

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FUNGAL LİPİD ÜRETİMİ: OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI VE BİYOZİDEL
ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİ

FİGEN ÇİÇEK

HAZİRAN2012

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

25/06 /2012


Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İhşan AKYURT



Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.


Doç. Dr. Emine YALÇIN

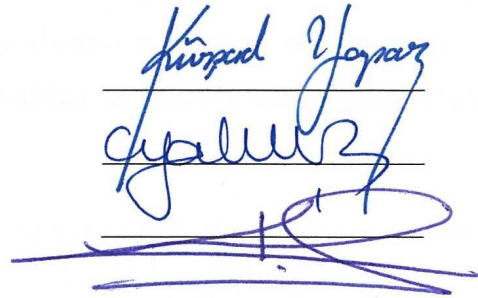
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Kürşad YAPAR

Doç. Dr. Emine YALÇIN

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU



ÖZET

FUNGAL LİPİD ÜRETİMİ: OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI VE BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİ

ÇİÇEK, Figen

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Emine YALÇIN

HAZİRAN 2012, 49 sayfa

Bu çalışmada *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum* ve *Fusarium culm* mantarlarından lipid üretimi ve elde edilen lipidden de biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Maksimum lipid üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla pH, farklı karbon ve azot kaynakları, demir varlığı gibi çeşitli sistem parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Kültür ortamlarından lipid ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen lipidler biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Biyodizel üretimi transesterifikasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen biyodizelin karakterizasyonu karbon kalıntısı, viskozite, parlama noktası ve kükürt oranı analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda maksimum fungal lipid üretimi *Fusarium proliferatum* ile 24.96g/L olarak bulunmuştur. Lipidlerden elde edilen biyodizelin araştırılan karbon kalıntısı, kükürt oranı, kinematik viskozite ve parlama noktası özellikleri standartlara uygun bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culm*, biyodizel, transesterifikasyon

ABSTRACT

FUNGAL LIPID PRODUCTION: OPTIMIZATION STUDIES AND USAGE IN BIODIESEL PRODUCTION

ÇİÇEK, Figen

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc.Prof. Dr.Emine YALÇIN

JUNE 2012, 49pages

In this study lipid production from *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum* ve *Fusarium culmorum* was studied, and biodiesel production from these lipids was investigated. The effect of system parameters such as pH, carbon source type, nitrogen source type and presence of iron on lipid production was investigated. Fungal lipid extraction from fungal biomass was achieved and the extracted lipids were used in biodiesel production. Transesterification method was used in biodiesel production. Flash point, viscosity, sulfur content and carbon residue analysis were used in biodiesel characterization. In the result of study, maximum lipid production were found as 24.96g/L by *Fusarium proliferatum*. Flash point, viscosity, sulfur content and carbon residue properties of the biodiesel produced in this study was found as in the range of standards.

Key Words: *Fusarium proliferatum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, biyodiesel, transesterification

TEŞEKKÜR

Çalıőmamım gerekleőmesinde emekleri baőta olmak üzere bana sağladığı hertürlü katkısından ve sabrından dolayı tez danıőmanım Sayın Doç. Dr. Emine YALÇIN'ateőekkürlerimi sunarım.

Her konuda yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. KültiėinÇAVUŐOĐLU'na teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmamda bana yardım eden arkadaőım Serdar KARAKUŐLU'ya teşekkür ederim.

Varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Alternatif Enerji Kaynakları	2
1.2. Biyoyakıtlar	3
1.2.1. Biyodizel	5
1.2.1.1. Biyodizelin Teknik Özellikleri	6
1.2.1.1.1. Kinematik Viskozite	7
1.2.1.1.2. Yoğunluk ve Bağlı Yoğunluk	7
1.2.1.1.3. Parlama Noktası	7
1.2.1.1.4. Bulutlanma ve Akma Noktası, Soğuk Filtre Tıkanma Noktası.....	8
1.2.1.1.5. Setan Sayısı	8
1.2.1.1.6. Oksidasyon Stabilitesi	9

1.2.1.1.7. Yağlama Özellikleri	9
1.2.1.1.8. Asit Değeri	9
1.2.1.1.9. Serbest Gliserol	10
1.2.1.1.10. Toplam Gliserol.....	10
1.2.1.1.11. Karbon Kalıntısı	11
1.2.1.2. Biyodizel Üretimi	11
1.2.1.2.1. Transesterifikasyon	13
1.2.1.3 Biyodizel Üretiminde Kullanılan Lipidler	16
1.2.1.3.1. Bitkisel Lipidler.....	16
1.2.1.3.2. Hayvansal Lipidler	17
1.2.1.3.3. AlgalLipidler	17
1.2.1.3.4. MikrobiyalLipidler	18
1.2.1.3.5. FungalLipidler	18
1.2.1.4. FungalLipid Üretimi Biyokimyası.....	19
1.2.1.5. Biyokütle.....	20
1.2.1.6. Yapılmış Çalışmalar	21
2. MATERYAL VE METOT	23
2.1. Mikroorganizmaların Temini ve Saklanması	23
2.2. Mikroorganizmaların Üretimi	23
2.3. Total Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi	24
2.4. Optimum Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi	25

2.4.1. Lipid Üretimi Üzerine pH Etkisi.....	25
2.4.2. Lipid Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi	25
2.4.3. Lipid Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi	25
2.4.4.Lipid Üretimi Üzerine Demir Varlığının Etkisi.....	26
2.5. LipidEkstraksiyonu.....	26
2.6. Biyodizel Üretimi	26
2.7. Biyodizelin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu.....	27
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
3.1. Lipid Üretimi Üzerine pH Etkisi	28
3.2. Lipid Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi	29
3.3. Lipid Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi	30
3.4. Lipid Üretimi Üzerine Demir Varlığının Etkisi.....	31
3.5. Biyodizel Özellikleri	32
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	49

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO

1.1. Alternatif enerji kaynakları	2
2.1. Besiyeri içeriği	23
3.1. Biyodizelkarakterizasyonu.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. Biyoyakıtların sınıflandırılması	3
1.2. Viskozite azaltma yöntemleri.....	12
1.3. Transesterifikasyon reaksiyonu.....	13
1.4. Transesterifikasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	15
3.1.Lipid üretimi üzerine pH etkisi	29
3.2.Lipid üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi	30
3.3. Lipid üretimi üzerine azot kaynağı etkisi.....	31
3.4. Lipid üretimi üzerine demir varlığının etkisi	32

KISALTMALAR

NaOH	Sodyum hidroksit
TAG	Triaçilgliserol
TCA	Trikarbosilik asit döngüsü

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun ve insan ihtiyaçlarının hızlı artışına bağlı olarak enerji tüketimi de gün geçtikçe artmaktadır. Bu artışa bağlı olarak hızlı sanayileşme ve fosil kaynaklarının aşırı kullanımı sonucu artan çevresel sorunlar ülkesel bir sorun olmaktan çıkmış ve küresel bir sorun haline gelmiştir [1]. Dünyanın tüm enerji ihtiyacının %85 kadarı kömür, petrol, doğalgaz, bitümlü şist gibi fosil yakıtlardan üretilmektedir. Türkiye'deki elektrik üretiminin %65'i fosil kaynaklı, %35'i ise hidrolik kaynaklıdır. Fosil yakıtlar insan sağlığında tehlike yaratacak zararlı gazlar içermektedir. Bu tür yakıtların tüketimi ile hem çevre zarar görmekte hem de küresel ısınma gün geçtikçe artmaktadır. Fosil yakıtların kullanımı sonucu yakıt içerisindeki karbonun havadaki oksijen ile birleşmesi sonucu CO₂ veya CO gazları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca fosil yakıtlarda eser miktarda bulunan kurşun, kükürt gibi elementler yanma sıcaklığında oksijen ile birleşerek insan sağlığı açısından tehdit oluşturan bileşiklere (SO_x, PbO, NO_x...) dönüşmektedir. Bu yanma ürünleri atmosferde birikmekte, güneş ve yeryüzü arasında tabii olmayan bir katman meydana getirmekte, insan ve bitki hayatı üzerinde negatif etkiye neden olmaktadır [2]. Fosil yakıtlardan dolayı yayılan gazlar ve parçacıklar solunum yolları hastalıklarına, kansellere ve erken ölümlere sebep olmaktadır [3]. Son zamanlarda kullanım oranı artan ve çok sık tartışma konusu olan diğer bir enerji kaynağı ise nükleer enerjidir. Nükleer santraller, fosil yakıtlı santrallerin aksine, çevreye zararlı olan CO₂, SO₂ ve NO_x gazlarının oluşumuna neden olmazlar. Fakat maliyetinin yüksek oluşu ve bir kaza sonrasında çevreyi temizlenemez şekilde kirletme olasılığı daha farklı ve güvenli alternatif enerji kaynaklarının arayışını gündeme getirmektedir [4]. Bu amaçla enerjide dışa bağımlı olmak istemeyen ve enerji arzında sorun yaşayan ülkeler, sahip oldukları alternatif enerji kaynaklarını arttırmaya ve çeşitlendirmeye çalışmaktadırlar [4-7].

İthal yakıtlara olan bağımlılık ülkelere önemli miktarlarda ekonomik maliyet yüklemektedir. Alternatif enerji kaynakları doğal enerji kaynaklarından meydana geldikleri için enerji ithalatına olan bağımlılığı azaltmakta ve istihdamın

gelişmesine önemli oranda katkıda bulunmaktadır [8]. Alternatif enerji kaynakları petrol, kömür ve hidrolik potansiyele dayanmayan doğal ve yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı tüm insanlığın geleceğini güvence altına almak için yaşamsal bir öneme sahiptir. Küresel ısı artışı önlemenin ilk koşulu, fosil yakıt kullanımını azaltarak, enerji altyapısını yenilenebilir enerjileri kullanmaya uygun duruma getirmektir [9]. Yenilenebilir enerji kaynakları, miktarlarının sınırlı olmaması, çevreye daha az zarar vermeleri ve güvenli olmaları nedeniyle fosil yakıtlardan daha avantajlıdır. En fazla bilinen alternatif enerji kaynakları arasında güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, biyokütle ve su gücünden üretilen enerji kaynaklarıdır [10].

1.1. Alternatif Enerji Kaynakları

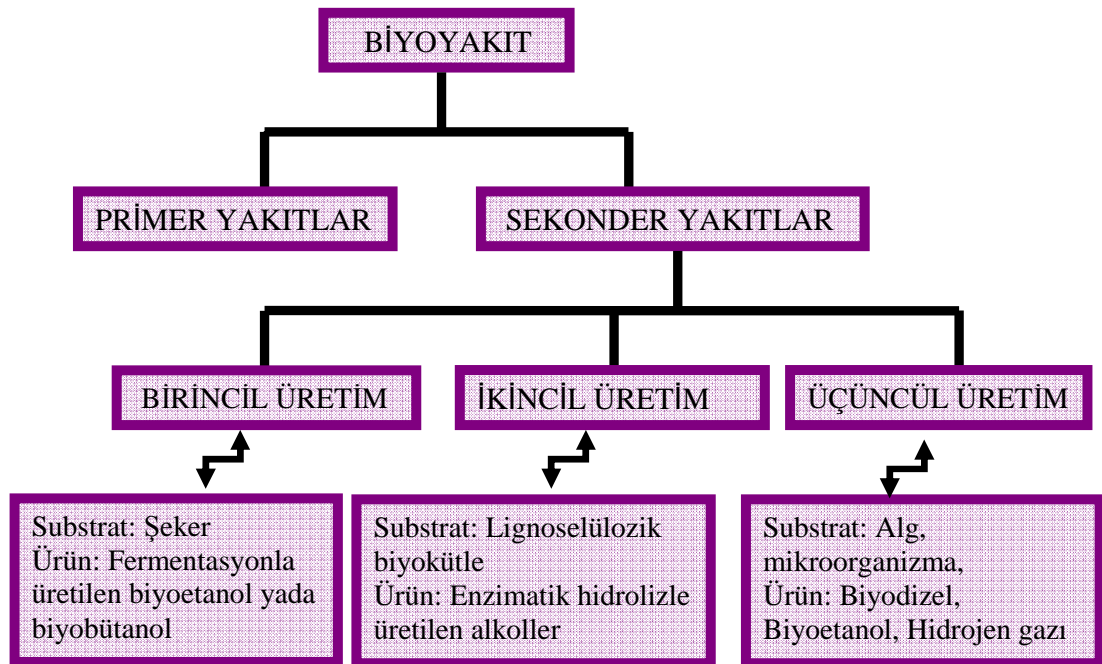
Petrol, kömür ve hidrolik potansiyele dayanmayan, bilimsel terminolojide Alternatif Enerji Kaynakları yeni enerji kaynakları olarak gündeme gelmiştir. Bu kaynakların en önemli özelliği her ülkede bulunması ve kolay erişilebilir olmasıdır. Klasik enerji kaynakları olan hidrolik enerji ve fosil yakıtlara alternatif olabilecek enerjiler Tablo 1.1’de sınıflandırılmıştır.

Tablo 1.1. Alternatif enerji kaynakları

Alternatif Enerji Türü	Kaynak veya Yakıtı
Nükleer enerji	Uranyum gibi ağır metaller
Güneş enerjisi	Güneş
Rüzgar Enerjisi	Atmosferin hareketi
Dalga enerjisi	Okyanus ve denizler
Geo-termal enerji	Yeraltı suları
Hidrolik potansiyel	Nehirler
Hidrojen	Su ve hidroksitler
Biyokütle, biyodizel, biyogaz	Biyolojik atıklar, yağ

1.2. Biyoyakıtlar

Hidrojen gazları, doğal gaz ve sentetik gazlar en sık rastlanan alternatif enerji kaynakları arasında yer almaktadır. Bu alternatif yakıtların çevre dostu olması ve pek çok avantaj sunması gün geçtikçe fosil yakıtların yerine kullanılmasını sağlamaktadır [11-13]. Biyoyakıtlar kaynaklarına ve tiplerine göre değişik şekillerde sınıflandırılabilirler. Pek çok endüstriyel sektörlere ait ürün ve bu ürünlerin atıklarından üretilen biyoyakıtlar katı ya da gaz özellikte olabilmektedir. Katı biyoyakıtlara odun, odun kömürü ve odun parçaları, gaz formundaki yakıtlara ise etanol, biyogaz, biyodizel ve piroliz yakıtlar örnek olarak verilebilir. Biyoyakıtlar; birincil (işlenmemiş) ve ikincil (işlenmiş) biyoyakıtlar olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 1.1). Primer yakıtlar doğal yakacak odun, odun talaşı ve parçaları, doğal haliyle kullanılan organik materyaller gibi doğal ve işlenmemiş yakıtlardır. Bu tür yakıtlar elektrik, ısıtma, pişirme ve ısınma amaçlı olarak direkt kullanılabilir. İkincil biyoyakıtlar ise primer yakıtların modifiye edilmiş halidir. Bu tür yakıtlar etanol, biyodizel gibi sıvı şekilde ve biyogaz, sentetik gaz ve hidrojen gibi gaz şeklinde üretilmektedir. Bu tür yakıtlar, ulaşım ve yüksek ısı kullanımını gerektiren endüstrilerde geniş çapta kullanılabilen yakıtlardır [14].



Şekil 1.1. Biyoyakıtların sınıflandırılması

Sıvı biyoyakıtlar dizel ve petrol gibi geleneksel yakıtlara alternatif olarak gündeme gelmektedir. Sıvı biyoyakıtlar birincil üretim ve ikincil üretim olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir [15]. Bu sınıflandırmada baz alınan unsur yakıt kökenidir. Bilimsel gelişmeye bağlı olarak üçüncül üretim yakıtlarda sınıflandırmada yerini almıştır [16].

