

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI POLARİTEDEKİ ÇÖZGENLERİN ALG (*Nannochloropsis* sp.) YAĞI  
EKSTRAKSİYONUNA ETKİLERİ**

**TUĞÇE AYGÜN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2017**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI POLARİTEDEKİ ÇÖZGENLERİN ALG (*Nannochloropsis* sp.) YAĞI  
EKSTRAKSİYONUNA ETKİLERİ**

**TUĞÇE AYGÜN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 23/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Osman Kadir TOPUZ (Danışman)

Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

Yrd.Doç.Dr İlknur UÇAK

## ÖZET

### FARKLI POLARİTEDEKİ ÇÖZGENLERİN ALG (*Nannochloropsis sp.*) YAĞI EKSTRAKSİYONUNA ETKİLERİ

TUĞÇE AYGÜN

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Osman Kadir TOPUZ

Mayıs 2017, 40 sayfa

Bu çalışmada *Nannochloropsis sp.* mikroalginden balık yağına alternatif optimum yağ verimine ve Omega-3 içeriğine sahip yağ üretim koşullarının belirlenmesi ve farklı çözümlerin ekstraksiyona etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda algal yağ üretiminde kullanılmak üzere f/2 besiyeri ve 50 lt x12 adet kapasiteli fotobioreaktör kullanılarak *Nannochloropsis sp.* mikroalginden biyokütle elde edilmiştir. Elde edilen biyokütle dondurularak kurutulduktan sonra ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemine göre yağ ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır. Yağ ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu Cevap Yüzey Metodu, Box ve Behnken deneme desenine göre yapılmıştır. Optimizasyon maksimum yağ verimi ve omega-3 yağ asitleri içeriği hedef alınarak yapılmıştır. *Nannochloropsis sp.* biyokütlesinden yağ ekstraksiyonunda optimum koşullar belirlendikten sonra bu koşullar altında n-hekzan, kloroform, metanol, etanol ve izopropil alkol olarak belirlenen farklı polaritedeki 5 çözümlerin yağ verimine ve Omega-3 yağ asitleri içeriğine etkileri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda *Nannochloropsis sp.* alginden yağ ekstraksiyonuna, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin istatistiksel olarak önemli etkisi olduğu ancak alg:çözgen oranı etkisinin önemsiz olduğu saptanmıştır. Ayrıca alg biyokütlesinden yağ ekstraksiyonunda optimum ekstraksiyon sıcaklığı: 44.30 °C, optimum ekstraksiyon süresi: 62.46 dakika ve optimum çözgen:alg oranı: 19.9:1 ml/g olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullar altında yağ verimi % 69.31 omega-3 yağ asitleri içeriği ise %32,03 olarak bulunmuştur.

Farklı polaritedeki çözümlerle yapılan ekstraksiyonlar sonucu en yüksek yağ verimi, polaritesi en yüksek çözgen olan metanol ile yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilmiştir. Yağ asitleri profiline bakıldığında elde edilen algal yağların doymuş yağ asitleri içeriğinde ( $\Sigma$ SFA), tekli doymamış yağ asitleri ( $\Sigma$ MUFA) içeriğinde ve çoklu doymamış yağ asitleri ( $\Sigma$ PUFA) içeriğinde istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) farklılıklar tespit edilmiştir. Omega-3 yağ asitlerinin de dahil olduğu grup olan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) en çok metanol ile hazırlanmış örnekte (%18,82) tespit edilmiştir. Kloroform ile hazırlanmış örnekler ise en düşük PUFA içeriğine sahip örnekler olarak belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Nannochloropsis sp.*, Algal yağ, Omega-3 yağ asitleri, Ultrasonik destekli ekstraksiyon, Apolar çözümler

**JÜRİ:** Yrd. Doç. Dr. Osman Kadir TOPUZ (Danışman)

Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

Yrd.Doç.Dr İlknur UÇAK

## ABSTRACT

### EFFECT OF DIFFERENT POLARITY SOLVENTS ON ALG (*Nannochloropsis* sp.) OIL EXTRACTION

TUĞÇE AYGÜN

MSc Thesis in Seafood Engineering  
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Osman Kadir TOPUZ  
May 2017, 40 pages

In this study it is aimed to investigate Omega-3 fatty acids rich algal oil production methods from microalga *Nannochloropsis sp.* The *Nannochloropsis sp.* algae were growth in f/2 medium with using photoreactor. Harvested microalgae biomass was dried in freeze dryer in order to remove its moisture. Dried algae biomass was milled and standardized with using sieve. Response surface methodology was used for omega-3 rich algal oil extraction from algal biomass in order to obtain optimum oil extraction conditions.

The extraction parameters which significantly affect to oil yield was extraction temperature and extraction time whereas the solvent:alga ration was insignificant factor affecting oil yield. Optimum conditions for extraction of omega-3 rich algal oil from algal biomass were as follow: extraction temperature, 44.30 °C; extraction time, 62.46 min.; solvent:alga ration, 19.9:1. The oil yield and omega-3 content obtained under the these optimum conditions were % 69.31 and %32.03, respectively.

Extraction with different polarity solvents resulted in the highest oil yield, the extreme result of methanol with the highest polarity solvent. When the fatty acid profile was examined, it was found that the algal oils obtained were statistically significant ( $P < 0.05$ ) in the contents of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), the group that includes omega-3 fatty acids, were detected the highest in the methanol-treated sample (20,57 %). The samples prepared with chloroform were identified as the samples with the lowest PUFA content (11,30).

**KEYWORDS:** *Nannochloropsis sp.*, Algal oil, Omega-3 Fatty acids, Ultrasonic assisted extraction, Apolar solvents

**COMMITTEE:** Assist. Prof. Dr. Osman Kadir TOPUZ (Supervisor)  
Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU  
Assist. Prof. Dr. İlknur UÇAK

## ÖNSÖZ

Sağlık açısından pek çok faydası bulunan omega-3 yağ asitlerine karşı artan bir ilgi bulunmaktadır. Bu artan ilgi ve toplum bilinci karşısında balık stokları sabit kalmakta ve tüketici ihtiyacını karşılamak için ikame edici bir kaynak ihtiyacı doğmaktadır. Gerek besin içeriği gerekse üretim kolaylığı düşünüldüğünde Mikroalgal yağlar alternatif bir bitkisel kaynak olarak dikkat çekmektedir. Türlerine göre % 60'lara varan yağ içeriği, balıgımsı koku bulunmaması ve bitkisel bir kaynak olması sayesinde vejetaryen bireyler tarafından da kullanılabilmesi gibi avantajları sayesinde mikroalglerden yağ eldesi üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada bir mikroalg türü olan *Nannochloropsis* sp. türü ile çalışılmış, birinci aşamada mikroalgden yağ ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş, ikinci aşamada, elde edilen optimum koşullar altında farklı polaritelere sahip organik çözümler ile ultrasonik destekli ekstraksiyon yapılmıştır. Çözümlerin algal yağ verimine ve yağ asitleri profiline etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışmasının yapılacak benzeri akademik çalışmalara ışık tutmasını ve topluma faydalı olmasını temenni ederim.

Bu tez çalışmasının karar aşamasından savunma aşamasına kadar desteğini ve anlayışını bende esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Osman Kadir TOPUZ'a, Tez İzleme Komitesi üyelerine, Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyelerine, Su Ürünleri Mühendisi Adem KAYA'ya, Su Ürünleri Mühendisi Alican ALP'e, Gıda Yüksek Mühendisi Hanife Aydan YATMAZ'a Su Ürünleri Mühendisi Berru ETLİ'ye, Su Ürünleri Yüksek Mühendisi Fahrettin Gökhan TOKAY'a, Su Ürünleri Yüksek Mühendisi Eda Özer ANDIZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Benim bu günlere gelmemde maddi manevi en büyük destekçilerimden sevgili annem Hacer SAK'a ve akademik bilgisi ve yardımlarıyla yanımda olan sevgili eşim öğretim görevlisi Ahmet AYGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En başta da sevgisini her daim yüreğimde taşıdığım, bana ihtiyaç duyduğu zamandan usluca feragat etmesiyle beni destekleyen canım oğlum Ömer Bera'ma sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	2
2.1. Alg Tanımı.....	2
2.2. Mikroalglerin Bileşimi.....	2
2.3. Alglerin Kullanım Alanları.....	3
2.4. Ekstraksiyon Teknolojisi ve Algal Yağ Ekstraksiyonu.....	4
2.4.1. Sıcaklığın ekstraksiyon üzerine etkileri.....	5
2.4.2. Ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon üzerine etkileri.....	5
2.4.3. Alg/çözgen oranının ekstraksiyon üzerine etkileri.....	5
2.4.4. Çözgen tipinin ekstraksiyon üzerine etkileri.....	5
3. MATERYAL VE METOD.....	7
3.1. Materyal.....	7
3.2. Metot.....	7
3.2.1. Mikroalg üretimi.....	7
3.2.2. Mikroalg hasatı ve biyokütlenin kurutulması.....	8
3.2.3. Mikroalg biyokütlesinden yağ ekstraksiyonunun optimizasyonu.....	8
3.2.4. Biyokütlenin dondurarak kurutulması.....	10
3.2.5. Ultrasonik destekli algal yağ ekstraksiyonu.....	10
3.3. Analizler.....	14
3.3.1. Kimyasal kompozisyon analizleri.....	14
3.3.1.1. Toplam kurumadde tayini.....	14
3.3.1.2. Mineral madde (kül) tayini.....	14
3.3.1.3. Protein tayini.....	14
3.3.1.4. Toplam yağ tayini.....	15
3.3.2. Yağ oksidasyon analizleri.....	15
3.3.2.1. Peroksit analizi (PV).....	16
3.3.2.2. Para-anisidin analizi (p-Av).....	16
3.3.2.3. Uv spektrum analizi.....	16
3.3.3. Serbest yağ asitliği analizi.....	17
3.3.4. Yağ asitleri kompozisyonu analizi.....	17
3.3.5. İstatiksel analizler.....	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	18
4.1. <i>Nanochloropsis</i> sp. Mikroalginin Kimyasal Kompozisyonu.....	18
4.2. <i>Nannochloropsis</i> sp. Mikroalginden Yağ Ekstraksiyonlarına Ait Bulgular.....	18
4.2.1. Ekstraksiyon parametrelerinin yağ ekstraksiyonuna etkileri.....	20
4.2.2. Ekstraksiyon parametrelerinin algal yağın omega-3 yağ asitleri içeriğine etkileri.....	22
4.3. <i>Nannochloropsis</i> sp. Mikroalginden Yağ Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	24

4.4. Farklı Polaritedeki Solventlerin Algal Yağ Verimine Etkisi .....	26
4.5. Mikroalgal Yağın Peroksit (PV) Değerine Ait Bulgular .....	28
4.6. Mikroalgal Yağın Para-Anisidin (p-Av) Değerine Ait Bulgular .....	29
4.7. Farklı Polaritedeki Solventlerin UV Spektrum Değerine Etkileri .....	30
4.8. Mikroalgal Yağın Serbest Yağ Asitliği Değerine Ait Bulgular .....	30
4.9. Farklı Polaritedeki Çözgenlerin Algal Yağın Yağ Asitleri Kompozisyonuna Etkisi .....	31
5. SONUÇ .....	34
6. KAYNAKLAR .....	36
ÖZGEÇMİŞ	



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

A1	Para-anisidin eklenmeden önce 350 nm'deki absorbans
A2	Para-anisidin eklendikten sonra 350 nm'deki absorbans
B	kör için harcanan sodyum tiyosülfat miktarı
Ca	Kalsiyum
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DHA	Dokosahekzaenoik asit
Dk	Dakika
EPA	Eikosapentaenoik asit
Es	Ekstraksiyonda elde edilen yağ
f/2	Guillard'ın zenginleştirilmiş deniz suyu çözeltisi
Fe	Demir
G	Gram
H	Saat
K	Potasyum
kg	Kilogram
kHz	Kiloherz
KOH	Potasyumhidroksit
lt	Litre
M	Molar
mEq	Miliekivalan
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
N	Azot
Na	Sodyum
Nf	Sodyum Tiyosülfatın normalitesi
nm	Nanometre
P	Fosfor
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per Minute)
Ty	Alg biyokütlesinde bulunan toplam yağ
V	Harcanan Sodyum Tiyosülfat miktarı
v/v	Hacim/hacim
w	Örnek Ağırlığı
w/v	Ağırlık/hacim
YV	Yağ verimi
Zn	Çinko



## **Kısaltmalar**

UAE	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (Ultrasonic Assisted Extraction)
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
SAS	İstatiksel Analiz Sistemi (Statistical Analysis System)
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (Poly Unsaturated Fatty Acid)
MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asitleri (Mono Unsaturated Fatty Acid)
SFA	Doymuş Yağ Asitleri (Saturated Fatty Acid)
NCMA	Amerikan Ulusal Alg ve Mikrobiota Merkezi
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Işık (Ultraviolet-visible)
GC	Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)
PV	Peroksit Değeri (Peroxide Value)
p-Av	Para Anisidin Değeri (Para Anisidine Value)
H	Hekzan
K	Kloroform
M	Metanol
E	Etanol
P	İzopropil Alkol (2-propanol)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>Nannochloropsis</i> sp. üretiminde kullanılan laboratuvar tipi fotobiyoreaktör ...	8
Şekil 3.2. (a) Ekstraksiyon öncesi çözen+alg karışımı. (b) Ultrasonik destekli ekstraksiyon .....	10
Şekil 3.3. (a) kaba filtre kağıdı ile filtrasyon. (b) evaporasyon öncesi çözen+alg al yağ.....	11
Şekil 3.4. Çözen türüne göre farklı renklerde elde edilen metillendirilmiş alg yağ... 12	12
Şekil 3.5. Alg yağın optimum yağ ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi ve farklı polaritedeki çözenlerle ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen alg yağa ait iş akış şeması. ....	13
Şekil 4.1. Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve çözen:alg oranının yağ ekstraksiyon verimine etkisi .....	22
Şekil 4.2. Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve çözen:alg oranının alg yağın omega-3 yağ asitleri içeriğine etkisi .....	23
Şekil 4.3. Farklı polaritedeki çözenlerin alg yağ verimine etkisi (%) .....	27
Şekil 4.4. Farklı polaritedeki çözenlerin alg yağın omega-3 yağ asitleri içeriğine etkileri .....	28
Şekil 4.5. Çözenlere göre yağ asitleri kompozisyonu .....	31

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ekstraksiyonda kullanılan çözümlere ait bazı kimyasal özellikler .....	6
Çizelge 3.1. <i>Nannochloropsis</i> sp. mikroalginin üretiminde kullanılan f/2 besiyeri .....	7
Çizelge 3.2. <i>Nannochloropsis</i> sp. alginden yağ ekstraksiyon koşullarının optimizasyonuna ait Cevap Yüzey Metodu Box-Behnken deneme deseni .	9
Çizelge 4.1. <i>Nannochloropsis</i> sp. mikroalginin kimyasal kompozisyonu .....	17
Çizelge 4.2. <i>Nannochloropsis</i> sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonlarına ait yağ verimi ve omega-3 yağ asitleri içeriği değerleri.....	19
Çizelge 4.3. <i>Nannochloropsis</i> sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonlarına ait yağ verimi ve omega-3 yağ asitleri içeriği değerlerinin regresyon katsayıları..	19
Çizelge 4.4. Maksimum yağ verimi hedef alınarak ekstrakte edilen yağın ekstraksiyon verim değerleri .....	25
Çizelge 4.5. Maksimum omega-3 yağ asitleri içeriği hedef alınarak ekstrakte edilen yağın omega-3 yağ asitleri değerleri .....	25
Çizelge 4.6. Maksimum yağ verimi ve maksimum omega-3 yağ asitleri içeriği hedef alınarak ekstrakte edilen yağın omega-3 yağ asitleri değerleri .....	26
Çizelge 4.7. Algal yağın PV değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları .....	28
Çizelge 4.8. Algal yağın p-Av değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları .....	29
Çizelge 4.9. Algal yağın UV Spektrum değerlerine ait duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları .....	30
Çizelge 4.10. Algal yağın serbest yağ asitliği değerlerine ait duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları .....	30
Çizelge 4.11. Farklı polariteye sahip çözümlerin algal yağın yağ asitleri profiline etkisi .....	33

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda insan nüfusundaki artışa paralel olarak doğal kaynaklara ve diğer gıda maddelerine olan ihtiyaç da aynı hızda artmaktadır. Sağlık açısından oldukça önemli olan omega-3 yağ asitlerinin kaynağı olan balık yağına olan ihtiyaç da nüfus artışına paralel olarak giderek artmakla birlikte omega-3 yağ asitlerinin kaynağı olan dünya balık stokları sabit kalmaktadır. Buna bağlı olarak, balıktan elde edilen yüksek omega-3 içerikli yağı ikame edici kaynak ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

Denizlerin önemli fotosentetik canlıları olarak bilinen algler protein, yağ ve mineral madde gibi önemli besin maddelerini bol miktarda içermektedirler. Kimi algler protein, mineral madde ve klorofil açısından zengin olmakla birlikte *Nannochloropsis sp.* gibi bazı alglerin yağ içeriği yüksektir. *Nannochloropsis* alginden elde edilen yağın, içeriğinde bulunan omega-3 yağ asitleri (özellikle EPA) sayesinde balıktan elde edilen yağ yerine kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bunun yanında alglerden elde edilen yağın bitkisel kaynaklı olması da balık yağı tüketemeyen vejetaryenler ve balık kokusuna hassas bireyler için bu yağı değerli kılmaktadır.

