



CHLORELLA VULGARIS BİYOFİLM KÜLTÜRLERİNDE AZOT AÇLIĞININ
LİPİD ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ersel ÇEÇEN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2019

CHLORELLA VULGARIS BİYOFİLM KÜLTÜRLERİNDE AZOT AÇLIĞININ
LİPİD ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ersel ÇEÇEN

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Tuba İÇA

Haziran-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ersel ÇEÇEN' in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı CHLORELLA VULGARIS BİYOFİLM KÜLTÜRLERİNDE AZOT AÇLIĞININ LİPİD ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ başlıklı bu çalışma, jürimizce Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

25/06/2019

Prof. Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Hayri DAYIOĞLU 4,
Anabilim Dalı Başkanı, Biyoloji Anabilim Dalı

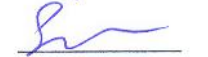
Prof. Dr. Tuba İÇA
Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Tuba İÇA
Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

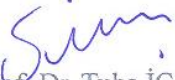
Doç. Dr. Ceylan AYADA
Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi

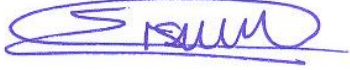
Doç. Dr. Cüneyt Nadir SOLAK
Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 16 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.


Prof. Dr. Tuba İÇA


Ersel ÇEÇEN



CHLORELLA VULGARIS BİYOFİLM KÜLTÜRLERİNDE AZOT AÇLIĞININ LİPİD ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ersel ÇEÇEN

Biyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tuba İÇA

ÖZET

Yapılan bu çalışmada *Chlorella vulgaris* mikroalginin biyofilm formu üzerinde azot (N) stresinin lipit üretimine etkisi araştırılmıştır. *C. vulgaris* mikroalgi 40 gün süresince %100 N ve %25 N içeren ortamlarda üremeye bırakılmıştır. Laboratuvar ortamına uygun olarak tasarladığımız dönen algal biyofilm reaktörü ile *C. vulgaris*' in biyofilm oluşturma yeteneğini gözlenmiştir. *C. vulgaris*' in reaktör üzerinde biyofilm oluşturabilmesi için çeşitli malzemeler denenmiştir. Hasat kolaylığı ve yüksek tutunma gibi kriterler nedeniyle polietilen halatı kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılan denemede en yüksek kuru ağırlık değeri 0,359 g/m² ile %100 N içeren ortamda elde edilmiştir. En yüksek total lipit miktarı ise 168,6 mg/g ile azot stresi uygulanmış %25 N içeren biyofilm formunda olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Azot (N) stresi, Biyofilm, Biyoreaktör, Chloropyceae, Döner algal biyofilm reaktörü (RABR), Klorofil-a, Kuru madde, Mikroalg, Planktonik form, Polietilen halat, *Chlorella vulgaris*, Total lipit.

THE EFFECT OF NITROGEN STARVATION ON LIPID PRODUCTION OF CHLORELLA VULGARIS BIOFILM CULTURES

Ersel ÇEÇEN

Biology, M. S. Thesis, 2019

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Tuba İÇA

SUMMARY

In this study, the effect of *Chlorella vulgaris* microalgae on the production of nitrogen stress on biofilm form was investigated. *C. vulgaris* microalgae were allowed to grow in environments containing %100 N and %25 N for 40 days. The ability of *C. vulgaris* to form biofilm was observed with the rotating algal biofilm reactor (RABR) designed in accordance with the laboratory environment. Various materials have been tried to form biofilm on the reactor of *C. vulgaris*. It was decided to use polyethylene rope due to criteria such as ease of harvesting and high adhesion quality. In the experiment, the highest dry weight value was 0,359 g/m² in an environment containing %100 N. The highest total lipid content was determined as 168,6 mg/g on the form of biofilm containing %25 N.

Keywords: Biofilm, Bioreactor, Chlorophyceae, Chlorophyll-a, Dry cell weight, Microalgae, Nitrogen (N) stress, Planktonic form, Polyethylene rope, Rotating algal biofilm reactor (RABR), *Chlorella vulgaris*, Total lipid.

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans öğrenimim süresince benden ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, büyük bir sabır ve titizlikle bilgi ve tecrübelerini aktararak gelişmemi sağlayan, insani değerlerini ve eğitimci kişiliğini örnek edindiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Tuba İÇA' ya saygılarımı sunuyor ve sonsuz teşekkür ediyorum. Üniversitemizin ileri teknoloji özelliklerine sahip Zoonozlar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çalışmama olanak sağlayan ve engin bilgileriyle yol gösteren hocam Prof. Dr. Anıl İÇA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin laboratuvar aşamalarında elinden gelen her türlü yardımı karşılıksız sunan, çok değerli arkadaşlarımla Fatma KAR ve Hasan İlkey YILMAZ' a tez çalışmam boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen Zoonozlar Uygulama ve Araştırma Merkezi sekreteri Barış KÜÇÜKAKSOY' a çok teşekkür ediyorum.

Son olarak bugün olduğum yere gelmemi sağlayan, beni hayatımın her döneminde koşulsuz şartsız destekleyen ve arkamda olan sevgili aileme sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Alglerin Tanımı.....	3
2.2. Taksonomideki Yeri.....	3
2.3. Alglerin Evrimi	3
2.4. Alglerin Anatomik Yapıları	4
2.4.1. Hücre duvarı	4
2.4.2. Hücre organelleri.....	4
2.5. Mikroalglerin Büyümesi Üzerine Etkili Olan Faktörler	5
2.5.1. Mikroalg kültürlenme sistemleri	5
2.5.2. pH.....	9
2.5.3. Işık.....	9
2.5.4. Sıcaklık.....	10
2.5.5. Besin elementleri.....	11
2.6. Mikroalglerin Fotosentez Tepkimeleri.....	12
2.7. Alglerin Lipit Kompozisyonları ve Üretim Mekanizmaları.....	15
2.8. Alglerin Lipit Üretim Mekanizmalarını Etkileyen Stres Koşulları ve Oluşturdukları Cevaplar	17
2.8.1. Sıcaklık stresi	18
2.8.2. Fosfor stresi	18
2.8.3. Tuz stresi	18
2.8.4. Işık stresi	18
2.8.5. Biyofilm formasyonu	19
2.8.6. Azot stresi.....	20
2.9. Mikroalglerin Endüstriyel Biyoyakıt Üretiminde Kullanılması.....	21
2.9.1. Elde edilen biyoyakıt türleri	21
2.10. Mikroalglerden Biyodizel Eldesi İçin Uygulanan Prosedürler	23

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.10.1. Piroliz	23
2.10.2. Mikro-emülsifikasyon	23
2.10.3. Transesterifikasyon	23
3. MATERYAL METOD	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Kullanılan alg türü ve kültür ortamı	25
3.2. Metod	25
3.2.1. Kültür koşulları	25
3.2.2. Dönen algal biyofilm reaktörünün (RABR) tasarlanması	28
3.2.3. Kuru madde analizi (DCW-Dry cell weight)	30
3.2.4. Optik dansite ölçümü	31
3.2.5. Klorofil-A tayini.....	31
3.2.6. Total lipit ekstraksiyonu.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. Kullanılan Alg Türünün Morfolojisi.....	33
4.2. Reaktörde Kullanılacak Materyalin Seçimi	34
4.3. Optik Dansite	36
4.4. Klorofil-A tayini	40
4.5. Kuru Madde Analizi.....	41
4.5.1. Planktonik form.....	41
4.5.2. Biyofilm formu.....	42
4.6. Total Yağ Miktarları	44
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR DİZİNİ	61
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Büyük ölçekli alg üretiminde kullanılan açık havuz sistemi	6
2.2. Tübüler alg sistemi	7
2.3. Kapalı fotobiyoreaktör	8
2.4. Dönen algal biyofilm reaktör	9
2.5. Görünür ışık şeması	15
2.6. Lipit biyosentezinin şematize hali.....	17
3.1. Planktonik formda %100 N M3N-BBM besiyeri ve %25 N M3N-BBM besiyeri (Orijinal).....	27
3.2. RABR' da kullanılacak silindir tekerlek ve motorun görünümü (Orijinal).	29
3.3. RABR'ın yan görünümü (Orijinal).	29
3.4. RABR' ın perspektif görüntüsü (Orijinal).	30
4.1. <i>C. vulgaris</i> mikroalginin mikroskobisi (Orijinal).	33
4.2. Silindir tekerleğin üzerinde biyofilm formasyonunun oluşması için denenen materyaller (A. plastik halat, B. polietilen halat, C. pamuk ip, D. yumuşak halat, E. sert seramik, F. hava taşı) (Orijinal).	35
4.3. Jüt ip üzerinde <i>C. vulgaris</i> ' in oluşturduğu biyofilmin SEM görüntüleri (Orijinal).	36
4.4. %100 azot ve %25 azotlu ortamlardaki planktonik formların OD karşılaştırılması.	37
4.5. %100 azot ve %25 azot ortamlarındaki biyofilm formlarının OD karşılaştırılması.	38
4.6. %100 N ortamındaki biyofilm formu ve planktonik formunun OD kıyaslanması.....	39
4.7. %25 azot ortamında biyofilm formu ile planktonik formunun OD kıyaslaması.....	40
4.8. %100 azot içeren ve %25 azot içeren planktonik formdaki klorofil-a miktarının kıyaslanması.	41
4.9. Planktonik formasyonlarında azot eksikliğine bağlı kuru madde miktarları (g/L).	42
4.10. Biyofilm formasyonlarında azot eksikliğine bağlı kuru madde miktarları (g/m ²).	44
4.11. Biyofilm ve planktonik formlarda kuru hücre ağırlığının (DCW) %100 azot bulunduran ortamda % yağ miktarı üzerine etkisi.	46
4.12. Biyofilm ve planktonik formda kuru hücre ağırlığının (DCW) N eksilmesi uygulanan koşullarında % yağ miktarına etkisi.	47
4.13. %100 azot bulunduran planktonik formdaki % total yağ miktarları ile kuru madde miktarı (g/L) kıyaslaması.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. %25 N içeren planktonik formun kuru madde (g/L) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırması.....	49
4.15. %100 N içeren biyofilm formun kuru madde (g/m ²) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırması.....	50
4.16. %25 N içeren biyofilm formun kuru madde (g/m ²) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırması.....	51
4.17. %100 N içeren planktonik formun klorofil-a (mg/L) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırılması.	52
4.18. %25 N içeren planktonik formun klorofil-a (mg/L) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırılması.	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. %100 N M3N-BBM besiyeri içeriği.	26
3.2. %25 N M3N-BBM besiyeri içeriği.	26
4.1. %100 azot bulunduran ve %25 azot bulunduran biyofilm ve planktonik formunun total yağ miktarları (mg/g).....	45



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
AT	Açıltransferaz enzimi
ACP	Açıl taşıyıcı protein
ADP	Adenozindifosfat
ATP	Adenozintrifosfat
CoA	Koenzim A
DCW	Dry Cell Weight (Kuru Hücre Ağırlığı)
DH	Dehidrataz enzimi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ER	Enoilredüktaz enzimi
EPS	Hücre dışı polimerik madde
FAS	Yağ asidi sentaz enzim
KAS	3-ketoaçıl ACP sentez enzim
KR	Ketoredüktaz enzim
NADP	Nikotinamidadenindinükleotit fosfat
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotit fosfat hidrojen
OD	Optik Dansite
SFA	Doymuş Yağ Asidi
PGA	Fosfogliserik asit
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
RABR	Dönen Algal Biyofilm Reaktörü
RNA	Ribonükleik asit
TE	Tioesteraz
M3N-BBM	Modified 3-N Basal Bold Medium

1. GİRİŞ

Günden güne artan dünya nüfusuyla birlikte enerji kaynağı olarak kullandığı fosil yakıtlarda da sürekli bir artış söz konusudur. 2010 yılında dünya enerji üretimi yaklaşık 40 yıldaki en yüksek yüzde artışı ile %5,6 artmıştır. Bu büyüme petrol, doğalgaz ve kömür de dâhil olmak üzere fosil yakıtların tüketiminde bir artış göstermiştir (Jones ve Mayfield, 2012). Günümüzde endüstrinin gelişmesiyle birlikte fosil yakıt kullanımının artışı sağlık problemleri, asit yağmurları ve iklim değişikliklerine neden olmasıyla birlikte yüksek enerji güvenilirliği ve daha az çevresel etkileri neden olabilecek yenilenebilir bir enerji kaynağına ihtiyaç vardır (Soydemir, 2016). Günümüzde petrol ve kömür gibi yenilenemeyen enerji kaynakları enerji ihtiyacı için kullanılmakta fakat bu kaynaklar çevreye ciddi zararlar vermekle birlikte keşfedilmesi ve işlenmesi zordur (Demirbaş ve Demirbaş, 2010). Gelişen insan nüfusunun enerji ihtiyacını karşılayabilmek için ilk olarak lipit depolayan bitkiler biyoenjeri kaynağı olarak kullanılmıştır. Ekim alanları ve düşük enerji gibi çeşitli problemler biyodizel üretimini kısıtlamıştır. İkinci nesil biyodizel olarak atıklar, özel hammadde, bitki ve orman kalıntıları gibi gıda dışı maddeler kullanılmış fakat düşük enerji nedeni ile bu yöntemde biyodizel üretimini kısıtlamıştır. Üçüncü nesilde ise fototrofik mikroalgler kullanılmış ve diğer iki enerji nesline göre daha yüksek yağ biriktirdiği belirlenmiştir (Ishikaa, vd., 2017). Mikroalgler CO₂' i kullanabilen canlılar olduğundan alg temelli teknolojiler, kömür ile çalışan termik santrallerdeki sera gazı ve karbon salınımının azaltılmasında kullanılabilmektedirler. Mikroalgler bitkiler için uygun olmayan koşullarda bile üreyebilirler ve diğer hammaddelerden daha yüksek yağ üretme potansiyeline sahiptirler. Algal lipitlerin verimi, bitkisel yağlardan elde edilen verime göre daha fazladır. Bu durum üretimi sağlanan alg türüne göre değişse de %2-%40 arasında yağ biriktirebilirler. Yeşil bir mikroalg olan *Chlorella vulgaris* yağ asidi miktarı olarak %14-%22' ye ulaşabilen ve biyodizel üretimi için kullanılabilecek bazı mikroalglerden daha verimli olduğu gözlemlenmiştir (Demirbaş ve Demirbaş, 2010). Biyodizel üretimi için mikroalgler gelecek vaat etse de ticari anlamda kullanılması için geliştirme çalışmaları yapılmalıdır (Cheng ve He, 2014). Mikroalg suşunun iyi seçilmesi, biyoreaktörün üretim amacına uygun dizayn edilmesi, kültürlenme sonrası uygulanacak işleme yöntemlerinin belirlenmesi, tüketeceği enerjinin ve kültürlenme maliyetinin iyi hesaplanması, biyoyakıt üretimi için gerekli koşulların biyomühendislik çalışmaları ile optimum hale getirilmesi gibi çalışmaların yapılması gerekmektedir (Chen vd., 2018). Fotosentetik canlılar olan mikroalgler acı, tatlı ve tuzlu sularda yaşayabilirler. Bu canlılar güneş ışığını biyokütle üretimi ya da biyodizel üretiminde kullanılan triaçilgliseroller (TAG) biriktirmek için kullanırlar (Gour, vd., 2016). Mikroalg temelli biyodizel karbonhidrat, biyokütle ve lipit verimliliği optimize edilerek ekonomik olarak

uygulanabilirliği arttırılabilir. Sıcaklık değimi, pH değışimi, azot veya fosfor eksiltmesi, ışık yoğunluğu gibi uyarıcılarla mikroalglerin lipit ve karbonhidrat içeriğı arttırılabilir (Pancha vd., 2014). Besin eksikliği alg biyokütlesinin lipit birikimini önemli derecede arttırabileceğini bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur. Örneğin; *C. vulgaris*' in bazı suşları üzerinde Griffiths ve arkadaşlarının (2011), yapmış oldukları çalışmada azot eksiltmesi uygulanan kültürlerde 7. günde %39, 14. günde %57' ye varan lipit konsantrasyonları gözlemlemiştir (Griffiths, vd., 2011), *Nannochloropsis sp.* üzerinde çalışan Rodolfi ve arkadaşları (2009), 3 günlük azot açlığıyla lipit birikiminde 4 kat artış belirlemiştir (Schnurr, vd., 2013). Her ne kadar mikroalgler biyoyakıt üretiminde umut verse de üretim sonrası biyokütle hasadı ekonomik açıdan sıkıntı oluşturmaktadır (Christenson ve Sims, 2011), (Uduman, vd., 2010). Sıradan bir yetiştirme yöntemi olan sıvı ortamda mikroalg üretmenin bazı gereksinimleri karşılamada yetersiz olmasından çalışmalar kısıtlanmaktadır. Bu gereksinimler arasında hasat işlemindeki zorluklar, işletme maliyetleri, fazlaca su ihtiyacı ve az miktarda biyokütle üretimi gösterilebilir. Günümüzde biyofilm temelli üretim mekanizmalarında su ve enerji ihtiyacının düşük olmasından dolayı oldukça ilgi görmektedir. Mikroalglerin katı bir substrata adsorbsiyonu sonucunda biyofilm oluşturdıkları yerler tıkanmaktadır. Fakat bu yenilikçi teknoloji geleneksel kültürlenme sistemlerine göre daha avantajlıdır. (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Bu sebeple, mikroalglerin ticari olarak üretim maliyetlerini minimuma indirebilmek için biyofilm sistemleri diğer kültürleme sistemlerinin bir alternatifi olabilmektedir. Fakat yapılan çalışmalar kısıtlıdır (Christenson ve Sims, 2012; Johnson ve Wen, 2010; Ozkan, vd., 2012; Irving ve Allen, 2011). Bu çalışmada geleneksel süspansiyon kültüründen farklı olarak işleme maliyetlerini azaltabilmek için mikroalglerde biyofilm oluşumunun sağlanabileceğı ortam kurulmuş olup, bu kültürlenme ortamında önemli bir stres koşulu olan azot stresi uygulanmış ve bu değışkenlerin lipit üretim mekanizması üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Alglerin Tanımı

Tek veya çok hücreli formları bulunan sucul fotosentetik organizmalardır. Algler ilk zamanlarda suda yaşayan bitkiler olarak tanımlanmasına rağmen bitkiler gibi vasküler sistemleri, kökleri olmadığı ve embriyoları oluşturmadıkları için ayrı bir kategoride sınıflandırılmaktadırlar (Sankaran, vd., 2018). Algler, denizlerde ve tatlı sularda gelişim gösterebilen ototrofik canlılardır. Cyanobacteria ve diatomlar gibi tek hücreli küçük mikroalglerden, kelp yosunu gibi çok hücreli makroalgelere kadar geniş bir yelpazeye sahiptirler (Bule, 2018). Boyutları 3 µ' dan 70 cm' ye kadar farklılık gösterebilir. Gün içerisinde 50 cm' ye varan büyüme gösteren alg türleri de mevcuttur (Aktar ve Cebe, 2010).

