

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROALGLERDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE  
YAĞ ELDESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yiğit AYHAN**

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Kimya Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melek TÜTER**

**ARALIK 2015**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROALGLERDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE  
YAĞ ELDESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yiğit AYHAN  
(506131033)**

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Kimya Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melek TÜTER**

**ARALIK 2015**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506131033 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Yiğit AYHAN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**MİKROALGLERDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE YAĞ ELDESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. Melek TÜTER**  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**        **Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN**  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Prof. Dr. Sevil YÜCEL**  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Teslim Tarihi :**        **27 Kasım 2015**  
**Savunma Tarihi :**    **28 Aralık 2015**



## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her türlü manevi desteğini, anlayışını ve zamanını esirgmeden tüm içtenliğiyle bana yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melek TÜTER'e en derin teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar ve tez çalışmalarım sırasında bana destek veren sevgili arkadaşım Kimya Mühendisi Gülizar BALCIOĞLU'na teşekkürlerimi iletmek isterim.

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her anımda yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Aralık 2015

Yiğit AYHAN  
(Kimya Mühendisi)





## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY .....	xix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>3</b>
2.1 Algler Hakkında Bilgi .....	3
2.2 Mikroalgler.....	6
2.2.1 Mikroalg üretimi .....	6
2.2.2 Mikroalglerin yağı ve kullanım alanları.....	9
2.3 Türkiye'deki Mikroalg Üretimi ve Mikroalgal Enerji Çalışmaları.....	14
2.4 Mikroalglerden Yağ Eldesi .....	15
2.5 Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Yöntemi .....	16
2.6 Literatürde Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	18
<b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>23</b>
3.1 Kullanılan Hammaddeler .....	23
3.2 Yöntemler.....	25
3.2.1 Kullanılan mikroalgin öğütülmesi ve çözücü ekstraksiyonu ile yağ yüzdesinin belirlenmesi .....	25
3.2.2 Deney düzeneğinin oluşturulması.....	25
3.2.3 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesi ve ekstraksiyon veriminin hesaplanması .....	26
<b>4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>29</b>
4.1 Mikroalg'in Yağ İçeriği .....	29
4.2 Deney Ortamının ve Karıştırıcı Tipinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi.....	29
4.3 Mikroalgden Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Yöntemi ile Yağ Eldesinde Ekstraksiyon Verimini Etkileyen Parametrelerinin İncelenmesi.....	31
4.3.1 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde pH değerinin ekstraksiyon verimine etkisi .....	31
4.3.2 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde enzim miktarının ekstraksiyon verimine etkisi .....	32
4.3.3 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisi.....	33
4.3.4 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimine etkisi .....	34
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>37</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>43</b>



## **KISALTMALAR**

<b>V<sub>K</sub></b>	: Enzimatik Yağ Verimi (Kati bakiye üzerinden)
<b>V<sub>S</sub></b>	: Ekstraksiyon Verimi (Sıvı fraksiyonlar üzerinden)
<b>DHA</b>	: Dokosaheksaenoik Asit
<b>EPA</b>	: Eikosapentaenoik Asit
<b>ARA</b>	: Araşidonik Asit
<b>GLA</b>	: γ-Linoleik Asit
<b>AOCS</b>	: Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği(American Oil Chemist' Society)
<b>AU/g</b>	: Anson unit/g



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1</b>	: Açık ve kapalı alg üretim sistemlerinin avantajları ve dezavantajları	8
<b>Çizelge 2.2</b>	: 2010 yılında Dünyada bazı mikroalglerin üretimi .....	9
<b>Çizelge 2.3</b>	: Bazı mikroalg ürünleri ve fiyatları .....	10
<b>Çizelge 2.4</b>	: <i>Schizochytrium sp.</i> ve diğer bazı mikroalglerin yağ içerikleri .....	12
<b>Çizelge 2.5</b>	: Bazı biyodizel kaynaklarının karşılaştırılması .....	13
<b>Çizelge 2.6</b>	: <i>Schizochytrium sp.</i> mikroalginden elde edilen omega-3 yağlarının(DHA ve EPA) kullanımı .....	14
<b>Çizelge 3.1</b>	: Mikroalg( <i>Schizochytrium sp.</i> ) yağının yağ asitleri bileşimi .....	24
<b>Çizelge 4.1</b>	: Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, karıştırıcı tipinin ekstraksiyon verimine etkisi .....	30
<b>Çizelge 4.2</b>	: Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon ortamının ekstraksiyon verimine etkisi .....	30
<b>Çizelge 4.3</b>	: Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, tampon çözelti miktarının ekstraksiyon verimine etkisi .....	31
<b>Çizelge 4.4</b>	: Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, pH değerinin ekstraksiyon verimine etkisi .....	32
<b>Çizelge 4.5</b>	: Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, enzim miktarının ekstraksiyon verimine etkisi .....	33
<b>Çizelge 4.6</b>	: Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisi .....	33
<b>Çizelge 4.7</b>	: Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, sürenin ekstraksiyon verimine etkisi .....	34



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Ökaryotik bir alg örneği .....	4
Şekil 2.2 : Prokaryotik bir alg örneği .....	4
Şekil 2.3 : Alg gruplarına örnekler .....	5
Şekil 2.4 : Havuz tipi açık mikroalg üretim sistemi .....	7
Şekil 2.5 : Kapalı mikroalg üretim sistemine örnek biyoreaktör.....	7
Şekil 2.6 : Mikroalglerden elde edilen bazı ürünler( $\beta$ -Karoten, zeaksantin ve gıda katkıları) .....	11
Şekil 2.7 : Mikroalg ürünlerinin ilaç sektöründeki örnekleri(astaksantin ve omega-3 yağı).....	12





## MİKROAGLERDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE YAĞ ELDESİ

### ÖZET

Teknolojinin gelişmesi ile birlikte insanların doğal kaynaklara yönelimi artmış ve doğada yaşayan birçok canlı türüne yönelme başlamıştır. Algler de insanların kendi yararları için kullanmaya başladığı doğal kaynaklar arasında yer almakta ve gün geçtikçe önemi artmaktadır.

Mikroalgler akuatik ekosistemlerdeki ekolojik ve de biyolojik rollerinin haricinde, gerek insan sağlığı gerekse de sucul hayvanlar için önemli besin maddeleri içermektedir. Günümüzde birçok mikroalg türü doymamış yağ asitlerinin zenginliği, yüksek oranda protein, vitamin vb. içeriklerinden dolayı birçok biyoteknolojik çalışma da önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmaların önemi 1950'li yıllardan itibaren gün geçerek artmıştır.

Bu çalışmada, mikroalglerden yağ ekstraksiyonunda geleneksel olarak kullanılan çözücü ekstraksiyonu yöntemine alternatif olabilecek, daha sağlıklı, yüksek kalitede ve yüksek verimde yağ elde edilebilecek bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Deneysel çalışmada içerisinde %18,6 oranında yağ içeren *Schizochtrium sp.* mikroalg türü kullanılmıştır. Alternatif ekstraksiyon yöntemi olarak enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi seçilmiş ve hücre duvarlarını parçalanması ve diğer etkileri arttırmak için proteaz enzimi kullanılmıştır. Proteaz enzimi için pH, enzim miktarı, sıcaklık ve süre parametreleri ele alınmış, uygun çalışma koşulları belirlenmiş ve ekstraksiyon verimine etkileri araştırılmıştır.

Deneysel çalışmalar, 30ml tampon çözelti, pH 5-8 aralığında, gram mikroalge karşılık 0,50-1,25 mL enzim miktarı, 30-50°C sıcaklık aralığında ve 4-24 saatlik deney sürelerinde gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen en uygun ekstraksiyon koşulları; pH: 8, enzim miktarı: 1 mL enzim/g mikroalg, sıcaklık: 50°C ve ekstraksiyon süresi: 12 saat olarak belirlenmiştir. Elde edilen uygun enzimatik ekstraksiyon koşullarında ekstraksiyon verimi %61,47 olarak bulunmuştur.



## ENZYMATIC AQUEOUS EXTRACTION OF OIL FROM MICROALGAE

### SUMMARY

In human nutrition, lipids are essential substances like carbohydrates and proteins that have vital roles in health. There are also fat-soluble vitamins in these lipids. Taking these vitamins is fundamental in terms of health and extremely necessary for the body. In addition, omega-3 fatty acids which can not be produced by the human body, is also plays an important role in human health and many other areas. On the other hand, these omega-3 fatty acids can be produced by algae and aquatic animals play the primal role of transporting these lipids into human body [1,2].

Algae are abundant and ancient organisms that can be found in virtually every ecosystem in the biosphere. They vary from tiny single-celled species one micrometer in diameter to giant seaweeds over 50 meters long. For billions of years algae have exerted profound effects on our planet, and they continue to do so today. Still, in many habitats algae often go unnoticed unless environmental conditions become favorable for the development of conspicuous and sometimes massive proliferations of a situation often brought about by human activity. People from many cultures, ancient and modern, have used algae for a variety of purposes. With the advent of biotechnology, algae are poised to play greater, although often subtle, roles in the day-to-day lives of human beings.

For millennia people throughout the world have collected algae for food, fodder, or fertilizer. More recently algae have begun to play important roles in biotechnology. For example, they have been used to absorb excess nutrients from water streams, thereby reducing nutrient pollution in lakes and streams. Algae also generate industrially useful biomolecules, and serve as a human food source, either directly or indirectly, by supporting aquaculture of shrimp and other aquatic animals. Algae are increasingly being cropped in lab-based bioreactors, outdoor production ponds, and engineered offshore environments. Algae have provided science with uniquely advantageous model systems for the study of photosynthesis and other molecular, biochemical, and cellular-level phenomena of wider importance. Examples include Melvin Calvin's explanation of the light-independent reactions of photosynthesis in the green alga *Chlorella*. Studies of algae have been essential to our understanding of basic photosynthetic processes, and they continue to break new conceptual ground. The relative simplicity, antiquity, and vast diversity of algae, coupled with excellent fossil records in some cases, have also made algae invaluable systems for learning the organismal and organellar evolution and ecosystem function, and for understanding the effects of human disturbance upon the biosphere [3].

Algae are involved in global biogeochemical cycles and biotic associations that provide essential ecological services. Humans reap the benefits of these algal activities in the form of atmospheric oxygen, climate modulation, and fossil fuels, as well as finfish, shrimp, and shellfish harvests, which depend upon algal primary production. In addition, humans have learned to use algae in a wide variety of technological applications. Certain algal species have become priceless and irreplaceable model systems for research. Algae are used as environmental monitors,

both to assess the health of modern aquatic systems and to understand environmental conditions of the past. Numerous food products are derived from algae, including food for cultivated shellfish, seaweeds eaten by humans, and protein and vitamin supplements produced from microalgae grown in pond or bioreactor cultivation systems. Some microalgae produce lipids that are potential sources of renewable fuels. Many algae manufacture compounds that have scientifically and industrially useful gelling properties. Ancient marine and lake diatom deposits (diatomite or diatomaceous earth) are mined for use in abrasives and industrial filtration. Algal phycobiliproteins can be used as fluorescent dyes in applications such as flow cytometry. Some algal compounds have potentially valuable antibiotic or antitumor activity. Finally, algae have been incorporated into engineering systems utilizing algal nutrient uptake and gas exchange properties to purify water or air [3].

Lipids are mostly extracted from seeds or the biomass itself by conventional methods such as mechanical pressing and/or solvent extraction. Generally *n*-hexane is used as solvent and high oil production yield is obtained. Although there is an advantage of good oil yield for the use of hexane, the oil product has low quality, high investment and management costs, and high energy requirement problems for its usage. Besides, organic solvent hexane is a toxic substance and has explosive property, it releases hazardous volatile materials to the atmosphere. Even though this traditional process for the extraction of oil is economically suitable, there are draw-backs like damage to the human health and environment and quality loss of finished products which cause to search for new techniques. Therefore, due to environmental safety regulations and public health risks associated with the use of hexane, alternative methods which are safe, environment-friendly, provide edible protein and qualified, highly efficient oil have been developed by researchers.

Many researchers have done a lot of work on aqueous enzymatic oil extraction from many different biomasses in order to obtain oil and different compounds and they have found that the yield value could be obtained the same or close the results of the solvent extraction processes. However, laboratory scale researches are needed to continue further researches to provide optimum conditions for extraction and separation stages of the process in order to take it to bring commercially more attractive.