Alglerden yağ üretiminde en önemli işlem ekstraksiyondur. Ekstraksiyon işleminin verimine ve ürün kalitesi üzerine, ekstraksiyonda uygulanacak yöntem, kullanılacak çözügen tipi, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve alg biyokütlesi/çözügen oranı gibi parametreler etki etmektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında genel olarak mikroalglerden yağ elde etme parametrelerinin optimize edilmesi ve farklı çözügenler kullanılmasıyla ilgili çalışmalar olsa da, hem ekstraksiyon parametrelerinin optimize edilmesi hem de farklı polaritedeki çözügenler kullanılarak ultrasonik destekli ekstraksiyon yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında temin edilen mikroalg biyokütlesinin laboratuvar koşullarında çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu amaçla f/2 besiyeri hazırlanmış, tuzluluk oranı %2,5'a ayarlanıp 24°C'de alg stok kültürü çoğaltılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, alglerden yağ ekstraksiyonunda ekstraksiyon verimine ve omega-3 yağ asitleri içeriğine önemli etkisi olan ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve alg biyokütlesi/çözügen oranı gibi parametreler test edilerek optimum algal yağ ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Son olarak da belirlenen optimum koşullar altında, ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile farklı polaritedeki çözügenlerin (hekzan, kloroform, metanol, etanol ve isopropil alkol) algal yağ verimine ve omega-3 yağ asitleri içeriğine etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Alg Tanımı

Algler güneş ışığını, suyu, azot, fosfor ve potasyum (N, P, K) gibi mikro elementler ile CO<sub>2</sub>'i kullanarak biyokütleye dönüştüren eşsiz fotosentetik mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Pragya vd., 2013). Alglerin tek hücreli, fotosentetik ve boyutları 1-100 µm arasında değişen grupları mikroalg olarak adlandırılmaktadır. Makroalglerden farklı olarak çok hücreli organizmaları oluşturmazlar ve daha basit yapıdadırlar (Saber vd., 2016). Mikroalgler diğer karasal bitkiler gibi gelişebilmeleri için su, güneş ışığı, CO<sub>2</sub>, azot ve fosfor içeren kültür ortamına ihtiyaç duyar.

Mikroalgler karasal bitkilerinden farklı olarak;

- Güneş ışığını daha verimli kullanabilmeleri,
- Daha hızlı gelişebilmeleri,
- Gelişimlerinin hava şartlarından bağımsız olması,
- Karasal bitkilere göre daha az suya ihtiyaç duymaları ve
- Herbisit, pestisit gibi tarım ilaçlarına gerek duymamaları gibi avantajlara sahiptir (Şahin ve Akyurt 2010).

Mikroalgler üzerine yapılan araştırmalar, özellikle siyanobakterilerle 1980'lerde başlamıştır ve son yıllarda mikroalgler kapsamlı araştırmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunun nedeni, denemeler için gerekli olan algal biyokütle, laboratuvar ölçeğinde kolaylıkla kültüre edilebilmesidir. Az miktardaki biyokütleden çok miktarda ekstrakt ve bileşik elde edilebilmektedir (Bulut 2009).

### 2.2. Mikroalglerin Bileşimi

Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında pek çok araştırmacı mikroalglerin yağ içeriğine dikkat çekmiş, yağ eldesinde mikroalgleri karasal bitkilere alternatif kaynak olarak göstermiştir. Mikroalglerin yağ içeriği türlere göre değişmekle birlikte % 35-40'lara ulaşmaktadır (Islam vd. 2013). Yağ içeriği yüksek mikroalg türleri;

- *Nannochloropsis* sp.,
- *Pavlova lutheri*
- *Chlorella vulgaris*,
- *Phaeodactylum tricornutum*,
- *Tetraselmis suecica* 'dır.

Mikroalgal yağın önemi vücudun üretmediği ve mutlaka besinler yoluyla alınması gereken esansiyel yağ asitlerince (linoleik, linolenik ve araşidonik asit) zengin olmasından kaynaklanmaktadır. Omega-3 formunda olan linolenik asit kolaylıkla eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asite (DHA) dönüşebilmektedir. Omega-3 yağ asitlerinden EPA ve DHA'nın birincil üreticileri olan alglerden elde edilen yağlara karşı artan bir ilgi gözlenmektedir (Ryckebosch vd., 2014). Omega-3 yağ asiti üreten mikroalgler; *Chaetoceros*, *Phaeodactylum*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Cryptomonas*, *Rhodomonas*, *Isochrysis*, *Pavlova porphyridium*, *Nannochloropsis* algleri olduğu bildirilmiştir (Ryckebosch vd., 2014; Ryckebosch vd., 2012). *Nannochloropsis* sp. mikroalgleri omega-3 yağ asitleri bakımından zengin olmakla birlikte, yaklaşık % 37,6 (ağırlıkça) karbonhidrat, % 28,8 protein, % 18,4 toplam yağ % 3 mikroelement (Na, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, vd.) de

içerdiği belirtilmiştir (Reboloso-Fuentes vd. 2001). Ryckebosch vd. (2014)'ün yaptığı bir çalışmada *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Pavlova* ve *Thalassiosira* alglerinden elde edilen algal yağların balık yağına alternatif olabilecek miktarda Omega-3 yağ asitlerini içerdiği saptanmıştır. Ancak balık yağında bol bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA), besinsel kayıplar ve yağ acılığından sorumlu oksidasyon reaksiyonlarına son derece hassas olduğu ve balık yağının ekstrakte edilmesi ve depolanması sırasında okside olarak istenmeyen renk, koku, aroma ve tat oluşumlarına neden olduğu ortaya konulmuştur (Rehman ve Salariya, 2006). Algal yağın balık yağına göre bir diğer avantajı ise balıgımsı koku içermemesi, bitkisel kaynaklı olması ve yapılarında bulunan antioksidan maddelerden dolayı oksidasyona daha dayanıklı olmasıdır (Ryan ve Symington, 2015).

### 2.3. Alglerin Kullanım Alanları

Mikroalglerin, protein, yağ, PUFA, karotenoid, değerli pigment ve vitaminlerin iyi bir kaynağı olduğu ve bu besinsel özelliklerinden dolayı gıda sanayinde, hayvan beslemede, balıkçılıkta, kozmetik alanında, eczacılıkta, biodizel endüstrisinde ve tarım sektöründe yaygın şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (Gong vd. 2014). Alglerin, organik atıklardan olan azot, fosfor ve potasyum gibi bileşikleri ve CO<sub>2</sub>'i kullanarak çoğalmalarından dolayı atık suların arıtılmasında ve baca gazlarından çıkan atık CO<sub>2</sub>'nin giderilmesinde de kullanıldığı belirtilmiştir (Singh ve Gu, 2010).

Dünyada mevcut alg üretiminin önemli bir kısmı hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Mikroalgler, çeşitli evcil hayvan ve kültür balıklarının beslenmesinde yem içine eklenebilmektedir. Özellikle yüksek protein içeriği ve besleyici değeri ile *Arthrospira* türleri yem takviyesi olarak kullanılmaktadır (Spolaore vd. 2006).

Ayrıca yaşlanma karşıtı, hücre yenileyici, yumuşatıcı, güneş koruyucu ve cilt gerdirici gibi özellikleri sayesinde kozmetik sanayiinde de *Arthrospira*, *Chlorella vulgaris* ve *Nannochloropsis oculata* mikroalgleri kullanılmaktadır (Bulut 2009).

Gıda sanayinde Klorofil (*Chlorella*), B-karoten (*Spirulina*, *Dunaliella*), zeaksantin (*Dunaliella salina*), antaksantin (*Haematococcus pluvialis*) gibi doğal renk pigmentlerini bol miktarda içermelerinden dolayı doğal renklendirici olarak, yüksek polisakkarit içerikleri sayesinde kırmızı alglerin (*Gelidium*, *Chondrus crispus*) hücre duvarından elde edilen agar ve karragenan ayrıca kahverengi alglerden (*Laminaria*) elde edilen aljinat kıvam artırıcı olarak reçel sanayiinden; dondurma sanayiine kadar çok geniş çapta kullanılmaktadır. Protein (% 60-70) ve vitamin içeriğinin (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, biotin, folik asit ve pantotenik asit) yüksek olmasından dolayı *Spirulina maxima* türünden kapsül, tablet ve sıvı formlarda gıda takviyesi üretilmektedir. Ayrıca, B-1,3 glukoz içeriği yüksek *Chlorella* türleri bağışıklık sistemini uyarıcı etkisi sayesinde takviye olarak gıda sanayiinde kullanılmaktadır (Akar ve Cebe 2010).

Kalp hastalıklarından depresyona kadar sağlığa faydalı pek çok özelliğinden dolayı balık yağı kapsüllerine son yıllarda giderek artan bir ilgi gözlenmektedir. Balık yağı kapsülleri PUFA ana bileşeni olan ve aynı zamanda omega-3 yağ asitleri olarak adlandırılan eicosa pentaenoic acid (EPA) ve docosahexaenoic acid (DHA) gibi, memelilerin büyümeleri, gelişmeleri ve yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri açısından önemli olan yağ asitlerini içermektedir (Singh ve Gu 2010). *Nannochloropsis* sp. ve *Tetraselmis* sp. gibi mikroalgler çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA), özellikle de omega-3 yağ asitlerini yüksek miktarda içermelerinden dolayı balık yağına alternatif gıda takviyesi olarak algal yağ üretiminde kullanılmaktadır (Ryckebosch vd. 2014).

#### 2.4. Ekstraksiyon Teknolojisi ve Algal Yağ Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon, katı veya sıvı herhangi bir maddenin bileşiminde bulunan unsurun veya unsurlardan bir kısmının uygun bir çözücü yardımı ile absorbe edilerek ayrılması esasına dayanır. Katı-sıvı ekstraksiyonu, çok bileşenli bir katı maddenin bileşenlerinden birinin veya bir kısmının (bir çözücü ile) çözülerek ayrılmasıdır. Katı içinde bulunan maddelerden biri, bu maddeyi çözebilen bir çözücü yardımıyla alınmakta, çözücü ve ayrılan maddeden oluşan sıvı karışım, katı maddeden ayrıldıktan sonra çözücünün herhangi bir yoldan uzaklaştırılması ile de geride sadece ayrılan madde kalmaktadır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda, katı faza ekstrakte edilen, çözücüye ekstrakte eden; elde edilen sıvı karışıma ise ekstrakt adı verilmektedir (M.E.B 2011).

Alglerde bulunan değerli besinsel maddelerin elde edilmesinde fiziksel ve kimyasal pek çok ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Yağ ekstraksiyonunda seçilecek yöntem hızlı, kolay uygulanabilir, verimli ve ekstrakte edilecek yağın yapısına zarar vermeyecek özellikte olmalıdır. Yapılan çalışmalar, yağlı tohumlardan elde edilenin aksine alglerdeki kalın hücre duvarının yağ salınımını kısıtladığını bu nedenle mekanik bir işlem uygulamanın algal yağ eldesinde daha etkili olduğunu göstermiştir (Suganya ve Renganathan 2012). Son yıllarda geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin çok zaman almasından ve elde edilecek üründe kimyasal değişikliklere neden olması gibi dezavantajlarından dolayı, ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon, süper kritik akışkan ekstraksiyonu, hızlandırılmış çözgen ekstraksiyonu gibi yeni ekstraksiyon yöntemleri popülerlik kazanmaktadır (Menéndez vd. 2014; Topuz vd. 2015; Wang ve Weller 2006). Ultrasonik destekli ekstraksiyon ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu, olarak da adlandırılır. Hem mekanik hem de termal etkisinden dolayı oldukça etkilidir ve hücre duvarının kolaylıkla parçalanması sağlamaktadır (Grimi vd. 2014). Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar (Grosso vd. 2015). Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar (Capelo ve Mota 2005). UAE yöntemi, çevreye herhangi bir zararlı etkisi olmaması, ekstraksiyon süresini kısaltarak ekstraksiyon verimini artırması ve elde edilecek ekstraktların doğal yapısına zarar vermemesi gibi özelliklerinden dolayı çok çeşitli biyomoleküllerin ekstraksiyonunda tercih edilmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılan ultrason uygulamalarında düşük yoğunluklu yüksek frekanslı ( $f > 100$  kHz) ve yüksek yoğunluklu düşük frekanslı ( $20 \text{ kHz} \leq f \leq 100 \text{ kHz}$ ) ultrason kullanılmakla beraber genel olarak gıda maddesinin fiziksel ve kimyasal özelliğini değiştirmeyen yüksek yoğunluklu düşük frekanslı ultrason kullanılmaktadır (Plaza vd. 2012).

Ekstraksiyon işleminin verimine ve ekstraktların kalitesine etki eden faktörler üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (Ma vd. 2008, Maran vd. 2017). Bu faktörler başlıca;

- Ekstraksiyon sıcaklığı
- Ekstraksiyon süresi
- Çözgen tipi ve
- Biyokütle/çözgen oranı şeklinde sınıflandırılmıştır.

#### 2.4.1. Sıcaklığın ekstraksiyon üzerine etkileri

Ekstraksiyonda sıcaklığın; çözünürlük, katıların yayılma gücü, viskozite ve sıvıların yüzey gerilimi gibi önemli olaylar üzerine etkisi vardır. Çoğu durumda, sıcaklıktaki artış, çözücünün çözme kapasitesini ve moleküllerin yayılma gücünü artırır. Bu da genellikle ekstraksiyon veriminin artmasıyla sonuçlanmaktadır (Büyüktuncel 2012). Yapılan bir çalışmada sıcaklığın alg yağı ekstraksiyonuna etkisi incelenmiş ve sıcaklık artışı ile yağ veriminin belli bir noktaya kadar arttığı görülmüştür. Sıcaklığın 35°C'den 55°C'ye çıkarılmasıyla yağ verimi %7'den %9.75'e yükseldiği belirtilmiştir (Suganya ve Renganathan 2012).

#### 2.4.2. Ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon üzerine etkileri

Ekstraksiyon işleminin süresi ekstraksiyon yöntemi, kullanılan materyalin partikül büyüklüğü ve materyalin nem içeriği gibi faktörlere bağlı olarak 2 dk - 8 saat arasında değişmektedir. Yapılan çalışmalarda ekstraksiyon süresinin artmasıyla ekstraksiyon verimi belli bir noktaya kadar artıp sonra sabit kaldığı bildirilmiştir (Suganya ve Renganathan 2012).

#### 2.4.3. Alg/çözgen oranının ekstraksiyon üzerine etkileri

Belirli miktardaki bir katının ekstraksiyonunda çözücü miktarını arttırmak yani katı/sıvı oranını azaltmak, ekstraksiyon verimini arttırmakta ve çözünebilir tüm maddelerin çözeltiye geçmesini sağlamaktadır. Ancak ekstraksiyon sonucu elde edilen çok seyreltik çözeltinin evaporasyonla konsantre edilmesi sırasında çok fazla enerji harcanması bir dezavantaj oluşturmaktadır. Mikroalglerden yağ ekstraksiyonu üzerine yapılan bir çalışmada ekstraksiyon verimine çözgen/alg oranının 10/1'e kadar etkisiz olduğu, 10/1' den fazla olmasının ise verimi azalttığı bildirilmiştir (Wang vd. 2016).

#### 2.4.4. Çözgen tipinin ekstraksiyon üzerindeki etkileri

Yağ ve yağda çözünen maddelerin ekstraksiyonunda genel olarak eter (Rios vd. 2013), etanol (Wang ve Wang 2012), izopropil alkol (Yao vd. 2012), kloroform, aseton ve metil alkol (Pragya vd. 2013) gibi farklı özellikte organik çözümler kullanıldığı görülmektedir. Seçilen çözgen ekstrakte edilen katıdan ve ekstrakte edilen çözücünden (çözünen+çözücü) kolayca ayrılabilir, kolay bulunabilir, düşük kaynama noktasına sahip olmalı ve ekonomik olmalıdır. Ayrıca seçilen çözgen materyalin özelliğine uygun çözme gücünde olmalıdır. Çözücünün çözme gücü ve çözücünün materyale difüze olabilme gücü ile çözücünün sahip olduğu polarite, çözücünün tabiatı hakkında bilgi verir. Bazı lipitlerin hem hidrofilik hem de hidrofobik grupları vardır ve yağların fraksiyone edilmeleri sırasında, özellikle polaritesi hiç olmayan çözümler sadece trigliseritleri çözerken, polaritesi yüksek olan çözümler ise kısmen polar özellik gösteren lipitleri çözer (Karaman 2017). Seçilen çözgenin çeşitli kimyasal özellikleri ve polaritesi antioksidant kapasitesini doğrudan etkiler ve bu da ekstraktları çözünür ya da çözünemez hale getirir (Metrouh-Amira vd. 2015). Çizelge 2.1.'de tez çalışmasında kullanılan çözümlerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir (Reichardt ve Welton 2010). Bitki türüne bağlı olarak mevcut biyoaktif yapı değişiklik gösterdiği için tek tek her tür için uygun çözücü seçilmesi mümkün olmamaktadır (Drira vd. 2016).