Algler kolayca tanımlanamazlar. Bunun nedeni tek bir monofiletik gruplarının olmamasıdır. Özgün türleri belirli habitatlarda yaşayabilse de, algler her yerde bulunabilir. Bazı algler hayvanlar gibi hareketli, bazıları su içinde asılı bir şekilde, bazıları ise diğer canlılarla ortak bir yaşam birlikteliği gösterebilirler (Richmond, 2013).

2.2. Taksonomideki Yeri

Mikroalg ve makroalg olmak üzere iki sınıfı ayrılan algler fotosentetik sucul canlılardır. Mikroalgler fotosentez yapabilen, tatlı ve tuzlu su ortamlarında yaşayabilen mikroskopik canlılardır. Hücre yapılarına, pigmentlerine ve yaşam döngülerine göre sınıflara ayrılmışlardır. En önemli üç alg sınıfı; yeşil algler (*Chlorophyceae*), siyanobakteriler (mavi-yeşil algler), diatomlar (*Bacillariophyceae*) dır.

Makroalgler pigmentlerine göre üç geniş gruba ayrılmıştır. Bunlar; yeşil deniz yosunu (*Chlorophyceae*), kırmızı deniz yosunu (*Rhodophyceae*), kahverengi deniz yosunu (*Phaeophyceae*) (Demirbaş, 2010).

2.3. Alglerin Evrimi

Bulunan kalıntılarda takribi 3,8 milyar yıl öncesine ait olduğu düşünülen prokaryotik siyanobakteri fosilleri, bilinen tarihten bu yana dünyanın oksijenini sağlayan fotosentezi gerçekleştirdiği bilinmektedir. Yine takribi 2 milyar yıl önce ortaya çıktığı düşünülen ökaryotik alglerin, kökeni henüz kesin olarak bilinmemektedir. Ökaryotik alglerin plastid yapısı onları fotosentetik protistalardan ayırmaktadır. Plastid genomunun kökeni primer endosimbiosise dayanmaktadır. Primer endosimbiosis, 2 milyar yıl önce bir siyanobakterinin fotosentetik özellik göstermeyen bir ökaryot canlının içerisine girmesiyle başlamaktadır. Fotosentetik

olmayan ökaryotik canlı, içeriye giren bu siyanobakteriyi sindirim enzimleri ile parçalamak yerine onu bir işçi gibi kullanmaya başlamış ve zamanla bu işçi konak içine yerleşerek kloroplasta dönüştüğü düşünülmektedir (Richmond, 2013).

2.4. Alglerin Anatomik Yapıları

3,5 milyarlık evrimsel süreç ve çevre adaptasyonları sayesinde alglerin yapısı geniş bir filogenetik çeşitliliğe sahiptir. Siyanobakteriler kısmen daha basit hücre yapısına sahiptir ve bu nedenle bakterilerle büyük ölçüde benzerlik göstermektedirler. Ökaryotik özellik gösteren hücreler daha karmaşık bir yapı göstermektedir. 2 milyar yıllık bir evrim süreci sonucunda oluşan bu ökaryotik yapılar, tanımlanan alg sınıfları içerisinde ve tür içinde önemli ölçüde farklılıklar gösterir. Ökaryotik alglerin bir çekirdeği, mitokondrisi, endoplazmik retikulumu, golgi cisimciği, bir veya daha fazla kloroplastları ve diğer tipik ökaryotik alg organellerini bulundurlar (Richmond, 2013).

2.4.1. Hücre duvarı

Algal hücre duvarı, sitoplazmayı komple saran, turgor basıncında gerçekleşen değişikliklere bağlı olarak hücrenin patlamasını engelleyen çok sağlam bir yapıdadır. Alg grupları arasında hücre duvarının biyokimyasal yapısı farklılıklar göstermektedir. Örneğin; *Chlorophyta* (yeşil algler)' da hücre duvarı glikoprotein, selüloz, peptidoglukan, hemiselüloz ve pektik bileşiklerden oluşurken, siyanobakterilerde genellikle fibril tabakalar ve peptidoglukandan oluşmaktadır (Richmond, 2013).

2.4.2. Hücre organelleri

Alglerdeki endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği gibi organeller yapı olarak ökaryot organellerine benzerler ve bu organelleri flagella ve diğer yapıları üretmekte kullanırlar. Flagella oluşumu birçok aşamadan oluşur. İlk oluşturulan flagellaya “olgunlaşmamış flagella” adı verilir. Hücre bölünmesinde olgunlaşmamış flagella yerini “olgunlaşmış flagellaya” bırakır. Bu sürece “flagellar dönüşüm” adı verilir. Alglerde göz lekeleri bulunur ve bunlar flagella ile ortak çalışırlar. Görevleri ışığın yönünü tespit edip flagella ile birlikte fototaksis olayını gerçekleştirmesini sağlamaktır. Alglerdeki vakuoller hücre elemanlarının yeniden işlenmesinden ve parçalanmasından oluşan yan ürünleri depolamak için kullanırlar. Hayvanlara ve bitkilere göre alglerdeki mitokondrinin çeşitliliği daha fazladır. Bitki veya hayvanlardaki yassılaştırmış mitokondriyal kristaya yeşil ve kırmızı alglerde sahiptirler (Richmond, 2013). Ökaryotik alglerde kloroplast baskın bir organeldir. Tilakoid zarlarında fotosentez için gerekli olan ışığı

yakalamakla görevli olan pigmentler bulunmaktadır. Alg grupları arasında tilakoid zarlar şekil olarak farklılık gösterir. Fotosentatlarını kloroplastta depolayan sadece yeşil alglerdir. Bu yüzden plastidlerinin içinde nişasta tanecikleri gözlenebilir. Diğer algler lipit ve karbonhidrat depolamasını plastid dışında gerçekleştirir. Lipit cisimleri sayısı ve büyüklüğü besin açlığı ve yüksek ışık stresi ile atar (Ball, vd., 2011).

2.5. Mikroalglerin Büyümesi Üzerine Etkili Olan Faktörler

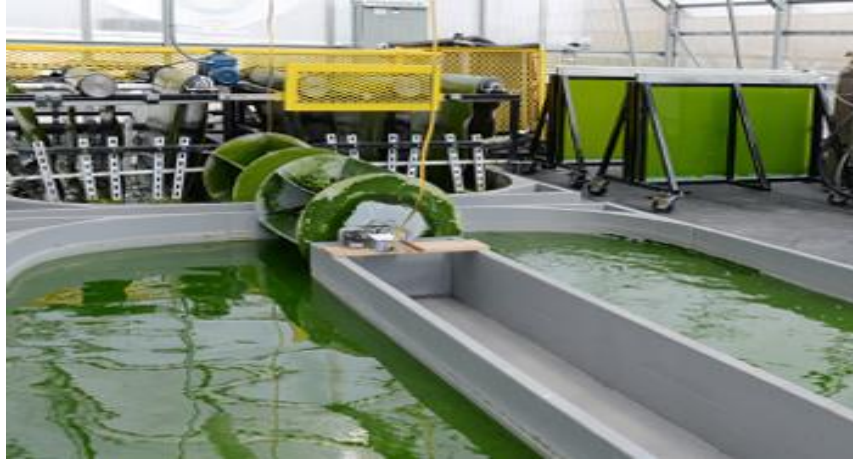
Türler arasında gelişen rekabet ve kültürlenme sistemlerine virüs bulaşması gibi biyolojik faktörler, ışık ve sıcaklık gibi fiziksel faktörler, besin elementleri ve karbondioksit gibi kimyasal faktörlerden alglerin büyüme hızı etkilenir. Reaktör tasarımı, seyreltme oranı ve karıştırma gibi operasyonel faktörler yukarıdaki durumları etkiler (Larsdotter, 2006).

2.5.1. Mikroalg kültürlenme sistemleri

Açık ve kapalı sistem olmak üzere mikroalg yetiştirmede kullanılan iki sistem vardır. Açık kültürlenme sistemleri atmosferik havayla temas halinde olduğundan burada bulunan etmenlerden kolayca etkilenebilirler. Kapalı sistemlerde büyüme koşulları açık sistemlere göre daha iyi kontrol edilebilir. Ancak açık kültürlenme sistemlerin inşa edilmesi ve sistemin çalıştırılması kapalı sistemlere göre daha kolay olduğundan daha fazla tercih edilmektedir (Larsdotter, 2006).

Açık sistemler

Büyük ölçekli alg endüstrisinde, oluklu havuz biçiminde veya yuvarlak göletler halinde dönen bir kol ile karıştırılan sistemler kurulur (Şekil 2.1). Kıvrımlı bir şekilde tasarlanan oluklu havuzlar kürek şeklinde yavaş dönen çarklarla karıştırılır. Bir metreden daha derin olan fakültatif havuzlarda algler yüzeye yakın bulunurlar. Bu havuz dibinin oksijensiz olmasından kaynaklıdır (Larsdotter, 2006). Atmosferdeki güneş ışığı ve karbondioksiti kullanarak açık sistemlerdeki maliyet düşürülebilir. Ancak mevsimsel olarak değişen durumlar mikroalgleri olumsuz etkileyebilir. Kurulan açık havuz sistemleri veya oluklu kanallar 0,2-0,3 m derinliğe göre kurulur. Bunun nedeni mikroalglerin güneş ışığını daha verimli alabilmesini sağlamaktır. Açık sistemlerde sterilizasyon sağlamak imkansız yakın olduğundan kontaminasyonun önüne geçilemez. Fotobiyoreaktöre göre açık sistemlerin bazı avantajları olsa da düşük verimliliklerinden dolayı dezavantajları da vardır (Gong ve Jiang, 2011).



Şekil 2.1. Büyük ölçekli alg üretiminde kullanılan açık havuz sistemi (<http://www.biocenturyresearchfarm.iastate.edu/facilities/algal-productionfacility.html>).

Kapalı sistemler

Fototrofik canlıların üretildiği veya fotobiyolojik bir reaksiyonun gerçekleştirildiği reaktörler fotobiyoreaktör olarak adlandırılır. Açık sistemlere göre fotobiyoreaktörler, mantar, bakteri gibi mikroorganizma kontaminasyonu ya da türler arası rekabetten kaynaklı inoküle edilen orijinal türün diğer mikroalg türlerinin baskılanmasından korunmasını sağlar ve istenilen türün baskınlığını sağlayacak koşulların daha iyi kontrol edilebileceği kapalı kültür ortamı sağlar (Richmond, 2014).

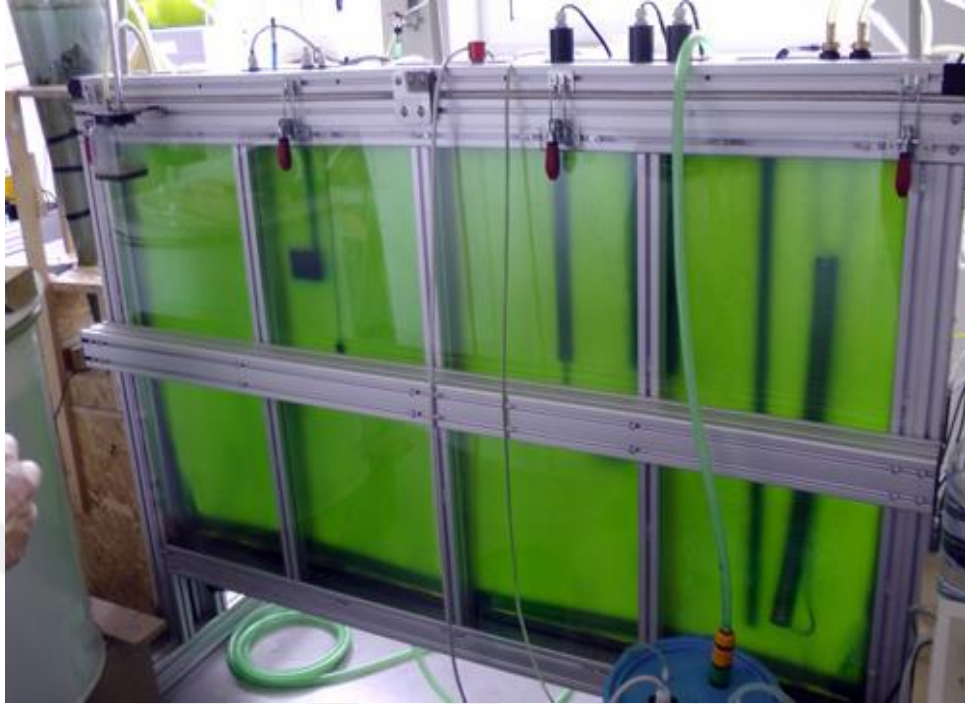
Tübüler reaktörler (Şekil 2.2) ve kapalı fotobiyoreaktörler (Şekil 2.3) olmak üzere iki ana tip foto-reaktör vardır. Tübüler fotobiyoreaktörlerde ışığın temas yüzeyi oldukça geniştir. Dış mekân kültürlenmesine ve ticari anlamda büyük biyokütle üretimine elverişlidir. İç mekânda kurulan fotobiyoreaktörler de güneş ışığı kullanılmadığı için halojen lambalar kullanılır. Dış mekân fotobiyoreaktörlerinde kültür ortamlarının karışmaması ve maksimum verimliliğe ulaşabilmek için hava pompaları kullanılmaktadır. Sıcaklık değişimleri, ışık, pH, CO₂ ve çözünmüş O₂ değerleri fotobiyoreaktörlerin üretkenliklerini etkileyebilir. Biyokütle konsantrasyonu, aydınlatma süresi ve ışık doygunluğu mikroalglerin büyüme hızını etkileyebilmektedir (Chisti, 2008).

Fotobiyoreaktörler, kültürün atmosferden doğrudan gelecek olan gazların ve kirleticilerin geçişini engellerken aynı zamanda kültür ortamına sınırlayıcı etki göstermez (Richmond, 2014). Düşük kirlenme, minimum buharlaşma, yüksek verimlilik, düşük CO₂ kaybı, yüksek alg yoğunluğu ve kültür ortamının kontrolünün daha iyi olmasıyla fotobiyoreaktörler

açık sistemlere göre avantajlıdır. Kurulum, işletme ve bakım maliyetleri fotobiyoreaktörler için dezavantaj olsa da yüksek biyokütle verimliliği bu durumu telafi edilebilmektedir. Buna rağmen kurulum maliyetinin yüksek olması, algal biyodizelin üretimi sınırlandırmaktadır (Gong ve Jiang, 2011).



Şekil 2.2. Tübüler alg sistemi (<http://www.varicon aqua.com/products-services/phyco-flow/>).



Şekil 2.3. Kapalı fotobiyoreaktör (<https://qubitbiology.com/photobioreactors-2/>).

Dönen algal biyofilm reaktörü

Dönen algal biyofilm reaktörü (RABR), suyla temas eden, üzerinde biyofilm oluşumu için yerleştirilmiş bir substrat yüzeyi olan silindirin, mikroalgal biyokütleleri su içine ve dışına döndürerek güneş ışığına ve besine mikroalgal biyokütlenin eşit şekilde temas etmesini sağlayan biyofilm temelli bir reaktördür (Şekil 2.4). Geleneksel büyütme sistemlerine kıyasla dönen algal biyofilm reaktörleri santrifüjleme, polimer ve sedimentasyon işlemlerini ortadan kaldırarak maliyetli hasat işlemlerini azaltabilir. Toplanan biyofilmlerden zengin besinli hayvan yemi, biyoplastik, farmasötik bileşikler ve biyoyakıt elde edilebilir (Fica ve Sims, 2016).

RABR kanal havuzlarına kıyasla üç boyutlu olmasında dolayı dikey olarak alg üretebilmesi iki boyutlu olan kanal havuzlarına göre daha az bir alanda kurulabilip mekan sıkıntısının olduğu yerlerde ekim yapılmasında avantaj sağlar (Gross, vd., 2015).



Şekil 2.4. Dönen algal biyofilm reaktör (Smith, vd., 2013).