Aqueous extraction method is carried out at lower temperatures with respect to solvent-based extraction method and more qualified oil can be obtained by it. However, due to low oil efficiency of aqueous extraction, enzymes are added to the extraction environment to increase the oil yield and to minimize byproducts. Enzymatic aqueous extraction makes use of enzymes to degrade the cell walls with water acting like a solvent. This enables much easier oil release and refining of the oil. Aim is not only to separate cellular or fluid lipids from other constituents, proteins, polysaccharides and macromolecules, but also to preserve these lipids for further analyses. The preservation of proteins also permits the pulp to be rich in proteins. Removing the non-lipid molecules without losing some lipids is a complete challenge. By means of enzymes, these difficulties are tried to be reduced. Although cost of enzymatic extraction process is estimated to be much more than hexane extraction, this situation may be overcome by recycling of the enzymes and using immobilized enzymes to decrease enzyme cost. If the oil to be extracted has high market value, again investment cost could be compensated. Enzymatic extraction can also be supported by ultrasonication for increasing the oil efficiency. Therefore, aqueous and enzyme-assisted aqueous extraction substitute the use of solvents and lead to obtain oil with high efficiency, so there is no more need for organic solvents in extraction process.

The aim of this study is the investigation of a method intended for elimination of toxic effects, obtaining high oil yield and quality and lowered economical issues which is an alternative to conventional solvent extraction. Microalgae (*Schizochytrium sp.*) is obtained from Vitatis Biyoteknoloji and contains %18,6 lipid of the dried cell weight of microalgae. In this study, aqueous enzymatic extraction is selected as alternative extraction method and protease enzyme is used for degrading cell walls. Optimum conditions in respect to pH, enzyme amount, temperature and time are determined.

Alcalase 2.5L Type-DX is used as enzyme in the experiments. Alcalase is a serine protease enzyme obtained from *Bacillus licheniformis* microorganisms. It has a high proteolytic activity of 2,5 AU/g (Anson Units/gram). The optimum conditions for enzyme activity are at the temperature between 55-70°C and pH 4-8 interval depending upon the substrate type.

Aqueous enzymatic extraction experiments are carried at 30 ml of pH 5-8 buffer, 0,50-1,25 mL/g microalgae enzyme amount, 30-50°C and between 4-24 hours. Optimum condition results for alcalase enzyme achieved at 50°C, 30 mL pH 8 buffer solution with 1,00 mL/g microalgae enzyme amount and duration of 12 hours. The extraction yield of microalgase oil at these conditions is determined as %61,47.



## 1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde temel besinler olarak protein ve karbonhidratların yanı sıra yağlar da çok büyük öneme sahiptir. Besin olarak tüketilen yağların içinde yağda eriyen birçok vitamin yer almaktadır. Sağlıksal açıdan önem teşkil eden bu vitaminlerin alımı vücut için son derece gereklidir. Ayrıca insan vücudunda üretilmeyen omega-3 yağları da insan sağlığı ve diğer birçok alanda önemli rol oynamaktadır. Alglerin ürettiği bu yağların insan vücuduna taşınmasında en büyük rolü balıklar oynamaktadır.

Algler, türlerinin büyük bölümü fotosentetik olmasına ve bitkilere benzemesine rağmen bitkiler familyasıyla yakın akraba olmayan bir grup sucul canlı grubudur. Algler birçok farklı alanda yetişip, bulunabilmesine rağmen %70 gibi büyük bir bölümü sularda bulunmaktadır [1].

Algler uzun süreler boyunca hayvan yemi besin katkı maddesi olarak üretilmesiyle bilinmektedir fakat günümüzün gelişen teknolojisi ve artan kaynak (besin, enerji vb.) ihtiyacı gibi birçok sebepten dolayı alternatif kullanım alanları da bulmuştur. Bunlardan en önemlisi alternatif bir enerji kaynağı olarak gündeme gelmesidir. Bunun yanı sıra son 20 li yıllarda alglerin ve alg yağlarının farmakolojik alanlarda kaynak olarak kullanılması ve geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Dünyada her geçen gün bulunan petrolün azalması, kirliliğin artması, besin arayışı, enerji kaynağı vb. etkenlerin ön planda olması alternatif kaynakların araştırılmasını büyük ölçüde arttırmaktadır. Alternatif kaynaklardan en önemlilerinden biri de mikroalgler olarak görülmektedir [2].

Ülkemizde mikroalglerle ilgili bilimsel çalışmalar büyük ortanda su ürünleri fakültelerinde ve çoğunlukla sucul besin katkısı ve su kaynaklarındaki gelişimlerinin incelenmesi alanlarında gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, teknoloji çağıyla birlikte gıda ve etken madde üretimine yönelme başlamış ve fotobiyoreaktör çalışmaları bulunmaktadır [2].

Genel olarak bitkisel yağların üretiminde mekanik presleme ve çözücü ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Çözücü ekstraksiyonunda çözücü olarak genellikle *n*-hekzan kullanılır. Çözücü kullanımının yüksek verim eldesi avantajına rağmen kullanılan çözücünün zehirsiz etkisi olması, yüksek yatırım ve işletme maliyeti, yüksek enerji gereksinimleri gibi dezavantajları vardır. Ayrıca organik bir çözücü olan *n*-hekzan patlama özelliğine sahiptir, atmosfere zehirli uçucu madde salınımı yapar. Bu yüzden alternatif olarak çevre dostu, güvenli, yenilebilir protein ve yüksek verimde kaliteli yağ eldesi sağlayan sulu ve enzim katkılı sulu ekstraksiyon yöntemleri üzerine son yıllarda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir.

Sulu ekstraksiyon yöntemi, çözücü bazlı ekstraksiyona göre daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir ve daha yüksek kalitede yağ elde edilir. Fakat ekstraksiyonun yağ verimi yüksek olmadığı için yağ ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla ortama enzim ilave edilerek bu sorun giderilmeye çalışılmaktadır. Enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi çevre ve güvenlik açısından da önemli avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada, endüstriyel olarak değerlendirmek amacıyla omega-3 yağ asitlerince zengin mikroalglerden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesi hedeflenmiştir. Bu amaçla mikroalglerin hücre duvarını parçalayıp yağ salınımını kolaylaştıran proteaz enzimi sulu ekstraksiyon ortamına ilave edilmiş, pH, enzim miktarı, sıcaklık ve süre parametrelerinin ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmıştır.



## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1 Algler Hakkında Bilgi

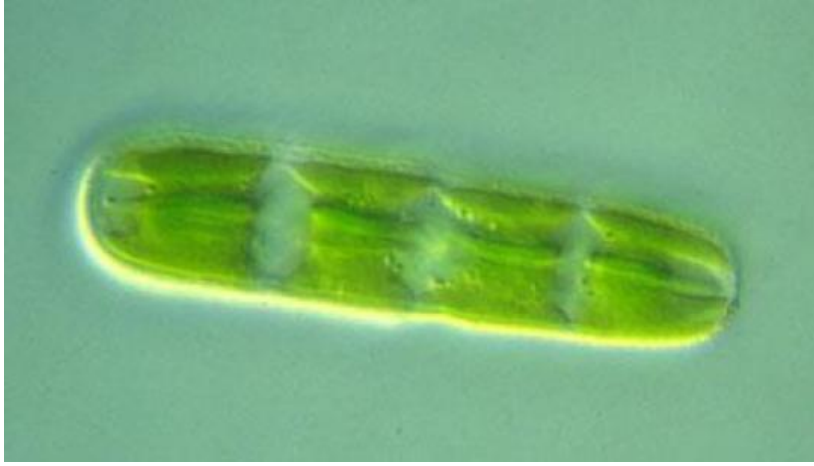
Algler biyosferdeki hemen hemen her ekosistemde bulunabilen, bol ve antik organizmalar olarak tanımlanabilir ve boyut aralığı küçük tek hücreliden 50 metrelik dev deniz yosunlarına kadar değişmektedir. Milyarlarca yıldır algler ekosistemimizde mevcut olup gezegenimiz üzerinde derin etkileri vardır [3]. Güneş enerjisini en etkin kullanan canlı sistemlerdir. Bu nedenle alg üretim teknolojisine ilgi giderek artmaktadır. Bu bağlamda, farklı mikroalg türlerinin besin bileşenleri incelenmekte, yetiştiriciliği yapılacak yeni türlerin arayışı giderek daha da artmaktadır [4].

Alglerin genel olarak özellikleri incelendiğinde yapısal olarak ökaryotik ve prokaryotik olarak iki büyük gruba ayrılırlar. Mavi yeşil algler prokaryotiktir ve belirgin bir hücre çekirdeğinin olmaması, çok basit olan kromatofor yapısındaki pigment dağılımları ve prokaryotik hücre özellikleri bakımından diğer alglerden ayrılmaktadırlar. Alglerde üreme vejetatif, eşeyli ve eşeysiz olarak üç şekilde gerçekleşebilir. Algler ekolojik olarak soğuk ve buzul ortamlar dahil birçok sulu ortamda bulunabilirler fakat %70'lik bölümünün asıl yayılım alanı sulardır. Organik karbon bileşiklerinin primer üreticileridir ve su ortamında primer üretici canlılardır. Yapılarındaki pigmentler sayesinde karbondioksit ve suyu ışığın etkisiyle karbonhidrata çevirirler ve böylece su ortamındaki besin değerinin ve oksijenin artmasını sağlarlar. Bunlara karşın alglerin üremeleri ve üretimleri çevresel faktörlerle sınırlanmıştır. Bunların en önemlileri ışık, sıcaklık ve besindir [1,5].

Alglerin birkaç bin türü bulunmaktadır ve metabolizmaları çok çeşitlidir. Genel anlamıyla yapıları göz önüne getirildiğinde ökaryotik ve prokaryotik olarak iki ana grupta gösterilebilirler [5]. Şekil 2.1 ve 2.2'de ökaryotik ve prokaryotik alglere örnekler verilmiştir.



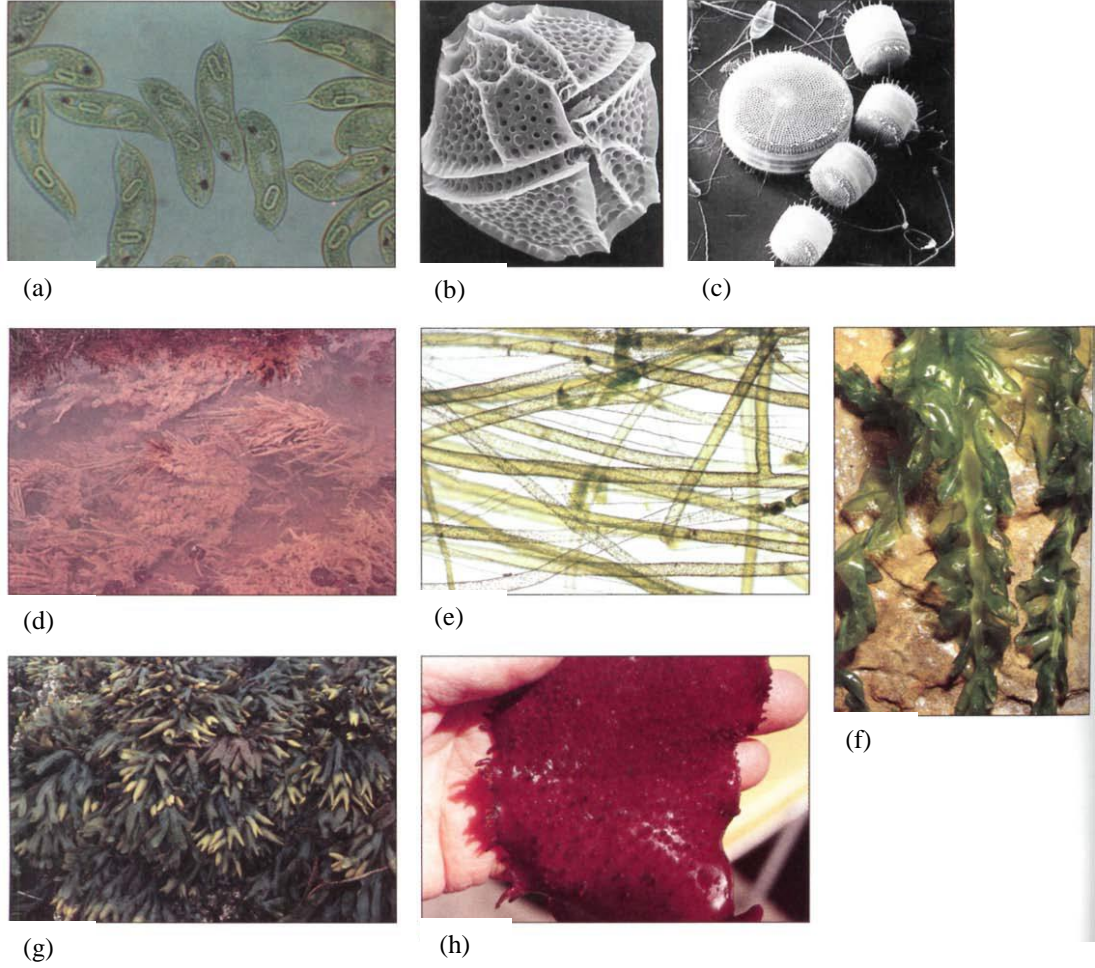
**Şekil 2.1** : Ökaryotik bir alg örneği [6].