Birincil üretim yakıtlar, hammaddesi şekerlerden, çim ve tohum gibi materyallerden oluşan yakıtlardır. Bu tür yakıtların üretimi için basit yöntemler uygulanmaktadır. En iyi bilinen birincil üretim yakıtlarından biri biyoetanoldür ve nişasta ile bitkisel ürünlerdeki şekerin fermentasyonu sonucu elde edilmektedir [17,18]. Biyoetanol yüksek oranda şeker içeren materyallerin mayalar tarafından üretilen enzimlerle fermentasyonu sonucu üretilmektedir. Birincil üretim yakıtlardan bir diğeri ise biyodizeldir ve yağların katalizör varlığında transesterifikasyonu ile elde edilmektedir [19]. İkincil üretim yakıtlar ise yenilenebilir ya da yenilenebilir olmayan lignoselülozik biyokütle kaynaklarından, biyolojik ya da termokimyasal yöntemlerle üretilmektedir [15]. İkincil üretim biyoyakıtlar üretim yöntemlerine göre sınıflandırılmaktadır. Etanol ve bütanol gibi yakıtlar biyokimyasal yöntemle üretilirken diğeri tüm ikincil üretim yakıtları termokimyasal yollarla üretilmektedir. Metanol ve dimetil eter gibi termokimyasal üretilen yakıtların çoğu fosil yakıtlardan köken almaktadır. Termokimyasal dönüşüm yöntemlerinde yüksek sıcaklık ve basınç kullanılmaktadır. Bu dönüşümün ilk basamaklarını gaz haline dönüştürme ve piroliz oluşturmaktadır [20].

Bilimsel gelişmeye ve teknolojik ilerlemeye bağlı olarak mikroorganizmalar ve alglerden köken alan üçüncül üretim yakıtları son yıllarda dikkat çeken konular arasında yer almaktadır. Bu tür yakıtlar birincil ve ikincil üretim yakıtlarının bazı dezavantajlarını bertaraf etmektedir. Özellikle açlık ve kıtlık göz önünde bulundurulduğunda bitkisel/hayvansal yağlar gibi tarımsal ve besinsel öneme sahip gıdaların yakıt üretiminde kaynak materyal olarak kullanılması uzun vadede ciddi sorunlar oluşturacaktır ve biyodizel üretimi bu nedenle kısa süreli bir çözüm olmaktan öte geçemeyecektir. Hammaddeden kaynaklanabilecek bu gibi olumsuzluklar üçüncül üretim yakıtlarının üretimi ile ortadan kalkmaktadır. Çünkü

hammadde olarak besinsel ya da tarımsal öneme sahip olmayan mikrobiyal/algal lipidler kullanılmaktadır [21].

1.2.1. Biyodizel

Biyodizel, bitkisel yağların, kullanılmış atık yağların veya hayvansal yağların alkol ile uygun bir katalizör kullanılarak kimyasal tepkimesi sonucunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. Tepkime sırasında bitkisel yağ molekülünün (trigliserid) yapısında bulunan yağ asitleri alkol ile yeni esterler oluşturmaktadır. Tepkimenin yan ürünü olarak gliserin oluşmaktadır. Gliserin, saflaştırılıp parfüm ve kozmetik sanayi gibi alanlarda değerlendirilebilmektedir. Biyodizel, orta uzunlukta C16-C18 yağ asidi zincirlerini içeren metil veya etil ester tipi bir yakıttır. Biyodizel, çoğunlukla 16 ile 20 arasında karbona sahip hidrokarbon zinciri içermektedir ve ağırlığının yaklaşık %11'ini oksijen oluşturmaktadır. Biyodizel, dizel motor yanma verimini ve emisyon oluşumunu olumsuz etkileyen kükürt, aromatik hidrokarbon, metaller ve ham petrol artıkları içermez. Isıl değer, yoğunluk ve viskozite değerleri gibi özellikleri dizel yakıt değerlerine çok yakındır. Ayrıca dizel yakıtına göre yağlama özelliğinin daha iyi, setan sayısının daha yüksek ve daha az toksik olması sunduğu önemli avantajlardandır.

Biyodizelde %10-11 oranında oksijen bulunmaktadır ve bu durum biyodizeli yüksek yanma özelliklerine sahip yakıt haline getirmektedir [22]. Biyodizel klasik dizel yakıtla karşılaştırıldığında yaşam döngüsü esnasında net karbondioksit emisyonlarını %78 oranında azaltmaktadır [23]. Biyodizel yenilenebilir, toksik olmayan, yanıcı olmayan, taşınabilir, kolayca bulunabilen, biyolojik olarak parçalanabilir, sürdürülebilir çevre dostu bir yakıttır ve aynı zamanda sülfür ve aromatik içerikten muaftır bu da biyodizeli oldukça kirli şehirler için ideal yakıt haline getirmektedir. Biyodizel aynı zamanda ortam havasındaki parçacık madde içeriğini azaltmakta ve böylece hava kirliliğini de azaltmaktadır. Bu durum kanser riskinde ve neonatal kusurlarda %90 azalma sağlamaktadır [24,25]. Biyodizel kırsal kalkınmanın zamanla vasfını yitirmiş arazilerin yenilenmesine de yardımcı olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda kırsal istihdam için de iyi bir potansiyele sahiptir [26]. Petrol dizeli gibi sondaj, nakliye veya rafine işlemleri

gerektirmediği için daha az maliyet ve zamanla yüksek biyodizel üretim kapasitesine rahatlıkla ulaşılabilir. Bundan dolayı her ülke yerel biyodizel üretme kapasitesine sahiptir. Ayrıca petrol ve petrol dizelin ithal edildiği ülkeler için geçerli vergilerin ve ücretlerin de ödenmesi gerekmez [27,28]. Biyodizelin daha üstün yağlılık özelliklerine sahip olması pompalarındaki ve enjektör birimlerindeki yağlanmayı iyileştirir, motorun aşınma ve yıpranması azaltır ve motor verimi arttırmaktadır [27,29]. Biyodizel petrol dizelin (60-80°C) daha yüksek olan parlama noktasından dolayı (100-170°C'nin üstünde) taşımacılık, ulaşım, dağıtım, kullanma ve depolama için daha güvenlidir [30,31].

Tüm bu avantajlarına rağmen biyodizelin dizele göre %12 daha düşük enerji içeriğine sahip olması önemli bir dezavantajdır. Ayrıca biyodizelin bulutlanma ve akma noktası ve nitrojen oksit emisyonları dizele göre daha yüksektir. Tamamlanmamış yanma özelliklerinden dolayı motorlarda çökelti oluşmasına neden olan daha düşük uçuculuğa da sahip olması, dizele göre nispeten daha yüksek viskoziteye (dizelin 11-18 katı) ve daha düşük uçuculuğa sahip olması ve bundan dolayı daha yüksek enjektör basıncı gerekliliği diğer bazı dezavantajlardandır [31,33].

1.2.1.1.Biyodizelin Teknik Özellikleri

Biyodizelin kullanımı, taşınması ve depolanması teknik özellikleri ile yakından ilişkilidir. Biyodizelin akışkanlığını belirleyen viskozite, bulutlanma noktası ve akma noktası değerleri ile setan sayısı gibi teknik özellikleri oldukça önemlidir. Bununla birlikte setan sayısı, bulutlanma noktası, akma noktası ve soğuk filtre tıkanma noktası, oksidasyon stabilitesi ve yağlama özellikleri gibi bazı diğer teknik özellikler de biyodizelin petrodizel ve diğer yakıtlarla kıyaslanabilirliği açısından önemli bazı parametrelerdir.

1.2.1.1.1. Kinematik Viskozite

Viskozite maddenin akma kapasitesini gösterdiği için yakıtın en önemli özelliğidir. Bundan dolayı yakıt enjeksiyon ekipmanının çalışmasını ve sprej otomasyonunu etkiler. Biyodizelin kinematik viskozitesi dizel fosil yakıtların viskozitesinden 10-15 kat daha fazladır. Bu durum büyük moleküler kütle ve büyük kimyasal yapı ile açıklanabilir. Düşük sıcaklıklarda biyodizelin viskozitesi değişebilir ve katılaşma gösterebilir. Yapılan bazı çalışmalarda biyodizel viskozitesinin hacim akışını ve motordaki enjeksiyon sprej özelliklerini etkileyebileceği belirtilmiştir. ASTM D445'ye göre maksimum izin verilebilir limit (1.9–6.0 mm²/sn) ve EN ISO 3104'te (3.5–5.0 mm²/sn)'dir [22,34-39].

1.2.1.1.2. Yoğunluk ve Bağlı Yoğunluk

Yoğunluk birim hacim başına ağırlığı ifade etmektedir. Daha yoğun olan yakıtlar daha fazla enerji içermektedir [40]. EN ISO 3675/12185 ve ASTM D1298'e göre yoğunluk 15 veya 20°C'lik sıcaklık referansında test edilmelidir [39,41]. Bağlı yoğunluk suyun yoğunluğu ile karşılaştırıldığında bileşenin yoğunluğudur. Biyodizelin bağlı yoğunluğu kütleden hacim dönüştürmeleri yapmak, akış ve viskozite özelliklerini hesaplamak ve biyodizel tankların homojenliğini belirlemek için gereklidir [42].

1.2.1.1.3. Parlama Noktası

Bir yakıtın parlama noktası aleve veya kıvılcıma maruz kaldığı zaman tutuşacağı sıcaklıktır. Parlama noktası yakıtın uçuculuğu ile ters orantılıdır. Biyodizelin parlama noktası taşıma ve depolama amaçları için güvenli olan dizel fosil yakıtın belirtilen limitinden daha yüksektir [43,44]. Biyodizelin tutuşma noktası genellikle 150°C'den daha yüksek iken klasik dizel yakıtın tutuşma noktası 55-

66°C'dir [43]. ASTM D93'de yer alan parlama noktası aralıklarının limiti 93°C ve EN ISO 3679'da yer alan limit ise 120°C'dir [35,45].

1.2.1.1.4. Bulutlanma ve Akma Noktası ve Soğuk Filtre Tıkanma Noktası

Biyodizelin düşük sıcaklıktaki davranışı önemli bir kalite kriteridir. Bunun nedeni yakıtın kısmen veya tamamen katılaşmasının yakıt borularında ve filtrelerde tıkanmaya neden olmasıdır. Bulutlanma ve akma noktaları ASTM D2500 EN ISO 23015 ve D97 prosedürleri ile ölçülmektedir. Genel olarak klasik dizel ile karşılaştırıldığında biyodizel için daha yüksek bulutlanma noktası ve akma noktası söz konusudur [35,45,46]. Soğuk filtre tıkanma noktası test filtresinin jelleşmeye veya kristalleşmeye başlayan yakıt bileşenlerinden dolayı tıkanmaya başladığı sıcaklığı ifade eder. Yaygın olarak yakıtların düşük sıcaklıkta işlerliğini göstergesi olarak kullanılır ve soğuk hava performansını yansıtır. Düşük çalışma sıcaklığında yakıt kalınlaşabilir ve yakıt borularının, yakıt pompalarının ve enjektörlerinin performansını etkileyerek uygun şekilde akmayabilir. Soğuk filtre tıkanma noktası dizel ve biyodizel için bulutlanma noktasından daha iyi korelasyona sahip olarak yakıtın süzülebilirlik limitini tanımlar. Soğuk filtre tıkanma noktası, ASTM D6371 ile ölçülmektedir [43-45,47].

1.2.1.1.5. Setan Sayısı

Setan sayısı yakıtın tutuşma özelliklerinin bir göstergesidir. Yakıtın daha iyi tutuşma niteliği daha yüksek setan sayısı değeri ile ilişkilidir. Biyodizel kullanımı için metil ester seçim işlemi sırasında göz önünde bulundurulmuş en önemli parametrelerden bir tanesidir [22,29,35]. Setan sayısı yağ asidi zincir uzunluğu ve artan doygunluk ile artar. Daha yüksek setan sayısı tutuşma ve ateşleme odasına yakıt enjeksiyonunun başlaması arasında kısa zaman olduğunu göstermektedir [48,49]. Biyodizel klasik dizel yakıtlardan daha yüksek setan numarasına sahiptir bu da daha yüksek tutuşma etkinliği ile sonuçlanmaktadır [49,50]. ASTM D613'te

belirtilen dizelin setan sayısı 47 ve EN ISO 5165'te belirtilen setan sayısı ise 51 dir [39,51].

1.2.1.1.6. Oksidasyon Stabilitesi

Biyodizel oksidasyonu biyodizelin kalitesinin değerlendirilmesine yardımcı olan en önemli faktörlerden bir tanesidir. Oksidasyon stabilitesi oksidasyon derecesinin, hava ile potansiyel reaktivitesinin göstergesidir ve antioksidan ihtiyacını da belirleyebilir. Biyodizel kimyasal bileşiminden dolayı fosil dizel yakıtlara kıyasla oksidatif degradasyona karşı daha duyarlıdır [45].

1.2.1.1.7. Yağlama Özellikleri

Atadashi ve arkadaşları [23] biyodizelin yağlama özelliklerinin dizelden daha iyi olduğunu ve bunun da motorun hizmet ömrünü arttırdığını belirtmişlerdir. Lapuerta ve arkadaşları [49] ise yağ asidi alkil esterlerin (biyodizel) yağlama özelliklerini iyileştirdiğini fakat tortu oluşumuna, temel olarak parçalanabilirliğe, soğuk akış özelliklerine bağlı olarak filtre tıkanıklığına katkıda bulunabileceğini bildirmiştir. Demirbaş [52] biyodizelin dizel yakıtı göre önemli yağlanma sağladığını ifade etmiştir. Xue ve arkadaşları [38] ise biyodizelin yüksek yağlılığının azalan sürtünme kaybıyla sonuçlanabileceğini ve bundan dolayı frenin etkin gücünü iyileştirebileceğini bildirmiştir.

1.2.1.1.8. Asit Değeri

Asit sayısı veya nötralizasyon sayısı yakıt örneğinde yer alan serbest yağ asitlerinin ölçümüdür. Serbest yağ asitleri yağlarda, sıvı yağlarda veya greslerde doğal olarak meydana gelen doymuş veya doymamış monokarboksilik asitlerdir. Yağ asitleri karbon zinciri uzunluğu veya doymamış bağ sayısı (çift bağ) açısından farklılık gösterir. Daha yüksek serbest yağ asidi miktarı daha yüksek asit değerine

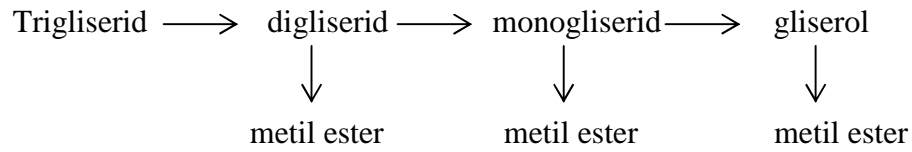
neden olmaktadır. Asit değeri 1 g'lık yağ asidi metil esteri nötrale etmek için gerekli olarak KOH (mg) miktarıdır. Asit değeri ASTM D664 ve EN 14104'ü kullanarak belirlenir [27,53,54].