2.5.2. pH

Mikroalglerin metabolik faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi için pH değeri önemli bir faktördür. pH değeri 10-11 düzeyini aştığından mikroalg gelişimi engeller. 7-9 arasındaki pH değerleri çoğu alg türünün gelişimi için optimum değerdir, fakat bazı alg türleri asidik veya alkali koşullarda gerekli gelişimi gösterebilirler. pH değerleri nitrat ve karbondioksit alımında yükselirken amonyak alımında azalmaktadır. Aynı zamanda fotosentez esnasında CO_2 ' i kullandıklarından ortam pH'ı yükselir. pH değerinin yükselmesini kontrol altında tutmak için asetik asit (CH_3COOH) ya da hidroklorik asit (HCl) kullanılmaktadır. CH_3COOH mikroalgler için bir karbon kaynağı olduğundan, mikroalg gelişiminde HCl ' ye göre daha fazla avantajı vardır (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

2.5.3. Işık

Fotosentetik canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için ışık zorunlu bir faktördür. Biyokütle üretiminde ışık optimum düzeyde olmalıdır. Bunun nedeni fotosentetik büyümenin hücrelerin kullandığı ışık enerjisi ile doğru orantıda olmasındandır. Işık yoğunluğunun artması fotosentetik büyümenin hızını arttıracak gibi belirli bir düzeyin üstüne çıkması durumunda büyümeyi kısıtlayabilmektedir. Organizmaların yüksek ışığa maruz kalmaları fizyolojik dengelerini bozabilir hatta organizmada büyük zararlara yol açabilmektedir (Richmond, 2014).

Mikroalgler ışığı yakalamak için fotosistemlerinde bulun antenleri kullanırlar ve bu antenler fotonları yakalayıp fotosentez reaksiyon merkezine göndermede görev alır. Farklı ışık yoğunluklarına adapte olmak için mikroalgler antenlerin boyutunda ve fotosistem sayılarında değişik yapabilirler. Kültür ortamlarında ışık kaynağı doğal ya da yapay olarak kullanılabilir. Örneğin, laboratuvar ortamlarında güneş gibi doğal bir ışık kaynağı kullanılamayacağından yapay ışık kaynağı olarak floresan lambalar kullanılmaktadır. Fakat floresan lambaların çeşitli tipte ve buna bağlı olarak yaydığı ışık miktarının farklı olmasından dolayı kullanılacak lambanın özelliklerine dikkat edilmelidir (Çakmak, 2013).

Fotosentetik mikroalgler, fotosentez reaksiyonlarını gerçekleştirebilmek için ışık ve karbondioksiti kullanmaktadırlar. Emilen ışık enerjisi, adenozintrifosfat (ATP) ve nikotinamadeninükleotit fosfat (NADP)' a dönüştürülür. Mikroalgler fotosentez tepkimelerini gerçekleştirebilmek için 400-700 nm arasındaki ışıktan faydalanırlar. Mikroalg türüne göre soğurulan ışığın dalga boyları farklılık göstermektedir. Örneğin, yeşil mikroalgler 450-475 nm ile 630-675 nm dalga boyundaki ışığı fotosentezde kullanmak için soğurmaktadırlar. Genel olarak çoğu fotosentetik mikroorganizmaların $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ aydınlatma düzeyinde doygunluğa ulaştığı bilinmektedir (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

2.5.4. Sıcaklık

Sıcaklık biyokimyasal reaksiyonlar üzerinde bir etkiye sahiptir. Bu da sıcaklığın alglerin biyokimyasal yapıları üzerinde etkili olan en önemli çevresel etmen haline getirmektedir. Büyüme için gerekli olan optimal sıcaklığın düşürülmesi membran sistemindeki doymamış lipid miktarını arttırmaktadır. Tilakoid membranların artan akışkanlığı ve stabilitesi düşük sıcaklıklarda meydana gelen foton inhibasyonuna karşı fotosentetik canlıyı korumaktadır (Çakmak, 2013).

Bazı alg türleri yüksek sıcaklıklarda hayatını devam ettiremezken, bazıları yüksek sıcaklıklardan etkilenmeden canlılığını sürdürebilmektedirler. Bu yüzden kültürlenmesi sağlanacak alg türünün yaşayabildiği sıcaklık değerleri bilinmelidir. Mikroalglerin üretiminde genellikle 16-27°C sıcaklık değerleri tercih edilmektedir. Çünkü 16°C' nin altındaki sıcaklıklarda üreme minimuma inerken, 35°C' nin üstüne çıkan sıcaklıklar öldürücü etki göstermektedir (Çakmak, 2013).

Fotosentez ve solunum reaksiyonlarının oranlarını koruyabilmek için büyüme sıcaklığının optimal değerlerin altına düşürülme mekanizması kullanılabilir. Ancak bunun üretilen enzim miktarının artmasına neden olabileceği de tespit edilmiştir. Ayrıca optimal

değerin altında kalan sıcaklıklar aminoasitlerin ve türevlerinin hücre içerisinde birikimini artırır. Biriken bu maddeler mikroalgin soğuk havaya karşı olan toleransını ve dayanıklılığını arttırabilir (Richmond, 2014).

2.5.5. Besin elementleri

Mikroalgler fototrofik üremelerinde mikro elementleri, makro elementleri ve vitaminleri kullanırlar. Makro elementlerden olan azot (N), aminoasitlerin ve nükleik asitlerin temelini oluşturduğundan en gereksinim duyulan elementtir. Bundan dolayı azot eksikliği mikroalg gelişimi etkiyen bir faktördür. Yapılan çalışmalarda yağ biyosentezinde ve biriktirilmesinde azot sınırlamasıyla ve azotun ortamdan çekilmesiyle başarılı olunmuştur (Chisti, 2007). Nitrit (NO_2), nitrat (NO_3), amonyum (NH_4) veya üre mikroalgler tarafından azot kaynağı olarak kullanılırlar. Kullanımlarında öncelik sırasına NH_4 -üre- NO_3 - NO_2 şeklinde gerçekleşmektedir (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

Yapısal ve fonksiyonel maddeleri oluşturmakta, hücre içi metabolik olaylarda ve mikroalglerin gelişmesinde fosfor (P) elementi önemli rol alır. Fosfor ortamda K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ gibi P tuzları biçiminde bulunmaktadır. Mikroalgler üzerinde fosfor sınırlaması uygulamak lipid üretimini uyarıcı etkisi olduğu bilinmektedir (Çakmak, 2013). Fosfor fotosentez, solunum reaksiyonları ve enerji transferi gibi hücre için önemli olan reaksiyonlarda görev alan bir elementtir (Elcik ve Çakmakçı, 2017). Biotin ve tiamin gibi vitaminlerin yapısında bulunan kükürt (S), N ile beraber proteinlerin yapıtaşını oluşturmaktadır. Moleküler S hücre içinde organik kükürde dönüştürülerek sülfat iyonu şeklinde tekrar kükürt üretilebilmesi için biriktirilir (Çakmak, 2013). Eriyebilir tuz halinde organizmalarda bulunan potasyum, hücre ozmatik basıncının düzenlemesinde rol alır. Özellikle erimiş K^+ katyonu halinde bulunarak turgor basıncının oluşmasını da sağlar. Bunların yanında solunum ve fotosentez enzimlerinin aktifleştirmede de rol oynarlar (Çakmak, 2013). Hücre çeperinin sentezlenmesinde rol alan kalsiyum, hücre içinde Ca^{+2} iyonu şeklinde bulunurlar. Organizmanın çevresel etkilere verdiği tepkilerin sekonder habercisi olarak görev aldığı da bilinmektedir (Çakmak, 2013). Klorofil molekülünün yapısının oluşumunda gerekli olan magnezyum ayrıca hücre içinde Mg^{+2} iyonları halinde bulunarak DNA ve RNA sentezindeki enzimlerin aktif hale gelmesinde, solunum ve fotosentez reaksiyonlarında da rol alır (Çakmak, 2013).

2.6. Mikroalglerin Fotosentez Tepkimeleri

Fotosentez, güneş ışığındaki enerjinin dönüştürülmesini simgeleyen bir reaksiyondur. Bu reaksiyonda, fototroflar güneşten gelen ışığı ve inorganik bileşikleri kullanarak organik bileşikleri sentezlemektedir. Dünya üzerindeki bütün canlılar, metabolizmal reaksiyonları ve büyümelerinin gerçekleşebilmesi için direkt ya da indirekt olarak fotosentez olayına gereksinim duymaktadırlar (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

Ökaryotik ve ototrofik özellik gösteren mikroalgler içerdikleri pigmentlere göre şu sınıflara ayrılmaktadırlar; Rhodophyta, Chrysophyceae, Phaeophyceae ve Chlorophyta. Bu fotosentetik pigmentler kloroplastın içerisindeki tilakoid membranlarda ve kloroplastın stromasında bulundurmaktadırlar (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

Oksijenin kullanıldığı fotosentez reaksiyonları karbondioksit ve suyun karbonhidratlara dönüştürülmesi için soğurulan ışığın yardımcı olduğu bir tepkime olarak nitelendirilebilmektedir. Fotosentez iki aşamada gerçekleşen bir reaksiyon dizisidir. Bu aşamalar, ışığa bağımlı reaksiyonlar ve ışıktan bağımsız reaksiyonlar olarak isimlendirilir. Işığa bağımlı tepkimelerde fotosentetik zarlar ışık enerjisini, NADPH ve ATP' ye dönüştürür. Kloroplastın stromasında meydana gelen ışıktan bağımsız tepkimelerde ise karbondioksit karbonhidrata dönüştürülürken, ışığa bağımlı tepkimelerde üretilmiş olan ATP ve NADPH kullanılmaktadır (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

Yapılan çalışmalara göre ışık foton adı verilen paket formlar şeklinde yayılmaktadır. Fotosenteze yardımcı olan pigmentler fotonların enerjisini soğurur ve kimyasal olaylar için gerekli olan tepkime merkezine aktarır. Fotondaki elektronları klorofilden koparabilmek için ATP' ye ihtiyaç vardır. Görünen ışığın dalga boyları 380 nm' den, 750 nm' ye kadar değişkenlik göstermektedir (Şekil 2.5). Fotosentetik etkinlik ışığın dalga boyu ile ilişkilendirilebilmektedir. Mikroalgler fotosentez tepkimesini gerçekleştirebilmek için 400 ve 700 nm dalga boylarındaki ışığı tercih ederler. Soğurulan ışığın dalga boyu mikroalg türüne göre çeşitlilik gösterebilmektedir (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

Fotosentez yapan canlılar ışıktaki enerjiyi soğurabilmek için bazı pigmentlere gereksinim duymaktadır ve bu pigmentler klorofil, karotenoid ve fikobilinler olmak üzere 3 ayrı başlıkta incelenmektedirler (Richmond, 2014).

Klorofil pigmenti, ortasında Mg^{+2} atomu ihtiva eden tetrapirel bir halka ve uzun zincirli bir alkolün birleşiminden oluşmaktadır. Klorofil pigmentinin a, b, c, d olarak isimlendirilen

çeşitli yapısal formları bulunmaktadır. Klorofil a tüm fototroflarda reaksiyon merkezinde bulunmaktadır. Fotosentez için kullanılacak olan ışığın absorpsiyonunda ise klorofil b ve c bulunmaktadır. Anten pigmentleri olarak görev yapan klorofil b, c ve d ışığın absorpsiyon aralıklarının genişletilmesinde görevli olan pigmentlerdir (Richmond, 2014). Klorofil ve karotenoid pigmentlerinin miktarlarının ölçülmesi için metanol, etanol gibi organik maddeler kullanılmaktadır. Organik maddelerde çözünen örneklerin absorpsiyon spektrofotometrik olarak belirlenebilir ve belirlenen matematik formülleriyle hesaplanabilmektedirler (Lichtenthaler ve Wellburn, 1983).

Fotosentez tepkimelerindeki ışığa bağımlı reaksiyonlar tilakoid zarlarda gerçekleşmektedir. Gelişmiş bitkilerin kloroplastında grana olarak isimlendirilen üst üste dizilmiş tilakoidler bulunmaktadır. Bu grana yapısı “stromal lamella” ile birbirlerine bağlıdır. Çoğu alg türünde bu tilakoid zarlar üçlü diziler halinde istiflenmiştir. Bu tilakoidler 5 ana yapıdan oluşmaktadır. Bunlar ışık absorpsiyonunu sağlayan anten pigmentleri, fotosistem II (PSII) ve fotosistem I (PSI), sitokrom-b₆/f, fotosentetik elektronların taşınmasını ve fotofosforilasyonu sağlayan ATPsentaz pompasıdır (Richmond, 2014).

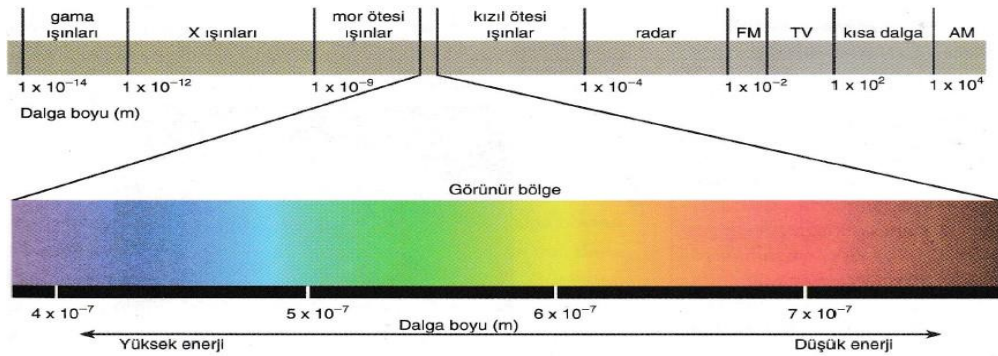
Işığa bağımlı reaksiyonların ana görevi, karbon özümlemesi için gereken NADPH ve ATP’ nin üretim tepkimelerini gerçekleştirmektir. Işık, fotosistem I ve fotosistem II olarak adlandırılan bir kompleks tarafından absorbe edilir ve bu sistemler Z şeklinde dizayn edilmiş bir elektron taşıma sistemi (ETS) ile birlikte çalışmaktadır. Işığın absorpsiyonunun akabinde su hidrolize edilir, sudan gelen iki elektron ve hidrojenlerin katkısıyla NADPH üretilmiş olur. Bununla birlikte bir pH değişikliği oluşturmak için hidrojenler tilakoid boşluğa pompalanmaktadır. Kemiosmotik hipoteze göre ATPsentaz pompası adı verilen yapı sayesinde pompalanan hidrojenlerin yardımıyla ATP üretilir (Richmond, 2014).

Işığa bağımlı olmayan reaksiyonlarda karbondioksitin özümlemesi için iki molekül NADPH’ a ve üç molekül ATP’ ye gereksinim duyulmaktadır. Bu mekanizma 1940’ lar da Calvin ve Benson isimli bilim insanları tarafından keşfedilmiş ve karbondioksitin şekerlere dönüştürülebilmesi için dört farklı aşamadan geçmesi gerektiğini rapor etmişlerdir. Karbondioksit öncelikle Rubisko olarak adlandırılan bir enzim yardımıyla kataliz edilir. Bu reaksiyon sonucunda elde edilen ilk 6C’ lu kararsız ara bileşikten karbon azaltmak için NADPH ve ATP kullanılarak gliseraldehid (PGAL) oluşturulmaktadır. Elde edilen PGAL’ nin bir kısmı döngünün sürdürülebilmesi için rübilozbifosfat adı verilen bileşiğe dönüşümü sağlanır ve bu basamakların her biri birer enzimatik reaksiyondur. Gerçekleşen döngünün neticesinde elde

edilen birincil ürün karbonhidratlardır. Fakat bunun yanında organik asitler, aminoasitler ve yağ asitleri de fotosentez tepkimesinin karbon yakalama basamağında üretilir (Richmond, 2014).

Yağ asitleri ve triaçilgliseroller (TAG), fotosentezin karbon fiksasyonunda sentezlenmektedir. Bu tepkimelerin meydana gelme basamakları herhangi bir organizmanın üretilen yağ asitlerinin öncül maddelerinin eldesini ve buna bağlı olarak TAG' ların sentezlenme ve depolanabilme kabiliyetlerini etkileyebilmektedir. Elde edilecek yağ asitinin sentezi asetil koenzim-A (asetil CoA)' nın karboksilasyon tepkimesi ile başlamaktadır. Malonil koenzim-A (malonil CoA)' nın elde edilebilmesi için bir molekül ATP hidrolize edilir. Malonil CoA, taşıyıcı olan bir açıl protein ile birleştirilir ve bu reaksiyon açıl protein zinciri uzayana dek devam eder ve kloroplasttaki uygun bölgeden ayrılarak endoplazmik retikulumına girer. Endoplazmik retikulumda istenilen lipitlere dönüştürülmeden önce birkaç farklı işleme maruz kalabilirler. İşlemlerin sonucunda üretilen yağ asitleri gereksinim duyulan lipit moleküllerine dönüşümü sağlanır ya da farklı lipitlere dönüştürülmek üzere endoplazmik retikulumda depolanır. Üretilen TAG' lar hücre tarafından genellikle enerji rezervuarı ya da membranların yapı taşı olarak depolanır ve gereksinim duyulduğunda depolanan bu TAG' lar istenilen reaksiyonun gerçekleşmesi için kullanılırlar (Schuhmann, vd., 2014).

Transeterifikasyon işlemi ile mikroalglerdeki TAG' lar kolaylıkla biyodizele dönüşebilir özelliktedir. Ticari olarak mikroalglerin kültürlenmesiyle, biyodizel eldesi sağlanan diğer maddelerden 10 ile 20 kat daha fazla verim elde edilmesi sağlanabilir. Biyodizelin elde edilebilmesi için gereken yoğun enerjiye sahip olan organik bileşiklerin üretilmesini sağlayan tek işlem fotosentezdir (Sharma, vd., 2012).



Şekil 2.5. Görünür ışık şeması (<https://fullbilgi.net/egitim/kimya/elektromanyetik-dalga-spektrumu-nedir-ozellikleri-ve-cesitleri/comment-page-2/>).