**Şekil 2.2** : Prokaryotik bir alg örneği [6].

Bununla birlikte algler kendi aralarında 6 bölümde toplanmıştır. Bu bölümleri incelenecek olursa;

**Euglenophyta – öglenoidler** : Birçok pigmentless öglenoid bulunmasıyla birlikte, bu grup zoologlar tarafından “Phylum Protozoa” adlı ögelerine bakılarak sınıflandırılırlar. Bu grup fotosentetik olmakla birlikte pigmentleri yeşil alglere benzemektedir. Öglenoidlerin hücre yapıları uzun yıllar boyu gelişmiş şekilde görünmektedir (Şekil2.3.a) [5].



**Şekil 2.3 : Alg gruplarına örnekler [5].**

**Pyrrhophyta – dinoflagellatlar :** Bu grup alg histonları bulunmamakla birlikte, kromozomlarla intranukleer mitoz yapmakta ve hiçbir zaman dekonse olmamaktadır. Birçok botanikçi bu grubu diğer gruplardan ayrı olarak görmekte ve bu ayrılmanın ökaryotik hücre gelişiminin ilk adımlarında gerçekleştiğini kabul etmektedir (Şekil2.3.b) [5].

**Chrysophyta – diyatamlar (altın kahverengi algler, sarı-yeşil algler) :** Bu grup algler birçok çeşitlilik göstermekte ve bazen birçok alt gruplara ayrılmaktadır. Bu ayrımlar yapılırken bazen kahverengi alglerde bu ana gruba katılmaktadır. Bunun nedeni kahverengi alglerin ve bu grubun ortak biyokimyaya sahip olmaları, alışmadık depolama ürünleri ve özellikle aynı klorofil gruplarına sahip olmalarıdır(Klorofil a ve c) (Şekil2.3.c-d-e) [5].

**Chlorophyta – yeşil algler :** Yeşil algler son derece birçok farklılık göstermekte fakat biyokimyasal olarak çok iyi tanımlanmış olup, temel metabolizmaları açısından

hemen hemen aynıdır. Yeşil algler evrensel olarak gerçek bitkilerin atası olarak kabul edilmektedir (Şekil2.3.f) [5].

**Phaeophyta – kahverengi algler :** Kahverengi algler büyük bir tür lülüğe sahip olmakla birlikte, vücut yapıları karmaşıktır ve genel olarak kayalık kıyılarda bulunurlar. Bu grup algler arasından bazıları çok iyi tanımlanmış olup, uzun mesafeli organik bileşiklerin taşınmasını sağlamakta ve bitkilerdeki soymuk borularına çok benzer yapılar göstermektedir (Şekil2.3.g) [5].

**Rhodophyta – kırmızı alg :** Kırmızı algler çok büyük bir grup olmakla birlikte, bu grubun birçok türü ipliksi yapıya sahiptirler. Diğer ökaryotik grupların aksine, kırmızı algler yapılarında hiçbir zaman flagella(kamçı, ipliksi organel) bulundurmazlar. Ayrıca kloroplastlarında prokaryotik yapıya sahip olmaları onları benzersiz kılar (Şekil2.3.h) [5].

## 2.2 Mikroalgler

Mikroalgler, yağ asitleri ve yüksek değerli molükllerin (karotenoid vb.) en önemli birincil üreticileridir [7]. Birçok bilim adamı mikroalglerin birçok kimyasalın (pigmentler, vitamin E, protein ve diğer.) kaynağı olduğunu ifade etmişlerdir. Mikroalglerin insan gıdasında önemli rol oynayan omega-3 yağlarının üretilmesinde kullanılmasından ve kültür balıkçılığında balık yemi olarak kullanılmasından dolayı talep oldukça fazladır [8]. Mikroalglerden elde edilen ürünler gıda, eczacılık, tarım, ziraat, çevre gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Birçok mikroalg yağ asitlerinin farklı türlerini üretebilmektedir. Her tür mikroalgin kendine özgü yağ asidi ve besin içeriği bulunmaktadır [9].

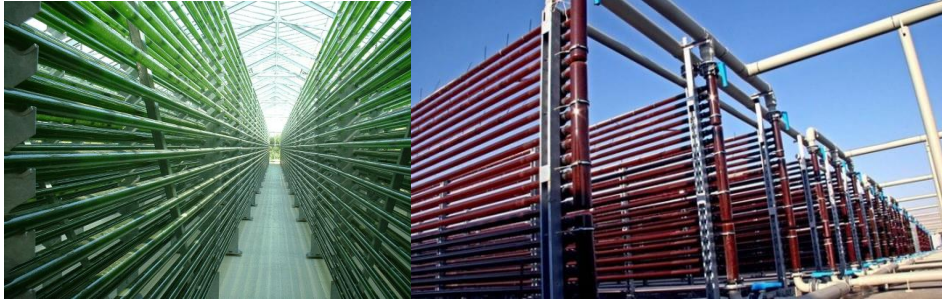
### 2.2.1 Mikroalg üretimi

Mikroalg üretiminde kullanılan sistemler genel olarak, açık ve kapalı sistemler olarak sınıflandırılabilir. Açık sistemlere, çok farklı amaçlar için üretilmiş olan konteyner, yapay havuzlar ve doğal sular örnek olarak verilebilir. Teknik kompleksliği bakımından, yaygın olarak kullanılan kanal tipi havuzlarda açık sistem olarak düşünülmektedir. Mikroalg kültüründe kapalı sistemlerden en yaygın olarak kullanılanı ise, kapalı fotobiyoreaktörlerdir.

Sistemlerin birbirlerine göre tercih edilmelerini etkileyen parametreler, son 20 yılda oldukça önem kazanmıştır. Bir sistem seçimi yapılırken dikkat edilmesi gerekli noktalardan biri, alg kültürlerinin hangi alg üretim sisteminde daha verimli olacağını tespit edilmiş olmasıdır. Algal üretim için belirli bir sistemin seçimini etkileyen faktörler ise; bölgenin iklim şartları, toprak ve suyun maliyetleri, alglerin çevresel istekleridir [10].



**Şekil 2.4 :** Havuz tipi açık mikroalg üretim sistemi.



**Şekil 2.5 :** Kapalı mikroalg üretim sistemine örnek biyoreaktör.

Bu sistemlerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları Çizelge2.1' de verilmektedir.

**Çizelge 2.1 :** Açık ve kapalı alg üretim sistemlerinin avantajları ve dezavantajları[10].

<b>Parametreler</b>	<b>Açık Havuzlar</b>	<b>Kapalı Sistemler</b>
Kirlilik Riski	Aşırı yüksek	Düşük
Alan ihtiyacı	Yüksek	Düşük
Su kayıpları	Aşırı yüksek	Hemen hemen yok
CO <sub>2</sub> kayıpları	Yüksek	Hemen hemen yok
Kültüre edilen türlerin çeşitliliği	Birkaç alg türüyle sınırlı	Yüksek. Hemen hemen tüm mikroalg türleri
Standardizasyon	Mümkün değil	Mümkün
Hava şartlarına bağımlılık	Yağış sırasında tam olarak mümkün değil	Kapalı konfigürasyonlar kötü hava şartlarında da çalışabilir
Üretim sırasındaki biyokütle konsantrasyonu	Düşük. 0,1-0,2 g/L	Yüksek. 2-8g/L
Muamele yöntemlerinin randımanı	Düşük. Düşük konsantrasyonlar yüzünden yüksek hacimler akar.	Yüksek. Yüksek konsantrasyonlardan dolayı küçük hacimler akar.

Üretim sistemlerinin sınıflandırılmasının yanı sıra mikroalg üretimindeki en büyük etken olan ışığın etkisine göre de alg üretimi sınıflandırılabilir. Bunlar;

**Fotosentetik yetiştirme:** Gerek kapalı yerlerdeki su birikintilerinde suni ışık kullanılarak gerekse de açık havadaki su birikintilerinde yetiştirilen mikroalgler için geleneksel metotlar kullanılmaktadır. Mikroalgin üretkenliğini birçok faktör etkilemektedir, fakat ışığın mevcudiyeti ana faktördür [11]. Suyun ışığı geçirmesinin sınırlı olduğu ve yosunlar büyüdükçe zaten kendi kendilerini gölgeledikleri için ışığı yeterince alamamak bir problem yaratır [12]. Amerika, Japonya ve İsrail’de oluşturulan araştırma grupları yosun üretimi konusunda çalışmışlar ve fotosentetik olarak üretilenlerin çoğunluğunun düşük omega-3 yağ asitleri içerdiği sonucuna varmışlardır [13]. Fotosentetik üretim üzerinde devam eden çalışmalar sadece sınırlı bir başarı sağlamıştır. En iyi koşullar altında bile açık havadaki havuzlarda üretilen yosunlardan elde edilen omega-3 yağ asitlerinin ortalama 4-8 mg/L olduğunu



bildirilmiştir [13]. Bu sistemin bir dezavantajı da çok büyük miktarda suyun işlemden geçirilmesi gerekliliği ve bunun da üretim maliyetinin %33'ne denk gelmesidir.

**Heterotrofik yetiştirme** : Fotosentetik yetiştirme'de belirtildiği gibi ışığın penetrasyonuna ilgili olarak ciddi bir problem vardır ve sonuçta fotosentetik kültürlerde bir litre suda 0,5 g den fazla biyokütle elde edilmesine nadir rastlanır. Bu nedenle son zamanlarda alternatif olarak besin maddelerinin fotosentez yoluyla değil de direkt besin maddelerinden sağlandığı heterotrofik mikroalg üretimine karşı büyük bir ilgi vardır. Birçok yosun türlerinin ışık gereksinimine gerek olmayan heterotrofik yetiştirmeyi başarabileceği gösterilmiştir [12]. Biyokütle yoğunluğu sadece besin maddelerinin sindirilebilirliğine bağlı olarak sınırlanabilir, özellikle de oksijenin ve heterotrofik olarak üretilen yosunların biyokütle yoğunluğu ortalama 40g kuru madde/L olarak rapor edilmiştir [12]. Çalışmalar sonucu *Nitzschia diyatomonum* heterotrofik türleri tanımlanmış ve bunlar en iyi EPA üreticileri olarak adlandırılmış diğer taraftan dinoflagetta *Crpthocodium cohnii* ise en iyi DHA üreten olarak belirlenmiştir. Çizelge 2.2'de Dünya'da üretilen bazı mikroalg türlerinin üretim değerleri hakkında bilgi verilmiştir.