1.2.1.1.9. Serbest Gliserol

Serbest gliserol biyodizelde kalan gliserol miktarını ifade etmektedir. Biyodizeldeki serbest gliserol içeriği üretim sürecine bağlıdır. Biyodizeldeki yüksek gliserol verimi ester ürünün yıkanması sırasında meydana gelen yetersiz ayrılmadan kaynaklanabilir. Gliserol temel olarak biyodizelde çözülmez ve neredeyse gliserolün tamamı kolaylıkla santrifüjleme veya çöktürme ile kolaylıkla giderilebilir. Serbest gliserol asılı damlacıklar olarak kalabilir veya biyodizelde çok küçük miktarlarda çözülebilir. Yüksek serbest gliserol yakıt enjeksiyonuna zarar verebilir. ASTM D6584'te gliserolün nihai biyodizel ürününün %0.24'ünden az olması şart koşulu ve EN 14105/14106'da limit maksimum %0.02 olarak belirtilmektedir [45,55,56].

1.2.1.1.10. Toplam Gliserol

Toplam gliserol, metil esterlere dönüştürülmeden kalan trigliseridin bir ölçüsüdür. Toplam gliserol serbest gliserol, monogliserid, digliserid ve trigliserid miktarından hesaplanmaktadır [57]. Reaksiyonlar aşağıdaki gibidir:



Her reaksiyon aşamasında yağ asidinden metil ester molekülü üretilmektedir. Bileşiklerin her biri yayılmayan gliserol molekülü içerir. Bu bileşiklerin gliserol kısmı bağlı gliserol olarak belirtilir. Bağlı gliserol ve serbest gliserol birlikte toplam gliserolü ifade etmektedir [35,45].

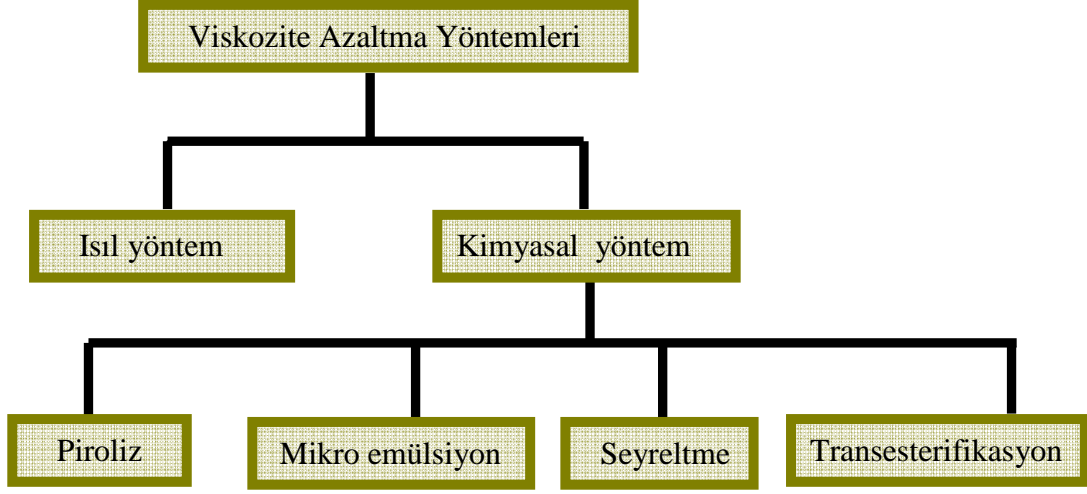
1.2.1.1.11. Karbon Kalıntısı

Yakıtın karbon kalıntısı tutuşmadan sonra yakıtın karbon kalıntısı eğilimlerinin göstergesidir. Biyodizel için kanradsons karbon kalıntısı dizel yakıttaki kalıntıdan daha önemlidir. Çünkü serbest yağ asitleri, gliseritler, sabun, polimerler, daha yüksek doymamış yağ asitleri ve inorganik kirletici maddeler varlığı ile yüksek korelasyon sergiler. Bu kalıntının sadece karbondan oluşmamasına rağmen karbon kalıntısı terimi tüm standartlarda görülür. ASTM D4530 standardında limit aralığı maksimum %0.050 (m/m) ve EN ISO10370'de ise maksimum %0.30'dur (m/m) [35,44,45].

1.2.1.1.2. Biyodizel Üretimi

Biyodizel üretiminde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan yöntemler piroliz, mikroemülsifikasyon, dilüsyon, transesterifikasyondur. Yağların içeriğinde serbest yağ asitleri, fosfolipitler, steroller, su, koku vericiler ve diğer safsızlıklar bulunur. Yağlar yüksek viskozite seviyesi, düşük uçuculuk ve yağlardaki doymamış hidrokarbon zincirlerinin düşük reaktivitesinden dolayı direk yakıt olarak kullanılamaz [58,59]. Yağların yakıt olarak kullanılması için viskozitelerinin azaltılması gerekir. Bu amaçla çeşitli yöntemler uygulanmaktadır (Şekil 1.2).

Bu yöntemlerden ısı yöntem ve kimyasal yöntem çok sık kullanılanlardandır. Isıl yöntemde, ön ısıtma uygulanarak sıcaklık yükseltilmekte ve viskozite azaltılmaktadır. Fakat bu yöntemin hareketli bir araç motorunda uygulanması sırasında problemler oluşmaktadır. Kimyasal yöntem kendi içerisinde piroliz, mikroemülsiyon, seyreltme, transesterifikasyon olmak üzere dört alt gruba ayrılmaktadır.

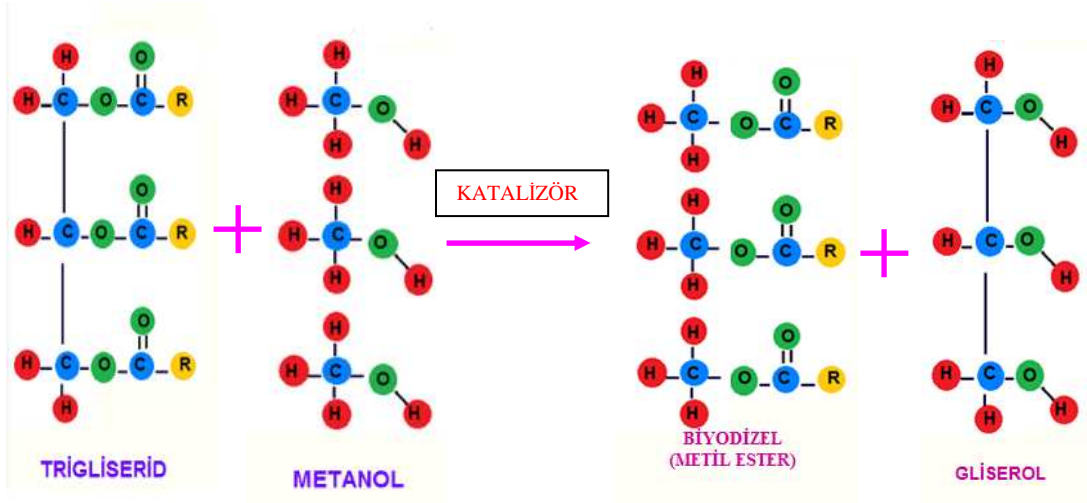


Şekil 1.2. Viskozite azaltma yöntemleri

Piroliz, yüksek sıcaklıklarda yüksek moleküllü bileşiklerin düşük moleküllü bileşiklere parçalanmasıdır. Bitkisel yağlarda piroliz iki farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. Birinci yöntemde bitkisel yağlar kapalı bir ortamda ısının etkisiyle parçalanmakta iken ikinci yöntemde yağlar damıtma yardımı ile ısının etkisiyle parçalanmaktadır [60]. Piroliz ısı veya ısı-katalizör kullanılarak bitkisel yağların biyodizele dönüştürülmesidir. Çok seçici bir yöntem değildir ve genellikle çeşitli bileşikler elde edilir. Trigliserid kaynağına ve kullanılan pirolitik yöntemle bağlı olarak alkanlar, alkenler, aromatik bileşikler, esterler, CO₂, CO, su ve H₂ üretilmektedir. Seyreltme işlemi yağın viskozitesini düşürmek amacıyla bitkisel ve atık yağların dizel yakıtı veya başka bir çözücü ile inceltilmesi işlemidir. Bu yöntemde atık yağlar, yer fıstığı, ayçiçeği, kolza gibi bitkisel yağlar kullanılmaktadır. Mikroemülsifikasyon, metanol ya da etanol gibi düz zincirli alkoller ile yağın karıştırılmasıdır [61,62]. Transesterifikasyon, trigliseridlerin katalizör varlığında alkollerle reaksiyona girmesi sonucu metil esterlerin oluştuğu reaksiyondur.

1.2.1.2.1. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon düşük maliyetli ve kolay olmasından dolayı en çok tercih edilen yöntemdir [24]. Bu sürecin ana ürünü biyodizeldir. Transesterifikasyon çeşitli ardışık, tersine çevrilebilir reaksiyonlardan oluşmaktadır. Bu reaksiyonlarda trigliseridler aşama aşama digliseritlere, monogliseride ve son olarak da dibe çöken gliserole ve biyodizele dönüşmektedir. Gliserol önemli bir yan üründür ve ısıtma için yakılabilir veya kozmetik sanayisinde hammadde olarak kullanılabilir. Metanol ve etanol nispeten düşük maliyetli olmasından dolayı transesterifikasyon yönteminde kullanılan iki temel hafif alkoldür. Ayrıca propanol, isopropanol, tert-butanol, dallı alkoller de kullanılabilir. Fakat bu alkollerin maliyeti daha yüksektir [63,64]. Transesterifikasyon reaksiyonunda hammadde olarak kullanılacak yağ, monohidrik bir alkolle (etanol, metanol), katalizör (asidik, bazik katalizörler ile enzimler) varlığında ana ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserin vererek esterleşmektedir (Şekil 1.3).

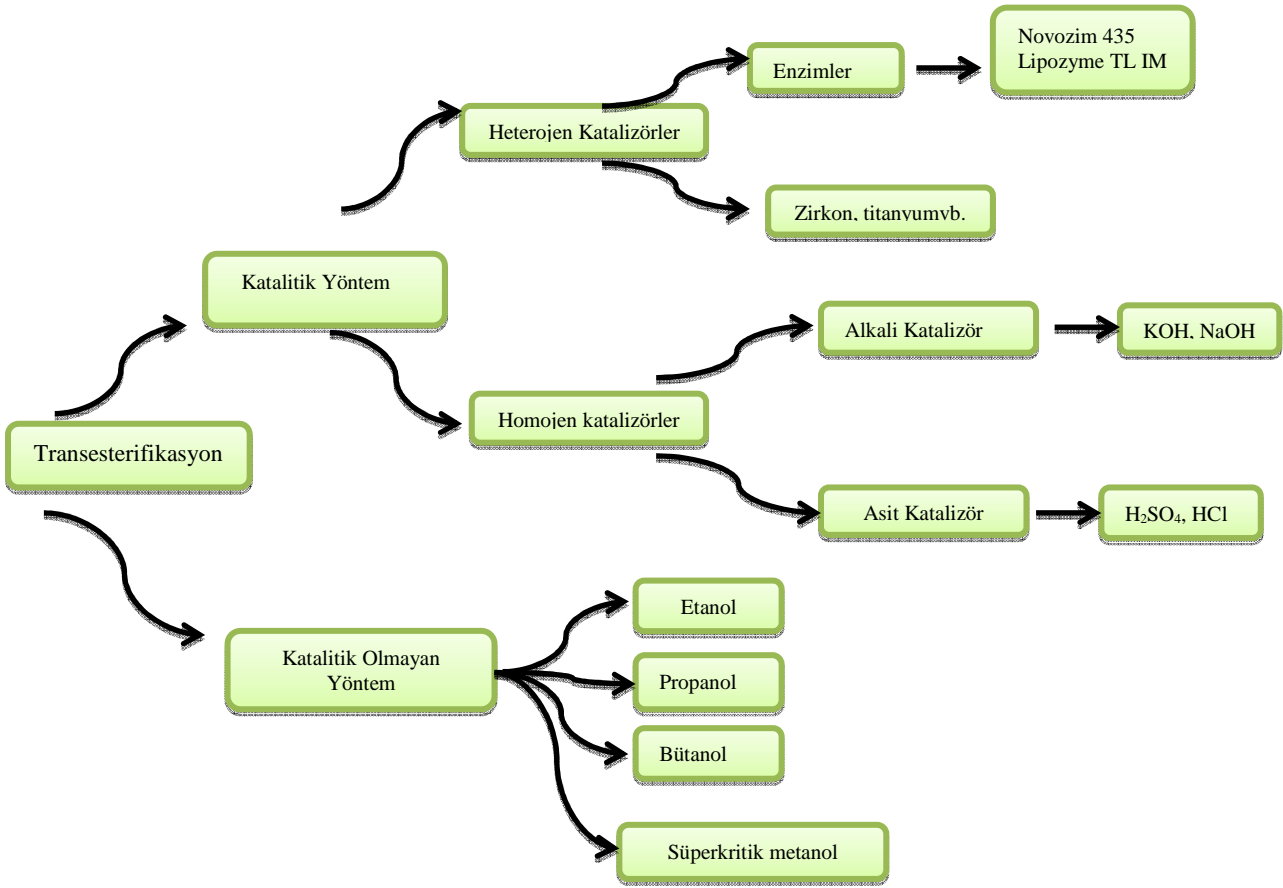


Şekil 1.3. Transesterifikasyon Reaksiyonu

Genellikle transesterifikasyon, katalitik ve katalitik olmayan iki ana yöntemden oluşmaktadır. Reaksiyonu başlatmak için bir katalizör kullanılmaktadır ve kullanılan katalizör sıvı veya katı yağda zor çözüldüğü için çok önemlidir. Katalizör alkolün çözünürlüğünü arttırmakta ve bundan dolayı tepkime hızını da arttırmaktadır. En sık kullanılan yöntem katalitik transesterifikasyon yöntemidir. Şekil 1.4'te transesterifikasyon yönteminin ayrıntılı sınıflandırması gösterilmiştir [45].

Biyodizel üretiminde en sık kullanılan katalizörler sodyum hidroksit veya potasyum hidroksittir. Pek çok araştırmacı alkali katalitik yönteminin diğer katalizörlere göre en hızlı ve en ekonomik katalizör olduğunu rapor etmiştir. Bir alkali katalizör varlığında transesterifikasyon aynı miktarda asit katalizörün kullanıldığı reaksiyona kıyasla yaklaşık 4000 defa daha hızlı ilerlemektedir. Ayrıca bu yöntemle kısa bir süre içinde (30-60 dakika) yüksek saflık ve yüksek biyodizel ürün verimi elde edilebilmektedir [48,65]. Asit katalizörleri arasında sülfürik asit, hidroklorik asit, ferrik sülfat, fosforik ve organik sülfonik asitler yer almaktadır. Bazı araştırmacılar asit katalizörlerinin yüksek serbest asitlere ve suya sahip bitkisel yağlar için alkali katalizörlerden daha fazla toleransa sahip olduğunu ileri sürmüştür. Benzer çalışmalarda asit katalizör varlığında reaksiyonun esterlerde çok yüksek verim verdiği fakat reaksiyonun oldukça yavaş ilerlediği rapor edilmiştir [66,67].

Transesterifikasyonda enzimatik katalizörler de yaygın bir kullanıma sahiptir. Enzimatik katalizör olarak en sık lipaz enzimleri kullanılmaktadır. Katalitik lipazların kullanıldığı reaksiyonlarda sabunun giderilmesi ve gliserolün kazanımı gibi karmaşık işlemler gerekli değildir. Bu avantaja rağmen reaksiyon verimlerinin düşük ve reaksiyon süresinin uzun olması önemli birer dezavantajdır. Ayrıca lipazlar büyük ölçekli endüstriyel üretim için çok pahalıdır ve ASTM yakıt şartlarını karşılayacak ölçüde tepkime tamamlama derecesi sağlamaz [48,66].