Çizelge 2.1. Ekstraksiyonda kullanılan çözüenlere ait bazı kimyasal özellikleri

Çözgen Adı	Polarite İndeksi	Dipol Moment	Dielektrik Sabiti	Kaynama Noktası	Vizkozite (40°C)
Hekzan	0,1	0	1,9	68,9	0,26
Kloroform	4,1	1,1	4,8	61,7	0,47
Metanol	5,1	1,70	32,6	65	1,70
Etanol	4,6	1,70	24,3	78,5	0,83
İzopropanol	3,9	1,66	18,3	82,4	1,35

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Projede kullanılan *Nannochloropsis* sp. CCMP 525 mikroalgi NCMA-Amerikan Ulusal Alg ve Mikrobiota Merkezi'nden (Bigelow, Maine, ABD) tedarik edilmiştir. *Nannochloropsis* sp. mikroalgini üretmek için f/2 (Guillard, 1975) besiyeri kullanılmıştır. Projede kullanılan f/2 besiyerini oluşturmak için gerekli kimyasallar Çizelge 3.1.'de belirtilmiştir.

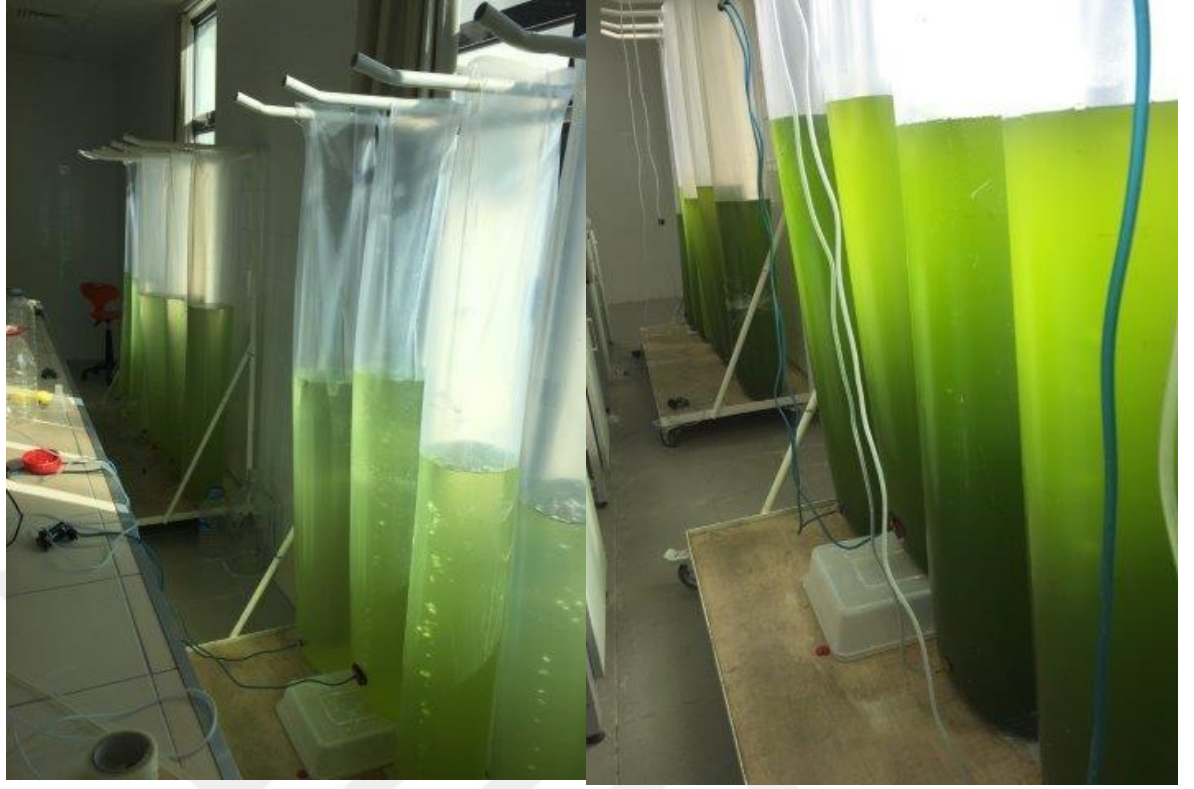
Çizelge 3.1. *Nannochloropsis* sp. mikroalginin üretiminde kullanılan f/2 besiyeri

Kimyasal	mg/lt	Kimyasal	mg/lt
NaNO <sub>3</sub>	75	CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,01
NaH <sub>2</sub> -PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5	CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9 H <sub>2</sub> O	30	FeCl <sub>3</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	3,15
Na <sub>2</sub> EDTA	4,36	MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0,18
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,006	ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,022
Thiamine HCl	0,1	Biotin	0,0005
B <sub>12</sub> vitamini	00005		

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Mikroalg üretimi

*Nannochloropsis* sp. alginin üretimi Çizelge 3.1.'de belirtilen kimyasalları içeren f/2 besiyeri kullanılarak her biri 50 lt kapasiteli 12 adet fotobioreaktör içerisinde, oda sıcaklığında (24±1 °C) gün ışığı altında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Şebeke suyunun ultrafiltrasyonu sonucu elde edilen saf su fotobioreaktör kolonlarına doldurulduktan sonra alg üretiminde kullanılan suyun tuzluluğu % 2,5'a ayarlanmıştır. Mikroalg ortam suyu ultraviyole filtreden (Jebo UV 700lt/h) geçirilerek steril edilmiştir. Kültür ortamı hava akış hızı 250 ml/dakika olan havalandırıcı (Eheim 3701, Almanya) yardımı ile sürekli olarak havalandırılmıştır.



Şekil 3.1. *Nannochloropsis* sp. üretiminde kullanılan laboratuvar tipi fotobiyoreaktör

### 3.2.2. Mikroalg hasatı ve mikroalg biyokütlesinin kurutulması

*Nannochloropsis* sp. mikroalginin üretimi süresince yetiştirme ortamından (Şekil 1) her 3 günde bir örnek alınıp hemositometre (Model Z359629, Sigma-aldrich) yardımı ile optik mikroskobu altında alg hücresi sayısı yapılmıştır. Hücre sayısı  $10^6$  *Nannochloropsis* sp./ml'ye erişince (yaklaşık 20-22 gün) mikroalg üretimi sonlandırıldı.  $FeCl_3$  eklenerek çöktürülen algler hasat edilmiştir. Hasat edilen mikroalgler 4000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj (Hettich Universal 320) edilerek konsantr mikroalg biyokütlesi elde edilmiştir. Elde edilen mikroalg biyokütlesi dondurarak kurutucuda (Telstar ,Lyoquest -55, İspanya)  $-50$  °C sıcaklık altında su aktivite değeri  $a_w$ : 0.35'in altına ininceye kadar kurutulmuştur. Kurutulmuş mikroalg biyokütlesinin su aktivite değeri su aktivitesi ölçüm cihazı (Aqualab 4T) yardımı ile belirlenmiştir. Kurutulmuş biyokütle laboratuvar tipi homojenizatör (Waring 8011 HB) yardımı ile öğütülmüştür. Öğütülmüş kuru alg biyokütlesi delik çapı 1 mm olan elek yardımı ile standardize edildikten sonra ekstraksiyon işlemine kadar  $-80$  °C derecede ultra derin dondurucu (Dairei Europe, ULTF -80) içerisinde muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Mikroalg biyokütlesinden yağ ekstraksiyonunun optimizasyonu

Çalışmada optimum ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi için cevap yüzey metodu Box-Benken deneme deseni kullanılmıştır. Optimizasyon yağ verimi ve omega-3 yağ asitleri içeriği hedef alınarak yapılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda *Nannochloropsis* sp. biyokütlesinden yağ ekstraksiyonunda optimum koşullar

belirlendikten sonra dondurarak kurutulmuş alg biyokütlesi bu koşullar altında 5 farklı çözücü ile ekstrakte edilmiş ve yağ verimi hesaplanmıştır.

Kurutulmuş alg biyokütlesinden ultrasonik destekli yağ ekstraksiyonu Cevap Yüzey Metodu Box Behnken deneme deseninde (Çizelge 3.2.) belirtilen ekstraksiyon şartlarında gerçekleştirilmiştir (Box ve Behnken, 1960). Ön denemeler ve literatür çalışması sonucu yağ ekstraksiyonunda alg/çözgen oranı (1/10, 1/20 ve 1/30 g/ml), ekstraksiyon sıcaklığı (25, 45 ve 65 °C) ve ekstraksiyon süresi (30, 60 ve 90 dakika) kritik ekstraksiyon parametreleri olarak deneme desenine göre sıralanmıştır. Kurutulmuş alg biyokütlesinden ultrasonik destekli yağ ekstraksiyonu Cevap Yüzey Metodu, Box Behnken deneme desenine göre Çizelge 3.2.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. *Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyon koşullarının optimizasyonuna ait Cevap Yüzey Metodu Box-Behnken deneme deseni

Deneme (A)	Max-Min nok.			X <sub>1</sub> (g:ml)	X <sub>2</sub> (°C)	X <sub>3</sub> (Dk.)
A <sub>1</sub>	-1	-1	+1	1:10	25	60
A <sub>2</sub>	0	-1	-1	1:20	25	30
A <sub>3</sub>	+1	-1	0	1:30	25	60
A <sub>4</sub>	0	-1	+1	1:20	25	90
A <sub>5</sub>	+1	0	+1	1:30	45	90
A <sub>6</sub>	+1	0	-1	1:30	45	30
A <sub>7</sub>	0	0	0	1:20	45	60
A <sub>8</sub>	0	0	0	1:20	45	60
A <sub>9</sub>	-1	0	-1	1:10	45	30
A <sub>10</sub>	0	0	0	1:20	45	60
A <sub>11</sub>	-1	0	+1	1:10	45	90
A <sub>12</sub>	0	+1	-1	1:20	65	30
A <sub>13</sub>	0	+1	+1	1:20	65	90
A <sub>14</sub>	+1	+1	0	1:30	65	60
A <sub>15</sub>	-1	+1	0	1:10	65	60

X<sub>1</sub>: alg/çözgen oranı, X<sub>2</sub>: ekstraksiyon sıcaklığı °C, X<sub>3</sub>: ekstraksiyon süresi (dakika)

Deneme deseninde belirtilen koşullarda yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen yağların yağ asidi kompozisyonu ve yağ verimi belirlenerek istatistik programı (Design expert 9.1) yardımı ile optimum yağ ekstraksiyon koşulları (sıcaklık, süre ve biyokütle/çözgen oranı) belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda yeniden 3 tekerrürlü ekstraksiyonlar yapılarak bilgisayar program yardımı ile elde edilen tahmini değerler ile gerçek (deneysel) değerler karşılaştırılarak tahmini değerlerin uygunluğu saptanmıştır.

### 3.2.4. Biyokütlenin kurutulması

Çalışmanın ikinci kısmında hasat edildikten sonra konsantre edilmiş alg biyokütlesi dondurarak kurutucuda  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de su aktivite değeri  $a_w:0.35$ 'e kadar kurutulmuş, laboratuvar tipi parçalayıcıda öğütüldükten sonra 1 mm çapında elekten geçirilerek standardize edilmiştir. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) ısı işleme hassas gıdaların biyolojik aktivitelerinin yanında besinsel ve duyuşal özelliklerini de en etkin şekilde koruyan kurutma işlemi olarak bilinmektedir. Dondurarak kurutma gıdaların başlangıç kalitesini en etkin şekilde muhafaza ederek ürünün kolayca taşınması ve depolanması gibi avantajlarının yanında raf ömrünü de uzatmaktadır. Ancak düşük kurutma oranı, uzun çalışma süresi ve yüksek enerji ihtiyacı gibi özelliklerinden dolayı pahalı bir kurutma yöntemi olarak bilinmektedir. Dondurarak kurutma, genellikle ısı işleme hassas değerli gıdaların kurutulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Lopez-Quiroga vd. 2012).

Suyun üçlü noktasının hemen alt derecelerinde gerçekleşen dondurarak kurutma işlemi bu sıcaklık derecelerinde örneklerdeki suyun süblimasyon ve vakum yoluyla uzaklaştırılması işlemidir (Jiang vd. 2013). Genel olarak gıdalar yapılarında bulunan enzimlerin faaliyet gösteremediği  $0.35 a_w$  ve bu değer altındaki su aktivite değerine kadar kurutulmaktadır. Gıdalarda bulunan ve gıdaların depolanmasında kalite kayıplarına neden olan pek çok enzimin aktivitesi  $0.35 a_w$  su aktivite değerinin üstü değerlerde artış göstermektedir (Saldamlı 2007). *Nannochloropsis* sp. alginden elde edilen biyokütlenin su aktivite değeri  $0.35 a_w$ 'nin altına çekilerek kurutma sağlanıp enzim faaliyetleri minimize edilmeye çalışılmıştır.

Çözgenin polaritesine bağlı olarak algal biyokütleye ekstraksiyon öncesi kurutma işlemi uygulamak ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Islak biyokütleye algal hücre etrafındaki su apolar çözgenlere bariyer etkisi yaparak hidrolik bir kabuk oluşturmakta ve bu da ekstraksiyon verimini düşürmektedir (Liu vd. 2013).

### 3.2.5. Ultrasonik destekli algal yağ ekstraksiyonu

Tez çalışmasında, diğer ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla daha fazla avantaj sağladığı yapılan çalışmalarla desteklenen, ultrasonik destekli ekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada ultrasonik destekli ekstraksiyon tekniğinin geleneksel ekstraksiyon yöntemine kıyasla yaklaşık 3 kat daha fazla yağ verimi sağladığı bildirilmiştir (Suganya ve Renganathan 2012).

Ultrasonik titreşimlerin oluşturduğu kavitasyon kabarcıkları sıkışmış buhar moleküllerinin ayrışması nedeniyle yüksek derecede reaktif radikaller üretmektedir. Hücre içindeki ve dışındaki kavitasyon kabarcıklarının patlaması, hücre duvarlarının bozulmasını sağlamakta ve bu mekanik etki geleneksel yöntemlere kıyasla yağ verimini arttırmaktadır (Araujo vd. 2013).

Standardize edilmiş kuru alg biyokütlesinden 5 farklı balona 100'er g tartılarak üzerlerine uygun miktarda çözümler eklenmiş, belirlenen optimum şartlarda, ultrasonik banyo yardımı ile ekstraksiyon yapılmıştır.



(a)



(b)

Şekil 3.2. (a) Ekstraksiyon öncesi çözümler+alg karışımı. (b) Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Ekstraksiyon sonrası çözelti kaba filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüştür.



