalar için yüksek potansiyele sahip organizmalar olarak görülmektedir. Son dönemde moleküler biyolojideki gelişmeler algal biyoürün üretim verimini iyileştirmektedir. Mikroalglerin biyoproses faktörlerindeki değişimler (sıcaklık, pH, ışık, karbon kaynağı, nütrient gibi) biyokütle ve spesifik biyoürün üretimlerini arttırmada kullanılmaktadır [Williams and Laurens, 2010], [Mercer and Armenta, 2011]. Yine son yıllarda mikroalg biyokütlesinin biyoyakıt elde etmek amacıyla üretimi, alglerin yüksek fotosentezleme kapasitesi, düşük karasal alan ihtiyacı, küçük miktarlarda ileri teknoloji gerektirmeyen şekilde biyodizele ve yakma gazına çevrilebilmesi ile dikkat çekmiştir [FAO, 2009].

2.3.2. Mikroalglerin Hücresel Bileşenleri

Güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürmek için fotosentez mekanizmasını kullanan mikroalgler, ürettikleri bu enerjiyi hücrelerinde protein, karbonhidrat, lipit ve nükleik asit gibi makromoleküller formunda depolamaktadırlar [Huang et al., 2010], [Demirbaş, 2011], [Park et al., 2015]. Mikroalg hücrelerinin içerdiği bu bileşenlerin mikroalg türüne ve kültür şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirtilmektedir [Mata et al., 2010], [Schlagermann et al., 2012], [Jacob-Lopez et al., 2015]. Literatürde yer alan bazı mikroalg türlerine ait protein, karbonhidrat ve lipit içerikleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1: Bazı mikroalg türlerine ait biyokimyasal bileşenler (% kuru hücre ağırlığı bazında).

Mikroalg	Protein	Karbonhidrat	Lipit	Kaynak
<i>Chlorella vulgaris</i>	55	9	25	Biller et al., 2012
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	43	16	18	Biller et al., 2012
<i>Spirulina platensis</i>	65	20	5	Biller et al., 2012
<i>Spirulina maxima</i>	68	11,7	6	De Oliveira et al.,1999
<i>Chlorella emersonii</i>	28	11	63	Illman et al., 2000
<i>Chlorella protothecoides</i>	52,6	10,6	14,6	Miao and Wu, 2006
<i>Chlorella sorokiniana</i>	42	32	22	Illman et al., 2000
<i>Chlorella minutissima</i>	9	14	57	Illman et al., 2000
<i>Nannochloropsis oculata</i>	57	8	32	Biller and Ross, 2011
<i>Botryococcus braunii</i>	32,6	8,8	36,1	Sydney et al., 2011
<i>Rhizoclonium hieroglyphicum</i>	38	19	34	Ahmad et al., 2013

Mikroalg hücrelerindeki karbonhidratlar metabolik ve yapısal fonksiyonlara hizmet etmekte ve fotosentezin ilk ürünü olarak diğer biyokimyasalların sentezi için başlangıç noktası olmaktadır [Williams and Laurens, 2010]. Mikroalglerin içerdiği karbonhidratlar hücre içinde nişasta, glikoz, şekerler ve diğer polisakkaritler şeklinde bulunabilmektedir [Spolaore et al., 2006]. *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*,

Scenedesmus ve *Tetraselmis* gibi bazı mikroalg türlerinin yüksek karbonhidrat içeriğine (% 37-55, kuru ağırlık bazında) sahip olmaları nedeniyle (kloroplastlarında ağırlıklı olarak nişastayı içermektedirler), biyoetanol üretimi için uygun bir hammadde kaynağı oldukları belirtilmektedir [Lam and Lee, 2012], [Jacob-Lopez et al., 2015].

Karbonhidratlar gibi proteinler de yapısal ve metabolik fonksiyonlarda görev almaktadırlar. Hücre büyümesini sağladıklarından hücre metabolizması için en önemli katalizörlerdir. Proteinler klorofil moleküllerinin bağlı olduğu kloroplastın ışık toplama komplekslerine yapısal bir iskelet sağlamak ve lipit membranlarında da bulunmaktadır [Williams and Laurens, 2010]. Bazı mikroalg türlerinin yüksek miktarda protein (esas olarak amino asitleri) içermesi nedeniyle, insan ve hayvan tüketimi için mükemmel bir ek besin kaynağı oldukları belirtilmektedir [Spolaore et al., 2006], [Jacob-Lopez et al., 2015].

Mikroalg hücreesindeki lipitler enerji rezervi ve hücre membranında yapısal bileşikler olarak yer almaktadırlar [Williams and Laurens, 2010]. Mikroalg biyokütlesinin içerdiği lipitler esas olarak nötral lipitler (ör; trigliseritler, kolesterol) ve polar lipitler (ör; fosfolipit, galaktolipit) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu lipit sınıflarından trigliseritler, en önemli enerji rezervleri olarak biyodizel üretiminin temel hammaddesini oluşturmaktadırlar [Huang et al., 2010], [Williams and Laurens, 2010].

Nükleik asitler (DNA ve RNA) proteinler ve monomerileri ile birlikte algal bölünme ve büyüme için temel oluşturmaktadırlar. Nükleik asitler hücrenel biyokütlenin küçük bir fraksiyonunu içermekle birlikte, hücre fosfatının önemli bölümünü ve azotun ikinci en önemli kısmını oluşturmaktadırlar [Williams and Laurens, 2010].

Mikroalgler ayrıca hücrelerinde klorofil ve karotenoid gibi pigmentleri de içermektedirler. Mikroalglerin içerdiği klorofil gıda ve kozmetik amaçlar için kullanılabilir. Bazı mikroalg türleri antibiyotik, antioksidan ve toksin gibi biyoaktif bileşikler de üretmektedirler [Harun et al., 2010]. Karotenoidler ise ışığı toplamaya, fotosentetik komplekslerin yapısı ve fonksiyonunu sürdürmeye, reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmaya ve fazla enerjiyi dağıtmaya katkıda bulunarak fotosentezde önemli rol oynamaktadırlar [Del Campo et al., 2007].

2.3.3. Mikroalg Biyokütlesi Üretimi

Genel olarak mikroalgler büyüme için gerekli enerji kaynağına ve karbon kaynağına göre fototrofik, heterotrofik, miksotrofik ve fotoheterotrofik olarak sınıflandırılmaktadır [Borowitzka, 1999], [Chen et al., 2011a]. Heterotrofik türler enerji ve karbon kaynağı olarak organik karbonu kullanırken, fototrofik türler enerji kaynağı olarak güneş ışığını, karbon kaynağı olarak inorganik karbonu (CO₂) kullanmaktadırlar. Miksotrofik türler hem fototrofik hem de heterotrofik şartlar altında yaşayabilen ve karbon kaynağı olarak organik bileşikleri ve inorganik karbonu (CO₂), enerji kaynağı olarak ise güneş ışığını ya da organik karbonu kullanan türler olarak tanımlanmaktadır. Fotoheterotrofik türler ise karbon kaynağı olarak organik bileşiklere, enerji kaynağı olarak güneş ışığına ihtiyaç duymaktadırlar [Mata et al., 2010], [Chen et al., 2011a].

Mikroalg biyokütle üretiminde kullanılacak kültür sistemi için algin biyolojisi, alan ihtiyacı, su ihtiyacı, besin maddeleri, iklim şartları (kültür açık ortamda yetiştirilecekse) ve nihai ürünün cinsi gibi faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir [Borowitzka, 1999]. Biyokütle üretimi için organik karbon (şeker, protein, yağlar gibi substratlar), azot ve fosfor gibi nütrientler, vitaminler ve tuzlar kadar, işletme parametleri (oksijen, karbondioksit, pH, sıcaklık, ışık yoğunluğu) arasındaki dengenin de önemli olduğu belirtilmektedir [Mata et al., 2010].

Mikroalg kültürü üretimi genel olarak açık havuzlarda ya da kapalı fotobiyoreaktörlerde gerçekleştirilmektedir. Mikroalg üretimi için açık havuz sistemlerinin 1950'lerden beri kullanıldığı bilinmektedir [Chisti, 2007]. Kapalı sistemlerle kıyaslandığında açık havuz sistemlerin daha az yatırım, işletim ve bakım maliyetine, daha düşük enerji girişine ve daha geniş üretim kapasitesine sahip oldukları belirtilmektedir. Bununla birlikte açık havuz sistemlerin sıcaklık, pH, aydınlanma ve buharlaşma gibi çevresel şartların kontrolünün zor olması, daha düşük biyokütle verimliliği, geniş alan gereksinimine ihtiyaç duyması, yetersiz karışım ve bakteri ve diğer mikroalgler tarafından kolaylıkla kontamine olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır [Mata et al., 2010], [Harun et al., 2010], [Chen et al., 2011a], [Rajvanshi and Sharma, 2012].

Kapalı fotobiyoreaktör sistemleri yetiştirilecek mikroalg türünün biyolojik ve fizyolojik karakteristiklerine göre optimize edilebilen esnek sistemler olarak tanımlanmaktadır [Mata et al., 2010]. Bu kültür sistemleri daha iyi kütle transferi sağlamak, maksimum hücre yoğunluğuna ulaşmak ve enerji kullanımını azaltmak amacıyla tübüler ve panel (flute plate) reaktörler şeklinde tasarlanmaktadır [Harun et al., 2010]. Kapalı fotobiyoreaktörler ile zorlu çevre şartlarında yaşayabilen mikroalg türlerinin üretimi için uygun şartlar sağlanabilmekte ve tek tür mikroalg üretimi gerçekleştirilebilmektedir [Lam and Lee 2012]. Ayrıca bu sistemlerin kontrollü şartlar altında yüksek verimde biyokütle üretimine izin vermesi ve kontaminasyon riskinin olmaması gibi avantajları da bulunmaktadır [Mata et al., 2010]. Bununla birlikte kapalı fotobiyoreaktör sistemlerinin küçük kapasiteli olması, güneş enerjisinden yararlanmasının kısıtlı olması, ilave ışık kaynağına ihtiyaç göstermesi, temizliğinin zor olması, biyolojik kirlenme, fotosentez ve havalandırma nedeniyle alg hücrelerinin fotooksidasyonuna neden olan oksijen birikimi, büyük ölçüğe çıkarmadaki zorluklar ve yatırım ve işletim maliyetlerinin yüksek olması gibi dezavantajlarının olduğu belirtilmektedir [Mata et al., 2010].

Açık havuz sistemler biyodizel üretimi amacıyla mikroalg yetiştirilmesi açısından oldukça düşük işletme maliyetleri nedeniyle kapalı fotobiyoreaktörlere göre daha uygun sistemler olarak değerlendirilmektedir [Huang et al., 2010]. Kapalı fotobiyoreaktörlerde sistem kontrolü daha kolay olması nedeniyle, bu sistemler özellikle yüksek değerlikli yağ asitlerinin üretimi (DHA, EPA gibi) için önerilmektedirler. Bununla birlikte yatırım ve işletme maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle bu sistemlerin mikroalglerden biyodizel üretimi amacıyla büyük ölçüğe geçirilmesinin ekonomik olmadığı belirtilmektedir [Huang et al., 2010].

2.4. Atıksuda Mikroalg Üretimi

Mikroalg üretimi için gerekli nütrienlerin sağlanması amacıyla değişik sentetik kültür ortamları kullanılmaktadır [Aitken and Antizar-Ladislao, 2012]. Mikroalglerin endüstriyel ölçekte üretimi, kullanılan sentetik kültür ortamı maliyetinin yüksek olması ve düşük seviyede biyokütle üretimi yüzünden ekonomik olarak uygulanabilir olmaktan çıkmaktadır. Bu yüzden atıksu gibi doğal kompleks ortamların kullanımı, atıksu arıtımı ile mikroalg üretimi arasında avantaja sahip ilginç bir alternatif olarak görülmektedir [Sydney et al., 2011], [Rawat et al., 2011]. Nütrient bakımından zengin atıksuların birçok mikroalg türü için gerekli nütrientlerin neredeyse tamamını sağlayabilecek nitelikte oldukları belirtilmektedir. Atıksu ortamından sağlanan azot, fosfor gibi nütrientler ile mikroalgal biyokütle üretiminin iki temel avantajı bulunmaktadır:

- Atıksudaki azot ve fosfor gibi nütrientler, çeşitli metaller ve iz elementler mikroalgler tarafından büyüme ve biyokütle üretimi için kullanılırken aynı zamanda ilave bir atıksu arıtımı da sağlanmaktadır.
- Alglerin fotosentez sırasında ürettikleri oksijen bakteriler tarafından kullanılarak organik maddelerin parçalanmasına ve aerobik bakteriyel büyümeye yardımcı olmaktadır [Rawat et al., 2011], [Aitken and Antizar-Ladislao, 2012].

Birçok mikroalg türünün atıksudaki organik karbon, inorganik azot ve fosforu kullanarak atıksu şartlarında etkin bir şekilde çoğalma yeteneğine sahip oldukları belirtilmektedir. Algler atıksu arıtımında koliform bakteri giderimi, kimyasal ve biyolojik oksijen ihtiyacının azaltılması, azot ve fosfor giderimi ve ağır metal giderimi için kullanılabilirler [Suali and Sarbatly, 2012], [Abdel-Raouf et al., 2012]. Literatürde *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Spirulina*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phormidium* ve *Botryococcus* türlerinin arıtım ve hammadde kaynağı olarak mikroalgal biyokütle üretiminde en çok kullanılan türler olduğu rapor edilmektedir [Pittman et al., 2011], [Suali and Sarbatly, 2012], [Abdel-Raouf et al., 2012].

Son yıllarda mühendislik sistemi olarak atıksu arıtımında mikroalg üretimi konseptinin maksimum potansiyelini, atıksudan nütrient gideriminin yanısıra mikroalg bazlı biyodizel üretimine genişlettiği görülmektedir. Örneğin; 2010–2013 tarihleri arasında “Mikroalglerden Biyodizel Üretiminde Yenilikçi (İnnovative) Yaklaşımlar” adıyla gerçekleştirilen TÜBİTAK destekli projede, atıksuda mikroalg üretimi ile sürdürülebilir mikroalgal biyodizel üretiminin ekonomik ve çevresel faydaları değerlendirilmiş ve proje başarı ile sonuçlandırılmıştır [Gürol, 2013]. Projenin kapsamında elde edilen çıktılar ise; mikroalg üretimi için evsel atıksu kullanarak temiz su kullanımını minimize etmek, mikroalglerin yetiştirilmesinde kullanılacak azot ve fosfor kaynağını atıksudan karşılayarak ilave gübre kullanımı maliyetini düşürmek ve ayrıca alıcı ortama gönderilecek nütrient yükünü azaltarak atıksu arıtımını sağlamak ve atmosfere verilecek CO₂ emisyonları yükünü azaltmaktır. Ayrıca üretilen biyokütlenin biyodizel üretimi için kullanılabilir olması ise biyokütle üretiminden kaynaklı ikinci bir kirlenme meydana gelmediğinden çevre dostu bir süreç olarak değerlendirilmektedir [Gürol, 2013]. Bununla birlikte biyoyakıt ve diğer değerli biyoürünlerin üretimi için entegre bir alg üretim sisteminin uygulanmasında mikroalgin büyük ölçekte üretimi ve hasatlanmasının iki temel sorun olduğu rapor edilmektedir [Pittman et al., 2011].

Literatürde mikroalglerden biyoyakıt eldesi konusunda son dönemlerde atıksuda bulunan besin maddelerinin algal biyokütle üretimi amacıyla kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar genellikle steril koşullar altında tek bir mikroalg kültürü kullanılarak ve çoğu laboratuvar ölçekli, az sayıda pilot ölçekli olarak gerçekleştirilmiştir [Mandal and Mallick, 2009], [Makareviciene et al., 2011], [Yang et al., 2011], [Cho et al., 2011], [Sturm and Lamer, 2011]. Değişik atıksu şartlarında çoğaltılan mikroalglerin büyüme kinetikleri ve nütrient giderim oranlarının yanısıra, lipid üretim verimleri ve biyodizele dönüşüm potansiyelleri incelenmiştir [Pittman et al., 2011]. Özellikle mikroalglerden biyoyakıt eldesi için evsel atıksuların mikroalgler için uygun bir büyüme ortamı olduğu belirtilmiştir [Sydney et al., 2011], [Yang et al., 2011]. Literatürde tek tür mikroalg kültürlerinin kullanıldığı çalışmaların dışında karışık mikroalg kültürlerinin kullanıldığı bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Fakat bu çalışmalarda kullanılan karışık mikroalg kültürleri, atıksu lagünü [Wahlen et al., 2011], [Sathish and Sims, 2012] veya stabilizasyon havuzu sistemlerinden [de Souza Silva et al., 2014] temin edilmiş ve hasatlandıktan sonra direkt olarak kullanılmış [Wahlen et al., 2011;], [de Souza Silva

et al., 2014] veya sentetik besin ortamında [Sathish and Sims, 2012] üretilmiştir. Sadece tek bir çalışmada siyonabakterilerin baskın olduğu ve *Desmodesmus sp.*'nin baskın olduğu ayrı iki karışık mikroalg kültürünün, arıtma tesisi lagünü girişinden alınan atıksu kullanılarak üretildiği belirtilmiştir [Komolafe et al., 2014].

Evsel atıksu arıtma tesisi ikincil arıtım çıkış suyu kullanılarak fotobiyoreaktörlerde yetiştirilen üç mikroalg türünün (*LEM-IM 11*, *Botryococcus braunii* ve *Chlorella vulgaris*) incelendiği bir çalışmada, mikroalg türlerinin azot-fosfor giderimleri, lipid bileşimleri ve biyoyakıt verimleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda *Botryococcus braunii* türünün sırasıyla %79,63 ve %100 azot ve fosfor giderimi, biyokütle ağırlığı bazında %36 lipid içeriği ve yüksek karbon alımı (144,91 mgCO₂/gbiyokütle-L-gün) ile en iyi sonucu verdiği rapor edilmiştir. Ayrıca içerdiği yağ asidi metil ester profili (palmitik, oleik, stearik, linoleik ve linolenik asit) sayesinde biyodizel üretimi için uygun bir tür olduğu da bildirilmiştir [Sydney et al., 2011].

Yine tek bir mikroalg türü (*Chlorella sp.*) ve ikincil arıtım evsel atıksu çıkışı kullanılarak yapılan çalışmada mikroalg biyokütle ve lipid üretim verimi incelenmiştir. Atıksuda bulunan bakteri ve protozoaların *Chlorella sp.*'nin çoğalması ve lipid üretimi üzerine negatif etkisinin olduğu gözlemlenmiş ve bu etkiyi azaltmak amacıyla atıksuya ön arıtım olarak farklı dozlarda UV radyasyonu ve farklı por boyutlarında filtrasyon uygulanmıştır. İki farklı ön arıtımdan geçen atıksuda *Chlorella sp.*'nin çoğalması, nütrient giderimi ve lipid üretim verimleri karşılaştırılmıştır. Kullanılan ön arıtım yöntemlerinden filtrasyon (0.2 µm por boyutu ile) uygulamasının en yüksek biyokütle ve lipid üretimi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir [Cho et al., 2011].

Evsel atıksu kullanılarak dokuz farklı yeşil ve mavi yeşil mikroalg türü ile yapılan başka bir çalışmada, farklı atıksu şartlarında (%100 atıksu, steril atıksu, steril ve nütrient ilaveli, steril olmayan nütrient ilaveli) yetiştirilen türlerin biyokütle üretim verimleri, toplam lipid içerikleri incelenmiştir [Mostafa et al., 2012]. Çalışma sonuçlarına göre mikroalg türüne ve kullanılan atıksu ortamına bağlı olarak lipid içerikleri ve biyokütle üretim verimleri değişmekle beraber, çalışmada kullanılan türler için en uygun atıksu ortamının steril ve nütrient ilaveli atıksu ortamı olduğu rapor edilmiştir [Mostafa et al., 2012].

Tek bir mikroalg türü için (*Botryococcus braunii*) evsel atıksu arıtma tesisi ikincil arıtım çıkış suyu ve sentetik kültür ortamı kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada [Orpez et al., 2009], üretilen mikroalglerin büyüme kinetikleri, ve

toplam lipit içerikleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar sentetik kültür ortamında yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin spesifik büyüme hızı ve biyokütle verimliliğinin (sırasıyla 0,21 gün⁻¹ ve 19,2 mg/Lt-saat) ikincil arıtım çıkış suyunda yetiştirilen mikroalg biyokütlesine göre (sırasıyla 0,14 gün⁻¹ ve 14,4 mg/Lt-saat) yüksek bulunduğu rapor edilmiştir. İki farklı besin ortamında yetiştirilen mikroalg biyokütlelerinin toplam lipit içerikleri ise (% kuru ağırlık bazında), atıksu ortamında üretilen tür için %17,85, sentetik kültür ortamında üretilen tür için %10,96 olarak belirlenmiştir [Orpez et al., 2009].

Mikroalglerle yapılan başka bir çalışmada [Wu et al., 2012], kültür ortamı olarak farklı azot kaynaklarına ve fosfora sahip (38,4 mg/L NH₄⁺-N, 3,1 mg/L NO₃⁻-N, 16,2 mg/L organik N and 44,7 mg/L PO₄⁻³-P) endüstriyel atıksuda, mikroalgin (*Chlamydomonas sp. TAI-2*) nütrient giderim verimi, biyokütle büyüme hızı, lipit üretimi ve lipit içeriği incelenmiştir. Sürekli aydınlanma ve %5 CO₂ ilavesi şartlarında mikroalg tarafından azot ve fosfor giderim veriminin %100 NH₄⁺-N, %100 NO₃⁻-N ve %33 PO₄⁻³-P olduğu belirlenmiştir. *Chlamydomonas* hücrelerinin büyüme hızları 5 gün sonrasında sabit ve maksimum 1,5 g/L, maksimum lipit üretimi ise 10. günde 0,28 g/L olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca üretilen lipitin yağ asidi bileşiminin 10 günlük kültürasyon boyunca çok az değiştiği ve genel olarak palmitik (C16:0), oleik (C18:1) ve linolenik (C18:3) asitlerin baskın olduğu belirlenmiştir [Wu et al., 2012].

Kong ve arkadaşları (2010) tarafından bir atıksu arıtma tesisinin farklı kesimlerinden (giriş, çıkış ve konsantre akım) alınan atıksu ortamları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, tek bir mikroalg türünün (*Chlamydomonas reinhardtii*) farklı kültür ortamlarındaki spesifik büyüme hızları, nütrient giderim oranları, lipit verimleri ve CO₂ oranının büyüme üzerine etkileri incelenmiştir. Deneyler farklı konsantrasyonlarda azot ve fosfor içeren kültür ortamları için 5 L'lik beherlerde kesikli modda ve konsantre akım içeren kültür ortamı için 15 L'lik fotobiyoreaktörde sürekli modda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada en yüksek biyokütle üretiminin (2 g/L-gün), en iyi azot-fosfor gideriminin (%83 azot, %14,45 fosfor giderimi) ve en yüksek yağ üretimi veriminin (%25,25, kuru ağırlık bazında) fotobiyoreaktör sistemi ve konsantre akım kullanılarak üretilen mikroalg biyokütlesi için elde edildiği ve yüksek CO₂ oranının hücre büyümesini teşvik ettiği rapor edilmiştir [Kong et al., 2010].

Besin ortamı olarak halı endüstrisi çıkış suyu ile evsel atık su karışımı (arıtılmış ve arıtılmamış) ve kanal tipi açık havuzların kullanıldığı bir çalışmada, doğada kendiliğinden üreyen 15 mikroalg türünden oluşan konsorsiyumun nütrient giderim oranları, biyokütle verimliliği, lipit içeriği ve biyodizel verimi değerlendirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda karışık mikroalg kültürünün arıtılmış ve arıtılmamış atıksudaki biyokütle üretim verimleri sırasıyla 41 ve 39 mg/lt-gün olarak belirlenmiştir. Ayrıca karışık mikroalg biyokütlesinin arıtılmış atıksuda %96,6 fosfor ve %99,8 azot giderimi sağladığı, lipit içeriğinin %6,82 ve biyodizel veriminin %63,9 olarak belirlendiği rapor edilmiştir [Chinnasamy et al., 2010].

Besin ortamı olarak atıksu arıtma tesisi lagünü giriş suyu kullanılarak 20 L'lik reaktörlerde gerçekleştirilen başka bir çalışmada, *Desmodesmus sp.* türü ve iki karışık mikroalg kültürünün nütrient ve toplam koliform giderim verimleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda *Desmodesmus sp.* türü ve iki karışık kültürü için azot giderim oranları sırasıyla %80, %55,4 ve %83,9 olarak, koliform bakteri giderim oranları ise %99 olarak rapor edilmiştir. Çalışmada ayrıca mikroalglerin lipit içerikleri de karşılaştırılmış ve en yüksek lipit içeriğine sahip türlerin karışık mikroalg kültürlerine ait olduğu (%16 – 26,3) belirlenmiştir [Komolafe et al., 2014].

2.5. Mikroalg Biyokütlesinin Hasatlanması

Algal biyokütleden biyodizel elde etme sürecinde biyokütlenin hasatlanması, genel olarak bir ya da daha fazla katı-sıvı ayırımı adımını içeren zorlu ve ürün maliyetini arttıran bir aşama olarak değerlendirilmektedir [Brennan and Owende, 2010], [Sturm and Lamer, 2011]. Büyüme ortamından mikroalglerin hasatlanması işleminin, toplam biyokütle üretim maliyetinin yaklaşık olarak %20-30'unu kapsadığı belirtilmektedir [Rajvanshi and Sharma, 2012], [Pragya et al., 2013]. Kullanılacak hasatlama yöntemi seçiminin mikroalgin karakteristiğine (hücre boyutu, yoğunluğu gibi) ve istenen ürünün kalitesine bağlı olması gerektiği bildirilmektedir [Brennan and Owende et al., 2010], [Sturm and Lamer, 2011]. Hasatlama yöntemi özellikle istenen ürünün hücre kütesinden ayrılarak saflaştırılması için daha sonraki kurutma proseslerini de içeriyorsa maliyeti daha da arttırmaktadır [Suali and Sarbatly, 2012]. Bu nedenle işletme, bakım ve enerji maliyetlerini arttırmayacak

şekilde en uygun hasatlama metodunun seçilmesi ve böylece mikroalg türlerinin çoğu için ekili bir yöntem olması ve yüksek biyokütle konsantrasyonları elde edilmesine izin vermesi gerektiği belirtilmektedir [Barros et al., 2015]. Bununla birlikte mikroalg hasatlamasında evrensel bir yöntem bulunmamasıyla birlikte, uygun ve ekonomik bir hasatlama metodunun geliştirilmesi yönündeki çalışmaların da halen devam ettiği bildirilmektedir [Mata et al., 2010]. Yüksek miktarda su giderimi ve büyük oranda biyokütle hacmi elde etmek için kullanılacak hasatlama yönteminin bir ya da daha fazla adımı içerebileceği ve istenen katı-sıvı ayırımının çeşitli fiziksel, kimyasal ya da biyolojik yollarla sağlanabileceği raporlanmıştır [Mata et al., 2010].

Literatürde biyokütlenin yoğunlaştırılması için hasatlama yöntemleri olarak koagülasyon/flokülasyon, ultrases, ozonlama, santrifüj, filtrasyon, çöktürme, flotasyon ya da elektroforez gibi tekniklerin kullanıldığı görülmektedir [Brennan and Owende, 2010], [Aitken and Antizar-Ladislao, 2012], [Pragya et al., 2013], [Lam and Lee, 2012], [Velasquez-Orta et al., 2014], [Misra et al., 2014].

Negatif yüzey yüküne sahip olan mikroalgler suda askıda kalma eğilimde olduklarından, bu durum yerçekimi etkisiyle kendiliğinden kolaylıkla çökmelerini engellemektedir [Kim et al., 2013], [Pragya et al., 2013]. Mikroalglerin bu negatif yüzey yüklerinin çok değerlikli katyonlar ve katyonik polimerler kullanılarak koagülasyon/flokülasyon yöntemi ile nötralize edilebileceği ya da azaltılabileceği belirtilmektedir [Molina Grima et al., 2003], [Pragya et al., 2013]. Flokülasyon mikroalg hücrelerini biraraya getirmek için düşük enerji gereksinimi nedeniyle avantajlı bir hasatlama yöntemi sayılabilmektedir. Ayrıca flokülasyon, ardından uygulanabilecek santrifüj, çöktürme veya filtrasyonu kolaylaştırmak için başlangıç susuzlaştırma adımı olarak da kullanılabilir [Molina Grima et al., 2003], [Suali and Sarbatly, 2012], [Pragya et al., 2013]. Flokülasyon amacıyla çok değerlikli metal tuzları ($FeCl_3$, $Al_2(SO_4)_3$, $Fe_2(SO_4)_3$), katyonik polimerler (polielektrolit, chitosan) ve yüzey aktif maddelerin kullanıldığı raporlanmıştır [Molina Grima et al., 2003], [Brennan and Owende, 2010], [Harun et al., 2010], [Barros et al., 2015]. Fakat mikroalg hasatlamasında düşük işletme maliyeti nedeniyle avantajlı görünen bu yöntemin, kullanılan kimyasallar nedeniyle mikroalg biyokütlesini ve çevreyi kirletmesi gibi dezavantajlarının olduğu belirtilmektedir [Harun et al., 2010], [Kim et al., 2013].

Laboratuvar ölçekli çalışmalarda mikroalg hasat etmede en çok tercih edilen yöntemin santrifüj olduğu görülmektedir [Miao and Wu, 2006], [Sheng et al., 2011], [Sathish, 2012]. Santrifüj ile biyokütle geri kazanım hızı hücrelerin çökme karakteristiklerine, santrifüj süresi ve hızına göre değişmektedir [Brennan and Owende, 2010]. Farklı hasatlama tekniklerinin incelendiği bir çalışmada santrifüjün diğer hasatlama yöntemlerine kıyasla daha etkili olduğu raporlanmıştır [Sim et al., 1988]. Kimyasal ilavesi gerektirmeyen ve diğer hasatlama yöntemlerine göre daha hızlı olan bu yöntemin dezavantajları, yüksek enerji girişi ve yüksek yatırım maliyetleri gerektirmesi ve bu nedenle büyük ölçekteki kullanımının ekonomik olmaması olarak bildirilmiştir [Molina Grima et al., 2003], [Suali and Sarbatly 2012]. Santrifüj kullanımına bağlı diğer bir dezavantaj ise santrifüj uygulaması sırasında oluşan gravitasyonel etki ve kesme kuvvetlerinin hücrelerin parçalanmasına neden olabileceği şeklinde ifade edilmektedir [Molina Grima et al., 2003]. Bununla birlikte santrifüj öncesi ön arıtım metodu olarak koagülasyon ya da filtrasyon kullanılarak enerji maliyetlerinin azaltılabileceği rapor edilmiştir [Kim et al., 2013], [Barros et al., 2015].

Diğer bir mikroalg hasatlama tekniği mikrobiyal bir membran kullanılarak katı-sıvı ayırımının yapıldığı [Suali and Sarbatly, 2012] ve diğer hasatlama yöntemleri ile kıyaslandığında daha rekabetçi bir yöntem olduğu belirtilen filtrasyondur [Harun et al., 2010]. Düşük hacimlerde ($<2\text{m}^3/\text{gün}$) biyokütle hasatlama için santrifüj ile karşılaştırıldığında daha ucuz bir yöntem olduğu belirtilen membran filtrasyonu, büyük hacimlere geçildiğinde ($>20\text{ m}^3/\text{gün}$) hem zaman alan (geri yıkama nedeniyle) hem de maliyeti arttıran bir yöntem olarak ifade edilmektedir [Molina Grima et al., 2003], [Brennan and Owende, 2010]. Düşük enerjili hasatlama için filtrasyon tekniği kullanılacaksa, mikroalg hücrelerinin $70\ \mu\text{m}$ ve üzerinde olması önerilmektedir [Aitken and Antizar-Ladislao, 2012].

Başka bir hasatlama yöntemi olan flotasyon, taşınım ve ayırım için ihtiyaç duyulan kaldırma gücünün gaz kabarcıklarıyla (nano, mikro ya da iri kabarcıklar şeklinde) mikroalg çözeltisine uygulandığı yüzdürme ile ayırma işlemi olarak tanımlanmaktadır. Etkili bir flotasyon için $30\ \mu\text{m}$ 'dan $500\ \mu\text{m}$ boyuta kadar olan mikroalg hücreleri için tercih edilebilecek bir yöntem olduğu bildirilmektedir [Kim et al., 2013]. Hasatlama metodu olarak düşük verimliliğe sahip olan bu yöntemin verimliliğini arttırmak için çeşitli koagülantların kullanılabilmesi [Lei et al., 2015],

[Barros et al., 2015] ya da ozon ile flotasyonun uygulanabileceği belirtilmektedir [Cheng et al., 2010], [Velasquez-Orta et al., 2014].

Son dönemde gelişmekte olan bir diğer hasatlama yönteminin ultrases uygulaması olduğu belirtilmektedir. Bu yöntemde mikroalg hücreleri sabit bir ultrasonik dalgaya maruz bırakıldıklarında, ortamda hücrelerin birbirine yaklaşım kümelenmesini sağlayan fiziksel bir güç oluşturulmaktadır [Kim et al., 2013]. Bu sayede bir araya gelen hücrelerin yerçekimi etkisiyle hızlı bir şekilde çökmeleri sağlanmaktadır. Hasatlama yöntemi olarak ultrases kullanımının yüksek enerji gereksinimi ve hasatlama veriminin düşük olması nedeniyle endüstriyel ölçüğe geçirilmesinin ekonomik olmayacağı bildirilmektedir [Bosma et al., 2003], [Kim et al., 2013].

Mikroalglerin hasatlanmasında kullanılan bir diğer yöntemin elektroforez tekniği olduğu görülmektedir [Lim et al., 2012], [Misra et al., 2014]. Mikroalg çözeltilisine yerleştirilen katotlar sayesinde çözeltide bir elektrik alan oluşturulduğu ve suyun hidrolizi ile üretilen hidrojenin, mikroalg floklarına yapışarak hücreleri katot yüzeyine taşıdığı belirtilmektedir. Enerji verimliliği ve düşük maliyet gibi avantajlara sahip olan bu yöntemin katot kirlenmesi ve yüksek güç gereksinimlerinin sonucu olarak yüksek sıcaklıklar nedeniyle sistemin zarar görmesi gibi dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir [Pragya et al., 2013].

Mikroalg hücrelerinin yoğunlaştırılması ve susuzlaştırılması için yapılan hasatlama işleminin ardından, hücre içindeki bileşenlerin (lipit, serbest yağ asitleri, trigliseritler gibi) ekstraksiyonu öncesinde bazı ön arıtım işlemleri uygulanmaktadır. Bu işlemler hücrenin freeze dryer, liyoflizatör ve etüv kullanılarak kurutulması [Johnson and Wen, 2009], [Ehimen et al., 2010], [Sheng et al., 2011], [Sathish, 2012], [Halim et al., 2012a], partükül boyutunun azaltılması ve hücrenin parçalanması (ultrases, mikrodalga, asit ya da enzim ile kimyasal parçalama gibi) adımlarını içerebilmektedir [Halim et al., 2012b], [Kim et al., 2013], [Keriş-Şen et al., 2014].