2.7. Alglerin Lipit Kompozisyonları ve Üretim Mekanizmaları

Mikroalglerin fotosentezi bitkilerle fazlaca benzerlik göstermektedir. Fakat mikroalglerde gerçekleşen fotosentezin hızı ve mikroalgal hücrelerin büyüme hızı bitkilere göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu yüzden bitkilere göre lipit biriktirme oranları daha yüksektir (Gour, vd., 2016). Mikroalglerin ürettiği lipitler non-polar lipitler (TAG) ve yapısal polar lipitler olmak üzere ayrı kategorilerde incelenmektedir (Luna, 2016). Besinlerin eksikliği gibi stres oluşturan koşullarda mikroalg türleri yağ asitlerini hücre zarının yapısını oluşturan lipitlerden, triaçilgliserol (TAG) sentezine ve önceden oluşturulmuş membran lipitlerini triaçilgliserollere dönüştürerek hücre içerisinde büyük miktarda lipit birikimini sağlayabilmektedir. Hücre içerisinde depolanan lipitler ökaryotik özellik gösteren birçok hücrede yağ damlacığı olarak depolanır (Xu, vd., 2016). Hücre içerisinde biriktirilen bu lipitler ağırlıklı olarak doymuş yağ asitlerinden ve transesterifikasyon işlemine tabi tutulup biyodizel yapımında kullanılabilen bazı doymamış yağ asitlerinden (TAG) oluşmaktadır. Yapısal lipitler ise sucul hayvanlar ve inşalar için gerekli olan doymamış yağ asitlerini içerir. Polar lipitler ve steroller, hücre ve organeller için seçici geçirgen özellikte olan hücre zarı yapısına katılırlar (Sharma, vd., 2012).

Çoğu mikroalg ortam koşullarının değişikliğine cevap olarak lipit metabolizmasını değiştirebilmektedir. Stres koşullarında üretilen bu lipitler biyodizel üretimi için uygundur. TAG'lerin oluşum şekli ve içeriği mikroalglerin türüne özgündür (Sharma, vd., 2012). Mikroalglerde biyodizel olarak kullanılan lipitlerin sentez yolları yağ asidi sentaz (FAS) ve triaçilgliserol (TAG) biyosentez yoluna dayanır. Genel olarak FAS enzim kompleksi lipit temelli biyodizel üretimi için doymuş yağ asitlerini (SFA) sentezler. Doymuş ve tekli doymamış C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 gibi biyodizel üretimi için en uygun yağ asitleridir. Mikroalgler C14:0, C16:0, C18:0' da dâhil olmak üzere doymuş yağ asitlerini sentezlemek için

asetil-CoA karboksilaz ve tipII yağ asiti sentazı (FAS) kullanabilmektedir (Sun, vd., 2018). Yağ asidi biyosentezinde açıl taşıyıcı protein (ACP) malonil CoA' yı üzerine alır ve ilk olarak apo-ACP' yi bir fosfopantetinitransferaz (PPTase) ile translasyonla modifiye eder. Modifikasyon sonrası elde edilen “kol” yağ asidi biyosentezi süresince gelişen yağ asidini tioester bağı ile bağlar. Açıl-ACP üzerinde β -ketoaçıl-ACP sentaz III, β -keton uzatılmış 2-karbon birimi meydana getirebilmek için malonil-CoA' yı asetil-CoA ile yoğunlaştırır. Bu yoğunlaşmadan sonra enoilredüktaz (ER), ketoredüktaz (KR), dehidrataz (DH) enzimleri ile doymuş metilen birimlerine indirgenir. Bu döngü KASI (C4'ü C16'ya uzatan) ve KASII (C16'yı C18'e uzatan) ile yedi kez tekrar eder. Hedef uzunluğuna ulaşan olgun yağ asidi, ya sitozole bir tioesteraz (TE) bölgesinin etkisiyle hidrolize edildiği ökaryotik yol ile ihraç edilen yağ asidi, plastid ihracatı için FAS' tan salınır ya da membran lipitlerine dâhil edilmek üzere bir açıltransferaz ile gliserol-3-fosfata aktarılır ve prokaryotik yol ile plastidde korunur. Bitkilerde, yağ asitleri tioesterazlarla ACP'lere hidrolize edilip plastid zarfına yayılırlar. CoAligaz enzimi ile CoA ile esterlenir ve buradaki yağ açıl-CoA, membran fosfolipitleri ve depolama triglisetileri içeren hücresel lipitlerde dâhil olmak için kloroplasttan ayrılır (Blatti, vd., 2013).

Yağ asitleri kloroplasttan çıktıktan sonra bir açıl-CoA sentetaz sayesinde CoA' ya bağlanır ve endoplazmik retikuluma alınır. Burada gliserollü lipitlerin biyosentezinde ana metabolit olan fosfatidik asidin TAG, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilkolin de dâhil olmak üzere- gliserol-3-fosfata aktarılmadan uzama ve desatürasyona maruz kalabilirler. Oluşan ürünler açıltransferazlardan dolayı açıl bölümlerini değiştirebilirler. Bu nedenle hücrenin yağ asitlerini depo lipitlerinin oluşturmak için membrandan geri tahvilini temin edebilir ve gliserollü lipitlerin türlerini arttırabilir. Triaçilgliseroller hücre gereksinim duyana kadar enerji kaynağı ve yağ asidi kaynağı olarak biriktirildikleri lipit cisimlerine ya da damlacıklarına aktarılırlar (Şekil 2.6) (Schuhmann, vd., 2014).

Bitkilerde ökaryotik ve prokaryotik lipit sonlandırma yöntemi arasında tioesterazlar karbon akışını tayin eder ve lipit biyosentezinde metabolik bir koruyucu görevi üstlenir. Mikroalglerde de bitkilerde bulunan bu enzimler tanımlanmıştır. Bundan dolayı mikroalglerin prokaryotik ve ökaryotik yollar arasında uyguladıkları ayrımın, bitkilerle benzeri sisteme sahip olması olasıdır. TE, işlevsel olarak yağ asidi tipini tayin ettiğinden alg suşlarında yüksek biyodizel kalitesi için algal yağ asidi zincir uzunluğunu planlamada öne çıkmaktadır (Blatti, vd., 2013).

Dış mekanlarda ya da laboratuvar ortamlarında mikroalg üretip yüksek lipit içeriği alabilmek için lipit indüklemeye yöntemlerine ve dış stres şartlarına gereksinim vardır.

2.8.1. Sıcaklık stresi

Mikroalglerin üreyebilmeleri için gerekli olan sıcaklık 20-30°C olmasına rağmen bu durum türe göre farklılık gösterebilir. Optimum aralıktaki sıcaklıklarda mikroalgler yüksek biyokütle verimliliği gösterir. Sıcaklık optimum değerleri geçtiğinde ise mikroalg biyokütlesine zarar vererek ölmelerine neden olabilmektedirler (Cheng ve He, 2014).

Birçok mikroalgde polar özellik gösteren lipidlerin üretimi sıcaklığın miktarı azaldıkça arttığı, sıcaklık arttıkça polar özellik göstermeyen yani triaçilgliserollerin miktarının artış gösterdiği bilinmektedir (Cheng ve He, 2014). Mikroalglerin çoğunda polar lipid üretiminin sıcaklık azaldıkça arttığı, sıcaklık arttıkça polar olmayan lipidlerin (TAG) arttığı gözlenmektedir (Paliwal vd., 2017). Bundan dolayı yüksek kalite ve miktarda lipid üretimini sağlayan sıcaklık biyodizel üretiminde kullanılabilecek bir çevresel koşul olabilir (Cheng ve He, 2014).

2.8.2. Fosfor stresi

Fosfor (P), mikroalglerdeki temel besin maddesidir ve aynı zamanda üremesinde, membran gelişiminde, fosfolipit biyosentezinde, nükleik asit biyosentezinde ve enerji transferinde önemli bir görevi olan bir elementtir (Paliwal vd., 2017). Mikroalglerde lipid birikimi P stresi ile arttığı bilinmektedir (Cheng ve He, 2014).

2.8.3. Tuz stresi

Ozmotik basıncın ya da tuzluluk artışına karşı birçok mikroalg türü cevap olarak ozmoregülatör maddeler oluşturmak için küçük maddeler biriktirebilirler (Richmond, 2014). Tuzluluk oranının yüksek olması mikroalg hücrelerindeki lipid bileşimi ve içeriğini etkileyen etmenlerden biridir. Tuz stresi, üretilen yağ asitlerindeki doymunluk miktarını arttırdığı için biyodizel verimini arttırabilmektedir (Xu ve Beardall, 1997).

2.8.4. Işık stresi

Çeşitli ışık miktarlarında mikroalgler, kimyasal kompozisyonlarında önemli değişiklikler meydana getirebilmektedir. Yüksek ışıktaki doymuş yağ asitleri artarken, düşük ışıktaki doymamış yağ asitleri artış göstermektedir. Biyodizel üretimi için uygun olan doymuş ve tekli yağ asitlerinin yüksek ışıktaki artış göstermesinden dolayı yüksek ışık stresi mikroalglerde lipid birikiminde kullanılabilecek olan çevresel koşullardan biridir (Cheng ve He, 2014).

2.8.5. Biyofilm formasyonu

Mikroorganizmalar ürettikleri hücre dışı polimerik moleküllerle (EPS) substrata gömülüp katı yüzeylerde üreyebilmesine olanak sağlayan bir yapı oluştururlar. Bu yapı mikroorganizmaların koalisyonu olarak da tanımlanabilir fakat günümüzde yaygın ismi biyofilmdir (Mantzorou, vd., 2018). Az sayıda çalışma yapılmasına karşılık, keşfedilmiş en eski biyofilm kalıntısı 3,5 milyar yıl öncesine ait olduğu düşünülmektedir (Roeselers, vd., 2008). Ekstraselüler matrisle çevrilenmiş ve sıvı ortamla münasebette olan bir substrata bağlanmış bu oluşuma Costerton ve arkadaşları biyofilm ismini vermişlerdir (Polizzi, vd., 2017). Biyofilm mekanizması, ekosistemlerin işleyişinde mühim rol üstlenirler ve doğada neredeyse her katı/sıvı yüzeylerde oluşabilirler. Doğadaki enerji akışına ve besin döngüsüne mühim bir katkıda bulunmaktadırlar (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Mikroalgal biyofilmler, ototrofik biyofilmler olarak da tanımlanırlar, bunun nedeni içerisinde heterotrofik mikroorganizmaları (bakteriler, protozoalar ve mantarlar) ve mikroalgleri (siyanobakteriler dâhil) bulundurmasındandır (Mantzorou, vd., 2018). Mikroalgal biyofilm yapıları kompleks bir yapıda olduğundan çözümlenememiş bir yöntem olarak da adlandırılmaktadır (Katarzyna, vd., 2015). Mikroalgin türüne bağlı olarak biyofilmin büyümesi ve oluşum süresi değişmektedir (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Mikroalgler biyofilm oluştururken gerçekleşen ilk aşama, türün absorpsiyon sistemiyle katı yüzeye tutmasıdır. Fakat bu aşama geri dönüştürülebilir bir adımdır. İkinci aşamada, hücre dışı polimerik moleküllerle (EPS) meydana geldiğinden geri dönüşümü olmayan adhezyon işlemi mevcuttur (Shen, vd., 2014). Yüzeylerde gelişen mikroorganizmaların büyümesini ve bu tür biyofilmleri destekleyen yapılar katyonlar, organik maddeler ve proteinlerdir. Biyofilm ortamdan serbest partikülleri tutmaktansa tüm evrelerde olan mikroorganizmaların hücre bölünmesiyle büyür. Böylece katmanlı bir yapı oluşturup üç boyutlu gözlemlenebilen bir yapı meydana getirir. Hareketsiz hale gelen hücreler hücresel bir küme meydana getirmiştir. Mikroalglerin oluşturduğu bu biyofilm difüzyon yöntemi ile beslenirler. Belirli bir kalınlığa ulaşan biyofilm parazitlerin bulaşması ya da hücre ölümleri ile büyüme ve ölüm hızı hemen hemen eşittir. Biyofilm oluşturan mikroalgler çeşitli iklim koşullarına adapte olabilirler. Bunun yanında biyofilm formunun zararlı mikroorganizmalara karşı korunaklı gelişim olduğu düşünülmektedir (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Özelleşmiş EPS salgılayarak mikroalgler ve bakteriler farklı yüzeylere yapışır ve dengelenmelerini sağlarlar (Zippel, vd., 2007; Choudhary, vd., 2017). EPS' lerin bileşimleri, polisakkarit, protein, nükleik asitler ve fosfolipit gibi organik bileşiklerden, hidroksil, fosforik, amino grupları ve karboksilik gibi işlevsel bölgelerden meydana gelmektedir. Bu EPS' ler biyofilmin bir arada durmasını, katı yüzeye tutunmayı ve tutunulan yerde bağlı kalmayı sağladığı için çok önemlidir. Ayrıca

polimerik moleküllerin matrisi stres meydana getiren çevresel şartlara ve zararlı kimyasallara karşı koruma sağlamanın yanında besin maddelerini saklama alanı olarak kullanabilirler (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Biyofilmde bulunan türlerin kompozisyonu, stres şartları, besin, biyofilmin yaşı gibi faktörler hücre dışı polimerik molekülleri etkiyebilmektedir. Mikroalglerin biyofilm ile kültürleme uygulamaları son yıllarda yüksek ilgi görmüştür. Bunun nedeni mikroalglerin en ucuz yolla toplanabilmesine ihtiyaç duyulmasından meydana gelmiştir. Bu yöntem ile biyoyakıt üretimini ve su arıtma ihtiyaçları karşılanabilir. Çoğunluğu laboratuvar ortamlarında kullanılmak üzere birkaç tane şekilleri ve tasarımları amaçlarına göre belirlenmiş biyofilm sistemi geliştirilmiştir (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Geometrik yapıları, kullanılan malzemeler ve tasarımın mantığı biyofilm sisteminin uygulamasına göre çeşitlidir (Gross, 2015).

Avantajlar ve dezavantajlar

Avantajlar

- Planktonik forma göre su ihtiyacı daha azdır.
- Kurulum maliyeti daha ucuzdur ve tutunmayı sağlayan malzemeler tekrar kullanılabilir.
- Üretilen biyokütle, klasik süspansiyon kültürlenmesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
- Planktonik forma nazaran küçük bir alanda üreyebilirler.
- Planktonik forma göre hasat işlemi basittir ve yüzey üzerinden kolayca sıyrılarak alınabilir.
- Planktonik forma göre nem oranı düşüktür, bu sebepten dolayı ek bir kurutma işlemi uygulamaya gerek kalmayabilir.
- Planktonik forma göre ışık kullanımı daha yüksektir (Mantzorou ve Ververidis, 2019).

Dezavantajlar

- Yüzey üzerindeki biyofilmin kopmasıyla biyokütle kaybı yaşanabilir.
- Kullanılan yüzeyler zarar görebilir ve hem biyokütle hem de ekonomik olarak sıkıntı yaratabilir (Mantzorou ve Ververidis, 2019).

2.8.6. Azot stresi

Azot, mikroalglerdeki üretilen lipitlerin kompozisyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olan elementtir. Protein ve klorofil oluşturmada kullanılır (Wong, vd., 2016). Lipit içeriğinin

arttırılmasında azot eksiltme yönteminin kullanılmasının nedeni ucuz, kolay ve farklı alg türleri üzerinde güçlü ve güvenilir etki gösterir (Griffiths, vd., 2011). Azot sınırlaması, lipid üretiminde ekonomik olarak uygulanabilecek etkili bir yöntem olsa da biyokütle verimliliği azalması endişe konusudur (Concas vd., 2016). Büyümeleri yavaşladığında alg hücreleri yağ asitlerini triaçilgliserollere gönderip biriktirirler, bunun nedeni membran bileşiği sentezi için lipid gereksinimi olmadığındandır. Biyokütle oluşumunda fotosentez ile oluşan ATP ve NADPH kullanılır. Akabinde oluşan tepkimelerden doğan ADP ve NADP fotosentezde alıcı molekül olarak kullanılabilir. Hücre çoğalması ortamdaki besin kıtlığından dolayı bozulduğunda ana elektron alıcısı NADP bitebilir. Işık ile bağlı olan fotosentez olayı istemli bir şekilde ışığın ortamdaki çekilemeyecek olmasından dolayı hücre içeriğine zarar verebilmektedir. Yağ asidi biyosentezinde ortamdaki NADPH harcanır ve fazla olan yağ asitleri NADP havuzunda depolanır (Sharma, vd., 2012). Triaçilgliseroller ortamdaki karbon ve enerjinin depolanmasında görev alır. Aynı zamanda ortamdaki fazla üretilmiş elektronları dahil ederek fotooksidatif hasardan korur. Optimum koşullar altında mikroalglerde triaçilgliserol üretimi düşük olmasına rağmen azot sınırlaması uygulandığında triaçilgliserol üretimi hücrelerin kuru ağırlıklarının %40' nı oluşturabilir (Breuer, vd., 2013). Yapılan bir çalışmada *C. vulgaris* ve *Scenedesmus* sp. mikroalglerinin azot sınırlaması altında lipid üretiminde artış meydana getirdiğini bildirmişlerdir (Griffiths, vd., 2011). Azot sınırlanmış koşulların uygulanacağı türün dikkatli seçilmesi önemi ve orta düzeydeki azot sınırlamasının başarılı olduğu yapılan bazı çalışmalarda raporlanmıştır (Hsieh ve Wu, 2009; Stephenson, vd., 2010; Takagi, vd., 2000; Rodolfi vd., 2009).

2.9. Mikroalglerin Endüstriyel Biyoyakıt Üretiminde Kullanılması

2.9.1. Elde edilen biyoyakıt türleri

Biyodizel

Uzun zincirli yağ asitlerinin mono alkil esterleri olarak tanımlanan biyodizel, yenilenebilir hammaddelerden (mikroalgler, bitkisel yağlar, hayvansal yağlar gibi) elde edilir. Petrol dizeliyle yarışabilecek niteliğe sahip olmasının yanında biyodizel, biyolojik ayrışmaya müsait, karbondioksit emisyonunun azalmasında etkin ve yenilenebilen bir yakıttır. Kullanılan alkol ve hammaddeye göre biyodizelin özellikleri farklılık gösterebilmektedir. Yine de direkt veya karışım halinde yakıt olarak kullanılabilirler (Soydemir, 2016). Biyodizel, yağın transesterifike edilmesiyle petrol dizelinin viskozitesine ulaştırılarak üretilir (Demirbaş ve Demirbaş, 2010).