**Çizelge 2.2** : 2010 yılında Dünyada bazı mikroalglerin üretimi [14].

Mikroalg	Üretim(Kuru madde olarak)	Ülke	Fiyat
<i>Spirulina</i>	3000 ton	Çin, Hindistan, ABD, Myanmar, Japonya	36 €/kg
<i>Chlorella</i>	2000 ton	Tayvan, Almanya, Japonya	36 €/kg
<i>Dunaliellasalina</i>	1200 ton	İsrail, ABD, Japonya	215-250 €/kg
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 ton	İsrail, ABD, Hindistan	50 €/L

### 2.2.2 Mikroalglerin yağı ve kullanım alanları

Günümüzde mikroalgler, atık su arıtımı, güneş enerjisinin biomasa dönüştürülmesi, fazla CO<sub>2</sub>'i uzaklaştırarak ortamın pH'sını ayarlaması, ortamdaki kirlerin uzaklaştırılmasıyla su kalitesinin kontrolü, bazı kimyasal maddelerin üretimi ve

enerji eldesi (metan gazı) gibi çok geniş alanlarda kullanılmaktadırlar. Mikroalglerin sağlık üzerindeki yararları ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda bunların; antifungal, antivirüs ya da antitümör aktivitelere sahip oldukları tespit edilmiş çok sayıda ürün yanında, gerek düşük gerekse yüksek moleküllü birçok bileşik ile antibiyotik ve antibakteriyel olarak kullanılan farklı sayıda ürünün alglerden elde edildiği ortaya konmuştur [1]. Çizelge 2.3'te bazı mikroalg türleri ve elde edilen ürünler gösterilmiştir.

**Çizelge 2.3 :** Bazı mikroalg ürünleri ve fiyatları [14].

Ürün	Mikroalg	Fiyat(ABD \$)
β-Carotene	<i>Dunalliella</i>	300-3000/kg kuru madde
Astaxanthin	<i>Haematococcus</i>	1000/kg
Tüm-hücre diyet takviyesi	<i>Spirulina, Chlorella, Chlamydomonas</i>	50/kg
Doymamış yağ asitleri	<i>Cryptocodinium, Schizochytrium</i>	60/kg

Alg formlarının bir çoğu yüzyıllardır gıda olarak tüketilmekte ve sağlık üzerindeki etkileri nedeniyle tercih edilmektedir. Mikroalglerin proteinler, esansiyel aminoasitler, vitaminler, çeşitli mineral maddeler ve biyoaktif moleküller yönünden zengin olduğu, ayrıca polisakkaritler, lipitler, lipoidler ve sterinler içerdiği, bu nedenle de kullanım alanlarının çok geniş olduğu bilinmektedir [15]. Şekilde 2.6'da mikroalglerden elde edilen bazı ürünler(gıda katkısı, β-karoten ve zeaksantin) gösterilmiştir.





**Şekil 2.6 :** Mikroalglerden elde edilen bazı ürünler ( $\beta$ -karoten, zeaksantin ve gıda katkısı).

Mikroalgler; Araşidonik asit (ARA), Eikosapentaenoik asit (EPA) gamma linoleik asit (GLA) gibi yağ asitleri yanında,  $\beta$ -Karoten, Astaksantin, allokofikosiyanin, c-fikosiyanin, miksoksanofil ve zeaksantin gibi pigmentler açısından da oldukça zengin organizmalardır. Yapılarında yer alan ARA ve EPA gibi 20 karbonlu çoklu doymamış yağ asitleri kanda pıhtılaşmanın ve arterik fonksiyonların kontrolünü sağlayan prostaglandin hormonunun sentezi için gerekli olan maddelerdir. Dokosahekzaenoik asit (DHA) ise multiplisikleroz üzerinde tedavi edici özelliğe sahiptir ve bebeklerde beyin dokusu ile görme duyusunun gelişimine yardımcı olan bir bileşendir. Son çalışmalar, uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinin bilinen kaynaklarına ilave olarak mikroalglerin de omega-3 yağ asitlerinin çıkış ön maddesi olan  $\gamma$ -linolenik yağ asitlerince zengin olduğunu göstermiştir. Günümüzde gıda katkı maddesi olarak mikroalglerden elde edilen omega-3 yağ asitlerinin, gıda ve ziraat alanında omega-3 yağ asitlerince zenginleştirilmiş gıdaların üretilmesinde kaynak olarak kullanıldığı görülmektedir. Yapılan araştırmalarda mikroalglerin eterik yağlarının ve bromlu bileşiklerinin antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiş, birkaç algin

de protein fraksiyonlarının antikoagülant, antilipolitik, antitümöral ve antiülseratif etkinlikleri saptanmıştır [16]. Çizelge 2.4'te bu çalışmada kullanılan mikroalg ve diğer bazı mikroalglerin yağ içerikleri verilmiştir.

**Çizelge 2.4 :** *Schizochytrium sp.* ve diğer bazı mikroalglerin yağ içerikleri [17].

Mikroalg	Yağ İçeriği(%Kuru Ağırlık)
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23



**Şekil 2.7 :** Mikroalg ürünlerinin ilaç sektöründeki örnekleri (astaksantin ve omega-3 yağı).

Mikroalgler ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda kırmızı mikroalg genusu olarak bilinen *Porphyridium*, besleyici ve teropatik özelliğe sahip biyokimyasalların bir kaynağı olarak bildirilmektedir. Söz konusu alg genusunun antiviral ve antiinflamator etkili polisakkaritler, uzun zincirli doymamış yağ asitleri ve zeaksantin gibi pigment ve floresan içerdiği bildirilmektedir. Kırmızı renkli

phycobiliproteinler; Phycoerythrin, mavi phycobiliproteinler de; Phycocyanin olarak isimlendirilmektedir. Suda eriyen bu pigmentler gıdalarda doğal renklendirici olarak kullanıldıkları gibi, kozmetik ve eczacılık alanında da sıklıkla kullanılmaktadırlar [18].

Bunların yanı sıra mikroalglerin diğer kullanım alanlarından biri olan biyodizel üretimi de çok büyük önem taşımaktadır. Mikroalgler biyoyakıt konusunda büyük önem taşımasının sebebi, birçok mikroalg türünün bünyesindeki yağların %80 den fazlasının yüksek enerjili oleik asit ve palmitoleik asit içermeleridir. Bu sebeple mikroalgleri yakıtı çevirmek oldukça elverişli olarak görülmektedir [19]. Çizelge 2.5'te kullanılan bazı biyodizel kaynaklarının karşılaştırılması gösterilmektedir.

**Çizelge 2.5 :** Bazı biyodizel kaynaklarının karşılaştırılması [19].

Ürün	Yağ Üretimi(L/hektar)
Mısır	172
Soya	446
Kanola	1190
Jatropha	1892
Hindistan cevizi	2689
Palmiye	5950
Mikroalg(%70 yağ içerikli)	136900
Mikroalg(%30 yağ içerikli)	58700

Ayrıca mikroalg yağları günlük yaşamımızda gıdalar tarafından da alınmak ve belirtildiği gibi gıdaların omega-3 yağ asitlerince(EPA ve DHA) zenginleştirilmesinde kullanılmaktadır. Çizelge 2.6'da bu araştırmada çalışılan mikroalg türünden elde edilen omega-3 yağlarının gıda sektöründeki bazı kullanım alanları verilmiştir.

**Çizelge 2.6 :** *Schizochytrium sp.* mikroalginden elde edilen omega-3 yağlarının (DHA ve EPA) kullanımı [20].

Gıda Kategorisi	Maksimum kullanım seviyesi(DHA+EPA)
Gıda katkıları	Normal insanda 250 mg/gün, hamile ya da emziren bayanlarda 450 mg/gün
Özel tıbbi diyet gıdaları	Besin miktarına uygun gereken miktarda
Enerji-kısıtlamalı diyetlerde	250 mg/öğün
Diğer gıdalarda	200 mg/100 g
Fırın ürünlerinde	200 mg/100 g
Kahvaltılık yulaf ezmesinde	500 mg/100 g
Süt ürünlerinde	360 mg/100 g
Alkolsüz içeceklerde	80 mg/100 g
Besin çubuklarında	500 mg/100 g
Sürülebilir yağlarda	600 mg/100 g

### 2.3 Türkiye'deki Mikroalg Üretimi ve Mikroalg Enerji Çalışmaları

Türkiye'de mikroalglerle ilgili bilimsel çalışmalar büyük oranda, su ürünleri fakültelerinde ve çoğunlukla larva yemi üretimi ve deniz ve yüzey sularındaki ötrofikasyonu izlenmesi alanlarında gerçekleşmektedir. Ayrıca Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü tarafından gıda ve etken madde üretimine yönelik fotobiyoreaktör tasarımı çalışmaları da mevcuttur. Başta Ege Üniversitesi olmak üzere bazı üniversitelerimizin çalışmaları sonucu Türkiye'de mikroalg biyokütle üretimi başlamış durumdadır; ancak enerji üretimine odaklanmış yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Kısıtlı sayıdaki çalışmalardan birisi de Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Nisan 2010 itibariyle başladığımız TÜBİTAK destekli "Mikroalg Biyokütle Üretiminde Yenilikçi (Innovative) Yaklaşımlar" isimli projedir. Bu projede algal biyodizel üretiminde karşılaşılan maliyet sorunlarının çözümü ile birlikte küresel ısınmanın en büyük sorumlusu olarak gösterilen CO<sup>2</sup> emisyonunun algler tarafından kullanılarak azaltılması ve biyolojik arıtım deşarj suyu kullanılarak alg üretimiyle azot, fosfor giderimi sayesinde deşarj suyunun verildiği alıcı ortamlarda ötrofikasyon riskinin düşürülmesi amaçlanmaktadır. Ömerli

Evsel Atık su Arıtma Tesisi'nden belirli aralıklarla alınan deşarj suyu kullanılarak çeşitli doğal ortamlardan toplanan alg numuneleri kültüre edilerek besi maddesi kullanım hızları, CO<sub>2</sub> özümleme kapasiteleri ile birlikte biyokütle ve yağ üretimlerini gözlemlemek amaçlı denemeler yapılmaktadır. Proje sonucunda getirilen yeniliklerin mikroalglerden biyodizel üretiminin maliyetini önemli derecede azaltması beklenmektedir[21].

## **2.4 Mikroalglerden Yağ Eldesi**

Mikroalglerden yağ eldesi için öncelikle kültür ortamında belirli bir olgunluğa gelen mikroalglerin hücre sayımı yapılmaktadır. Yeterli hücre sayısına erişen (türe göre değişen) mikroalgler ayrı bir tanka alınarak streslendirme uygulanır. Streslendirmeye maruz bırakmak için besin tankından yoğun miktarda katalizör verilir. Katalizör uygulanmaz ise, verilen ortalama üretim şartlarından belirli parametreler değiştirilir. Streslendirme uygulaması mikroalglerin yağ çıkarma işleminden önce hızlı yağ bağlamasını sağlayacaktır. Streslendirme uygulandıktan sonra yağ çıkarma işlemine geçilir. Yağ çıkarma işleminin ilk aşaması mikroalg hasat ünitesinde mikroalglerin suyunun alınması işlemidir. Mikroalg hasat ünitesi içerisinde serbest dolaşan hava sayesinde ve sonsuz dönen bir bant yardımıyla mikroalglerin suyunun alınması sağlanır[22].

Mikroalg hasat ünitesinden çıkarılan mikroalglerin suyu tamamen alınmıştır. Suyu alınmış mikroalglere pul adı da verilir. Pul haline gelmiş mikroalgler yağının alınması için baskı makinalarına gönderilir. Ekonomik boyutta üretim yapan firmalarda mikroalgler için özel üretilmiş yağ çıkarma makinaları mevcuttur. Özel yağ çıkarma makinaları bulunmayan işletmelerde eski tip yağ çıkarma makinaları da kullanılmaktadır[22].

Yağı çıkarılan mikroalgler, makinanın alt kısmından alg yığını olarak geri verilir. Yağ ise kapalı bir hazneye alınır. Mikroalg yığınları etanol, gübre ve yem olarak değerlendirilebilir. Elde edilen mikroalg yığını özellikle Avrupa'da pelet yem olarak kullanılmaktadır[22].