2.6. Mikroalg Biyokütlesinden Lipitin Ekstraksiyonu

2.6.1. Mikroalglerin Lipit Bileşimi

Lipitler organik bir solvent içinde çözünebilen biyolojik bir molekül olarak tanımlanabilmektedir. Birçok lipit yağ asitlerini içermektedirler ve genellikle moleküler baş grubunun polaritesine bağlı olarak iki kategoride sınıflandırılabilirler: 1) açilgliseroller (gliseritler) ve serbest yağ asitlerini oluşturan nötral lipitler, 2) fosfolipit ve glikolipitler olarak alt kategorilenmiş polar lipitler (Tablo 2.2) [Robles Medina et al., 1998]. Mikroalgler çok çeşitli yağ asidi ve lipit üretmektedirler. Mikroalglerin ürettikleri lipitler biyodizele dönüşüm için potansiyel hammadde kaynağı olarak görülmektedir. Mikroalglerdeki temel yağ asitlerinin 12-22 karbonlu ve 6 çift bağa kadar olabilen doymamış cis-isomerler ve doymuş yağ asitlerinden oluştuğu belirtilmektedir. Nötral lipitler mikroalg hücrelerinde öncelikle enerji deposu olarak kullanılırken, polar lipitler iki tabakalı hücre membranını oluşturan yapısal lipitler olarak tanımlanmaktadır [Robles Medina et al., 1998], [Williams and Laurens, 2010], [Halim et al., 2012a]. Açilgliseroller (gliseritler) gliserol omurgasına bağlı yağ asidi esterlerinden oluşmakta ve yağ asitlerinin sayılarına göre (triacilgliserol, diaçilgliserol, monoaçilgliserol) kategorize edilmektedirler. Lipit sınıfı bakımından açilgliserollerin, polar lipitlerden daha düşük doymamışlık derecesine sahip olmaları nedeniyle, biyodizele dönüşüm için daha uygun oldukları bildirilmiştir [Halim et al., 2012a]. Hidrokarbonlar, steroller, ketonlar, pigmentler (karotenler ve klorofiller) gibi yağ asidi içermeyen bazı nötral lipit türleri de mevcuttur. Bu lipit fraksiyonları organik solventlerde çözünmelerine rağmen biyodizele dönüştürülemezler. Özellikle mikroalglerden elde edilen lipitler, çeşitli fraksiyonlardan oluşan kompozit karışımlar olarak ekstrakte edilmektedirler [Halim et al., 2012a].

Tablo 2.2: Mikroalgelerde bulunabilecek lipit sınıfları.

Nötral Lipitler	Polar Lipitler	
	Glikolipitler	Fosfolipitler
Trigiliseritler	Fosfatidilkolin	Polimerleşmiş trigiliserit
Wax esterler	Fosfatidiletanolamin	Monogalaktosildigliserit
Hidrokarbonlar	Fosfatidilserin	Digalaktosildigliserit
Serbest yağ asitleri	Fosfatidilgliserol	
Steroller	Fosfatidilinositol	

Mikroalglerin türe ve yetiştirilme koşullarına bağlı olarak lipit ve yağ asidi içerikleri değişiklik göstermektedir. Mikroalglerin lipit içeriklerinin genel olarak kuru biyokütle ağırlığı bazında %20–%50 arasında değişebileceği ve büyüme koşullarında laboratuvar şartlarında optimizasyona gidildiğinde %80'e kadar lipit üretimi gerçekleştirebilecekleri rapor edilmektedir [Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007; Brennan and Owende, 2010]. Değişik mikroalg türleri ile yapılan çalışmalarda stres koşulları (azot, fosfor eksikliği, yüksek CO₂ oranı ve yüksek demir konsantrasyonları gibi) altında hücrelipit içeriklerinin önemli oranda arttığı belirtilmektedir [Li et al., 2008], [Liu et al., 2008], [Yoo et al., 2010], [Wu et al., 2012]. Biyodizel üretiminde önemli potansiyele sahip olduğu bilinen *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Neochloris oleoabundans* gibi bazı mikroalg türlerinin lipit içeriğinin %20'den %50'ye ulaştığı raporlanmıştır [Gouveia and Oliveira, 2009]. *Chlorella vulgaris* ve *Dunaliella tertiolecta* türleri ile kolon fotobiyoreaktörler kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada [Hulatt et al., 2012], farklı azot kaynaklarının (nitrat, amonyum ve üre) mikroalglerin kalorifik değerleri ve biyokimyasal bileşimleri (lipit ve protein içerikleri) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Azot eksikliği şartlarında *Chlorella vulgaris* türünün kalorifik değeri ve lipit içeriğinin arttığı, protein içeriğinin ise azaldığı gözlenmiştir. *Dunaliella tertiolecta* için yine protein içeriğinin azot eksikliği şartlarında azaldığı, lipit içeriği ve kalorifik değerinin ise neredeyse değişmediği rapor edilmiştir. *Dunaliella tertiolecta* türünün protein içeriği azalırken lipit içeriğinin aynı kalması, biyokütlenin bünyesinde karbonhidrat biriktirdiği şeklinde açıklanmıştır [Hulatt et al., 2012]. Farklı nitrat (0,005-0,1 g/L) ve fosfat (0,06-0,1 g/L) konsantrasyonlarında yetiştirilen *Scenedesmus Obliquus* türünün lipit üretim verimliliğinin incelendiği diğer bir

çalışmada ise, yine mikroalg hücrelerinin lipit içeriklerinin azot ve fosfor eksikliği şartlarında önemli oranda arttığı bildirilmiştir [Mandal and Mallick, 2009]. Tablo 2.3'te bazı mikroalg türlerinin lipit içerikleri (kuru ağırlık bazında) verilmektedir.

Tablo 2.3: Bazı mikroalg türlerinin lipit içerikleri (% kuru biyokütle ağırlığı bazında).

Mikroalg türü	Lipit İçeriği (%)	Kaynaklar
<i>Botryococcus braunii</i>	9,5 ± 1,2	Chinnasamy et al., 2010
<i>Chlorella saccharophila</i>	17,0 ± 2,9	Chinnasamy et al., 2010
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	12,2 ± 1,4	Chinnasamy et al., 2010
<i>Pleurochrysis carterae</i>	11,8 ± 2,1	Chinnasamy et al., 2010
Karışık Kültür	12,2 ± 1,3	Chinnasamy et al., 2010
<i>Chlorella vulgaris</i>	27,9 ± 3,6	Hulatt et al., 2012
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	17,9 ± 3,4	Hulatt et al., 2012
<i>Botryococcus braunii</i>	17,9	Orpez et al., 2009
<i>Scenedesmus obliquus</i>	12,7	Mandal and Mallick, 2009
<i>Spirulina maxima</i>	4,1	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Nannochloropsis sp.</i>	28,7	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Neochloris oleabundans</i>	29,0	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>C. protothecoides</i>	14,6 ± 0,2	Miao and Wu, 2006
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	25,3	Shen et al., 2009
<i>Picochlorum sp.</i>	30,0	Yang et al., 2015

Mikroalglerden ekstrakte edilen lipitlerin yağ asidi profili ve bileşimi, kültür şartlarının (medium bileşimi, sıcaklık, ışık yoğunluğu, aydınlık/karanlık döngüsünün oranı, pH gibi) yanı sıra mikroalg yaşam döngüsüne bağlı olarak da değişmektedir. Durgun faz esnasında hasat edilen mikroalg hücrelerinin, logaritmik faz esnasında elde edilen aynı türdeki hücrelerden daha düşük polar lipit ve daha yüksek nötral lipit (trigliserit) içeriğine sahip oldukları ve böylece biyodizel üretimi için daha uygun oldukları belirtilmektedir [Schlagermann et al., 2012], [Hu et al., 2008], [Halim et al., 2012a].

Mikroalg türlerinde bulunan yağ asitlerinin zincir uzunluğu dağılımı, diğer enerji bitkileriyle kıyaslandığında, seçilen yakıt özellikleri için belirli türlerin üretilmesini de mümkün kılmaktadır. Örneğin çoğunlukla daha kısa zincirli yağ asitlerini (<C₁₆) içeren türler, jet yakıtı üretiminde kullanım için de uygun olabilmektedirler [Williams and Laurens, 2010].

2.6.2. Lipit Ekstraksiyonu Yöntemleri

Mikroalglerin lipit içeriğinin belirlenmesinde laboratuvar ölçekli ekstraksiyon yöntemlerinin rutin kullanımına rağmen, lipit ekstraksiyonunu etkileyen değişkenler tam olarak anlaşılammıştır. Bu yüzden mikroalgal biyodizelin ticari üretimi için büyük ölçeğe geçmekte zorluklar yaşanmaktadır. İdeal bir lipit ekstraksiyon prosesi, lipit dışındaki kirleticilerin ekstraksiyonunu minimize etmek için spesifik olmalı, aynı zamanda istenen lipit fraksiyonlarına (mono-di ve trienoik yağ asidi zincirlerini içeren nötral lipitler) karşı da seçici olmalıdır [Cooksey et al., 1987], [Halim et al., 2011]. Literatürde mikroalglerden yüksek verimde lipit ekstraksiyonu için laboratuvar ölçekli çeşitli solventlerin ve yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir [Lewis et al., 2000], [Lee et al., 2010], [Halim et al., 2011], [Pruvost et al., 2011], [Kim et al., 2011].

Mikroalglerden lipit ekstraksiyonu kimyasal, fiziksel yöntemler ya da bu iki yöntemin birleştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir [Rawat et al., 2011]. Lipit ekstraksiyonunda kimyasal yöntem olarak organik solvent (n-hekzan, hekzan/izopropanol, kloroform/metanol, diklorometan/metanol, dietil eter, etanol) ekstraksiyonu ve süper kritik sıvı ekstraksiyonu gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [Demirbaş, 2009], [Halim et al., 2011], [Kanda et al., 2012], [Lam and Lee, 2012], [Pragya et al., 2013]. Mikroalg hücrelerinde bulunan nötral lipitlerin hücreden ekstraksiyonu genellikle non-polar solventler (kloroform, dietileter, hekzan vb.) kullanılarak sağlanmaktadır. Diğer taraftan polar lipitlerin ekstraksiyonunda, hücre membran yapısında bulunan hidrojen bağlarını parçalayacak ve diğer elektrostatik kuvvetleri yenecek özelliklere sahip olan daha polar çözücülerin (metanol, isopropil alkol vb.) kullanılması gerektiği belirtilmektedir [Christie, 1993], [Ferraz et al., 2004], [Rawat et al., 2011].

Mikroalglerin lipit içeriğinin belirlenmesinde en çok kullanılan iki metodun Soxhlet (n-hekzanın kullanıldığı) ve Bligh and Dyer (kloroform/metanolün kullanıldığı) metotları olduğu görülmektedir [Bligh and Dyer, 1959], [Mansour, 2005], [Johnson and Wen, 2009], [Sanchez et al., 2012]. Hekzan ucuz bir kimyasal olması nedeniyle tercih edilmekle birlikte, toksik ve parlayıcı özelliği nedeniyle çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir [Cheng et al., 2011]. Ayrıca kloroform ile karşılaştırıldığında, hekzanın nötral lipitler için daha düşük seçiciliğe sahip olması ve lipit dışındaki kirleticilere karşı afinitesinin daha yüksek olması nedeniyle, daha düşük ekstraksiyon verimine sahip olduğu bulunmuştur [Pragya et al., 2013]. Hekzanla ekstraksiyon metodunun dışında, laboratuvar tekniği olarak biyolojik materyallerden lipit ekstraksiyonu için hızlı ve etkili bir metot olduğu belirtilen Bligh and Dyer (1959) metodunun (kloroform/metanol karışımı) ve modifikasyonlarının, mikroalg lipit miktarının ölçülmesinde sıklıkla kullanıldığı görülmektedir [Lewis et al., 2000], [Zhu et al., 2002], [Mansour, 2005], [Lee et al., 2010], [Kim et al., 2011], [Halim et al., 2012a], [Kanda et al., 2012], [Mandal et al., 2013], [Kim et al., 2015].

Kloroform/metanol ve hekzan/eter karışımlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, sekiz farklı mikroalg türü kullanılarak lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir [El-Moneim et al., 2010]. Çalışmada kullanılan mikroalg türlerinin lipit içerikleri farklılık göstermesine rağmen, en yüksek ekstraksiyon verimi her tür için kloroform/metanol kullanılması ile sağlanmıştır. Kloroform/metanol kullanılmasıyla %2,5-12,5 (kuru biyokütle ağırlığı bazında) lipit verimi elde edilirken, hekzan/eter kullanıldığında bu değer %2,3-3,5 olduğu bildirilmiştir [El-Moneim et al., 2010].

Bir başka çalışmada *Spirulina* türü mikroalg biyokütlesinden lipitin ekstraksiyonunda kloroform/metanol, diklorometan/metanol, etanol ve hekzandan, oluşan dört farklı solvent kullanılmıştır. Bu solventler için elde edilen lipit ekstraksiyon veriminin, kuru biyokütle ağırlığı bazında sırasıyla %13,42, %13,36, %11,82 ve %1,88 şeklinde olduğu bildirilmiştir [Zheng et al., 2012].

Sheng ve arkadaşları (2011) tarafından *Synechocystis PCC 6803* türü mikroalglerden farklı solventler kullanılarak lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen lipitin biyodizele dönüşüm verimleri (% biyokütle ağırlığı bazındaki YAME miktarı) incelenmiştir. Kloroform/metanol kullanılması ile en yüksek ester (YAME) verimi elde edilirken hekzan kullanılmasının esterleşme için yeterli olmadığı raporlanmıştır [Sheng et al., 2011].

Bu çalışmaların yanı sıra literatürde mikroalg biyokütlesinde yer alan lipitlerin (nötral ve polar) hücreden ekstraksiyonunu kolaylaştırmak amacıyla çeşitli hücre parçalama metotları (ultrases, otoklav, mikrodalga, fransız presi, bead-beating, ıslak öğütme, ozmotik şok, yüksek ısı, süper kritik sıvı gibi) kullanıldığı ve lipit kazanım veriminin arttırıldığı bildirilmiştir [Lewis et al., 2000], [Shen et al., 2009], [Lee et al., 2010], [Chen et al., 2015]. Mikroalg hücrelerinin şekli, büyüklüğü ve yapısının türden türe farklılık göstermesi, uygulanan hücre parçalama metoduna karşı göstereceği direnci etkilemektedir. Bu durum farklı mikroalg türleri için yüksek lipit verimlerine ulaşmak amacıyla farklı lipit ekstraksiyon metotlarının kullanılmasını beraberinde getirmiştir [Shen et al., 2009], [Lee et al., 2010], [Prabakaran and Ravindran, 2011].

Shen ve arkadaşları (2009) tarafından *Scenedesmus dimorphus* ve *Chlorella protothecoides* türlerinden lipit ekstraksiyonuna yardımcı olması amacıyla bead-beater, fransız presi, ultrases ve ıslak öğütme yöntemlerinin yer aldığı dört farklı hücre parçalama yöntemi karşılaştırılmıştır. Hüresel parçalanma sağlandıktan sonra lipit ekstraksiyonu için çözeltilere hekzan ve hekzan/metanol karışımı ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda *Scenedesmus dimorphus* için en yüksek lipit ekstraksiyon veriminin ıslak öğütme yöntemi ile sağlanırken, *Chlorella protothecoides* içinse bead-beating yöntemi ile elde edildiği bulunmuştur [Shen et al., 2009].

Mikroalg hücrelerinden lipit ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, otoklavlama, bead-beating, mikrodalga, ultrases ve ozmotik şok uygulamalarından oluşan beş farklı hücre parçalama yöntemi *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus sp.* ve *Scenedesmus sp.* üzerinde denenmiştir. Çalışmada, hücre parçalama metotlarının uygulanmasının ardından hücredeki lipitin ekstraksiyonunda modifiye Bligh and Dyer metodu (kloroform/metanol (1/1, mL/mL) kullanılmıştır. *Botryococcus sp.* için en yüksek lipit ekstraksiyon verimi bead-beating ve mikrodalga, *Chlorella vulgaris* için otoklavlama ve mikrodalga, *Scenedesmus sp.* için ise mikrodalga uygulamaları ile elde edildiği bildirilmiştir [Lee et al., 2010].

Otoklavlama, bead-baeting, mikrodalga, ultrases ve ozmotik şok uygulamalarının mikroalg hücrelerdeki parçalanma ve çözeltiye lipit salınımındaki etkilerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada *Chlorella*, *Nostoc* ve *Tolypothrix* türü mikroalgler kullanılmıştır. Hücrelerdeki toplam lipitin ekstraksiyonu

kloroform/metanol karışımı kullanılarak sağlanmıştır. Araştırmacılar, her üç mikroalg türü için de ultrases uygulamasının diğer yöntemlerden daha yüksek lipit ekstraksiyon verimi sağladığını ortaya koymuşlardır [Prabakaran and Ravindran, 2011].

Mikroalglerden lipit ekstraksiyonuna yardımcı olarak kullanılan bir diğer hücre parçalama metodu ultrases uygulamasıdır. Literatürde, ultrases ön işlemleri sonrası dietileter [Mecozzi et al., 2002], etanol [Wiyarno et al., 2010], [Wiyarno et al., 2011], n-hekzan [Cravotto et al., 2008], [Wiyarno et al., 2010], [Ranjan et al., 2010], [Wiyarno et al., 2011], [Keriş-Şen et al., 2014], kloroform/metanol karışımı [Lee et al., 2010], [Ranjan et al., 2010], [Araujo et al., 2011], [Keriş-Şen et al., 2014] gibi çeşitli solventlerin kullanımının lipit ayrıştırma verimi üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Farklı solventlerle ultrases uygulamasının birlikte kullanıldığı bu çalışmalarda hücrelerden lipit ekstraksiyonu veriminin önemli oranda arttığı rapor edilmiştir.

Son dönemlerde lipit ekstraksiyonu için önerilen bir diğer ekstraksiyon prosesi, düşük toksisiteli ve ekstrakte edilen ürünün kolaylıkla ayırımını sağlayan süper kritik CO₂ ekstraksiyonudur. Bu proses, mikroalg lipit ekstraksiyonu için geleneksel organik solvent kullanımının yerini alabilecek potansiyele sahip, umut verici bir yeşil teknoloji olarak görülmektedir [Halim et al., 2011], [Kanda et al., 2012]. Fakat bu prosesin dezavantajı alt yapı ve işletme maliyetlerinin (yüksek basınç ve yüksek sıcaklık uygulaması nedeniyle) yüksek olmasıdır [Halim et al., 2011], [Kanda et al., 2012].

Lipit ekstraksiyonunda kullanılacak ekstraksiyon yöntemi kadar, ekstraksiyonda kullanılan biyokütlenin nem içeriğinin de önemli olduğu ve hücresel lipitin belirlenmesinde özellikle kuru biyokütle kullanılmasıyla da daha sağlıklı sonuçlar alındığı birçok araştırmacı tarafından raporlanmıştır [Lewis et al., 2000], [Zhu et al., 2002], [Cheng et al., 2010], [Pruvost et al., 2011]. Kurutma işlemi için santrifüj ve sıcaklık uygulamaları [Zhu et al., 2002], [Mandal ve Mallick, 2009], [Sydney et al., 2011] hem laboratuvar ölçeğinde hem de endüstriyel ölçekte, liyofilizasyon [Sydney et al., 2011] ve dondurarak kurutma (freeze drying) [Lewis et al., 2000], [Lee et al., 2010], [Kim et al., 2012], [Rawat et al., 2013] ise laboratuvar ölçeğinde kullanılan yöntemler olarak rapor edilmektedir.

Lipit ekstraksiyonu ve biyodizel üretiminde kuru biyokütle kullanımının lipit ve biyodizel verimi açısından avantajlı olduğu bildirilmekle birlikte, kurutma için gereken enerjinin toplam enerji tüketiminin %84'ünü oluşturduğu rapor edilmektedir [Patil et al., 2012], [Sathish, 2012], [Cheng et al., 2013], [Yang et al., 2015]. Bu nedenle literatürde son yıllarda mikroalglerden lipit ekstraksiyonu ve biyodizel üretimi çalışmalarında ıslak biyokütle kullanımının denendiği çalışmalar da görülmektedir [Sathish, 2012], [Sathish and Sims, 2012], [Cheng et al., 2013], [Chen et al., 2015]. Çalışmalarda ıslak biyokütleden lipitin ekstraksiyonunda hücre parçalanmasını kolaylaştırmak ve ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla mikrodalga metodunun kullanıldığı ve bu sayede yüksek lipit verimlerine ulaşılabildiği rapor edilmektedir [Cheng et al., 2013], [Chen et al., 2015].

Mikroalglerin lipit içeriğinin belirlenmesinde daha ileri analiz ve karakterizasyonu (trigliserit ve bireysel yağ asidi içeriği gibi) GC ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmektedir [Elsey et al., 2007], [Chen et al., 2011b]. Literatürde solvent ekstraksiyonu ile lipit ölçümü birçok araştırmacı tarafından sıklıkla kullanılmasına rağmen, bazı araştırmacılar bu tekniklerin zaman alan karmaşık adımlar içeren yöntemler olduğunu belirtmektedir [Kimura et al., 2004], [Bertozzini et al., 2011], [Isleten-Hosoglu et al., 2012]. Bu amaçla mikroalglerin lipit içeriğinin belirlenmesinde (özellikle nötral lipitler) hızlı sonuç alındığı belirtilen Nile Red (NR) floresan boyanın kullanımı önerilmektedir. NR lipitte çözünen ve yüksek floresan hassasiyetine sahip bir boyadır. NR ile lipit ölçümü, hücrel lipitin hücre dışına çıkarılmadan gerçekleştirildiği florometrik bir yöntemdir. Bu yöntem ile uygun “uyarıma (Excitation(Ex)) ve yayılma (Emission(Em))” dalga boyları seçilerek nötral ve polar lipitlerin ayırımı sağlanmaktadır [Elsey et al., 2007]. Bununla birlikte NR metodunun her mikroalg türü üzerinde etkili olmadığı belirtilmektedir. Bu durum mikroalg hücresi içine NR boya çözeltisinin nüfuz edememesi ile açıklanmaktadır. Hücre duvarından NR boya çözeltisinin etkili bir şekilde geçebilmesi amacıyla bazı ön arıtım işlemlerinin uygulanabildiği raporlanmıştır [Chen et al., 2011b].

2.7. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi

Mikroalglerin içerdiği lipitin ekstraksiyonundan sonra bu yağdan biyodizel üretmek için bir dönüşüm prosesine ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroalgal yağın viskozitesi çok yüksek olduğu için direkt yakıt olarak kullanımının uygun olmadığı belirtilmektedir. Bu nedenle mikroalg yağının viskozitesinin azaltılması gerekmektedir. Mikroalgal lipitin biyoyakıtlara dönüştürülmesi aşamasında hidroliz, mikroemülsiyon, piroliz ve transesterifikasyon prosesleri kullanılabilir. Bu prosesler arasında literatürde en yaygın olarak kullanılan yöntemin transesterifikasyon prosesi ile biyodizel üretimi olduğu görülmektedir [Miao and Wu, 2006], [Velasquez-Orta et al., 2012], [Kim et al., 2013], [Pragya et al., 2013].

Mikroalg biyokütlesinden transesterifikasyon yöntemi ile biyodizel üretimi iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Bunlardan birincisi biyokütleden lipitin ekstraksiyonu ve ardından ekstrakte edilen lipitin transesterifikasyon prosesi ile biyodizele dönüştürülmesidir. İkinci yöntem ise son yıllarda enerji ve zaman verimliliği açısından sıklıkla tercih edilen ve yüksek verimde biyodizel üretimi elde edilmesini sağlayan direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemidir. Bu yöntemde ekstraksiyon ve transesterifikasyon prosesleri eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. [Ehimen et al., 2010], [Pragya et al., 2013], [Martinez-Guerra et al., 2014a], [Martinez-Guerra et al., 2014b].

Mikroalglerden biyodizel üretimi seçeneklerinden bir diğeri de ultrases ve mikrodalga gibi çeşitli hücre parçalama teknolojileri ile desteklenen in-situ transesterifikasyon uygulamalarıdır. Mikroalg hücrelerinin parçalanmasını hızlandıran bu metotların, reaksiyon solventinin hücresel lipite geçişini kolaylaştırdığı belirtilmektedir [Koberg et al., 2011], [Ehimen et al., 2012]. Bu yöntemler arasında mikrodalga uygulaması en etkili ve en kolay yöntem olarak rapor edilmektedir [Wahidin et al., 2014] Mikroalglerden transesterifikasyon yöntemi ile biyodizel üretimi Bölüm 2.7.4'te detaylı olarak anlatılmıştır.

2.7.1. Biyodizelin Özellikleri

Biyodizel, bitkisel yağlar, hayvansal yağlar ya da mikroalgler gibi yenilenebilir yağ hammaddelerinden elde edilen, uzun zincirli yağ asitlerinin mono alkil esterleri olarak tanımlanan alternatif bir dizel yakıttır [Zhang et al., 2003], [Barnwal and Sharma, 2005], [Meher et al., 2006], [Chakraborty et al., 2010]. Önemli potansiyele sahip endüstriyel bir ürün olan biyodizel, ekonomik bakımdan uygunluğu, atık yağlardan ve diğer biyokütlelerden eldesi ve olumlu çevresel etkileri bakımından kullanılabilirliği ile ortaya çıkmaktadır.

Biyodizel biyolojik olarak parçalanabilen, zehirsiz, CO₂ gazı emisyonlarının azaltılmasına katkıda bulunan yenilenebilir bir dizel yakıttır ve petrol dizeli ile rekabet edebilecek yakıt özelliklerine sahiptir [Hossain et al., 2008], [Mandal and Mallick, 2009], [Georgogianni et al., 2009], [Banerjee and Chakraborty, 2009], [Jain and Sharma, 2010], [Ehimen et al., 2010]. Özellikleri yağ hammaddesine ve kullanılan alkole göre biraz değişiklik gösterse de, direkt olarak veya karışım şeklinde dizel yakıt yerine kullanılabilir [Zhang et al., 2003], [Mata et al., 2010].

Trigliseritlerin ve biyodizel yakıtının özellikleri moleküllerde mevcut olan her bir yağ asidinin miktarına göre tanımlanmaktadır. Zincir uzunluğu ve çift bağ sayıları yağ asitlerinin ve trigliseritlerin fiziksel karakteristiklerini belirlemektedir. Biyodizel hammaddesinin yağ asidi kompozisyonu biyodizelin yakıt özelliklerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır [Ramos et al., 2009]. Setan sayısı, kinematik viskozite, soğuk akış özellikleri ve oksidatif stabilite gibi birçok parametre, biyodizelin yakıt olarak uygunluğunu belirlemede kullanılan yakıt özellikleridir. Kullanılan hammadde kaynağının yağ asidi profili biyodizeldeki bu yakıt özelliklerini büyük oranda etkilemektedir. Sonuç olarak farklı kaynaklardan elde edilen yakıtların yağ asidi profilleri ve özellikleri önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle en iyi biyodizel kompozisyonunun belirlenmesi için potansiyel hammadde kaynağının yağ asidi profilinin incelenmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir [Knothe, 2008], [Kaur et al., 2012]. Biyodizelin yakıt özelliklerinin değerlendirilmesinde ASTM D6751 (American Society for Testing and Materials) ve EN 14214 (Avrupa Standardı) biyodizel standartları kullanılmaktadır. Biyodizelin yakıt özellikleri kendisini oluşturan yağ asidi

esterlerinin yapısıyla tanımlandığı için, bu özelliklerin Amerika (ASTM D6751) ve Avrupa (EN 14214) standartlarında verilen setan sayısı, kinematik viskozite, soğuk akış özellikleri ve oksidatif stabilite gibi birçok parametreyi karşılaması istenmektedir [Knothe, 2005] [Knothe, 2008]. Tablo 2.4'te petrol dizeli ve bitkisel kökenli biyodizelin ASTM ve EN 14214 biyodizel standartları ile karşılaştırılması verilmektedir [Çengelci vd., 2011], [Web 2, 2016].

Tablo 2.4: Petrol dizeli ve bitkisel kökenli biyodizelin ASTM ve EN 14214 biyodizel standartları ile karşılaştırılması.

Özellikler	Petrol Dizeli	Bitkisel Kökenli Biyodizel	ASTM D6751 (Amerikan Standardı)	EN 14214 (Avrupa Standardı)
Yoğunluk, 15°C (g/cm ³)	0,82 – 0,86	0,87 – 0,88		0,86 – 0,90
Kinematik Viskozite, 40°C (mm ² /s)	2,50 – 3,50	4,3	1,9 – 6,0	3,5 – 5,0
Parlama Noktası (°C)	>55	>100	130 (min.)	120 (min.)
Setan Sayısı (tutuşma katsayısı)	49 – 55	>55	51	47
Kükürt İçeriği (%kütlesel)	<0,05	<0,01	≤0.0015	≤0.001
Kül İçeriği (%kütlesel)	<0,01	<0,01	0,02 (max.)	0,02 (max.)
Su Miktarı (mg/kg)	<200	<300	500 (max)	500 (max).

Biyodizel dizel yakıttan daha yüksek setan sayısına sahiptir, aromatik değildir, neredeyse hiç sülfür içermez ve ağırlıkça %10-11 oranında oksijen içermektedir. Fazla olan serbest oksijen tam yanmanın gerçekleşmesini sağlayarak emisyonların azaltılmasına yardımcı olmaktadır. [Zhang et al., 2003], [Atabani et al., 2012]. Çevre dostu olarak bilinen biyodizel, petrol bazlı dizel yakıtla kıyaslandığında, egzoz gazındaki CO, partikül madde, duman ve hidrokarbon emisyonlarının azlığı ile de ön plana çıkmaktadır [Zhang et al., 2003], [Mata et al., 2010], [Atabani et al., 2012].

Setan sayısı tutuşma gecikmesi ve yanma kalitesi ile ilgili dizel yakıt kalite parametresi olarak kullanılmaktadır. Setan sayısı ne kadar yüksek ise yakıtın ateşleme kalitesi o kadar iyi olmaktadır. Biyodizelin setan sayısı değerinin kullanılan hammaddeye bağlı olduğu bilinmektedir. Hammaddenin yağ asidi karbon zinciri ne kadar uzun ve molekül doygunluğu ne kadar fazla ise setan sayısı değeri o kadar

yüksek olmaktadır. [Ramos et al., 2009], [Moser, 2009]. Linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asit gibi doymamış yağ asidi esterleri düşük setan sayısı ile sonuçlanırken, yüksek setan sayısı değerlerinin ise plamitik (C16:0) ve stearik (C18:0) gibi doymuş yağ asidi esterleri için gözlemlendiği raporlanmıştır [Ramos et al., 2009].

Biyodizelin oksidasyon stabilitesi çoklu doymamış yağ asidi metil esterleri içeriği nedeniyle, biyodizelin kullanımı etkileyen temel parametrelerden biri olarak tanımlanmaktadır. Stabilite hava, ısı, ışık, iz metaller, peroksitler ya da bileşiğin yapısal özelliği (çift bağların varlığı nedeniyle) gibi faktörlerden etkilenmektedir [Ramos et al., 2009], [Rajvanshi and Sharma, 2012]. Yüksek oranda doymuş yağ asidine sahip yağlardan üretilen biyodizelin daha iyi oksidasyon stabilitesine sahip oldukları bildirilmektedir. Bu yüzden linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asitler bakımından zengin biyodizel hammaddelerinin zayıf oksidasyon stabilitesine sahip yakıtlar vermeye meyilli oldukları rapor edilmektedir [Rajvanshi and Sharma, 2012; Kaur et al., 2012].

Biyodizelin yakıt kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer parametre de iyot değeridir. İyot değeri yağ asidi karışımı içindeki toplam doymamışlığın bir ölçüsü olarak değerlendirilmekte ve artan doymamışlık derecesi ile lineer bir artış göstermektedir [Ramos et al., 2009], [Schlagermann et al., 2012].

Palmitik (C16:0) ve stearik (C18:0) asit gibi doymuş yağ asidi esterleri bakımından zengin yağlarda iyot değerinin düşük olduğu bildirilmektedir [Ramos et al., 2009]. İyot değeri ne kadar düşüğe yakıtın oksidatif stabilitesinin de o kadar iyi olacağı rapor edilmektedir [Gouveia and Oliveria, 2009].

Biyodizel petrol dizelinden daha yüksek parlama noktasına sahiptir. Biyodizelin bu özelliği, kullanım, taşınım ve depolanma aşamasında güvenli bir yakıt olmasını sağlamaktadır [Zhang et al., 2003]. Biyodizelin kinematik viskozitesinin de petrol dizelinden daha yüksek olduğu, bununla birlikte viskozitenin artan doymamışlık derecesi ile azaldığı bildirilmektedir [Knothe et al., 2008]. Erime noktası parametresi de biyodizelin düşük sıcaklık özelliklerine ilişkin bireysel yağ asidi esterlerinin uygunluğunu değerlendirmede kullanılmaktadır. Düşük sıcaklık özelliklerinin belirlenmesi için bulutlanma noktası ve soğuk filtre tıkanma noktası gibi parametreler değerlendirilmektedir. Doymuş yağ asitlerinin (palmitik ve stearik asitler gibi) doymamış yağ asitlerinden (linolenik, linolenik gibi) daha yüksek erime noktasına sahip oldukları bilinmektedir [Knothe et al., 2005], [Knothe et al., 2008].

Yağ asidi esterlerinin erime noktalarının yüksek olması dizel motorlarda yakıt hatlarının ve filtrelerin tıkanması ve çökme gibi işletme problemlerine neden olabilmektedir [Ramos et al., 2009].

Biyodizelin çeşitli avantajlarının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Biyodizel petrol kökenli dizel yakıttan %12 daha düşük enerji içeriğine sahiptir, bu durum yaklaşık olarak %2-10 oranında yakıt tüketiminin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca biyodizelin bulutlanma noktasının, oksijen içeriğinin ve azot oksit (NO_x) emisyonlarının dizele göre yüksek olduğu rapor edilmektedir. Fakat bu problem yanmanın geciktirilmesi ile yanma sıcaklığını azaltarak önlenebilmektedir [Moser, 2009], [Atabani et al., 2012].

2.7.2. Biyodizel Hammaddesi Olarak Mikroalgler

Mikroalgal lipitlerden üretilen biyodizel, gıda ve diğer bitkisel ürünlerin temini ile ilgili olumsuzluklardan etkilenmeden, düşük karbonlu ve yenilenebilir bir hammadde kaynağı sağlama potansiyeline sahip olduğu için, çağdaş ve küresel biyoteknolojik araştırmaların odak noktası haline gelmiştir [Doan et al., 2011]. Literatürde özellikle son dönemlerde, üçüncü nesil enerji kaynağı olarak adlandırılan mikroalglerin mevcut diğer hammaddeler ile karşılaştırıldığında, avantajlı olduklarını gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir [Chisti, 2007], [Hossain et al., 2008], [Hu et al., 2008], [Mandal and Mallick, 2009], [Mata et al., 2010], [Yang et al., 2011], [Schlagerman et al., 2012], [Hulatt et al., 2012], [Mandotra et al., 2016].

Mikroalgler diğer enerji bitkileriyle kıyaslandığında daha yüksek fotosentetik verim, daha yüksek biyokütle üretimi, daha yüksek büyüme hızına sahiptirler ve fazla alan gereksinimine ihtiyaç duymamaktadırlar [Hossain et al., 2008], [Johnson and Wen, 2009], [Mata et al., 2010], [Wahlen et al., 2011]. Yağlı tohum bitkilerinin yüksek maliyetleri nedeniyle biyodizel üretim maliyeti, büyük ölçekli ticari işletmeler için hala büyük bir engel teşkil etmektedir [Mandal and Mallick, 2009].

Mikroalglerin biyodizel üretiminde kullanılmaları için avantajları özetlenecek olursa;

- Mikroalgler güneş ışığını biyokütleyle (lipit+hücre) dönüştürme yeteneğine sahiptirler.
- Bazı mikroalg türlerinin kuru alg biyokütlesi bazında %80'e kadar lipit üretimine sahip oldukları bildirilmektedir. Bununla birlikte yağ seviyesi genel olarak kuru ağırlıklarının %20 – 50 arasında değişmektedir [Spolaore et al., 2006], [Chisti, 2007].
- Büyüme hızları diğer enerji bitkilerine kıyasla daha yüksektir. Logaritmik büyüme hızları biyokütlelerini 3,5 saat kadar kısa bir sürede ikiye katlayabilmektedirler [Spolaore et al., 2006], [Chisti, 2007].
- Mikroalgal biyokütle üretimi sırasında atık CO₂'in etkili bir şekilde biyofiksasyonu sağlanmaktadır (1 kg kuru algal biyokütle üretimi için yaklaşık olarak 1,83 kg CO₂ kullanılır.) [Chisti, 2007], [Sanchez et al., 2011].
- Biyodizel üretimi için kullanılan diğer ürünlerin (soyayağı, ayçiçeği, kanola gibi) aksine, insan gıdasının asıl kaynağı olarak kullanılmadıkları için ve diğer geleneksel ürünlerin yetiştirilmesine uygun olmayan verimsiz topraklarda bile üretilebildikleri için (nütrient ihtiyaçlarını atıksu akımlarını kullanarak da karşılayabilirler) mikroalgler biyodizel üretiminde en uygun hammadde olarak görülmektedir [Sanchez et al., 2011], [Rawat et al., 2011].
- Mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonları büyüme koşulları optimize edilerek değiştirilebilmektedir. Böylece uygun koşullarda lipit üretim verimleri artırılabilir [Brennan and Owende, 2010].