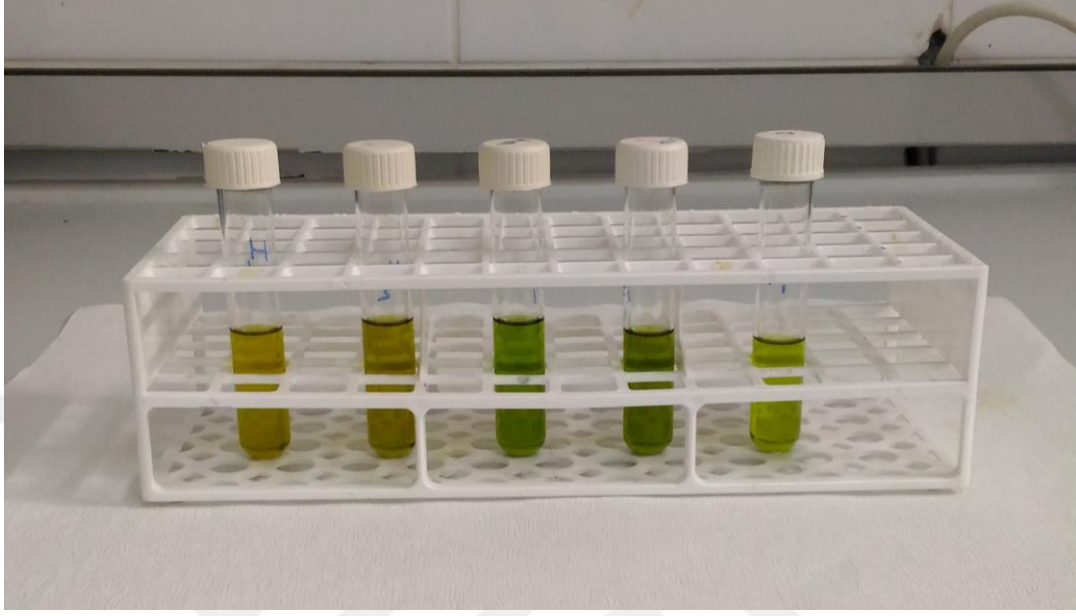
(a)



(b)

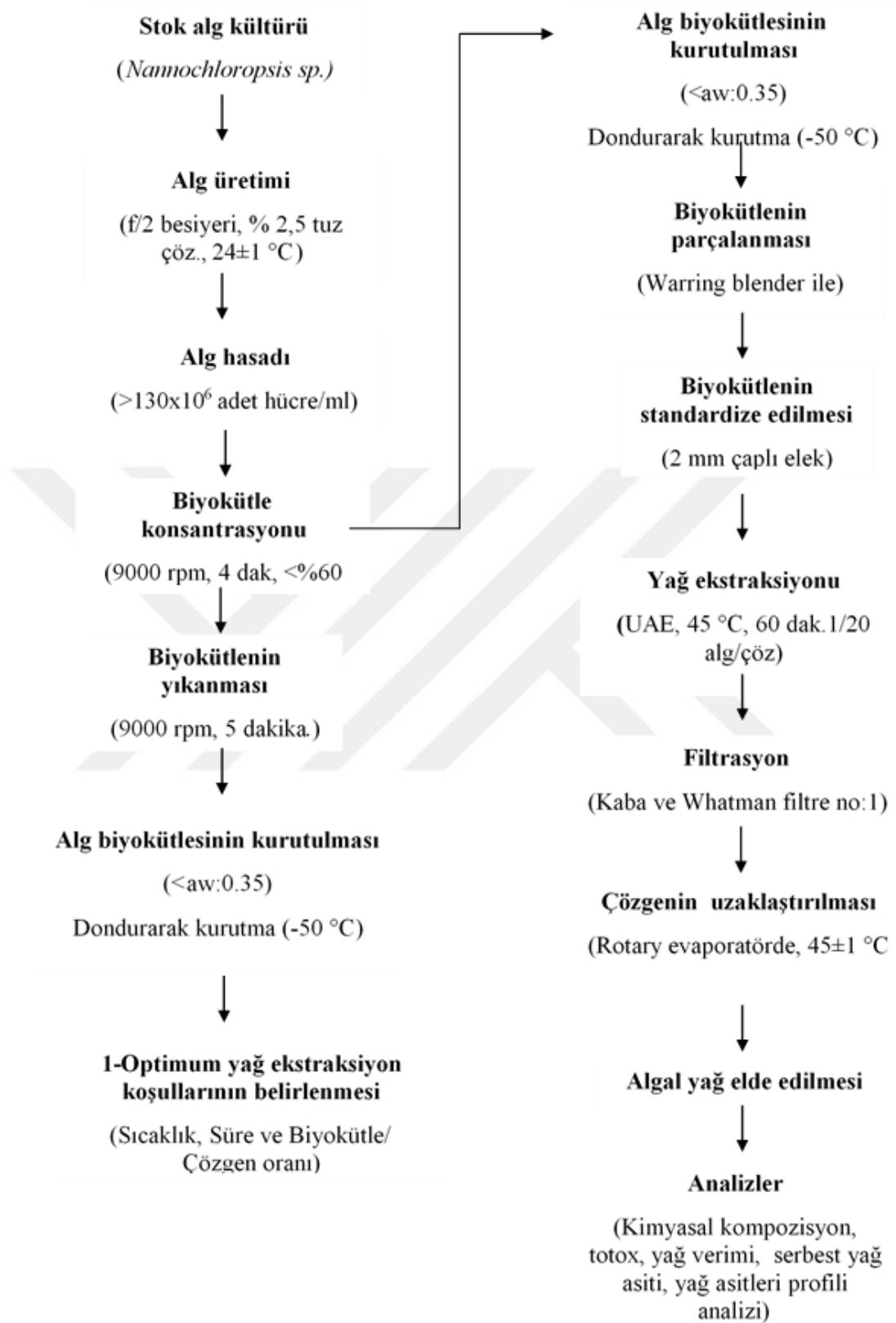
Şekil 3.3. Kaba filtre kâğıdı ile filtrasyon (a) ve evaporasyon öncesi çözümler+alg al yağ

Filtrasyon sonucu elde edilen ekstrakt rotary evaporatörde 45 °C’de çözücü uzaklaşmaya kadar uçurulmuştur. Elde edilen algal yağ ile çeşitli oksidasyon analizleri yapılmış ve metillendirme sonrası gaz kromatografisi (GC) ile yağ asitleri profili çıkarılmıştır.



Şekil 3.4. Çözücü türüne göre farklı renklerde elde edilen metillendirilmiş algal yağ

İki tekerrürlü olarak gerçekleştirilen çalışmaya ait iş akış diyagramı Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Algal yağın optimum yağ ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi ve farklı polaritedeki çözümlerle ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen algal yağa ait iş akış şeması



### 3.3. Analizler

#### 3.3.1. Kimyasal kompozisyon analizi

*Nannochloropsis* sp. mikroalginden üretilecek biyokütlenin toplam kurumadde ve kül miktarı Helrich (1990)'nın belirttiği yönteme göre yapılmıştır.

##### 3.3.1.1. Toplam kurumadde tayini

Cam kurutma kabı etüvde kurutulduktan sonra desikatörde soğutulmuş ve darası alınmıştır (G). Kurutulup öğütülmüş alg örneklerinden yaklaşık 3 g alınarak tartılmıştır (G<sub>1</sub>). Örnekler sıcaklığı 100 °C'ye ayarlanmış etüvde ağırlıkları sabit tartıma gelinceye kadar kurutularak tartılmıştır (G<sub>2</sub>). Örneklerin kurumadde miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Toplam kurumadde} = [(G_2 - G)/(G_1 - G)] \times 100$$

$$\% \text{ Nem} = 100 - \text{Kuru madde}$$

##### 3.3.1.2. Mineral madde (kül) tayini

Krozeler, 500-600 °C'de kül fırınında kurutulmuştur. Krozeler desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak darası alınmıştır (Y1). Kroze içerisine yaklaşık 3 gr kadar kurutulup öğütülmüş örnekten konulmuş ve tekrar tartılmıştır (Y2). Kül fırınında beyaz kül oluşuncaya kadar, 500 °C'de 24 saat yakılmıştır. Desikatörde soğutulan krozeler tartılarak (Y3) örneklerin kül içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kül} = ((Y_3 - Y_1)/(Y_2 - Y_1)) \times 100$$

##### 3.3.1.3. Protein tayini

Protein analizi A.O.A.C. (981.10, 1984)'de belirtilen yönteme göre yapılmıştır. Homojenize edilip hazırlanmış örnekten 1 g kadar tartılmıştır. Tartılan örnek kuru Kjehdahl balonuna konulmuş, üzerine 1 adet kjehdahl tableti eklenmiştir. Kjehdahl balonu veya yakma tüplerine 25 ml derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yavaşça ilave edilmiştir. Kaynama taşı konularak hazırlanan Kjehdahl balonu yakma setine yerleştirilmiştir. Başka bir Kjehdahl balonuna 10 g yakma tuzu, 25 ml derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve cam boncuk konularak kör deneme hazırlanmış ve yakma setine yerleştirilmiştir. Önce köpürme bitene kadar 200–250 °C'de 15 dakika, daha sonra 350–400 °C'de 45–60 dakika siyah nokta kalmayıncaya kadar yakılmıştır. Başlangıçta siyah, koyu kahverengi olan renk yakma işlemi boyunca açılmıştır. Kör deneme ile örneklerin rengi açık mavi -yeşil veya sarımsı yeşil olduğunda yakma işlemine en az 30 dakika kadar devam edilmiştir. Daha sonra yakma işlemine son verilmiştir. Yaş yakma tüpleri oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Üzerine 150–200 ml saf su, ilave edilmiş ve soğumaya bırakılmıştır.

Yakma işlemi yapılmış ve soğutulmuş Kjehdahl balonlarına 125 ml % 40'luk NaOH ilave edilmiştir. Damıtma sırasında patlamaları önlemek için 1–2 parça çinko (Zn) granülü konulmuştur. Kjehdahl balonları destilasyon cihazına yerleştirilmiştir. Bir erlene 50 ml, 0,1 N borik asit çözeltisi ve 5–6 damla indikatör çözeltisi konulmuştur.

Hazırlanan erlen geri soğutucunun ucu erlendeki borik asit ve indikatör çözeltisinin içine girecek şekilde yerleştirilmiştir. Destilasyon başlatılmış ve erlenin başlangıçtaki menekşe-mor rengi mavi-yeşil renge dönüşünce destilasyon sonlandırılmıştır. Soğutucunun ucu saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra titrasyon işlemine geçilmiştir.

Bürete 0,1 N HCl doldurulmuştur. Damıtma aşamasında içinde amonyağın tutulduğu borik asit çözeltisi bulunan erlen büretteki asit çözeltisi ile menekşe-mor renk oluşuncaya kadar titre edilmiştir. Aynı titrasyon işlemi kör için de yapılmıştır. Her iki titrasyonda harcanan asit miktarları kaydedilmiştir. Örneklerin protein tayini toplam azot miktarı tespit edildikten sonra faktör (F: 5,83) ile çarpımı sonucu tespit edilmiştir.

$$\% \text{ Azot} = ((V1 - V0) \times N \times 0.014) / m \times 100 = \text{gr}/100\text{gr}$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ Azot} \times F$$

Burada;

**V1** = Titrasyonda harcanan HCl çözeltisi miktarı (ml)

**V0** = Kör deneme titrasyonunda harcanan HCl çözeltisi miktarı (ml)

**N** = Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0.1 N)

**0,014** = Azotun mili ekivalen ağırlığı

**m** : Alınan gıda örneği miktarı (g)

#### 3.3.1.4. Toplam yağ tayini

Alg biyokütlesinden ekstrakte edilen toplam yağ miktarı Bligh ve Dyer (1959)'in belirttiği yöntemle göre hesaplanmıştır. Kurutulmuş mikroalg örneklerinden cam behere 20 g tartılmıştır üzerine 1:2 oranında hazırlanmış kloroform:metanol karışımından 60 ml eklenmiştir. Karışım homojenize edilirken içine 20 ml kloroform ve 20 ml NaCl (% 88'lik) ilave edilmiştir. Homojenize karışım 20 ml'lik falkon tüplerine alınmış 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Çöktürülen alg örnekleri kaba filtre kağıdı yardımıyla cam balonlara süzümüştür. Döner buharlaştırıcı yardımıyla çözgen uzaklaştırılmış, cam balonlar tartılmıştır. Tartımdan balon ağırlığının çıkarılmasıyla elde edilen toplam yağ miktarı hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam yağ (\%)} = [(balon darası + yağ) - balon darası] / \text{örnek miktarı} \times 100$$

Yağ verimi, alg biyokütlesinden ekstrakte edilen toplam yağın ekstraksiyon öncesi biyoküttelede bulunan toplam yağ miktarına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

$$YV (\%) = (Es / Ty) \times 100,$$

YV: yağ verimi (%); Es:ekstraksiyonda elde edilen yağ (g); Ty: alg biyokütlesinde bulunan toplam yağ (g).

#### 3.3.2. Yağ oksidasyonu analizleri

Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin göstergesi olan peroksit değeri (PV), para-anisidin (p-Av) ve UV Spektrum değerleri kullanılarak belirlenmiştir.

### 3.3.2.1. Peroksit analizi (PV)

Yağ asidi molekülleri, oksijen varlığında serbest radikallerle tepkimeye girerek yağ asidi pekroksitlerini oluşturmaktadır. Peroksitler kararlı bileşikler değildir ve üründe acılaşılmaya neden olan uçucu bileşikler olan aldehit, keton ve alkollere ayrılırlar. Ayrıca yapılan çalışmalarla PUFA içeriği yüksek olan yağların oksidasyona daha hassas olduğu belirtilmiştir (Özogul vd. 2005).

Peroksit analizi AOAC (1990)'de belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Alg yağı (1g) örneği üzerine kloroform: asetik asit (1:1.5) çözeltisi ve 1 ml potasyum iyodür eklenerek yağın iyice çözülmesi sağlanmıştır. Karanlıkta 5 dakika bekletilmesinin ardından bir miktar su ve indikatör olarak %1'lik nişasta çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım, 0.01 N sodyum tiyosülfat eşliğinde titre edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$PV \text{ (meq/kg)} = (V - B \times N_f / W) \times 1000$$

V: harcanan sodyum tiyosülfat miktarı; B: kör için harcanan sodyum tiyosülfat miktarı; W: örnek ağırlığı; N<sub>f</sub>: sodyum tiyosülfatın normalitesi

### 3.3.2.2. Para-anisidin (p-Av) analizi

Birincil oksidasyon ürünlerinin renksiz ve tatsız olması nedeniyle ürünlerdeki lipit oksidasyonunun belirlenmesinde ikincil oksidasyon ürünlerinin ölçülmesi önemlidir. Kolorimetrik bir yöntem olan p-Av analizi yağlardaki ikincil oksidasyon ürünlerinin tespitinde kullanılmaktadır. p-Av analizi Frankel (1984)'in belirttiği yöntemle yapılmıştır.

Alg örneklerinden elde edilen yağ 0,5 g'ı 25 ml n-hekzan içerisinde çözülmüştür (A1).

Çözeltiden alınan 5 ml üzerine 1 ml para-anisidin standardı (Merck 800458, Almanya) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika süreyle karanlıkta bekletilmiştir (A2). Örneklere ait para-anisidin değeri 350 nm'deki spektrofotometrik ölçümlerle elde edilen absorbans değerleri yardımıyla aşağıda verilen formülle hesaplanarak belirlenmiştir. Algal yağın koyu renkli olması nedeniyle kolorimetrik ölçüme dayalı olan p-Av analizinde 1/10 seyreltme işlemi uygulanmıştır.

$$\text{Para-anisidin değeri (p-Av)} = 25 (1,2 \times (A_2 - A_1)) / \text{örnek ağırlığı}$$

A<sub>1</sub>= Para-anisidin eklenmeden önce 350 nm'deki absorbans

A<sub>2</sub>= Para-anisidin eklendikten sonra 350 nm'deki absorbans

### 3.3.2.3. UV spektrum analizi

Genel olarak K<sub>232</sub> değeri, yağların bileşiminde bulunan konjuge dienlerin miktarını belirlemede kullanılan bir veridir. Yağların parçalanmaları sonucunda meydana gelebilecek olan oksidasyon ürünlerinin morötesi bölgede ve yaklaşık 232 nm'de karakteristik spektrumlarını sergiledikleri bildirilmektedir. Bu nedenle 232 nm'de absorbansın hesaplanması yağların oksidasyon durumunun bir göstergesidir.

K<sub>270</sub> değeri ise, konjuge trienler gibi ikincil lipid oksidasyon ürünlerinin oluşumunu gösteren önemli bir kalite indeksidir.

Algal yağın uv absorbans ölçümü için Thermo Evolution 160 UV-VIS kullanılmıştır. UV spektrum analizi uluslararası zeytin konseyi (IOC, 2015)'nde belirtilen standartlara göre yapılmıştır. 0,02 g algal yağ tartılmış üzerine 25 ml izooktan eklenerek spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Ölçüm Scan formatında 220-320 nm dalga boyu aralığında yapılmıştır. Birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerin oluştuğu 232 nm ve 270 nm değerleri alınmıştır.

### 3.3.3. Serbest yağ asitliği analizi

Ekstraksiyon sırasında yağların hidrolizi sonucu meydana gelecek serbest yağ asit miktarının tayininde Lee (1975)'nin belirttiği yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre ekstrakte edilen 1 g yağ nötrale edilmiş dietileter ve etanolden (1:1) oluşan çözelti ile karıştırıldıktan sonra etanolde hazırlanmış 0.1 N KOH ile titre edilmiştir. Alglerden ekstrakte edilen yağların serbest yağ içeriği g/100 g oleik asit cinsinden ifade edilmiştir.

### 3.3.4. Yağ asitleri kompozisyon analizi

Yağ asitleri metil esterifikasyonunda Özogul ve Özogul (2007)'nin yöntemi kullanılmıştır. *Nannochloropsis* sp. mikroalginden elde edilen örneklerden alınan 10 mg yağ, n-heptan (2 ml) içerisinde çözülmüştür. Karışıma 4 ml 2 M metanolde hazırlanmış KOH ilave edilerek 2 dakika süre ile vortekslenip, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faz kromatogram için kullanılmıştır.

Gaz kromatografisi koşulları: BPx70 silika kolon (50m x 0.22 mm, film kalınlığı 0.25µm; SGE Inc., Victoria, Avustralya) ve alev iyonizasyon dedektörü ile donatılmış olan gaz kromatografisi (Perkin Labor, Clarus 500) kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 140 °C'de 5 dak ile başlayacak, 4 °C/dak artışla 200 °C'ye ulaşacak ve beklemeden 1°C/dak artışla 220 °C'de son bulmuştur. Enjeksiyon sıcaklığı 220°C ve taşıyıcı gaz olan Helyumun akış hızı 1.0 ml/dak olmuştur. Dedektör sıcaklığı 280 °C'ye ve split oranı 1:50 olacak şekilde ayarlamalar yapılmıştır.

Yağ asitleri metil esterlerinin standartlarına ait çıkış zamanlarının elde edilen çıkış zamanları ile kıyaslaması sonucu örneklerdeki yağ asitleri tanımlanmıştır. Sonuçlar % gaz kromatografisi alanı olarak verilmiştir.

### 3.3.5. İstatiksel analiz

Elde edilen bulgular Design Expert (Stat-Ease Inc. Minneapolis, ABD) ve SAS 9.0 (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) paket programları kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve önemli bulunan farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ortaya konulmuştur.

## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. *Nannochloropsis* sp. Mikroalginin Kimyasal Kompozisyonu

Çalışmada kullanılan *Nannochloropsis* sp. mikroalgine ait protein, yağ, mineral madde (kül) ve nem miktarı Çizelge 4.1.'de belirtilmiştir. Hasat edildikten sonra santrifüj yardımı ile konsantre edilen mikroalg biyokütlesinin hedef su aktivitesi olan 0.35 aw su aktivite değerine kadar kurutulması ile başlangıç nem içeri % 73,7 seviyesinden % ortalama  $5,73 \pm 0,73$  seviyelerine kadar azalma göstermiştir. Çizelge 4.1'den de anlaşılacağı gibi *Nannochloropsis* sp. mikroalginin kuru ağırlığının önemli miktarı (% 23,07) yağdan oluşmaktadır. Babuskin vd.'nin (2014) fonksiyonel gıda üretiminde kullandığı *N. oculata* mikroalginin (kurumaddesinin) % 36'sının proteinden, % 22,1'inin yağdan, % 22'sinin külden ve % 18'inin karbondihattan oluştuğunu bildirmiştir. *Nannochloropsis* sp. İle ilgili yapılan bir diğer çalışmada mikroalg biyokütlesinin % 35,9 karbondihatt, % 28,8 protein, % 18,4 yağ ve % 9,4 kül içerdiği bildirilmiştir (Reboloso-Fuentes vd. 2001)

Çizelge 4.1. *Nannochloropsis* sp. mikroalginin kimyasal kompozisyonu

Örnek	Kimyasal kompozisyon*				
	Nem (g/100 g)	Karbondihatt (g/100 g)	Yağ (g/100 g)	Protein (g/100 g)	Kül (g/100 g)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	5.73.±0.37	35.70±0.68	23.07±0.73	31.27.±0.55	9.97±0.19

\*Hesaplamalar kurumadde üzerinden yapılmıştır.

### 4.2. *Nannochloropsis* sp. Mikroalginden Yağ Ekstraksiyonlarına Ait Bulgular

*Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonlarına ait yağ verimi ve omega-3 yağ asitleri içeriğine ait değerler Çizelge 4.3'de bu değerlere ait katsayılar Çizelge 4.4'de belirtilmiştir. Deneme deseninde belirtilen şartlarda yapılan ekstraksiyonlar sonucunda en yüksek yağ verimine (%75,60) 1:20 alg:cözgen oranına göre, 65 °C'de 90 dakikalık ekstraksiyon sonucu ulaşılırken; en yüksek omega-3 yağ asitleri içeriğine (%33,40) ise yine 1:20 alg:cözgen oranında göre, 25 °C'de 30 dakikalık yağ ekstraksiyonu sonucu ulaşılmıştır. *Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonunun optimizasyonunda maksimum yağ verimine ve omega-3 yağ asitleri içeriğine ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi parametrelerinin önemli derecede ( $P < 0,05$ ) etkileri olduğu; alg:cözgen oranının etkisinin ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.). Çizelge 4.3. incelendiğinde yüksek sıcaklıklarda uzun sürede yapılan yağ ekstraksiyonlarının yağ verimini arttırdığı tespit edilmiştir.

Ultrason yardımı ile ekstraksiyon metodu ekstraksiyon verimini artırırken işlem zamanını azaltan metot olarak bilinmektedir. Ultrason dalgalarının oluşturduğu titreşim hücrelerin bir birine çarpışmalarını arttırarak ekstraksiyon verimini de arttırdığı bilinmektedir (Dos Santos vd. 2015).

Çizelge 4.2. *Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonlarına ait yağ verimi ve omega-3 yağ asitleri değerleri

Örnek	*X <sub>1</sub> (ml:g)	*X <sub>2</sub> (°C)	*X <sub>3</sub> (dakika)	Yağ verimi (%)	Omega-3 yağ asitleri içeriği (%)
A <sub>1</sub>	1:10	25	60	63.92±1.13	33.04±0.43
A <sub>2</sub>	1:20	25	30	65.37±0.86	33.40±0.65
A <sub>3</sub>	1:30	25	60	65.85±0.78	32.59±0.56
A <sub>4</sub>	1:20	25	90	66.14±0.82	32.06±0.74
A <sub>5</sub>	1:30	45	90	71.55±1.05	31.04±0.60
A <sub>6</sub>	1:30	45	30	68.65±0.63	31.76±0.43
A <sub>7</sub>	1:20	45	60	69.42±0.67	31.75±0.84
A <sub>8</sub>	1:20	45	60	69.61±0.93	31.60±0.66
A <sub>9</sub>	1:10	45	30	66.43±0.79	31.78±0.72
A <sub>10</sub>	1:2	45	60	71.16±1.03	31.45±0.53
A <sub>11</sub>	1:10	45	90	71.45±0.45	31.40±0.44
A <sub>12</sub>	1:20	65	30	73.18±0.56	30.92±0.75
A <sub>13</sub>	1:20	65	90	75.60±0.71	30.30±0.56
A <sub>14</sub>	1:30	65	60	74.15±0.84	30.61±0.34
A <sub>15</sub>	1:10	65	60	73.67±0.58	30.81±0.52

\*X<sub>1</sub>:Alg:çözgen (hekzan) oranı (ml:g); X<sub>2</sub>: ekstraksiyon sıcaklığı (°C); ekstraksiyon süresi (dakika)

Çizelge 4.3. *Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonlarına ait yağ verimi ve omega-3 yağ asitleri içeriği değerlerinin regresyon katsayıları

Parametreler	Regresyon parametre katsayıları	
	Yağ verimi (%)	Omega-3 yağ asitleri içeriği (%)
Çözgen:alg oranı (X <sub>1</sub> )	0.0921	0.0962
Ekstraksiyon sıcaklığı (X <sub>2</sub> )	<0.0001	<0.0001*
Ekstraksiyon süresi (X <sub>3</sub> )	0.0020	0.0005*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.4300	0.5358
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.2569	0.4046
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.3747	0.0994
R <sup>2</sup>	0.97	0.95

\* İstatistiksel olarak P<0.05 düzeyinde önemli

#### 4.2.1 Ekstraksiyon parametrelerinin algal yağ verimine etkileri

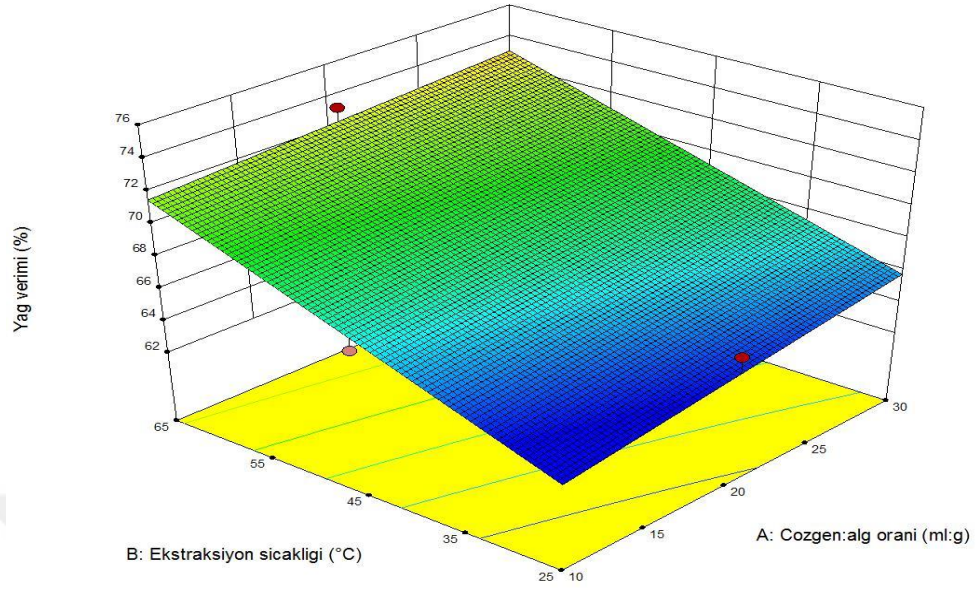
*Nannochloropsis* sp. mikroalginden algal yağ ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi amacıyla 3 boyutlu (3D) Cevap Yüzey Metodu grafikleri oluşturulmuştur. Çözgen:alg oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin yağ ekstraksiyon verimine etkisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Ortalama ekstraksiyon süresi olan 60 dakikada ekstraksiyon sıcaklığının ve çözgen/alg oranının artırılması yağ verimini önemli derecede ( $P<0.005$ ) arttırmıştır (Şekil 4.1a). Yağ verimine yüksek sıcaklıklarda çözgen:alg oranının artırılması düşük sıcaklıklarda çözgen alg oranının artırılmasından daha etkili olmuştur. En düşük yağ verimine düşük ekstraksiyon sıcaklığı ( $<45$  °C) ve düşük çözgen:alg oranında ( $<20$  ml:g) rastlanmıştır.

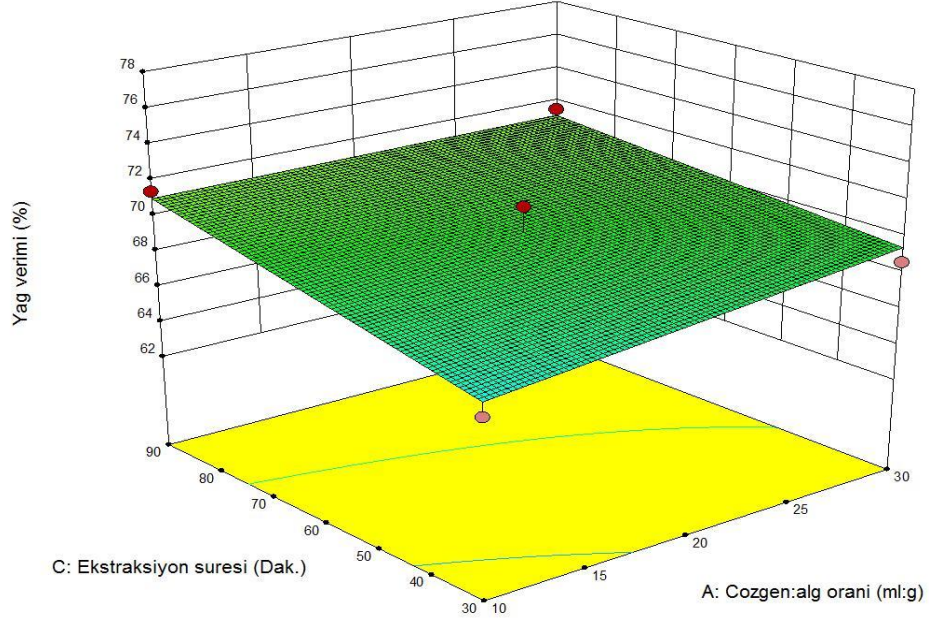
Ortalama ekstraksiyon sıcaklığı olan 45 °C sabit tutularak yapılan değerlendirmede ekstraksiyon süresinin ve çözgen/alg oranının artırılması yağ verimini arttırmamıştır ( $P>0.005$ ) (Şekil 4.1b). En yüksek yağ verimine yüksek ekstraksiyon sürelerinde yüksek çözgen:alg oranında rastlanırken en düşük yağ verimine en düşük ekstraksiyon süresi ve en düşük çözgen/alg oranında rastlanmıştır. *Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonunda yağ verimine ekstraksiyon süresinin artırılması çözgen/alg oranının artırılmasından daha fazla etki ettiği tespit edilmiştir.

Çözgen:alg oranı 20:1 (ml:g)’de sabitlenerek ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığını arttırmak yağ verimini önemli derecede ( $P<0.005$ ) arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1c). Çözgen/alg oranını sabit tutarak ekstraksiyon süresini ve ekstraksiyon sıcaklığını arttırmak yağ verimini önemli derecede arttırırken, ekstraksiyon sıcaklığını ve ekstraksiyon süresini arttırmak yağ verimine önemli derecede etki etmemiştir. En yüksek yağ verimine yüksek ekstraksiyon sıcaklığında ve uzun ekstraksiyon sürelerinde rastlanırken en düşük yağ verimine düşük ekstraksiyon sıcaklık değerlerinde ve düşük ekstraksiyon sürelerinde rastlanmıştır.

Pıtaya meyvesinin antosiyenin pigmentlerinin cevap-yüzey metodu kullanılarak tanımlanması ve ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada etanol ve metanol ile yapılan ekstraksiyonlar karşılaştırılmıştır. Sonuçta metanol ile yapılan ekstraksiyonların daha yüksek verimde olduğu görülmüş, ayrıca ekstraksiyon sıcaklığı ve katı/çözgen oranının ekstraksiyon süresine göre verimi daha çok etkilediği tespit edilmiştir. Etanol ile yapılan ekstraksiyon sonucunda ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin artırılmasının verimi arttırdığı, katı/çözücü oranının verimi etkilemediği bildirilmiştir (Anuar vd. 2013).

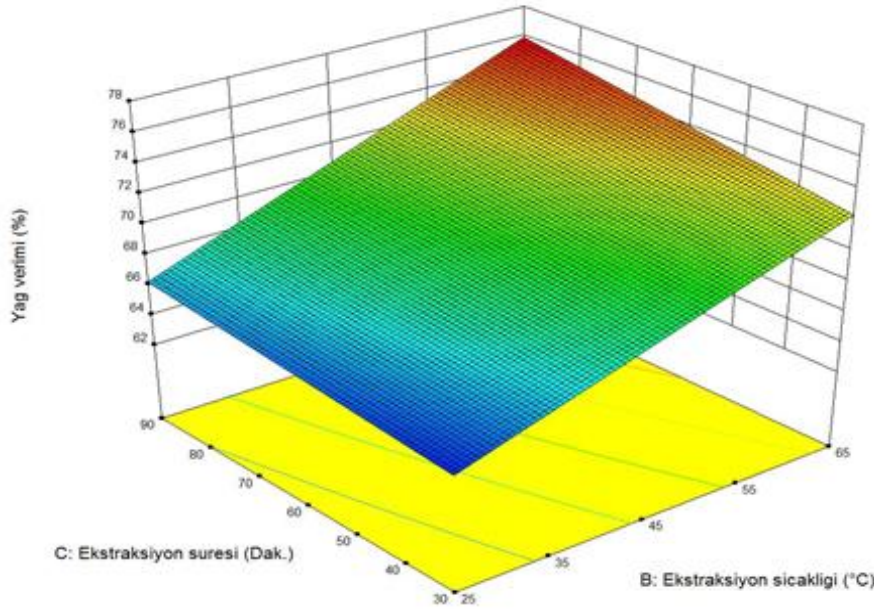


(a)



(b)





(c)

Şekil 4.1. Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve çözen:alg oranının yağ ekstraksiyon verimine etkisi

#### 4.2.2 Ekstraksiyon parametrelerinin algal yağın omega-3 yağ asitleri içeriğine etkileri

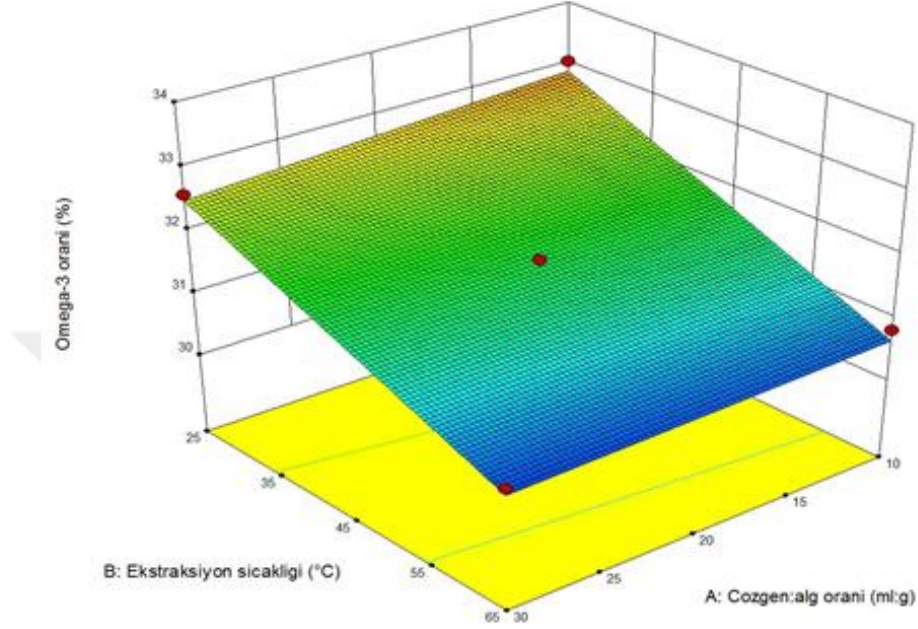
Çözen:alg oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi gibi parametrelerin *Nannochloropsis* sp. mikroalginden elde edilen yağın omega-3 yağ asitleri içeriğine etkisi sırasıyla Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Ekstraksiyon süresinin 60 dakika olarak sabitlenmesi ile yapılan yağ ekstraksiyonlarında ekstraksiyon sıcaklığını ve çözen:alg oranını arttırmak ekstrakte edilen yağın omega-3 yağ asitleri içeriğini önemli derecede ( $P<0.005$ ) azaltmıştır (Şekil 4.2a). En yüksek omega-3 yağ içeriği düşük sıcaklık değerlerinde (25-35 °C); en düşük omega-3 yağ asitleri içeriğine ise yüksek ekstraksiyon sıcaklık değerlerinde (45-65 °C) rastlanılmıştır. Tüm ekstraksiyon sıcaklıklarında çözen:alg oranını azaltmak omega-3 yağ asitleri içeriğine etki etmezken, test edilen tüm çözen:alg oranlarında ekstraksiyon sıcaklığını azaltmak omega-3 yağ asitleri içeriğini önemli derecede arttırmıştır.