## 2.5 Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Yöntemi

Yağlı tohumlardan yağ eldesinde günümüzde en yaygın kullanılan yöntem çözücü ekstraksiyonu yöntemidir. Kullanılan çözücünün çok büyük çoğunluğu uçurularak geri kazanılmasına rağmen, güvenlik ve çevresel kirlilikle ilgili endişeler devam etmektedir. Organik çözücülerin kullanılması güvenlik açısından sorun teşkil ettiğinden çözücü olarak su kullanımı denenmiş, ancak ilk denemeler düşük yağ verimi dolayısıyla başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Buna rağmen çevresel açıdan daha güvenilir bir yöntem olduğu için sulu ekstraksiyon çalışmalarına devam edilmektedir. Aynı zamanda diğer yenilenebilir çözücülere (alkol ve süperkritik akışkanlar) göre su kullanımı, en ekonomik olarak toksik çözücülerin yerine iyi bir alternatiftir [23,24]. Ayrıca sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ ekstrakte edilebildiği gibi protein de ekstrakte edilebilmektedir. Yangın ve patlama tehlikesi de içermediğinden mekanik presleme ve geleneksel çözücü ekstraksiyonu yöntemlerine göre avantajlı görünmektedir.

Bitkilerin hücre duvarı temel olarak pektik bileşenler, selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır ve kofulları içerisinde yağ barındırırlar [25]. Enzimler hücre duvarını parçalayarak hücre zarının yağ geçirgenliğini artırır ve yağ çıkışını sağlarlar. Bu durum hücre içerisindeki komponentlerin daha kolay salınımına imkan sağlamaktadır. Böylece yağın ekstraksiyon verimi, hücre duvarına etkileyen enzimlerin hidrolitik müdahalesi ile artırılabilir [26]. Öğütülmüş tohuma enzimle müdahale ederek hücre duvarı yıkımı ve bazı lifli maddelerin parçalanması sağlanır. Bu sayede su ile ekstraksiyon işlemi kolaylaşır. Proteaz, amilaz, selülaz, hemiselülaz ve pektinaz gibi enzimler bitkisel yağ ekstraksiyonunda etkin şekilde kullanılabilirler. Enzimler ayrı ayrı işleme tabi tutulabileceği gibi, enzim karışımları da yağ verimini ve protein alımını artırmak için kullanılabilirler. Proteolitik enzimler yağ bileşenlerini çevreleyen lipofilik proteinler olan oleozinleri hidrolize etmekte, böylece oleozinlerin yüzey aktiviteleri azalmakta ve yağ ayrımı gerçekleşmektedir [27].

Enzimatik sulu ekstraksiyon yönteminde yağ verimi ve ürün kalitesine birçok faktör etki eder. Enzimin işlevini gerçekleştirmesi için, ekstraksiyon koşullarının enzim tavsye edilen kullanımına uygun olması gerekir. Birçok araştırmacı tarafından bildirilen ekstraksiyonu etkileyen başlıca faktörler; enzim bileşimi ve

konsantrasyonu, yağlı partikül boyutu, tampon çözelti pH'ı, katı-sıvı oranı, çalkalama hızı, sıcaklık ve inkübasyon zamanıdır [28].

Enzimatik sulu ekstraksiyonda izlenen adımlar genelde yağ elde edilecek tohumun öğütülmesi, sulu tampon çözeltisiyle karıştırılması, enzimle inkübasyonu, katı ve sıvı fazların santrifüjle birbirlerinden ayrılması ve sıvı fazdan yağın elde edilmesidir. Ekstraksiyon sonrası çıkan yağı alabilmek için birçok araştırmada santrifüj kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Genelde ekstraksiyon sonrasında karışımlar santrifüj edilince yağ, krema, sulu ve katı faz tabakaları olmak üzere toplam dört faza ayrılırlar. Karşılaşılan en büyük zorluklardan birisi oluşan emülsiyonun yağ verimini düşürmesidir. Emülsiyon giderme, sulu ve enzimatik ekstraksiyonun uygulanabilirliğini belirler. Bu yüzden ekstraksiyon sırasında emülsiyon oluşursa, yağı ayırmak için emülsiyon kırılmalıdır. Emülsiyonlar n-hekzan yardımıyla ekstrakte edilebileceği gibi, dondurma-eritme gibi yöntemlerle de kırılabilir [28]. Yağın ayrılması için ekstraksiyon karışımına sıcak su eklenerek sıcak suda yağ yüzdürülebilir. Bu işlemde emülsiyon tabakası üst yüzeye çıkar, oradan alınır ve biraz kaynatılarak emülsiyon kırılır, son olarak yağ tabakası dekante edilir. İşlemin temeli, emülsiyondaki yağ küreciklerinin birleşerek daha büyük damlacıklar oluşturmasına ve böylece santrifüjde kolay ayrılmasına dayanır [28].

Enzimatik sulu ekstraksiyon ve çözücü bazlı ekstraksiyon yöntemlerinin çözücü kullanımı, ekonomik maliyet, ürün kalitesi, yağ verimi, ürün ve çevreye olan etkileri açısından birçok avantaj ve dezavantajları vardır. Sulu enzimatik ekstraksiyon; çözücü ekstraksiyonu yerine kullanılan çevresel açıdan zararsız bir yöntemdir, dolayısıyla çevre dostudur. Yanıcılık ve patlayıcılık gibi güvenlik sorunları yoktur, hava kirletici olarak atmosfere uçucu organik bileşik salınımı yapmaz [29]. Farklı tohumlarla çalışılabilmesi açısından esnek bir çözümdür. Ilımlı işletme koşulları kimi zaman rafine edilmeyi gerektirmeyen yağ eldesini ve zehirsiz gıda üretimini mümkün kılar [24]. Çözücü ekstraksiyonunun yüksek ilk yatırım maliyeti vardır; sulu ekstraksiyon ile işlem maliyeti ve enerji gereksiniminin düşmesi sağlanabilir. Ayrıca bu yöntem yağlı tohumlardan aynı anda yağ ve protein elde edilmesine imkan sağlamaktadır.

Enzimatik sulu ekstraksiyonla elde edilen yağın kalitesinin yüksek olduğu araştırmalarda ortaya konmuştur. Denemeler enzimatik sulu ekstraksiyon ile edilen ham yağın renginin endüstriyel yöntem olan çözücü ekstraksiyonu ile edilen yağın

renginden daha açık olduğunu göstermiştir [30]. Başka bir araştırmada enzimatik sulu ekstraksiyon ve hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen yağların arasında serbest yağ asidi, peroksit ve diğer oksidasyon değerleri açısından fark olmadığı da gözlemlenmiştir [28]. Enzimatik ekstraksiyon ile düşük fosfatid içerikli, oldukça kararlı ve daha düşük seviyede renkli madde içeren ürünler elde edilebilmektedir. Bu sayede saflaştırma için daha az ağartma toprağına ihtiyaç duyulmaktadır. Geleneksel çözücü ekstraksiyonu yönteminde glukosinolat, tanin, sinapın ve fitik asit gibi maddeler yağın içinde kalır. Enzimatik sulu ekstraksiyonda ise bu istenmeyen maddeler yağın içinde oldukça düşük bulunur. Bu yöntem ile bazı toksin maddelerin ve besleyici olmayan bileşimlerin yağdan uzaklaştırılması sağlanabilir. Detoksisiteye gerek kalmadan yüksek kalitede yağ çıkar [31].

Diğer yandan, enzimatik sulu ekstraksiyon yönteminin başlıca dezavantajları düşük yağ verimi, önemli miktarda atık su üretmesi, yağ eldesi aşamalarının daha komplike olması, yağları alabilmek için gerekli olan uzun ekstraksiyon süreleri ve ticari olarak enzimlerin bulunabilme zorluğudur. Düşük verim sorununa çare olarak enzim katkılı sulu ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmektedir. Daha önce bahsedildiği gibi, ekstraksiyon verimi hücre duvarını degrade eden enzimlerin hidrolitik etkisi ile artırılabilir [25]. Atık su oluşumunu ve enerji tüketimini azaltmak için, ekstraksiyonda kullanılan su geri kazanılabilir ve tekrar kullanılabilir duruma getirilmelidir. Suyun sirkülasyonu sayesinde enzimin geri kazanılması da enzim maliyetini azaltabilir [28]. Ancak enzimin geri kazanılması ve tekrar kullanılabilmesi için işlem esnasında enzim aktivitesinin önemli oranda azalmamış olması gerekir [31].

Enzimatik sulu ekstraksiyon metodunun ekonomikliğinin incelendiği bir çalışmada çözücü ekstraksiyonu tesislerine göre bu yöntemin tesis kurulum maliyeti daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu çalışma, eğer piyasa değeri yüksek bir yağ eldesi söz konusu ise enzimatik ekstraksiyon yönteminin, endüstriyel olan çözücü yöntemiyle kolaylıkla rekabet edebileceğini ve eğer immobilize enzimler ile çalışılırsa enzim maliyetinin oldukça düşürülebileceğini ifade etmektedir [32].

## **2.6 Literatürde Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Üzerine Yapılmış Çalışmalar**

Çözücü ekstraksiyonuna alternatif olarak enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonunda son yıllarda birçok araştırma yapılmaktadır. Araştırmaların



çoğu yağ verimine ve kalitesine ekstraksiyon parametrelerinin etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Literatürdeki bu çalışmalar çeşitli enzimler kullanarak farklı bitkilerden ve yağlı tohumlardan yağ eldesi üzerine yapılmıştır.

Man ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hindistan cevizi yağının çeşitli enzimlerle ekstraksiyonu incelenmiş, selüloz, poligalakturonaz, proteaz ve  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin değişik konsantrasyonlarda, değişik pH (4-8) ve sıcaklıklarda (40-50-60°C) yağ verimi üzerindeki etkileri ölçülmüştür. Selüloz,  $\alpha$ -amilaz, poligalakturonaz ve proteaz enzimlerinin %1 ilavesi ile pH 7 ve 60°C de işleme tabi tutulunca en yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir (73.8%). Elde edilen yağların özellikleri ve rengi arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir [33].

Rosenthal ve arkadaşları, soya tohumlarından yağ ve protein eldesinde proteaz enzimi kullanımının verimi nasıl etkilediğini incelemişlerdir. Alkalaz enzimiyle protein verimi %66,2, yağ verimi ise %58,7 olarak bildirilmiştir. Selüloz, hemiselüloz ve pektinazla karşılaştırıldığında, proteazın daha yüksek verim sağladığı görülmüştür [34].

Sharma ve Gupta'nın yaptığı çalışmada kayısı ve badem tohumlarının enzimatik sulu ekstraksiyonundan önce ultrasonik ön işlem yapılmasının etkisi araştırılmıştır. Badem ve kayısının standart AOCS yöntemi ile elde edilen yağ içerikleri sırasıyla % 45 ve % 40 olmuştur. Badem tohumunda, 3 çeşit Proteaz enzimi karışımı kullanıldığında 40°C sıcaklıkta ve pH 4'te 18 saat sonunda ulaşılan ekstraksiyon verimi %75 olmuştur. Ultrasonik ön işlem uygulaması sonucunda ise ekstraksiyon verimi %95'e yükselmiş ve ekstraksiyon süresi de 6 saate düşmüştür. Kayısı tohumunda ise ekstraksiyon verimi ultrasonik ön işlem ile % 63'ten % 77'ye yükselmiş, ekstraksiyon süresi de 6 saate kısalmıştır [35].

Sant'Anna ve arkadaşları tarafından yapılan hindistan cevizinden yağ ve proteinin sulu ekstraksiyonu çalışmasında Viscozyme L, Termamyl 120 L, Pectinex 3XL, Celluclast 1.5L enzimlerinin ayrı ayrı Neutrased 1.5MG ve Alcalase enzimleri ile ikili kombinasyonu şeklinde çalışılmıştır. Substrat/su:1:6 (ağ/hac) seçilerek 30-60 dk ekstre edilmiştir. Viscozyme L ve Neutrased 1.5MG kombinasyonu ile en verimli sonuç elde edilmiş ve enzimden kontrol deneyi verimini %60 artırmıştır. %0,6'lık Viscozyme L ve % 0,3'lük Neutrased 1.5MG karışımı ile 30 dk inkübasyon sonucunda % 92 ekstraksiyon verimi elde edilmiştir [36].

Nyam ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada, Kalahari kavunu çekirdeğinden yağ eldesinde, iki farklı enzim, Flavourzyme 1000L ve Neutrase 0,8L kullanmıştır. Bu enzimler ile %68,58 ve 71,55 ekstraksiyon verimiyle yağ elde etmiştir. Tohumlardan enzimatik yöntem ile ve petrol eteri ile ekstrakte edilmiş yağların bileşimleri ve özellikleri arasında da önemli fark bulunmadığı bildirilmiştir [37].