Mikroalgal biyokütleden biyodizel üretiminin yukarıda sayılan avantajlarının yanında bazı dezavantajları da mevcuttur. Mikroalgal biyokütleden biyodizel üretimi; mikroalg üretimi, hasatlama, lipit ekstraksiyonu ve mikroalgal lipitlerin biyoyakıtta dönüşümünü içeren sıralı bir prosesdir. Toplam biyodizel üretim maliyetinin %60'ı üretim haricindeki proseslerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Bu nedenle hasatlama, ekstraksiyon ve biyodizele dönüşüm maliyetlerinin azaltılması gerekmektedir. Mikroalgin hasatlanması için gereken maliyet, kullanılan hasatlama teknolojisine ve mikroalgal kültürün yoğunluğuna bağlı olarak değişmesine rağmen,

toplam biyodizel üretim maliyetinin %20'si kadar yüksektir [Kim et al., 2013]. Mikroalgal biyodizel üretimi, hasatlama ve ekstraksiyon prosesleri ekonomik açıdan optimize edildiği takdirde, teknik olarak uygun ve petrol bazlı dizelle rekabet edebilecek kalitede bir yakıt elde edilmektedir [Rajvanshi and Sharma, 2012], [Schlagermann et al., 2012].

2.7.3. Mikroalgal Biyodizelin Özellikleri

Mikroalglerle yapılan biyodizel üretimi çalışmalarında lipit üretim potansiyelini ve elde edilecek biyodizelin özelliklerini değerlendirmek için genel olarak toplam lipit içeriği, lipit üretimi verimliliği (mg/L·gün bazında) ya da yağ asidi profili kullanılmaktadır [Song et al., 2013]. Besinsel ve çevresel faktörlerin (sıcaklık, ışık gibi), mikroalglerin toplam lipit içeriği kadar yağ asitlerinin birbirlerine göre oranlarını da etkilediği bilinmektedir [Spolaore et al., 2006], [Sanchez et al., 2011], [Mandotra et al., 2016].

Mikroalg türüne, büyüme şartlarına ve büyüme aşamalarına bağlı olarak mikroalglerin trigliseritleri, fosfolipitleri, glikolipitleri ve betain lipitlerini içeren değişik türde lipit üretimini gerçekleştirdikleri rapor edilmektedir. Mikroalglerden elde edilen biyodizelin fizikokimyasal özelliklerinin, mikroalgal lipitin içerdiği trigliseritlerin yağ asidi bileşimine direkt olarak bağlı olduğu bildirilmektedir [Bucy et al., 2012], [Kaur et al., 2012]. Mikroalglerin içerdiği trigliseritlerin yağ asidi içeriklerinin, türe göre değişmekle birlikte çoğunlukla palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1), stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve linolenik asitten (C18:3) oluştuğu rapor edilmektedir [Mandal vand Mallick, 2009], [Kumar et al., 2011], [Kaur et al., 2012]. Tablo 2.5'te bazı mikroalg türlerine ait yağ asidi bileşimleri verilmektedir.

Tablo 2.5: Bazı mikroalg türlerinin yağ asidi bileşimleri.

Mikroalg türü	Yağ asidi (Toplam YAME'in ağırlık olarak yüzdesi, %)						Kaynak
	Palmitik asit (16:0) ¹	Palmitoleik asit (16:1) ¹	Stearik asit (18:0) ¹	Oleik asit (18:1) ¹	Linoleik asit (18:2) ¹	Linolenik asit (18:3) ¹	
<i>Chlorella vulgaris</i>	25,07	5,25	0,63	12,64	7,19	19,05	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Spirulina maxima</i>	40,16	9,19	1,18	5,43	17,89	18,32	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Scenedesmus obliquus</i>	21,78	5,95	0,45	17,93	21,74	3,76	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	17,70	0,88	—	4,87	12,37	30,19	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Nannochloropsis sp.</i>	23,35	26,87	0,45	13,20	1,21	—	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Neochloris oleabundans</i>	19,35	1,85	0,98	20,29	12,99	17,43	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Chlorella protothecoides</i>	4,70	—	2,00	65,20	18,50	6,90	Chen et al., 2012
<i>Spirulina platensis</i>	42,30	1,00	0,95	1,97	16,18	20,06	Ötleş and Pire, 2001
<i>Nannochloropsis salina</i>	30,00	39,00	1,00	8,00	1,00	1,00	Bucy et al., 2012;
<i>C. Sorokiniana</i>	25,32	2,29	1,22	22,56	39,32	4,62	Dong et al., 2013
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,10	4,10	2,80	62,80	3,80	—	Halim et al., 2011
<i>B. braunii</i>	29,50	3,40	1,00	44,90	21,20	—	Yoo et al., 2010

¹Yağ asidinin içerdiği karbon sayısı:karbon zincirindeki çift bağ sayısını ifade etmektedir.

Bazı deniz yosunu türü olarak bilinen dinoflagellalar (ör: *Scripsiella sp.*) yüksek oranda değişik uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerini (ÇDYA) içermektedir [Mansour, 2005]. Farklı kültür şartları altında heterotrofik veya ototrofik olarak büyütülebilen *Chlorella protothecoides*'in yağ asidi bileşiminin temel olarak oleik asit, linoleik asit ve setan asitten oluştuğu bildirilmiştir [Miao and Wu, 2006]. Biyodizel üretimi için uygun bir hammadde kaynağı olarak görülen

Scenedesmus obliquus'un yağ asidi metil esterleri (YAME) içeriğinin dört temel bileşenin; palmitik asit (C16:0), oleik asit (C18:1), linoleik asit (C18:2) ve linolenik asitten (C18:3) oluştuğu rapor edilmiştir [Mandal and Mallick, 2009]. Fotobiyoreaktörde yüksek biyokütle üretim verimine sahip *Chlorella sp. MCCS 040*'ın, biyodizelin de yapısında bulunan en yaygın yağ asitlerinden palmitik ve stearik asiti içerdiği bildirilmiştir [Rasoul-Amini et al., 2011].

Literatürde mikroalglerle yapılan biyodizel üretimi çalışmalarında, mikroalglerin lipit birikiminin ve yağ asidi metil esteri içeriklerinin belirlenmesinin yanında, elde edilen biyodizelin fizikokimyasal özelliklerinin de değerlendirildiği çok sayıda çalışma görülmektedir [Knothe, 2008], [Knothe, 2009], [Kumar et al., 2011], [Chen et al., 2012], [Kaur et al., 2012], [Bucy et al., 2012], [Islam et al., 2013], [Mandotra et al., 2016]. Mikroalgal biyodizelin fizikokimyasal özelliklerinin (oksidasyon stabilitesi, kinematik vizkozitesi, iyot değeri, setan sayısı ve soğukta akış özellikleri gibi) çoğunun ASTM Biyodizel Standardı'nda verilen limit değerlere uygun olduğu bildirilmiştir [Chen et al., 2012], [Kumar et al., 2014].

Mikroalglerle yapılan bir biyodizel karakterizasyonu çalışmasında, altı farklı mikroalg türünün yağ asidi profili değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda altı mikroalg türü için temel yağ asidi bileşenlerinin palmitik, palmitoleik, oleik, linoleik ve linolenik asitten oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca uzatılmış yetiştirme süresinin, mikroalgal biyodizel örneklerinin oksidasyon stabilitesi ve setan sayısı değerlerinin artırılması için gerekli olan çoklu doymamış yağ asidi içeriklerinin azalmasını sağladığı rapor edilmiştir [Kaur et al., 2012].

Mikroalglerin yakıt özelliklerinin incelendiği başka bir çalışmada, mikroalg lipitinden (*Chlorella protothecoides*) üretilen biyodizel ve farklı hacimsel oranlarda mikroalgal biyodizel/petrol dizeli karışımları yakıt kalitesi bakımından incelenmiş ve elde edilen sonuçlar ASTM D6751 ve EN14214 Biyodizel Standartlarına göre değerlendirilmiştir. Mikroalg yağından üretilen biyodizelin yüksek oranda oleik (ağırlıkça %65,2) ve linoleik (ağırlıkça %18,5) asit metil esterleri içeriğine sahip olduğu ve tatmin edici yakıt özellikleri gösterdiği (yüksek oksidasyon stabilitesi, düşük soğuk filtre tıkanma noktası gibi) görülmüştür. Çalışmada ayrıca istenen yakıt özellikleri açısından mikroalgal biyodizelin petrol dizeli ile en uygun karışım oranının en fazla %20 (hacimsel oran) olması önerilmiştir [Chen et al., 2012].

Literatürde biri mavi-yeşil alg diğerleri yeşil alg olan beş farklı türün fizikokimyasal karakterizasyonun yapıldığı diğer bir çalışmada, bu türlerin çoklu doymamış yağ asitleri miktarının düşük olduğu (%0,2, g/g) ve iyi kalitede biyodizel üretimi için kullanılabilecekleri belirtilmiştir [Kumar et al., 2011].

Mikroalgal lipitten elde edilen biyodizel, içerdiği yağ asitleri nedeniyle geleneksel dizel yakıtla kıyaslandığında çok daha düşük soğuk filtre tıkanma noktasına (-11°C) ve daha yüksek viskositeye sahip bir yakıt olmasına rağmen, biyodizel üretimi için yüksek potansiyele sahip bir hammadde kaynağı olarak değerlendirilmektedir [Miao and Wu, 2006]. Oleik (C18:1) ve palmitik (C16:1) asit metil esteri bakımından zengin bazı mikroalg türlerinin yüksek oksidasyon stabiliteli yakıt üretimi sağladığı rapor edilmektedir [Gouveia and Oliveira, 2009], [Abou-Shanab et al., 2011], [Kaur et al., 2012], [Schlagermann et al., 2012]. Mikroalgal yağın iyot değerinin de (69-102 g I₂/100 g), Avrupa Biyodizel Standardı'na (EN 14214) (<120 g I₂/100 g) uygun olduğu belirtilmektedir. Bu özelliği mikroalg yağına iyot değeri 120'den büyük ayçiçeği gibi biyodizel üretiminde kullanılan bazı bitkisel yağlarla rekabet edebilme avantajı vermektedir [Gouveia and Oliveira, 2009]. Tablo 2.6 da mikroalgden elde edilen biyodizelin geleneksel dizel yakıt ve ASTM biyodizel standardı ile karşılaştırılması verilmiştir [Miao and Wu, 2006], [Gouveia and Oliveria, 2009], [Rajvanshi and Sharma, 2012], [Schlagermann et al., 2012].

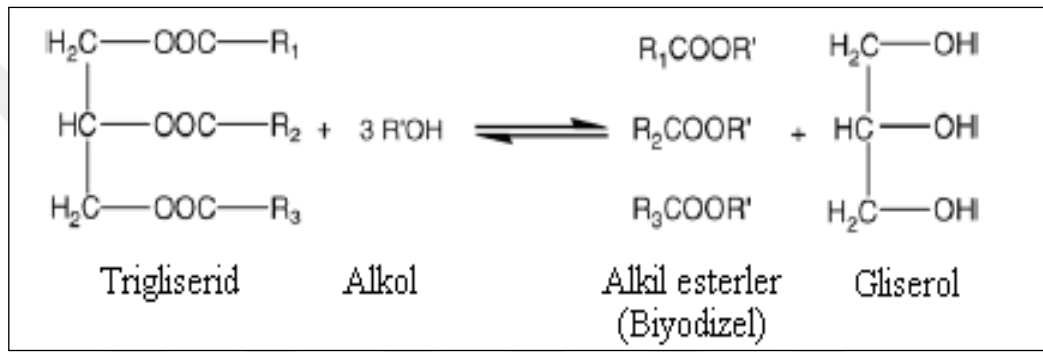
Tablo 2.6: Mikroalg yağından elde edilen biyodizelin dizel yakıt ve ASTM Biyodizel Standardı ile karşılaştırılması.

Özellik	Mikroalg biyodizel	Dizel yakıt	ASTM Biyodizel Standardı
Yoğunluk, (kg/L)	0,864	0,838	0,86-0,9
Viskozite, (mm ² /s) 40 °C'de	5,2	1,9-4,1	3,5-5,0
Parlama noktası, (°C)	115	75	En az 100
Katılma Noktası, (°C)	-12	-50-10	—
Soğukta Filtre Tıkanma Noktası, (°C)	-11	-3,0 (En fazla -6,7)	Yazın en fazla 0 Kışın en fazla <-15
Asit Değeri, (mg KOH/g)	0,374	En fazla 0,5	En fazla 0,5
Isıl Değeri, (MJ/kg)	41	40-45	—
H/C oranı	1,81	1,81	—
İyot Değeri (g I ₂ /100g)	69-102	—	<120

2.7.4. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon (alkoliz) yönteminde yenilenebilir hammadde yağı (bitkisel yağların temel bileşeni olan trigliserit), katalizör varlığında kısa zincirli bir alkolle (metanol veya etanol) reaksiyona girerek, yağ asidi metil esterleri (YAME) ve gliserin vererek esterleşmektedir. Hammadde yağının içerdiği trigliseritlerin alkolle transesterifikasyonu sonucu oluşan yağ asidi metil esterleri (YAME) bu reaksiyonun ana ürünü, gliserin ise yan ürünü oluşturmaktadır [Ma and Hanna, 1999], [Zhang et al., 2003]. Reaksiyonda kullanılacak alkol; metanol, etanol, propanol, bütanol ve pentanol olabilmektedir. Fakat özellikle kolay bulunması ve ucuz olması nedeniyle en çok tercih edilen alkolün metanol olduğu belirtilmektedir [Ma and Hanna, 1999].

Transesterifikasyon reaksiyonu alkali katalizörlü, asit katalizörlü ya da enzim katalizörlü olarak gerçekleştirilmektedir. Katalizör reaksiyon hızını ve verimini arttırmak için kullanılmaktadır. Alkali katalizör olarak NaOH, KOH, karbonatlar ve sodyum ya da potasyum alkoksitler; asit katalizör olarak genellikle sülfürik asit, sülfonik asit ve hidroklorik asit kullanılmaktadır. Lipaz enzimi ise biyokatalizör olarak kullanılabilir [Ma and Hanna, 1999], [Georgogianni et al., 2009], [Velasquez-Orta et al., 2012]. Şekil 2.2’de bir trigliserit ile alkolün bir katalizör eşliğinde meydana gelen transesterifikasyon reaksiyonu ifade edilmektedir [Sprules and Price 1950].



Şekil 2.2: Transesterifikasyon reaksiyonu.

Transesterifikasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonraki ürünler bir ester karışımı, gliserol(gliserin), reaksiyona girmemiş alkol, katalizör ve tri-di-monogliseritlerdir. Bir çok araştırmacı yağ asidi metil esterlerini elde etmenin, esterde her zaman di ve monogliserit gibi safsızlıkların kalması nedeniyle kolay bir proses olmadığını rapor etmiştir. Monogliseritler ester karışımında bulanıklığa sebep olmaktadır. Transesterifikasyonun tamamlanmasından sonra karışım oda sıcaklığında bekletildiğinde, ham ester fazı ve gliserol fazı ayrılmaktadır. Gliserol karışım ortamından temel olarak gravite etkisi ile çöktürerek ya da santrifüjle ayrılmaktadır [Ma and Hanna, 1999], [Banerjee and Chakraborty, 2009].

Transesterifikasyonda yağın serbest yağ asidi ve su içeriği, alkolün yağa molar oranı, katalizör tipi, karışımın yoğunluğu, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi gibi faktörler reaksiyon verimini etkilemektedir [Sharma et al., 2008].

Transesterifikasyonda kullanılacak olan hammaddenin serbest yağ asidi (SYA) içeriği reaksiyonun sonucu açısından önemli bir parametre olarak görülmektedir. Literatürde SYA içeriği düşük olan yağlar için (<0,5, ağırlık bazında) alkali

katalizörlü transesterifikasyonun [Jain and Sharma, 2010], [Ehimen et al., 2010], SYA içeriği yüksek olan yağlar için (mikroalg yağı, pirinç kepeği yağı, jatropha curcas yağı gibi) ise asit katalizörlü transesterifikasyonun uygun bir yöntem olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir [Miao and Wu, 2006], [Jain and Sharma, 2010], [Ehimen et al., 2010], [Rawat et al., 2011].

Günümüzde birçok endüstriyel uygulamada transesterifikasyon yöntemi, homojen alkali katalizör kullanarak gerçekleştirilmektedir. Alkali katalizörlü transesterifikasyon reaktanın saflığına çok hassas olmasına rağmen, asit katalizörlü transesterifikasyona göre kısa sürede (30-60 dk) yüksek verim ve yüksek saflıkta ürün sağlayabilmektedir [Jain and Sharma, 2010]. Alkali katalizörlü bir transesterifikasyon için gliseritlerin (yağ) ve alkolün oldukça susuz (anhidroz) olması gerekmektedir. Reaksiyon ortamında su bulunmasının, reaksiyonu sabunlaşmaya (sulu bir ortamda trigliserinlerin metil esterleri yerine sabuna dönüşmesi) çevirdiği, bu durumun ise ester ve gliserin fazlarının ayırımını zorlaştırıp ester verimini düşürdüğü belirtilmektedir [Ma and Hanna, 1999].

Transesterifikasyon yöntemi çoğunlukla homojen katalizör (alkali ya da asit) kullanarak gerçekleştirilmekle birlikte, bu katalizörler reaksiyondan sonra ortamdan uzaklaştırılma gibi bazı problemlere sahip olabilmektedir. Reaksiyonda heterojen katı asit ya da heterojen katı alkali katalizörlerin kullanımı ile bu problemlerin çözülebileceği birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir [Liu et al., 2008b], [Georgogianni et al., 2009], [Chakraborty et al., 2010]. Bu sayede katalizör solvent kullanımı olmadan reaksiyon karışımından kolaylıkla ayrılabilen, kolaylıkla rejenere edilebilmekte ve daha az korozif karaktere sahip olmaktadır [Georgogianni et al., 2009].

Transesterifikasyonda kullanılan alkolün yağa molar oranı, dönüşüm verimine etki eden önemli parametrelerden biri olarak değerlendirilmektedir. Reaksiyon stokiyometrik olarak 1 mol trigliserit için 3 mol alkol gerektirmektedir. Reaksiyonun ürünler yönüne kayabilmesi için, uygulamada alkol:yağ oranı 3:1'den yüksek olmalıdır. Molar oranın kullanılan katalizör tipi ile ilgili olduğu belirtilmektedir [Ma and Hanna, 1999]. Endüstriyel uygulamalarda %98 (g/g)'den daha yüksek metil ester verimi sağlamak için kullanılan molar oran genel olarak 6:1 (alkol:yağ)'dır [Barnwal and Sharma, 2005].

Literatürde mikroalglerden biyodizel üretiminde transesterifikasyon yönteminin kullanılması ile ilgili çok sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Fakat

mikroalg yağından biyodizel üretimi göz önüne alındığında, alkali katalizli transesterifikasyon teknolojisinin kullanımının uygun olmadığı belirtilmektedir [Sanchez et al., 2011], [Ehimen et al., 2010], [Miao and Wu, 2006]. Mikroalg yağının yüksek asidik özelliği (yüksek SYA içeriği, >%0,5) nedeniyle, alkali katalizör kullanıldığında, kısmi sabunlaşma reaksiyonuna neden olabilmekte ve reaksiyon sonrasında biyodizelin ayrımı ve saflaştırılmasında zorluklar meydana gelmektedir [Ehimen et al., 2010], [Rawat et al., 2011]. Mikroalg yağının yağ asidi metil estere (YAME) dönüşümü için katalizör tipinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, aynı reaksiyon şartları altında asit katalizörlü (HCl) transesterifikasyonun, alkali katalizörlü (NaOH) transesterifikasyondan daha yüksek YAME verimi sağladığı belirtilmektedir [Nagle and Lemke, 1990]. Aynı çalışmada katalizör tipi dışında katalizör konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve sıcaklığının da transesterifikasyon reaksiyonuna etkisi incelenmiş, bu parametrelerin YAME dönüşümüne çok büyük bir katkısının olmadığı bulunmuştur [Nagle and Lemke, 1990].

Yapılan başka bir çalışmada heterotrofik mikroalg türü olan *Chlorella protothecoides*'den asit katalizörlü transesterifikasyon ile biyodizel üretimi incelenmiştir [Miao and Wu, 2006]. Çalışmada 4 farklı katalizör miktarının (%25, %50, %60 ve %100 H₂SO₄) ve 3 farklı sıcaklık (30, 50 ve 90 °C) değerinin elde edilecek YAME verimine etkisi değerlendirilmiş ve %100 asit katalizör kullanıldığında ve 30 °C sıcaklıkta yüksek biyodizel verimi elde edildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca yüksek katalizör konsantrasyonunun çok kısa sürede düşük spesifik gravite değerine sahip biyodizel ürünü üretebileceği belirtilmiştir [Miao and Wu, 2006].

Mikroalglerle yapılan transesterifikasyon çalışmalarında, genel olarak kuru biyokütle kullanılmaktadır. Mikroalg biyokütlenin kurutulması işlemi, biyodizel üretim maliyeti açısından bir dezavantaj olarak görülmekle birlikte, kullanılan biyokütlenin ıslak ya da kuru olmasının biyodizel verimi ve YAME karakterizasyonunu etkilediği belirtilmektedir [Johnson and Wen, 2009], [Ehimen et al., 2010].

Mikroalg lipitin biyodizele dönüşüm seçeneklerinden birisi de yüksek sıcaklık (>240°C) ve yüksek basınç (>8 MPa) altında, katalizör gereksinimi olmadan yapılan süper kritik transesterifikasyon yöntemidir [Wahidin et al., 2014]. Bu yöntemin geleneksel proseslere göre, daha kısa sürede (120-240 sn) daha iyi ürün

verimi sağladığı ve daha az proses adımı (reaksiyon sonrası ürünün nötralizasyon, yıkama ve kurutma gibi arıtım adımlarını gerektirmediği) gerektirdiği rapor edilmektedir [Ehimen et al., 2010]. Fakat bu yöntemin, yüksek biyodizel dönüşümü sağlamak için yüksek sıcaklık, yüksek basınç ve yüksek alkol:yağ oranı (40:1-42:1) gerektirmesi sebebiyle, ekonomik anlamda uygulanabilir olmadığı bildirilmektedir [Ehimen et al., 2010].

2.7.4.1.Direkt (in-situ) Transesterifikasyon

Mikroalglerden geleneksel biyodizel üretimi, biyokütleden lipitin ekstraksiyonunu ve ekstraksiyonun ardından elde edilen lipitin transesterifikasyonunu içeren iki aşamalı bir proses ile gerçekleştirilmektedir [Lam and Lee, 2012]. Fakat lipit ekstraksiyonu ve lipitin biyodizel dönüşüm adımları yüksek enerji girişi ve yüksek maliyeti nedeniyle mikroalgal biyodizelin ticarileşmesinin önünde büyük bir engel teşkil etmektedir [Kim et al., 2015]. Bu yüzden son dönemlerde ekstraksiyon ve transesterifikasyon proseslerinin tek adımda gerçekleştirildiği direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemi mikroalgal biyokütleye sıklıkla uygulanmaktadır [Johnson and Wen, 2009], [Ehimen et al., 2010], [Haas and Wagner, 2011], [Sanchez et al., 2012], [Velasquez-Orta et al., 2013], [Kim et al., 2015]. Genel olarak n-hekzan toksisitesinin daha az olması tercih edilirken, kloroform ekstraksiyon performansının iyi olması nedeniyle direkt transesterifikasyonda co-solvent olarak tercih edilmektedir [Halim et al., 2011]. Bu proses lipit içeren biyokütlenin katalizör varlığında kimyasal solvent (metanol) ile direkt olarak temasına izin vermektedir. Kimyasal solvent bu proseste biyokütleden lipitin ekstrakte edilmesine ve reaktan olarak transesterifikasyon reaksiyonuna katkıda bulunmaktadır [Lam and Lee, 2012]. Direkt (in-situ) transesterifikasyonun geleneksel iki aşamalı transesterifikasyona göre bir çok avantajı olduğu belirtilmektedir. Bunlar; solvent ayırım adımını minimize etmek, proses süresini azaltmak ve sonuç olarak proses üretim maliyetini düşürmektir [Johnson and Wen, 2009], [Lam and Lee, 2012], [Velasquez-Orta et al., 2012], [Kim et al., 2013]. Aynı zamanda iki aşamalı (ekstraksiyon-transesterifikasyon) metotta ekstraksiyon adımı boyunca meydana gelebilecek potansiyel lipit kaybının önüne geçilerek, daha fazla lipit geri kazanımı ve daha yüksek YAME verimi elde edilebildiği de rapor

edilmektedir [Lewis et al., 2000], [Johnson and Wen, 2009], [Ehimen et al., 2010], [Wahlen et al., 2011].

Literatürde iki aşamalı (ekstraksiyon-transesterifikasyon) ve tek aşamalı (direkt) transesterifikasyon yöntemlerinin mikroalglerden biyodizel üretim verimini nasıl etkilediği inceleyen çalışmalar mevcuttur. Lewis ve arkadaşları (2000), ekstraksiyon-transesterifikasyon ve direkt transesterifikasyon (başlangıç ekstraksiyon adımı olmaksızın) yöntemleri ile lipit üreten iki mikroheterotroftan yağ asitlerinin geri kazanım verimlerini incelemiştir. İki tür için bu iki yöntem karşılaştırıldığında, direkt transesterifikasyon yönteminin ekstraksiyon-transesterifikasyon yöntemine göre biyokütleden daha fazla YAME verimi sağladığı görülmüştür [Lewis et al., 2000]. *Schizochytrium limacinum* türü kullanılarak yapılan diğer çalışmada, yine ekstraksiyon-transesterifikasyon ve direkt transesterifikasyon yöntemleri değişik (kloroform, hekzan, petrol eteri) co-solventler kullanılarak karşılaştırılmış ve en yüksek biyodizel verimi ve YAME içeriğinin direkt transesterifikasyon yöntemi ve kloroform kullanılarak elde edildiği rapor edilmiştir [Johnson and Wen, 2009].

Mikroalglerle direkt transesterifikasyon çalışmalarında genel olarak homojen asit ya da alkali katalizörler kullanıldığı görülmektedir [Lewis et al., 2000], [Johnson and Wen, 2009], [Sanchez et al., 2012], [Valesquez-Orta et al., 2013]. Mikroalglerden (*Chlorella sp.* ve *Nannochloropsis oculata*) direkt transesterifikasyon yönteminin kullanılarak gerçekleştirildiği bir çalışmada, asit katalizör (sülfirik asit) ve alkali katalizör (sodyum hidroksit ve sodyum metoksit) kullanımının YAME verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Reaksiyonda katalizör olarak sülfirik asit kullanıldığında iki tür için de daha yüksek YAME verimi elde edildiği bildirilmiştir [Valesquez-Orta et al., 2013].

Direkt (in-situ) transesterifikasyonda kullanılan hammaddenin kuru ya da ıslak olmasının biyodizel verimini önemli oranda etkilediği belirtilmektedir. Direkt (in-situ) transesterifikasyonda kuru biyokütle kullanıldığında, ıslak biyokütle kullanımına göre daha yüksek YAME verimi elde edildiği rapor edilmektedir [Lam and Lee, 2012], [Kim et al., 2013], [Valesquez-Orta et al., 2013]. Islak ve kuru mikroalg biyokütleleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, direkt transesterifikasyon yöntemi ile ıslak biyokütleden elde edilen biyodizel verimi ve YAME içeriği (%7,76), kuru biyokütleye göre (%63,47) önemli oranda düşük bulunmuştur [Johnson and Wen, 2009]. Başka bir çalışmada, farklı nem içeriklerindeki *Chlorella* biyokütlesinin %100 asit katalizör (H_2SO_4) kullanarak direkt transesterifikasyonu

denenmiş ve nem içeriğindeki artışın dönüşüm verimini önemli oranda düşürdüğü rapor edilmiştir [Ehimen et al., 2010].

2.7.4.2. Mikrodalga Destekli Direkt (in-situ) Transesterifikasyon

Direkt transesterifikasyon yönteminde dönüşüm verimini arttırmak amacıyla, reaksiyon karışımındaki karışmayan fazlar arasındaki kütle transfer hızını arttıran ve eş zamanlı olarak da reaksiyon süresini azaltan mikrodalga ya da ultrases uygulamaları gibi mekanik proseslerin kullanımı son yıllarda önerilmektedir [Park et al., 2015]. Özellikle mikrodalga destekli in-situ transesterifikasyon yöntemi mikroalglerden biyodizel üretiminde hızlı ve basit bir yol sunması nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir yöntem olmuştur. Mikrodalga (MD) uygulamasının lipit ve biyodizel verimine etkisinin, mikrodalga ışınlamasının frekansına oldukça bağlı olduğu belirtilmektedir. Mikrodalga ışınlaması sisteminin ürün verimini, ürün saflığını ve reaksiyon hızını arttırdığı bildirilmektedir [Teo and Idris, 2014]. Literatürde de mikrodalga destekli direkt transesterifikasyonun, konvensiyonel ısıtmayı kullanan (su banyosu yöntemi) direkt transesterifikasyon uygulamasına nazaran daha avantajlı olduğunu gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir [Koberg et al., 2011], [Cheng et al., 2013], [Teo and Idris, 2014], [Cui and Liang, 2014], [Wahidin et al., 2014]. Konvensiyonel ısıtmayı kullanan transesterifikasyon metodunda ısı transferi hücre dışından içeriye doğru meydana gelirken, kütle transferi hücrenin içinden dışarıya doğru meydana gelmektedir. Mikrodalga ısıtmasını kullanan transesterifikasyon metodunda ise kütle ve ısı transferi ekstrakte edilen maddenin içinden bulk sıvısına (reaksiyon solventine) doğru meydana gelmektedir. Isı ve kütle transferinin aynı yönde meydana gelmesinin, hücrelerin etkili bir şekilde parçalanmasına yardımcı olduğu bildirilmektedir [Iqbal and Theegala, 2013], [Teo and Idris, 2014].

Mikrodalga ısıtması reaktanın her yerini eş zamanlı olarak ısıtan temassız ısı kaynağıdır. Mikroalg hücresinden lipitin ekstrakte edilmesinde bu temassız ısı kaynağını kullanmanın avantajları; daha etkili ısıtma, daha hızlı enerji transferi, azalan ekipman boyutu, azalan termal gradyan, reaksiyonun daha hızlı başlaması (start-up), artan üretim ve proses adımlarının elimine edilmesi olarak belirtilmektedir [Iqbal and Theegala, 2013], [Wahidin et al., 2014]. Mikrodalga ısıtma uygulaması ısının direkt olarak mikroalg biyokütlesine transfer olmasına izin

vererek, moleküllerin hızlı titreşimi sayesinde mikroalg hücre duvarının parçalanmasına yardımcı olmaktadır. Böylece hücresel lipitin hücre içinden reaksiyon solventine geçişini kolaylaştırmaktadır. Mikroalg uygulaması aynı zamanda reaksiyon sırasında mikroalg hücresinin içinde ve dışında kavite olan bubble'ların patlamasını destekleyerek daha fazla lipit ekstrakte edilmesini sağlamaktadır. Kavite fenomeni mikroalg ile üretilen yüksek sıcaklık ve basınç gradyanları nedeniyle hücre yüzeyinde meydana gelmekte ve böylelikle hücre duvarı parçalanmaktadır [Teo and Idris, 2014].

Mikroalg ışınlanması basit bir dielektrik ısıtması değil, daha ziyade kimyasal reaksiyona dahil olan spesifik bir mikroalg aktivasyon etkisi olarak da ifade edilmektedir. Solvent ve katalizör arasında mikroalg ile etkileşimin dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir [Teo and Idris, 2014]. Reaksiyon bileşenleri (metanol ve gliseritler) ile mikroalgın etkileşimi, artan dipolar polarizasyon fenomeni nedeniyle [Hincapie et al., 2014] aktivasyon enerjisinde büyük bir azalma ile sonuçlanmaktadır. Bu durum dipolar rotasyon ve iyonik iletim ile sonuçlanan reaksiyon karışımında, mikroalgın moleküler seviyede etkileşimi ile elde edilmektedir. Aktivasyon enerjisinin azaltıldığı miktar ortam ve reaksiyon mekanizmasına önemli oranda bağlı olmaktadır. Bu anlamda metanolün güçlü bir mikroalg absorpsiyon materyali olduğu bildirilmiştir [Patil et al., 2011].

Mikroalglerden geleneksel yöntemle lipit ve biyodizel üretimi çalışmalarında kuru biyokütle kullanımının daha yüksek YAME verimleri elde edilmesini sağladığı bildirilmekle birlikte, mikroalg destekli ekstraksiyon ya da transesterifikasyonda ıslak biyokütle kullanımı ile de yüksek verimler elde edilebildiği bildirilmektedir [Cheng et al., 2013], [Cheng et al., 2014], [Wahidin et al., 2014], [Cui and Liang, 2014], [Park et al., 2015]. Ayrıca bu sayede biyokütle kurutma adımı elimine edilerek, biyokütlenin kurutulması için gereken enerji tüketimi de büyük oranda azaltılmış olmaktadır. Geleneksel ekstraksiyon-transesterifikasyon (iki aşamalı), mikroalg destekli ekstraksiyon-transesterifikasyon ve mikroalg destekli direkt transesterifikasyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, %80 su içeriğine sahip ıslak *Chlorella pyrenoidosa* mikroalg biyokütlesinin biyodizel üretim verimi incelenmiştir. Islak biyokütle kullanılarak gerçekleştirilen farklı transesterifikasyon uygulamaları arasında, en yüksek biyodizel veriminin mikroalg destekli direkt transesterifikasyon ile elde edildiği rapor edilmiştir [Cheng et al., 2013].

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Atıksuda Karışık Kültür Üretimi Çalışmaları

Çalışma kapsamında atıksuda karışık mikroalgal biyokütle üretimi amacıyla kullanılan ikincil arıtım deşarj suyu, Ömerli Evsel Atıksu Arıtma Tesisi'nden temin edilmiştir. İstanbul Su ve Kanalizasyon İşletmesi (İSKİ) tarafından işletilen biyolojik arıtma tesisi, 500 m³/gün arıtım kapasitesine sahip olup, ardışık-kesikli olarak çalıştırılmaktadır. Arıtma tesisinin çıkış suyundaki azot, fosfor ve iz elementler mikroalglerin büyümesi için gereken inorganik besin kaynaklarını oluşturmaktadır.