Biyometan

Biyometan fermentasyonu ile değerli bir ürün olan biyogaz oluşumunu sağlamak biyometan üretimine ilgiyi çekmiştir (Rawat, vd., 2010). Biyogaz anaerobik canlıların anaerobik sindirim ile oluşur. Temelin de CO₂ (%25-45) ve metan (%55-75) karışımı vardır. Anaerobik sindirim ile metan oluşturulurken artık kalan biyokütle gübre üretmek için tekrardan işlenebilir. Biyogaz çeşitli çevresel etmenlerden etkilenebilir. Bunların başında sıcaklık, pH, reaktörde bulunma süresi ve organik yüklemeler gelebilir. Mikroalglerden biyogaz üretimi her ne kadar iyi bir potansiyel olması rağmen günümüzde henüz ticari bir uygulama bulunmamaktadır. Özellikle metan eldesi için yapılan alg yetiştiriciliği ile atık su arıtma tesisinin birleştirilmesiyle üretim maliyeti az ve karlı bir girişim olabilir. Bu girişim aynı zamanda ötrofikasyonu engelleyebileceği için atık suların temizlenmesine de sebep olabilir (Singh ve Gu, 2010).

Biyoetanol

Son zamanlarda mikroalgler üzerinden biyoetanol üretilmesi için fermentasyon işleminin kullanıldığı çokça deneme yapılmaktadır. Bu durumun nedeni mikroalgler, fermentasyon için gerekli olan protein ve karbondioksidin bolca bünyesinde bulundurmasıdır. Yapılan çalışmalarda mikroalglerin biyoetanol üretiminde kullanılabilecek iyi bir substrat olduğu rapor edilmiştir. Alglerden biyoetanol elde etmek için fermentasyon ve gasifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Singh ve Gu, 2010).

Mikroalglerin fermentasyonla biyoetanol üretebilmelerinde birincil olarak anaerobik ve ışık almayan yerde bekleterek etanol meydana getirmesi beklenilmelidir. Daha sonra üretilen etanolün saflaştırılması ile biyoetanol formuna dönüştürülebilir. İkincil olarak fermentasyon işleminin sonucunda mikroalg biyokütlesi anaerobik sindirim işlemiyle elektrik üretimi için metan formuna getirilebilir (Singh ve Gu, 2010).

Mikroalglerden fermentasyon ile biyoetanol üretimi prosedürü, mikroalglerden biyodizel üretimi için uygulanan prosedürden daha kolaydır. Ayrıca fermentasyon neticesinde meydana gelen karbondioksit alglerin besiyerleri için dönüştürülecek bir formasyondadır. Yapılan bu yöntemle sera gazının yayılımı azaltılabilir (Singh ve Gu, 2010). Alglerden biyoetanol üretiminin henüz ticarileşmemesinin nedeni yapılan çalışmaların başlangıç aşamasında olmasındandır (Rawat, vd., 2010).

2.10. Mikroalglerden Biyodizel Eldesi İçin Uygulanan Prosedürler

Alglerden biyodizel oluşturulması için ilk olarak lipit ekstraksiyonu işlemi sonrasında gereksiz olan solventin buharlaştırılması ve mikroalglerden üretilen lipitin biyodizele dönüşümünün sağlanması için ilgili prosedürlerin uygulanmalıdır (Robles-Medina, vd., 2009).

Bitkilerden elde edilen lipitler, petrol dizeli ile belli bir miktarda karıştırıldığında direkt biyodizel yerine kullanılabilirler. Ancak bitkisel yağlardan elde edilen bu biyodizel, yüksek akışkanlığı sebebiyle, dizel motorlu araçlarda doğrudan kullanılacak durumda değildir ve bundan dolayı bazı işlemlerden geçirilmelidir (Robles-Medina, vd., 2009).

2.10.1. Piroliz

Biyokütlelerin piroliz olayı, likit, gaz yakıtları, aktif karbon ve mühim kimyasalların eşzamanlı oluşturulması için gelecek vaadeden bir teknik olarak düşünülebilmektedir (Minkova, vd., 2001). Mikroalglerin biyokütlesinin O₂ eksikliğinde ısıtılmasıyla ya da bir nebze düşük O₂ kaynağı mevcudiyetinde yandığı termokimyasal yöntemdir. Pirolizle üretilen dizel, petrol dizeliyle benzerlik gösteren kimyasal bileşime sahiptir fakat piroliz işlemi neticesinde meydana gelen ağır karbon birikintilerinin göz ardı edilebilir bir boyutta olmadığı bilinmektedir (Pragya, vd., 2013).

2.10.2. Mikro-emülsifikasyon

Mikro-emülsifikasyon işleminde metanol/etanol gibi alkol türevleri kullanılır. Son zamanlarda etanol ve metanole benzeyen kısa zincirli karışmayan alkol türevleri ve iyonik olan veya non-iyonik amfipillerle mikro-emülsifikasyon işlemini gerçekleştirerek, bitkilerden elde edilen yağların yüksek akışkanlıklarının düşürülmesi üstüne deneyler yapılmaktadır (Demirbas, 2009). Ancak bu işlem ile bitkisel içerkli yağların viskozitesinin azaltılmış olsa bile yağın yanıcılığının azalmasından dolayı enerji kaybına neden olmuş, ağır karbon birikmesiyle neticelenmiştir (Pragya, vd., 2013).

2.10.3. Transesterifikasyon

Mikro-emülsiyon ile piroliz işlemlerinin maliyeti yüksektir ve üretilen biyodizelin kalitesi çok düşüktür. Biyodizel üretiminde transesterifikasyon işlemi son zamanlarda yaygınca kullanılan yöntemdir. Bundan dolayı, transesterifikasyon neticesinde oluşturulan yağ asidi metil esterlerinin, petrol dizeli bileşimine benzemektedir (Pragya, vd., 2013).

Transesterifikasyon yöntemi, akışkan mikroalgal lipitin molekül ağırlıklığı düşük yağ asidi alkil esterlerine dönüştürmektedir. Uygulanan bu yöntem, temel yağ ile kısa zincirli alkol arasında katalizör ile gerçekleşen bir reaksiyondur. Uygulanan yöntem neticesinde FAME ve gliserol meydana gelmektedir (Pragya, vd., 2013).

Transesterifikasyon da kullanılan etanol, mayalanma neticesinde oluşabilir, bu nedenle yenilenebilir ve toksikitesi düşük bir alkol çeşididir. Buna karşın ekonomik ve reaktif olmasından kaynaklı olarak FAME ve metanol oluşturulmasında daha çok kullanılan bir alkoldür (Pragya, vd., 2013).

Transesterifikasyonun tepkime hızı ve verimliliği elverişli bir katalizörün kullanılmasıyla artırılabilir. Bu katalizör maddeler doğada enzimatik formlarda bulunabilirken asidik veya bazik çözelti formunda da bulunabilirler. Potasyum hidroksit, sodyum hidroksit ve sodyum metoksit bazik katalizör olarak kullanılabilir. Hidroklorik asit, sülfürik asit ve sülfonik asit, fosforik asit asidik katalizör olarak kullanılabilir. Lipazlar ise enzimatik katalizör olarak kullanılabilir (Pragya, vd., 2013).

Mikroalgler üzerinde gerçekleştirilen transesterifikasyon deneylerinde, çoğunlukla kurutulmuş biyokütle kullanılmıştır. Hasatlanan mikroalg biyokütlesinin kurutma yöntemi, biyodizel üretiminde maliyet artışı sağladığından dezavantaj olarak sayılmaktadır ve biyodizel üretimi için kullanılacak biyokütlenin ıslak veya kurutulmuş olmasının biyodizel verimi ve yağ asidi metil esterlerinin karakterizasyonuna etki ettiği belirtilmiştir (Soydemir, 2016).

3. MATERİYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alg türü ve kültür ortamı

Bu çalışma içerisinde yeşil alglerden, *Chlorophyceae* grubuna ait *Chlorella vulgaris* kullanılmıştır. *C. vulgaris*' in sistematik olarak sınıflandırılması aşağıdaki gibidir;

Üst Alem: *Eukaryotic*

Alem: *Protista*

Grup: *Chlorophyta*

Sınıf: *Trebouxiophyceae*

Takım: *Chlorellales*

Aile: *Chlorellaceae*

Cins: *Chlorella*

Tür: *Chlorella vulgaris*

3.2. Metod

3.2.1. Kültür koşulları

Bu çalışmada planktonik form ve biyofilm formu olmak üzere iki farklı formda, standart miktarda azot içeren (%100) M3N-BBM besiyeri (Çizelge 3.1) ve 1/4 (%25) azot içeren M3N-BBM besiyeri (Çizelge 3.2) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. %100 N M3N-BBM besiyeri içeriği.

STOK SOLÜSYONLAR	1 L İÇİN
NaNO ₃	30 mL/L
CaCl ₂ 2H ₂ O	10 mL/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	10 mL/L
K ₂ HPO ₄	10 mL/L
KH ₂ PO ₄	10 mL/L
NaCl	10 mL/L
P-IV Metal Solüsyon	6 mL/L
Soilwater (Green House Soil)	40 mL/L
Vitamin B ₁₂	1 mL/L
Biotin	1 mL/L
Tiamin	1 mL/L

Çizelge 3.2. %25 N M3N-BBM besiyeri içeriği.

STOK SOLÜSYONLAR	1 L' de
NaNO ₃	7,5 mL/L
CaCl ₂ 2H ₂ O	10 mL/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	10 mL/L
K ₂ HPO ₄	10 mL/L
KH ₂ PO ₄	10 mL/L
NaCl	10 mL/L
P-IV Metal Solüsyon	6 mL/L
Soilwater (Green House Soil)	40 mL/L
Vitamin B ₁₂	1 mL/L
Biotin	1 mL/L
Tiamin	1 mL/L

Planktonik form

M3N-BBM katı kültür ortamında yetiştirilmiş *C. vulgaris*' den, ilk olarak 10 mL' lik sıvı kültür ortamına pasajlama yapıp ve 22±2°C 130 µmol·m⁻²·s⁻¹ ışıktaki inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon işlemlerine her seferinde 5 kat artacak şekilde devam edildi. 1250 mL' den itibaren sıvı kültürler bir hava kompresörü yardımıyla havalandırılarak 22±2°C' de ve 130 µmol·m⁻²·s⁻¹

ışıkta inkübasyonuna devam edildi. Total de 12 L' lik stok kültür elde edilene kadar çoğaltma işlemlerine devam edildi.

Yeterli biyokütleyle ulaşıncaya, başlangıçta belirlenmiş olan 0,3'lük optik dansiteye (OD) ulaşabilmek için 12 L' lik stok kültürden 800 mL alg örneği 3200 mL' lik standart miktarda azot içeren (%100) M3N-BBM besiyerine pasajlama yapıp 40 günlük inkübasyona bırakıldı ve böylelikle kontrol grubu oluşturuldu. N stresine sokulmuş diğer grup elde edebilmek için 12 L' lik stok kültürden 800 mL alg örneği 3200 mL' lik 1/4 (%25) azot içeren M3N-BBM besiyerine pasajlama yapıp 0,3' lük optik dansiteye sahip N eksiliği grubu oluşturuldu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Planktonik formda %100 N M3N-BBM besiyeri ve %25 N M3N-BBM besiyeri (Oriijinal).

Biyofilm formu

Hazırlanan reaktöre, 12 L' lik stok kültürden OD 0,3 olacak şekilde 800 mL alg örneği 3200 mL' lik M3N-BBM besiyerine pasajlanıp $22 \pm 2^\circ\text{C}$ $130 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ışıktaki 40 günlük inkübasyona bırakıldı.

Hazırlanan diğer reaktöre ise planktonik formda olduğu gibi 12 L' lik stok kültürden OD 0,3 olacak şekilde 800 mL alg örneği 3200 mL' lik %25 oranında N azaltılmış M3N-BBM besiyerine pasajlanıp $22 \pm 2^\circ\text{C}$ $130 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ışıktaki 40 günlük inkübasyona bırakıldı.

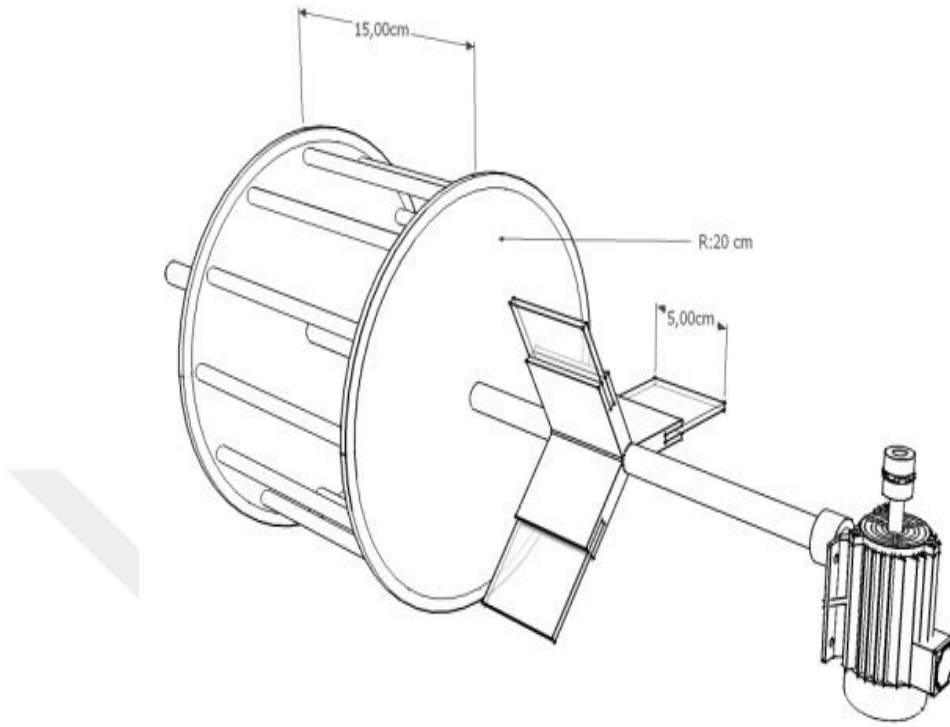
3.2.2. Dönen algal biyofilm reaktörünün (RABR) tasarlanması

Bu çalışmada *Chlorella vulgaris* mikroalginin biyofilm oluşturma potansiyellerinin belirlenebilmesi için dönen algal biyofilm reaktörü, laboratuvar koşullarına uyarlanarak tasarlandı.

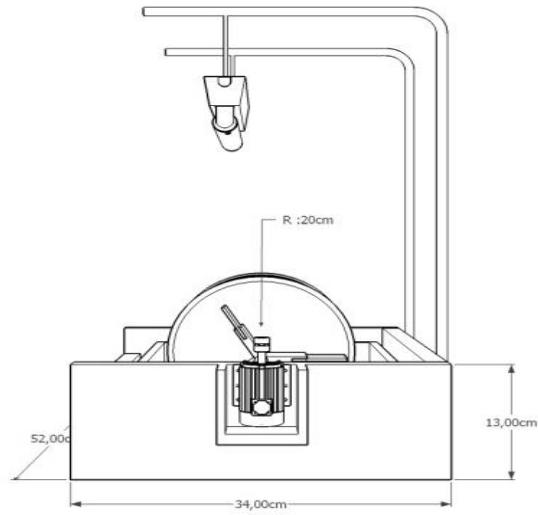
Reaktör tasarımında, çerçeveyi oluşturacak suntalam malzeme 52x34x13 cm ölçülerine uygun bir biçimde birleştirildi. Bu çerçevenin içerisine girebilecek büyüklükte bir plastik tank yerleştirildi. Tankın alabileceği sıvı miktarı 9 L olarak ölçüldü.

RABR tasarımında, 20 cm çapında krom malzemeden üretilen bir silindir tekerlek kullanılmış ve rulman ile reaktörün çerçevesine sabitlendi (Şekil 3.2). Bu silindir tekerleğin etrafı çeşitli kaplama malzemeleriyle (pamuk ip, plastik halat, polietilen halat, yumuşak seramik, hava taşı) kaplandı. Bu kaplama malzemelerinde, kullanılan materyalin yapısına bağlı olarak, *C. vulgaris* mikroalginin biyofilm oluşturma kapasitesi karşılaştırıldı.

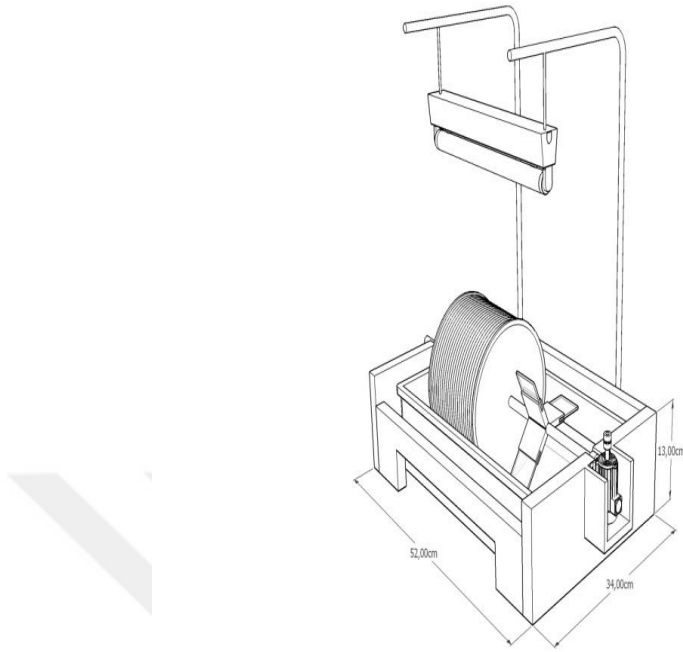
RABR tasarımında kullanılan silindir tekerleğin dönebilmesi için 12 V 30 rpm redüktörlü dc motor kullanıldı. Reaktörün çalıştırıldığı ortam ısısı $22\pm2^{\circ}\text{C}$ ve biyofilm oluşturan mikroalglerin ısıtan faydalanabilmeleri için reaktörün tasarımında floresan lamba kullanıldı. Bu floresan lambaların ışık yoğunluğu $130\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ olarak ölçüldü (Lux METER) (LX-101). Plastik teknenin içerisine, silindir tekerleğin en fazla yarısının dışarıda kalacağı miktar hesaplanıp, OD 0,3 olacak şekilde ayarlanan 4 L' lik alg ve besi ortamından oluşan solüsyon döküldü. Dökülen solüsyon içerisinde dibe çöken biyokütle kalıntılarını oluşmaması için cam parçalar kesilerek rulmana sabitlendi. Reaktörün çizimleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4' de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. RABR’ da kullanılacak silindir tekerlek ve motorun görünümü (Orijinal).