Şekil 1.4. Transesterifikasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Trigliserid/alkol mol oranı, katalizör türü ve miktarı, serbest yağ asidi türü, reaksiyon sıcaklığı gibi çeşitli parametreler transesterifikasyon reaksiyonunu önemli derecede etkilemektedir.

i. Trigliserid/alkol mol oranı: Trigliserid/alkol mol oranı biyodizelin saflığının belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Düşük trigliserid/alkol mol oranı kullanımı durumunda ayırma ve arındırma yöntemleri oldukça basittir [32].

ii. Katalizör türü ve miktarı: Katalizör seçimi yağdaki serbest yağ asidi miktarına bağlıdır. Katalizör olarak alkali, asidik ve enzimatik katalizörler kullanılmaktadır. Alkali katalizör olarak sodyum hidroksit, potasyum hidroksit, karbonatlar ve alkoksitler kullanılırken, asidik katalizör olarak hidrojen klorür, sülfirik asit ve sülfonik asit kullanılmaktadır. Enzimatik katalizör olarak ise novozim 435, lipozymeTL IM, amona AK kullanılmaktadır. Enzimatik katalizörler yüksek

maliyetli olduğu için tercih edilmemektedir. Alkali katalizörlü reaksiyonların 4000 kez daha hızlı olması, daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesi ve daha ucuz olması yaygın kullanımını açıklamaktadır [32,68].

iii. Serbest yağ asidi türü: Biyodizel üretiminde miristik asit, palmitik asit, stearik asit gibi doymuş yağ asitleri ve oleik asit, linoleik asit gibi doymamış yağ asitleri kullanılmaktadır. İdeal bir biyodizel üretiminde doymamış yağ asitlerinin yüksek olması tercih edilir. Çünkü doymamış yağ asitleri daha kolay esterleşme reaksiyonuna girmektedir [69].

iv. Reaksiyon sıcaklığı: Transesterifikasyon kullanılan yağa bağlı olarak değişik sıcaklıklarda gerçekleşebilir. Sıcaklığın yüksek olması transesterifikasyon hızını ve biyodizel verimini önemli derecede arttırmaktadır.

v. Su ve serbest yağ asidi miktarı: Sıvı ve katı yağlardaki su ve serbest yağ asidi transesterifikasyon sırasında önemli bir sorun olabilir. Özellikle yüksek sıcaklıklarda su, trigliseridleri digliseridlere hidrolize edebilir ve serbest yağ asidi oluşturabilir. Ortalama sıcaklıklarda su aşırı sabun oluşumuna neden olabilir. Sabun oluşumunun negatif etkileri arasında katalizör tüketimi, katalizör etkinliğinin azaltılması, gliserol ayırmada zorluk ve ham biyodizel saflaştırmanın engellenmesi vardır [32].

1.2.1.3 Biyodizel Üretiminde Kullanılan Lipidler

1.2.1.3.1. Bitkisel Lipidler

Bitkisel yağların temel bileşeni trigliseridlerdir. Bitkisel yağlar %90-98 oranında trigliserid ve az miktarda monogliserid ve digliserid içermektedir. Bitkisel yağlar yapılarında fosfolipit, fosfatid, karotenoid, tokoferol, sülfür bileşikleri, %1-5 oranında serbest yağ asidi ve az miktarda su içermektedir. Bu yağlarda çoğunlukla stearik, palmitik, oleik, linoleik ve linolenik yağ asitleri bulunmaktadır [70]. Bitkisel yağların yağ asidi kompozisyonu bitkinin genetik çeşitliliği, yetiştirildiği mevsim, iklim şartları, toprak tipi gibi koşullara bağlı olarak değişmektedir. Soya, pamuk, ayçiçeği, jojoba, kolza, kanola, jatropha curcas gibi bitkiler biyodizel üretiminde kullanılmaktadır. Bitkisel yağlar, yakıt olarak ilk defa Rudolf Diesel tarafından

denenmiştir. Biyodizelin %95'ten fazlası bitkisel yağlardan yapıldığı için bunun daha fazla ekonomik sorunlara neden olabileceğine dair pek çok iddia vardır. Yemeklik yağları biyodizele dönüştürerek gıda kaynakları otomotiv yakıtlar olarak kullanılmaktadır. Yemeklik yağdan büyük ölçekli biyodizel üretiminin gıda arz ve talep piyasasında global dengesizliğe neden olabileceği düşünülmektedir [17].

1.2.1.3.2. Hayvansal Lipidler

Hayvansal yağlar yüksek oranda doymuş yağ asidi içerdikleri için oda sıcaklığında katı ve viskoz yapıdadır. Hayvansal yağlarda en fazla bulunan yağ asitleri oleik, miristik, palmitik ve stearik asittir. Biyodizel üretiminde en yaygın olarak kullanılan yağlar arasında kümes hayvanları, domuz ve sığırdan elde edilen yağlar vardır. Wyatt ve arkadaşları [71] sığır iç yağı, domuz yağı ve tavuk yağından, Ma ve arkadaşları [72] sığır iç yağından, Altun [73] hayvansal iç yağlardan baz katalizörlü transesterifikasyon ile, Bhatti ve arkadaşları [74] hayvansal yağlardan hem asit hem de baz katalizörlü transesterifikasyon ile, Reyes ve Sepulveda [75] balık yağından, Dias ve arkadaşları [76], domuz yağından, Guru ve arkadaşları [77] Artukoğlu [78] atık hayvansal yağlardan yüksek serbest yağ asidi içeriğinden dolayı önce asit ve sonra baz katalizörlü transesterifikasyon ile hayvansal yağlardan biyodizel üretimini araştırmışlardır.

1.2.1.3.3. Algal Lipidler

Algler tarafından üretilen lipitler oldukça değişkenlik göstermektedir. Alg lipidlerinin büyük çoğunluğu doymamış yağ asitleridir. Alglerle gerçekleştirilen çoklu yağ asitlerini zenginleştirme çalışmaları total yağ miktarını azalttığı için henüz olumlu sonuç alınamamıştır. Tatlı su alglerinde 16 karbonlu yağ asidi oranı yüksek, 18 karbonlu yağ asidi düşüktür. Deniz algleri 20 karbonlu yağ asitlerince zengindir. Bu nedenle algal yağlar da geniş ölçekli biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilir [79].

1.2.1.3.4. Mikrobiyal Lipidler

Pek çok mikroorganizma lipid üretme ve biriktirme potansiyeline sahiptir. 590 maya türü arasında sadece 25 kadarı %20 den fazla yağ üretebilme yeteneğine sahiptir. 60.000 tür küf mantarının ise çok az bir bölümü %25 oranında yağ biriktirebilmektedir. Bu nedenle bu mikroorganizmalara yağsı (oleaginous) mikroorganizmalar denilmektedir. Bütün yağ üreten mikroorganizmalar aerobiktir ve oksijen gelişmeyi sınırlayıcı bir faktördür. Mikroorganizmalar ürettikleri lipid depolarını besin azlığı durumunda metabolizma faaliyetleri için kullanmaya başlamaktadır. Ortamda karbon kaynağının bulunması durumunda ise lipid kullanımı yavaşlamaktadır. Fakat karbon azlığı durumunda mikroorganizma karbon kaynağı olarak lipidi kullanacağı için lipoliz artacaktır. Yağsı mikrobiyal türler mikroalg, bakteri, mantar ve mayalardır. Çoğu durumda bu mikroorganizmalardan elde edilen lipid trigliserid şeklindedir, bunlar da bitkisel ve hayvansal yağlardaki ana bileşendir. Bundan dolayı mikrobiyal lipidler biyodizel üretimi için ham madde olarak kullanılabilir. Bakterilerde yağ üretimi genelde düşük düzeydedir [80].

1.2.1.3.5. Fungal Lipidler

1980'li yıllardan bu yana funguslar (tek hücreli mayalar ve filamentli funguslar) türden türe değişen yağ üretim kapasiteleri ile ilgi çekmektedir. Funguslar 10 karbondan 24 karbona kadar doymuş ve doymamış düz zincirli yağ asitleri sentezleyebilmektedir. En çok üretilen doymuş yağ asiti palmitik asit iken, oleik asit en fazla üretilen doymamış yağ asitidir. Ayrıca küflerde özellikle emega-3 ve emega-6 doymamış yağ asiti üretimine rastlanmaktadır. *Rhodospordium sp.*, *Rhodotorula sp.* ve *Lypomyces sp.* gibi bazı maya türlerine ait hücrelerde kuru ağırlıklarının %70'i kadar lipit biriktirebilme kapasitesi gözlenmektedir. Yüksek lipit içeriğine sahip funguslara *Mortierella sp.* örnek olarak verilebilmektedir. Yağlı mayalar ve küfler çoklu doymamış yağ asitlerince zengin triaçilgliserol biriktirmektedirler. Bu

hücrelerde en fazla rastlanan yağ asitleri arasında C18:1, C18:2, C16:0 ve C16:1 gelmektedir. Bu bilgiler ışığı altında yağlı maya ve fungusların biyodizel üretimi için alternatif yağ kaynakları olduğu söylenebilmektedir [81].

1.2.1.4. Fungal Lipid Üretimi Biyokimyası

Fungal lipid üretiminde iki faz gözlenmektedir. İlk faz dengeli bir gelişmenin gözlendiği fazdır ve bu fazda bütün besin elementleri ortamda yeterli miktarda bulunmaktadır. Besin maddelerinin azalması özellikle azot sınırlamasının başladığı durumda ikinci faz olan lipogenik faz başlar. Bu faz ise lipid üretimi için gerekli olan tüm besin elementleri tükenene dek devam eder. Lipid üretimi için gerekli besin elementlerinin ortama yeniden ilave edilmesi durumunda lipogenik faz yüksek düzeyde devam eder ve biyokütleden lipid üretimi açısından yüksek verim elde edilir [79,82]. Mikroorganizmaların yağ üretme kapasiteleri bazı sistem parametreleri tarafından sınırlanmaktadır. Lipid üretimi birincil besin maddelerinin varlığı ile doğrudan alakalıdır. Ortamdaki azot kaynağının azalması lipid üretimini indüklemektedir. Benzer şekilde karbon kaynağı miktarındaki artış da lipid üretimini arttırmaktadır. Azot kaynağındaki azalma, protein ve nükleik asit sentezinde yavaşlamaya neden olmaktadır. Çünkü bu metabolik yollarda azot esansiyel elementtir ve azotun azalmasına bağlı olarak protein ve nükleik asit metabolizmasının durması sonucu hücre gelişimini sınırlamaktadır. Bu durumda kullanılan karbon, lipid üretiminde ve depolanmasında kullanılmaktadır [79,83]. Kısaca azot sınırlaması fungal kütlelerde iyi bir lipogenez indikatörüdür. Mikroorganizmalar karbon kısıtlaması olduğu durumda lipid depolarını metabolik faaliyet için kullanmaktadırlar. Çünkü fungal kütle lipidleri karbon kaynağı olarak enerji temininde kullanmaktadır [84]. Organizmalar lipid birikimini triaçilgliserol (TAG) depolayarak gerçekleştirmektedir. TAG'lar ökaryotlardan prokaryotlara kadar pek çok türde lipidin depo şeklidir. Mayalar ve küfler gibi pek çok fungal kütleler iyi birer TAG üreticisidir ve depolayıcısıdır. Lipid birikimi ve üretimi biyosentetik yolların düzenlenmesi ve öncü moleküllerin varlığı ile yakından ilişkilidir. Lipid

üretiminde önemli olan öncü moleküllerden bazıları asetilCoA, malonil CoA, gliserol-3-fosfat, NADPH'tır.

Lipid üretim basamağında sitozolik yağ asidi sentaz enzimi görev almaktadır. Bu enzim 6α and 6β olmak üzere multimerik bir yapıya ve 48 aktif merkeze sahiptir. Yağ asidi sentezinde başlangıç reaksiyonlar için sabit bir asetil CoA kaynağı ve uzama safhaları için malonil-CoA gereklidir [85]. Azot kısıtlaması AMP-deaminaz enzimini aktive etmektedir. Bu aktivasyonla mitokondri AMP konsantrasyonu azalmakta ve buna bağlı olarak izositrat dehidrogenaz aktivitesi düşmektedir. İzositrat dehidrogenaz enzimi trikarboksilik asit döngüsü (TCA) döngüsünün kontrolünde önemli bir enzimdir ve bu enzimin azalması, izositrat birikime ve TCA siklusunun bloke olmasına neden olmaktadır. Aşırı biriken izositrat, sitrat şeklinde mitokondriden sitoplazmaya malat sitrat antiport taşıma sistemi ile pompalanmaktadır. Sitozolik ATP-sitrat liyaz enzimi sitoplazmaya pompalanan sitratı okzoloasetat ve asetil CoA'ya dönüştürmektedir. Asetil CoA ise lipid sentezinde öncü molekül olarak kullanılmakta ve bu yolla lipid üretimi artmaktadır.

1.2.1.5. Biyokütle

Endüstriyel anlamda biyokütle, yaşayan ya da yakın zamanda yaşamış biyolojik maddelerden yakıt elde edilmesi ya da diğer endüstriyel amaçlarla kullanılması ile ilgilidir. Yenilenebilir ya da alternatif enerji kaynakları arasında "Biyokütle" en büyük teknik potansiyele sahip olan kaynak türüdür. Ana bileşenleri karbohidrat bileşikleri olan bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli tüm maddeler "Biyokütle Enerji Kaynağı" olarak adlandırılırken, bu kaynaklardan üretilen enerji ise "Biyokütle Enerjisi" olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada biyodizel üretiminde kullanılan lipidler *Fusarium* cinsine ait funguslardan elde edilmiştir ve bu kapsamda biyodizel üretiminde biyokütle olarak funguslar kullanılmıştır.

Fusarium

20'nin üzerinde türü olduğu bilinen *Fusarium* cinsi mantarlar toprakta ve bitkide bulunabilen filamentöz funguslardır [86]. *Fusarium* türlerine ait makroskopik morfoloji farklı ortamlarda önemli ölçüde değişmektedir. Türler patates dekstroza agarda 25°C'de her 12 saatte hızlı bir büyüme göstermektedir. Koloniler hava miselyumları ile birlikte kahverengi renkte iken spor keseleri turuncu renktedir. Septalı ve hiyalinli hif yapısı gözlenmektedir. Konidioforlar basit veya dallanmış monoploid ve poliploidlerdir. Mikrokonidiumlar seyrek veya hiç yoktur. Makrokonidiumlar iki tiptir. Bu tiplerde hava miselleri çoğunlukla düz 3-5 septalı ve 7.5-35 x 2.5-4 µm boyutundadır. Makrokonidiumlarda spor keseleri kıvrıktır ve 3-7 septalı, 20-46 x 3-5.5 µm boyutuna sahiptir. *Fusarium semitectum* koloni rengine, mikrokonidiumların azlığı, hava keseleri ve makrokonidiumların şekline göre diğer klinik önemli türlerden kolaylıkla ayırt edilebilir. *Fusarium proliferatum* türünde konidioforlar orta uzunlukta, basit veya dallıdır. Konidium hücreleri monoploid ve poliploid yapıdadır. Mikrokonidiumlar bol, tek hücreli ve 4.5-10.5 x 1.3-2.5 µm boyutuna sahiptir. *Fusarium culmorum* türlerine ait hava miselyumları açık sarı renktedir. Bu türün mikrokonidiumları yok fakat makrokonidiumları boldur. Spor keseleri kahverengi ve sık bulunur. Makrokonidiumların büyüklüğü 4-7 µm genişliğinde ve 25-50 µm uzunluğundadır. Septa sayıları 3-5 adet arasında değişim göstermektedir [87].