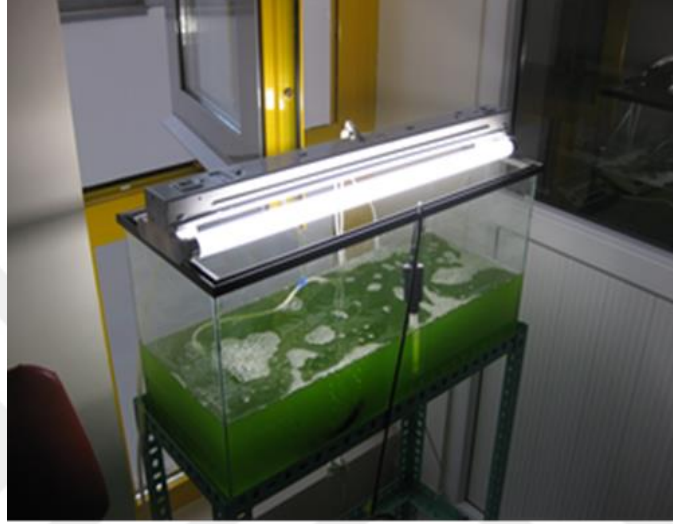
Mikroalg üretimi için kullanılacak ikincil arıtım deşarj suyu, arıtma tesisinden çalışmanın gerçekleştirildiği Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'ne vidanjör ile taşınmış ve 5 m³ kapasiteli tankta güneş görmeyecek şekilde üstü kapatılarak muhafaza edilmiştir. Atıksuya herhangi bir makro ya da mikro nütrient ilavesi yapılmamış ve atıksuyun seyreltme, otoklavlama, ultraviyole ya da filtrasyon gibi ön arıtım işlemlerinden geçirilmeden direkt olarak kullanılması hedeflenmiştir. Evsel atıksu tesisi ikincil arıtım deşarj suyuna ait su kalitesi parametresi değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan ikincil arıtım deşarj suyunun karakterizasyonu.

Parametre	İkinci Arıtım Deşarj Suyu
pH	7,42
Çözünmüş Oksijen (ÇO) (mg/L)	8,39
Alkalinite (mg/L CaCO ₃)	110±3,0
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) (mg/L)	34,1±4,7
Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOİ ₅) (mg/L)	6,0±2,5
Amonyak Azotu (NH ₃ -N) (mg/L)	0,24±0,03
Nitrat Azotu (NO ₃ ⁻ -N) (mg/L)	15±2,3
Fosfat Fosforu (PO ₄) ⁻³ -P) (mg/L)	1,9±1,4
Toplam Azot (TN) (mg/L)	17±1,2
Toplam Karbon (TC) (mg/L)	50,5±1,0
İnorganik Karbon (IC) (mg/L)	37,8±1,2
Toplam Organik Karbon (TOC) (mg/L)	12,7±0,2

Atıksuda karışık mikroalg biyokütle üretimine yönelik çalışmanın ilk aşamasında, çeşitli doğal su ortamlarından toplanan mikroalglerin, laboratuvar şartlarında atıksu ortamına aklimasyonlarının sağlanması hedeflenmiştir. Karışık mikroalg kültürünün atıksu ortamına alıştırılması, 24 ± 2 °C ortam sıcaklığında kesikli olarak çalıştırılan 20 L'lik cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Mikroalglerin büyümesi için gerekli nitrat (NO₃⁻), fosfat (PO₄⁻³) ve iz elementler atıksudan, fotosentez için gerekli yapay ışık kaynağı ise floresan lambalar (85 W Philips Master TL-D-90 Graphica and 18 W Osram Lumiux de Luxe) kullanılarak sağlanmıştır. Yapay ışık kaynağının yoğunluğu 150 µmol foton/m²·sn sürekli aydınlatma olacak şekilde, Fotosentetik Olarak Aktif Radyasyon (FAR) ölçüm cihazı (Licor LI193 SA) ile ölçülmüştür. Sistemin pH değerini 6,5 – 7,0 arasında tutmak ve mikroalglerin büyümesi için gereken inorganik karbon kaynağını sağlamak amacıyla, reaktörlere cam difüzörler yardımıyla sürekli olarak saf CO₂ ilavesi yapılmıştır. Difüzörlerden sağlanan CO₂ akışı, otomatik kontrol sistemi (WTW pH 296) ile ayarlanarak

sistemin pH değerinin sabit tutulması sağlanmıştır. Mikroalglerin büyüme ortamı olan atıksuya aklimasyonunun gerçekleştirildiği cam reaktörlerden birinin fotoğrafı Şekil 3.1’de görülmektedir. Belirlenen büyütme koşulları altında 6 aylık aklimasyon sonrası karışık mikroalg kültürü, içerdiği mikroalg türlerinin belirlenmesi amacıyla ışık mikroskobu (ACCU-Scope 3025 Fluorescence Microscope) altında 100 kat büyütme ile görüntülenmiştir.



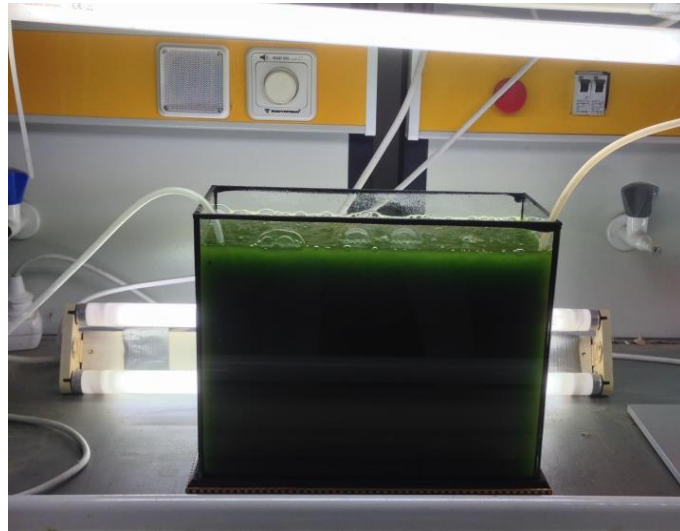
Şekil 3.1: Karışık kültürün atıksuya aklimasyonunun gerçekleştirildiği cam reaktör.

Atıksuda altı aylık aklimasyon sürecinin ardından, elde edilen stok mikroalg çözeltisinden 100 mL alınarak, biyokütle üretimi için %100 atıksu içeren 20 L’lik cam reaktörlere ekim yapılmıştır. Laboratuvar Şartlarında biyolojik olarak arıtılmış evsel atıksu ile ortam koşulları (ışık, CO₂, sıcaklık, azot ve fosfor içeriği) sabit tutularak kesikli modda çalıştırılan reaktörlere, günlük olarak buharlaşma nedeniyle kaybedilen su miktarı kadar (500 mL) atıksu ilavesi yapılmıştır. Reaktörlerdeki biyokütle konsantrasyonunu takip etmek için, günlük olarak reaktörlerden numune alınarak, Standart Metotlar 2540-D bölümünde belirtilen Askıda Katı Madde (AKM) analizi yapılmıştır [APHA, 1995].

3.2. Biyokütlenin Konsantre Edilmesi ve Hasatlanması

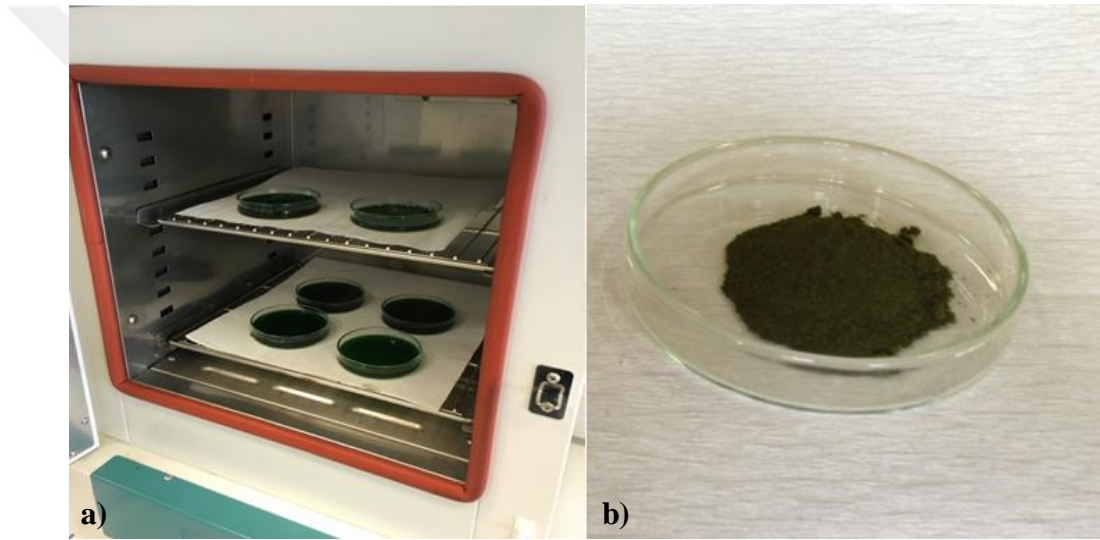
Reaktör içindeki biyokütlenin konsantre edilmesi ve mikroalglerin besin kaynağını oluşturan atıksu ortamının yenilenmesi amacıyla batık membran filtrasyonu kullanılmıştır. Bu metot, başka bir doktora tezinin konusu olup membran filtrasyonu çalışmaları bu tez çalışmasında detaylandırılmamış (membran kirlenmesi gibi), filtrasyon işlemi sadece reaktörlerin konsantre edilmesi amacıyla belirli aralıklarla kullanılmıştır.

Batık membran filtrasyonu çalışmalarında gözenek boyutu 1,2 µm olan hollow fiber Polietersülfon (PES) mikrofiltrasyon membranları kullanılmıştır. Batık membran modülü reaktörlerin içine yerleştirilmiş ve peristaltik pompa yardımıyla üç günde bir 15 L süzüntü reaktörlerden çekilmiştir. Batık membran filtrasyonu sayesinde mikroalgler tarafından tüketilmiş besin ortamı reaktörlerden uzaklaştırılmış ve belirli aralıklarla membran geri yıkaması yapılarak membran üzerinde biriken biyokütlenin reaktör içerisinde kalması sağlanmıştır. Filtrasyon işleminin ardından reaktörlerden çekilen süzüntü miktarı kadar taze atıksu ile reaktörlere besleme yapılmıştır. Bu sayede mikroalglerin besin ortamının yenilenmesi de sağlanarak, biyokütle konsantrasyonunun artırılması hedeflenmiştir. Bu yöntem ile reaktör içerisindeki biyokütle konsantrasyonu zamanla yaklaşık 3000 mg/L'ye kadar çıkartılmıştır. Batık membran filtrasyonu kullanılarak yoğun biyokütlenin elde edildiği reaktörlerden birinin fotoğrafı Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2: Batık membran filtrasyonu sonrası elde edilen yoğun kültür.

Reaktörlerde batık membran filtrasyonu ile elde edilen yoğun mikroalg süspansiyonu, belirli zamanlarda reaktörden alınmış, 6000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek biyokütlenin hasatlanması sağlanmıştır. Santrifüj edilen mikroalg çamuru cam petrilere koyularak etüvde (Model ON-01E, Jeio Tech, Korea) 65°C'de 24 saat süre ile kurutulmuştur. Kurutulan biyoküteller desikatörde sabit tartıma gelene kadar bekletilmiş ve daha sonra havanda dövülerek toz haline (mesh no: 40) getirilmiştir (Şekil 3.3). Elde edilen kuru mikroalg biyokütlesi tez çalışması kapsamında lipit ekstraksiyonu (lipit ve yağ asidi içeriğinin belirlenmesi) ve biyodizel üretimi (transesterifikasyon) çalışmalarında kullanılmak üzere -18°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3: Mikroalg biyokütlesi. a) Etüvde kurutulan, b) toz haline getirilen.

3.3. Mikroalglerden Lipitin Ekstraksiyonu Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında evsel atıksu tesisi ikincil arıtım çıkış suyu kullanılarak yetiştirilen mikrolaglerdeki lipitin ekstraksiyonunda, kloroform/metanol ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) kullanımını içeren ve gravimetrik tanımlamaya dayanan Bligh and Dyer metodundan yararlanılmıştır. Bu metot ile %80 sıvı içeriğine sahip biyolojik materyallerden, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{su}$ (1:1:0,5 mL/mL) içeren ekstraksiyon çözeltisi kullanılarak hücresel parçalama ve lipit ekstraksiyonu sağlanmaktadır. Literatürde mikroalglerin lipit içeriğinin belirlenmesinde laboratuvar ölçekli çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmasına rağmen, lipit ekstraksiyonunu etkileyen değişkenler tam

olarak belirlenememiştir. Bu nedenle bu çalışmada, tekrarlanabilir bir lipit ekstraksiyon yönteminin belirlenebilmesi amacıyla, ekstraksiyon denemelerinde farklı değişkenlerin (biyokütle miktarı, çözücü oranı, hücre parçalama metotları gibi) etkisi incelenmiştir.

Mikroalg biyokütlesinden lipit ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği denemelerde, Bligh and Dyer metodu farklı biyokütle miktarları (100 mg, 50 mg ve 25 mg), farklı biyokütle nem içerikleri (ıslak ya da kuru), farklı çözücü miktarları (12,5 mL ve 25 mL) ve farklı hücre parçalama metotları (mikrodalga ve ultrases) için uygulanmıştır. Bu sayede biyokütlerdeki lipitin ekstrakte edilmesinde tekrarlanabilirliği yüksek bir ekstraksiyon yönteminin oluşturulması hedeflenmiştir. Lipit analizi çalışmaları için ilk safhada atıksu ortamında çoğaltılan ve ikinci safhada sentetik kültür ortamında (BG 11 besi ortamı) yetiştirilen [Keriş-Şen et al., 2014] karışık mikroalg biyokütlesi kullanılmıştır.

Kurutulan mikroalg biyokütlesi üzerinde lipit ekstraksiyonu için yapılan denemelerde uygulanan yöntemler aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

- Biyokütle üzerine çözücü oranı $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{su}$ (1:1:0,5, mL/mL) olacak şekilde ekstraksiyon çözeltisi bir kaç adımda eklenmiş ve biyokütle – çözücü karışımı 1 dakika süreyle vortex ile karıştırılmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarının bir kısmında kuru, bir kısmında ise ıslak biyoküteller kullanılmıştır.
- Islak biyokütle (%80 nem içeriğine sahip) ile yapılan deneylerde ayrıca, ekstraksiyon çözeltisi ilavesinden önce, biyokütleye hücresel parçalanmayı arttırmak amacıyla mikrodalga ve ultrases yöntemleri uygulanmıştır. Ultrases yönteminde ıslak biyokütle ultrasese maruz bırakıldıktan sonra çözücü ilaveleri yapılmıştır. Mikrodalga yönteminde ise ıslak biyokütle mikrodalga uygulamasına maruz bırakılıp, etüvde kurutulduktan sonra çözücü ilaveleri yapılmıştır.
- Deneysel çalışmalarda numunelerin bazılarında çözücü ilavelerinden sonra 75°C 'de su banyosunda 5 dk süreyle ısıtma işlemi uygulanmış, bazılarında ise uygulanmamıştır.
- Lipit ekstraksiyonu sonrası faz ayırımının sağlanması için biyokütle – çözücü karışımı 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj ardından alttaki faz (lipit + kloroform karışımı) cam pastör pipeti ile dikkatlice çekilerek, önceden darası alınmış numune şişesine aktarılmıştır.

- Çözücüsü uçurulan numunenin son tartımı alındıktan sonra, ilk ve son tartım arasındaki fark, kuru ağırlık bazında % lipit içeriği olarak hesaplanmıştır.

Bu prosedüre göre mikroalg biyokütlesinden lipitin ekstraksiyonu için yapılan denemeler Tablo 3.2’de özetlenmiştir. Deneyler sonrasında elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.1.1. de verilmiştir.

Tablo 3.2: Mikroalg biyokütlesinden lipit ekstraksiyonu çalışmaları.

Deney no	Biyokütle (mg)	Hücresel parçalama Yöntemi	CHCl ₃ /MeOH/su (mL)	Isıtma (su banyosu ile)
1	100 (kuru)	-	12,5	-
2	100 (kuru)	-	25	-
3	100 (kuru)	-	25	75°C’de 5 dk.
4	50 (kuru)	-	25	75°C’de 5 dk.
5	25 (kuru)	-	25	75°C’de 5 dk.
6	25 (ıslak)	-	25	75°C’de 5 dk.
7	50 (ıslak)	Mikrodalga 100°C’de 600 W güçte 5 dk.	25	-
8	50 (ıslak)	Mikrodalga 100°C’de 600 W güçte 5 dk.	25	75°C’de 5 dk.
9	25 (ıslak)	Ultrases 10 kHz’de 5, 7,5 ve 10 dk.	25	75°C’de 5 dk.

3.4. Transesterifikasyon Uygulamaları

Biyodizel üretimi amacıyla transesterifikasyon yöntemlerinden ekstraksiyon-transesterifikasyon (iki aşamalı), direkt (in-situ) transterifikasyon (tek aşamalı) ve mikrodalga destekli direkt transesterifikasyon uygulamaları kullanılarak karışık mikroalg biyokütlesinin biyodizele dönüşüm potansiyeli ve YAME içeriğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Deneysel çalışmaların tamamı asit katalizör (H₂SO₄) ve metanol varlığında kuru mikroalg biyokütlesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Transesterifikasyon uygulamaları sonrası elde edilen YAME örneklerinin GC’de analizi için, numuneler n-heptanda (GC-grade, Merck) çözülmüş ve BD-WAX kolon kullanılarak Bölüm 3.5.5.2’de belirtilen analiz şartlarında YAME analizleri yapılmıştır.

3.4.1. Ekstraksiyon–Transesterifikasyon Deneyleri

Ekstraksiyon-transesterifikasyon uygulamalarında, biyokütleden Bligh and Dyer (1956) metodu modifiye edildikten sonra lipidlerin ekstrakte edilmesi ve ardından lipidlerin metanol ve sülfürik asit (H_2SO_4) varlığında biyodizel ürününe (yağ asidi metil esterlerine) dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla literatürde kullanılan iki metottan faydalanılarak, mikroalgal lipidler geleneksel ısıtma (su banyosu) yöntemi ile transesterifikasyona tabi tutulmuştur. Deneysel çalışmalarda BG-11 besin ortamında [Keriş-Şen et al., 2014] ve atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütleleri kurutularak kullanılmıştır.

- Deney no:1

Mikroalgal lipitin transesterifikasyonu Johnson ve Wen (2009) tarafından uygulanan metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Mikroalgal lipid üzerine sırayla 12 mL metanol, 3 mL derişik H_2SO_4 (metanol içindeki hacimsel oranı %20, mL/mL) ve 20 mL kloroform eklenmiştir. Reaksiyon çözeltilerinin ilavesinden sonra, karışım $90^\circ C$ ’deki su banyosunda karıştırılarak (500 rpm) 75 dakika boyunca ısıtılmıştır.

- Deney no:2

Abou-Shanab ve arkadaşları (2011)’in uyguladığı metot modifiye edilerek transesterifikasyon yürütülmüştür. Mikroalgal lipite 12 mL MeOH:CHCl₃ (2:1, mL/mL) karışımı, 6mL CHCl₃, 6 mL MeOH ve 1,8 mL H_2SO_4 (metanol içindeki hacimsel oranı %11, mL/mL) eklenmiştir. Karışım 5 dakika vortekslenmiş ve sonra $90^\circ C$ ’deki su banyosunda karıştırılarak (500 rpm) 75 dakika süreyle ısıtılmıştır.

Transesterifikasyon reaksiyonu sonrası reaksiyon karışımları oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ve numunelere 10 mL safsu eklenip 1 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Faz ayırımı için karışımlar 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj

edilmiş ve YAME içeren solvent tabakası (alt faz), tartımı önceden alınmış vial 0,22 µm'lik şırınga filtreden süzülerek toplanmıştır. Solvent uçurulduktan sonra biyodizel örneklerinin kütlesi gravimetrik olarak ölçülmüştür. Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1'de özetlenmiştir.

3.4.2. Direkt (in-situ) Transesterifikasyon Deneyleri

Transesterifikasyon çalışmalarının ikinci aşamasında literatürde son yıllarda mikroalgler üzerinde sıklıkla kullanıldığı görülen direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemi yoluyla biyodizel üretimi değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında in-situ transesterifikasyon prosesi, reaksiyon solventi olarak metanol ve katalizör olarak da sülfürik asit (H₂SO₄) kullanılarak, geleneksel ısıtma (su banyosu) yöntemi ile evsel atıksuda üretilen kuru mikroalg biyokütlesine uygulanmıştır. Eş zamanlı ekstraktif-transesterifikasyon prosesi olarak tanımlanan bu yöntemde, hücre içindeki lipitin ekstraksiyonunu arttırmak için kloroform ve hekzan co-solvent olarak reaksiyon karışımında kullanılmıştır. Aynı reaksiyon şartlarında farklı co-solventlerin YAME verimi üzerine etkisi reaksiyon süresinin fonksiyonu da göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

Deneylerde 100 mg kuru biyokütle örnekleri kullanılmıştır. 100 mg'lık kuru biyokütlelere 5 mL metanol (50:1, mL/g), 50 µL derişik H₂SO₄ (metanol içindeki oranı %1, mL/mL) ve 4 ml co-solvent (kloroform ya da hekzan) ilave edilmiş ve karışım 5 dakika vortekslenmiştir. Reaksiyon karışımı 65 °C'lik su banyosunda 500 rpm'de karıştırılarak ısıtılmıştır. Deneyler her iki co-solvent (kloroform ve hekzan) için ve farklı reaksiyon süreleri (2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 saat) kullanılarak üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrası karışım oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Karışıma daha sonra faz ayırımının sağlanması için 10 mL saf su ilave edilerek 1 dakika vortekslenmiş ve 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası yağ asidi metil esterlerini (YAME) içeren solvent tabakası (alt faz), 0,22 µm'lik şırınga filtreden süzülerek tartımı önceden alınmış bir vial 0,22 µm'lik şırınga filtreden süzülerek toplanmıştır. Solvent 40°C'de su banyosunda uçurulduktan ve numune sabit tartıma geldikten sonra, vialin ilk ve son tartımı arasındaki fark alınarak mikroalgal biyodizel ürününün (YAME) kütlesi gravimetrik olarak ölçülmüştür. Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.2 de özetlenmiştir.

3.4.3. Mikrodalga Destekli Direkt (in-situ) Transesterifikasyon Deneyleri

Tez çalışmasının üçüncü aşamasında mikroalgal biyokütleden yüksek verimde biyodizel üretimi için avantajlı bir metot olan mikrodalga destekli direkt (in-situ) transesterifikasyon metodu kullanılmıştır. Burada amaç transesterifikasyon reaksiyonu sırasında hücre parçalanmasını arttırmak ve hücredeki lipitin reaksiyon karışımına geçişini kolaylaştırmaktır. Böylece transesterifikasyon reaksiyonu kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve kısa sürede daha yüksek YAME verimleri elde edilebilmektedir. Mikroalglerden kısa reaksiyon sürelerinde yüksek biyodizel verimleri elde etmek için yürütülen deneyler co-solvent olarak sadece kloroform kullanılarak yürütülmüştür. Bir önceki bölümde aynı reaksiyon şartları altında düşük YAME dönüşümü sağlaması nedeniyle n-hekzanın etkisi bu bölümde değerlendirilmemiştir.

Mikrodalga (MD) destekli in-situ transesterifikasyon deneyleri metanol, kloroform ve asit katalizör (H_2SO_4) kullanılarak ve 400 Watt sabit MD gücünde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde fiber optik sıcaklık ve basınç sensörü bulunan ve işletme frekansı 2450 MHz olan mikrodalga (ETHOS 1600 Advanced Microwave Labstation, Milestone) sistemi kullanılmıştır. Şekil 3.4'te deneysel çalışmada kullanılan mikrodalga fırını ve deney düzeneğini gösteren fotoğraf verilmiştir. 200 mg sabit kuru biyokütle miktarı kullanılan deneylerde, farklı reaksiyon parametrelerinin (farklı metanol, asit katalizör ve kloroform hacimleri, farklı reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri) YAME verimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.



Şekil 3.4: Mikrodalga destekli in-situ transesterifikasyon deneylerinde kullanılan mikrodalga fırını ve deney düzeneği.

200 mg kuru mikroalg biyokütleleri 60 mL'lik teflon mikrodalga reaktörleri içine koyulmuş ve üzerlerine metanol, co-solvent (kloroform), asit katalizör karışımı ilave edilmiştir. Reaktörler sızdırmazlığı sağlayacak şekilde kapatılarak Şekil 3.4'te görüldüğü üzere mikrodalga fırınına yerleştirilmiştir. Reaksiyon için istenen sıcaklık değeri mikrodalga programına girildikten sonra ayarlanan reaksiyon sıcaklığına çıkarılana kadar (yaklaşık 1-2 dakika) numuneler 400 W mikrodalga gücünde ısıtılmıştır. Sıcaklık sabitlendikten sonra aynı mikrodalga gücünde numuneler belirlenen reaksiyon süresinde MD ışınlamasına tabi tutulmuştur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımları oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış, soğuduktan sonra teflon reaktörler açılmış ve karışımlar santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Karışımlara faz ayırımın sağlanması için 10 mL safsu ilave edilerek 1 dakika vortekslenmiş ve 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından YAME içeren kloroform fazı (alt faz) toplanarak 0,22 µm'lik şırınga filtreden süzülüp tartımı önceden alınmış bir vialde aktarılmıştır. Kloroform 40°C'lik su banyosunda uçurulduktan ve numune desikatörde sabit tartıma geldikten sonra, vialin ilk ve son tartımı arasındaki fark alınarak mikroalgal biyodizel ürününün (YAME) kütlesi gravimetrik olarak ölçülmüştür.

MD destekli in-situ transesterifikasyon deneylerinde 200 mg sabit kuru mikroalg biyokütlesi için sabit 10 dakika süre ve 60°C sıcaklıkta 2, 3, 4, 5 mL metanol miktarları, 10, 20, 30, 40 µL H₂SO₄ miktarları, 2, 3, 4, 5 mL kloroform miktarları kullanılmıştır. Ayrıca deneylerde 10, 15, 20, 25 dakika reaksiyon süreleri ve 60, 80, 100, 120°C reaksiyon sıcaklıkları da biyodizel üretimi için en iyi şartların belirlenmesi için uygulanmıştır. Tüm deneyler tekrarlanabilirliği sağlamak amacıyla en az üç yada dört tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise Bölüm 4.3.3'te verilmiştir.

3.5. Biyokütle Analizleri

3.5.1. Protein Analizi

Mikroalg biyokütlesinin protein içeriğinin belirlenmesinde hücrelerin sodyum hidroksit ile parçalanmasına dayanan Lowry metodu [Lowry et al., 1951] kullanılmıştır. Öncelikle analiz için gerekli A reaktifi (0,1 N NaOH'da %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi), B reaktifi (%0,5'lik bakır sülfat çözeltisi), C reaktifi (%1'lik NaK tartarat çözeltisi) hazırlanmış ve bu üç çözelti (A:B:C) 100:1:1 oranında karıştırılarak birleştirilmiş reaktif oluşturulmuştur. 1 mL mikroalg solüsyonu cam tüplere alınmış ve üzerlerine 0,7 mL birleştirilmiş reaktif eklenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Bu sırada 5 mL Folin ciocalteus–fenol ayıracına 6 mL saf su eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra numunelere 0,1 mL hazırlanan folin ayıracından eklenip iyice karıştırılmış ve numuneler 30 dakika daha karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda cam küvetlere alınan numunelere spektrofotometrede (Thermo Scientific, Genesys 10S UV–VIS) 660 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Numuneler safsu ile yukarıdaki yönteme göre hazırlanan şahit numuneye karşı okutulmuştur. Protein analizinde kalibrasyon standardı olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

3.5.2. Karbonhidrat Analizi

Mikroalg biyokütlesinin karbonhidrat içeriğinin belirlenmesinde hücrelerin sülfürik asit ile parçalanmasına dayanan Dubois metodu [Dubois et al., 1956] kullanılmıştır. Mikroalg solüsyonundan 1 mL alınarak cam tüplere koyulmuş, üzerine 25 µL %80'lik fenol çözeltisi ve 2,5 mL derişik sülfürik asit eklenmiştir. Cam tüplerin kapağı kapatılıp iyice çalkalandıktan sonra, numuneler soğumaları için 20-30 dakika süre ile su banyosunda bekletilmiştir. Şahit numune de saf su kullanılarak aynı şekilde hazırlanmıştır. Bu sürenin sonunda cam küvetlere alınan numuneler spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda şahit numuneye karşı okunmuştur. Karbonhidrat analizinde kalibrasyon standardı olarak glikoz kullanılmıştır.

3.5.3. Klorofil-a Analizi

Mikroalg biyokütlesinin klorofil-a içeriğinin belirlenmesi için de spektrofotomerik yöntem kullanılmıştır [Becker, 1994]. Mikroalg solüsyonundan 10 mL alınarak cam tüpe koyulmuş ve 3000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen mikroalg pelletine 3 mL %90'lık metanol çözeltisi ilave edilip 5 dakika süreyle sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra bu karışıma 2 mL daha metanol çözeltisi ilave edilip çalkalanmış ve 3000 rpm'de 1 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki berrak kısım alınarak, spektrofotometrede 665 nm ve 650 nm dalga boylarında okuma yapılmıştır. Elde edilen değerler aşağıdaki eşitlikte yerine koyularak mikroalg biyokütlesinin klorofil-a içeriği mg/L cinsinden hesaplanmıştır [Becker, 1994].

$$C_{chl-a} = 16,5 \times OD_{665} - 8,3 \times OD_{660} \quad (3.1)$$

- C_{chl-a} : Klorofil-a konsantrasyonu (mg/L)
- OD_{665} : Optik yoğunluk (665 nm)
- OD_{660} : Optik yoğunluk (660 nm)

3.5.4. Isıl Değeri ve Kl İçeriği Analizi

Karışık mikroalg biyokütlesinin kütlesel ısıl değeri (kalorifik değer) ASTM D 2015 Standart Metoduna göre bomb kalorimetre (IKA C 200) cihazı kullanılarak analiz edilmiş ve MJ/kg cinsinden ifade edilmiştir. Ayrıca bomb kalorimetrede yakma sonrası biyokütle kl içeriği de ağırlık cinsinden % olarak hesaplanmıştır.

3.5.5. Nötral Lipit ve Ester İçeriği Analizleri

3.5.5.1. GC ile Nötral Lipit Analizi

Mikroalgal biyokütlenin nötral lipit miktarının (toplam gliserit içeriğinin) belirlenmesi amacıyla GC kullanılarak lipit analizi çalışmaları yrtlmştir.

Lipit sınıfı bakımından trigliseritler polar lipitlerden daha düşük doymamışlık derecesine sahiptirler ve biyodizele dönüşüm için daha uygundur. Yapılan literatür araştırması sonucu toplam lipit (nötral ve polar lipitler) rneklerinin TG içeriklerinin belirlenmesinde, gliseritlerin esterleştirilip metil esterlerine dönüştürüldükten sonra yağ asidi metil esteri (YAME) olarak analiz edildiği görülmektedir. GC analizi genel olarak, lipit örneklerinin bir takım türevlendirme işlemlerinin ardından (sırasıyla esterleştirme reaksiyonu ve ardından yapılan silanlama işlemi sonrasında) numunede reaksiyon sonrası eser miktarda kalan mono-, di- ve trigliseritlerin belirlenmesinde kullanılan bir metot olarak tanımlanmaktadır [Azcan ve Yılmaz, 2013]. Ayrıca analiz öncesi silanlama (trimethylsilylation) ile trevlendirilmeleri gereken uçucu olmayan ailgliserollerin (mono- di- trigliseritler) direkt analizi için elverişli bir metot olmadığı belirtilmektedir [Holcapek et al., 1999], [Knothe, 2001]. Bununla birlikte literatürde yer alan bir çalışmada gliserit analizi için mikroalg lipitlerin silanlama (20 μ L N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) ilavesi ve ardından 70°C’de 10 dakika ısıtma işlemi uygulaması) işlemi ardından GC’de analiz edildiği görülmektedir [Iqbal and Theegala, 2013]. Bu tez çalışmasında da ham lipit rneklerinin GC’de analiz edilmesi amacıyla silanlama için gereken MSTFA miktarı ve silanlama süresi arttırılmıştır. Bu sayede numunenin optimum hassasiyeti için gerekli termal ve katalitik stabilitesi ve uçuculuğu arttırılarak [Azcan ve Yılmaz, 2013] GC’de kolaylıkla analiz edilmesi sağlanmıştır.

GC ile nötral lipit analizi için öncelikle mikroalgal biyokütleden modifiye Bligh and Dyer metodu ile lipit ekstrakte edilmiştir. Sonrasında mikroalgal lipitin nötral lipit (mono-di-trigliseritler) içeriği EN14105 standart metodu [EN14105, 2003] modifiye edilerek GC’de analiz edilmiştir. Nötral lipit analizi çalışmaları evsel atıksu ortamında ve BG-11 besin ortamında yetiştirilen ve durgun (stationary) büyüme fazındaki karışık mikroalg kültürleri için gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik analiz için Agilent 6890N marka FID detektörlü gaz kromatografisi, uzunluğu 30 m, iç çapı 0,53 mm ve film kalınlığı 0,1 µm olan DB–5HT kapiler kolon (J.V. Scientific) ve FID detektörü için hidrojen jeneratörü (Shimadzu OPGU–2200S) kullanılmıştır. Fırın için seçilen başlangıç sıcaklığı 50°C (1 dakika) ve sonrasında 15°C/dk’da 180°C’ye, 7 °C/dk’da 230°C’ye ve 10°C/dk’da 370 °C’ye artacak şekilde programlanmış, bu sıcaklıkta 10 dakika tutulmuştur. Maksimum fırın sıcaklığı 400°C olarak belirlenmiştir. Toplam analiz süresi 40 dk’dır. FID detektörün sıcaklığı 380 °C, detektör gazı 350 mL/dk hava ve 35mL/dk ile H₂ gazıdır. İnlet modu splitless ve sıcaklığı ise 350°C’dir. Kolon akışı 2,6 mL/dk (80 kPa’lık sabit basınç modunda), kolon için taşıyıcı gaz helyum ve süpürme (make up) gazı ise azottur.

GC analizi için kullanılan analitik standartlardan Internal Standard#1 (ASTM D6584 1, 2, 4 –Butanetriol Solution, 1 mg/mL), Internal Standard#2 (ASTM D6584 Tricaprin Solution, 8 mg/mL) ve lipit standardı olarak triolein (5 mg/mL), monoolein (10 mg/mL) ve 1, 3–diolein (5 mg/mL) Sigma Aldrich’den, silanlama için kullanılan türevlendirme reaktifi N–Methyl–N–trimethylsilyl–trifluoroacetamide (MSTFA) ve n–heptan (GC grade) Merck’ten temin edilmiştir.

Mikroalgal biyokütleden ekstrakte edilen lipitin GC’de analizi için öncelikle mono–, di– ve triolein standartları, Internal Standard#1 (IS-1), Internal Standard#2 (IS-2) ve MSTFA kullanılarak gliserit kalibrasyonu oluşturulmuştur. Kalibrasyon için kullanılan standartların miktarları ve GC analizi sonrası oluşturulan kalibrasyon grafiği (trioleine ait olan) Ekler Bölümündeki EK B’de gösterilmektedir.

Mikroalgal lipit örneklerinin analizi için; 4 mg lipit örneğine 40 µL IS-1, 50 µL IS-2 ilave edilmiştir. Silanlama reaktifi olarak standart metotta 40 µL olarak önerilmiş olan MSTFA miktarı 100 µL’ye arttırılarak numuneye ilave edilmiştir. MSTFA ilavesinden sonra hazırlanan karışım 2 dakika vorteksle karıştırılmış ve numunelerin silanlanması için 30 dakika (EN14105 standart metodunda seçilen silanlama süresi 20 dakika) beklenmiştir. Silanlama işlemi numune içindeki

gliseritlerin buharlaşma sıcaklığını düşürerek uçuculuğunun artırılması ve GC’de kolaylıkla okunabilmesi için yapılması gereken bir ön işlemdir. Silanlama işleminin ardından hazırlanan lipit numunerine 1 mL heptan eklenerek GC’de analiz edilmiştir. Ayrıca metodun doğruluğunu kontrol etmek için soya yağı standardı (Sigma–USA) da GC’de analiz edilmiştir.