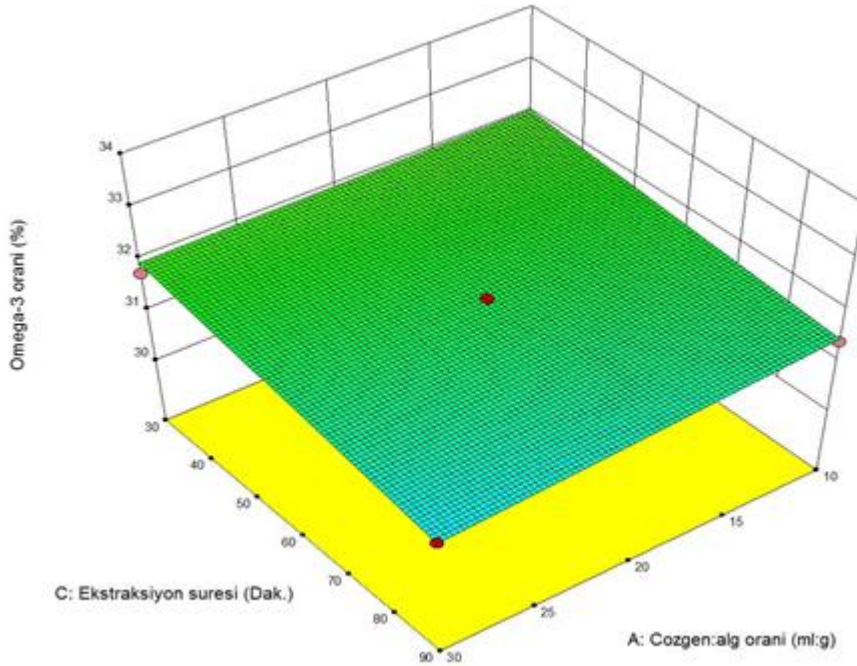
Ekstraksiyon sıcaklığı 45°C’de sabit tutularak yapılan ekstraksiyonlarda ekstraksiyon süresinin ve çözen:alg oranının artırılması yağın omega-3 yağ asitleri içeriğine önemli ( $P>0.005$ ) bir etkide bulunmamıştır (Şekil 4.2b). En yüksek omega-3 yağ asitleri içeriğine en kısa ekstraksiyon sürelerinde ve en düşük çözen:alg oranında rastlanırken en düşük omega-3 yağ asitleri içeriğine ise en uzun ekstraksiyon süresi ve en yüksek çözen:alg oranında rastlanmıştır.

Çözen:alg oranı ortalama değerinde (20:1, ml:g) sabit tutularak yapılan ekstraksiyonlarda hem ekstraksiyon sıcaklığı hem de ekstraksiyon süresi elde edilen yağın yağ asitleri içeriğine önemli derecede ( $P<0.005$ ) etki ettiği belirlenmiştir.

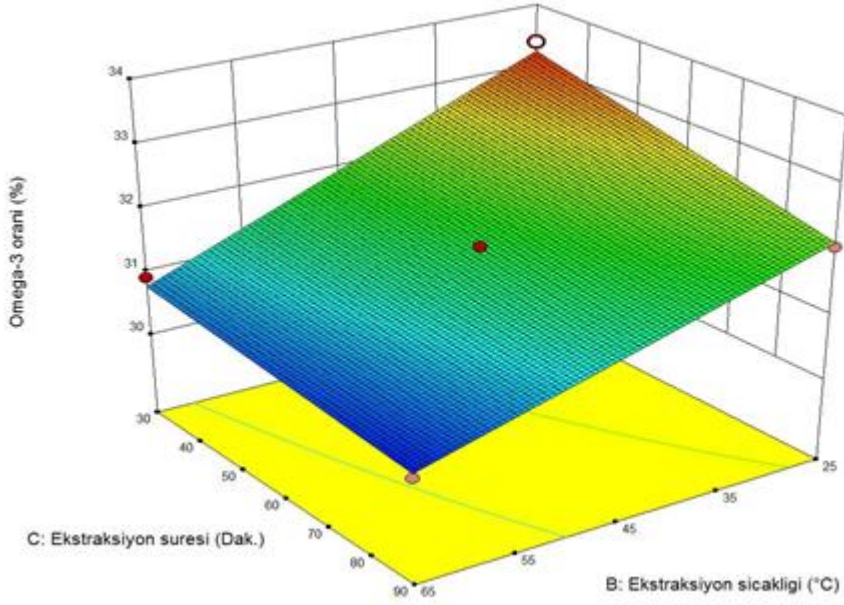
Ekstraksiyon sıcaklığını arttırırken ekstraksiyon süresini de uzatmak elde edilen yağın omega-3 yağ asitleri içeriğini önemli derecede azaltmıştır (Şekil 4.2c). Bu önemli azalışın sıcaklığa hassas doymamış yağ asitlerinin parçalanarak daha kısa zincirli serbest yağ asitlerine dönüşmesinden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.2. Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve çözgen:alg oranının algal yağın omega-3 yağ asitleri içeriğine etkisi

#### 4.3. *Nannochloropsis* sp. Mikroalginden Yağ Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

*Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyonunda yağ verimleri ve elde edilen yağın omega-3 yağ asitleri içerikleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen değerler ve Design Expert 9.0 istatistik programı kullanılarak yağ verimi, algal yağın omega-3 yağ asitleri içeriği ve hem yağ verimi hem de yağın omega-3 yağ içeriği hedef alınarak yağ ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Bilgisayar programı yardımı ile elde edilen tahmini optimum ekstraksiyon koşulları belirlendikten sonra bu koşullar altında deneysel ekstraksiyonlar ( $n:3$ ) gerçekleştirilerek sonuçlar Çizelge 4.4., Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Maksimum yağ verimi hedef alınarak yapılan hesaplamalar sonucu Çözgen:alg oranı: 1:16.9 g:ml, ekstraksiyon sıcaklığı 63,62 (°C) ve ekstraksiyon süresi 82,48 dk. optimum koşullar olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4.). Belirlenen bu koşullar altında bilgisayar programı tahmini yağ verimini % 75,23 hesaplarken, aynı koşullar altında yapılan ekstraksiyonlar sonucu yağ verimi %75,82±0.89 olarak saptanmıştır. Tahmini ve deneysel koşullar altında elde edilen sonuçlar istatistiki olarak önemsiz ( $P>0.005$ ) bulunması tahmini koşullar ile deneysel koşulların uyduğunu göstermiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Maksimum yağ verimi hedef alınarak ekstrakte edilen yağın ekstraksiyon verim değerleri

	Optimum koşullar			Yağ ekstraksiyon verimi (%)**
	$X_1^*$	$X_2^*$	$X_3^*$	
Tahmini optimum koşullar				75.23 <sup>a</sup>
Deneysel optimum koşullar**	16.9:1	63.62	82.48	75.82±0.89 <sup>a</sup>

\*  $X_1$ : çözen:alg oranı,  $X_2$ : ekstraksiyon sıcaklığı (°C),  $X_3$ : ekstraksiyon süresi (dakika)

\*\* Aynı sütunda farklı harfler (a ve b) değerlerin istatistiksel olarak ( $P < 0.05$ ) önemli olduğunu belirtir.

Maksimum omega-3 yağ içeriği hedef alınarak yapılan hesaplamalar sonucu çözen:alg oranı: 24.6:1 g:ml, ekstraksiyon sıcaklığı 26.87 °C ve ekstraksiyon süresi 30 dk. optimum koşullar olarak saptanmıştır (Çizelge 4.5.). Belirlenen bu koşullar altında bilgisayar programı elde edilen yağın tahmini omega-3 içeriğini %33.16 hesaplarken, aynı koşullar altında yapılan ekstraksiyonlar sonucu omega-3 içeriği %33.65±0.37 olarak belirlenmiştir. Tahmini ve deneysel koşullar altında elde edilen sonuçlar istatistiki olarak önemsiz ( $P > 0.005$ ) bulunması tahmini koşullar ile deneysel koşulların uyduğunu göstermiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Maksimum omega-3 yağ asitleri içeriği hedef alınarak ekstrakte edilen yağın omega-3 yağ asitleri değerleri

	Optimum koşullar			Omega-3 içeriği (%)**
	$X_1^*$	$X_2^*$	$X_3^*$	
Tahmini koşullar				33.16± <sup>a</sup>
Deneysel koşullar**	24.6:1	26.87	30	33.65±0.37 <sup>a</sup>

\*  $X_1$ : çözen:alg oranı,  $X_2$ : ekstraksiyon sıcaklığı (°C),  $X_3$ : ekstraksiyon süresi (dakika)

\*\* Aynı sütunda farklı harfler (a ve b) değerlerin istatistiksel olarak ( $P < 0.05$ ) önemli olduğunu belirtir.

Maksimum yağ verimi ve maksimum omega-3 yağ içeriği aynı anda hedef alınarak yapılan hesaplamalar sonucu çözen:alg oranı: 19,9:1 g:ml, ekstraksiyon sıcaklığı 44,30 °C ve ekstraksiyon süresi 62.46 dk. optimum koşullar olarak saptanmıştır

(Çizelge 4.6). Belirlenen bu koşullar altında bilgisayar programı yağ verimini % 68.31 ve omega-3 içeriğini % 32.03 olarak hesaplarken, aynı koşullar altında yapılan ekstraksiyonlar sonucu yağ verimi ve elde edilen yağın omega-3 içeriği sırasıyla % 69,86±0,71 ve % 32,21±0.44 olarak belirlenmiştir. Tahmini ve deneysel koşullar altında elde edilen sonuçlar istatistiki açıdan önemsiz ( $P>0.005$ ) bulunması tahmini koşullar ile deneysel koşulların uyduğunu göstermiştir (Çizelge 4.6).

*Nannochloropsis salina* mikroalginden yağ ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada solvent alg oranı 33:1 ml:g, ekstraksiyon sıcaklığı 25 °C ve ekstraksiyon süresi 120 dakika olarak tespit edilmiştir (Chatsungnoen 2015). Belirlenen bu koşullar altında *N. salina* biyokütlesindeki yağın % 96'sı başarı ile geri kazanılmıştır.

Çizelge 4.6. Maksimum yağ verimi ve maksimum omega-3 yağ asitleri içeriği hedef alınarak ekstrakte edilen yağa ait değerler

	Optimum koşullar			Yağ ekstraksiyon verimi (%)**	Omega-3 içeriği (%)**
	$X_1^*$	$X_2^*$	$X_3^*$		
Tahmini koşullar				69.31 <sup>A</sup>	32.03 <sup>a</sup>
Deneysel koşullar**	19.9:1	44.30	62.46	69.86±0.71 <sup>A</sup>	32.21±0.44 <sup>a</sup>

\*  $X_1$ : çözügen:alg oranı,  $X_2$ : ekstraksiyon sıcaklığı (°C),  $X_3$ : ekstraksiyon süresi (dakika)

\*\* Aynı sütunda farklı harfler (A ve a) değerlerin istatistiksel olarak ( $P<0.05$ ) önemli olduğunu belirtir.

#### 4.4. Farklı Polaritedeki Çözgenlerin Algal Yağ Verimine ve Omega-3 Yağ Asitleri İçeriğine Etkileri

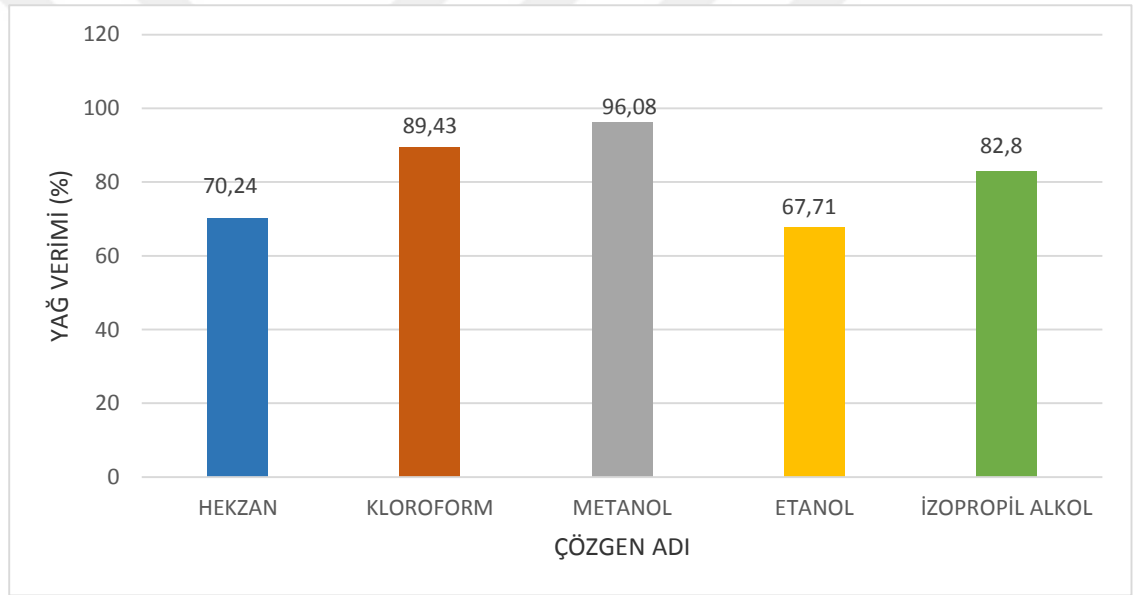
Algal biyokütleden yağ ekstraksiyonunu etkileyen önemli parametrelerden biri kullanılan çözügendir. Çözücü seçimi öncelikle ürünün saflaştırılmasının daha ekonomik olmasını sağlayacaktır. Ayrıca, çözügen ve biyokütle muamelesini arttırmak için yüksek ekstraksiyon kapasitesine ve düşük viskoziteye sahip olmalıdır. Etkin bir ekstraksiyon, çözücünün biyokütleyle nüfuz etmesini ve hedeflenen bileşiklerin polaritesini uymayı gerektirir (Suganya ve Renganathan 2012).

Farklı polaritedeki solventlerle UAE yöntemi ile elde edilen algal yağa ait yağ verimleri Şekil 4.3.' de gösterilmiştir. En yüksek yağ verimi polaritesi en yüksek çözügen olan metanol ile yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilmiştir. İzopropil alkol ve hekzan ile yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen yağ verimi diğer çözümlere kıyasla düşük bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde polar çözügenlerin apolar solventlere göre algal yağ eldesinde daha seçici olduğu düşünülmektedir.

Benzer bir çalışma farklı ekstraksiyon metotları kullanılarak yapılmış (Bligh ve Dyer 1959, Chen, Folch, Hara and Radin ) sonuçta en yüksek verim metanolün hakim çözügen olarak kullanıldığı Bligh ve Dyer metoduyla elde edilirken, en düşük verim hekzanın çözügen olarak kullanıldığı Hara ve Radin metoduyla belirlenmiştir (Araujo vd 2013). Analiz sonucu elde edilen sonuçlar bu verilerle örtüşmektedir.

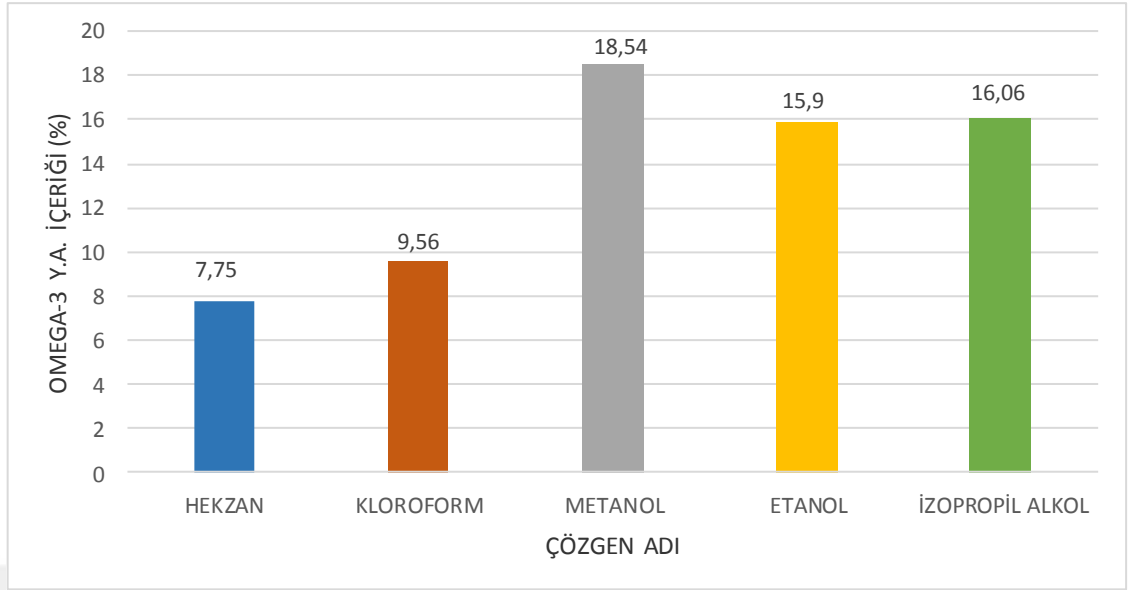
*Botryococcus braunii* mikroalgi ıslak biyokütlesinin farklı çözügenlerle ekstraksiyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada en düşük verim metanol ile yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilmiştir (Liu vd 2013). Çalışmada öngörülen ıslak biyokütledeki alg hücrelerinin etrafındaki polar su moleküllerinin apolar çözügenlere karşı bariyer özelliği göstermesi bu nedenle kuru alg biyokütleleri için polar çözügen kullanılmasının daha uygun olması görüşü bu çalışma ile desteklenmektedir.