Jiang ve arkadaşları Alcalase 2,4L enzimi kullanarak yer fıstığının yağ ve protein ekstraksiyonunun üzerine çalışmışlardır. En uygun proses koşulları: 60°C, pH 9,5, tohum-su oranı 1:5 (ağ/hac), enzim miktarı % 1,5 (ağ/ağ) ve inkübasyon süresi 5 saat olarak tespit edilmiştir. Bu koşullar altında, yağ ve protein hidrolizatları ekstraksiyon verimleri sırasıyla, % 79,32 ve % 71,38 olarak bildirilmiştir [38].

Latif ve arkadaşları tarafından kanola tohumlarından yağ ve proteinin sulu enzimatik ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu çalışmada Protex 7L, Multifect Pektinase FE, Multifect CX 13L ve Natuzyme enzimleri kullanılmıştır. Enzimatik ekstraksiyona tabi tutulan tohumların yağ verimi % 22,2 (Multifect Pektinase FE enzimi ile) – %26 (Multifect CX 13L enzimi ile) iken, enzim kullanılmadan % 16,5 değerlerine ulaşılmıştır. Bunların yanı sıra çözücü ekstraksiyonu sonucu ise % 43,1 olduğu bildirilmiştir [39].

Latif ve Anwar tarafından yapılan diğer bir çalışmada, enzimatik sulu ekstraksiyon prosesinin ayçiçeği yağının üstündeki etkileri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, Protex 7L, Alkalaz 2.4L, Viskozim L, Natuzim ve Kemzim olmak üzere 5 farklı enzim kullanılıp, en yüksek ekstraksiyon verimine (%87.25) Viskozim ile ulaşılmıştır. Bunun yanında, Protex 7L'nin sulu fazda en yüksek seviyede protein eldesi sağladığı belirlenmiştir [40].

Moreau ve arkadaşları mısır özünden mısır yağını eldesi amacıyla mısır özünü çeşitli enzimlerle 4 saat 50°C ve 16 saat 65°C da reaksiyona tabi tutmuşlardır. Mısır özü örneklerinden 3 farklı ticari selüloz kullanarak yaklaşık %80 ekstraksiyon verimleri ile yağ elde edilmiştir. Kullanılan enzim miktarları dört katı kullanıldığında ise verim %90'a yükselmiştir. Enzim kullanılmadan sadece sulu ekstraksiyon yöntemiyle ise ekstraksiyon veriminin %37 olduğu görülmüştür. Çözücü ekstraksiyonu yöntemiyle hekzanla ekstrakte edilmiş mısır özü yağıyla, enzimatik sulu ekstraksiyon kullanılarak elde edilmiş yağın aynı özelliklerde olduğu sonucuna varılmıştır [41].

Literatürde mikroalglerden yağ eldesinde enzimatik sulu ekstraksiyonun çalışıldığı az sayıda makale bulunmaktadır. Bunlardan biri; Liang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, enzim katkılı sulu ekstraksiyonun mikroalglerden yağ eldesi

alışılmıştır. Bu çalışmada, sellz, proteaz, alkali proteaz,snailase ve trypsin olmak üzere 5 farklı enzim denenmiştir. Çalışmada enzimler %0,5-%8,0(ađ/hac.) aralığında, farklı pH'larda ve farklı mikroalg türlerinde denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ekstraksiyon veriminin, yağ bileşimi, içerdiği yağ türü ve alg tipinden büyük ölçüde etkilendiği belirtilmiştir [42].



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1 Kullanılan Hammaddeler

Bu çalışmada kullanılan mikroalg (*Schizochtrium sp.* orijinli) Vitatis Biyoteknoloji tarafından üretilmiştir. Kullanılan mikroalg'in yağ asidi bileşimi Çizelge 3.1'de verilmiştir. Mikroalg çalışma boyunca buzdolabı koşullarında +4°C'de saklanmıştır.

Mikroalgden enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi deneylerinde proteaz olarak Alcalase 2.5L Type-DX ticari enzimi kullanılmıştır. Alcalase 2,5L Type-DX enzimi; *Bacillus licheniformis* mikroorganizmalarından elde edilen özgül olmayan serin tipi bir proteazdır. Proteolitik aktivitesi 2,5 AU/gr (Anson Units/gram) olan yüksek aktiviteye sahip bir enzimdir. Enzimin aktif olduğu uygun koşullar; sıcaklık 55-70°C ve substrat tipine bağlı olarak pH 4-8 aralığıdır.

Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ve disodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) kimyasalları kullanılarak ayrı ayrı 1/15 mol/L olacak şekilde stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden belirli oranlarda karıştırılarak farklı pH'larda fosfat tampon çözeltileri oluşturulmuştur.

Kullanılan kimyasallar Merck Chemical Co. tarafından temin edilmiş ve reaktifler analitik kullanım amaçlı olup en yüksek saflık değerindedir.

**Çizelge 3.1 :** Mikroalg(*Schizochtrium sp.*) yağının yağ asitleri bileşimi.

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)
Kaprik asit (C10:0)	%0,03
Laurik asit (C12:0)	%0,44
Tridekanoik asit (C13:0)	%0,03
Miristik asit (C14:0)	%14,85
Miristoleik asit (C14:1)	%0,02
Pentadekanoik asit (C15:0)	%0,56
Palmitik asit (C16:0)	%37,44
Palmitoleik asit (C16:1)	%4,66
Margarik asit(C17:0)	%0,15
Stearik asit(C18:0)	%1,87
Oleik asit(C18:1n+9c)	%2,15
$\gamma$ -Linoleik asit(C18:2n+6c)	%0,66
Linolenik asit(C18:3n-3)	%0,05
$\gamma$ -Linolenik asit(C18:3n-6)	%0,13
Araşidonik asit(C20:0)	%0,12
cis-13,16-Dokosadienoik asit(C22:1n-9)	%0,06
cis-4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenoik asit (C22:6n+3)	%35,23

## **3.2 Yöntemler**

### **3.2.1 Kullanılan mikroalgin öğütülmesi ve çözücü ekstraksiyonu ile yağ yüzdesinin belirlenmesi**

Deneysel çalışmalarda kullanılan mikroalg pelet şeklinde olup öğütme işlemi kahve değirmeninde yapılmıştır. Öğütme işlemi sonrası toz haline gelen mikroalg buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

Mikroalg'in yağ içeriğinin saptanmasında çözücü ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Yapılan tüm deneyler paralel olarak yürütülmüştür.

Mikroalgin yağ içeriğinin belirlenmesi için 5 gr öğütülmüş mikroalg 250 ml'lik erlene alınmış, üzerine 50 mL hekzan ilave edilmiştir. Mikroalg-hekzan karışımını içeren erlen ısıtıcılı çalkalayıcıya konmuştur. Ekstraksiyon işlemi; 30°C sıcaklıkta, 200 rpm karıştırma hızında 6 saat ekstraksiyon süresinde yürütülmüştür. Ekstraksiyon sonrası elde edilen yağ-hekzan çözeltisi ağırlığı belli balona filtrasyon işlemi sonrası alınmış ve hekzan döner buharlaştırıcıda (Laborata 4000-efficient Heidolph, USA) uçurulmuştur. Hekzanın buharlaştırılma işlemi atmosfere açık olarak 95°C, 180 rpm'de yapılır. Balon içerisinde kalan az miktarda hekzanı uçurmak için sistem atmosfere kapatılarak vakum uygulanır. İşlemler sonunda, balon tekrar tartılarak elde edilen yağ miktarı üzerinden mikroalgin yağ yüzdesi hesaplanmıştır.

### **3.2.2 Deney düzeneğinin oluşturulması**

Enzimatik sulu ekstraksiyon çalışmaları daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilen enzimatik sulu ekstraksiyon çalışmaları temel alınarak önce polikarbonat falkon tüplerde gerçekleştirilmiştir [43]. Bu çalışmalarda, 4 gr mikroalg 50 mL'lik falkon tüpe konmuş, üzerine 0,5 mL enzim/g mikroalg ve pH 5 değerinde 30 mL tampon çözelti ilave edilmiştir. Deneyler 50°C sıcaklıkta, 200 rpm de orbital karıştırıcı cihazında 4 saat süreyle yürütülmüştür. Ancak bu çalışmalar sonucunda mikroalgden elde edilen yağ miktarı oldukça düşük bulunmuştur. Düşük ekstraksiyon verimi nedeniyle çalışmalar sıcaklık kontrollü laboratuvar tipi çalkalayıcıda aynı şekilde gerçekleştirilmiştir ancak ekstraksiyon verimi artmasına rağmen beklenenin oldukça altında çıkmıştır.

Bunun üzerine deneysel çalışmalarda falkon tüpü yerine 250 mL'lik erlen ve 250 mL'lik balonlar kullanılarak yukarıda belirtilen koşullarda çalışmalar yürütülmüştür.

Erlende gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucunda yağ içeriğinin arttığı gözlemlenmiş ve daha sonraki çalışmaların tümü 250 mL erlende ve çalkalayıcıda 200 rpm sabit karıştırma hızında yürütülmüştür.

Erlende yürütülen çalışmalarda kullanılan tampon çözelti miktarının karıştırmaya ve ekstraksiyon verimine etkisini belirlemek amacıyla sulu ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 4 g mikroalg, 0.5 mL enzim/g mikroalg, 250 mL lik erlene konmuş üzerine farklı miktarlarda (30 mL, 40 mL) tampon çözelti ilave edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı 50°C, karıştırma hızı 200 rpm, ekstraksiyon süresi 4 saat olarak sabit tutulmuştur. Bu deneyler sonucunda çözelti miktarının artırılmasının çok etkili olmadığı gözlemlenmiştir ve daha sonra yürütülen deneylerde çözelti miktarı 30 mL olarak sabit tutulmuştur.

### **3.2.3 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesi ve ekstraksiyon veriminin hesaplanması**

Enzimatik sulu ekstraksiyon deneyleri için, 4 gr mikroalg, 250 mL'lik erlene konulmuştur. Üzerine istenilen pH değerinde, 30 mL fosfat tampon çözeltisi ve belirli miktarda enzim ilave edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi belirli sıcaklık ve reaksiyon sürelerinde 200 rpm çalkalama hızında devam ettirilmiştir. Çalkalama işlemi bittikten sonra ekstraksiyon karışımını içeren erlen 90°C'de sıcak su banyosunda 15 dakika bekletilerek enzimler inaktif hale getirilmiştir ve 10 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldıktan sonra, santrifüj için 50 mL'lik polikarbonat falkon tüplere aktarılmıştır. Falkon tüpler santrifüj cihazına (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Germany) dengeli şekilde yerleştirilmiş ve 4000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenen karışımda 4 faz gözlenmiştir. Fazlar yukarıdan aşağı sıralandığında; en üstte serbest yağ fazı, altında kremamsı yağ-su emülsiyon fazı, ardından berrak olmayan sulu faz ve en dipte ise küspe olarak isimlendirilen katı faz bulunmaktadır.

Enzimatik sulu ekstraksiyon denemelerinde karşılaşılan en büyük zorluk; enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan hidroliz ürünleri (protein, selüloz, hemiselüloz, pektin gibi moleküllerin hidroliz ürünleri) ile sulu ortama geçen yağ molekülleri arasında emülsiyon oluşmasıdır. Dolayısıyla yağın tamamının serbest halde yüzeyde toplanması güçleşmektedir. Oluşan emülsiyon yağ kaybına neden olmaktadır ve



kırılması kolay değildir. Bu nedenle bu çalışmada yağ verimi aşağıda açıklanan yöntemle göre belirlenmiştir.