3.5.5.2. GC ile Yağ Asidi Metil Esteri Analizi

Ekstraksiyon-transesterifikasyon, direkt (in-situ) transesterifikasyon ve mikrodalga destekli transesterifikasyon metotları kullanılarak esterleştirilen mikroalgal biyokütlelerinin yağ asidi metil esterleri (YAME) içeriği ve biyodizel veriminin belirlenmesi amacıyla GC’de analizleri gerçekleştirilmiştir. Transesterifikasyon uygulamaları sonrası elde edilen YAME örneklerinin kromatografik analizi için numuneler n-heptanda (GC-grade, Merck) çözülmüş ve BD-WAX kolon (polyethylene glycol, J.V. Scientific) kullanılarak aşağıda belirtilen analiz şartlarında YAME analizleri yapılmıştır.

• Transesterifikasyon Sonrası GC Analizi İçin Kullanılan Metot

Kromatografik analiz için Agilent 6890 N marka FID detektörlü gaz kromatografisi, uzunluğu 30 m, iç çapı 0,53 mm ve film kalınlığı 0,5 µm olan DB–WAX kolon (polyethylene glycol, J.&V. Scientific) ve FID detektörü için hidrojen jeneratörü (Shimadzu OPGU–2200S) kullanılmıştır. Fırın için seçilen başlangıç sıcaklığı 100 °C (2 dakika) ve sonrasında 30°C/dk’da 210°C’ye artacak şekilde programlanmış, bu sıcaklıkta 15 dakika tutulmuştur. Maksimum fırın sıcaklığı sıcaklık 240°C olarak belirlenmiştir. Toplam analiz süresi 21 dk’dır. FID detektörün sıcaklığı 250°C, detektör gazı 350 mL/dk hava ve 35 mL/dk ile hidrojen gazıdır. İnlet modu splitless ve sıcaklığı ise 250°C’dir. Kolon akışı ise 2 mL/dk (constant flow), taşıyıcı gaz helyum ve süpürme (make up) gazı ise azottur.

Öncelikle karışım YAME standardı (Sigma–GC grade) n–heptanda (Merck–GC grade) çözülmüş, stok YAME çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltiden seri seyreltmeler yapılarak kalibrasyon standartları hazırlanmıştır. Standartlar düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru GC’de okunup her bir yağ asidi metil esterini için kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Bunlardan

oleik asit metil esterine ait olan kalibrasyon grafiği Ekler bölümündeki EK B'de verilmiştir. Kalibrasyonun ardından esterleştirilen mikroalg lipidlerine ait numuneler n-heptanda çözülmüş ve GC'de analiz edilerek bireysel yağ asidi metil ester kompozisyonu ve miktarları belirlenmiştir. Karışık mikroalg biyokütlesinin biyodizel verimi ve YAME içeriği ile ilgili sonuçlar Bölüm 4.3'te verilmiştir.

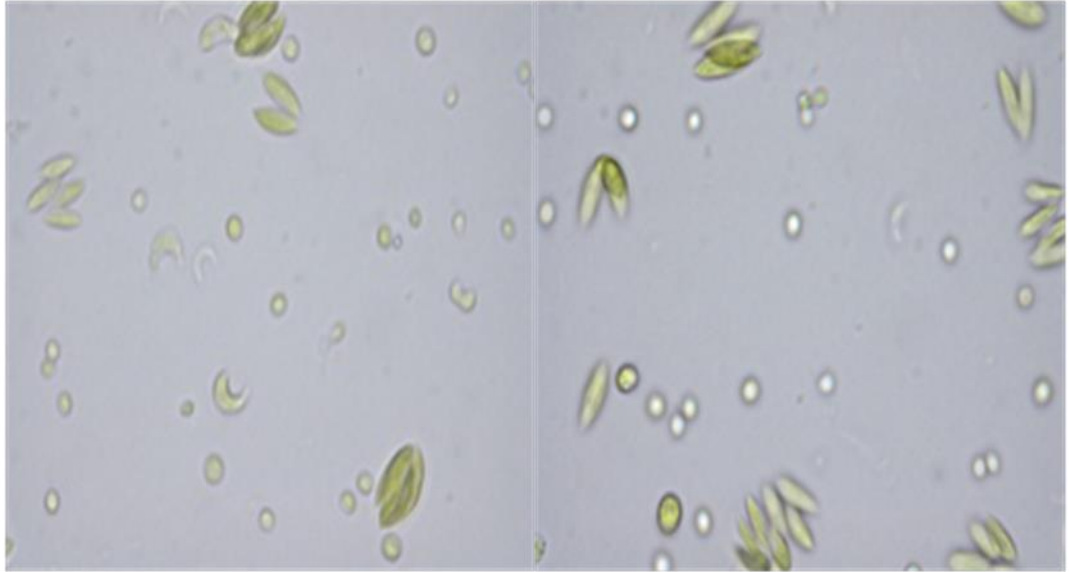


4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Karışık Mikroalg Biyokütlesi Üretimi

Tez çalışması kapsamında mikroalglerin büyüme ortamı olarak kullanılan Ömerli Evsel Atıksu Arıtma Tesisi'ne ait deşarj suyu kalitesi parametreleri, deneyler öncesi ve deneyler sırasında sistemin stabilitesini takip etmek amacıyla belirli aralıklarla analiz edilmiştir. Evsel atıksu ortamında sabit büyüme koşulları (ışık yoğunluğu, sıcaklık, pH) altında, 20 L'lik cam reaktörlerde üretilen karışık mikroalg kültürü konsantrasyonunun yaklaşık 500 mg/L kadar çıkartılabildiği görülmüştür.

Evsel atıksuda üretilen karışık mikroalg kültürünün içerdiği türleri belirlemek amacıyla yapılan floresan mikroskobu görüntülemesi sonucunda, karışık kültürün temel olarak *Scenedesmus rubescens*, *S. quadricauda*, *S. subspicatus*, *Selanastrum capricornutum*, *Glaucocystis nostochinearum*, *Oocystis apiculata*, *O. lacustris*, *O. borgei* ve *Coleastrum astroideum* türlerini içerdiği, bununla birlikte baskın türün *Scenedesmus sp.* olduğu belirlenmiştir. Floresan mikroskobunda 100 kat büyütme kullanılarak yapılan mikroskop görüntülemesine ait fotoğraf Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1: Atıksuda karışık kültürü oluşturan türlerin mikroskop görüntüsü (x100 büyütme).

4.2. Mikroalg Biyokütlesinin Hücresel Bileşenleri

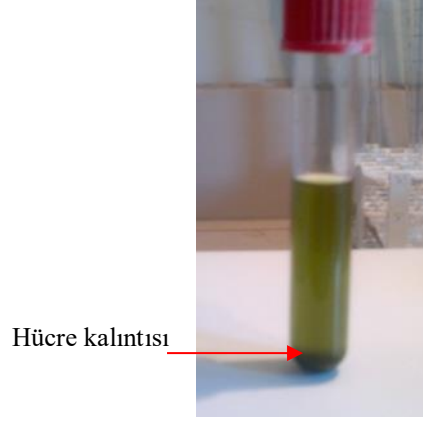
4.2.1. Lipit İçeriği

Mikroalg biyokütlesinin toplam (nötral ve polar lipitler) lipit içeriğinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalarda, literatürde sıklıkla kullanıldığı görülen ve gravimetrik tanımlamaya dayanan Bligh and Dyer metodu değişik modifikasyonlarda BG-11 besin ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesine uygulanmış ve güvenilir bir ekstraksiyon metodunun oluşturulmasına çalışılmıştır. Ayrıca ekstrakte edilen lipit numunelerinin biyodizele dönüşüm açısından önemli kısmını oluşturan nötral lipitlerin (toplam gliseritler) içeriğini belirlemek amacıyla GC analizi yöntemi kullanılmıştır. Yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

4.2.1.1. Toplam Lipit İçeriği

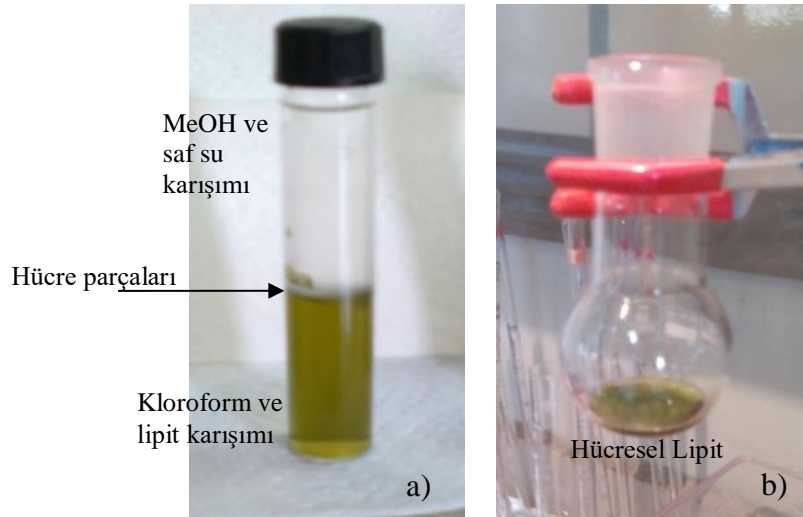
Mikroalglerden lipit ekstraksiyonunda kloroform/metanol/su karışımını içeren Bligh and Dyer metodu kullanılmış ve biyokütleden etkili bir ekstraksiyon sağlanması için yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

100 mg kuru biyokütle için 12,5 mL ve 25 mL çözücü ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{su}$ karışımı) miktarları kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda (deney no:1-2), iki çözücü miktarı için de lipit içeriği kuru biyokütle ağırlığı bazında %15 olarak ölçülmüştür. Ayrıca özellikle 12,5 mL çözücü kullanıldığında, bir kısım biyokütlenin çözeltilinin dibine çöktüğü görülmüştür. Kloroform+lipit fazı ve metanol+su fazı arasında olması beklenen hücrelerin dibe çökmesi hücresel parçalanmanın tam olarak sağlanamadığını göstermiştir. Şekil 4.2'de ekstraksiyon çözeltilisinin hücre içine geçişinin sağlanamaması nedeniyle dibe çökelmiş durumdaki hücrelerin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 4.2: Ekstraksiyon sonrası kloroform fazında çöken hücreler.

Ekstraksiyon çözeltisinin hücre içine geçerek lipiti ekstrakte edebilmesi için çözücü ilavesinin ardından 5 dakika süreyle 75°C'lik su banyosunda ısıtma işleminin uygulandığı deneyler yürütülmüştür. Biyokütle miktarının 100 mg, 50 mg ve 25 mg seçildiği ve çözücü miktarının da 25 mL kullanıldığı deneylerde (deney no:3-4-5), ısıtma sonrası gerçekleştirilen ekstraksiyonda, lipit içerikleri 100 mg, 50 mg ve 25 mg kuru biyokütleler için sırasıyla %24, %28 ve %26 olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak hem çözücü miktarının artırılması, hem de ısıtma uygulamasının gerçekleştirilmesi ile lipit ekstraksiyonu veriminin artması sağlanmıştır. Şekil 4.3'te Bligh and Dyer metodu ile 25 mg biyokütleyle 25 mL çözücü ilavesi ve çözücü eklemeleri sonrası ısıtmanın yapılmasının ardından elde edilen numunedeki faz ayrımının ve alttaki fazda (kloroform+lipit) kloroform uçurulduktan sonra kalan hücresel lipitin fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.3: Bligh and Dyer sonrası ekstrakte edilen lipit a) biyokütleye çözücü eklemeleri sonrası ısıtmanın yapılması sonucu elde edilen numunedeki faz ayrımı, b) kloroform uçurulduktan sonra elde edilen lipit.

Lipit ekstraksiyonu çalışmalarında kuru biyokütle kullanımı dışında ıslak biyokütle kullanarak da lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. %80 su içeriğine sahip 25 mg ıslak biyokütle ve 25 mL çözücü kullanılarak yürütülen deneyde (deney no:6) lipit içeriği %20,8 olarak bulunmuştur. Islak biyokütle kullanıldığında ekstraksiyon veriminin düşük çıkmasının nedeni, biyokütledeki suyun çözücüler ve hücreler arasında bir bariyer oluşturarak hücre içine çözücünün geçişini engellemesi şeklinde açıklanabilmektedir [Mercer and Armenta, 2011]. Sonuç olarak ıslak biyokütlenin kullanılması lipit ekstraksiyonu verimini düşürmektedir. Literatürde de lipit ekstraksiyonda kullanılacak biyokütlenin nem içeriğinin ekstraksiyon verimi açısından önemli olduğu ve özellikle kuru biyokütle kullanıldığında daha sağlıklı sonuçlar alındığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir [Lewis et al., 2000], [Zhu et al., 2002], [Cheng et al., 2010], [Pruvost et al., 2011].

Mikroalg biyokütlesinde bulunan lipitlerin hücreden ekstraksiyonunu kolaylaştırmak amacıyla, ekstraksiyon öncesinde kullanılan mikrodalga yöntemi hücre parçalama metodu olarak biyokütleye uygulanmıştır. Mikrodalga uygulamasının ardından gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda lipit içeriği, ısıtma işleminin yapılmadığı deneme (deney no:7) için %24, ısıtmanın yapıldığı (5 dakika 75°C'lik su banyosunda bekletme) deneme (deney no:8) için %36 olarak bulunmuştur. Yapılan deneyler sonucu mikrodalga uygulamasının hücresel parçalamayı kolaylaştırdığı sonucuna varılmıştır.

Bir diğere hücre parçalamaya metodu olan ultrasesin uygulandığı deneylerde (deney no:9), sabit ultrases yoğunluğu ve farklı süreler kullanılarak lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ultrasese maruz kalma süresi arttırıldıkça ölçülen lipit değerlerinin de arttığı (5 dakika için %24,4, 7,5 dakika için %26,8 ve 10 dakika için %38 lipit içeriği) gözlenmiştir. Yapılan deneyler sonucu ultrasesin de mikrodalga gibi hücrenel parçalamayı desteklediği sonucuna varılmıştır. Fakat lipit olarak ölçülen değerin yüksek çıkmasının nedeni, lipidin yanı sıra karbonhidrat, protein, klorofil ve karotenoid gibi biyokimyasal bileşenlerin de çözücüye geçmesi olarak ifade edilebilmektedir [Suali and Sarbatly, 2012].

Sonuç olarak karışık mikroalg biyokütlesi ile yapılan lipit ekstraksiyonu çalışmaları değerlendirildiğinde; uygun biyokütle - çözücü miktarları kullanılarak ve her çözücü ilavesinden sonra örnekler sıcak su banyosunda (75°C'de 5 dakika) bekletilerek, mikroalg hücrelerinden lipit ekstraksiyonunun sağlanabildiği görülmüştür. Lipit ekstraksiyonu çalışmalarının amacı, lipitlerin hücreden tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem ile etkili bir şekilde çıkartılması ve elde edilen lipitin karakterize edilerek biyodizele dönüşüm için uygun olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu nedenle ultrases ve mikrodalga gibi ilave hücre parçalamaya metotlarına enerji verimliliği açısından gerek duyulmadığı düşünölmektedir. Çalışma kapsamında lipit ölçümü için belirlenmiş olan yöntem şu şekildedir:

25 mg kuru biyokütle 50 mL'lik falkon tüpüne alınmış ve üzerine CHCl₃/MeOH/su (1:1:0,5 mL/mL) çözücüleri, toplam hacim 25 mL olacak şekilde birkaç adımda eklenmiştir. Her çözücü ilavesinden sonra biyokütle-çözücü karışımı 1 dakika hızlıca karıştırılmış (vortex) ve ardından 75°C'lik su banyosunda 5 dk süre ile bekletilmiştir. Biyokütle-çözücü karışımı 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek faz ayırımı sağlanmıştır. Alttaki faz (kloroform-lipit karışımı) pastör pipeti ile dikkatlice çekilerek önceden darası alınan numune şişesine koyulmuştur. 60°C'de çözücüsü uçurulan numunenin son tartımı alındıktan sonra, ilk ve son tartım arasındaki fark, kuru ağırlık bazında % lipit içeriği olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda modifiye edilmiş Bligh and Dyer metodu evsel atıksu ortamında yetiştirilen durgun fazdaki karışık mikroalg biyokütlesine uygulanmıştır. 25 mg kuru biyokütleye 25 mL çözücü ilavesinin ardından ısıtma uygulanarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda, biyokütlenin lipit içeriği %26,2±0,6 (kuru biyokütle ağırlığı bazında) olarak bulunmuştur. Ayrıca toplam lipit ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan ve BG-11 besin ortamında henüz

yetiştirilmeye başlanılan karışık kültürünün durgun faza geçtikten sonra da lipit içeriği analiz edilmiştir. Zaman içerisinde BG-11 besin ortamındaki karışık mikroalg kültüründe *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği ve durgun fazda lipit içeriğinin türden ve BG-11 besin ortamının nütrient bakımından zengin olmasından [Li et al., 2008], [Liu et al., 2008a], [Yoo et al., 2010], [Wu et al., 2012] kaynaklı olarak %26-28'den %18,7'ye düştüğü belirlenmiştir. Bu durum ayrıca BG-11 besin ortamında stres koşulları (nütrient eksikliği koşulları) altına girmeden çoğalan karışık mikroalg biyokütlesinin, metabolizmasını lipit biriktirmek yerine biyokütle konsantrasyonunu arttırmaya yönlendirdiği şeklinde de açıklanabilmektedir.

Bu çalışmada atıksu ortamında ve BG-11 besin ortamında yetiştirilen mikroalg kültürünün lipit içeriği, literatürde verilen farklı besin ortamlarındaki mikroalg türlerinin lipit içerikleri ile karşılaştırıldığında, benzer ya da yakın sonuçlar içerdiği görülmüştür (Tablo 4.1) [Chinnasamy et al., 2010], [Ehimen et al., 2010], [Xin et al., 2010], [Wahlen et al., 2011], [Song et al., 2013], [Komolafe et al., 2014]. Mikroalglerin lipit içeriğinin sadece türe bağlı olarak değil, aynı zamanda büyüme koşulları ve büyüme fazına bağlı olarak da değiştiği bilinmektedir. Bu tür bir bilgi Tablo 4.1'de listelenen çalışmalar için literatürde genellikle mevcut değildir. Bu tez çalışmasında atıksuda ve BG-11 besin ortamındaki karışık mikroalg kültürleri karşılaştırıldığında, atıksu ortamında yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin, BG-11 besin ortamındaki karışık kültüre daha yüksek lipit içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Bunun nedeni atıksudaki karışık kültürün durgun büyüme fazında hasatlanmış olması, durgun fazda sudaki azot ve fosfor konsantrasyonlarının sırasıyla 3 mg/L ve 0,1 mg/L olması ve dolayısıyla hücrelerin hasatlanması sırasında çok düşük nütrient konsantrasyonlarına maruz bırakılmaları ile açıklanmaktadır.

Tablo 4.1: Bu çalışmada ve farklı besin ortamlarında yetiştirilen mikroalg türlerinin lipit içeriklerinin karşılaştırması.

Mikroalg kültürü	Besin ortamı	Lipit içeriği (% ağırlık)	Kaynak
Karışık kültür	Atıksu	26,2±0,6	Bu çalışma
Karışık kültür	BG – 11	18,7	Bu çalışma
Karışık kültür	Atıksu lagünü	14,4±0,4	Wahlen et al., 2011
Karışık kültür	Atıksu lagünü	20	Komolafe et al., 2014
Chlorella saccharophila	BG – 11	12,9±1,2	Chinnasamy et al., 2010
Chlorella saccharophila	Atıksu	18,1±1,3	Chinnasamy et al., 2010
Chlorella sp.	BG – 11	27,6	Ehimen et al., 2010
Scenedesmus sp. LX1	BG – 11	33	Xin et al., 2010
Scenedesmus obliquus	BG – 11	20	Song et al., 2013

4.2.1.2. Nötral Lipit (Toplam Gliserit) İçeriği

Çalışma kapsamında esterleştirme yapılmadan sadece silanlama (trimethylsilylation) işlemi ardından yapılan toplam gliserit analizinde, GC yönteminin kullanılabilirliği araştırılmış ve mikroalg biyokütlesinin nötral lipit (toplam gliseritler-TG) içeriğinin belirlenmesine çalışılmıştır.

Mikroalgal biyokütlelerden Bligh and Dyer metodu kullanılarak ekstrakte edilen lipit numuneleri, Bölüm 3.5.5.1’de gliserit için belirlenen silanlama işleminin ardından GC’de analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucu evsel atıksu ortamında yetiştirilen ve durgun büyüme fazında hasatlanan karışık mikroalg kültürünün TG içeriği, lipit ağırlığı bazında %74,4 (TG/lipit, mg/mg), biyokütle ağırlığı bazında ise % 20 (TG/biyokütle, mg/mg) olarak bulunmuştur. Çalışmada evsel atıksu ortamında üretilen karışık kültüre (*Scenedesmus sp.* baskın) ait TG miktarının yüksek çıkmasının sebebi, hücrelerin logaritmik büyüme fazı yerine durgun büyüme fazında hasatlanması ve hasatlama zamanında çok düşük besin konsantrasyonlarına maruz kalmış olmaları ile açıklanabilmektedir. Literatürde de stres koşullarında (besin eksikliği gibi) ve durgun büyüme fazında hasat edilen mikroalglerin, logaritmik faz esnasında hasat edilen aynı türdeki hücrelerden daha düşük polar lipit ve daha

yüksek nötral lipit (temel olarak trigliserit formunda) içeriğine sahip oldukları belirtilmektedir [Hu et al., 2008], [Wahlen et al., 2011], [Halim et al., 2012a], [Schlagerman et al., 2012]. Bu çalışmada mikroalgal lipitin içerdiği TG miktarının yüksek olması sebebiyle çalışmada üretilen karışık kültürün lipit karakteristikleri uygun olduğunda biyodizele dönüşüm için kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

GC ile gliserit analizi çalışmalarında BG-11 besin ortamında yetiştirilen ve yine büyüme fazında iken hasatlanan karışık mikroalg kültürünün de (*Chlorococcum* türleri baskın) TG içeriği analiz edilmiştir. *Chlorococcum* türlerinin baskın olduğu kültürün TG içeriği lipit ağırlığı bazında %70 (TG/lipit), biyokütle ağırlığı bazında %13,10 (TG/biyokütle) olarak bulunmuştur.

Ayrıca gliserit için belirlenen GC metodunun doğruluğunu kontrol etmek amacıyla literatürde %98 oranında trigliserit ve az miktarda mono- ve di-gliserit içeriğine sahip olduğu belirtilen yağlı tohum bitkilerinden soya yağı [Barnwal et al., 2005] standardı kullanılarak da GC analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan GC analizi sonucu soya yağı standardına ait gliserit içeriği %97,2 olarak bulunmuştur. Soya yağı kullanılarak yapılan gliserit analizi sonucu elde edilen değer literatür ile uyum içinde bulunmuştur [Barnwal et al., 2005]. Sonuç olarak uygulanan GC metodunun, gliserit analizi için doğru ve kullanılabilir bir metot olduğu görülmektedir. GC metodu kullanılarak yapılan gliserit analizi sonucu evsel atıksu ortamında yetiştirilen mikroalg biyokütlesine ve soya yağına ait GC kromatogramı EK B.2’de verilmiştir.

25 mg kuru biyoküteller kullanılarak yapılan GC analizleri sonrası farklı biyokütle miktarları (100 mg, 250 mg ve 500 mg kuru biyoküteller için) kullanılarak da denemeler yapılmıştır. İki mikroalg türü için de artan biyokütle miktarlarında gerçekleştirilen lipit ekstraksiyonunun ardından yapılan GC analizi sonucunda düşük gliserit içerikleri (%40 ve %50 arasında) ölçüldüğü görülmektedir. Bunun nedeni, solvent ekstraksiyonunda biyokütle miktarının arttırılması, ancak solvent miktarının yeterli olmaması sebebi ile solvent ve biyokütle arasındaki kütle transferinin tam olarak sağlanamaması ve sonuç olarak gliseritlerin biyokütleden ekstrakte edilememesi olarak açıklanabilir.

4.2.2. Diğer Hücresel Bileşenler

Mikroalg hücreleri, biyodizele dönüştürülebilen lipitler dışında, hücrede yapısal ve metabolik fonksiyonlarda görev alan proteini, karbonhidratı ve fotosentezde görev alan klorofili de içermektedirler. Bu yüzden biyolojik olarak arıtılmış evsel atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürünün protein, karbonhidrat, klorofil-a içerikleri de Bölüm 3.5'te detaylandırılan analiz yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Karışık mikroalg kültürünün biyokütle analizleri sonucunda elde edilen değerler Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre karışık mikroalg kültürünün kuru biyokütle ağırlığı bazında protein içeriği %33, karbonhidrat içeriği %32,6 ve klorofil-a içeriği ise %1,5 olarak analiz edilmiştir. Literatürde mikroalglerle yapılan çalışmalar incelendiğinde türe ve çevresel şartlara bağlı olarak hücresel bileşenlerin değişiklik gösterebileceği belirtilmektedir. Genel olarak mikroalglerdeki hücresel proteinin % 8–71 arasında, karbonhidrat içeriğinin ise %4–64 arasında değiştiği rapor edilmektedir [Demirbaş, 2009], [Chinnasamy et al., 2010], [Jacob-Lopez et al., 2015].

Tablo 4.2: Mikroalg biyokütlesinin kuru biyokütle ağırlığı bazında hücresel bileşimi (protein, karbonhidrat, lipit, klorofil ve kül) ve yüksek ısıl değeri.

Mikroalg türü	Protein (%)	Karbonhidrat (%)	Lipit (%)	Klorofil-a (%)	Yüksek Isıl Değer (MJ/kg)	Kül (%)
Karışık mikroalg kültürü	33	32,6	26,2±0,6	1,5	21,7	6,5

Çalışma kapsamında ayrıca kuru mikroalg biyokütlesinin ısıl değeri ASTM D 2015 standart metoduna göre bomba kalorimetre cihazı ile ölçülmüş ve yüksek ısıl değer 21,7 MJ/kg, kül içeriği ise %6,5 (% kuru ağırlık bazında) olarak belirlenmiştir. Literatürde Demirbaş (2009) tarafından yapılan çalışmada *Chlorella protothecoides* türü mikroalg biyokütlesinin ısıl değerinin 25,1 MJ/kg, yine aynı türle yapılan başka bir çalışmada [Miao and Wu, 2006] kül içeriğinin ise %6,36 olarak bulunduğu rapor edilmiştir. *Nannochloropsis oceanica* türü mikroalg biyokütlesi ile yapılan bir çalışmada bu türün ısıl değerinin (21,46 MJ/kg) bu tez çalışmasındaki karışık kültüre benzer olduğu görülmüştür [Cheng et al., 2014]. Enerji ve biyoyakıt potansiyelinin

belirlenmesi amacıyla 12 mikroalg türü kullanılarak yapılan bir çalışmada, mikroalglerin ısı değerleri 18–27,6 MJ/kg arasında bulunmuştur [Picardo et al., 2012].

4.3. Transesterifikasyon Uygulamaları

4.3.1. Ekstraksiyon-Transesterifikasyon

Mikroalglerden biyodizel üretimi ve elde edilen biyodizelin YAME içeriğinin belirlenmesi için yürütülen ekstraksiyon-transesterifikasyon çalışmaları, atıksuda ve BG-11 besin ortamında yetiştirilen durgun (stationary) fazdaki karışık mikroalg biyokütelleri için değerlendirilmiştir. Biyokütleden modifiye Bligh and Dyer metodu ile ekstrakte edilen mikroalg lipitlere Bölüm 3.4.1’de belirtildiği üzere transesterifikasyon yöntemleri uygulanmıştır. Buna göre elde edilen biyodizel verimleri, biyokütlenin içerdiği lipitin ağırlığına ve biyokütlenin ağırlığına bağlı olarak hesaplanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda iki farklı besin ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürlerinin ekstraksiyon-transesterifikasyon sonrası elde edilen biyodizel verimleri Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Farklı besin ortamlarında yetiştirilen karışık mikroalg kültürlerinden ekstraksiyon-transesterifikasyon yöntemi ile elde edilen biyodizel verimleri.

Mikroalg kültürü (Besin ortamı)	Deneme No	YAME/Biyokütle (%) ¹	YAME/Lipit (%) ¹	YAME/TG (%) ¹
Karışık kültür (BG-11)	1	2,16	12,00	17,14
Karışık kültür (BG-11)	2	2,88	16,00	22,86
Karışık kültür (Evsel atıksu)	1	6,29	24,00	32,26
Karışık kültür (Evsel atıksu)	2	9,43	36,00	48,40

¹ % biyokütle ve lipit ağırlığı bazında YAME miktarları

Farklı metanol, kloroform ve katalizör miktarları kullanılarak aynı reaksiyon şartlarında yürütülen iki deneysel çalışmada, Tablo 4.3'te görüldüğü üzere mikroalgal biyokütlenin ve biyokütle bünyesindeki lipitin ağırlığı esas alınarak hesaplanan YAME verimlerine göre, evsel atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin dönüşüm verimleri, BG-11 ortamındaki karışık mikroalg biyokütlesinden yüksek bulunmuştur.

Evsel atıksuda yetiştirilen karışık mikroalg kültürünün YAME verimleri lipit ağırlığı bazında deneme 1 ve deneme 2 için sırasıyla %24 ve %36, BG-11 ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürü için ise %12 ve %16 olarak hesaplanmıştır. Mikroalg lipitinin içerdiği TG miktarı baz alınarak elde edilen YAME verimleri, evsel atıksu ortamına ait biyoküteller için %32,26 ve %48,40, BG-11 besin ortamına ait biyoküteller için %17,14 ve %22,86 olarak bulunmuştur. Biyokütle ağırlığı bazında YAME verimleri ise evsel atıksu ve BG-11 besin ortamında yetiştirilen mikroalg türleri için sırasıyla %6,29 – 9,43 ve %2,16 – 2,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon parametrelerinde optimizasyona gidilmeden, sadece literatürdeki iki ekstraksiyon-transesterifikasyon yönteminden yararlanarak gerçekleştirilen reaksiyon şartlarında, elde edilen YAME verimlerinin genel olarak düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürde transesterifikasyon çalışmalarında genel olarak trigliseritlerin biyodizele dönüşümü için gerekli alkol:yağ molar oranının teorik olarak 3:1 (alkol:yağ) olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte reaksiyonda kullanılan alkol miktarının artırılması ile reaksiyon hızının artacağı ve kısa sürelerde daha yüksek dönüşüm verimleri elde edilebileceği rapor edilmiştir [Miao and Wu, 2006], [Ahmad et al., 2009], [Prommuak et al., 2012]. Bu nedenle tez çalışmasında ekstraksiyon-transesterifikasyon denemelerinde kısa reaksiyon sürelerinde daha iyi YAME verimleri elde edebilmek amacıyla, her iki mikroalg kültürü için metanolün biyokütleyle oranı deneme 1 ve deneme 2 için sırasıyla 24:1 (mL/g) ve 56:1 (mL/g) olacak şekilde aşırı metanol kullanımı tercih edilmiştir. Deneyler sonucunda yüksek YAME verimleri elde edilmemekle birlikte, elde edilen YAME veriminin deneme 2 için biraz daha iyi olduğu görülmüştür.

Ekstraksiyon-transesterifikasyon deneylerinden elde edilen YAME verimleri reaksiyonda kullanılan asit katalizör konsantrasyonları açısından da değerlendirilmiştir. İki mikroalg kültüründen kısa reaksiyon sürelerinde yüksek oranda YAME dönüşümü sağlayabilmek için yüksek konsantrasyonda (1,8 mL ve 3

mL) asit (H_2SO_4) katalizör kullanılmıştır. Fakat yüksek YAME verimlerine ulaşamadığı görülmüştür. Literatürde de yüksek katalizör konsantrasyonlarının daha kısa sürede ve daha düşük spesifik gravite değerine sahip biyodizel üretebilmesine rağmen, düşük biyodizel verimleri elde edildiği raporlanmıştır [Miao ve Wu, 2006]. Bu durum yüksek H_2SO_4 konsantrasyonu ve yüksek reaksiyon sıcaklıklarının yağın bir kısmının yanmasına neden olabileceği şeklinde açıklanmıştır [Miao ve Wu, 2006]. Başka bir çalışmada ise aşırı katalizör miktarlarının transesterifikasyon reaksiyonunu engelleyen sabunlaşmaya katılabileceği ve sonuç olarak düşük YAME verimleri elde edilmesine neden olabileceği de rapor edilmiştir [Prommuak et al., 2012]. Dolayısıyla bu tez çalışmasında kinetik açıdan reaksiyonunu hızlandırmak amacıyla deneylerde kullanılan yüksek katalizör konsantrasyonları ve yüksek reaksiyon sıcaklıklarının ($90^\circ C$), düşük YAME verimleri elde edilmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen biyodizel (YAME) verimleri bazı araştırmacıların elde ettikleri verimlere göre düşük [Johnson and Wen, 2009], [Li et al., 2011] iken bazı araştırmacıların elde ettiği verimlere göre yüksek bulunmuştur [Sheng et al., 2011]. Ayrıca literatürde bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer verimlerin olduğu da görülmektedir [Sheng et al., 2011], [Prommuak et al., 2012]. Johnson ve Wen, (2009) tarafından *Schizochytrium limacinum* türü mikroalg biyokütlesi ile yapılan transesterifikasyon çalışmasında asit katalizörlü transesterifikasyon yöntemi kullanıldığında YAME veriminin biyokütle ağırlığı bazında %36,80, lipit ağırlığı bazında %63,70 olarak bulunduğu bildirmişlerdir. Li ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada evsel atıksu ortamında yetiştirilen *Chlorella* türlerine ait mikroalg biyokütlenin YAME dönüşüm verimi incelenmiş ve YAME veriminin kuru biyokütle ağırlığı bazında %11,04 olarak tespit edildiği raporlanmıştır [Li et al., 2011]. Literatürde rapor edilmiş başka bir çalışmada ise elde edilen YAME veriminin biyokütle ağırlığı bazında %4,22 olarak bulunduğu görülmüştür. Ayrıca reaksiyonda kloroform dışında diğer solvent sistemleri (etanol, hekzan/etanol, asetik asit/etanol gibi) kullanıldığında elde edilen verimin azaldığı (biyokütle ağırlığı bazında %3,2) bildirilmiştir [Sheng et al., 2011]. Prommuak ve arkadaşları (2012) tarafından *Chlorella vulgaris* türü mikroalg biyokütlesi kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada da en yüksek YAME veriminin biyokütle ağırlığı bazında %4, lipit ağırlığı bazında ise yaklaşık olarak %25 bulunduğu rapor edilmiştir [Prommuak et al., 2012].

Evsel atıksu ve BG-11 besin ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürlerinin ekstraksiyon-transesterifikasyon yöntemi ile esterleştirilmesi sonrasında elde edilen YAME ürününün karakterizasyonu da Bölüm 3.5.5.2’de belirtildiği üzere GC analizleri ile belirlenmiştir. Transesterifikasyon uygulamaları sonrası GC’de analiz edilen mikroalg biyodizel örneklerinin deneme 2’ye ait YAME bileşimlerinin karakterizasyonu Tablo 4.4’te verilmektedir.

Tablo 4.4: Ekstraksiyon-transesterifikasyon sonrası üretilen iki mikroalg biyodizel örneğinin YAME karakterizasyonu.