1.2.1.6. Yapılmış Çalışmalar

Literatürde biyodizel üretimine ait pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda biyodizel hammaddesi olarak çoğunlukla atık yağlar, hayvansal ve algal lipidler kullanılmıştır. Fungal lipidlerin kullanımına dair yapılmış çalışmalar henüz yeterli düzeyde değildir. Wang ve arkadaşları atık yemek yağlarından asit katalizörlü işlem ile %20 metanol varlığında 10 saat reaksiyon süresince %90, çift katalizörlü işlem

ile %10 metanol varlığında 4 saat reaksiyon süresince %97.22 oranında biyodizel üretimini rapor etmişlerdir. [88]. Artukoğlu çalışmasında sıcaklığın biyodizel verimi üzerine etkisini araştırmış ve $63\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklığı en uygun sıcaklık olarak kaydetmiş ve bu sıcaklıkta hayvansal atık yağlardan %89'luk biyodizel üretimini gerçekleştirmiştir [78]. Üstün çalışmasında hayvansal yağ kaynağı olarak sığır iç yağını kullanmış ve çalışma sonucunda %93.4 lük biyodizel üretimini rapor etmiştir [89]. Lu ve arkadaşları, *Jatropha curcas* bitkisinden biyodizel üretiminde metanol:yağ mol oranı olarak 6:1 oranını kullanmış ve % 1.3 lük KOH katalizörlüğünde 64°C sıcaklıkta %98'lik biyodizel üretimini rapor etmişlerdir [90]. Hossain ve arkadaşları, *Spirogyra* ve *Oedogonium* alglerinden biyodizel üretimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda *Spirogyra*'dan elde edilen biyodizel veriminin *Oedogonium*'dan elde edilen biyodizel verimine kıyasla daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir [91]. Miao ve arkadaşları, *Chlorella protothecoides* mikroalginden 30°C 'de 56:1 metanol:yağ mol oranında yaklaşık 4 saat reaksiyon süresince biyodizel üretimini gerçekleştirmişlerdir [92]. Li ve arkadaşları *Chlorella protothecoides* mikroalginden %75'lik lipaz ve 3:1 metanol:yağ mol oranında 12 saat içerisinde % 98.15'lik biyodizel üretimini rapor etmişlerdir [93]. Vicente ve arkadaşları *Mucor circinelloides* mantarından biyodizel üretimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında sıcaklık ve katalizörün biyodizel üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. 25°C de %90'lık 65°C 'de %98'lik biyodizel üretimini rapor etmişlerdir. BF_3 , HCl ve H_2SO_4 katalizörlerini kullanarak her bir katalizör için sırasıyla %98, %95.8, %91.5 saflıkta biyodizel üretimini rapor etmişlerdir [94]. Dai ve arkadaşları yağsı bir maya olan *Rhodotorula* glutinis'den lipid eldesi sonrasında transesterifikasyon ile %81.7'lik biyodizel üretimini rapor etmişlerdir [95].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Mikroorganizmaların temini ve saklanması

Çalışmada *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum* ve *Fusarium semitectum* fungusları kullanılmıştır.

Mikroorganizmalar Kırıkkale Üniversitesi, Mantar Yetiştiriciliği Programı koleksiyonundan temin edilmiştir. Mikroorganizmaların stok kültürlerinin sürekliliğini sağlamak amacıyla, Patota Dekstroz Agar (Fluka) katı besi ortamı kullanılmıştır. Stok fungus kültürleri haftada bir yatık taze besi ortamına transfer edilmiş, 28°C’de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Elde edilen tüm kültürler ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2. Mikroorganizmaların üretimi

Çalışmada kullanılan fungal biyokütlenin üretimi için kullanılan besiyeri bileşimi Tablo 2.1 ’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Besiyeri içeriği

Besiyeri içeriği	
Glukoz	50 g
Maya ekstraktı	1 g
KH ₂ PO ₄	5 g
NaNO ₃	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	500 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg

Besiyeri pH'ı 0.1 M HCl ile 7.0'a ayarlanmış ve 1.5 atm basınç altında 110°C'de 25 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. Fungusların stok kültürlerinden, hazırlanan besiyeri ortamlarına ekim yapılmıştır. Stok kültürleri 5 ml steril distile su içerisinde süspanse edildikten sonra hazırlanan miselyum süspanسیونu steril koşullarda 100 ml besiyeri içeren 250 ml'lik erlenmayer şişelerine ekilmiştir. Kültürler 28°C inkübasyon sıcaklığında 150 r.p.m. çalkalama hızında, 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir kültürde lipid üretim düzeyi araştırılmıştır.

2.3. Total Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi

Toplam lipid tayininde sülfo-fosfo-vanillin yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem hızlı, güvenilir ve uygulaması oldukça kolay bir yöntemdir [96,97]. Lipid analizi amacı ile besiyerinden ayrılan fungal biyokütle kloroform-metanol karışımı ile ekstrakte edilmiş ve santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant lipid analizinde kullanılmıştır. Bu amaçla 0.010 ml süpernatant 1.0 ml H₂SO₄ içerisinde tamamen çözülmüş ve karışım sıcak su banyosunda 10 dk süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler hızlı bir şekilde soğutulmuş ve tüplere 1.0 ml fosfovanilin ayırıcı ve 1.0 ml distile su ilave edilmiştir. Standart olarak etanol içerisinde çözülmüş zeytinyağı kullanılmıştır. Standart ve örnek çözeltilerinin 530 nm'de absorbans artışı tayin edilmiş ve total lipid miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Total lipid derişimi (g/L)} == \frac{\text{Absorbans artışı } (\Delta A)}{\text{Standart kalibrasyon grafiğinin eğimi}}$$

Standart kalibrasyon grafiğinin eğimi

Fosfovanilin ayırıcı: 0.6 g vanilin 10 ml etanol içerisinde çözülmüş ve 100 ml distile su ile seyreltilmiştir. Karışıma 400 ml fosforik asit ilave edilmiş ve homojen görüntü oluşana dek karıştırılmıştır.

2.4. Optimum Lipid Üretim Düzeyinin Belirlenmesi

Mikroorganizmalar gelişme ortamında oluşabilecek herhangi bir değişme oldukça hızlı cevap vermektedir. Bu durum sadece fungal gelişimi değil aynı zamanda fungal lipid üretimini de etkilemektedir. Bu amaçla maksimum lipid üretimi elde edebilmek için çeşitli sistem parametrelerinin lipid üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Maksimum lipid üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla pH, karbon kaynağı, azot kaynağı ve demir varlığı gibi sistem parametreleri incelenmiştir.

2.4.1. Lipid Üretimi Üzerine pH Etkisi

Lipid üretimi üzerine pH etkisini belirlemek için besiyeri pH'ı 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir mikroorganizma farklı pH'lardaki bu besiyeri ile 35°C'de 10 gün süre ile inkübe edilmiş ve lipid analizi gerçekleştirilmiştir.

2.4.2. Lipid Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi

Lipid sentezine karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla sıvı besiyerlerinde karbon kaynağı olarak glukoz, laktoz, dekstroz, maltoz ve mannitol kullanılmıştır. Bu amaçla temel besiyerine ilgili karbon kaynağı %1 (w/v, v/v) oranında ilave edilmiştir. 35°C'de 10 gün süre ile inkübasyon sonrasında karbon kaynaklarının lipid üretimi üzerine etkisi, farklı karbon kaynağı içeren kültürlerde lipid miktarının ölçümü ile belirlenmiştir.

2.4.3. Lipid Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi

Lipid üretiminde azot kaynağının etkisini belirlemek amacıyla sıvı besi yerlerine %0.2 oranında potasyum nitrat, amonyum nitrat, pepton ve glisin ilave edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde lipid miktarı belirlenmiştir.

2.4.4. Lipid Üretimi Üzerine Demir Varlığının Etkisi

Lipid üretiminde demir metal iyonunun varlığını belirlemek amacıyla sıvı besi yerlerine 0.0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L derişimlerinde FeSO₄ ilave edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde lipid miktarı belirlenmiştir.

2.5. Lipid Ekstraksiyonu

Fungal biyokütle tarafından üretilen lipidlerin ekstraksiyonu Bligh ve Dyer'in önerdiği yönteme göre uygulanmıştır [98]. Besiyeri ve fungal biyokütle bir homojenizatör ile öğütölmüş ve kloroform:metanol (2:1, v/v) karışımı ile 20 dakika süre ile orbital karıştırıcıda (Heidolph Ins., Unimax 1010) ekstrakte edilmiştir. Süre sonunda karışıma kloroform:su (1:1) karışımı ilave edilmiş ve 10 dakika süre ile karıştırılmıştır. Süre sonunda ekstrakte edilen faz santrifüjlenerek (Sigma, Sartorius) ayrılmıştır. Elde edilen organik faz evaporatörde uçurularak lipit kalıntısı ince tabaka haline getirilmiş ve toplanarak biyodizel üretiminde kullanılmıştır.

2.6. Biyodizel Üretimi

Metanol ve sodyum hidroksit (NaOH) cam behere aktarılarak ısıtıcıda 30°C'ye kadar ısıtılmıştır. Katalizör olarak kullanılan NaOH'ın alkol içinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Alkol + katalizör karışımı üzerine fungal lipid ilave edilmiş

ve reaksiyon $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık 1 saat süresince devam ettirilmiştir. Reaksiyon süresinin bitiminde karışım ayırma hunisine alınmış ve sıcak su eklenmiştir. Gliserin fazının ayrılması için karışım 12 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve ayrılan gliserin fazı ayırma hunisinden alınmıştır. Kalan metil ester, iki katı miktarda 60°C 'deki saf su ile reaksiyon kabında bir süre karıştırıldıktan sonra ayırma hunisine alınmış ve faz ayrımı oluşumu sonrasında alınan ester filtreden geçirilmiştir.

2.6. Biyodizelin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu

Her bir mikroorganizmadan maksimum verimle elde edilen biyodizel örnekleri ile karbon kalıntısı, kükürt oranı, kinematik viskozite ve parlama noktası tayini gerçekleştirilmiştir. Karbon kalıntısı TS 6148 EN ISO 10370, kükürt oranı TS EN ISO 4264 kinematik viskozite TS 1451 EN ISO 3104, parlama noktası ise TS EN ISO 121185 analiz yöntemlerine göre yapılmıştır.

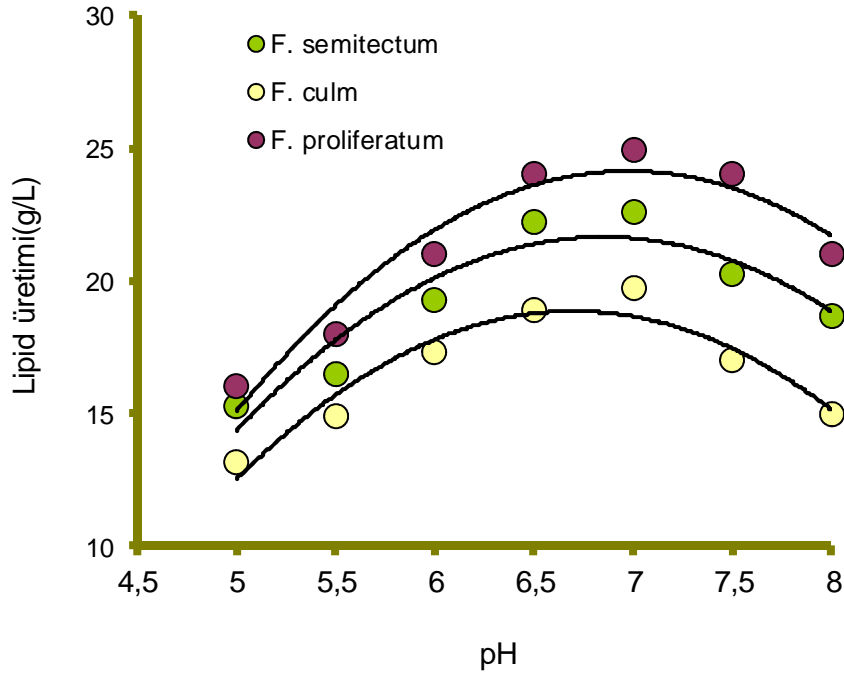
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Biyodizel üretimi hedefli bu çalışma iki aşamadan oluşmuştur. İlk aşamada fungal biyokütlelerden lipid üretimi sağlanmış ve lipid üretiminde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise elde edilen lipidler, biyodizel üretiminde kullanılmış ve biyodizel karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında maksimum lipid üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla fungal lipid üretimi üzerine sistem parametrelerinden pH, karbon kaynağı, azot türü ve demir varlığının etkisi incelenmiş ve yüksek düzeyde lipid üretimi elde edilmiştir.

3.1. Lipid Üretimi Üzerine pH Etkisi

Mikroorganizmaların ürün oluşturmaları ve yaşamlarını devam ettirmelerinde besin ortamının pH'ı önemli bir parametredir. Mikroorganizmaların üremeleri için, besiyerinin pH 'sının optimal sınırlar içinde bulunması gereklidir. Minimal ve maksimal pH limitlerine yaklaştıkça üreme azalır ve durur. Bu amaçla fungal lipid üretimi üzerine pH etkisi 5.0-8.0 aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.1'de verilmiştir. Tüm biyokütleler için 5.5-6.0 ve 7.5-8.0 pH aralıklarında düşük lipid üretimi, pH 6.5-7.0 aralığında ise yüksek lipid üretimi gözlenmiştir.