**Çözücü vasıtasıyla sıvı fazlardan geri kazanılan yağ üzerinden ekstraksiyon veriminin ( $V_s$ ) hesaplanması:** Bu metotta çözücü kullanımı sadece tayin amaçlıdır ve yağ kaybı ile verimin düşmemesi içindir. Santrifüj tüpündeki küspe hariç diğer 3 faz, içerisinde çözücü (50 mL hekzan) bulunan ayırma hunisine aktarılır. Tüpte yağ kalmasını önlemek amacıyla 10 mL hekzan ile tüpte yıkama yapılır ve yıkama çözeltisi de ayırma hunisine eklenir. Ayırma hunisi dikkatli bir şekilde çalkalandıktan sonra fazların ayrılması beklenir. Oluşan fazlar altta sulu faz ve üstte hekzan fazıdır. Alttan alınan sulu faz ayrı bir ayırma hunisine alınır ve 50 mL hekzan ile tekrar çalkalanarak içinde kalabilecek yağ hekzan fazına alınır. İkinci ayırma hunisinden elde edilen alt sulu faz 3 kere 50 mL hekzan ile muamele edilerek işlem tekrarlanır. Tüm hekzan fazları tek bir ayırma hunisinde toplanarak son olarak 100 mL su ile yıkanır ve fazların ayrılması beklenir. Alt sulu faz ayrıldıktan sonra üstteki hekzan fazına sodyum sülfat ( $Na_2SO_4$ ) eklenerek kalabilecek suyun uzaklaşması sağlanır. Daha sonra bu yağ-hekzan fazı darası belli balona filtrasyon işlemi sonrası alınır. Çözücü giderme işlemi döner buharlaştırıcıda yapılır. Hekzanın buharlaştırılma işlemi atmosfere açık olarak  $95^{\circ}C$ , 180 rpm'de yapılır. Balon içerisinde kalan az miktarda hekzanı uçurmak için sistem atmosfere kapatılarak vakum uygulanır. İşlemler sonunda balonda kalan yağ miktarı tartılarak aşağıdaki formülle  $V_s$  verimi hesaplanır.

$$V_s (\%) = (Y_s/Y_b) \times 100 \quad (3.1)$$

$Y_s$  = Sıvı fazlardan çözücü ile geri kazanılan yağ miktarı, gram;

$Y_b$  = Kullanılan tohumların içerdiği başlangıç yağ miktarı, gram.



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Mikroalg'in Yağ İçeriği

Bu çalışmada kullanılan mikroalg Vitatis Biyoteknoloji firması tarafından üretilmiş olup, yağ içeriği n-hekzan kullanılarak çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile %18,6 olarak belirlenmiştir. Bu değer literatürde bulunan *Schizochtrium sp.* mikroalg türünün yağ içeriği aralığın altında bulunmakta olup, düşük yağ içerikli bir üründür. Kullanılan ürünün üretim koşullarına bağlı olarak yağ içeriği değişiklik göstermekte olup, bu çalışmada tüm deneyler tek bir parti mikroalg üzerinden yapılmıştır.

Deneylerde kullanılan mikroalg yağ asidi bileşimine bakıldığında, kullanılan mikroalg yağı omega-3 yağ asitlerinden olan dokosaheksaenoik(DHA) asitçe zengindir ve bileşimin %35,23 ünü kapsamaktadır. Bunun yanı sıra doymuş yağ asitlerinden olan palmitik asit ise %37,44 ünü içermektedir.

### 4.2 Deney Ortamının ve Karıştırıcı Tipinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

DeneySEL çalışmalara, daha önce yapılmış çalışmalar temel alınarak başlanmıştır. Deney düzeneğinin ekstraksiyon verimine etkisini belirlemek amacıyla önce farklı tipte karıştırıcılarda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deneyler, pH 5, değerinde 30 mL tampon çözelti, 50°C'de, 0,50 mL/g mikroalg enzim miktarında 4 saat süre ile orbital shaker ve ısıtıcılı çalkalayıcıda yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, ısıtıcılı çalkalayıcıda yürütülen ekstraksiyon işleminde daha iyi verim alındığı görülmüş ve bundan sonraki deneyler ısıtıcılı çalkalayıcı kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra ekstraksiyon ortamının ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ekstraksiyon işlemleri, 30 mL, pH 5 değerindeki tampon çözelti, 0,50 mL/g mikroalg enzim miktarında, 50°C sıcaklıkta, 4 saat süre ile polikarbonat falkon tüp, 250 mL'lik erlen ve 250 mL'lik balonda yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1 :** Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, karıştırıcı tipinin ekstraksiyon verimine etkisi (tampon çözelti miktarı: 30 mL, pH: 5, enzim miktarı: 0,50 mL enzim/g mikroalg, sıcaklık: 50°C, ekstraksiyon süresi: 4 saat karıştırma hızı: 200 rpm).

<b>Karıştırıcı tipi</b>	<b>Ekstraksiyon verimi (%Vs)</b>
Orbital çalkalayıcı	8,85
Isıtıcılı çalkalayıcı	10,23

**Çizelge 4.2 :** Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon ortamının ekstraksiyon verimine etkisi (tampon çözelti miktarı: 30 mL, pH: 5, enzim miktarı: 0,50 mL enzim/g mikroalg, sıcaklık: 50°C, ekstraksiyon süresi: 4 saat karıştırma hızı: 200 rpm).

<b>Deney ortamı</b>	<b>Ekstraksiyon verimi (%Vs)</b>
Polikarbonat falkon tüp	10,23
Erlen (250 mL)	22,88
Balon (250 mL)	20,61

Çizelge 4.2 incelendiğinde, yüzey alanının artmasının ekstraksiyon verimine artı yönde etki ettiği görülmüştür. 250 mL'lik balon'da gerçekleştirilen ekstraksiyon deneylerinde, mikroalgin balon boğum noktalarında birikmesi ekstraksiyon verimini düşürmüştür. En yüksek ekstraksiyon veriminin 250 mL'lik erlen ile yürütülen deneyler sonucunda elde edildiği görülmüş ve bundan sonraki çalışmalara 250 mL'lik erlen kullanılarak devam edilmiştir. Deney düzeneğinin belirlenmesindeki son aşamada tampon çözelti miktarındaki artışın ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla pH 5'de 40 mL tampon çözelti miktarında ve diğer ekstraksiyon koşulları sabit tutularak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

**Çizelge 4.3 :** Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, tampon çözelti miktarının ekstraksiyon verimine etkisi (pH: 5, enzim miktarı: 0,50 mL enzim/g mikroalg, sıcaklık: 50°C, ekstraksiyon süresi: 4 saat, karıştırma hızı: 200 rpm).

Tampon çözelti miktarı (mL)	Ekstraksiyon verimi (%Vs)
30	22,88
40	22,48

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde tampon çözelti miktarındaki artış ekstraksiyon verimi üzerinde kayda değer bir etki göstermemiştir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalar ekonomik açıdan da yarar sağlayabileceği için 30 mL tampon çözelti miktarında yürütülmüştür.

#### **4.3 Mikroalgden Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Yöntemi ile Yağ Eldesinde Ekstraksiyon Verimini Etkileyen Parametrelerinin İncelenmesi**

Çalışmanın bundan sonraki aşamasında enzimatik sulu ekstraksiyon işlemine etki edecek parametrelerin belirlenmesi amacıyla deneysel çalışmalar yürütülmüştür.

Yağ ekstraksiyon verimine etki edebileceği düşünülen parametreler pH, enzim miktarı, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık olarak belirlenmiştir.

Bilindiği gibi her enzimin aktivite gösterdiği bir pH ve sıcaklık aralığı vardır. Bu çalışmada enzimatik sulu ekstraksiyon işlemi için pH aralığı 5-8 ve sıcaklık aralığı 30-50°C olarak seçilmiştir. Enzim miktarı olarak daha önce enzimatik sulu ekstraksiyon çalışmaları temel alınarak gram mikroalg başına 0,25-1,25 mL enzim aralığı seçilmiştir. Ekstraksiyon süresi aralığı ise 4-24 saat olarak belirlenmiştir.

Bu şekilde seçilen çalışma koşullarında yürütülen deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

##### **4.3.1 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde pH değerinin ekstraksiyon verimine etkisi**

Bilindiği gibi her enzimin optimum aktivite gösterdiği bir pH değeri veya pH aralığı bulunmaktadır. Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesine pH etkisinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Ekstraksiyon deneyleri,

pH 5-8 aralığında, 30 mL tampon çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmiştir.

**Çizelge 4.4 :** Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, pH değerinin ekstraksiyon verimine etkisi (tampon çözelti miktarı: 30 mL, sıcaklık: 50°C, ekstraksiyon süresi: 4 saat, enzim miktarı: 0,50 mL enzim/g mikroalg, karıştırma hızı 200 rpm).

Tampon çözeltisi pH değeri	Ekstraksiyon verimi (%Vs)
5	22,88
6	30,15
7	38,97
8	42,02

Çizelge 4.4’de verilen sonuçlar incelendiğinde, en yüksek ekstraksiyon veriminin pH 8 değerinde elde edildiği görülmektedir. Bu sonuç enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ile uyumluluk göstermektedir. Bundan sonraki çalışmalar için pH değeri 8 olarak sabit tutulmuştur.

#### **4.3.2 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde enzim miktarının ekstraksiyon verimine etkisi**

Çalışmanın bu kısmında kullanılan proteaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği uygun enzim miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 0,5-1,25 mL enzim/g mikroalg aralığında değişen enzim miktarlarında ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir.

**Çizelge 4.5 :** Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, enzim miktarının ekstraksiyon verimine etkisi (tampon çözelti miktarı: 30 mL, pH: 8, sıcaklık: 50°C, ekstraksiyon süresi: 4 saat, karıştırma hızı: 200 rpm).

Enzim miktarı (mL enzim/g mikroalg)	Ekstraksiyon Verimi (% Vs)
0,50	42,02
0,75	46,86
1,00	56,75
1,25	48,31

Çizelge 4.5’de verilen sonuçlar incelendiğinde, en yüksek ekstraksiyon veriminin 1,00 mL enzim/g mikroalg miktarında elde edildiği görülmüştür. Enzim miktarındaki artışın ekstraksiyon verimini düşürdüğü gözlenmiştir, bunun nedeni ekstraksiyon ortamının enzim miktarı açısından doygunluğa erişmesinden kaynaklandığı söylenebilir.

#### **4.3.3 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisi**

Ekstraksiyon verimine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 30°C-50°C sıcaklık aralığında çalışmalar yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’de verilmiştir.

**Çizelge 4.6 :** Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisi (tampon çözelti miktarı: 30 mL, pH: 8, enzim miktarı: 1,00 mL enzim/g mikroalg, ekstraksiyon süresi: 4 saat, karıştırma hızı: 200 rpm).

Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon Verimi (% Vs)
30	43,11
40	50,57
50	56,75

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, en yüksek ekstraksiyon veriminin 50°C’de elde edildiği görülmektedir. Çalışmada daha yüksek sıcaklıklara çıkılması belki ekstraksiyon verimini artırabilir. Ancak bu çalışmada kullanılan mikroalg Vitatis Biyoteknoloji firmasının yürüttüğü proje kapsamında üretilmiştir. Projede amaç mikroalgden elde edilen yağ içerisindeki omega-3 yağ asitlerinin miktarının artırılması ve uygun şekilde bozunmadan elde edilmesidir. Omega-3 yağ asitleri yüksek sıcaklıklarda bozunmaktadır. Vitatis Biyoteknoloji firması proje kapsamında sıcakta soxhlet ekstraksiyonu ile mikroalgden yağ elde etmeye çalışmış ancak elde edilen yağ çok koyu renkte, katran görünümünde olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda enzimatik sulu ekstraksiyon çalışmalarında da bu tür bir yağ elde etmemek ve omega-3 yağ asidinin bozunmasını önlemek için ekstraksiyon işlemine daha yüksek sıcaklıklarda devam edilmemiş ve çalışma için en uygun sıcaklığın 50°C olmasına karar verilmiştir.

#### **4.3.4 Mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimine etkisi**

Daha önce belirlenen uygun pH, sıcaklık, enzim miktarı değerleri sabit tutularak ekstraksiyon verimine sürenin etkisini incelemek amacıyla 4, 6, 12, 18, 24 saatlik ekstraksiyon sürelerinde çalışmalar yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

**Çizelge 4.7** : Mikroalgin enzimatik sulu ekstraksiyonunda, sürenin ekstraksiyon verimine etkisi (tampon çözelti miktarı: 30 mL, pH: 8, enzim miktarı: 1,00 mL enzim/g mikroalg, sıcaklık: 50°C, karıştırma hızı: 200 rpm).