YAME Kompozisyonu (% ağırlık olarak)		
YAME bileşimi	Karışık kültür (BG-11 besin ortamı)	Karışık kültür (Evsel atıksu ortamı)
Tridekanoik (C13:0)	2,26	2,19
Miristik (C14:0)	2,9	2,62
Miristoleik (C14:0)	0,4	1,44
Palmitik (C16:0)	44,17	36,84
Palmitoleik (C16:1)	2,05	1,4
Stearik (C18:0)	18,25	13,26
Oleik (C18:1)	8,12	11,21
Linoleik (C18:2)	14,68	22,63
Linolenik (C18:3)	7,17	8,41
Toplam YAME	100	100

Tablo 4.4'te görüldüğü üzere, evsel atıksu ve BG-11 besin ortamlarında yetiştirilen mikroalg biyokütlelerinin YAME bileşiminde; palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asit metil esterleri içeriklerinin ortak ve baskın olduğu bulunmuştur. GC analizleri sonucu iki mikroalg kültürünün de doymuş (C13:0, C14:0, C16:0 ve C18:0) ve tekli doymamış (C16:1 ve C18:1) yağ asidi miktarları toplamının (BG-11 ortamındaki ve atıksu ortamındaki türler için sırasıyla yaklaşık %78,15 ve % 68,96), çoklu doymamış yağ asidi (C18:2 ve C18:3) miktarlarından yüksek olduğu görülmüştür. Genel olarak literatürde değerlendirilen birçok alg türünde de doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin baskın olduğu bildirilmiştir [Hu et al., 2008], [Lee et al., 2010], [Kumar et al., 2011], [Chen et al., 2012], [Mandotra et al., 2016].

İki mikroalg kültürünün YAME profilinde doymuş ve tekli doymamış yağ asidi metil esteri miktarlarının toplamı yüksek olmakla birlikte, elde edilen bireysel YAME içeriği yüzdelerinin birbirine yakın olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni çalışmada kullanılan karışık mikroalg kültürlerinin ve besin ortamlarının farklı olması ile açıklanmaktadır. Nitekim literatürde de benzer şekilde mikroalglerin yağ asidi profili ve bileşiminin türe, kültür şartlarına ve yaşam döngüsüne bağlı olarak değişiklik gösterdiği rapor edilmektedir [Hu et al., 2008], [Schlagermann et al., 2012], [Halim et al., 2012a], [Islam et al., 2013].

Ekstraksiyon-transesterifikasyon çalışmaları sonucu karışık mikroalg kültüründen elde edilen biyodizel ürününün YAME bileşimi, mikroalgal biyodizelin yakıt özelliklerinin tanımlanması açısından önemli olmaktadır. Bu çalışmada elde edilen mikroalgal biyodizelin yakıt özellikleri ile ilgili değerlendirme Bölüm 4.4'te verilmiştir.

4.3.2. Direkt (in-situ)Transesterifikasyon

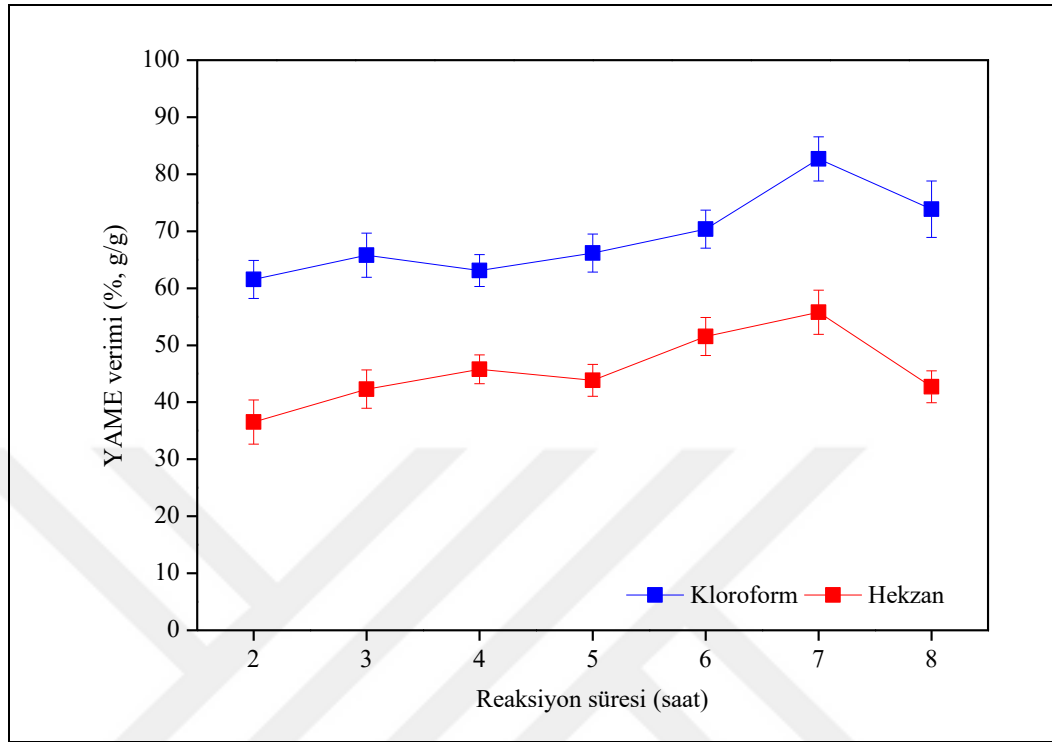
Bu yöntem, lipitleri biyodizele (metil esterlerine) dönüştürmek için gereken alkol ve katalizörün, mikroalgal biyokütleye direkt olarak temasını sağlayarak ekstraksiyon adımını elimine etmektedir. Böylece hem lipit ekstraksiyonu için harcanan solvent miktarı, hem de proses süresi azalmaktadır. Ayrıca iki aşamalı (ekstraksiyon-transesterifikasyon) yöntemde lipit ekstraksiyonu sırasında meydana

gelebilecek lipit kaybının da önüne geçerek, daha yüksek YAME verimi elde edilmesine olanak sağlamaktadır [Velasquez-Orta et al., 2012].

Lipitler organik solvenlerden daha viskoz bir yapıya sahiptirler ve lipitle organik solvent (co-solvent olarak) karışımının sıvı reaksiyon fazında reaktanın difüzyon limitini azaltıp metanol ile transesterifikasyon prosesinin performansını arttırabileceği belirtilmektedir [Im et al., 2014]. Bu nedenle bu çalışmada, geleneksel ısıtma metodunu kullanarak gerçekleştirilen in-situ transesterifikasyon prosesi ile karışık mikroalg biyokütlesinin (evsel atıksu ortamında yetiştirilen) biyodizel dönüşümünde, n-hekzan ve kloroform co-solvent olarak reaksiyon karışımında metanol ile birlikte olarak kullanılmıştır. Reaksiyon boyunca metanol ile birlikte co-solvent kullanımının, reaksiyon ortamında hücre parçalanmasını ve lipitlerin hücre içinden ekstrakte edilmesini destekleyerek, YAME oluşumunu artırması beklenmektedir. Yapılan transesterifikasyon uygulamaları sonrası elde edilen en yüksek biyodizel verimleri kloroform kullanıldığında %82,1±3,9 (YAME/lipit), n-hekzan kullanıldığında ise %55,3±3,9 (YAME/lipit) olarak bulunmuştur. Kloroform ile kıyaslandığında n-hekzan daha düşük ekstraksiyon verimi sağladığı için daha düşük YAME verimleri elde edilmesine neden olmuştur. Bu durum kloroformun hekzana kıyasla daha polar olması ve reaksiyon çözeltisi içinde daha homojen bir yapı oluşturarak hücreden ekstrakte edilen lipitlerin metanol ile transesterifikasyon performansını artırması ile açıklanabilmektedir. Literatürde de benzer şekilde hekzan kullanıldığında kloroforma kıyasla, daha düşük verimler elde edildiği rapor edilmektedir [Johnson and Wen, 2009], [Sheng et al., 2011], [Im et al., 2014].

İn-situ transesterifikasyon deneylerinden elde edilen YAME verimleri 2 saatten 8 saate kadar değişen reaksiyon sürelerinin fonksiyonu olarak da incelenmiştir. Şekil 4.4'te görüldüğü üzere aynı reaksiyon şartları altında (5 mL metanol, 4 mL co-solvent ve 50 µL H₂SO₄ ve 65°C sabit sıcaklıkta) en yüksek YAME verimlerine iki co-solvent için de 7 saatlik reaksiyon süresinde ulaşılmıştır. Bununla birlikte bu süreden fazla devam eden reaksiyon süresinde YAME verimleri azalmış ve kloroform ve n-hekzan için sırasıyla %73,3±4,9 ve %42,4±2,8 (YAME/lipit, mg/mg) olarak bulunmuştur. Benzer sonuçların Cheng ve arkadaşları (2014) ile Carvalho ve Malcata (2005) tarafından da gözlemlendiği rapor edilmiş ve YAME verimlerindeki azalmanın nedeni artan reaksiyon sürelerinde sülfürik asit ile serbest yağ asitlerinin parçalanması ile açıklanmıştır [Carvalho and Malcata, 2005] [Cheng et al., 2014]. Bu durum ayrıca geri devirli bir reaksiyon olan transesterifikasyonda, reaksiyonda aşırı

metanol kullanımına bağlı olarak reaksiyonun girenler yönüne kayması ve dolayısıyla YAME veriminin düşmesi ile de açıklanabilmektedir.



Şekil 4.4: Kloroform ve n-hekzanın biyodizel verimine etkisi (Reaksiyon şartları; 5 mL metanol, 4 mL co-solvent (hekzan ya da kloroform) ve 50 μ L H_2SO_4 (metanol içindeki hacimsel oranı %1, mL/mL), 65°C sabit sıcaklıkta).

Tez çalışması kapsamında atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinden direkt-transesterifikasyon uygulaması ile elde edilen YAME verimlerinin (%55,3 \pm 3,9 – 82,1 \pm 3,9), ekstraksiyon-transesterifikasyon uygulamaları ile elde edilen verimlerden (%24–36) yüksek olduğu görülmüştür. Literatürde de direkt transesterifikasyon uygulaması ile ekstraksiyon-transesterifikasyon uygulamasına göre daha yüksek biyodizel verimleri elde edilebildiği görülmektedir [Ehimen et al., 2010], [Wahlen et al., 2011], [Johnson and Wen, 2009], [Lewis et al., 2000]. Bu çalışmada elde edilen en yüksek YAME verimi (%82,1 \pm 3,9) Avrupa Biyodizel (EN 14214) Standardı'na göre ürünün saflaştırılması adımını elimine etmek için iyi bir uygulama olarak istenen YAME değerinden (ağırlık bazında en az %96,5) düşük bulunmuştur. Bununla birlikte bu çalışmada elde edilen YAME verimini ultrases ve mikroadalga gibi değişik proses modifikasyonlarını kullanarak limit değerlerin üzerine çıkarmanın mümkün olduğu söylenebilmektedir. Halihazırda literatürde daha önce yapılmış olan çalışmalar, geleneksel in-situ transesterifikasyon

uygulamalarından elde edilen YAME verimlerinin ultrases uygulaması ile yaklaşık %25 [Ehimen et al., 2012], mikrodalga uygulaması ile yaklaşık olarak %34 [Koberg et al., 2011] ve %14,34 – 43,37 [Teo and Idris, 2014] oranlarında arttırabildiğini göstermiştir. Bu amaçla çalışmanın son kısmında mikrodalga uygulaması kullanılarak transesterifikasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Karışık mikroalg biyokütlesinin co-solvent destekli direkt transesterifikasyonu sonucu elde edilen biyodizel ürününün YAME kompozisyonun karakterizasyonu, Bölüm 3.5.5.2’de YAME analizi için anlatılan GC analizi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Yapılan GC analizleri sonrası kloroform ile direkt transesterifikasyon deneylerinden elde edilen en yüksek YAME dönüşüm verimine (%82,1±3,9) sahip mikroalg biyodizel örneğine ait sonuçların literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırılması Tablo 4.5’te verilmiştir. Tablo 4.5’te görüldüğü üzere, karışık mikroalg biyokütlesinin YAME bileşiminde palmitik (C16:0), palmitoleik (C16:1), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asit metil esterleri içeriklerinin baskın olduğu bulunmuştur. Literatürde daha önce mikroalglerle yapılmış çalışmalarda da palmitik, palmitoleik, stearik, oleik ve linoleik asit metil esterlerinin esterleştirilen mikroalg lipitlerin temel bileşenlerini oluşturduğu rapor edilmiştir. [Mandal and Mallick, 2009], [Gouveia and Oliveria, 2009], [Halim et al., 2011], [Kaur et al., 2012]. Dolayısıyla bu çalışmada evsel atıksu ikincil arıtım çıkış suyunda yetiştirilen karışık mikroalg kültürünün, literatürdeki saf mikroalg kültürleri ile benzer bileşime sahip yağ asitlerini ürettikleri yapılan GC analizleri sonucunda görülmüştür.

Tablo 4.5: Direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemiyle karışık kültürden elde edilen YAME bileşimi ve literatür değerleri ile karşılaştırılması.

YAME bileşimi	YAME kompozisyonu (% ağırlık olarak)			
	Karışık kültür ¹	<i>Scenedesmus obliquus</i> ²	<i>Chlorococcum sp.</i> ³	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> ⁴
Laurik (C12:0)	1,27	-	-	-
Miristik (14:0)	4,95	1,48	0,5	-
Pentadekanoik (C15:0)	0,62	-	-	-
Palmitik (C16:0)	26,72	21,78	18,8	19,46
Palmitoleik (C16:1)	8,94	5,95	5,7	4,66
Hekzadekadienoik (C16:2)	-	3,96	2,3	12,75
Hekzadekatrienoik (C16:3)	-	0,68	-	19,22
Hekzadekatetraenoik (C16:4)	-	0,43	-	-
Heptadekanoik (C17:0)	1,98	-	0,5	-
Stearik (C18:0)	5,82	0,45	2,8	0,21
Oleik (C18:1)	23,50	17,93	63,3	2,68
Linoleik (C18:2)	14,02	21,74	4,7	19,76
Linolenik (C18:3)	9,83	3,76	-	21,25
Stearidonik (C18:4)	-	0,21	-	-
Araşidik (C20:0)	2,35	-	1,1	-
Toplam YAME	100	78,37	99,70	99,99

¹ Bu çalışmada evsel atıksuda üretilen karışık mikroalg kültürü,

² [Gouveia and Oliveira, 2009],

³ [Halim et al., 2011],

⁴ [Cheng et al., 2013].

Karışık mikroalg biyokütlesinin YAME bileşenlerinin dışında, doymuş yağ asidi (C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0) içeriği, tekli doymamış yağ asidi (C16:1, C18:1) içeriği ve çoklu doymamış yağ asidi (C18:2, C18:3) içeriği, toplam YAME miktarının ağırlıkça sırasıyla %43,7, %32,4 ve %23,9'u olarak hesaplanmıştır. Direkt transesterifikasyon uygulaması sonucunda mikroalgal biyodizelin doymuş ve tekli doymamış yağ asidi içeriği toplamının, ekstraksiyon-transesterifikasyon deneylerinden elde edilen sonuçlara benzer şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak uygulanan transesterifikasyon yöntemine bağlı olarak bireysel YAME kompozisyonları (miktarları) değişmekle birlikte, baskın YAME bileşenleri palmitik, palmitoleik, stearik, oleik, linoleik ve linolenik asitten oluşmaktadır. Literatürde de uygulanan farklı transesterifikasyon yöntemlerinin biyokütlelerin YAME bileşimini değiştirmeyeceği, sadece bireysel YAME miktarlarını ve biyodizele dönüşüm verimini etkileyeceği belirtilmektedir [Rajvanshi ve Sharma, 2012].

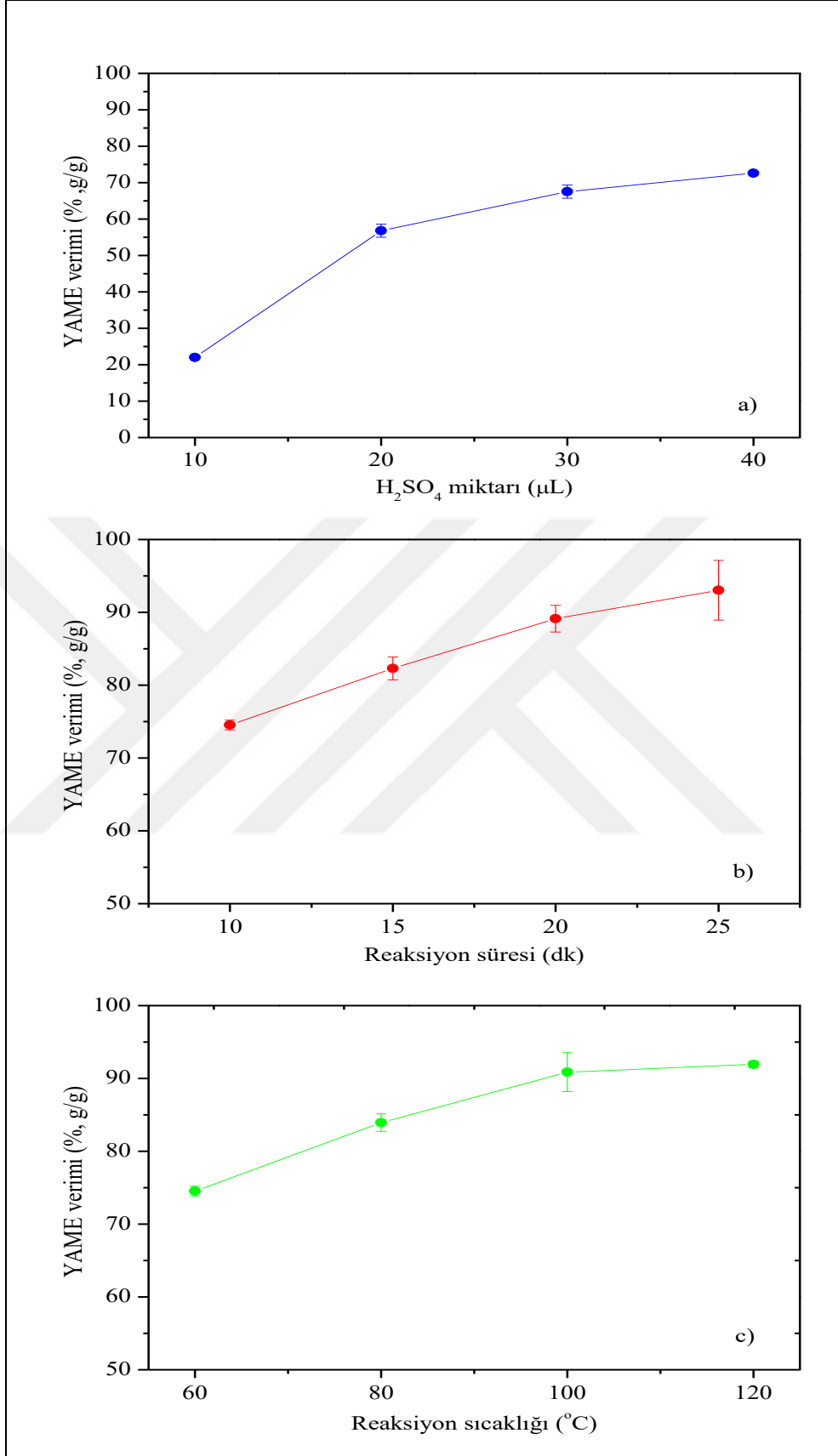
4.3.3. Mikroalga Destekli Direkt (in-situ) Transesterifikasyon

Tez çalışmasının son aşamasında, mikroalglerden direkt transesterifikasyon ile biyodizel üretiminde, hücrelerden lipitin ekstraksiyonunu kolaylaştırmak ve kısa sürede yüksek YAME dönüşümü sağlamak amacıyla mikroalga (MD) destekli in-situ transesterifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Deneylerde mikroalg biyokütlesinden yüksek YAME dönüşümünün sağlanması amacıyla reaksiyon parametrelerinin optimize edilmesine çalışılmıştır. Uygulanan reaksiyon şartları ve bu şartlar altında elde edilen YAME verimleri Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.6: Kuru mikroalg biyokütlesinin MD destekli in-situ transesterifikasyonu için kullanılan deneysel veriler ve elde edilen YAME verimleri (200 mg sabit biyokütle miktarı ve 400 W sabit MD gücünde).

Değişen parametre	H ₂ SO ₄ (μL)	Metanol (mL)	Kloroform (mL)	Reaksiyon süresi (dakika)	Sıcaklık (°C)	YAME (% ağırlık)
H ₂ SO ₄	10	2	2	10	60	22,0±0,2
	20	2	2	10	60	56,8±1,8
	30	2	2	10	60	67,5±1,8
	40	2	2	10	60	72,6±0,5
Metanol	40	2	2	10	60	72,6±0,5
	40	3	2	10	60	74,5±0,7
	40	4	2	10	60	79,3±3,2
	40	5	2	10	60	80,3±0,9
Kloroform	40	3	2	10	60	74,5±0,7
	40	3	3	10	60	74,4±4,9
	40	3	4	10	60	73,2±3,9
	40	3	5	10	60	68,3±1,7
Reaksiyon süresi	40	3	2	10	60	74,5±0,7
	40	3	2	15	60	82,3±1,6
	40	3	2	20	60	89,1±1,8
	40	3	2	25	60	93,0±4,1
Reaksiyon sıcaklığı	40	3	2	10	60	74,5±0,7
	40	3	2	10	80	83,9±1,2
	40	3	2	10	100	90,9±2,7
	40	3	2	10	120	91,9±0,5

Tablo 4.6’da görüldüğü üzere deneylerde biyodizele dönüşüm verimi üzerine katalizör hacminin etkisini belirlemek için H₂SO₄ miktarları 10, 20, 30, 40 µL (metanoldeki katalizör oranları sırasıyla %0,5, %1,0, %1,5 ve %2,0, mL/mL) olarak seçilmiştir. Kullanılan katalizör tipi ve katalizör oranı in-situ transesterifikasyonda reaksiyon hızını belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Tablo 4.6 incelendiğinde reaksiyon karışımında kullanılan asit katalizörün miktarı 10 µL’den 40 µL’ye arttırıldığında, elde edilen YAME (biyodizel ürünü) veriminin yaklaşık 3 kat artışla %22±0,2’den %67,5±1,8’e (lipit ağırlığı bazında) yükseldiği gözlemlenmiştir. Reaksiyon karışımında düşük katalizör miktarları kullanıldığında, yeterli katalitik aktif bölge sağlanamadığı için reaksiyon hızının oldukça yavaş olduğu [Cheng et al., 2014], [Dai et al., 2014], [Ma et al., 2015] ve dolayısıyla düşük YAME verimleri elde edildiği görülmüştür. Bununla birlikte katalizör miktarı 30 µL ve 40 µL olarak kullanıldığında, YAME verimleri lipit ağırlığı bazında sırasıyla %67,5±1,8 ve %72,6±0,5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5a). Sonuç olarak reaksiyonda kullanılan artan katalizör miktarının YAME dönüşümü üzerine pozitif bir etkisinin olduğu görülmüştür. Literatürde de genel olarak sabit reaksiyon şartları (metanol miktarı, süre, sıcaklık ve MD enerjisi gibi) altında, artan katalizör miktarlarının YAME verimini arttırdığı rapor edilmektedir [Velasquez-Orta et al., 2012], [Mandal et al., 2013], [Martinez-Guerra et al., 2014a], [Cui and Liang, 2014], [Dai et al., 2014], [Ma et al., 2015].



Şekil 4.5: MD destekli in-situ transesterifikasyonda a) katalizör oranı, b) reaksiyon süresi ve c) reaksiyon sıcaklığının YAME verimi üzerine etkisi.

Reaksiyon karışımında kullanılan metanol miktarı da, transesterifikasyon reaksiyonunun verimini etkileyen dominant parametredir. MD destekli transesterifikasyonda reaksiyona katılan metanol iyi bir MD absorpsiyon materyalidir ve MD etkisinin bir kısmını absorbe ederek reaktanlarda bölgesel bir süper ısıtma sağlar ve reaksiyonun daha hızlı tamamlanmasını destekler [Patil et al., 2012]. Bu çalışmada kullanılan metanolün biyokütleyle oranları 10:1-15:1-20:1-25:1 (mL/g) (sırasıyla 2, 3, 4, 5 mL) olarak seçilmiştir. Tablo 4.6'da görüldüğü üzere, reaksiyon karışımında 2 mL, 3 mL ve 4 mL metanol miktarı kullanıldığında YAME verimleri sırasıyla %72,6±0,5, %74,5±0,7 ve %79,3±3,2 olarak bulunmuştur. Metanol miktarının 4 mL'den 5 mL'ye çıkartılması ile biyodizele dönüşüm veriminde herhangi bir artış gözlenmemiş ve YAME verimi %80,3±0,9 olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak reaksiyon karışımındaki artan metanol miktarlarının YAME verimi üzerine negatif bir etkisi olmamakla birlikte, önemli oranda bir artış da sağlamadığı bulunmuştur. Bu nedenle çalışma kapsamında 15:1 (mL/g) metanol:biyokütle oranı kullanımının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde metanol oranının artırılması ile yüksek biyodizel verimlerine ulaşamamasının nedeni şu şekilde açıklanabilmektedir: İyi bir MD absorpsiyon solventi olan metanol aşırı miktarda kullanıldığında, metanol MD enerjisinin büyük bir kısmını absorbe edebilmekte ve MD gücünü yavaşlatabilmektedir. Sonuç olarak mikroalg biyokütlesinin parçalanmasını kolaylaştıran MD ışınlaması etkisi azaldığı için, etkili bir lipid ekstraksiyonu sağlanamamakta ve dolayısıyla yüksek biyodizel verimleri elde edilememektedir [Patil et al., 2011], [Martinez-Guerra et al., 2014a], [Cheng et al., 2014]. Literatürde *Nannochloropsis* türü mikroalg biyokütlesi ile gerçekleştirilen MD destekli transesterifikasyon çalışmasında, reaksiyonlarda 9:1-12:1-15:1 (mL/g) metanol:biyokütle oranları kullanılmış ve en iyi biyodizele dönüşüm veriminin 20 dakikalık reaksiyon süresinde metanol:biyokütle oranı 12:1 (mL/g) kullanıldığında elde edildiği rapor edilmiştir [Patil et al., 2011]. Ayrıca bu oranın üzerinde kullanılan metanol:biyokütle oranlarında, yukarıda da belirtildiği gibi MD ışınlamasının çoğunun solvent tarafından absorbe edilebileceği ve sonuç olarak yetersiz lipid ekstraksiyonu nedeniyle ekstraksiyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarında yüksek verimlerin elde edilemediği bildirilmiştir [Patil et al., 2011]. Metanolün biyokütleyle oranının YAME verimi üzerine etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada, sabit reaksiyon şartları (%12 katı heterojen (KF/CaO) katalizör varlığında 60°C'de 30 dk) altında 4:1-12:1 (mL/g) arasında metanol:biyokütle oranları değerlendirilmiştir.

Artan metanol miktarı ile biyodizel veriminin hızlı bir şekilde arttığı ve en yüksek YAME veriminin 8:1 (mL/g) metanol:biyokütle oranında elde edildiği rapor edilmiştir. Fakat metanol oranı 8:1'den daha yüksek kullanıldığında YAME veriminde azalma olduğu bildirilmiş ve bunun nedeni ise aşırı metanol oranlarının reaktanların (lipit ve katalizör) konsantrasyonunu seyrelttiği ve sonuç olarak reaktanlar arasındaki teması azaltarak biyodizele dönüşüm hızını geciktirebildiği şeklinde açıklanmıştır [Ma et al., 2015].

MD destekli in-situ transesterifikasyon reaksiyonunda co-solvent olarak kloroformun da YAME verimi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Deneysel olarak, kloroform hücre duvarından mikroalgal lipitin difüzyonunu artırarak, lipitin metanole geçişini desteklemesi açısından reaksiyon karışımında kullanılmıştır. [Park et al., 2015]. Ayrıca reaksiyon karışımına co-solvent ilavesinin in-situ transesterifikasyonda yüksek metanol konsantrasyonları gereksinimini de azalttığı bildirilmektedir [Martinez-Guerra et al., 2014a]. Deneysel çalışmada reaksiyon karışımında 2-5 mL arasında değişen kloroform miktarları için 15:1 (mL/g) metanol:biyokütle oranı ve 40 µL H₂SO₄ kullanılmıştır. Tablo 4.6'da görüldüğü üzere, 60°C reaksiyon sıcaklığı ve 10 dakikalık reaksiyon süresi şartlarında gerçekleştirilen deneyler sonucunda, artan kloroform miktarının YAME verimi üzerine negatif etkisinin olduğu ve YAME veriminin yaklaşık %8 oranında azalma ile %74,5±0,7'den %68,3±1,7'ye düştüğü görülmüştür. Bu yüzden çalışma kapsamında reaksiyon karışımı içinde 2 mL kloroform kullanılmasının, YAME verimi açısından yeterli olacağı sonucuna varılmıştır. Literatürde de bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir [Cui and Liang, 2014], [Kim et al., 2015]. İn-situ transesterifikasyon reaksiyonu verimi üzerine kloroformun etkisinin incelendiği bir çalışmada, değişik metanol - kloroform karışımı oranları (2:1-1:1-1:2, mL/mL) ile saf metanolün performansı karşılaştırılmıştır. Reaksiyonda saf metanol kullanılması ile metanol - kloroform karışımına kıyasla daha yüksek YAME verimleri (%99,8) elde edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca solvent karışımı içindeki artan kloroform miktarının metanolün fraksiyonunu düşürdüğü ve sonuç olarak metanol - kloroform solvent sisteminin veriminin azaldığı belirtilmiştir [Kim et al., 2015]. Literatürde yer alan bir diğer çalışmada *Cryptococcus curvatus* türü maya hücrelerinden biyodizel üretiminde MD destekli in-situ transesterifikasyonun etkisi incelenmiştir. Reaksiyonlarda solvent olarak metanol/kloroform karışımı ile, saf metanol kullanımına göre oldukça düşük

biyodizel verimleri elde edildiği ve polar solvent olarak metanolün MD destekli transesterifikasyonda lipitleri YAME'ye dönüştürmede tek başına da etkili olduğu bildirilmiştir [Cui and Liang, 2014]. Fakat en yüksek biyodizel verimine (%92, lipit ağırlığı bazında) yüksek metanol:biyokütle (50:1, mL/g) konsantrasyonlarında elde edildiği raporlanmıştır [Cui and Liang, 2014].

Reaksiyon süresi de biyodizele dönüşüm verimini etkileyen parametrelerden biridir. Bu nedenle çalışma kapsamında optimum reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla 10 dakikadan 25 dakikaya değişen (5 dk artışla) reaksiyon süreleri denenmiştir. MD deneyleri 3 mL (15:0, (mL/g)) metanol, 40 µL asit katalizör ve 2 mL kloroform içeren reaksiyon karışımı kullanılarak 60°C reaksiyon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.6'da görüldüğü üzere 10-15-20 dakikalık reaksiyon süreleri için YAME verimleri sırasıyla %74,5±0,7, %82,3±1,6 ve %89,1±1,8 olarak artış göstermiştir. Reaksiyon süresi 25 dakikaya çıkartıldığında ise YAME veriminde önemli oranda bir artış olmadığı (%93,0±4,1) gözlenmiştir. Literatürde yer alan bir çalışmada *Nannochloropsis salina* türü kuru mikroalg biyokütlesinin süper kritik (265°C sıcaklık ve 80 bar basınç altında) şartlarda gerçekleştirilen MD destekli in-situ transesterifikasyonun, yağ asidi etil esteri (FAEE) verimi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada 12:1 (mL/g) etanol:biyokütle oranı ve 10 – 25 dakika arasında değişen reaksiyon süreleri için en yüksek FAEE veriminin (biyokütle ağırlığı bazında yaklaşık %31, g/g) 20. dakikada elde edildiği, sürenin 25 dakikaya arttırılması ile FAEE veriminde artış gözlenmediği rapor edilmiştir [Patil et al., 2013]. Ma et al. (2015) tarafından *Chlorella vulgaris* biyokütlesinden biyodizel üretiminde MD destekli transesterifikasyonda 5 - 60 dakika arasında değişen farklı reaksiyon sıcaklıklarının YAME verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Reaksiyon süresi 5 – 45 dakika arasında YAME veriminin hızlı bir şekilde arttığı, bu süreden sonraki reaksiyon sürelerinde ise YAME veriminin az miktarda artış gösterdiği bildirilmiştir [Ma et al., 2015]. Belirli bir süreden sonra reaksiyon süresinin arttırılmasıyla dönüşüm veriminde artış olmamasının ya da artış oranının azalmasının nedeni, reaksiyonun neredeyse dengeye yaklaşması ile açıklanmaktadır [Im et al., 2014]. Literatürde in-situ transesterifikasyon reaksiyonunda MD'in etkisinin iki yönlü olarak gerçekleştiği belirtilmektedir: Birincisi MD'in neden olduğu termal etki, metanolün biyokütleden lipiti ekstrakte etme özelliklerini arttırmaktadır. İkicisi ise uzatılmış MD etkisi, hücre duvarı içinden nüfus ederek çözücü karışımı içine lipitin salınımını kolaylaştırmaktadır [Martinez Guerra et al., 2014a]. Ayrıca düşük

reaksiyon sürelerinde hücresel parçalanmanın tam olarak gerçekleşmediği, MD ile reaksiyon karışımı arasında yeterli etkileşimin sağlanamadığı ve dolayısıyla düşük YAME verimleri elde edilebildiği bildirilmektedir [Ma et al., 2015]. Bu çalışmada kullanılan reaksiyon şartları için (3 mL metanol, 40 µL asit katalizör ve 2 mL kloroform karışımı ve 60°C reaksiyon sıcaklığı) MD ve reaksiyon karışımı arasında yeterli temasın sağlanması açısından 20 dakikalık reaksiyon süresinin karışık mikroalg biyokütlesinden lipitin transesterifikasyonu için uygun süre olduğu düşünülmektedir.

Reaksiyon sıcaklığı da in-situ transesterifikasyonda YAME veriminin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle çalışmanın son aşamasında sabit reaksiyon şartlarında (3 mL (15:0, (mL/g)) metanol, 40 µL H₂SO₄, 2 mL kloroform miktarı ve 10 dakika reaksiyon süresi), 60 - 120°C arasında (20°C'lik artışla) değişen reaksiyon sıcaklıklarının YAME verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Diğer deney setlerinde reaksiyon süresi sabit 10 dakika kullanıldığı için bu deney setinde de, reaksiyon süresi 20 dakika yerine 10 dakika olarak seçilmiştir. Tablo 4.6'da görüldüğü üzere, MD destekli transesterifikasyonda reaksiyon sıcaklığı 60°C'den 100°C'ye arttırılması ile YAME veriminin lipit ağırlığı bazında yaklaşık olarak %22 oranında artış ile %74,5±0,7'den %90,9±2,7'ye yükseldiği bulunmuştur. Sıcaklığın 100°C'den 120°C'ye arttırılmasıyla ise biyodizel dönüşüm oranında bir değişim gözlenmemiş ve YAME verimi %91,9±0,5 bulunmuştur. Bu yüzden karışık mikroalg biyokütlesinin MD destekli in-situ transesterifikasyonu için bu çalışma şartlarındaki uygun sıcaklık değerinin 100°C olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürdeki mikrodalga destekli transesterifikasyonda genel olarak artan reaksiyon sıcaklıklarının biyodizele dönüşüm verimini arttırdığı bildirilmektedir [Iqbal and Theegala, 2013]. *Nannochloropsis* türü mikroalg biyokütlesinden 80-100-120°C'lik reaksiyon sıcaklıklarında etanol:kloroform solvent sistemi (2:1 mL/mL) kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, MD destekli ekstraksiyon ve transesterifikasyon sonrası elde edilen FAEE verimlerinin kuru biyokütle ağırlığı bazında sırasıyla %15, %37 ve %41 olduğu rapor edilmiştir [Iqbal and Theegala, 2013]. Literatürde ayrıca artan reaksiyon sıcaklıklarının her zaman artan biyodizel üretimi ile sonuçlanmadığı da bildirilmektedir [Cheng et al., 2013], [Guldhe et al., 2014]. Bunun nedeni ise, metanolün kaynama noktasının 64,8°C olduğu göz önüne alındığında, 60°C'nin üzerindeki reaksiyon sıcaklıklarında metanolün buharlaşarak metanol:lipit oranının azalmasına neden olabileceği ve sonuç olarak reaksiyon hızında azalma meydana

gelebileceği şeklinde açıklanmıştır [Cheng et al., 2013]. Guldhe ve arkadaşları (2014) tarafından *Scenedesmus sp.* türü mikroalg biyokütlesi ile metanol, hekzan ve katı asit katalizör (zirkon dioksit) varlığında yapılan MD destekli transesterifikasyon çalışmasında, 80-100-120°C'lik reaksiyon sıcaklıkları kullanılarak deneyler yürütülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda %51,94 ile en yüksek biyodizel verimine 80°C'de ulaşıldığı bildirilmiştir. Ayrıca reaksiyon sıcaklığının 120°C'ye artırılmasıyla dönüşüm veriminin (%9,65) azaldığı ve bu yüzden optimum reaksiyon sıcaklığının 80°C olduğu rapor edilmiştir [Guldhe et al., 2014].