Yapılan bir çalışmada metanol ve etanol ile yapılan ekstraksiyonların antosiyanin verimine etkisi araştırılmış, sonuçta metanol ile yapılan ekstraksiyonla daha yüksek verim elde edilmiştir (Anuar vd. 2013).



Şekil 4.3. Farklı polaritedeki çözügenlerin algal yağ verimine etkisi (%)

Farklı polaritedeki çözügenlerle yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen algal yağın omega-3 yağ asitleri içeriği şekil 4.4'de gösterilmiştir. Omega-3 yağ asitlerinin en fazla elde edildiği çözügen metanol (% 18,54), en az elde edildiği çözügen hekzan (% 7,75) olarak belirlenmiştir. Yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen yağlardaki hakim omega-3 yağ asidinin EPA (% 5,83-14,46) olduğu görülmüştür. *Nannochloropsis* sp. mikroalginin hekzan ile ekstraksiyonu üzerine yapılan bir çalışmada hakim omega-3 yağ asidi EPA olup miktarı % 3,9 olarak belirtilmiştir (Pal vd. 2011).



Şekil 4.4. Farklı polaritedeki çözümlerin algal yağın Omega-3 yağ asitleri içeriğine etkileri (%)

#### 4.5. Mikroalgal Yağın Peroksit (PV) Değerine Ait Bulgular

Farklı solventlerle ekstrakte edilen algal yağlarda meydana gelen birincil oksidasyon ürünlerinin göstergesi olan peroksit değerlerine (PV) ait ortalama değerler ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Algal yağın PV değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Çözümler	PV*
Hekzan	2,12±0,20 <sup>cb</sup>
Kloroform	1,45±0,03 <sup>c</sup>
Metanol	2,11±0,00 <sup>cb</sup>
Etanol	2,32±0,05 <sup>b</sup>
2-propanol	3,97±0,43 <sup>a</sup>

\*Değerler, Ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı harfler (a,b,c) değerlerin istatistiksel olarak ( $P<0.05$ ) önemli olduğunu belirtir.

Çizelge 4.7.'de görüleceği üzere en yüksek peroksit değeri 2-propanol örneğinde ( $P=3,97$  meq/kg) tespit edilirken en düşük peroksit değeri ise kloroform örneğinde ( $K=1,45$  meq/kg) belirlenmiştir. Hekzan ve metanol ile ekstrakte edilen yağların PV değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmamıştır ( $P<0.05$ ). H ve M ile ekstrakte edilen örneklerin PV değeri K örneğinden yüksek, E örneğinden düşük olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada algelerde farklı sıcaklıklardaki peroksit değeri ölçülmüş, 50° C’de ölçülen değer 1,2 meq/kg bulunmuştur. Ayrıca sıcaklık ve süre arttıkça peroksit değerinin arttığı belirtilmiştir (Özogul vd. 2005).

FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) standartlarında belirtilen en yüksek kabul edilebilir peroksit değeri 5 meq/kg olarak belirtilmiştir. Tez çalışmasında, ekstraksiyonlar sonucu elde edilen algal yağların peroksit değerleri standartların altında bulunmuştur. İzopropil alkol ile yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen algal yağın peroksit değeri maksimum kabul edilebilir düzeye yakın bulunmuştur. Bunun nedeninin izopropil alkolün kaynama noktasının (82,4) yüksek olması sebebiyle çözgenin uzaklaştırılması işleminin daha uzun sürede yapılması olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.6. Mikroalgal Yağın Para-Anisidin (p-Av) Değerine Ait Bulgular

Peroksit değeri yağlar okside oldukça başlangıçta artarken, diğer oksidatif reaksiyonlarda peroksitlerin kullanılmasıysa sonradan azalmaktadır. Bu nedenle peroksit değeri yağlarda tazeliği belirlemede kesin bir ölçüt olmamaktadır. Yağlarda gerçek tazeliği belirlemede ikincil oksidasyon ürünlerinin tespiti gerekmektedir. İkincil oksidasyon ürünleri, başlangıçta oluşturulmuş peroksitlerden oksidatif prosesteki diğer aşamalarda oluşan ürünler olup zincir kısaltılmış aldehitler ve alkollerini içermektedir.

Farklı solventlerle ekstrakte edilen algal yağlarda meydana gelen ikincil oksidasyon ürünlerinin göstergesi olan para-anisidin değerine (p-Av) ait ortalama değerler ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Algal yağın p-Av değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Çözgenler	p-Av*
Hekzan	1,40±0,05 <sup>a</sup>
Kloroform	1,61±0,04 <sup>a</sup>
Metanol	1,15±0,68 <sup>a</sup>
Etanol	1,29±0,11 <sup>a</sup>
2-propanol	1,56±0,53 <sup>a</sup>

\*Değerler, Ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütundaki harfler (a) değerlerin istatistiksel olarak ( $P<0.05$ ) önemsiz olduğunu belirtir.

Çizelge 4.8.’de görüleceği üzere kloroform ile hazırlanan örneklerin p-Av değeri (1,61) diğer çözgenlerle hazırlanan örneklerden yüksek bulunmuştur. Hekzan, metanol, etanol ve 2-propanol örneklerinin p-Av değeri kloroform ile hazırlanan örneklerden düşük olsa da aralarında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar görülmemiştir ( $P<0.05$ ).

Birçok anonim kaynakta algal yağdaki maksimum kabul edilebilir p-Av değeri 20 olarak belirlenmiş olup tez çalışmasında elde edilen değerler bu limitin altında bulunmuştur (Anonim 2014).



#### 4.7. UV Spektrumu

Mikroalgal yağlara ait UV spektrum değerleri Çizelge 4.9.'de verilmiştir. Çizelgede görüleceği üzere etanol ile hazırlanan örneklerin 232 ve 270 nm'deki UV spektrum değerleri (sırasıyla  $4,04 \pm 0,01$  ve  $2,60 \pm 0,15$ ) diğer çözügenlerle hazırlanan örneklere göre daha yüksek bulunmuştur. Hekzan, metanol ve 2-propanol örneklerinin UV spektrum değerleri kloroform ile hazırlanan örneklerin UV spektrum değerlerinden (sırasıyla  $2,36 \pm 0,77$  ve  $1,25 \pm 0,42$ ) yüksek olsa da aralarında istatistiksel açıdan önemli fark olmadığı bulunmuştur ( $P < 0,05$ ).

Çizelge 4.9. Algal yağın UV Spektrum değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Çözgenler	232nm	270nm
Hekzan	$3,66 \pm 0,03^{a,b}$	$1,75 \pm 0,07^{a,b}$
Kloroform	$2,36 \pm 0,77^b$	$1,25 \pm 0,42^b$
Metanol	$3,33 \pm 0,26^{a,b}$	$2,04 \pm 0,16^{a,b}$
Etanol	$4,04 \pm 0,01^a$	$2,60 \pm 0,15^a$
2-propanol	$3,54 \pm 0,33^{a,b}$	$1,88 \pm 0,27^{a,b}$

\*Değerler, Ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı harfler (a,b) değerlerin istatistiksel olarak ( $P < 0,05$ ) önemli olduğunu belirtir.

#### 4.8. Mikroalgal Yağın Serbest Yağ Asitliği Değerine Ait Bulgular

Yağlarda enzim ve ısı sonucu meydana gelen hidrolitik bozulmaların göstergesi olan serbest yağ asitliğine ait bulgular Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Algal yağın serbest yağ asitliği değerlerine ait duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Çözgenler	Serbest yağ asitliği*
Hekzan	$4,98 \pm 0,04^b$
Kloroform	$1,95 \pm 0,01^e$
Metanol	$3,05 \pm 0,05^d$
Etanol	$4,00 \pm 0,00^c$
2-propanol	$6,80 \pm 0,40^a$

\*Değerler, Ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı harfler (a,b.c.d.e) değerlerin istatistiksel olarak ( $P < 0,05$ ) önemli olduğunu belirtir.

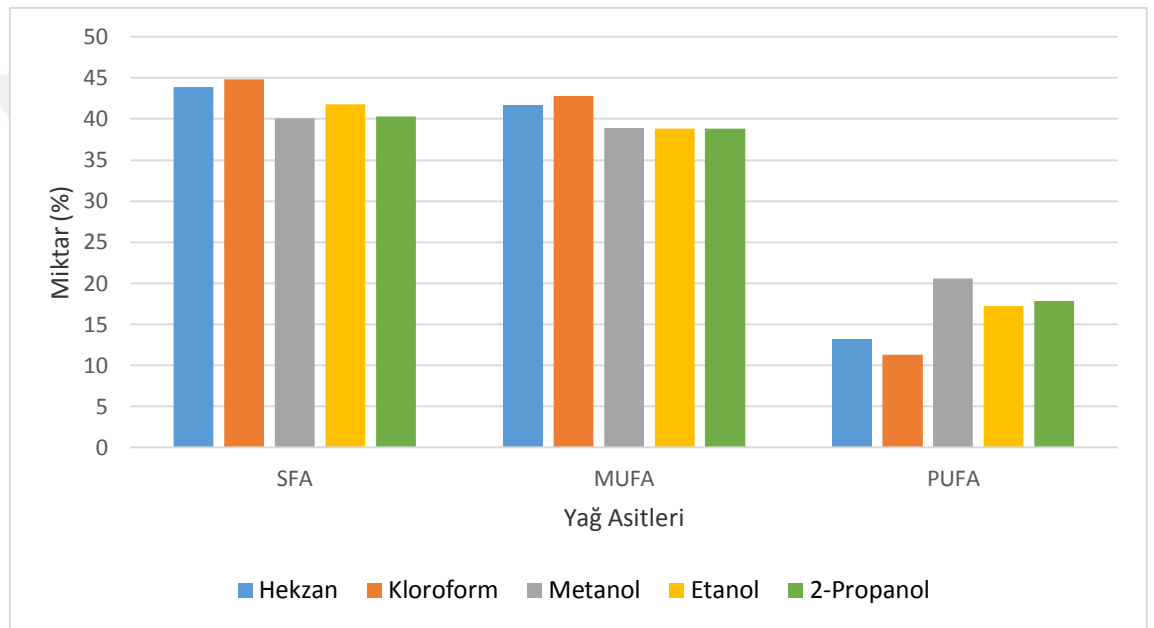
Serbest yağ asitliği değerleri oleik asit cinsinden hesaplanmıştır. "1 ml 0.1 NaOH: 0.028 gram oleik asit."

Çizelge 4.10.'da verilen bulgulara bakıldığında % serbest yağ asidi miktarlarının en yüksekte en düşüğe doğru 2-propanol, hekzan, etanol, metanol ve kloroform şeklinde

sıralandığı tespit edilmiştir. Serbest yağ asitliği değerleri arasında çözümlere göre istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu görülmüştür.

#### 4.9. Farklı Polaritedeki Çözgenlerin Algal Yağın Yağ Asitleri Kompozisyonuna Etkisi

*Nannochloropsis* sp. mikroalginden farklı polaritedeki solventlerle ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen yağa ait yağ asidi profili şekil 4.4.'de ve Çizelge 4.11.'de gösterilmiştir. *Nannochloropsis* sp. mikroalginin farklı polaritedeki solventlerle ekstraksiyonu sonucu elde edilen algal yağların doymuş yağ asitleri içeriğinde ( $\Sigma$ SFA), tekli doymamış yağ asitleri ( $\Sigma$ MUFA) içeriğinde ve çoklu doymamış yağ asitleri ( $\Sigma$ PUFA) içeriğinde istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) farklılıklar tespit edilmiştir (Çizelge 4.11.).



Şekil 4.5. Çözümlere göre yağ asitleri kompozisyonu

En düşük doymuş yağ asitleri (SFA) içeriği izopropil alkol ile hazırlanan örneklerde (40,03), en yüksek SFA içeriğine ise kloroform ile hazırlanan örneklerde (44,81) elde edilmiştir.

Tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) karşılaştırıldığında yine en yüksek MUFA kloroform ile hazırlanmış mikroalg örneklerinden (42,83) ekstrakte edilen yağda tespit edilirken bunu sırasıyla hekzan, metanol, etanol ve izopropil alkol ile hazırlanmış mikroalg örneklerinden ekstrakte edilen yağ örnekleri (41,67- 38,89- 38,83- 38,80) izlemiştir.

Sağlık açısından pek çok faydaları bulunan omega-3 yağ asitlerinin de dahil olduğu grup olan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) en çok metanol ile hazırlanmış örnekte (% 20,57) tespit edilmiştir. Kloroform ile hazırlanmış örneklerde ise en düşük PUFA içeriğine rastlanmıştır.

Yağ asitleri içerisinde en baskın asit palmitik asit olup toplam yağ asidi içeriğindeki oranı kullanılan çözümlere göre farklılık göstermektedir (% 33,24-37,92). Palmitik asitin en fazla elde edildiği çözümler kloroform, en düşük ise izopropil alkol olarak bulunmuştur. Farklı çözümlerin ekstraksiyonuyla yapılan benzer bir çalışmada palmitik asit (% 39) hakim asit olarak belirlenmiş ve çalışmamızla desteklenmiştir (Araujo vd 013).

*Nannochloropsis* sp. mikroalginden mikrodalga destekli solvent ekstraksiyonunda çözümler olarak metanol kullanılmış elde edilen verilere göre 14 adet yağ asidi çıkarılırken toplam SFA içeriği % 20,18, toplam MUFA % 50,8 ve toplam PUFA % 28,6 olarak tespit edilmiştir (Patil vd 2011). Tez çalışmasından elde edilen toplam SFA içeriği bu çalışmadan yüksek bulunurken, toplam MUFA ve PUFA içeriği düşük bulunmuştur.

Babuskin vd., (2014)'ün *N. oculata* mikroalg biyokütlesinin fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak kurabiye yapımında kullanım potansiyelinin araştırılması üzerine yapılan bir çalışmada *N. oculata* mikroalg yağının % 33,4 SFA, % 42,1 MUFA ve % 23,3 oranında PUFA içerdiği bildirilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı polariteye sahip çözügenlerin algal yağın yağ asitleri profiline etkisi

Yağ Asitleri (%)	H*	K*	M*	E*	P*
C10:0 (Kaprik asit)	0,33±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,26±0,03	0,32±0,01
C12:0 (Laurik asit)	0,26±0,02	0,33±0,01	0,38±0,01	0,32±0,01	0,26±0,01
C14:0 (Miristik asit)	3,28±0,25	4,44±0,03	5,09±0,04	4,47±0,04	3,76±0,05
C15:0	0,34±0,07	0,45±0,01	0,44±0,01	0,46±0,00	0,43±0,01
C16:0 (Palmitik asit)	37,89±0,52	37,93±0,12	33,49±0,15	34,57±0,25	33,85±0,19
C17:0	0,41±0,08	0,42±0,03	0,30±0,05	0,45±0,00	0,32±0,00
C18:0 (Stearik asit)	1,41±0,08	1,25±0,12	0,35±0,05	1,26±0,01	1,11±0,02
<b>ΣSFA**</b>	<b>43,92±1,17<sup>a</sup></b>	<b>44,81±0,00<sup>a</sup></b>	<b>40,04±0,28<sup>b</sup></b>	<b>41,77±0,28<sup>b</sup></b>	<b>40,03±0,28<sup>b</sup></b>
C16:1 (P.oleik asit)	29,36±1,02	30,48±0,12	29,25±0,26	28,72±0,24	27,79±0,24
C17:1	0,54±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C18:1 n-9 (Oleik asit)	11,78±1,57	12,35±0,13	9,64±0,36	10,11±0,04	11,01±0,04
<b>ΣMUFA**</b>	<b>41,67±0,85<sup>a</sup></b>	<b>42,83±0,01<sup>a</sup></b>	<b>38,89±0,14<sup>b</sup></b>	<b>38,83±0,39<sup>b</sup></b>	<b>38,80±0,19<sup>b</sup></b>
C18:2n-6 (Linoleik asit)	0,94±0,11	1,08±0,07	1,36±0,01	0,82±0,01	1,05±0,07
C18:3n-6 (γ-Linolenik)	0,45±0,11	0,67±0,00	0,69±0,06	0,48±0,01	0,73±0,06
C18:3n-3 (ALA)***	1,21±0,06	0,78±0,01	0,51±0,06	2,52±0,01	2,72±0,03
C20:3 n-3	0,50±0,02	1,32±0,49	2,81±0,02	2,54±0,01	3,93±0,06
C20:4n-6 (Arashidonik asit)	4,08±0,16	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C20:5 n-3 (EPA)***	5,83±0,07	7,19±0,08	14,46±0,23	10,41±0,31	9,09±0,19
C22:6 n-3 (DHA)***	0,21±0,01	0,27±0,02	0,76±0,03	0,43±0,02	0,32±0,02
<b>ΣPUFA**</b>	<b>13,23±0,33<sup>c</sup></b>	<b>11,30±0,22<sup>d</sup></b>	<b>20,57±0,08<sup>a</sup></b>	<b>17,19±0,19<sup>b</sup></b>	<b>17,83±0,00<sup>b</sup></b>
<b>PUFA/SFA</b>	0,30	0,25	0,51	0,41	0,44
<b>DHA/EPA</b>	0,03	0,03	0,05	0,04	0,03
<b>n-6/n-3</b>	0,70	0,18	0,11	0,08	0,10
<b>Tanımlanamayan</b>	1,17	1,06	0,51	2,22	3,34

\*H: Hezsan ile ekstrakte edilmiş alg biyokütlesi, K: Kloroform ile ekstrakte edilmiş alg biyokütlesi, M: Metanol ile ekstrakte edilmiş alg biyokütlesi, E: Etanol ile ekstrakte edilmiş alg biyokütlesi, P: İzopropil alkol ile ekstrakte edilmiş alg biyokütlesi

\*\*SFA: Doymuş yağ asitleri, MUFA: Tekli doymamış yağ asitleri, PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

\*\*\*ALA: Alfa-linolenik asit, EPA: Eikosapentaenoik asit.