Şekil 3.3. RABR’ın yan görünümü (Orijinal).



Şekil 3.4. RABR' in perspektif görüntüsü (Orijinal).

3.2.3. Kuru madde analizi (DCW-Dry cell weight)

Kuru madde analizinin yapılabilmesi için 10-20-30-40. günlerde örnekler alındı. Ölçümleri gerçekleştirebilmek için *C. vulgaris* mikroalginin %100 azot ve %25 azot içeren ortamlarında kültivasyonu sağlanan planktonik ve biyofilm formasyonlarında kuru madde miktarları incelendi.

Planktonik form

Hazırlanan *C. vulgaris* stok kültüründen steril koşullar oluşturularak 10- 20- 30 ve 40. günlerde 50 mL örnek alınarak steril falcon tüpüne aktarıldı. 50 mL örnek vakum makinesi yardımıyla GF/C filtresinden geçirildi. Bu filtre daha sonra 50°C etüvde tamamen kuruyuncaya kadar bırakıldı. Kuruyan bu örnekler desikatöre alınıp soğutulduktan sonra kuru madde miktarları belirlenen formüle göre hesaplanarak kaydedildi.

Biyofilm formu

Biyofilm reaktöründeki *C. vulgaris* kültürünün tutunması için reaktör üzerinde 3' lü tekrar alınabilecek şekilde sarılı olan 150 cm' lik polietilen halatlardan 75 cm' lik numuneler

kesildi. Biyofilm oluşumu şekillenen halatın ağırlığından, kullanılan halatın ilk halinin ağırlığı çıkartıldı ve sonuçlar g/m² cinsinden hesaplandı.

3.2.4. Optik dansite ölçümü

Planktonik form için *C. vulgaris* stok kültüründen, biyofilm form için ise reaktör tankından 10-20-30 ve 40. günlerde 200 µL örnek alınarak mikropleyte 3' lü tekrar şeklinde konuldu. Mikropleyt spektrofotometre cihazına yerleştirilip 680 nm' de ölçüm yapıp kaydedildi.

3.2.5. Klorofil-A tayini

Klorofil-a tayini gerçekleştirebilmek için 10-20-30-40. günlerde numuneler alınarak belirlenen prosedür uygulandı. Ölçümleri gerçekleştirebilmek için *C. vulgaris* mikroalginin %100 azot ve %25 azot içeren ortamlarında kültivasyonu sağlanan planktonik formda klorofil-a tayinleri gerçekleştirildi. Dönen algal biyofilm reaktörüne aşıl原因an mikroalgler halatlara tutunup biyofilm oluşturmaları sebebi ile tank içerisindeki solüsyondan klorofil-a tayini gerçekleştirilemedi.

Planktonik form

%100 azot içeren besi ortamındaki *C. vulgaris* kültüründen 10-20-30 ve 40. günlerde 5 mL örnek alındı. Alınan örnek GF/C filtreden vakum makinası yardımı ile süzdürüldü ve bu filtre bir falcon tüpünün içerisine alındı. Bu falcon tüpünün içine 5 mL metanol eklenerek 70°C'lik su banyosunda 3 dakika bekletildi. Su banyosundan sonra 3500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından mikropipet yardımı ile 200 µL örnek alınıp 3' lü tekrar halinde mikropleyte konulup spektrofotometre ile 665 nm ve 750 nm dalga boyunda ölçüldü. Klorofil-A miktarı aşağıdaki denkleme göre belirlendi.

$$\text{Klorofil-a (mg/L)} = 13,9 \times (\text{AB665} - \text{AB750})$$

3.2.6. Total lipit ekstraksiyonu

Planktonik form

10.-20.-30. ve 40. günlerde *C. vulgaris* kültüründen 50 mL örnek falcon tüpüne alınıp 6500 rpm hızda 15 dakika süresince santrifüj işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonucunda falcon tüpünde üst kısımda kalan süpernatant bölgesi uygun bir enjektör ya da cam pipet yardımıyla tüpten uzaklaştırıldı. Kalan alg örneği kurutularak total lipit ekstraksiyonu için saklandı. 50 mg kurutulmuş alg örneği alınarak üzerine 10 mL metanol:kloroform (2:1) eklendi ve 2200 rpm

hızda 2 dakika vorteks işlemi uygulanıp 5 dakika beher içerisinde kaynar suda bekletildi. Bekletilen bu örneğe 5 mL kloroform eklenip 2200 rpm hızda 2 dakika vorteks işlemi uygulandı ve 5 dakika kaynar su bulunduran beher içerisinde bekletildi. Kaynar suda bekletilen örneğe 5 mL saflaştırılmış su eklendi ve 2200 rpm hızda 2 dakika vorteks işlemi uygulandı. Bu solüsyon 5 dakikalık süreyle kaynar su içerisinde bekletildi. Bu işlemin sonrasında 6000 rpm hızda 10 dakikalık santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj işlemi bittikten sonra falcon tüpünün alt kısmından, kalan koyu yeşil faz kısmı enjektör ile alınıp farklı bir falcon tüpüne aktarıldı. Alınan koyu yeşil faza 5 mL saflaştırılmış su eklenerek bir dakika 6000 rpm hızda santrifüj işlemi uygulandı. Su ile yıkama işlemi 2-3 kez tekrarlanarak klorofil uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi ve kloroform uçurma işlemi uygulanarak total lipit miktarı hesaplaması yapıldı.

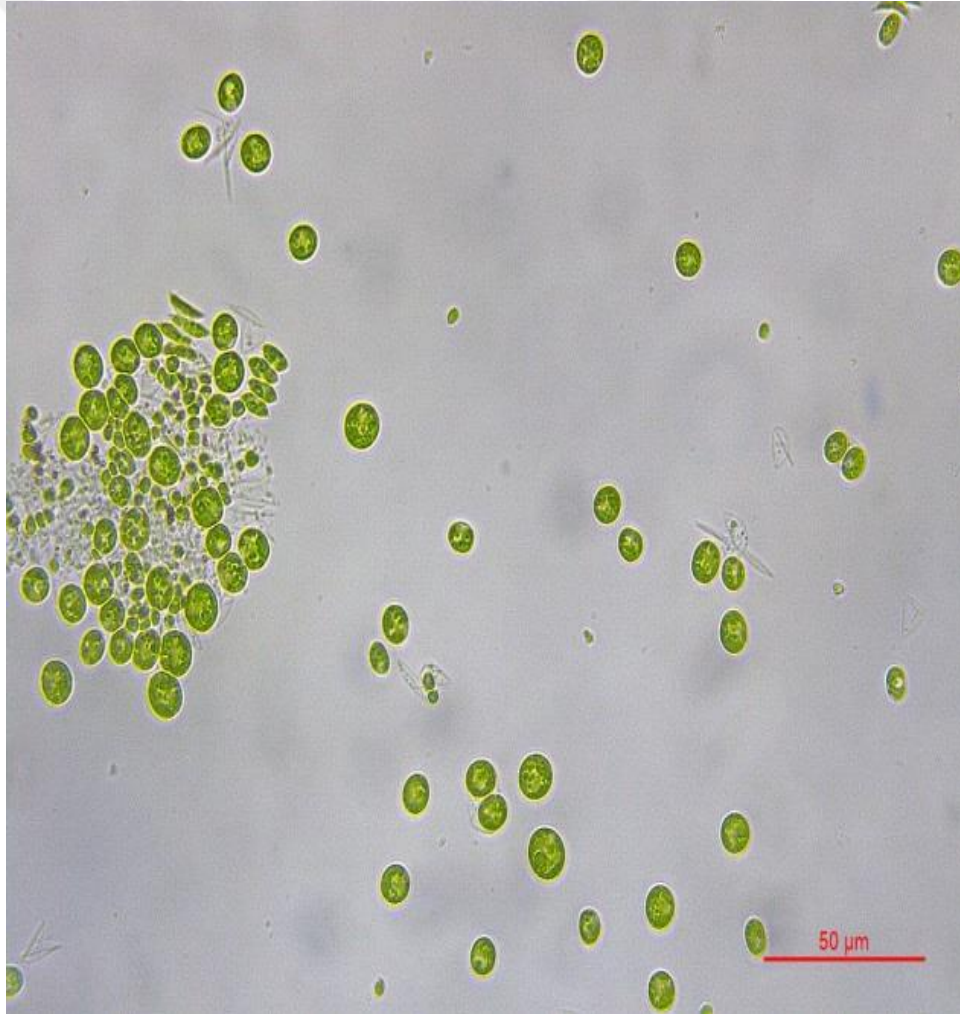
Biyofilm formu

Biyofilm reaktöründeki *C. vulgaris* kültürünün tutunması için reaktör üzerinde 3' lü tekrar alınabilecek şekilde sarılı olan 150 cm' lik polietilen halatlardan 75 cm boyunda numuneler kesildi. Kesilen polietilen halatlar 100 mL % 0,9' luk NaCl çözeltisi içinde çalkalandı. Elde edilen çözelti 6000 rpm hızda 10 dakikalık santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminin sonucunda falcon tüpünün üst kısmında kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan alg örneği kurutularak total lipit ekstraksiyonu için muafaza edildi. Bu örneklerden 50 mg tartıldı ve planktonik forma uygulanan total lipit ekstraksiyon prosedürü biyofilm formunada uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Kullanılan Alg Türünün Morfolojisi

Chlorella vulgaris yeşil mikroalgi küresel ya da elipsoidal tipte hücreler olup çapları 2-10µm arasında değişmektedir (Ahmad, vd., 2018). Hücre duvarlarının yapısının %20' si proteinden oluşur ve bunların %50' sinden fazlası hücre matrisinin içindedir. Gelişim evresinde hücre duvarları 2 nm kalınlığında kırılğan bir unilamellar tabakadan oluşur. Olgunlaşma evresinde 17-20 nm kalınlığa kademeli olarak ulaşır ve bu da glukozaminden oluşan mikrofibriler tabakada oluşturur (Safi, vd., 2014). Bu çalışmada kullanılan *C. vulgaris* mikroalginin mikroskobisi Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. *C. vulgaris* mikroalginin mikroskobisi(Orijinal).

4.2. Reaktörde Kullanılacak Materyalin Seçimi

Dönen algal biyofilm reaktöründe (RABR) kullanılacak silindir tekerleğin üzerinde biyofilm oluşturulacak malzemenin seçimi için silindir tekerlek plastik halat, hamak halatı, pamuk ip, jüt ip, hava taşı, sert seramik ve yumuşak seramik ile kaplanıp bir ön deneme yapılmıştır.

Bu deneme sonucunda silindir tekerlek üzerine sarılan plastik halat üzerinde biyofilm oluşturma oranının yüksek olması, vorteksleme yöntemiyle üzerinde oluşan biyofilmin büyük bir kısmı alınabilirken ipin lifli yapısından dolayı lif aralarında biyokütle kalıntısının kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.A).

Bu deneme sonucunda silindir tekerlek etrafına sarılan hamak halat üzerinde biyofilm oluşturma oranının yüksek olması, vorteksleme yöntemiyle üzerinde oluşan biyofilmin çoğunun hasatlanabildiği gözlenmiştir. Ancak sıvı içerisinde çalkalama işleminin sonucunda az miktarda ip kalıntıları kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2B).

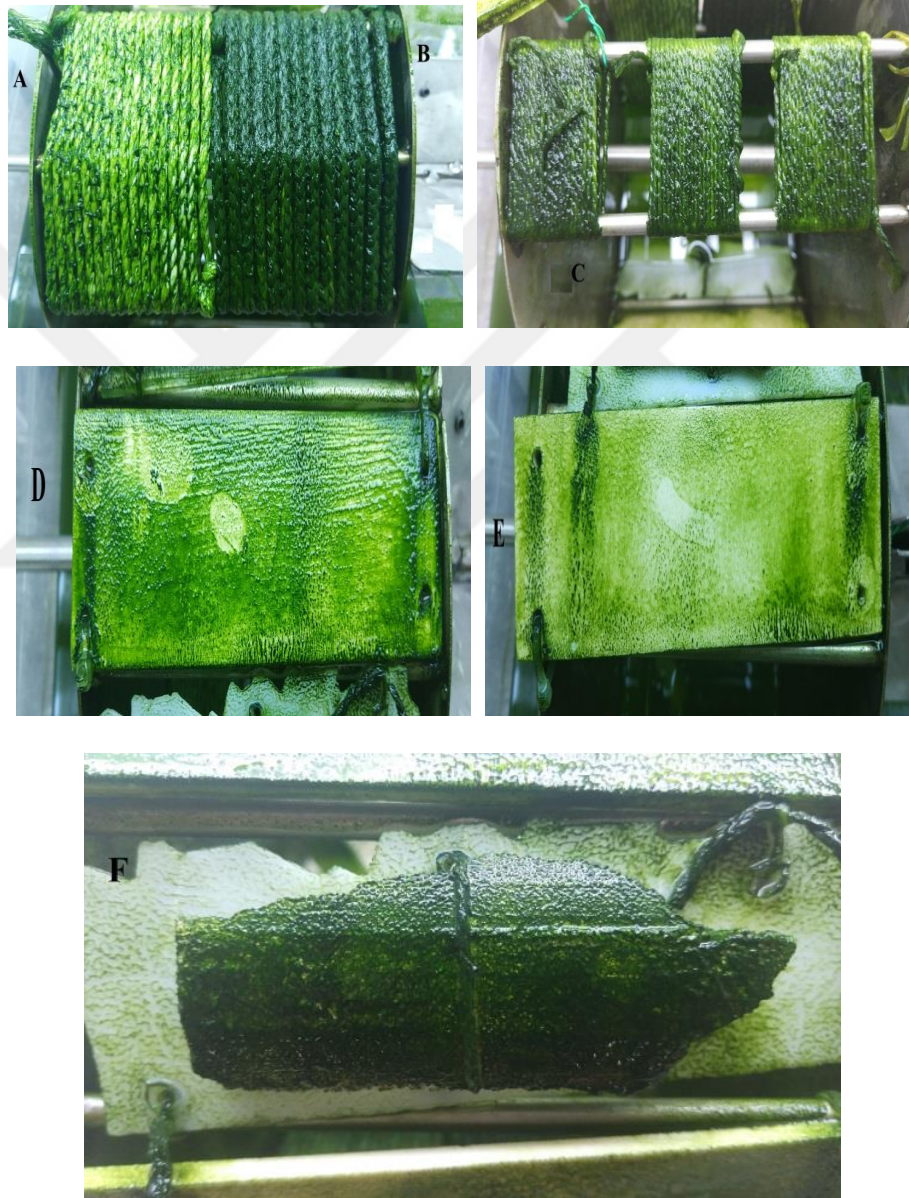
Bu deneme sonucunda silindir tekerlek etrafına sarılan pamuk ip üzerinde biyofilm oluşturma oranının yüksek olması, vorteksleme işlemi kullanılarak üzerinde oluşan biyofilmin rahatça alınabildiği gözlemlenmiştir. Fakat pamuk ipin diğer kullanılan iplere göre daha ince olduğundan hızlı doygunluğa ulaştığından deney süresi olarak belirlenen (40 gün) için elverişsiz olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2C).

Bu deneme sonucunda silindir tekerlek etrafına yerleştirilen yumuşak seramik üzerinde biyofilm oluşturma oranı yüksektir. Kazıma yöntemi ile yapılan hasat işleminde biyokütle kaybı yaşanması ve kazıma esnasında biyokütlenin seramik tozları ile kirlendiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2D).