Sonuç olarak MD destekli direkt (in-situ) transesterifikasyon deneylerinde reaksiyon parametrelerinin YAME verimi üzerine etkisi değerlendirildiğinde; katalizör oranı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı parametrelerinin pozitif etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.5a-b-c). Ayrıca reaksiyon karışımındaki artan metanol miktarlarının YAME verimi üzerine negatif bir etkisi olmamakla birlikte, metanol miktarının artırılmasıyla YAME veriminde sadece %11 oranında artış gözlemlenmiştir. Fakat reaksiyon karışımı içinde artan kloroform miktarlarının ise YAME veriminde yaklaşık olarak %8 oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Karışık mikroalg biyokütlesinin MD destekli direkt transesterifikasyonu sonucu elde edilen biyodizel ürününün YAME içeriğinin karakterizasyonu yapılan GC analizleri ile belirlenmiş ve en yüksek YAME dönüşüm verimine (%93,0±4,1 YAME/ lipit) sahip mikroalg biyodizel örneğinin bireysel YAME kompozisyonu ve miktarları Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7: Karışık mikroalg biyokütlesinin MD destekli direkt transesterifikasyonu sonucu elde edilen YAME bileşimi.

YAME Bileşimi	YAME kompozisyonu (% ağırlık olarak)
Kaprilik (C8:0)	-
Kaprik (C10:0)	0,96 ± 0,23
Laurik (C12:0)	-
Tridekanoik (C13:0)	2,24 ± 0,60
Miristik (C14:0)	3,06 ± 0,32
Miristoleik (C14:0)	2,05 ± 0,48
Pentadekanoik (C15:0)	1,00 ± 0,09
Palmitik (C16:0)	25,43 ± 0,75
Palmitoleik (C16:1)	6,86 ± 0,45
Heptadekanoik (C17:0)	0,25 ± 0,04
Stearik (C18:0)	4,32 ± 0,74
Oleik (C18:1)	23,87 ± 0,40
Linoleik (C18:2)	15,47 ± 0,60
Linolenik (C18:3)	11,30 ± 0,55
Araşidik (C20:0)	2,17 ± 0,09
Eikosenoik (C20:1)	1,02 ± 0,34
Toplam	100,00

Tablo 4.7’de görüldüğü üzere, karışık mikroalg biyokütlesinin YAME bileşiminde palmitik (C16:0), palmitoleik (C16:1), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asit metil esterleri içeriklerinin baskın olduğu bulunmuştur. Mikroalg biyokütlesinin bireysel YAME içeriğinin çalışma kapsamında kullanılan ekstraksiyon-transesterifikasyon (iki aşamalı) ve direkt (in-situ) transesterifikasyon (tek aşamalı) deneylerinde elde edilen sonuçlarla benzer olduğu görülmektedir. Sonuç olarak bir önceki Bölüm 4.3.2’de belirtildiği gibi uygulanan transesterifikasyon yönteminin karışık mikroalg biyokütlesinin YAME bileşimini genel olarak değiştirmedeği (baskın yağ asidi bileşenleri ortak), sadece bireysel YAME konsantrasyonlarında bir miktar farklılık yarattığı gözlenmiştir (Tablo 4.8).

4.4. Karışık Mikroalg Biyokütlesinden Üretilen Biyodizelin Yakıt Özelliklerinin Değerlendirmesi

Yüksek verim için mikroalglerin yüksek lipit içeriğine sahip türlerinden seçilmesi istenir. Tür seçimi temel olarak biyodizel özelliklerini ve biyodizelin kalitesini belirleyen yağ asidi profiline bağlı olmaktadır [Bucy et al., 2012], [Valdez-Ojeda et al., 2015]. Çalışma kapsamında evsel atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin yağ asidi profilinin temel olarak palmitik, palmitoleik, stearik, oleik, linoleik ve linolenik asitten oluştuğu yapılan GC analizleri sonucunda belirlenmiştir. Literatürde de benzer şekilde birçok saf mikroalg türünün yağ asidi profilinde palmitik, palmitoleik, stearik, oleik, linoleik ve linolenik asitleri içerdiği rapor edilmiştir [Mata et al., 2010], [Kumar et al., 2011], [Kaur et al., 2012], [Islam et al., 2013], [Mandotra et al., 2016]. Düşük miktarlarda çoklu doymamış (linoleik, linolenik gibi) yağ asitleri ve yüksek oleik asit (C18:1) içeriklerinin biyodizelin oksidasyon stabilitesini arttırdığı, yüksek miktarda doymuş yağ asidi (palmitik ve stearik gibi) içeriklerinin ise yüksek setan sayısı ve düşük iyot değeri ile sonuçlandığı bilinmektedir [Ramos et al., 2009], [Abou-Shanab et al., 2011], [Kaur et al., 2012]. Ayrıca mikroalg kültürünün yaşı ile yağ asidi profilindeki çoklu doymamış yağ asidi içeriği arasında ters bir orantı olduğu bilinmektedir. Mikroalg kültürlerinin durgun fazdaki doymuş ve tekli doymamış yağ asidi miktarlarının büyüme fazına oranla daha yüksek olduğu da rapor edilmektedir [Kaur et al., 2012], [Islam et al., 2013], [Mandotra et al., 2016]. Tablo 4.8’de evsel atıksuda yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin farklı transesterifikasyon yöntemleri sonucu elde edilen yağ asidi profili gösterilmektedir. Çalışma kapsamında değerlendirilen karışık mikroalg kültürü de durgun faz sürecinde hasat edilerek kullanılmış ve Tablo 4.8’de görüldüğü üzere doymuş ve tekli doymamış yağ asidi miktarları toplamının, çoklu doymamış yağ asidi miktarından yüksek olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.8: Evsel atıksuda yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin farklı transesterifikasyon yöntemleri sonucu elde edilen yağ asidi profili.

YAME Bileşimi	Transesterifikasyon yöntemi		
	İki Adımlı ¹ (%) ⁴	Tek Adımlı ² (%) ⁴	MD Destekli Tek Adımlı ³ (%) ⁴
Kaprilik (C8:0)	-	-	-
Kaprik (C10:0)	-	-	0,96±0,23
Laurik (C12:0)	-	1,27	-
Tridekanoik (C13:0)	2,19	-	2,24±0,6
Miristik (C14:0)	2,62	4,95	3,06±0,32
Miristoleik (C14:0)	1,44	-	2,05±0,48
Pentadekanoik (C15:0)	-	0,62	1,00±0,09
Palmitik (C16:0)	36,84	26,72	25,43±0,75
Palmitoleik (C16:1)	1,4	8,94	6,86±0,45
Heptadekanoik (C17:0)	-	1,98	0,25±0,04
Stearik (C18:0)	13,26	5,82	4,32±0,74
Oleik (C18:1)	11,21	23,50	23,87±0,40
Linoleik (C18:2)	22,63	14,02	15,47±0,60
Linolenik (C18:3)	8,41	9,83	11,30±0,55
Araşidik (C20:0)	-	2,35	2,17±0,09
Eikosenoik (C20:1)	-	-	1,02±0,34
Doymuş	56,35	43,71	41,48
Tekli doymamış	12,61	32,44	31,75
Çoklu doymamış	31,04	23,85	26,77
Toplam YAME	100	100	100

¹Ekstraksiyon-transesterifikasyon yöntemi

²Direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemi

³MD destekli in-situ transesterifikasyon yöntemi

⁴Ağırlıkça toplam YAME içindeki % değerler

Bu çalışmada elde edilen biyodizel ürününün oksidasyon stabilitesi, setan sayısı ve iyot değeri direkt olarak ölçülmemiştir. Bununla birlikte mikroalg biyodizeldeki düşük çoklu doymamış (C18:2 ve C18:3) yağ asidi içeriği ve yüksek oleik (C18:1) ve palmitik asit (C16:0) miktarları nedeniyle, karışık mikroalg kültürünün bu üç parametre için verilen spesifikasyonları karşılayabileceğini göstermektedir. Tablo 4.9'da evsel atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin MD destekli direkt transesterifikasyonu sonrası elde edilen (%93,0±4,1 YAME verimine sahip biyodizel ürününe ait) yağ asidi profilinin literatürdeki farklı mikroalg türleri ile karşılaştırılması verilmiştir. Literatürde de birçok mikroalg türünün yağ asidi profilinde doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri toplamının çoklu doymamış yağ asidi miktarından fazla olduğu görülmektedir. Çalışma sonuçları, literatürdeki saf mikroalg türlerinden elde edilen biyodizelin fizikokimyasal özelliklerinin çoğunun, ASTM D6751 ve EN 14214 biyodizel standartları tarafından belirlenen sınır değerleri karşıladığını rapor eden literatür ile uyum içindedir [Gouveia and Oliveira,2009], [Abou-Shanab et al., 2011], [Rajvanshi and Sharma, 2012], [Schlagermann et al., 2012], [Chen et al., 2012], [Kaur et al., 2012]. Sonuç olarak bu özelliklere sahip mikroalglerden iyi kalitede biyodizel üretimi sağlanabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.9: Evsel atıksuda yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinin transesterifikasyon uygulamaları sonrası elde edilen yağ asidi profilinin literatürdeki farklı mikroalg türleri ile karşılaştırılması.

Mikroalg Kültürü	Yağ asidi Profili (Toplam YAME'in Ağırlık Bazındaki %'si)			Kaynak
	Doymuş (%)	Tekli Doymamış (%)	Çoklu Doymamış (%)	
Karışık Kültür (<i>Scenedesmus sp.</i> baskın)	56,4	12,6	31,0	Bu çalışma (Ekst./Trans.)
	43,7	32,4	23,9	Bu çalışma (in-situ trans.)
	41,5	31,8	26,8	Bu çalışma (MD destekli in-situ)
Karışık kültür (<i>Desmodesmus sp.</i> baskın)	47,0	34,5	18,9	Komolafe et al.,2014
<i>Scenedesmus abundans</i>	55,3	16,8	27,9	Mandotra et al.,2016
<i>Scenedesmus sp.</i>	18,6	26,9	30,0	Talebi et al., 2013
<i>Scenedesmus obliquus</i>	23,7	23,9	30,8	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	28,6	18,8	33,1	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Chlorella protothecoides</i>	9,3	65,2	25,4	Chen et al., 2012
<i>Nannochloropsis sp.</i>	60,0	20,0	20,0	Teo and Idris 2014
<i>Botryococcus braunii</i>	26,5	5,7	68,3	Schlagerman et al., 2012

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Karışık Mikroalg Biyokütlesi Üretimi Çalışmaları

Bu tez çalışmasında mikroalglerden biyodizel üretimi amacıyla mikroalg biyokütlesi üretiminde, temiz su yerine biyolojik olarak arıtılmış evsel atıksu kullanılarak kendiliğinden çoğalan türler çalışılmıştır. Bu kapsamda evsel atıksu arıtma tesisi çıkış suyu ortamında üretilen karışık mikroalg kültürünün yağının karakterizasyonu ve biyodizel üretim potansiyelinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle çeşitli doğal su ortamlarından toplanan mikroalglerin laboratuvar şartlarında atıksuya ekimi yapılmıştır. Atıksuda sabit büyüme koşulları altında ($24\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, $150 \mu\text{mol foton/m}^2\cdot\text{sn}$ ışık yoğunluğu, pH değeri 6,5 - 7,0 olacak şekilde sürekli CO_2 gazı ilavesi ile) kesikli modda çalıştırılan reaktörlerde karışık kültürün atıksuya aklımasyonu sağlanmıştır. Bu şartlar altında atıksudaki azot, fosfor ve çeşitli iz elementleri kullanarak çoğalan ve zamanla *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık kültürün, reaktör içindeki konsantrasyonunun yaklaşık olarak 500 mg/L 'ye kadar çıkartılabildiği görülmüştür.

Atıksu içerisindeki nütrient miktarının düşük olması ($\text{TN}=17,2\pm 1,2 \text{ mg/L}$ ve $(\text{PO}_4)^{-3}\text{-P}=1,9\pm 1,4 \text{ mg/L}$) ve dolayısıyla reaktörlerde yüksek biyokütle konsantrasyonuna ulaşamaması nedeniyle, biyokütlenin yoğunlaştırılması ve hasatlanması için batık membran filtrasyonu kullanılmıştır. Yarı-sürekli şekilde çalıştırılan batık membran filtrasyonu sayesinde, hem mikroalglerin ihtiyacı olan besin ortamı yenilenmiş, hem de mikroalgler büyüme ortamından uzaklaştırılmadan yoğun kültür üretimi sağlanmıştır. Batık membran filtrasyonu ile reaktör içerisindeki biyokütle konsantrasyonunun yaklaşık 3000 mg/L 'ye kadar çıkarılabildiği görülmüştür.

5.2. Hücresel Bileşenlerin Belirlenmesi Çalışmaları

Karışık mikroalg biyokütlesinin hücresel bileşenlerini oluşturan protein, karbonhidrat ve lipit içeriklerinin karakterizasyonu çalışmaları yürütülmüştür. Evsel atıksu ortamında yetiştirilen ve durgun büyüme fazında hasat edilen mikroalg biyokütlesinin protein ve karbonhidrat içerikleri biyokütle ağırlığı bazında sırasıyla %33 ve %32,6 olarak belirlenmiştir. Literatürde saf türler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışmada kullanılan karışık mikroalg biyokütlesinin protein ve karbonhidrat içeriklerinin literatür ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Ayrıca kuru mikroalg biyokütlesinin ASTM D2015 standart metoduna göre analiz edilen ısı değeri 21,7 MJ/kg olarak bulunmuş ve bu çalışmadaki karışık mikroalg kültürü için ölçülen ısı değerinin, literatürdeki saf kültürlerin ısı değerleri ile benzer olduğu görülmüştür.

Mikroalg biyokütlesinin toplam lipit içeriğinin (polar ve nötral lipit toplamı) belirlenmesi çalışmalarında ise, literatürde de mikroalgal lipitler için en çok kullanılan ve gravimetrik ölçüme dayalı bir metot olan Bligh and Dyer metodu modifiye edilerek uygulanmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarında metodun oluşturulması aşamasında BG-11 besin ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesi kullanılmıştır. Çalışma kapsamında farklı çözücü ve biyokütle oranlarının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları sonucunda Bligh and Dyer metodunun, modifiye edilerek kullanılması ile lipitlerin ekstraksiyonu için uygun ve etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur. Ayrıca hücresel parçalamayı desteklemek ve lipitlerin hücreden ekstraksiyon solventine geçişini kolaylaştırmak amacıyla tez çalışması kapsamında mikrodalga ve ultrases uygulamaları da denenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda ultrases ve mikrodalga hücresel parçalamayı arttırdığı görülmüştür. Mikrodalga uygulaması sonrası gerçekleştirilen lipit ekstraksiyonu verimi %36, ultrases uygulaması sonrası gerçekleştirilen lipit ekstraksiyonu verimi (ultrases süresine bağlı olarak) %24,4 – 38 arasında ölçülmüştür. Bununla birlikte kullanılan hücre parçalama metotları sırasında hücredeki lipitin yanı sıra karbonhidrat ve protein gibi diğer hücre bileşenlerinin de ekstraksiyon solventine geçtiği [Suali and Sarbatly, 2012] düşünülmüş ve sonuç olarak lipit ekstraksiyonu veriminin yüksek ölçüldüğü görülmüştür. Bu durum bir sonraki biyodizel üretimi aşamasında lipitin biyodizele dönüşüm verimini düşüreceği

gibi aynı zamanda ekstraksiyon için fazla enerji tüketimine sebep olmaktadır. Bu nedenle lipit ekstraksiyonu için modifiye Bligh and Dyer metodunun hücresel lipitin ekstraksiyonu için uygun çözücü ve biyokütle oranlarında yeterli olacağı, enerji gerektiren hücre parçalama metotlarına da gerek olmadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda evsel atıksu ortamında yetiştirilen ve zamanla *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürünün durgun fazdaki lipit içeriği $26,2 \pm 0,6$ olarak ölçülmüştür. Ayrıca BG-11 sentetik besin ile beslenmeye başlanılan ve logaritmik (büyüme) fazdaki karışık mikroalg kültürüne ait lipit içeriği ise %26-28 olarak bulunmuştur. Fakat zaman içerisinde BG-11 besin ortamında *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği ve durgun fazdaki kültürün lipit içeriğinin türden ve besin ortamından kaynaklı olarak %26-28'den %18'e düştüğü belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında mikroalg biyokütlesinin toplam lipit (nötral ve polar lipitler) içeriğinin yanısıra nötral lipit (toplam gliseritler: tri-di-monogliseritler) içeriğinin belirlenmesi amacıyla da lipit analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Lipit sınıfı bakımından gliseritler polar lipitlerden daha düşük doymamışlık derecesine sahip ve dolayısıyla biyodizele dönüşüm için daha uygun olduklarından ekstrakte edilen lipit örneklerine GC yöntemi kullanılarak gliserit analizleri yapılmıştır. GC'de TG (toplam gliserit) analizleri hem evsel atıksu ortamında (*Scenedesmus sp.* baskın), hem de BG-11 besin ortamında (*Chlorococcum sp.* baskın) yetiştirilen karışık mikroalg biyokütleleri için gerçekleştirilmiştir. Buna göre 25 mg kuru biyokütlelerden Bligh and Dyer metodu ile ekstrakte edilen mikroalg lipit örneklerinin TG içerikleri, %26 lipit içeriğine sahip *Scenedesmus* türleri için %74,4 (g TG/g lipit), %18 lipit içeriğine sahip *Chlorococcum* türleri için %70 (g TG/g lipit) olarak bulunmuştur. Mikroalg lipitlerin içerdiği TG miktarının yüksek olması sebebiyle, özellikle evsel atıksu ortamında üretilen türlerin biyodizele dönüşüm için uygun oldukları sonucuna varılmıştır.

5.3. Transesterifikasyon Çalışmaları

Kuru mikroalg biyokütlesinden biyodizel üretiminde asit katalizörlü üç farklı transesterifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Mikroalglerden yüksek verimde biyodizel elde etmek amacıyla denenen yöntemler; ekstraksiyon-transesterifikasyon (iki aşamalı), direk (in-situ) transesterifikasyon (tek aşamalı) ve mikrodalga destekli in-situ transesterifikasyon uygulamalarından oluşmaktadır.

- Ekstraksiyon-Transesterifikasyon Deneylelerinden Elde Edilen Sonuçlar

Transesterifikasyon uygulamalarının yürütüldüğü çalışmalarda ilk olarak iki aşamalı transesterifikasyon olarak tanımlanan biyokütleden lipitin ekstraksiyonu (Bligh and Dyer yöntemi ile) ve ardından lipitin transesterifikasyon reaksiyonu ile YAME'e dönüştürülmesi denenmiştir. Geleneksel ısıtma (su banyosu) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen iki aşamalı transesterifikasyon denemeleri, atıksu ortamında ve BG-11 besin ortamında yetiştirilen kuru mikroalg biyokütleleri için değerlendirilmiştir. Reaksiyon parametrelerinde optimizasyona gidilmeden, sadece literatürdeki iki ekstraksiyon-transesterifikasyon yönteminden [Johnson and Wen, 2009], [Abou-Shanab et al., 2011] faydalanılarak gerçekleştirilen deneylerde, elde edilen YAME verimlerinin genel olarak düşük olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda elde edilen en yüksek biyodizel (YAME) verimleri (Deneme 2) değerlendirildiğinde, atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg (*Scenedesmus sp.* baskın) biyokütlesinin dönüşüm veriminin %24-%36 (YAME/lipit), BG-11 besin ortamındaki karışık mikroalg (*Chlorococcum sp.* baskın) biyokütlesinin dönüşüm veriminin ise %12-%16 (YAME/lipit) olduğu bulunmuştur. Aynı metot için (Deneme 2) mikroalg lipitlerinin içerdiği TG miktarı baz alınarak elde edilen YAME verimleri ise *Scenedesmus* türleri için %32-%48 (YAME/TG) *Chlorococcum* türleri için %17-%23 (YAME/TG) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar iki mikroalg kültürüne ait lipitlerin içerdiği TG miktarları yüksek olmasına karşın, bu çalışmada uygulanan transesterifikasyon metotları ve şartları için yüksek biyodizel (YAME) verimleri sağlanamadığını göstermiştir. Kinetik açıdan reaksiyonunu hızlandırmak amacıyla deneylerde kullanılan yüksek katalizör konsantrasyonları ve yüksek reaksiyon sıcaklıklarının (90°C) düşük YAME verimlerine neden olduğu düşünülmektedir.

Transesterifikasyon sonrası elde edilen YAME bileşiminin belirlenmesi için yapılan GC analizleri sonucunda ise *Scenedesmus* türleri ve *Chlorococcum* türlerinin baskın olduğu karışık mikroalg kültürlerinin YAME bileşiminde; palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1) ve linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asit metil esterleri bileşenlerinin ortak ve baskın olduğu bulunmuştur. İki mikroalg kültürü ortak YAME bileşimine sahip olmalarına rağmen, bireysel YAME kompozisyonlarının (miktarları) türe ve büyüme ortamına bağlı olarak birbirlerine göre değişiklik gösterdiği bulunmuştur.

- Direkt (in-situ) Transesterifikasyon Deneylelerinden Elde Edilen Sonuçlar

Çalışma kapsamında denenen bir diğer yöntem kuru mikroalg biyokütlesinden lipitlerin tek adımda ekstrakte edildiği ve biyodizele (YAME) dönüşümünün sağlandığı direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemidir. Direkt (in-situ) transesterifikasyon deneyleri metanol ve sülfürik asit (H₂SO₄) varlığında, geleneksel ısıtma (su banyosu) yöntemi kullanılarak, evsel atıksu ikincil arıtım çıkış suyunda yetiştirilen kuru mikroalg biyokütlesi (*Scenedesmus sp.* baskın) için gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı ekstraktif-transesterifikasyon prosesi olarak da tanımlanan bu yöntemde, hücrelerin parçalanmasını desteklemek ve hücre içindeki lipitin ekstraksiyonunu arttırmak amacıyla kloroform ve n-hekzan co-solvent olarak reaksiyon karışımında kullanılmıştır. Aynı reaksiyon şartlarında (5 mL metanol, 4 mL co-solvent ve 50 µL H₂SO₄ ve 65°C sabit sıcaklıkta) farklı co-solventlerin YAME verimi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Sabit reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen deneyler sonucunda, co-solvent olarak kloroform ile n-hekzana kıyasla daha yüksek YAME verimleri elde edilmiştir. n-Hekzana göre kloroformun ekstraksiyon performansının yüksek olduğu ve dolayısıyla kloroformun kullanıldığı reaksiyon ortamında daha yüksek YAME dönüşümü sağlandığı gözlenmiştir. Reaksiyon süresinin YAME verimi üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise, genel olarak reaksiyon süresinin arttırılması ile kloroform ve hekzan için YAME verimlerinde artış olduğu görülmüştür. En yüksek YAME verimleri kloroform kullanıldığında %82,1±3,9 (YAME/lipit), n-hekzan kullanıldığında ise %55,3±3,9 (YAME/lipit) olarak 7 saatlik reaksiyon süresinde elde edilmiştir. Fakat bu süreden fazla devam eden reaksiyon süresinde YAME verimlerinin her iki co-solvent kullanımı için azaldığı görülmüştür. YAME verimlerindeki azalmanın, 7 saatten sonraki reaksiyon sürelerinde sülfürik asit ile serbest yağ asitlerinin

parçalanmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu durum ayrıca geri devirli bir reaksiyon olan transesterifikasyonda, reaksiyonda aşırı metanol kullanımına bağlı olarak reaksiyonun girenler yönüne kayması ve dolayısıyla YAME veriminin düşmesi ile de açıklanabilmektedir.

Çalışma kapsamında atıksu ortamında yetiştirilen karışık mikroalg biyokütlesinden direkt (in-situ) transesterifikasyon uygulaması ile elde edilen YAME verimleri, ekstraksiyon-transesterifikasyon uygulamaları ile elde edilen verimlerden yüksek bulunmuştur. Literatürde de benzer şekilde in-situ transesterifikasyon yöntemi ile ekstraksiyon-transesterifikasyon yöntemine göre daha yüksek biyodizel verimleri elde edildiğini bildiren çok sayıda çalışma rapor edilmiştir.

• MD Destekli Direkt (in-situ) Transesterifikasyon Deneylerinden Elde Edilen Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında mikroalg biyokütlesinden kısa reaksiyon sürelerinde yüksek biyodizel dönüşümleri sağlamak amacıyla MD destekli direkt (in-situ) transesterifikasyon yöntemi denenmiştir. Deneylerde metanol, kloroform ve asit (H_2SO_4) katalizör miktarları, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı parametrelerinin YAME verimi üzerine etkisi incelenmiştir. MD deneylerinde co-solvent olarak daha iyi lipit ekstraksiyon performansı göstermesi nedeniyle sadece kloroformun etkisi değerlendirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda artan katalizör miktarı, metanol miktarı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı parametrelerinin YAME verimi üzerine pozitif etkisinin, kloroformun ise negatif etkisinin olduğu görülmüştür. MD destekli direkt transesterifikasyon çalışmaları sonucu elde edilen en yüksek YAME verimleri reaksiyon süresi 20. ve 25. dakikalar için sırasıyla %89,1±1,8 ve %93,0±4,1 olarak ve reaksiyon sıcaklığı 100-120°C için sırasıyla 90,9±2,7 ve %91,9±0,5 olarak bulunmuştur.

MD destekli transesterifikasyon yöntemi çalışmada kullanılan diğer transesterifikasyon yöntemleri ile kıyaslandığında, MD uygulaması ile oldukça kısa reaksiyon sürelerinde (20-25 dk) yüksek biyodizel verimleri elde edilmiştir. Sonuç olarak mikroalglerden biyodizel üretiminde MD destekli in-situ transesterifikasyon yönteminin, geleneksel ısıtmayı (su banyosu) kullanan transesterifikasyon yöntemine göre lipitleri biyodizele dönüştürmede daha etkili olduğu görülmüştür.

5.4. Mikroalgal Biyodizelin Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

Evsel atıksu arıtma tesisi ikincil arıtım çıkış suyunda üretilen karışık mikroalg kültüründen transesterifikasyon yöntemi ile elde edilen biyodizel ürününün YAME profilinde, palmitik (C16:0), palmitoleik (C16:1), stearik (C18:0), oleik (C18:1), linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) asit metil esteri içeriklerinin baskın olduğu bulunmuştur. Ayrıca YAME bileşimindeki doymuş ve tekli doymamış yağ asidi miktarları toplamı, çoklu doymamış yağ asidi miktarından yüksektir. Çalışma sonuçları yüksek oranda toplam lipit ve TG içeriğine sahip olan bu karışık kültürün, iyi kalitede biyodizel üretimi için uygun ve sürdürülebilir bir hammadde kaynağı olabilecek yağ asidi kompozisyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Çalışma sonuçları ayrıca evsel atıksu arıtma tesisi ikincil arıtım deşarj suyuna adapte olarak üreyen karışık kültürün, sentetik besin ve temiz su kullanarak üretilen saf kültürlerle benzer kalitede ve miktarda lipit ürettiğini ve dolayısıyla daha az maliyetli bir alternatif ortaya koyduğunu göstermiştir.

Atıksu ortamında üretilen mikroalg biyokütlesinin transesterifikasyon reaksiyonu ile biyodizele dönüştürülmesi prosesinde, biyokütle üretim maliyetinin düşürülmesi tüm proses maliyeti açısından önemli bir uygulamadır. Üstelik atıksuda üretilen biyokütlenin biyodizele dönüştürüldükten sonra, kalan atık kısmının yakılması ile de enerji elde edilebilmesi mümkündür. Bu sayede hem enerji üretimi sağlanmış, hem de procesten kaynaklı atık miktarı da azaltılmış olacaktır.

Evsel atıksu arıtma tesisi deşarj suyu haricinde, azot ve fosfor konsantrasyonları yüksek olan farklı atıksular da (anaerobik çürütücü çıkış suyu gibi) mikroalg üretimi için kullanılabilir. Mikroalgler için gerekli inorganik karbon kaynağı ise çürütücüden çıkan CO₂ gazı kullanılarak sağlanabilir.

KAYNAKLAR

Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A. A., Ibraheem I. B. M., (2012), "Microalgae and wastewater treatment", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19 (3), 257-275.

Abou-Shanab R. A. I., (2015), "Green renewable energy for sustainable socio-economic development", 14th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece, 3-5 September.

Abou-Shanab, R. A. I., Hwang, J. H., Cho, Y., Min, B., Jeon, B. H., (2011), "Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production", *Applied Energy*, 88 (10), 3300-3306.

Ahmad F., Khan A. U., Yasar A., (2013), "Transesterification of oil extracted from different species of algae for biodiesel production", *African Journal of Environmental Science and Technology*, 7 (6), 358-364.

Ahmad M., Rashid S., Khan M. A., Zafar M., Sultana S., (2009), "Optimization of base catalyzed transesterification of peanut oil biodiesel", *African Journal of Biotechnology* 8 (3), 441-446.

Aitken D., Antizar-Ladislao B., (2012), "Achieving a green solution: Limitations and focus points for sustainable algal fuels", *Energies*, 5 (5), 1613-1647.

APHA (American Public Health Association), (2005), "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21st Edition, American Public Health Association.

Araujo G. S., Matos L. J., Gonçalves L. R., Fernandes F. A., Farias W. R., (2011), "Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains", *Bioresource technology*, 102 (8), 5248-5250.

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

Azcan N., Yilmaz O., (2013), "Microwave assisted transesterification of waste frying oil and concentrate methyl ester content of biodiesel by molecular distillation", *Fuel*, 104, 614-619.

Balat M., (2005), "Use of biomass sources for energy in Turkey and a view to biomass potential", *Biomass and Bioenergy*, 29 (1), 32-41.

Banerjee A., Chakraborty R., (2009), "Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production-A review", *Resources, Conservation and Recycling*, 53 (9), 490-497.

Barnwal B. K., Sharma M. P., (2005), "Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9 (4), 363-378.

Barros A. I., Gonçalves A. L., Simões M., Pires J. C. M., (2015), "Harvesting techniques applied to microalgae: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489-1500.

Becker E. W., (1994), *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, 1st Edition, Cambridge University Press.

Bertozzini E., Galluzzi L., Penna A., Magnani M., (2011), "Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red", *Journal of Microbiological Methods*, 87 (1), 17-23.

Biller P., Ross A. B., Skill S. C., Lea-langton A., Balasundaram B., Hall C., Riley R., Llewellyn C. A., (2012), "Nutrient recycling of aqueous phase for microalgae cultivation from the hydrothermal liquefaction process", *Algal Research*, 1 (1), 70-76.

Biller P., Ross B., (2011), "Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content.", *Bioresource Technology*, 102 (1), 215-25.

Bligh E.G., Dyer W. J. A., (1959), "Rapid method of total lipid extraction and purification", *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37 (8), 911-915.

Borowitzka M. A., (1999), "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters", *Journal of Biotechnology*, 70, 313-321.

Bosma R., van Spronsen W. A., Tramper J., Wijffels, R. H., (2003), "Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae", *Journal of Applied Phycology*, 15(2), 143-153.

Brennan L., Owende P., (2010), "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2), 557-577.

Bucy H. B., Baumgardner M. E., Marchese A. J., (2012), "Chemical and physical properties of algal methyl ester biodiesel containing varying levels of methyl eicosapentaenoate and methyl docosahexaenoate", *Algal Research*, 1 (1), 57-69.

Carvalho A. P., Malcata F. X., (2005), "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Marine Lipids: Insight Studies", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5049-5059.

Chakraborty R., Bepari S., Banerjee A., (2010), "Transesterification of soybean oil catalyzed by fly ash and egg shell derived solid catalysts", *Chemical Engineering Journal*, 165 (3), 798-805.

Chen C. L., Huang C. C., Ho K. C., Hsiao P. X., Wu M. S., Chang J. S., (2015), "Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes", *Bioresource technology*, 194, 179-186.

Chen C. Y., Yeh K. L., Aisyah R., Lee D. J., Chang J. S., (2011a), "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review", *Bioresource Technology*, 102 (1), 71-81.

Chen W., Sommerfeld M., Hu Q., (2011b), "Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae.", *Bioresource Technology*, 102 (1), 135-141.

Chen Y. H., Huang B. Y., Chiang T. H., Tang T. C., (2012), "Fuel properties of microalgae (*Chlorella protothecoides*) oil biodiesel and its blends with petroleum diesel", *Fuel*, 94, 270-273.

Cheng C. H., Du T. B., Pi H. C., Jang S. M., Lin Y. H., Lee H. T., (2011), "Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂", *Bioresource Technology*, 102 (21), 10151-10153.

Cheng J., Huang R., Li T., Zhou J., Cen K., (2014), "Biodiesel from wet microalgae: Extraction with hexane after the microwave-assisted transesterification of lipids", *Bioresource Technology*, 170, 69-75.

Cheng J., Yu T., Li T., Zhou J., Cen K., (2013), "Using wet microalgae for direct biodiesel production via microwave irradiation", *Bioresource Technology*, 131, 531-535.

Cheng Y. L., Juang Y. C., Liao G. Y., Ho S. H., Yeh K. L., Chen C. Y., Chang J. S., Liu J. C., Lee D. J., (2010), "Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*", *Bioresource Technology*, 101 (23), 9092-9096.

Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R. W., Das K. C., (2010), "Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications", *Bioresource Technology*, 101 (9), 3097-3105.

Chisti Y., (2007), "Biodiesel from microalgae.", *Biotechnology Advances*, 25 (3), 294-306.

Chisti Y., (2008)., "Biodiesel from microalgae beats bioethanol" *Trends in biotechnology*, 26 (3), 126-131.

Cho S., Luong T. T., Lee D., Oh Y. K., Lee T., (2011), "Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production", *Bioresource Technology*, 102 (18), 8639-8645.

Christie W. W., (1993), "Preparation of lipid extracts from tissues", *Advances in Lipid Methodology*, 2, 195-213.

Cooksey K. E., Guckert, J. B., Williams S. A., Callis P. R., (1987), "Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red", *Journal of Microbiological Methods*, 6, 333-345.

Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., Cintas P., (2008), "Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves", *Ultrasonics sonochemistry*, 15 (5), 898-902.

Cui Y., Liang Y., (2014), "Direct transesterification of wet *Cryptococcus curvatus* cells to biodiesel through use of microwave irradiation", *Applied Energy*, 119, 438-444.

Çengelci E., Bayrakçeken H., Aksoy F., (2011), "Hayvansal ve Bitkisel Yağlardan Elde Edilen Biyodizelin Dizel Yakıtı ile Karşılaştırılması, Taşıt Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3 (1), 41-53.

Dai Y. M., Chen K. T., Chen C. C., (2014), "Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production", *Chemical Engineering Journal*, 250, 267-273.

De Oliveira, M. A. C. L., Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G., and Leite, S. G. F. (1999), "Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures", *Aquaculture international*, 7 (4), 261-275.

de Souza Silva A. P. F., Costa M. C., Lopes A. C., Neto E. F. A., Leitao R. C., Mota C. R., dos Santos A. B., (2014), "Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae", *Renewable Energy*, 63, 762-766.

Del Campo J. A., Gonzalez M. G., Guerrero M. G., (2007), "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1163-74.