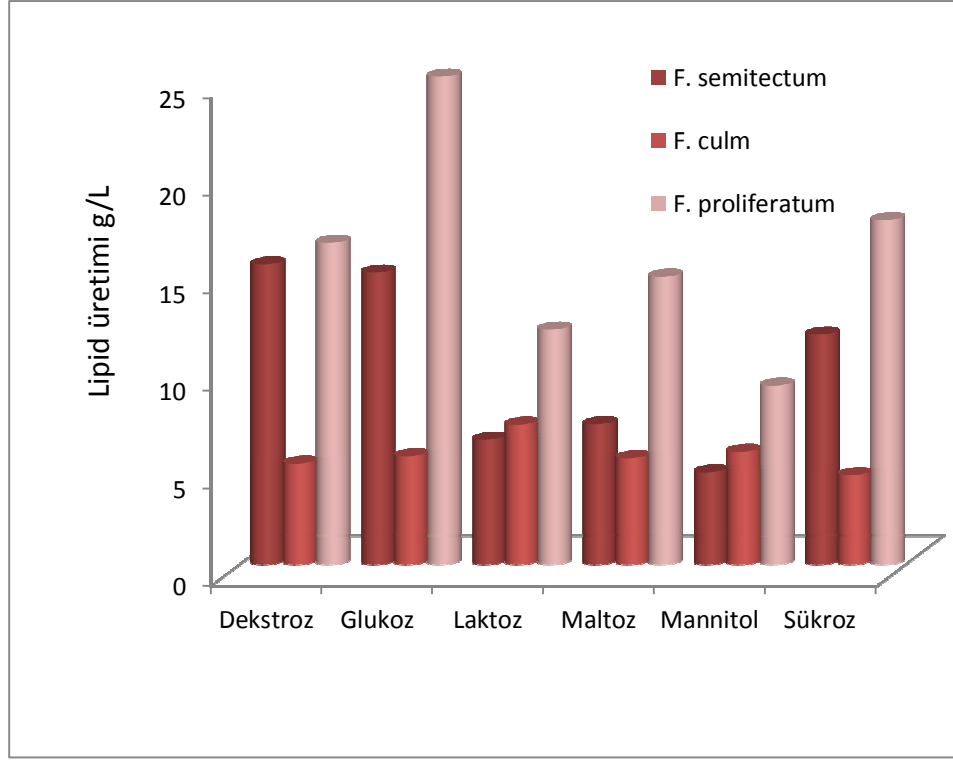
En yüksek lipid üretimi *Fusarium proliferatum* ile 24.96 g/L olarak bulunmuştur. pH değerinin 5.0'dan 7.0'a arttırılması ile lipid üretim kapasitesinin *Fusarium proliferatum* için 1.56, *Fusarium semitectum* için 1.48, *Fusarium culmorum* için ise 1.51 kat arttığı belirlenmiştir. pH değerinin 7.0'dan 8.0'a azalması durumunda ise lipid üretim kapasitesinin *Fusarium proliferatum* için 1.19, *Fusarium semitectum* için 1.22, *Fusarium culmorum* için 1.32 kat azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan biyokütlelerin lipid üretimi için nötral ve nötrale yakın pH değerlerini tercih ettikleri belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Lipid üretimi üzerine pH etkisi

3.2. Lipid Üretimi Üzerine Karbon Kaynağı Etkisi

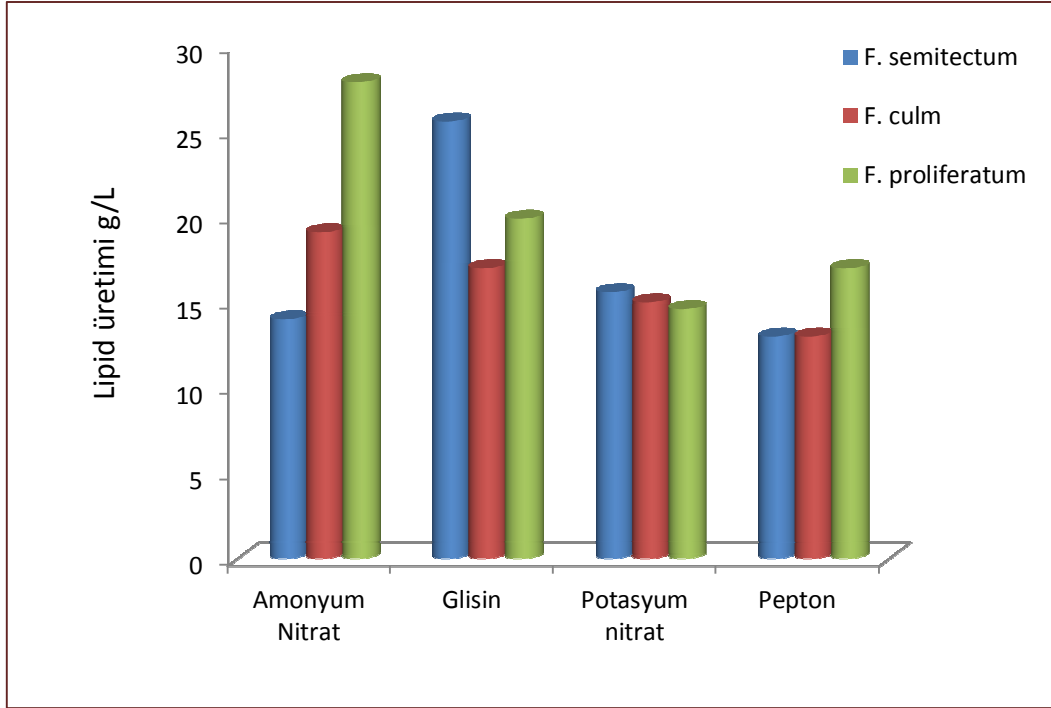
Fungal lipid üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi Şekil 3.2’de verilmiştir. Karbon kaynağı olarak dekstroz, glukoz, laktoz, maltoz, mannitol ve sükroz şekerleri test edilmiştir. En yüksek lipid üretimi diğer fungal kütlelere kıyasla *Fusarium proliferatum* ile elde edilmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini glukoz varlığında gösterirken, en düşük lipid üretimi ise mannitol varlığında gözlenmiştir. Mannitole kıyasla glukoz varlığında *Fusarium proliferatum*da lipid üretim kapasitesi 2.73 kat artış gözlenmiştir. *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi dekstroz varlığında 15.38 g/L olarak, en düşük üretim ise yine mannitol varlığında 4.7 g/L olarak bulunmuştur. *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi laktoz varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Sükroz varlığında ise tüm biyokütleler arasında minimum düzey olan 4.5 g/L lipid üretimi gözlenmiştir.



Şekil 3.2. Lipid üretimi üzerine karbon kaynağı etkisi

3.3. Lipid Üretimi Üzerine Azot Kaynağı Etkisi

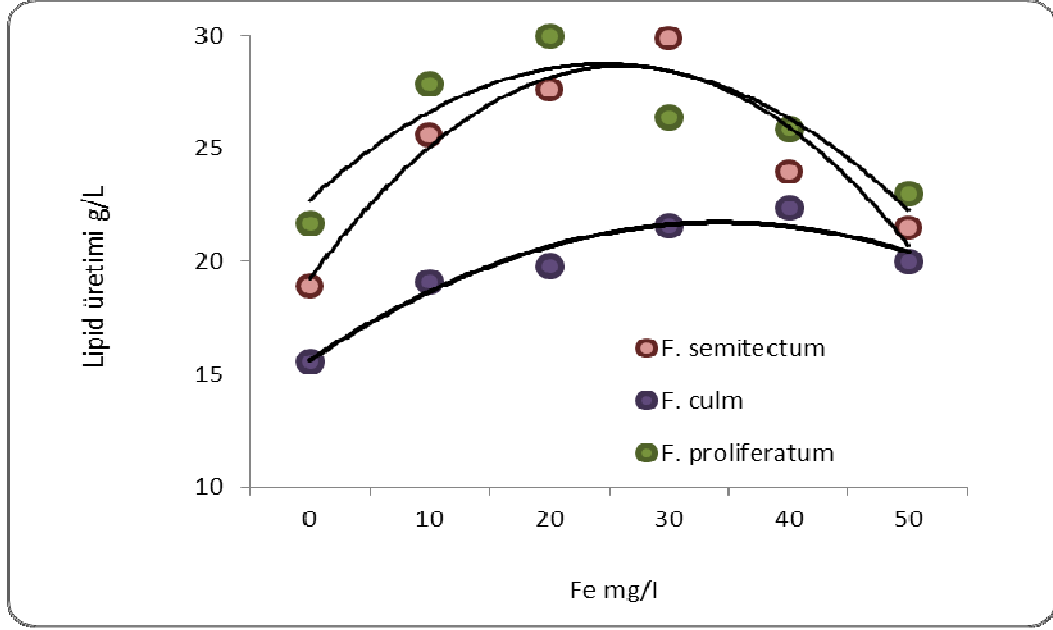
Azot kaynağının lipid üretimi üzerine etkisi Şekil 3.3'de verilmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini amonyum nitrat varlığında gösterirken, en düşük lipid üretimi potasyum nitrat varlığında gözlenmiştir. *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi glisin varlığında 25.6 g/L olarak, en düşük üretim ise pepton varlığında 14.1 g/L olarak bulunmuştur. *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi amonyum nitrat varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Farklı mantar türleri farklı azot kaynağını tercih ederken, genel olarak mantarlar tarafından amonyum nitratın tercih edildiği gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Lipid üretimi üzerine azot kaynağı etkisi

3.4. Lipid Üretimi Üzerine Demir Varlığının Etkisi

Demir varlığının lipid üretimi üzerine etkisi Şekil 3.4'te verilmiştir. Besi ortamında demir konsantrasyonunun artışına bağlı olarak lipid üretiminde de önemli artışlar olduğu belirlenmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini 20 mg/l demir varlığında, *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi 30 mg/l demir varlığında gözlenirken, *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi 40 mg/l demir varlığında maksimuma ulaşmıştır.



Şekil 3.4. Lipid üretimi üzerine demir varlığının etkisi

3.5. Biyodizel Özellikleri

Biyodizel özelliklerinin belirlenmesinde karbon kalıntısı, viskozite, parlama noktası ve kükürt oranı analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.1’de verilmiştir. Viskozite değeri TS 1451 ENISO 3104 standartlarına göre (40°C’de) 1.0-6.0 mm²/sn aralığında, parlama noktası TSEN ISO 121185 standartlarına göre 100-170°C aralığındadır. Kükürt oranı TSEN ISO 4264 standartlarına göre %0.0-0.0024 aralığındadır. Karbon kalıntısının TS 6148 ENISO 10370 standartlarında limit aralığı maksimum %0.030(m/m)’dur. *Fusarium proliferatum*’dan elde edilen biyodizelin viskozitesi 5.8 mm²/sn, parlama noktası 110°C kükürt oranı %0.0020, karbon kalıntısı %0.012 olarak ölçülürken *Fusarium semitectum* dan elde edilen biyodizelin viskozitesi 4.9 mm²/sn, parlama noktası 126°C kükürt oranı %0.0019, karbon kalıntısı %0.014 olarak ölçülmüştür. *Fusarium culmorum*’dan elde edilen biyodizelin viskozitesi 5.1 mm²/sn, parlama noktası 105°C kükürt oranı %0.0014, karbon kalıntısı %0.025 olarak ölçülmüştür.

Tablo 3.1. Biyodizel karakterizasyonu

	Viskozite (mm²/sn) (40 °C)	Parlama noktası (°C)	Kükürt oranı (%)	Karbon kalıntısı (%)
<i>Fusarium proliferatum</i>	5.8	150	0.0020	0.012
<i>Fusarium semitectum</i>	4.9	166	0.0019	0.014
<i>Fusarium culmorum</i>	5.1	140	0.0014	0.025

4.TARTIŞMA

Son yıllarda enerji kaynaklarının azalması ve küresel ısınmanın artması alternatif enerji kaynakları arayışına sebep olmuştur. Alternatif kaynaklardan biri olan biyodizel, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal yağlardan üretilen çevre dostu bir enerji kaynağıdır. Pek çok olumlu özelliği ile araçlarda, ısınmada, havacılık sanayinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Fakat tarımsal ve besinsel öneme sahip yağların enerji eldesi için feda edilmesi pek çok sorunu da beraberinde getirmiş ve kısa vadeli çözüm olarak kalmıştır. Bu çalışmada biyodizel üretimi için yeni hammadde olarak mikrobiyal lipidlerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Literatürde biyolojik kökenli lipidlerden en çok algal lipidlerin biyodizele dönüşümü araştırılmış, fungal lipidlerin kullanılabilirliği yeterince araştırılmamıştır. Bu kapsamda çalışmada yüksek lipid üretme kapasitesine sahip olduğu bilinen *Fusarium* türleri ile lipid üretimi ve elde edilen lipid ile biyodizel üretimi gerçekleştirilmiştir. Pek çok biyoküttelede lipid üretimi ve birikimi gerçekleşmektedir. Biyodizel üretiminde yüksek oranda lipid üretimi, biyoküttelede aranan önemli bir özelliktir. Lipid üretimi, biyokütlenin bulunduğu ortam şartlarının iyileştirilmesi ve modifiye edilmesi ile artırılabilir. Bu çalışmada, biyoküttele olarak kullanılan *Fusarium* türlerinin besiyortamının modifiye edilmesi ile lipid üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda ilk olarak besiyerinin pH'nın lipid üretimine etkisi incelenmiştir.

Besiyeri pH'sı mikroorganizma üretiminde etkili olan önemli bir çevresel parametredir. Mikrobiyal metabolizmayı önemli derecede etkileyen pH'nın lipid üretimi üzerine etkisi farklı pH değerlerinde incelenmiş ve tüm fungal biyokütteleler için maksimum lipid üretimi pH 6.5-7.0 aralığında gözlenmiştir. Bu aralığın altında ve üzerindeki pH değerlerinde lipid üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Fungal lipid üretimi üzerine pH'nın etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı türlerde pH değişikliğinin lipid üretimini önemli derecede etkilerden bazı türlerde pH değişikliğinin herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir [99]. Mikroorganizmaların buldukları ortamdaki hidrojen iyonları yoğunluğunun derecesi özellikle enzimatik etkinlikler için büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin

bazı metabolizma ürünlerini sentezlenmesinde besiyerinin pH'sı oldukça önemlidir ve pH değişimlerine karşı hassas olan mikroorganizmalarda metabolizma olumsuz yönde etkilenmektedir. pH, moleküllerin bağlanması ve etkileşimi gibi mekanizmalarda önemli bir faktör olan iyonizasyon üzerine oldukça etkilidir. Örneğin mikroorganizmalar için iz element olan bazı metaller farklı pH değerlerinde farklı iyonizasyon derecelerine sahiptir ve bu derece metalin mikroorganizma tarafından kullanılabilirliğini de etkilemektedir. pH, fungal kütlelerin ihtiyaç duyduğu çoğu moleküllerin çözünürlüğünü de etkilemektedir. Ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilerek dış ortama salınan ekstrasellüler enzimler de besiyerinin pH'sından etkilenmektedirler. pH'a bağlı olarak enzim molekülü üzerinde çeşitli elektrik yüklenmeleri ve buna bağlı olarak enzim aktivitesi için gerekli olan konformasyonel yapı meydana gelmekte ve substratla-enzim etkileşimi gerçekleşmektedir. Ortam pH'sındaki değişimler enzim yüklenmesi üzerinde farklılıklara neden olacağından enzim-substrat etkileşimi azalacak ve fungal metabolizmada aksamalar meydana gelecektir. Tüm bu sebeplerden dolayı besiyerinin pH'sı mikrobiyal büyümede ve metabolit üretiminde oldukça önemlidir. Literatürde de çalışma kapsamında elde ettiğimiz verileri destekleyici pek çok çalışma mevcuttur.

Lipid üretiminde kültür ortamına ilave edilen karbon kaynağının etkisini belirlemek amacıyla farklı karbon kaynakları varlığında lipid üretimi test edilmiştir. Biyokütlelerin maksimum lipid üretiminde farklı karbon kaynaklarını tercih ettiği belirlenmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini glukoz varlığında gösterirken, *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi dekstroz varlığında, *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi laktoz varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar ile biyokütlelerin farklı karbon kaynaklarını tercih ettiği gözlenmiştir. Easterling ve arkadaşları üretilen lipid miktarının ve bileşiminin mikroorganizmaların türlerine, kültür şartlarına ve karbon kaynaklarına göre değiştiğini belirtmişlerdir [100]. Genel olarak maksimum lipid üretiminde monosakkaritlerin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Çünkü monomerlerin parçalanması diğer şekerlere göre daha kolaydır. Shinmen ve arkadaşları [101] ve Aki ve arkadaşları [102] sırasıyla *Mortierella alpina* ve *Mortierella alliace* türlerini kullanarak araşidonik asit üretimi için çeşitli karbon kaynaklarını araştırmışlar ve

araşidonik asit üretimi için glukozun en uygun karbon kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir. Papanikolaou [103] lipid üretimi için başlıca karbon kaynağının glukoz olduğunu, Chen ve Liu [104] en uygun karbon kaynağının çözünebilir nişasta olduğunu, Papanikolaou ve Aggelis, [105] ise gliserol olduğunu rapor etmişlerdir. Ortamda yağ birikimini arttırmak için karbon kaynağının arttırılması gerekmektedir. Hücreler aldığı karbonu önce yağ asitlerine daha sonra trigliseridlere dönüştürmektedir. Yağ üretebilme özelliğine sahip mikroorganizmalar glukoz, fruktoz, maltoz ve ksiloz gibi farklı birçok karbon kaynaklarını tercih edebilmektedir [106].