\*Değerler, ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler (a, b, c ve d) değerlerin istatistiksel olarak ( $P<0,05$ ) önemli olduğunu belirtir

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında öncelikle *Nannochloropsis* sp. mikroalginin kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre 100 g kuru *Nannochloropsis* sp. mikroalginin 23,07±0,73 g'ı yağlardan oluştuğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasının birinci aşamasında kurutulmuş *Nannochloropsis* sp. mikroalginden yağ ekstraksiyon parametreleri maksimum yağ verimi ve omega-3 içeriği göz önünde bulundurularak optimize edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda en uygun çözgen:biyokütle oranının 19,9:1, ekstraksiyon süresinin 62,46 dk ve ekstraksiyon sıcaklığının 44,3 °C olduğu tespit edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin yağ verimine istatistiksel açıdan önemli ölçüde ( $P<0.05$ ) etkileri olduğu saptanmıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, belirlenen optimum ekstraksiyon koşulları uygulanarak, farklı polaritelere sahip 5 adet çözgen (hekzan, kloroform, metanol, etanol ve izopropil alkol) kullanılarak, dondurularak kurutulmuş mikroalg biyokütlesinden, ultrasonik destekli yağ ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ekstrakte edilen yağlara, yağ oksidasyon analizleri (peroksit, para-anisidin ve UV spektrum analizleri) uygulanmış, serbest yağ asitliği ve yağ asitleri kompozisyonu analiz edilmiştir.

En yüksek peroksit değeri 2-propanol örneğinde ( $P=3,97\text{meq/kg}$ ) tespit edilirken en düşük peroksit değeri ise kloroform örneğinde ( $K=1,45\text{meq/kg}$ ) belirlenmiştir. Ayrıca H, K, M ve E örneklerinin peroksit değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Kloroform ile hazırlanan örneklerin p-Av değeri (1,61) diğer çözgenlerle hazırlanan örneklerden yüksek bulunmuştur. Hekzan, metanol, etanol ve 2-propanol örneklerinin p-Av değeri kloroform ile hazırlanan örneklerden düşük olsa da aralarında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar görülmemiştir ( $P<0.05$ ).

% serbest yağ asidi miktarlarının en yüksekten en düşüğe doğru 2-propanol (6,803±0,402), hekzan, etanol, metanol ve kloroform (1,954±0,016) şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir. Serbest yağ asitliği değerleri arasında çözgenlere göre istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ).

Etanol ile hazırlanan örneklerin 232 ve 270 nm'deki UV spektrum değerleri (sırasıyla 4,041±0,005 ve 2,601±0,151) diğer çözgenlerle hazırlanan örnekler göre daha yüksek bulunmuştur. Hekzan, metanol ve 2-propanol örneklerinin UV spektrum değerleri kloroform ile hazırlanan örneklerin UV spektrum değerlerinden (sırasıyla 2,361±0,771 ve 1,255±0,428) yüksek olsa da aralarında istatistiksel açıdan önemli fark olmadığı bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

*Nannochloropsis* sp. mikroalginin farklı polaritedeki solventlerle ekstraksiyonu sonucu elde edilen algal yağların doymuş yağ asitleri içeriğinde ( $\Sigma\text{SFA}$ ), tekli doymamış yağ asitleri ( $\Sigma\text{MUFA}$ ) içeriğinde ve çoklu doymamış yağ asitleri ( $\Sigma\text{PUFA}$ ) içeriğinde istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) farklılıklar tespit edilmiştir.

En düşük doymuş yağ asitleri (SFA) içeriği izopropil alkol ile hazırlanan örneklerde (40,03), en yüksek SFA içeriğine ise kloroform ile hazırlanan örneklerde (44,81) elde edilmiştir

Tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) karşılaştırıldığında yine en yüksek MUFA kloroform ile hazırlanmış mikroalg örneklerinden (42,83) ekstrakte edilen yağda tespit edilirken bunu sırasıyla hekzan, metanol, etanol ve izopropil alkol ile hazırlanmış mikroalg örneklerinden ekstrakte edilen yağ örnekleri (41,67- 38,89- 38,83- 38,80) izlemiştir.

Sağlık açısından pek çok faydaları bulunan omega-3 yağ asitlerinin de dahil olduğu grup olan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) en çok metanol ile hazırlanmış örnekte (% 20,57) tespit edilmiştir. Kloroform ile hazırlanmış örneklerde ise en düşük PUFA içeriğine rastlanmıştır. Omega-3 yağ asitleri içerisinde ise hakim asit EPA olarak belirlenmiştir. Kullanılan çözümlere göre örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar (%5,83-14,46) bulunmuş, en yüksek EPA içeriği metanol ile yapılan ekstraksiyondan elde edilmiştir.

Yapılan tüm analizler sonucunda, doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi için en iyi çözümlerin kloroform, çoklu doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi için ise en iyi çözümlerin metanol olduğu belirlenmiştir. Tez çalışması sonucunda *Nannochloropsis* sp. mikroalginden, sağlık açısından oldukça önemli olan omega-3 yağ asitleri (özellikle EPA) eldesi ve maksimum yağ verimi için metanolün çözümler olarak kullanılmasının diğer çözümlere (hekzan, etanol, kloroform ve İzopropil alkol) kıyasla daha uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca metanolün diğer çözümlere göre daha ekonomik olması da ekstraksiyon işlemi açısından önem taşımaktadır.

**6. KAYNAKLAR**

- AKOWUAH G.A., ISMAİL Z., NORHAYATI I., SADIKUN A., 2005. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity, *Food Chemistry*, 93(2):311-317
- AKTAR S., CEBE G. E., 2010. Alglerin genel özellikleri, kullanım alanları ve eczacılıktaki önemi, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39 (3) 237-264
- ANONİM, 2014. <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/cm-cg-dha-epa-rich-schizochytrium-algal-oil.pdf>. (Erişim Tarihi: 03.04.2017)
- ANUAR N., ADNAN A.F.M., SAAT N., AZİZ N., TAHA R.M., 2013. Optimization of Extraction Parameters by Using Response Surface Methodology, Purification, and Identification of Anthocyanin Pigments in *Melastoma malabathricum* Fruit, *The Scientific World Journal*, 810547, 10
- AOAC, 1997. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th edn., AOCS Press, Champaign, Illinois.
- ARAUJO G.S., MATOS L.J.B.L., FERNANDES J.O., CARTAXO S.J.M., GONÇALVES L.R.B., FERNANDES F.A.N., FARIAS W.R.L., 2013. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1):95-98
- BABUSKIN, S., KRISHNAN, K. R., BABU, P. A. S., SIVARAJAN, M., SUKUMAR, M. 2014. Functional Foods Enriched with Marine Microalga *Nannochloropsis oculata* as a Source of omega-3 Fatty Acids. *Food technology and biotechnology*, 52 (3), 292-299.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37 (8), 911-917.
- BOX, G. E., BEHNKEN, D. W. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2 (4), 455-475.
- BULUT, Y., 2009. *Chlorella*'da (*chlorophyceae*) yağ miktarını artırma olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 62 sf.
- BÜYÜKTUNCEL, E., 2012. Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 32(2) , 209-242.
- CAPELO, J.L., MOTA, A.M. 2005. Ultrasonication for Analytical Chemistry. *Current Analytical Chemistry* 1(2):193-201

- CHATSUNGNOEN, T. 2015. An assessment of inexpensive methods for recovery of microalgal biomass and oils: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology at Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- DOS SANTOS, R. R., MOREIRA, D. M., KUNIGAMI, C. N., ARANDA, D. A. G., TEIXEIRA, C. M. L. L. 2015. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 95-99.
- DRIRA N., PIRAS A., ROSA A., PORCEDDA S., DHAOUADI H., 2016. Microalgae from domestic wastewater facility's high rate algal pond: Lipids extraction, characterization and biodiesel production, *Bioresource Technology*, 206:239-244.
- FRANKEL E.N., 1984. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(12): 1908–1917
- GONG, Y. M., HU, H. H., GAO, Y., XU, X. D., GAO, H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38 (12), 1879-1890.
- GRIMI, N., DUBOIS, A., MARCHAL, L., JUBEAU, S., LEOVKA, N. I., VOROBIEV, E. 2014. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, 153, 254-259.
- GROSSO C., VALENTÃO P., FERRERES F. and ANDRADE P.B., 2015. Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds, *Mar. Drugs*, 13(5): 3182-3230
- GUILLARD, R. R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals*, Springer 29-60.
- HELDRICH, K. 1990. Official methods of Analysis of the AOAC. Volume 2: Association of Official Analytical Chemists Inc.
- INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2015. Spectrophotometric investigation in the ultraviolet, COI/T.20/Doc. No 19/Rev. 3
- ISLAM M., AYOKO G., BROWN R., STUART D., HEIMANN K. 2013. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. *Procedia Engineering*, 56 ( 2013 ) 591 – 596
- JIANG, H., ZHANG, M., MUJUMDAR, A. S., LIM, R. X. 2013. Analysis of Temperature Distribution and SEM Images of Microwave Freeze Drying Banana Chips. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (5), 1144-1152.



- KARAMAN, S., Yağlı tohumlarda (%) ham yağ tayini.  
<http://gida.erciyes.edu.tr/dosyalar/dokumanlar/YA%C4%9E%20LAB%20F%C3%96Y/BYTUDModul-1.pdf>. [Son erişim tarihi: 04.04.2017]
- KUMAR M. and SHARMA M.P., 2014. Potential assessment of microalgal oils for biodiesel production: A review. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (3): 757-766
- LIU C.-Z., ZHENG S., XU L., WANG F., GUO C. 2013, Algal oil extraction from wet biomass of *Botryococcus braunii* by 1,2-dimethoxyethane, *Applied Energy*, 102:971-974
- LOPEZ-QUIROGA, E., ANTELO, L. T., ALONSO, A. A. 2012. Time-scale modeling and optimal control of freeze-drying. *Journal of Food Engineering*, 111 (4), 655-666.
- MA, Y. Q., YE, X. Q., HAO, Y. B., XU, G. N., XU, G. H., LIU, D. H. 2008. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (3), 227-232.
- MENÉNDEZ, J. M., ARENILLAS, A., MENÉNDEZ DIAZ, J. Á., BOFFA, L., MANTEGNA, S., BINELLO, A., CRAVOTTO, G. 2014. Optimization of microalgae oil extraction under ultrasound and microwave irradiation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89 (11), 1779-1784.
- METROUH-AMIR H., DUARTE C.M.M., MAIZA F., 2015. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*, *Industrial Crops and Products*, 67:249-256
- MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI, 2011. Kimya teknolojisi, Karışımları ayırma modülü, 524KI0234.
- OZOGUL, Y., OZYURT, G., OZOGUL, F., KULEY, E., POLAT, A., 2005. Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry* 92, 745–751.
- ÖZOGUL, Y., ÖZOGUL, F. 2007. Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chemistry*, 100 (4), 1634-1638.
- PATIL P.D., GUDE V.G., MANNARSWAMY A., COOKE P., MUNSON-MCGEE S., NIRMALAKHANDAN N., LAMMERS P., DENG S., 2011. Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology, *Bioresource Technology*, 102(2):1399-1405
- PLAZA, M., SANTOYO, S., JAIME, L., AVALO, B., CIFUENTES, A., REGLERO, G., REINA, G. G. B., SENORANS, F. J., IBANEZ, E. 2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *Lwt-Food Science and Technology*, 46 (1), 245-253.

- PRAGYA, N., PANDEY, K. K., SAHOO, P. 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171.
- REBOLLOSO-FUENTES, M. M., NAVARRO-PEREZ, A., GARCIA-CAMACHO, F., RAMOS-MIRAS, J. J., GUIL-GUERRERO, J. L. 2001. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2966-2972.
- REHMAN, Z., SALARIYA, A. M. 2006. Effect of synthetic antioxidants on storage stability of Khoa - a semi-solid concentrated milk product. *Food Chemistry*, 96 (1), 122-125.
- REICHARD, C., WELTON, T. 2010. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, Fourth Edition.
- RIOS, S. D., CASTANEDA, J., TORRAS, C., FARRIOL, X., SALVADO, J. 2013. Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production. *Bioresource Technology*, 133, 378-388.
- RYAN, L., SYMINGTON, A. M. 2015. Algal-oil supplements are a viable alternative to fish-oil supplements in terms of docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA). *Journal of Functional Foods*, 19, 852-858.
- RYCKEBOSCH, E., BRUNEEL, C., TERMOTE-VERHALLE, R., GOIRIS, K., MUYLAERT, K., FOUBERT, I. 2014. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry*, 160, 393-400.
- RYCKEBOSCH, E., MUYLAERT, K., FOUBERT, I. 2012. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89(2), 189-198.
- SABER M., NAKHSHINIEV B., YOSHIKAWA K., 2016. A review of production and upgrading of algal bio-oil, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58: 918-930
- SALDAMLI İ. 2007. Gıda Kimyası, Ankara, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, 587s.
- SINGH, J., GU, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 2596-2610.
- SPOLAORE P., CASSAN C., DURAN E., ISAMBERT A., 2006. Commercial Applications of Microalgae, *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 2, 87-96.

- SUGANYA T. AND RENGANATHAN S., 2012. Optimization and kinetic studies on algal oil extraction from marine macroalgae *Ulva lactuca*, *Bioresource Technology*, 107:319-326
- ŞAHİN Y., AKYURT İ., 2010. Planktonlar ve Fotobiyoreaktörler, *Karadeniz Fenbilimleri Dergisi*, 2, 83-92
- TOPUZ, O. K., GOKOGLU, N., YERLİKAYA, P., UCAK, I., GUMUS, B. 2015. Optimisation of antioxidant activity and phenolic compound extraction conditions from red seaweed (*Laurencia obtuse*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Basımda.
- TOPUZ, O. K., YERLİKAYA, P., UCAK, I., GUMUS, B., BUYUKBENLİ, H.A., GOKOGLU, N. 2015. Influence of pomegranate peel (*Punica granatum*) extract on lipid oxidation in anchovy fish oil under heat accelerated conditions. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52 (1), 625-632.
- TOPUZ, O. K., YERLİKAYA, P., UCAK, I., GUMUS, B., BÜYÜKBENLİ, H. A. 2014. Effects of olive oil and olive oil–pomegranate juice sauces on chemical, oxidative and sensorial quality of marinated anchovy. *Food Chemistry*, 154, 63-70.
- WANG S., ZHU J., DAI L., ZHAO X., LIU D., DU W., 2016. A novel process on lipid extraction from microalgae for biodiesel production, *Energy*, 115(1): 963-968
- WANG, G., WANG, T. 2012. Lipid and Biomass Distribution and Recovery from Two Microalgae by Aqueous and Alcohol Processing. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89 (2), 335-345.
- WANG, L. J., WELLER, C. L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), 300-312.
- YAO, L. X., GERDE, J. A., WANG, T. 2012. Oil extraction from microalga *Nannochloropsis* sp with isopropyl alcohol. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89 (12), 2279-2287

## ÖZGEÇMİŞ



Tuğçe AYGÜN 1989 yılında Diyarbakır'da doğdu. Lise öğrenimini Antalya Metin Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesinde tamamladı. 2008 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2013 yılında Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. Şubat 2014 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda öğrenimine devam etmektedir.