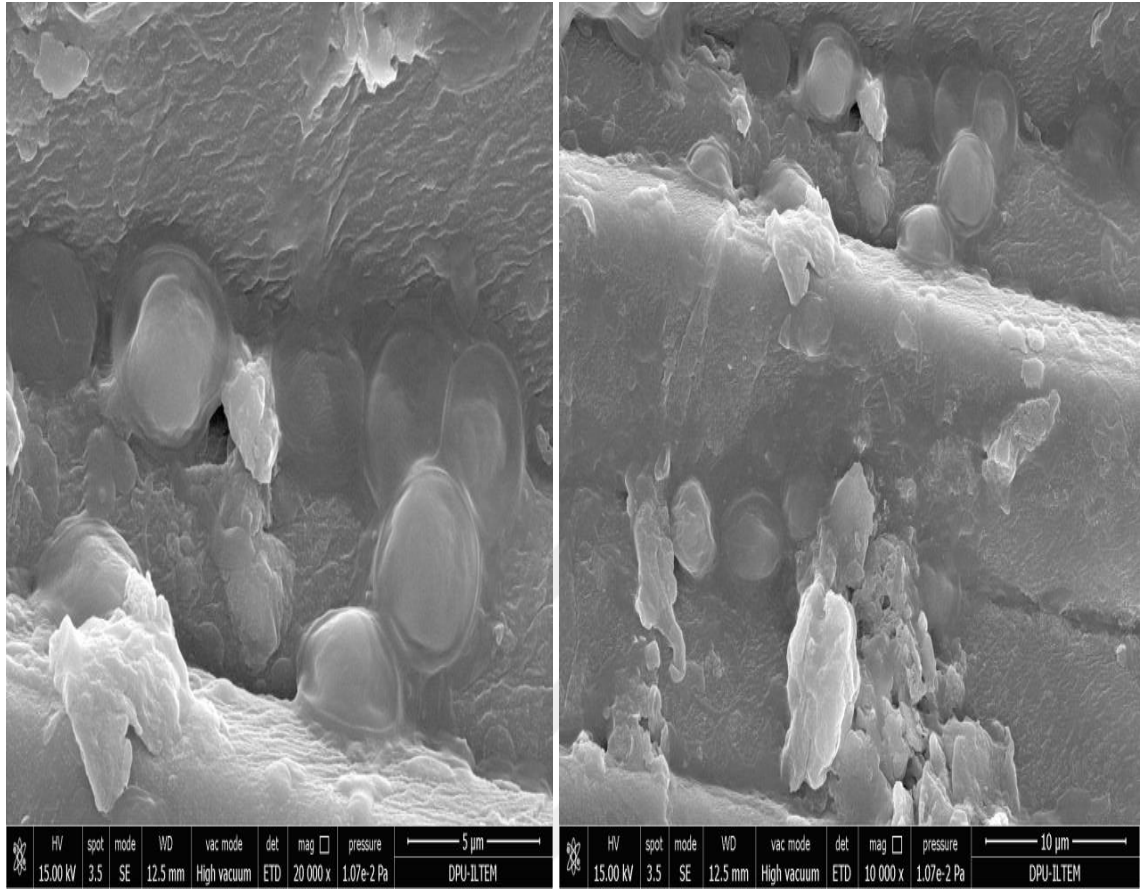
Bu deneme sonucunda silindir tekerlek etrafına yerleştirilen sert seramiğe üzerinde biyofilm oluşturma oranı yumuşak seramiğe göre daha azdır. Kazıma yöntemi ile yapılan hasat işleminde üzerinde oluşan biyofilmin alınamamasından çok fazla biyokütle kaybına neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2E).

Bu deneme sonucunda silindir tekerlek üzerine yerleştirilen hava taşı üzerinde biyofilm oluşturma oranı yüksek iken delikli yüzeyi nedeniyle oluşan biyofilmi hasatlamanın güç olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2F).

Bu deneme sonucunda silindir tekerlek etrafına sarılan jüt ip üzerinde biyofim oluşturma oranının yüksek olması, vorteksleme yöntemiyle üzerinde oluşan biyofilmin çoğunun hasatlanabildiği gözlenmiştir. Ancak vorteksleme işleminin sonucunda çok miktarda ip kalıntıları kaldığı gözlenmiştir. Jüt ip üzerinde oluşan biyofilmin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 4.3’ da gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Silindir tekerleğin üzerinde biyofilm formasyonunun oluşması için denenen materyaller (A. plastik halat, B. polietilen halat, C. pamuk ip, D. yumuşak halat, E. sert seramik, F. hava taşı) (Orijinal).



Şekil 4.3. Jüt ip üzerinde *C. vulgaris*' in oluşturduğu biyofilmin SEM görüntüleri (Orijinal).

4.3.Optik Dansite

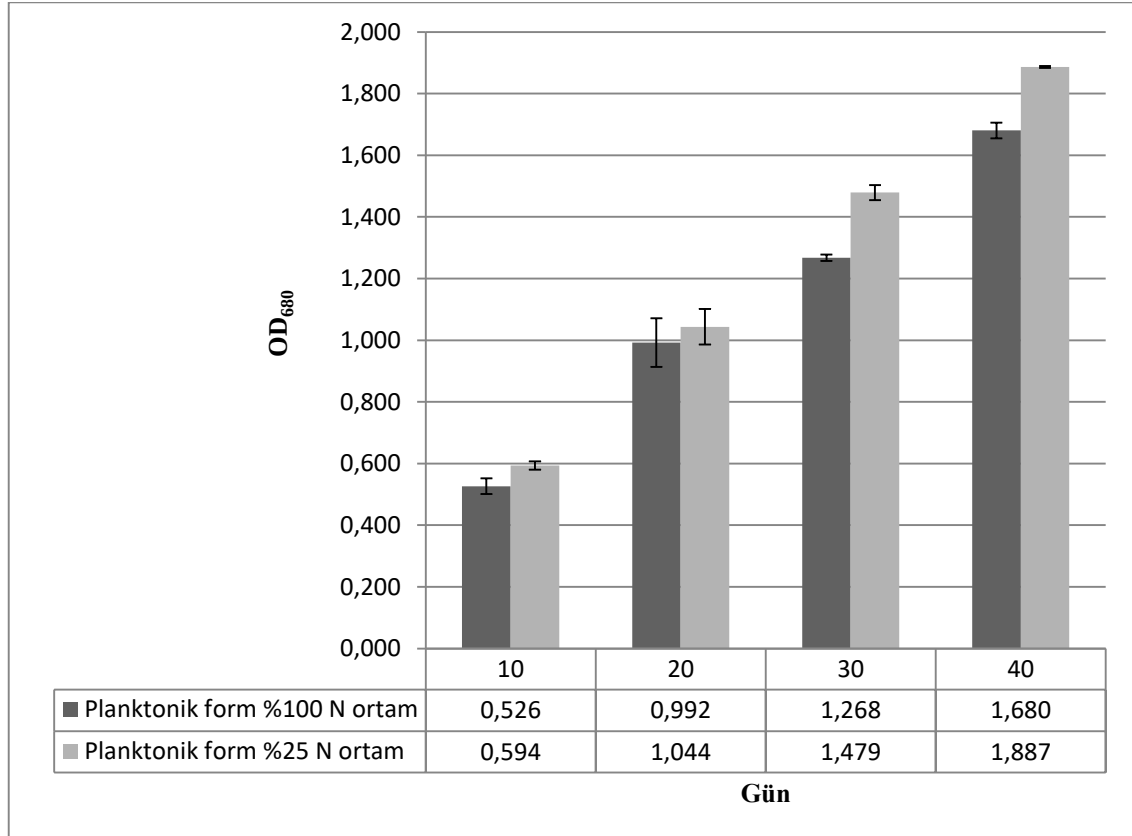
Yapılan deneyde planktonik form ve biyofilm formu üzerine çeşitli muameleler uygulanmıştır. Bu muameleler %100 azot içeren besiyeri ve %25 azot içeren besiyeri olup en düşük OD değeri 0,526 ($\pm 0,02$) iken en yüksek OD değeri 1,887 ($\pm 0,002$) olarak bulunmuştur. Bu çalışma gün sürmüştür ve 10.-20.-30.-40. günlerde alınan örneklerden elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Başlangıç optik dansitesi 0,3' e ayarlanıp kültivasyona bırakılan % 100 azot içeren *C. vulgaris* planktonik formundan deney öncesinde belirlenmiş olan günlerde numune alıp 680 nm' de incelenerek ölçülen en düşük OD değeri 0,526 ($\pm 0,02$) iken en yüksek OD değeri ise 1,680 ($\pm 0,02$) olarak saptanmıştır.

Başlangıç optik dansitesi 0,3' e ayarlanıp kültivasyona bırakılan %25 azot içeren *C. vulgaris* planktonik formundan deney öncesinde belirlenmiş olan günlerde numune alıp 680 nm'

de incelenerek ölçülen en düşük OD değeri 0,594 ($\pm 0,013$) ve en yüksek OD değeri ise 1,887 ($\pm 0,002$) olarak saptanmıştır.

C. vulgaris'in planktonik formu üzerinde uygulanan %100 azot içeren besiyeri ile %25 azot içeren besiyerinde yapılan OD ölçümlerinin kıyaslaması Şekil 4.4' de verilmiştir.



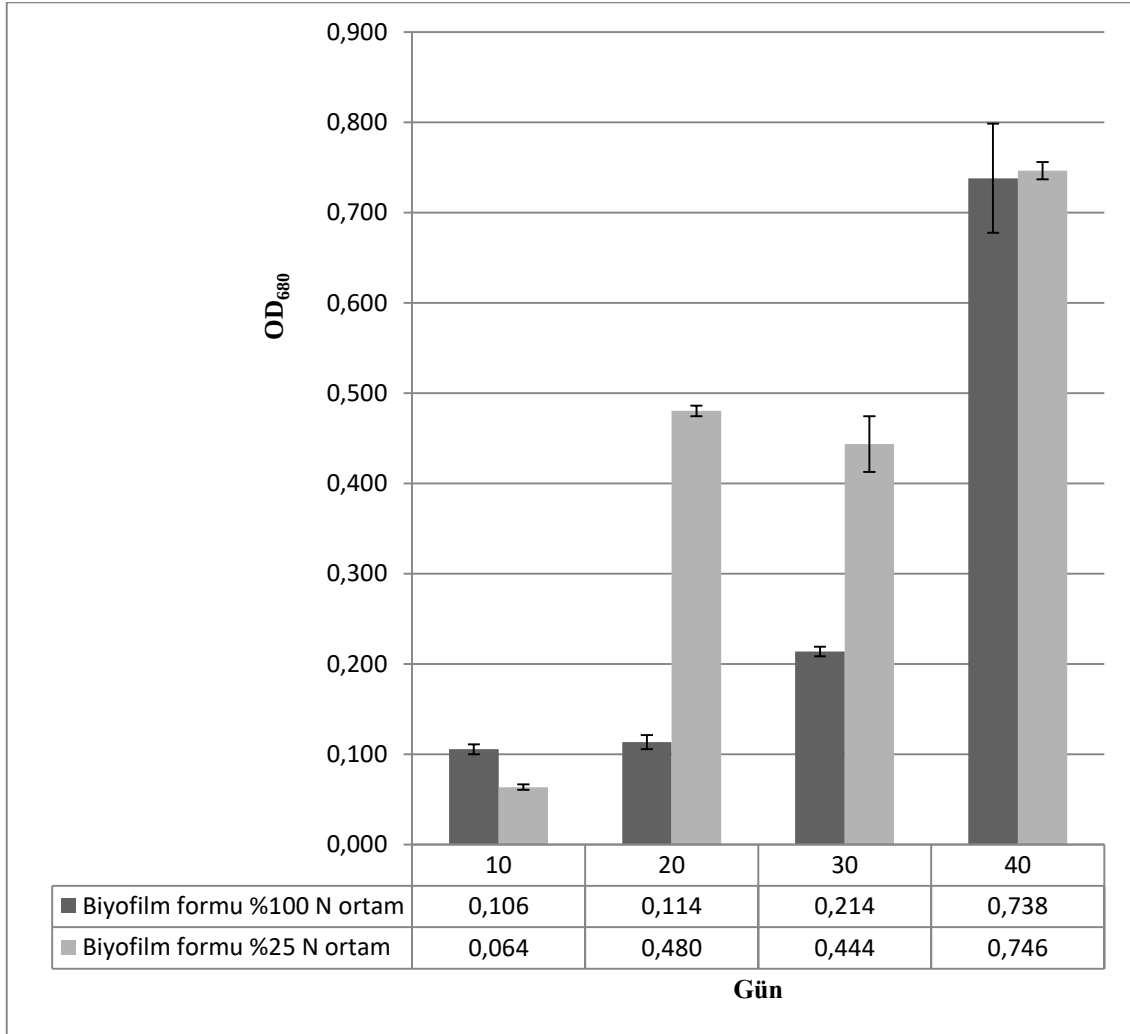
Şekil 4.4. %100 azot ve %25 azotlu ortamlardaki planktonik formların OD karşılaştırılması.

Başlangıçta OD 0,3 olacak şekilde ayarlanan *C. vulgaris*' in biyofilm formundan, metod kısmında bahsedildiği gibi oluşturulan reaktörün tankından 10.- 20.- 30.- 40. günlerde numuneler alınıp spektrofotometre yardımıyla 680 nm' de ölçümleri yapılmıştır. %100 azot içeren biyofilm formundan alınmış numunelerde ölçülen en düşük OD değeri 0,106 ($\pm 0,005$) iken en yüksek OD değeri 0,738 ($\pm 0,06$) olarak saptanmıştır.

Başlangıçta OD 0,3 olacak şekilde ayarlanan *C. vulgaris*' in biyofilm formundan, metod kısmında bahsedildiği gibi oluşturulan reaktörün tankından 10.- 20.- 30.- 40. günlerde numuneler alınıp spektrofotometre yardımıyla 680 nm' de ölçümleri yapılmıştır. %25 azot

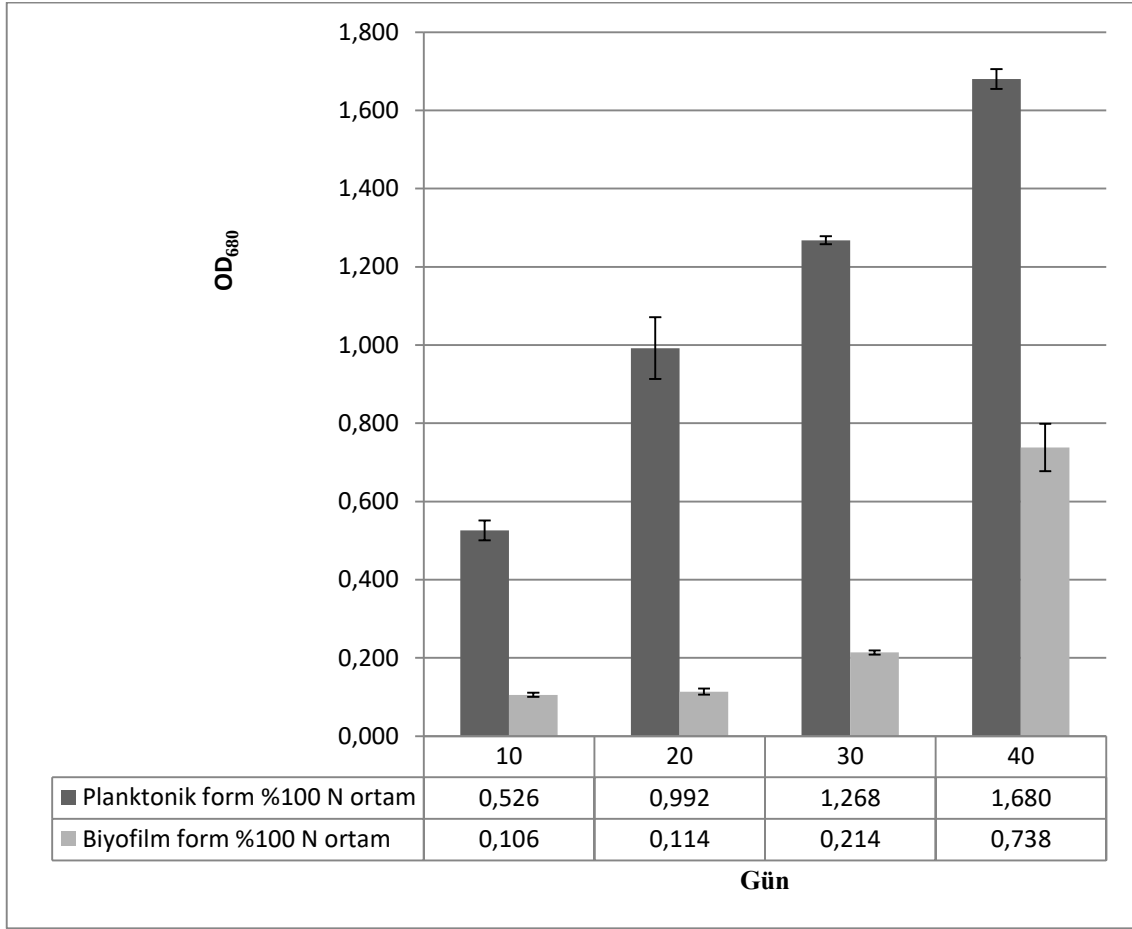
içeren biyofilm formundan alınmış numunelerde ölçülen en düşük OD değeri 0,064 ($\pm 0,003$) iken en yüksek OD değeri 0,746 ($\pm 0,009$) olarak saptanmıştır.

C. vulgaris' in biyofilm formunun %100 azotlu ortam ile %25 azotlu ortamın OD ölçümlerinin kıyaslanması Şekil 4.5' de gösterilmiştir.