Lipid üretiminde kültür ortamına ilave edilen azot kaynağının etkisini belirlemek amacıyla farklı azot kaynakları varlığında lipid üretimi test edilmiştir. Biyokütlelerin maksimum lipid üretiminde farklı azot kaynaklarını tercih ettiği belirlenmiştir. *Fusarium proliferatum* en yüksek lipid üretimini amonyum nitrat varlığında gösterirken, *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi glisin varlığında, *Fusarium culmorum* biyokütlesi ile lipid üretim kapasitesi amonyum nitrat varlığında maksimum düzeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar ile biyokütlelerin farklı azot kaynaklarını tercih etmesine rağmen, genel olarak mantarlar tarafından amonyum nitratın tercih edildiği gözlenmiştir. Huang ve arkadaşları organik azot kaynaklarının lipid üretimi ve depolanmasında etkin bir role sahip olduğunu fakat hücre büyümesi açısından iyi birer azot kaynağı olmadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde inorganik azot kaynaklarının ise hücre büyümesi için oldukça kullanışlı olduğunu fakat lipid üretimi için etkili olmadığını rapor etmişlerdir. Bu kapsamda *Rhodosporidium toruloides* ile maksimum lipid üretiminin azot kaynağı olarak pepton varlığında elde edildiği rapor edilmiştir [107]. Çalışmamızda *Fusarium semitectum* ile elde ettiğimiz sonuçlar bu genel fenomeni doğrulamaktadır. *Fusarium semitectum* ile lipid üretiminde en yüksek üretim kapasitesi organik azot kaynağı olan glisin varlığında elde edilmiştir. Fakat diğer biyokütlelerde en yüksek verim inorganik azot kaynakları varlığında elde edilmiştir ve bu nedenle böyle bir genellemenin bu çalışmada kullanılamayacağı açıktır. Fungal lipid üretimi birincil besin maddelerinin varlığı ile doğrudan etkilenmektedir. Ortamdaki azot kaynağının türü kadar ve miktarı da lipid üretim düzeyini önemli derecede etkilemektedir. Azot kaynağındaki azalma, azotun esansiyel element

olduğu protein ve nükleik asit metabolizmasında yavaşlamaya neden olmaktadır. Ortamdaki azot kaynağının azalmasına bağlı olarak bazı metabolik yolların yavaşlaması hücre gelişimini sınırlamaktadır. Bu durumda besin kaynağı olarak kullanılan karbon diğer metabolik yollar yerine lipid üretiminde ve depolanmasında kullanılmaktadır [79,83]. Kısaca azot sınırlaması fungal kütlelerde iyi bir lipogenez indikatörüdür. Sınırlı azot düzeyi mitokondriyal AMP-deaminaz enzimini aktive etmektedir ve mitokondri AMP düzeyi azalmaktadır. Bu azalma ile izositrat dehidrogenaz aktivitesi azalmakta ve izositrat düzeyi artmaktadır. Bu artış, TCA siklusunun bloke olmasına ve biriken izositratın sitoplazmaya transferi ile sitoplazmik asetil CoA düzeyinde yükselmeye neden olmaktadır. Sitoplazmik asetil CoA lipid sentezinde nc molekül olarak kullanılmakta ve bu yolla lipid üretimi ve depolanması artmaktadır [108].

Besiyerindeki eser element bileşiminin optimizasyonu daha yüksek ürün verimi elde etmek için önemlidir. Demir fungal kültür ortamının önemli temel inorganik bileşenlerinden biridir [109]. Bu nedenle çalışmamızda lipid üretiminde kültür ortamına ilave edilen demir varlığının etkisi ve miktarı araştırılmıştır. Demir konsantrasyonunun artışı ile lipid üretiminde önemli artışlar gözlenmiştir. *Fusarium semitectum* ile en yüksek lipid üretimi 30 mg/l demir varlığında, *Fusarium culmorum* ile en yüksek lipid üretimi 40 mg/l demir varlığında gözlenirken, *Fusarium proliferatum* ile en yüksek lipid üretimi 20 mg/l demir varlığında gözlenmiştir. Demirin yüksek konsantrasyonlarında lipid üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. Totani ve arkadaşları [110] *Mortierella alpina* kültüründe mineral varlığının lipid üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır ve hücre büyümesi için fosfor, potasyum, demir ve manganezin temel olduğunu ve demirin lipid sentezinde önemli rollere sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Kyle [111] demir, çinko ve bakır ilavesinin *M. alpina* kültüründeki araşidonik asit verimini arttırdığını ispatlamıştır. Bu durum asetil-CoA'nın malonil-CoA'ya dönüştürülmesini katalize eden ve kofaktör olarak bivalent metal iyonlarını gerektiren asetil-CoA karboksilaz aktivitesinin artması ile açıklanabilir [112].

Maksimum lipid üretimi çalışmaları sonrasında elde edilen lipidler, biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Elde edilen biyodizelin standartlara uygunluğunu belirlemek amacıyla karbon kalıntısı, viskozite, parlama noktası ve kükürt oranı

analizleri gerçekleştirilmiştir. Biyodizele ait bu özelliklerin tamamı standart değerler aralığındadır ve elde ettiğimiz tüm biyodizel örneklerinin standartlara uyduğu görülmektedir. Fungal lipidler, doymamış lipid içeriği bakımından zengindir. İdeal bir biyodizel üretiminde doymamış yağ asitlerinin yüksek olması tercih edilmektedir. Çünkü doymamış yağ asitleri daha kolay esterleşme reaksiyonuna girmektedir. Fungal lipidlerle elde edilen biyodizelin standartlara uygun olması ve iyi özellik göstermesi fungal lipid içeriğinde doymamış lipidlerin bulunması ile açıklanabilir. Benzer şekilde Demirbaş [113] yaptığı çalışmada elde ettiği biyodizelin viskozitesini 3.59-4.63 mm²/sn olarak rapor etmiştir. Antolin ve arkadaşları çalışmalarında, %100 ayçiçeği yağından elde ettikleri biyodizelin viskozitesini 4.3 mm²/sn bulmuşlardır [114]. Artukoğlu hayvansal atık yağlardan elde ettiği biyodizelin parlama noktasını 138°C olarak rapor etmiştir [78]. Şanlı atık kızartma yağından elde ettiği biyodizelin karbon kalıntısını %0.04 olarak rapor etmiştir [115].

Gelişmeyle birlikte artan enerji kullanımı ve çevresel zararlar, dünyada olduğu gibi ülkemizde de biyodizel yakıtı gibi yenilenebilir enerji çeşitlerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Biyodizel konusunda gerekli üretim potansiyeline sahip olan ülkemizin hammadde ve üretim maliyetleri konusundaki sıkıntılar biyodizel konusunda istenilen noktaya gelmemizi engellemektedir. Biyodizel daha çok bitkisel ürünlerden elde edilmekte ve bu durum ileride besin azlığı ve kıtlık gibi daha önemli sorunları beraberinde getirebilmektedir. Bu nedenle biyodizel üretiminde hammadde açısından yeni alternatifler gündeme getirilmelidir. Bu çalışmada fungal lipidler bu anlamda kullanılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen biyodizel özelliklerinin standartlara yakın bir değer göstermesi ise oldukça umut vericidir.

KAYNAKLAR

1. Yaşar, B. Türkiye’de Biyodizel Üretim Maliyeti ve Yaşanan Sorunlar. VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, UTES’2008, 17-19 Aralık 2008, İstanbul.
2. Ünalın, S. Alternatif Enerji Kaynakları <http://akmyo.kocaeli.edu.tr/altenerkaydersnot.pdf>. Web adresinden 10 Nisan 2012 tarihinde edinilmiştir.
3. <http://www.msxlab.org/forum/soru-cevap/320872-fosil-yakitlarin-zararlari> Web adresinden 10 Nisan 2012 tarihinde edinilmiştir.
4. Pamir, A.N. 2003. Dünyada ve Türkiye’de Enerji, Türkiye’nin Enerji Kaynakları ve Politikaları. *Metallurji Dergisi*.
5. Akinlo, A.E. 2008. Energy Consumption and Economic Growth: Evidence From sub-Saharan Africa Countries. *Energy Economics* 30: 2391-2400.
6. Altunç, Ö.F. 2008. Türkiye’de Finansal Gelişme ve İktisadi Büyüme Arasındaki Nedenselliğin Ampirik Bir Analizi. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi GÖBF Dergisi* 3 (2): 113-127.
7. Cumhuriyetten Günümüze Enerji Sektörü, Sürdürülebilir Kalkınma ve Çevre. <http://www.gençbilim.com.odev97541>. Web adresinden 26 Şubat 2012 tarihinde edinilmiştir.
8. <http://www.deltur.cec.eu.int/>
9. Keleş, R., Hamamcı, C. 2002. *Çevrebilim*. İmge Kitabevi, Ankara.
10. Savin, J. 2003. *Enerji İçin Yeni Bir Gelecek Yaratmak. Dünyanın Durumu*. Çev. Şehnaz Tahir Gürçağlar, TEMA Vakfı Yayınları, İstanbul.
11. Zhao, R., Bean, S.R., Wang, D., Park, S.H., Schober, T.J., Wilson, J.D. 2009. Small-scale Mashing Procedure for Predicting Ethanol Yield of Sorghum Grain. *Journal of Cereal Science* 49 (2): 230-38.
12. Singh, A., Pant, D., Korres, N.E., Nizami, A.S., Prasad, S., Murphy, J.D. 2010. Key Issues in Life Cycle Assessment of Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass: Challenges and Perspectives. *Bioresource Technology* 101 (13): 5003-12.

13. Prasad, S., Singh, A., Jain, N., Joshi, H.C. 2007. Ethanol Production From Sweet Sorghum Syrup For Utilization as Automotive Fuel in India. *Energy Fuel* 21 (4): 2415-20.
14. FAO, 2008. Biofuels: Prospects, Risks and Opportunities The State of Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome. BIOFUELS: Prospects, Risks and Opportunities. The state of food and agriculture.
15. Larson, E.D. 2008. Biofuel Production Technologies: Status, Prospects and Implications for Trade and Development. United Nations Conference on Trade and Development, New York and Geneva.
16. Giselerød, H.R., Patil, V., Tran, K. 2008. Towards Sustainable Production Of Biofuels From Microalgae. *International Journal of Molecular Sciences* 9: 1188-95.
17. Love, G., Gough, S., Brady, D., Barron, N., Nigam, P., Singh, D. 1998. Continuous Ethanol Fermentation at 45°C Using *Kluyveromyces Marxianus* IMB3 Immobilized in Calcium Alginate and Kissiris. *Bioprocess Engineering* 18: 187-189.
18. Banat, I.M., Nigam, P., Marchant, R. 1992. Isolation of A Thermotolerant, Fermentative Yeasts Growing at 52°C and Producing Ethanol at 45°C&50°C. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 8: 259-63.
19. Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yanez, E.E., Castillo, E.F., Almazan, O. 2009. Biofuels: Environment Technology and Food Security. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 13: 1275-87.
20. Farias, F.E.M., Silva, F.R.C., Cartaxo, S.J.M., Fernandes, F.A.N., Sales, F.G. 2007. Effect of Operating Conditions on Fischer-Tropsch Liquid Products. *Latin American applied research* 37: 283-7.
21. Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from Microalgae A Review of Technologies for Production, Processing and Extractions of Biofuels and Co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 14: 557-77.
22. Balat, M., Balat, H. 2010. Progress in Biodiesel Processing. *Appl Energy* 87 (6): 1815–28.
23. Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Abdul Aziz, A. 2010. High Quality Biodiesel and Its Diesel Engine Application: A Review. *Renew Sustain Energy Rev* 14 (7): 1999–2008.

24. Shahid, E.M., Jamal, J. 2011. Production of Biodiesel: A Technical Review. *Renew Sustain Energy Rev* 15 (9): 4732–45.
25. Demirbaş, A. 2007. Importance Of Biodiesel as Transportation Fuel. *Energy Policy* 35 (9): 4661–70.
26. Knothe, G. 2010. Biodiesel and Renewable Diesel: A Comparison. *Prog Energy Combust Sci* 36 (3): 364–73.
27. Jena, P.C., Raheman, H., Kumar, G.V.P., Machavaram, R. 2010. Biodiesel Production from Mixture of Mahua and Simarouba Oils with High Free Fatty Acids. *Biomass Bioenergy* 34 (8) 1108–16.
28. Jain, S., Sharma, M.P. 2010. Biodiesel Production from *Jatropha curcas* oil. *Renew sustain Energy Rev* 14 (9): 3140–7.
29. Saloua, F., Saber, C., Hedi, Z. 2010. Methyl Ester of [*Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider] Seed Oil: Biodiesel Production and Characterization. *Bioresour Technol* 101 (9): 3091–6.
30. Silitonga, A.S., Atabani, A.E., Mahlia, T.M.I., Masjuki, H.H., Badruddin, I.A., Mekhilef, S. 2011. A Review on Prospect of *Jatropha Curcas* for Biodiesel in Indonesia. *Renew Sustain Energy Rev* 15: 3733–56.
31. Antolin, G., Tinaut, F.V., Briceno, Y., Castano, V., Perez, C., Ramirez, A.I. 2002. Optimisation of Biodiesel Production by Sunflower Oil Transesterification. *Bioresour Technol* 83 (2): 111–4.
32. Atadashi, I.M., Aroua, M.K., Abdul Aziz, A. 2011. Biodiesel Separation and Purification: A Review. *Renew Energy* 36 (2): 437–43.
33. Li, S., Wang, Y., Dong, S., Chen, Y., Cao, F., Chai, F., Wang, X. 2009. Biodiesel Production from *Eruca Sativa* Gars Vegetable Oil and Motor: Emissions Properties. *Renew Energy* 34 (7): 1871–6.
34. Rabe, E.L.M. 2010. *Jatropha Oil in Compression Ignition Engines, Effects on The Engines, Environment and Tanzania as Supplying Country*. Eindhoven: Eindhoven University of Technology.
35. Fernando, S., Karra, P., Hernandez, R., Jha, S.K., 2007. Effect of Incompletely Converted Soybean Oil on Biodiesel Quality. *Energ* 32 (5): 844–851.
36. Monyem, A., Van Gerpen, J.H., Canakcı, M. 2001. The Effect of Timing and Oxidation on Emissions from Biodiesel–Fueled Engines. *American Society of Agricultural Engineers: St. Joseph, MI, ETATS-UNIS;*, pp. 44.