Demirbaş A., (2009), "Production of biodiesel from algae oils", *Energy Sources*, 31 (2), 163-168.

Demirbaş A., (2011), "Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems", *Applied Energy*, 88 (10), 3541-3547.

Doan T. T. Y., Sivaloganathan B., Obbard J. P., (2011), "Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock", *Biomass and Bioenergy*, 35 (7), 2534-2544.

Dong T., Wang J., Miao C., Zheng Y., Chen S., (2013), "Two-step in situ biodiesel production from microalgae with high free fatty acid content", *Bioresource Technology*, 136, 8-15.

Dragone G., Fernandes B., Vicente A., Teixeira J., (2010), "Third generation biofuels from microalgae", *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1355-1366.

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., (1956), "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

Ehimen E. A., Sun Z. F., Carrington C. G., (2010), "Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids", *Fuel*, 89 (3), 677-684.

Ehimen E. A., Sun Z., Carrington G. C., (2012), "Use of ultrasound and co-solvents to improve the in-situ transesterification of microalgae biomass", *Procedia Environmental Sciences*, 15, 47-55.

El-Moneim A., Afify M. R., Shalaby E.A., Shanab S. M. M., (2010), "Enhancement of biodiesel production from different species of algae", *Grasas Y Aceites*, 61, 416–22.

Else D., Jameson D., Raleigh B., Cooney, M. J., (2007), "Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids", *Journal of Microbiological Methods*, 68 (3), 639-642.

EN14105, (2003), Fat and oil derivatives-Fatty acid methyl Esters (FAME) Determination of Free and Total Glycerol and Mono-, Di- and Triglyceride Content European Committee for Standardization, EN 14105, European Standard.

FAO, (2009), "Algae-based Biofuels: A Review of Challenges and Opportunities for Developing Countries" Environment, Climate Change and Bioenergy Division, Rome, Pp. 59.

Ferraz T. P. L., Fiuza M. C., Dos Santos M. L. A., De Carvalho L. P., Soares N. M., (2004), "Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 58 (3), 187-193.

Field C. B., Campbell J. E., Lobell D. B., (2008), "Biomass energy: the scale of the potential resource", *Trends in Ecology and Evolution*, 23 (2), 65-72.

Georgogianni K. G., Katsoulidis A. P., Pomonis P. J., Kontominas M. G., (2009), "Transesterification of soybean frying oil to biodiesel using heterogeneous catalysts", *Fuel Processing Technology*, 90 (5), 671-676.

Gouveia L., Oliveira A. C., (2009), "Microalgae as a raw material for biofuels production", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (2), 269-274.

Guldhe A., Singh B., Rawat I., Bux F., (2014), "Synthesis of biodiesel from *Scenedesmus* sp. by microwave and ultrasound assisted in situ transesterification using tungstated zirconia as a solid acid catalyst", *Chemical Engineering Research and Design*, 92 (8), 1503-1511.

Gürol M. D., (2013), "Mikroalglerden Biyodizel Üretiminde Yenilikçi (Innovative) Yaklaşımlar", Proje No: ÇAYDAG-109Y296, (2010-2013 dönemi), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Türkiye.

Haas M. J., Wagner K., (2011), "Simplifying biodiesel production: The direct or in situ transesterification of algal biomass", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113 (10), 1219-1229.

Halim R., Danquah M. K., Webley P. A., (2012a), "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review", *Biotechnology Advances*, 30 (3), 709-732.

Halim R., Gladman B., Danquah M. K., Webley P. A., (2011), "Oil extraction from microalgae for biodiesel production", *Bioresource Technology*, 102 (1), 178-185.

Halim R., Harun R., Danquah M. K., Webley P. A., (2012b), "Microalgal cell disruption for biofuel development", *Applied Energy*, 91 (1), 116-121.

Hanna M., Hanna M., (1999), "Biodiesel production: a review", *Bioresource Technology*, 70, 1-15.

Harun R., Singh M., Forde G. M., Danquah M. K., (2010), "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (3), 1037-1047.

Hincapie G. M., Valange S., Barrault J., Moreno J. A., Lopez D. P., (2014), "Effect of microwave-assisted system on transesterification of castor oil with ethanol", *Universitas Scientiarum*, 19 (3), 193-200.

Holcapek M., Jandera P., Fischer J., Prokes B., (1999), "Analytical monitoring of the production of biodiesel by highperformance liquid chromatography with various detection methods", *Journal of Chromatography A*, 858, 13-31.

Hossain S. A. B. M., 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.

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A., (2008), "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances.", *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 54 (4), 621-639.

Huang G., Chen F., Wei D., Zhang X., Chen G., (2010), "Biodiesel production by microalgal biotechnology", *Applied Energy*, 87 (1), 38-46.

Hughes E., Benemann J. R., (1997), "Biological fossil CO₂ Mitigation", *Energy Conversion and Management*, 38, 467-473.

Hulatt C. J., Lakaniemi A. M., Puhakka J. A., Thomas D. N., (2012), "Energy Demands of Nitrogen Supply in Mass Cultivation of Two Commercially Important Microalgal Species, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*", *Bioenergy Research*, 5 (3), 669-684.

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.

Im H., Lee H., Park M. S., Yang J. W., Lee J. W., (2014), "Concurrent extraction and reaction for the production of biodiesel from wet microalgae", *Bioresource Technology*, 152, 534-537.

Iqbal J., Theegala C., (2013), "Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent", *Algal Research*, 2 (1), 34-42.

Islam M. A., Ayoko G. A., Brown R., Stuart D., Heimann K., (2013), "Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel", *Procedia Engineering*, 56, 591-596.

Isleten-Hosoglu M., Gultepe I., Elibol M., (2012), "Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content", *Biochemical Engineering Journal*, 61, 11-19.

Jacob-Lopes E., Guillermo L., Mérida R., Queiroz M. I., Zepka L. Q., (2015), "Microalgal Biorefineries". In: E. Jacob-Lopez, L. Q. Zepka, Editors, "Biomass production and Uses", InTech.

Jain S., Sharma M. P., (2010), "Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (9), 3140-3147.

Johnson M. B., Wen Z., (2009), "Production of biodiesel fuel from the microalga *schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass", *Energy and Fuels*, 23 (10), 5179-5183.

Kanda H., Li P., Ikehara T., Yasumoto-Hirose M., (2012), "Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties", *Fuel*, 95, 88-92.

Kaur S., Sarkar M., Srivastava R. B., Gogoi H. K., Kalita M. C., (2012), "Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production", *New Biotechnology*, 29 (3), 332-344.

Keriş-Şen U. D., Şen U., Soydemir G., Gurol M. D., (2014), "An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency", *Bioresource Technology*, 152, 407-413.

Kim B., Im H., Lee J. W., (2015), "In situ transesterification of highly wet microalgae using hydrochloric acid", *Bioresource Technology*, 185, 421-425.

Kim J., Yoo G., Lee H., Lim J., Kim K., Kim C. W., Park M. S., Yang J. W., (2013), "Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances*, 31 (6), 862-876.

Kim Y. H., Choi Y. K., Park J., Lee S., Yang Y. H., Kim H. J., Park T. J., Hwan Kim Y., Lee S. H., (2012), "Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass", *Bioresource Technology*, 109, 312-315.

Kimura K., Yamaoka M., Kamisaka Y., (2004), "Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence", *Journal of Microbiological Methods*, 56 (3), 331-338.

Knothe G., (2005), "Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters", *Fuel Processing Technology*, 86 (10), 1059-1070.

Knothe G., (2008), "'Designer' biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties", *Energy and Fuels*, 22 (2), 1358-1364.

Knothe G., (2009), "Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition", *Energy and Environmental Science*, 2 (7), 759-766.

Koberg M., Cohen M., Ben-Amotz A., Gedanken A., (2011), "Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation", *Bioresource Technology*, 102 (5), 4265-4269.

Komolafe O., Velasquez Orta S. B., Monje-Ramirez I., Noguez I. Y., Harvey A. P., Orta Ledesma M. T., (2014), "Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater", *Bioresource Technology*, 154, 297-304.

Kong Q., Li L., Martinez B., Chen P., Ruan R., (2010), "Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (1), 9-18.

Kumar P., Suseela M. R., Toppo K., (2011), "Physico-Chemical Characterization of Algal oil : a Potential Biofuel", *Asian Journal of Experimental Biological Sciences* 2(3),2011 493-497.

Kumar V., Muthuraj M., Palabhanvi B., Ghoshal A. K., Das D., (2014), "Evaluation and optimization of two stage sequential in situ transesterification process for fatty acid methyl ester quantification from microalgae", *Renewable Energy*, 68, 560-569.

Lam M. K., Lee K. T., (2012), "Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward", *Biotechnology advances*, 30 (3), 673-690.

Lee J. Y., Yoo C., Jun S.Y., Ahn C. Y., Oh H. M., (2010), "Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae.", *Bioresource Technology*, 101 Suppl (1), 75-77.

Lei X., Chen Y., Shao Z., Chen Z., Li Y., Zhu H., Zhang J., Zheng W., Zheng T., (2015), "Effective harvesting of the microalgae *Chlorella vulgaris* via flocculation-flotation with bioflocculant", *Bioresource Technology*, 198, 922-925.

Lewis T., Nichols P. D., McMeekin T. A., (2000) "Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs", *Journal of Microbiological Methods*, 43, 107-116.

Li Y., Chen Y.-F., Chen P., Min M., Zhou W., Martinez B., Zhu J., Ruan R., (2011), "Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production.", *Bioresource Technology*, 102 (8), 5138-5144.

Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N., Lan C. Q., (2008), "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (4), 629-636.

Lim J. K., Chieh D. C. J., Jalak S. A., Toh P. Y., Yasin N. H. M., Ng B. W., Ahmad A. L., (2012), "Rapid magnetophoretic separation of microalgae", *Small*, 8 (11), 1683-1692.

Liu Z. Y., Wang G. C., Zhou B. C., (2008a), "Effect of iron growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*", *Bioresource Technology*, 99, 4717-4722.

Liu X., He H., Wang Y., Zhu S., Piao, X., (2008b), "Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst", *Fuel*, 87 (2), 216-221.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L. A., Randall R. J., (1951), "Protein measurement with the folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Ma G., Hu W., Pei H., Jiang L., Song M., Mu R., (2015), "In situ heterogeneous transesterification of microalgae using combined ultrasound and microwave irradiation", *Energy Conversion and Management*, 90, 41-46.

Maceiras R., Rodríguez M., Cancela A., Urréjola S., Sánchez A., (2010), "Macroalgae: Raw material for biodiesel production", *Applied Energy*, 88 (10), 3318-3323.

Maity J. P., Bundschuh J., Chen C. Y., Bhattacharya P., (2014), "Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review", *Energy*, 78, 104-113.

Makareviciene P. D. V., Andruleviciute V., Skorupskaitė V., Kasperovicienė J., (2011), "Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock", *Environmental Research, Engineering and Management*, 57 (3), 21-27.

Mandal S., Mallick N., (2009), "Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (2), 281-291.

Mandal S., Patnaik R., Singh A. K., Mallick N., (2013), "Comparative assessment of various lipid extraction protocols and optimization of transesterification process for microalgal biodiesel production", *Environmental Technology*, 34 (13-14), 2009-2018.

Mandotra S. K., Kumar P., Suseela M. R., Nayaka S., Ramteke P. W., (2016), "Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities", *Bioresource Technology*, 201, 222-229.

Mansour M. P., (2005), "Reversed-phase high-performance liquid chromatography purification of methyl esters of C16-C28 polyunsaturated fatty acids in microalgae, including octacosaoctanoic acid [28:8(n-3)]", *Journal of Chromatography A*, 1097 (1-2), 54-58.

Martinez-Guerra E., Gude V. G., Mondala A., Holmes W., Hernandez R., (2014a), "Extractive-transesterification of algal lipids under microwave irradiation with hexane as solvent", *Bioresource Technology*, 156, 240-247.

Martinez-Guerra E., Gude V. G., Mondala A., Holmes W., Hernandez R., (2014b), "Microwave and ultrasound enhanced extractive-transesterification of algal lipids", *Applied Energy*, 129, 354-363.

Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S., (2010), "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (1), 217-232.

McKendry P., (2002), "Energy production from biomass (part 2): conversion technologies", *Bioresource Technology*, 83 (1), 47-54.

Mecozzi M., Amici M., Romanelli G., Pietrantonio E., Deluca A., (2002), "Ultrasound extraction and thin layer chromatography-flame ionization detection analysis of the lipid fraction in marine mucilage samples", *Journal of Chromatography A*, 963, 363-373.

Meher L. C., Vidya Sagar D., Naik S.N., (2006), "Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10 (3), 248-268.

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.

Misra R., Guldhe A., Singh P., Rawat I., Bux F., (2014), "Electrochemical harvesting process for microalgae by using nonsacrificial carbon electrode: A sustainable approach for biodiesel production", *Chemical Engineering Journal*, 255, 327-333.

Molina Grima E., Belarbi E.-H., Ación Fernández F. G., Robles Medina a, Chisti Y., (2003), "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics.", *Biotechnology Advances*, 20 (7), 491-515.

Moser B. R., (2009), "Biodiesel production, properties, and feedstocks", *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45 (3), 229-266.

Mostafa S. S. M., Shalaby E. A., Mahmoud G. I., (2012), "Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production", *Notulae Scientia Biologicae*, 4 (1), 56-65.

Nagle N., Lemke P., (1990), "Production of methyl ester fuel from microalgae", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-25 (1), 355-361.

Naik S. N., Goud V. V., Rout P. K., Dalai A. K., (2010), "Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2), 578-597.

Najafabadi H. A., Vossoughi M., Pazuki G., (2015), "The role of co-solvents in improving the direct transesterification of wet microalgal biomass under supercritical condition", *Bioresource Technology*, 193, 90-96.

Negoro M., Shioji N., Miyamoto K., Miura Y., (1991), "Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SO_x and NO_x", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29, 877-86.

Nigam P. S., Singh A., (2011), "Production of liquid biofuels from renewable resources", *Progress in Energy and Combustion Science*, 37 (1), 52-68.

Orpez R., Martinez M. E., Hodaifa G., El Yousfi F., Jbari N., Sanchez S., (2009), "Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage", *Desalination*, 246 (1-3), 625-630.

Oswald W. J., (1963), "Light efficiency of algae grown in sewage", *American Society of Civil Engineers*, 128, 47-83.

Oswald W. J., Golueke C. G., (1960), "Biological transformation of solar energy", *Advance Applied Microbiology*, 2, 223-62.

Oswald W. J., Golueke C. G., (1962), "The coming industry of controlled photosynthesis", *American Journal of Public Health*, 52, 235-42.

Ötles S., Pire, R., (2001)., "Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species", *Journal of AOAC International*, 84 (6), 1708-1714.

Panwar N. L., Kaushik S. C., Kothari S., (2011), "Role of renewable energy sources in environmental protection: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15 (3), 1513-1524.

Park J. Y., Park M. S., Lee Y. C., Yang J. W., (2015), "Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass", *Bioresource Technology*, 184, 267-275.

Patil P. D., Gude V. G., Mannarswamy A., Cooke P., Munson-McGee S., Nirmalakhandan N., Lammers P., Deng S., (2011), "Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology", *Bioresource Technology*, 102 (2), 1399-1405.

Patil P. D., Gude V. G., Mannarswamy A., Cooke P., Nirmalakhandan N., Lammers P., Deng S., (2012), "Comparison of direct transesterification of algal biomass under supercritical methanol and microwave irradiation conditions", *Fuel*, 97, 822-831.

Patil P. D., Reddy H., Muppaneni T., Ponnusamy S., Cooke P., Schuab T., Deng S., (2013), "Microwave-mediated non-catalytic transesterification of algal biomass under supercritical ethanol conditions", *Journal of Supercritical Fluids*, 79, 67-72.

Picardo M. C., De Medeiros J. L., Monteiro J. G. M., Chaloub R. M., Giordano M., De Queiroz Fernandes Araújo O., (2013), "A methodology for screening of microalgae as a decision making tool for energy and green chemical process applications", *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15 (2), 275-291.

Pittman J. K., Dean A. P., Osundeko O., (2011), "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources", *Bioresource Technology*, 102 (1), 17-25.

Prabakaran P., Ravindran, A. D., (2011), A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, 53 (2), 150-154.

Pragya N., Pandey K. K., Sahoo P. K., (2013), "A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171.

Pruvost J., Van Vooren G., Le Gouic B., Couzinet-Mossion A., Legrand J., (2011), "Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application.", *Bioresource Technology*, 102 (1), 150-158.

Rajvanshi S., Sharma M. P., (2012), "Microalgae: a potential source of biodiesel.", *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 2, 49-59.

Ramos M. J., Fernandez C. M., Casas A., Rodriguez, L., Pérez, A., (2009), "Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties", *Bioresource Technology*, 100 (1), 261-268.

Ranjan A., Patil C., Moholkar V. S., (2010), "Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49 (6), 2979-2985.

Rasoul-Amini S., Montazeri-Najafabady N., Mobasher M. A., Hoseini-Alhashemi S., Ghasemi Y., (2011), "Chlorella sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor", *Applied Energy*, 88 (10), 3354-3356.

Rawat I., Kumar R. R., Mutanda T., Bux, F., (2013), "Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production", *Applied Energy*, 103, 444-467.

Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F., (2011), "Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production", *Applied Energy*, 88 (10), 3411-3424.

Robles Medina A., Molina Grima E., Giménez Giménez A., Ibáñez González M. J., (1998), "Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids", *Biotechnology Advances*, 16 (3), 517-580.

Robles Medina A., Esteban Cerdan L., Gimenez Gimenez A., Camacho Paez B., Ibanez Gonzalez M. J., Molina Grima E., (1999), "Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils", *Progress in Industrial Microbiology*, 70 (1-3), 379-391.

Sanchez A., Maceiras R., Cancela A., Rodriguez M., (2012), "Influence of n-hexane on in Situ transesterification of marine macroalgae", *Energies*, 5 (2), 243-257.

Sanchez E., Ojeda K., El-Halwagi M., Kafarov V., (2011), "Biodiesel from microalgae oil production in two sequential esterification/transesterification reactors: Pinch analysis of heat integration", *Chemical Engineering Journal*, 176, 211-216.

Sathish A., (2012), "Biodiesel Production from Mixed Culture Algae Via a Wet Lipid Extraction Procedure", Master of Science Dissertation, Utah State University.

Sathish A., Sims, R. C., (2012), "Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure" *Bioresource technology*, 118, 643-647.

Say A. N., Keriş Ü. D., Şen Ü., Gürol M. D., (2010), "Mikroalglerden Biyokütle Enerjisi Üretimi ve Türkiye", 8. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu (UTES10), 263-271, Bursa, Türkiye, 1-5 Aralık.

Schlagermann P., Göttlicher G., Dillschneider R., Rosello-Sastre R., Posten C., (2012), "Composition of algal oil and its potential as biofuel", *Journal of Combustion*, 285185, 1-14.

Sharma A., Shinde Y., Pareek V., Zhang D., (2015), "Process modelling of biomass conversion to biofuels with combined heat and power", *Bioresource Technology*, 198, 309-315.

Sharma Y. C., Singh B., Upadhyay S. N., (2008), "Advancements in development and characterization of biodiesel: a review", *Fuel*, 87 (12), 2355-2373.

Shen Y., Pei Z., Yuan W., Mao E., (2009), "Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield", *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2 (1), 51-57.

Sheng J., Vannela R., Rittmann B. E., (2011), "Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803", *Bioresource Technology*, 102 (2), 1697-1703.

Sim T. S., Goh A., Becker E. W., (1988), "Comparison of centrifugation, dissolved air flotation and drum filtration techniques for harvesting sewage-grown algae", *Biomass*, 16 (1), 51-62.

Sims R. E. H., Mabee W., Saddler J. N., Taylor M., (2010), "An overview of second generation biofuel technologies", *Bioresource Technology*, 101 (6), 1570-1580.

Song M., Pei H., Hu W., Ma G., (2013), "Bioresource Technology Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production", *Bioresource Technology*, 141, 245-251.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., (2006), "Commercial applications of microalgae.", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (2), 87-96.

Sprules F. J., and Price D., 1950. "Production of fatty esters". U.S. Patent 2,494,366.

Sturm B. S., Lamer S. L., (2011), "An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production" *Applied Energy*, 88 (10), 3499-3506.

Suali E., Sarbatly R., (2012), "Conversion of microalgae to biofuel", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16 (6), 4316-4342.

Suganya T., Varman M., Masjuki H. H., Renganathan, S., (2016), "Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach" *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909-941.

Sydney E. B., da Silva T. E., Tokarski A., Novak A. C., de Carvalho J. C., Woiciechowski A. L., Larroche C., Soccol C. R., (2011), "Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage", *Applied Energy*, 88 (10), 3291-3294.

Talebi A. F., Mohtashami S. K., Tabatabaei M., Tohidfar M., Bagheri A., Zeinalabedini M., Hadavand Mirzaei H., Mirzajanzadeh M., Malekzadeh Shafaroudi S., Bakhtiari S., (2013), "Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgal strains for biodiesel production", *Algal Research*, 2 (3), 258-267.

Teo C. L., Idris A., (2014), "Evaluation of direct transesterification of microalgae using microwave irradiation", *Bioresource Technology*, 174, 281-285.

Valdez-Ojeda R., Gonzalez-Munoz M., Us-Vazquez R., Narvaez-Zapata J., Chavarria-Hernandez J. C., Lopez-Adrian S., Barahona-Perez F., Toledano-Thompson T., Garduno-Solorzano G., Escobedo-Gracia Medrano R. M., (2015), "Characterization of five fresh water microalgae with potential for biodiesel production", *Algal Research*, 7, 33-44.

Velasquez-Orta S. B., Garcia-Estrada R., Monje-Ramirez I., Harvey A., Orta Ledesma M. T., (2014), "Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and YAME recoveries", *Biomass and Bioenergy*, 70, 356-363.

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

Velasquez-Orta S. B., Lee J. G. M., Harvey A., (2012), "Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*", *Fuel*, 94, 544-550.

Wahidin S., Idris A., Shaleh S. R. M., (2014), "Rapid biodiesel production using wet microalgae via microwave irradiation", *Energy Conversion and Management*, 84, 227-233.

Wahlen B. D., Willis R. M., Seefeldt L. C., (2011), "Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures", *Bioresource Technology*, 102 (3), 2724-2730.

Web 1, (2016), <https://unfcc.int/resource/docs/convkp/conveng.pdf>, (Erişim Tarihi: 08/04/2016).

Web 2, (2016), <http://www.biofueltesting.com/specifications.asp>, (Erişim Tarihi: 19/01/2016).

WEO, World Energy Outlook (2015), "Special Report on Energy and Climate Change", International Energy Agency, Paris, France.

Williams P. J. L. B., Laurens L. M. L., (2010), "Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics and economics", *Energy and Environmental Science*, 3 (5), 554-590.

Wiyarno B., Yunus R. M., Mel M., (2010), "Ultrasound Extraction Assisted (UEA) of Oil from Microalgae (*Nannochloropsis sp.*)", *International Journal of Engineering Science*, 3, 1-5.

Wiyarno B., Yunus R.M., Mel M., (2011), "Extraction of algae oil from *Nannochloropsis sp.*: A study of soxhlet and ultrasonic-assisted extractions", *Journal of Applied Sciences*, 11, 21, 3607-3612.

Wu L. F., Chen P. C., Huang A. P., Lee C. M., (2012), "The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater", *Bioresource Technology*, 113, 14-18.

Xin L., Hong-Ying H., Jia Y., (2010), "Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent", *New Biotechnology*, 27 (1), 59-63.

Xu R., Mi Y., (2011), "Simplifying the process of microalgal biodiesel production through in situ transesterification technology", *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (1), 91-99.

Yang F., Cheng C., Long L., Hu Q., Jia Q., Wu H., Xiang W., Accepted J., (2015), "Extracting Lipids from several species of wet microalgae using ethanol at room temperature", *Energy and Fuels*, 29 (4), 2380-2386.

Yang J., Li X., Hu H., Zhang X., Yu Y., Chen Y., (2011), "Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella ellipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents", *Applied Energy*, 88 (10), 3295-3299.

Yoo C., Jun S. Y., Lee J. Y., Ahn C. Y., Oh H. M., (2010), "Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide", *Bioresource Technology*, 101 (1), 71-74.

Zhang Y., Dube M. A., McLean D., Kates M., (2003), "Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment", *Bioresource Technology*, 89 (1), 1-16.

Zheng G., Li C., Guo L., Ruo W., Wang S., (2012), "Purification of extracted fatty acids from the microalgae *Spirulina*", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 561-566.

Zhu M., Zhou P. P., Yu L. J., (2002), "Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids", *Bioresource Technology*, 84 (1), 93-95.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Balıkesir, Bandırma’da doğan Gülfem SOYDEMİR ilk, orta ve lise öğrenimini Bandırma’da tamamladı. 2002 yılında Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü’nde lisans eğitimini bitirdi. 2003-2005 yılları arasında Bandırma Kocaman Balıkçılık İhr. ve İth. Ltd. Şti.’nde çevre mühendisi olarak görev yaptı. 2005 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında yüksek lisansını tamamlayarak yine Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı’nda doktora programına başladı ve halen akademik çalışmalarına devam etmektedir.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

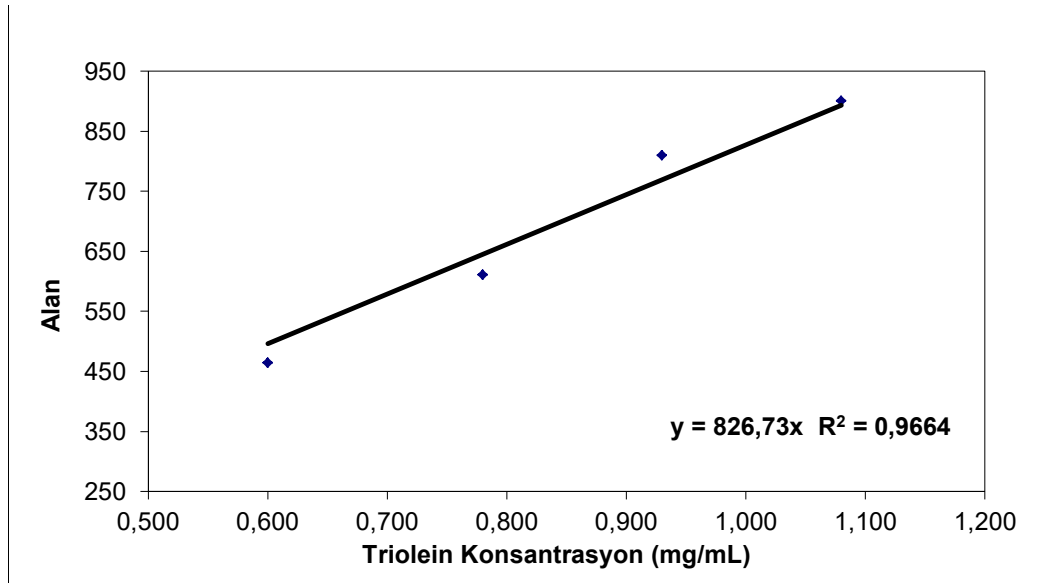
Soydemir G., Keris-Sen U.D. , Sen, U., Gurol M.D., (2016), “Biodiesel production potential of mixed microalgal culture grown in domestic wastewater”, Bioprocess and Biosystems Engineering, 39, (1) 45-51.

EK B: Açıklamalar

GC ile toplam gliserit (TG) analizinin kalibrasyonu için kullanılan standartların içeriği ve bu standartlardan triolein için oluşturulan kalibrasyon grafiği.

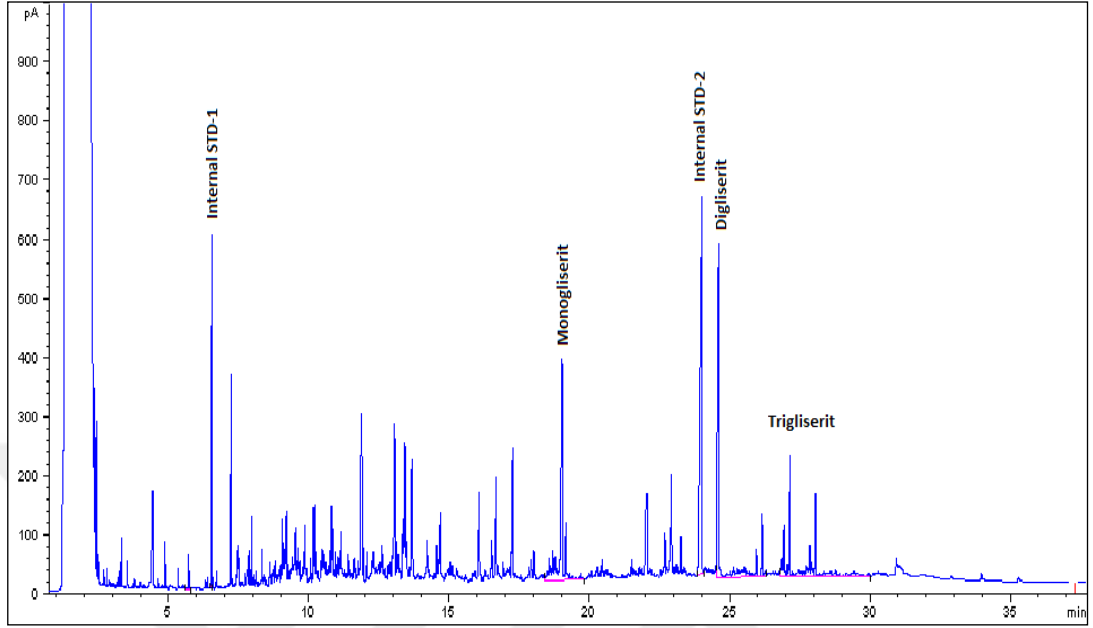
Tablo B1.1: Gliserit kalibrasyonunda kullanılan standartların içeriği

Standard No	Monoolein (µL)	Diöleoin (µL)	Triöleoin (µL)	IS-1 (µL)	IS-2 (µL)	MSTFA (µL)
STD 1	60	150	150	40	50	100
STD 2	94	200	200	40	50	100
STD 3	124	250	250	40	50	100
STD 4	160	300	300	40	50	100

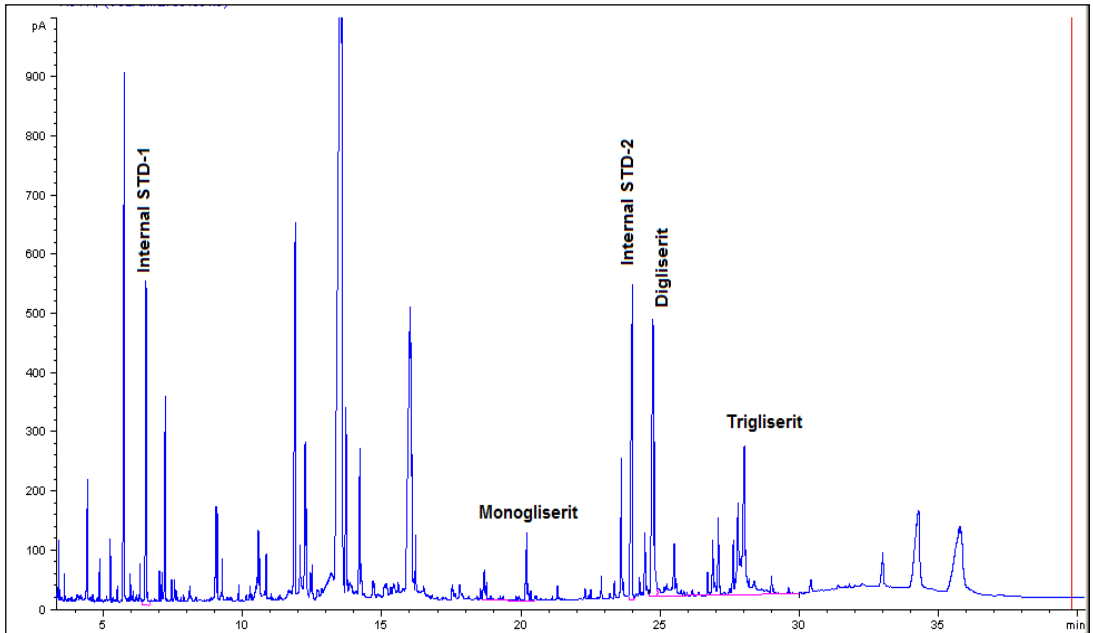


Şekil B1.1: Lipit Analizi için TG Kalibrasyon Grafiği (referans data triolein standardına ait)

Evsel atıksu ortamında yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin ve soya yağı standardının toplam gliserit analizi sonucunda elde edilen GC kromatogramları.

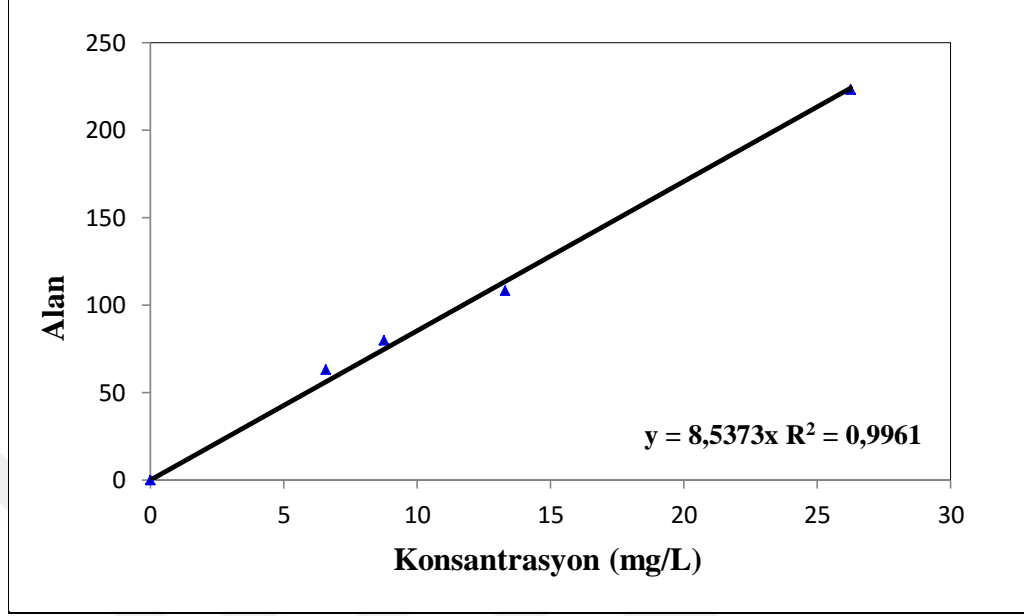


Şekil B1.2: Ekstrakte edilen mikroalg biyokütlesinin gliserit analizi sonucu elde edilen GC kromatogramı



Şekil B1.3: Soya yağının gliserit analizi sonucu elde edilen GC kromatogramı

GC'de YAME analizi için oluşturulan kalibrasyonda, bireysel YAME bileşenlerinden oleik asit metil esterine (C18:1) ait kalibrasyon eğrisi.



Şekil B1.4: YAME için Kalibrasyon Grafiği (referans data oleik asit metil ester standardına ait)

Direkt (in-situ) transesterifikasyon deneylerinden elde edilen YAME verimleri (Reaksiyon şartları: 100 mg kuru mikroalg biyokütlesi için 5 mL metanol, 4 mL co-solvent ve 50 μ L H₂SO₄ karışımı ve 65°C sabit reaksiyon sıcaklığı).

Tablo B1.2: Direkt (in-situ) transesterifikasyonda reaksiyon süresi ve co-solventin (kloroform ve n-hekzan) YAME verimi üzerine etkisi

Reaksiyon süresi (saat)	% YAME (lipit ağırlığı bazında)	
	Kloroform	n-Hekzan
2	61,1±3,3	36,3±3,8
3	65,3±3,8	41,9±3,3
4	63,0±2,7	45,2±2,5
5	65,6±3,3	43,5±2,8
6	69,8±3,3	51,1±3,3
7	82,1±3,9	55,3±3,9
8	73,3±4,9	42,4±2,7