<b>Süre (saat)</b>	<b>Ekstraksiyon Verimi (%Vs)</b>
4	56,75
6	59,13
12	61,47
18	62,62
24	63,32



Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 12 saatlik ekstraksiyon işleminden sonra ekstraksiyon süresindeki artışın ekstraksiyon verimi üzerinde kayda değer bir artış göstermediğini söyleyebiliriz. Ayrıca ekstraksiyon işlemi uzadığında elde edilen yağın görünüşü zamksı bir hal almakta ve yapısı bozulmaktadır. Bu da çalışmacının amacına yönelik bir yağ elde edilmemesi demektir. Bu nedenle en uygun ekstraksiyon süresinin bu koşullar için 12 saat olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma sonucunda belirlenen en uygun ekstraksiyon koşullarında (30 mL, pH:8 tampon çözelti; 1,00 mL enzim/g mikroalg enzim miktarı; 50°C' sıcaklık; 12 saat ekstraksiyon süresi) elde edilen ekstraksiyon verimi %61,47 olarak belirlenmiştir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, ticari olarak üretilen bir mikroalgden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle endüstriyel olarak kullanılabilir bir yağ eldesidir. Bu amaçla, Vitatis Biyoteknoloji firmasından temin edilen mikroalg (*Schizochytrium sp.*) enzimatik sulu ekstraksiyonuna etki edebileceği düşünülen pH, enzim miktarı, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi gibi parametreler için uygun değerlerin belirlenmesi için deneyler yürütülmüştür. Çalışmada Alcalase 2.5L proteaz enzimi kullanılmıştır. Yapılan çalışmada kullanılan mikroalglerin yağ içeriği 30°C'de çözücü ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İşlem sonucunda mikroalg yağ içeriği %18,6 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek ekstraksiyon verimi için elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Tampon çözelti miktarı: 30 mL

Tampon çözelti pH değeri: 8

Enzim miktarı: 1,00 mL enzim/g mikroalg

Sıcaklık: 50°C

Ekstraksiyon süresi: 12 saat

Bu koşullarda elde edilen en yüksek ekstraksiyon verimi ise %61,47 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmanın ileriye yönelik uygulamaları için, farklı enzimlerin etkileri ve farklı enzim karışımlarının etkileri araştırılabilir. Vitatis Biyoteknoloji firmasının yürütmüş olduğu çalışmalar sonucunda elde edilen mikroalg yağ asidi bileşiminde EPA iz miktarlarda bulunmakta olup, DHA %35,23'lük bir orana sahip olduğu görülmüştür. Proje kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda yağ içeriğinin değişmesi, ileride yapılacak çalışmalarda kullanılacak enzim türlerinin ve miktarlarının araştırılmasına öncülük edebilir ve enzimatik sulu ekstraksiyon veriminin artırılması için gerekli parametrelerin optimizasyon çalışmaları yapılabilir. Ekstraksiyon verimine etki edebilecek parametrelerin optimizasyonu için yanıt yüzey metodu kullanılabilir.

İncelenen parametrelere göre elde edilen sonuçların endüstriyel düzeyde çalışılabilirliği ve ekonomik açıdan ticari potansiyeli incelenebilir.

İleriye dönük mikroalglerin enzimatik sulu ekstraksiyon çalışmalarında, ekstraksiyon veriminin etkilendiği en büyük etken olan alg türünün etkileri incelenebilir ve aynı cins alg türlerinin belirlenen yöntemler ile yağ eldesi araştırılabilir. Her tür algin farklı yağ bileşimi ve içeriğine sahip olmasından dolayı yapılan çalışmalarda, yağ bileşimine bağlı olarak kullanılan enzim miktarı, enzim tipi gibi parametreler değişebilir ve bunların ikili etkileşimleri incelenebilir. Elde edilebilecek sonuçlara göre, mikroalglerin yağ, enerji, sağlık vb. birçok alanda ticari kullanım potansiyeli konusunda da bilgi edinilebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] **Url-1**, Hacettepe Üniversitesi Arşivi, alındığı tarih: 22.10.2015 <<http://yunus.hacettepe.edu.tr/~akbulut/sayfalar/alg.html>>, sayfa 1-2.
- [2] **Yahya Ulusoy**, Enerji ve Algler(Mikro-Makro Algler), U.Ü. Teknik Bilimler MYO, Tarım Makinaları Programı, sayfa 23-53
- [3] **Linda E. Grahaman, Lee W. Wilcox** (2000). Prentice-Hall, Algae, Ch. 1-4, 1-78.
- [4] **A. Richmond**, Outdoor mass cultures of microlagae, Handbook of Microalgal Mass Cultures of Microalgae, (ed. Richmond A), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. (1986), 285–329.
- [5] **Mauseth, James D.**, Botany, an Introduction to Plant Biology 2/e, Multimedia Enhanced Edition, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, Ch. 21, 575–609.
- [6] **Evrım Ağacı**, Evrimsel Süreç – 14:Algler, Bitkiler ve Evrimsel Tarihleri(500 Milyon Yıl Öncesi ve Günümüz), 2012, sayfa 2-6.
- [7] **Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A.**, Commercial Applications of Microalgae, 87-96.
- [8] **Adarme-Vega, T.C., Thomas-Hall S.R. and Schenk, P.M.**, Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. Current Opinion in Biotechnology (2014), 14–18.
- [9] **Lim, D.K., Garg, S., Timmins, M., Zhang, E.S., Thomas-Hall, S.R., Schuhmann, H., Li,Y., Schenk, P.M.**, Isolation and Evaluation of Oil-Producing Microalgae from Subtropical Coastal and Brackish Waters (2012)
- [10] **Mehmet Naz, Kaya Gökçek**, Fotobiyoreaktörler: Fototropik Mikroorganizmalar için Alternatif Üretim Sistemleri,
- [11] **Laing I., Ayala, F.**, Commercial Mass Culture Techniques for Producing Microalgae, SPB Academic Publishing, 1990
- [12] **Glaue R.M., Maxey J.E.**, Microalgal Feeds for Aquaculture. Journal of Applied Phycology, 1994
- [13] **Barclay W.R., Meager K.M., Abril J.R.**, Heterotrophic Production of Long Chain Omega-3 Fatty Acids Utilizing Algae and Algae-like Microorganisms, Journal of Applied Phycology, 1994
- [14] **Ferit Rad, İsa Şen**, Biyo-Ekonomi ve Su Ürünleri: Mavi Ekonomi ve Fırsatlar, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Biyo-Ekonomi Çalıştayı, 2014
- [15] **Url-2**, Dünya Gıda Derigisi, 2010, alındığı tarih: 22.10.2015, <<http://dunyagida.com.tr>>, sayfa 2-4.

- [16] **Sheety, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E.**, Food Biotechnology Second Edition, Taylor&Francis Group, CRC Presss, 505-506
- [17] **Esin Bağcı, Erkan Can**, Omega-3 Yağ Asitleri Temininde Sürdürülebilir Kaynakların Rolü, *Bilim ve Gençlik Dergisi*, 2015, 77-89
- [18] **Nazan Çelikel, Özer Kınık, Sıddık Gönç, Gökhan Kavas**, Mikroalgelerin Gıdalarda Renk Verici Madde(Pigment) Kaynağı Olarak Kullanımı, Türkiye 9. Gıda Kongresi 24-26 Mayıs 2006, Bolu
- [19] **Xu, H., Miao, X., Wu Q.**, High Quality Biodiesel Production From a Microalga *Chlorella protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters, 2006, 499-507.
- [20] **Dr. Gray, R.**, DHA and EPA Rick Oil From the Microalgae *Schizochytrium*, Food Standarts Agency
- [21] **Ayşe Neslihan SAY, Ülker Diler KERİŞ, Ünal ŞEN, Mirat D. GÜROL**, Mikroalglerden Biyokütle Enerjisi Üretimi ve Türkiye, VIII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu(UTES'10), 1-5 Aralık 2010, Bursa, sayfa 263-271
- [22] **Ahmad, A.L, Yasin, N.H.M., Derek J.K., Lim J.K.**, Microalgae as a Sustaniable Energy Source for Biodiesel Produciton: A Review, *Journal of Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, pp 585,591
- [23] **Ghodsvali, A., Khodaparast, H., Hosein, M.H., Diosady, Levente, L**, Aqueous Extraction of Virgin Olive Oil Using Industrial Enzymes, *Food Res.* 2009, 171-175.
- [24] **Latif, S. and Anwar, F.**, Effect of Enzymatic Processes on Sunflower Oil Quality, *J Am Oil Chem Soc*, **86**, 2009, 393-400.
- [25] **Ramadan, M. F., Moersel, J., Moersel T.**, Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (*Physalis peruviana L.*) pomace: range of operational variables, *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 2009, 435-444.
- [26] **De Moura, J. M. L. N., Campbell, K., Mahfuz, A., Jung, S., Glatz, C.E., ve Johnson, I.**, Enzyme-assisted Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybeans and Cream De-emulsification, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **85**, 2009, 985-995.
- [27] **Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjan, K.**, Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction, *Enzyme Microb Technol.*, **19**, 1996, 402-420.
- [28] **Dunford, N.T., Dunford, H.B.**, Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing, *AOCS Publishing*, Ch. 5, 2004.
- [29] **DTM**, (2002). Dış Ticaret Müsteşarlığı, Değişik Kayıtlar, Ankara.
- [30] **Abdulkarim, S.M., Long, K., Lai, O.M., Muhammad, S.K.S., Ghazali, H.M.** (2005). Some physico-chemical properties of Moringa oleifera seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods, *Food Chemistry*, **93**(2), 253-263.

- [31] **Dominguez, H., Nunez, M.J., ve Lema, J.M.,** Oil Extractability from Enzymatically Treated Soybean and Sunflower: Range of Operational Variables, *Food Chem.*, **46**, 1993, 277–284.
- [32] **Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., Gilmour, S., ve Trinca, L.,** Combined Effect of Operational Variables and Enzyme Activity on Aqueous Enzymatic Extraction of Oil and Protein from Soybean, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, **2001**, 499–509.
- [33] **Man, Y.B.C., Asbi, A.B., Azudin, M.N. and Wei, L.S.,** Aqueous Enzymatic Extraction of Coconut Oil, *JAOCs*, Vol. 73, No.6, 1996.
- [34] **Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., Gilmour, S., ve Trinca, L.** (2001). Combined Effect of Operational Variables and Enzyme Activity on Aqueous Enzymatic Extraction of Oil and Protein from Soybean, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 499–509.
- [35] **Sharma, A., Gupta, M., N.,** Ultrasonic Pre-irradiation Effect Upon Aqueous Enzymatic Oil Extraction from Almond and Apricot Seeds, *Ultrasonics Sonochemistry*, **13**, 529-534, 2006.
- [36] **Sant'Anna, P., M., Freitas, P., S., Coelho, M.A.,** Enzymatic Aqueous Technology for Simultaneous Coconut Protein and Oil Extraction, *Grasas Y Aceites*, Vol. 54, 77-80, 2003.
- [37] **Nyam, K.L., Tan, C.P., Man, Y.B.C., Lai, O.M. and Long, K.,** Physicochemical properties of Kalahari melon seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods, *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 694–701, 2009.
- [38] **Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., ve Xu, S.,** Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates, *Food Sci. Technol.*, **14**, 533-540, 2009.
- [39] **Latif S., Diosady, L.L., Anwar, F.,** Enzyme-assisted Aqueous Extraction of Oil and Protein from Canola (*Brassica napus* L.) seeds, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **110**, 887-892
- [40] **Latif, S. ve Anwar, F.,** Effect of Enzymatic Processes on Sunflower Oil Quality. *J Am Oil Chem Soc*, **86**, 393-400, 2009.
- [41] **Moreau, R.A., Johnston, D.B., Powell, M.J., ve Hicks, K.B.,** A Comparison of Commercial Enzymes for the Aqueous Enzymatic Extraction of Corn Oil from Corn Germ, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **11**, 2006, 1071-1075.
- [42] **Liang K., Zhang Q., Cong W.,** Enzyme-assisted Aqueous Extraction of Lipid from Microalgae, *J. Agric Food Chem.*, **60**, 2014.





## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad** : Yiğit AYHAN  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : İstanbul, 1990  
**Adres** : Çınar Mah. Tolga Sok. No:6/6 Maltepe/İST.  
**E-posta** : ayhan.yigit@yahoo.com  
**Lisans** : Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,  
Kimya Mühendisliği Bölümü