37. Öner, C., Altun, A. 2009. Biodiesel Production from Inedible Animal Tallow and an Experimental Investigation of Its Use as Alternative Fuel in a Direct Injection Diesel Engine. *Applied Energy* 86 (10): 2114–2120.
38. Xue, J., Grift, T.E., Hansen, A.C. 2011. Effect of Biodiesel on Engine Performances and Emissions. *Renew Sustain Energy Rev* 15 (2): 1098–116.
39. Schumacher, L., 1995. The Physical & Chemical Characterization of Biodiesel Low Sulfur Diesel Fuel Blends. Available from: http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19951230_gen-253.pdf. Web adresinden 15 Nisan 2012 tarihinde edinilmiştir.
40. Filemon, J., 2010. Biofuels from Plant Oils. Available from: <http://www.aseanfoundation.org/documents/books/biofuel.pdf>. Web adresinden 10 Nisan 2012 tarihinde edinilmiştir.
41. Torres-Jimenez, E., Jerman, M.S., Gregorc, A., Lisec, I., Dorado, M., Kegl, B. 2011. Physical and Chemical Properties of Ethanol–Diesel Fuel Blends. *Fuel* 90 (2): 795–802.
42. Sanford, S.D., White, J.M., Shah, P.S., Wee, C., Valverde, M.A., Meier, G.R., 2009. Feedstock and Biodiesel Characteristics Report. http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/20091117_GEN-398.pdf. Web adresinden 8 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.
43. Meher, L.C., Vidya Sagar, D., Naik, S.N., 2006. Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification – A Review.: *Renewable & Sustainable Energy* 10 (3): 248–268.
44. Murugesan, A., Umarani, C., Chinnusamy, T.R., Krishnan, M., Subramanian, R., Neduzchezain, N. 2009. Production and Analysis of Bio-Diesel From Non-Edible Oils– A Review. *Renewable & Sustainable Energy* 13 (4): 825–834.
45. Masjuki, H.H. 2010. Biofuel Engine: A New Challenge. Inaugural Lecture. Malaysia University of Malaya.
46. Friday, J.B., Okano, D., *Calophyllum Inophyllum* (Kamani). (2011). <http://www.agroforestry.net/tti/Calophyllum-kamani.pdf> Web adresinden 8 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.
47. Moser, B.R., Vaughn, S.F. 2010. Coriander Seed Oil Methyl Esters as Biodiesel Fuel: Unique Fatty Acid Composition and Excellent Oxidative Stability. *Biomass Bioenergy* 34 (4): 550–558.

48. Karmakar, A., Karmakar, S., Mukherjee, S. 2010. Properties of Various Plants and Animals Feedstocks for Biodiesel Production. *Bioresour Technol* 101 (19): 7201–7210.
49. Lapuerta, M., Armas, O., Rodriguez-Fernandez, J. 2008. Effect of Biodiesel Fuels on Diesel Engine Emissions. *Progress in Energy and Combustion Science* 34 (2): 198–223.
50. Demirbas, A. 2005. Biodiesel Production from Vegetable Oils by Supercritical Methanol. *Journal of Scientific & Industrial Research* 64: 858–865.
51. The Pew Charitable Trusts., 2011. Worldwide Action on Global Warming. http://www.pewtrusts.org/uploadedFiles/wwwpewtrustsorg/FactSheets/Global_warming/world%20wide%20actionsnpdf.pdf. Web adresinden 18 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.
52. Kafuku, G., Mbarawa, M., 2010. Biodiesel Production from Croton Megalocarpus Oil and Its Process Optimization. *Fuel* 89: 2556–2560.
53. Agarwal, A.K. 2007. Biofuels (Alcohols and Biodiesel) Applications as Fuels for Internal Combustion Engines. *Progress in Energy and Combustion Science* 33 (3): 33–71.
54. Rashid, U., Anwar, F., Knothe, G. 2009. Evaluation of Biodiesel Obtained from Cottonseed Oil. *Fuel Processing Technology* 90 (9): 1157–1163.
55. Van Gerpen, J.H., Hammond, E.G., Johnson, L.A., Marley, S.J., Yu, L., Lee, I., Monyem, A. 2005. Biodiesel Processing and Production. *Fuel Processing Technology* 86 (10): 1097–1107.
56. Li, Z., Deng, L., Lu, J., Guo, X., Yang, Z., Tan, T. 2010. Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters From Crude Rice Bran Oil With Immobilized Candida. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18 (5): 870–875.
57. Maceiras, R., Rodriguez, M., Cancela, A., Urrejola, S., Sanchez, A. 2011. Macroalgae: Raw Material for Biodiesel Production. *Applied Energy* 88 (10): 3318–3323.
58. Demirbaş, A. 2009. Progress and Recent Trends in Biodiesel Fuels. *Energy Conserv M Usta, N., Ozturk, E., Can, O., Conkur, E.S., Nas, S., Con, A.H.* 2005. Combustion of Biodiesel Fuel Produced from Hazelnut Soapstuck/Waste Sunflower Oil Mixture in A Diesel Engine. *Energy Convers Manage*, 46, 741-55.anage, 50, 14-34.

59. Usta, N., Ozturk, E., Can, O., Conkur, E.S., Nas, S., Con, A.H. 2005. Combustion of Biodiesel Fuel Produced from Hazelnut Soapstock/Waste Sunflower Oil Mixture in A Diesel Engine. *Energy Convers Manage* 46: 741-55.
60. Vicente G., Martinez M., Aracil, J. 2004. Integrated biodiesel production: A Comparison of Different Homogeneous Catalysts Systems. *Biores. Technology* 92: 297-305.
61. Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. and Shrestha, S. 2001. Production of Biodiesel Fuel from Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase. *Journal of Molecular Catalysis* 16: 53-58.
62. Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A. 2011. Oil extraction from Microalgae for Biodiesel Production. *Biores. Technol* 102: 178-185.
63. Singh, S.P., Singh, D. 2010. Biodiesel Production Through The Use of Different Sources and Characterization of Oils and Their Esters as The Substitute of Diesel: A Review. *Renew Sustain Energy Rev* 14 (1): 200–16.
64. Yusuf, N.N.A.N., Kamarudin, S.K., Yaakub, Z. 2011. Overview on The Current Trends in Biodiesel Production. *Energy Convers Manage* 52 (7): 2741–51.
65. Canakci, M., Sanli, H. 2010. Biodiesel Production from Various Feedstocks and Their Effects on The Fuel Properties. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35 (5): 431–41.
66. Mahanta, P., Shrivastava, A. Technology Development of Bio-Diesel as An Energy Alternative. http://www.newagepublishers.com/samplechapter_001305.pdf. Web adresinden 18 Mart 2012 tarihinde edinilmiştir.
67. Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F. 2007. Possible Methods for Biodiesel Production. *Renew Sustain Energy Rev* 11 (6): 1300–11.
68. Körbitz, W. 1999. Biodiesel Production in Europa and North America an Encouraging Prospect. *Renewable Energy* 16: 1078-1083.
69. Keskin, A., Gürü, M., Altıparmak, D. 2007. Tall Yağı Biyodizelinin Dizel Yakıtı İle %90 Oranındaki Karışımının Alternatif Dizel Yakıtı Olarak İncelenmesi. *Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der* 22 (1): 57-63.
70. Kafadar, A.B. 2010. Yağlardan Biyodizel Eldesine Etki Eden Faktörlerin Araştırılması. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 96 Diyarbakır.

71. Wyatt, V.T., Hess, M.A., Dunn, R.O., Foglia, T.A., Haas, M.J., Marmer, V.N. 2005. Fuel Properties and Nitrogen Oxide Emission Levels of Biodiesel Produced from Animal Fats. *JAOCS* 82 (8): 585-591.
72. Ma, F., Clements, L.D., Hanna, M.A. 1998. The Effects of Catalyst, Free Fatty Acids, and Water on Transesterification of Beef Tallow, *Transaction of ASAE*, 41 (5): 1261-1264.
73. Altun, Ş., Hayvansal Yağlardan Biyoyakıt Üretimi ve Bir Dizel Motorunda Kullanılabilirliğinin Deneysel Araştırılması. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 137, Elazığ.
74. Bhatti, H.N., Hanif, M.A. Faruq, U., Sheikh, M.A. 2008. Acid and Base Catalyzed Transesterification of Animal Fats to Biodiesel. *Iran. J. Chem. Chem. Eng* 27: 41-48.
75. Reyes, J.F., Sepulveda, M.A. 2006. PM-10 Emissions and Power of a Diesel Engine Fueled with Crude and Refined Biodiesel from Salmon Oil. *Fuel* 85: 1714–1719.
76. Dias, J.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Almeida, M.F. 2009. Production of Biodiesel from Acid Waste Lard. *Bioresource Technology* 100: 6355–6361.
77. Guru, M., Artukoglu, B.D., Keskin, A., Koca, A. 2009. Biodiesel Production From Waste Animal Fat And Improvement Of Its Characteristics By Synthesized Nickel And Magnesium Additive. *Energy Conversion and Managemen* 50: 498–502.
78. Artukoğlu, B.D. 2006. Hayvansal Atık Yağlardan Biyodizel Üretimi ve Özelliklerinin Geliştirilmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 94, Ankara.
79. Denli, Y., Tekin, A. 2000. Oil Production and Microorganisms. *Gıda* 25 (4): 265-270.
80. Ratledge, C. 1989. Biotechnology of oils and fats, Microbial lipids. 2: 567-668, Academic Press, London.
81. Dönmez, G. 2011. Maya ve Fungus Lipitlerinin Soxhlet Sistemi ile Ekstraksiyonu. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi.

82. Keskin, A. 2005. Tall Yağı Esaslı Biyodizel ve Yakıt Katkı Maddesi Üretimi ve Bunların Dizel Motor Performansı Üzerindeki Etkileri. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
83. Ratledge, C. Lipids and fatty acids, *Economic Microbiology*, Ed. A.H. Rose, 2: 263-302, Academic Press, London.
84. Holdsworth, J.E., Ratledge, C. 1988. Lipid Turnover in Oleaginous Yeasts. *Journal of General Microbiololy* 134: 339–346.
85. Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S. D. 2007. Fatty Acid Synthesis and Elongation in Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1171 (83): 255-270.
86. Ciegler, A., Detroy, R.W., Lileho, F.B. 1971. Patulin, Penicillic Acid and Other Carcinogenic Lactones. *Microbial. Toxins, Fungal Toxins*.
87. <http://www.doctorfungus.org/>
88. Wang, Y., Ou, S., Liu, P., Xue, F., Tang, S. 2006. Comparison of Two Different Processes to Synthesize Biodiesel by Waste Cooking Oil. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 252: 107-112.
89. Üstün, S. 2006. Hayvansal Yağlardan Biyodizel Eldesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp.66, Konya.
90. Lu, H., Liu, Y., Zhou, H., Yang, Y., Chen, M., Liang, B. 2009. Production of Biodiesel from *Jatropha curcas* L. Oil. *Computers and Chemical Engineering* 33 (5): 1091-1096.
91. Hossain, A.B.M.S., Salleh, A., Boyce, A.M., Chowdhury, P., Naquiuddin, M. 2008. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4 (3): 250-254.
92. Miao, X., Wu, O. 2004. High Yield Bio-oil Production from Fast Pyrolysis by Metabolic Controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology* 110 (1): 85-93.
93. Li, X., Xu, H., Wu, Q. 2007. Large-scale Biodiesel Production from Microalga *Chlorella protothecoides* Through Heterotrophic Cultivation in Bioreactors. *Journal of Biotechnology* 98 (4): 764-71.
94. Vicente, G., Bautista, L.F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F.J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martinez, S., Garre, V., 2009. Biodiesel Production from Biomass of An Oleaginous Fungus. *Biochemical Engineering Journal* 48: 22-27.

95. Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., Zhao, M. 2007. Biodiesel Generation from Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* with Xylose Assimilating Capacity. *African Journal of Biotechnolog.* 6 (18): 2130–2134.
96. Knight, J.A. et al, 1972. *Clinical Chemistry* 19:199
97. Jacobs, S.L., Henry, R.J. 1962. *Clinica Chimica Acta* 7:270.
98. Darnoko, D., Cheryan, M. 2000. Continuous Production of Palm Methyl Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 1269-72.
99. Weete, J.D. 1980. *Lipid Biochemistry of Fungi and other Organisms*. Plenum Press, New York.
100. Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M. 2009. The effect of Glycerol as A Sole and Secondary Substrate on The Growth and Fatty Acid Composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol* 100: 356–361.
101. Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto K., Kawashima, H., Yamada, H. 1989. Production of Arachidonic Acid by *Mortierella* Fungi: Selection of A Potent Producer and Optimization of Culture Conditions for Large-scale Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 31: 11-16.
102. Aki, T., Nagahata, Y., Ishihara, K., Tanaka, Y., Morinaga, T., Higashiyama, K., Kimoto, K., Fujikawa, S., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K., Suzuki, O. 2001. Production of Arachidonic Acid By Filamentous Fungus, *Mortierella alliacea* Strain YN-15. *J. Am. Oil Chem. Soc* 78: 599-604.
103. Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. 2004. Single cell Oil (SCO) Production by *Mortierella isabellina* Grown on High-Sugar Content Media. *Bioresource Technol* 95 (3): 287-291.
104. Chen, H.C., Liu, T.M. 1997. Inoculum Effects on The Production of Γ -Linolenic Acid by The Shake Culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme Microb Technol* 21: 137-142.
105. Papanikolaou, S., Aggelis, G. 2002. Lipid Production by *Yarrowia lipolytica* Growing on Industrial Glycerol in A Singlestage Continuous Culture. *Bioresource Technol* 82 (1): 43-49.
106. Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I., Aggelis, G. 2001. Lipid and γ -linolenic Acid Accumulation in Strains of Zygomycetes Growing on Glucose. *JAOCS* 78 (4): 341-346.

107. Huang, J.Z., Shi, Q.Q., Zhou, X.L., Lin, Y.X., Xie, B.F., Wu, S.G. 1998. Studies on The Breeding Of *Mortierella isabellina* Mutant High Producing Lipid and Its Fermentation Conditions. *Microbiology* 25: 187-191.
108. Bielecki, S., Krystynowics, A., Turkiewics, M., Kalinowska, H. 2001. Bacterial Cellulose. In Steinbuchel A (Ed), *Biopolymers: 7:37-90*, Polysaccharides I. Wiley-VCH Verlag GmbH, Munster, Germany.
109. Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F. 1973. *Biochemical Engineering*. 2nd ed., 29-30. University of Tokyo Press, Japan.
110. Totani, N., Someya, K., Oba, K. 1992. Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*. In: D. J. Kyle, and C. Ratledge (eds.). *Industrial Applications of Single Cell Oils*, pp. 52-60, AOCS Press, IL, USA.
111. Kyle, D. J. 1996. Arachidonic Acid and Methods for The Production and Use Thereof. PCT Patent WO96/21037.
112. Guchhait, R.H., Polakis, S.E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J., Lane, M.D. 1974. Acetyl-CoA Carboxylase System of E. Coli: Purification and Properties of The Biotin Protein Carboxylase, Carboxytransferase and Carboxyl Carrier Protein Components. *J. Biol. Chem* 249: 6633-6645.
113. Demirbaş, A. 2003. Biodiesel Fuels from Vegetable Oils Via Catalytic and Non-Catalytic Supercritical Alcohol Transesterifications and Other Methods: A Survey, *Energy Conversion and Management*, 44 (13): 2093-2109.
114. Antolin, G., Tinaut, F.V., Briceno, Y., Castano, V., Perez, C., Ramirez, A.I. 2000. Optimisation of Biodiesel Production by Sunflower Oil Transesterification, *Bioresource Technology* 83: 111-114.
115. Şanlı, H. 2005. Farklı Alkol ve Katalizör Kullanımını. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Manisa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Manisa'da tamamladı. Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2010 yılında mezun oldu. Eylül 2010'da girdiği Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek-Lisans programını Haziran 2012'de tamamladı. 1 adet SCI indexli dergilerde, 2 adet ulusal hakemli dergilerde olmak üzere toplam üç yayını ve 4 adet ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildirisi vardır. 1 adet Giresun Üniversitesi BAP birimi destekli projesi ve 1 adet TÜBİTAK projesi bulunmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.