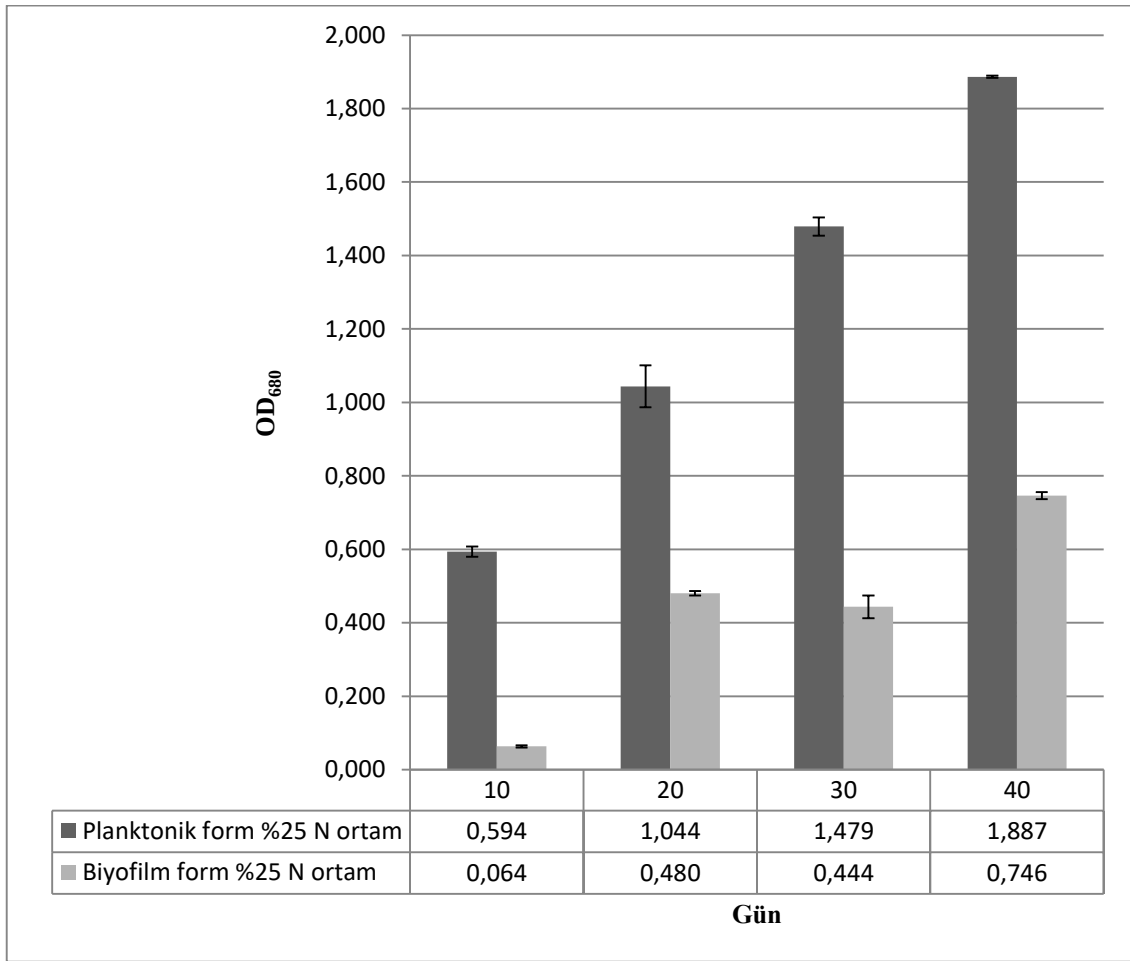
Şekil 4.5. %100 azot ve %25 azot ortamlarındaki biyofilm formlarının OD karşılaştırılması.

C. vulgaris' in biyofilm ve planktonik formun %100 azotlu ortamdaki belirlenen OD değerlerinin kıyaslanması Şekil 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.6. %100 N ortamındaki biyofilm formu ve planktonik formunun OD kıyaslanması.

C. vulgaris' in biyofilm ve planktonik formunun %25 azot bulunduran ortamlardaki belirlenen OD değerlerinin kıyaslaması Şekil 4.7' de verilmiştir.



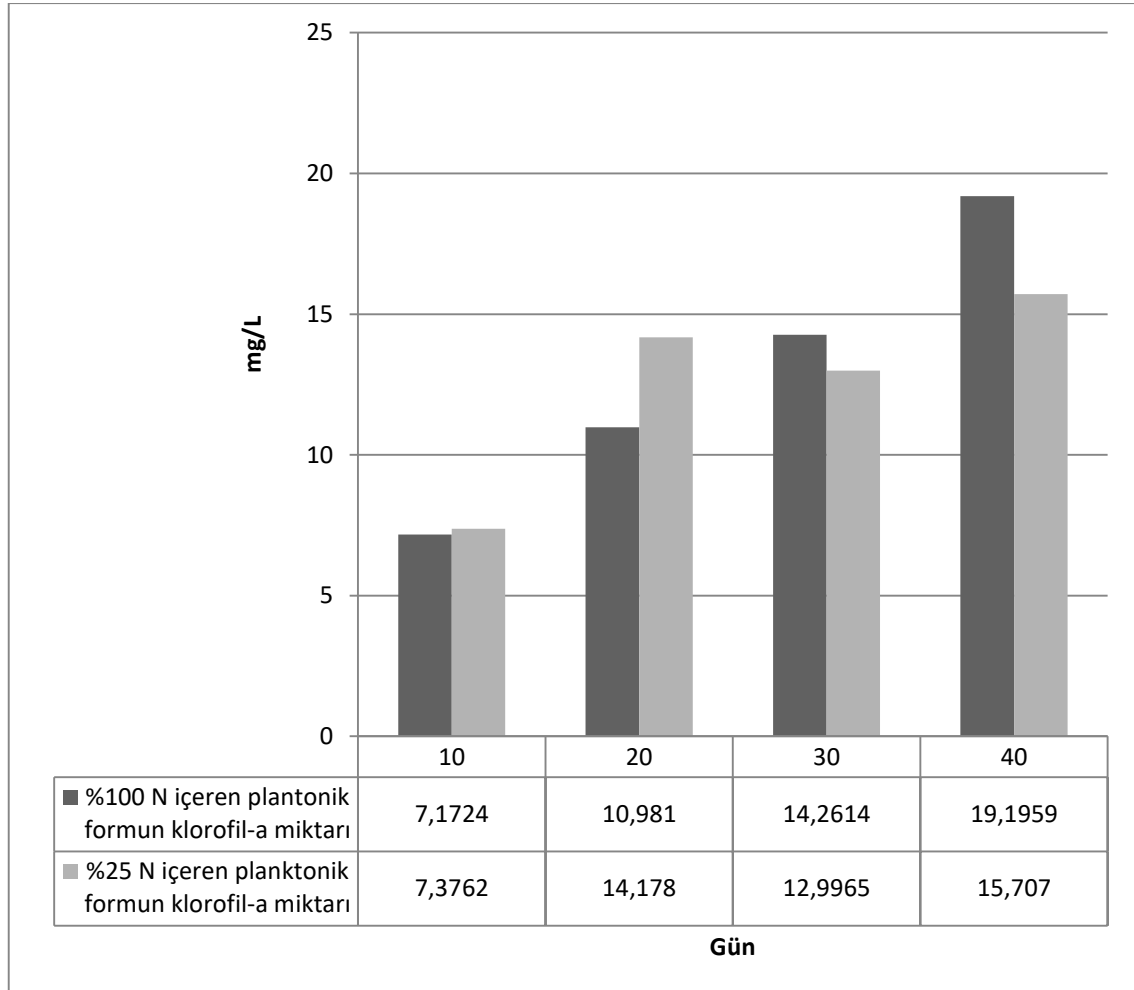
Şekil 4.7. %25 azot ortamında biyofilm formu ile planktonik formunun OD kıyaslaması.

4.4. Klorofil-A tayini

Yapılan deneyde %100 azot bulunduran *C. vulgaris* planktonik formundan belirlenmiş günlerde numune alıp 665 nm ve 750 nm’ de spektrofotometre yardımıyla ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda, %100 azot bulunduran *C. vulgaris* kültüründeki en düşük klorofil-a miktarı 7,172 mg/L iken en yüksek klorofil-a miktarı ise 19,1959 mg/L olarak belirlenmiştir.

Yapılan deneyde %25 azot bulunduran *C. vulgaris* planktonik formundan belirlenmiş günlerde numune alıp 665nm ve 750 nm’ de spektrofotometre yardımıyla ölçüm gerçekleştirilmiştir. %25 azot bulunduran *C. vulgaris* kültüründeki en düşük klorofil-a miktarı 7,3762 mg/L iken en yüksek klorofil- a miktarı 15,707 mg/L olarak saptanmıştır.

C. vulgaris kültürünün üzerinde gerçekleştirilen bu deneyde %100 azot bulunduran ve %25 azot bulunduran ortamların klorofil-a miktarlarının kıyaslaması Şekil 4.8’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. %100 azot içeren ve %25 azot içeren planktonik formdaki klorofil-a miktarının kıyaslanması.

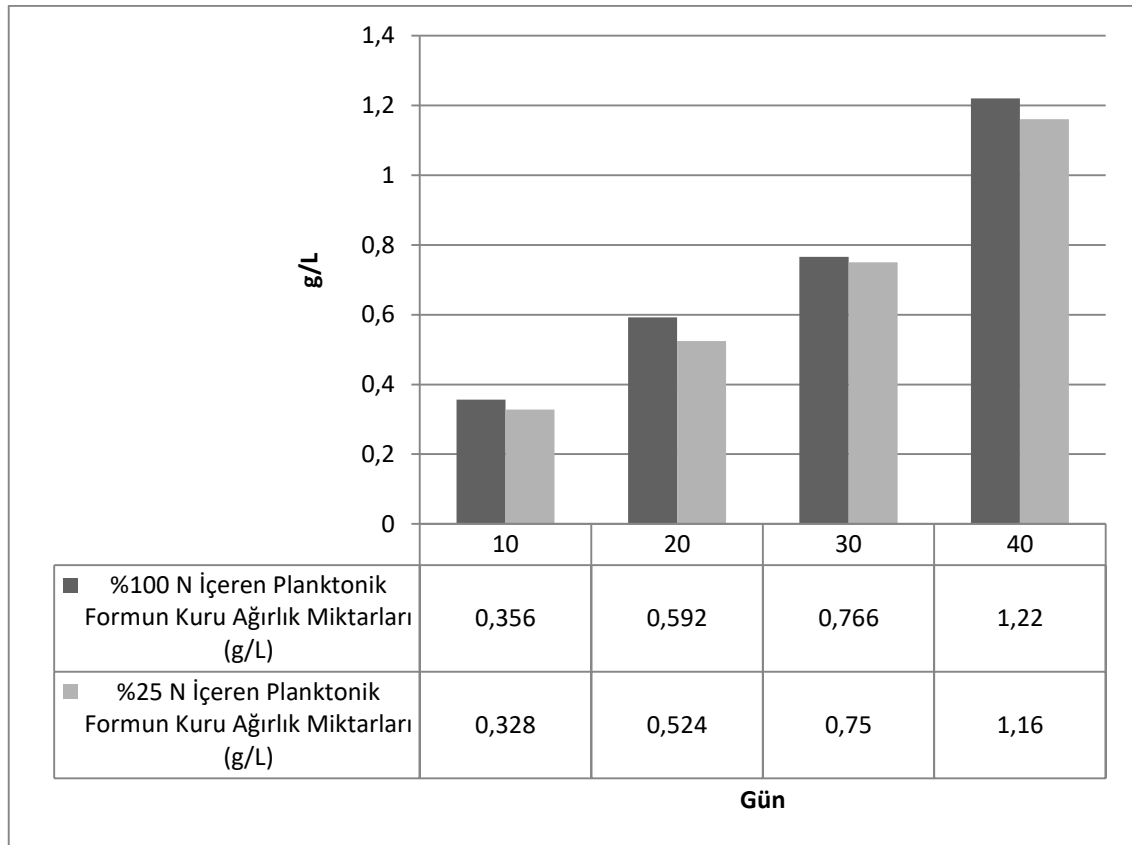
4.5. Kuru Madde Analizi

4.5.1. Planktonik form

C. vulgaris’ in planktonik olarak kültürlendiği %100-%25 N içerikli besi ortamından 10.-20.-30.-40. günlerde 50 mL örnek alınıp materyal metotta belirtilen prosedürlere tabi tutulmuştur. Bu uygulamanın sonucunda %100 N içerikli ortamdan ölçülen en düşük ve en yüksek DCW sırası ile 0,356 g/L ve 1,22 g/L olarak hesaplanmıştır.

C. vulgaris' in planktonik olarak kültürlendiği %25 N içeren besi ortamında uygulama sonucunda elde edilen en düşük ve en yüksek DCW miktarları sırası ile 0,328 g/L ve 1,16 g/L olarak hesaplanmıştır.

C. vulgaris mikroalginin üzerinde uygulanan bu çalışmada %100-%25 N içerikli besi ortamlarında ölçülen kuru madde miktarlarının karşılaştırılması Şekil 4.9' da verilmiştir.



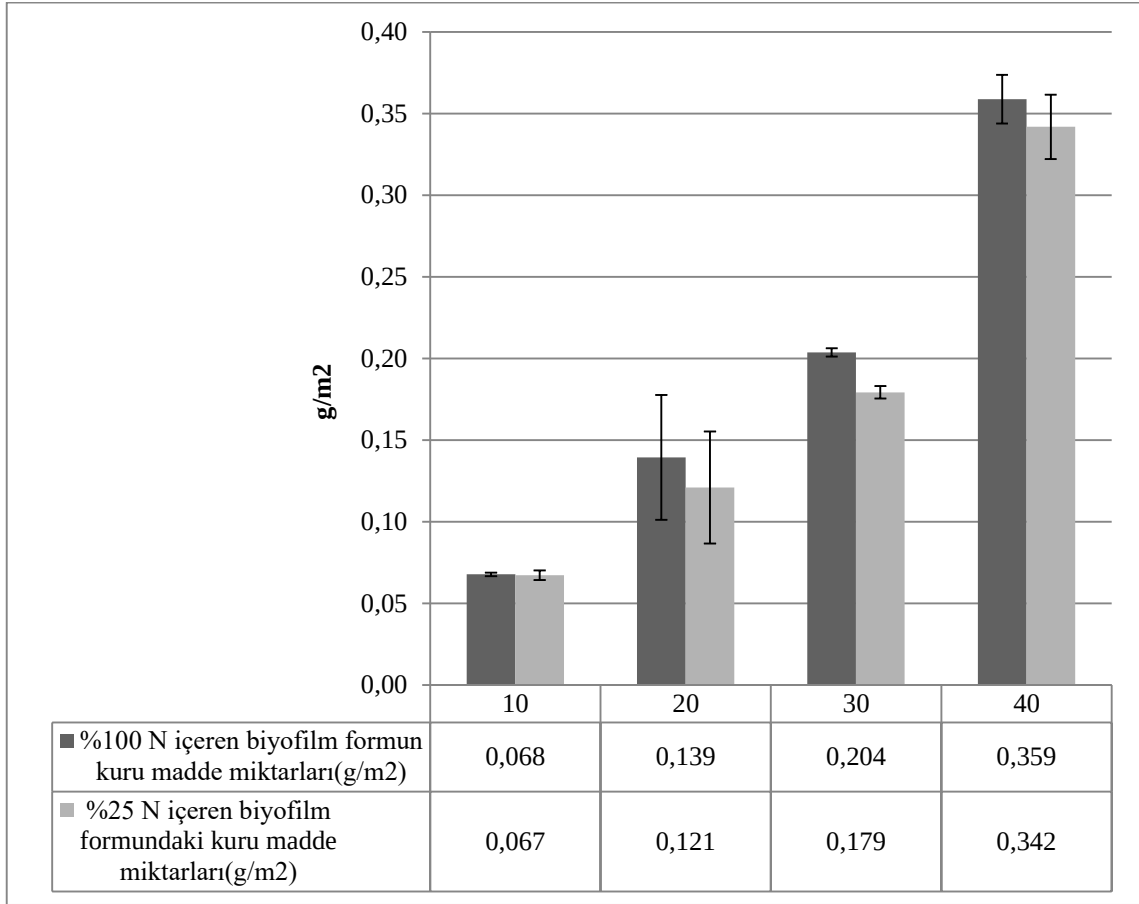
Şekil 4.9. Planktonik formasyonlarında azot eksikliğine bağlı kuru madde miktarları (g/L).

4.5.2. Biyofilm formu

RABR' da kültürlen *C. vulgaris*' in biyofilm oluşum özelliklerinin incelenmesinin gerçekleştirildiği %100-%25 N içerikli ortamlardan 10.-20.-30.-40. günlerde alınan örneklerle materyal metot kısmında belirtilen prosedürler uygulanmıştır. Uygulama sonucunda hesaplanan en düşük ve en yüksek DCW miktarları 0,067 ($\pm 0,003$) g/m² ve 0,359 ($\pm 0,014$) g/m² olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın 10. gününde elde edilen ölçüm sonuçlarında %100 N içerikli ortamda m^2 'ye düşen DCW miktarı 0,068 g/m^2 olarak belirlenmiştir. %25 N içerikli ortamdan elde edilen m^2 'ye düşen DCW miktarı ise 0,067 ($\pm 0,003$) g/m^2 olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın 20. gününde elde edilen ölçüm sonuçlarında %100 N içerikli ortamda m^2 'ye düşen DCW miktarı 0,139 ($\pm 0,038$) g/m^2 olarak belirlenmiştir. %25 N içerikli ortamdan elde edilen m^2 'ye düşen DCW miktarı ise 0,121 ($\pm 0,034$) g/m^2 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın 30. gününde elde edilen ölçüm sonuçlarında %100 N içerikli ortamda m^2 'ye düşen DCW miktarı 0,204 ($\pm 0,002$) g/m^2 olarak hesaplanmıştır. %25 N içerikli ortamdan elde edilen m^2 'ye düşen DCW miktarı ise 0,179 ($\pm 0,003$) g/m^2 olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın 40. gününde elde edilen ölçüm sonuçlarında %100 N içeren ortamdaki m^2 'ye düşen DCW miktarı 0,359 ($\pm 0,014$) g/m^2 olarak hesaplanmıştır. %25 N içerikli ortamdan elde edilen m^2 'ye düşen DCW miktarı ise 0,342 ($\pm 0,019$) g/m^2 olarak hesaplanmıştır.

Biyofilm formasyonunun %100-%25 N içerikli besi ortamında m^2 'ye düşen DCW miktarının karşılaştırmalı grafiği g/m^2 cinsinden hesaplanarak Şekil 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.10. Biyofilm formasyonlarında azot eksikliğine bağlı kuru madde miktarları (g/m²).

4.6. Total Yağ Miktarları

C. vulgaris mikroalginin kültivasyonunun sağlandığı %100 azot bulunduran ve %25 azot bulunduran biyofilm ve planktonik formundan 10.- 20.- 30.- 40. günlerde alınan numunelerde metot bölümünde değinildiği gibi total yağ ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Bu uygulama neticesinde meydana gelen sonuçlar % ve mg/g olmak üzere ayrı ayrı hesaplanmıştır.

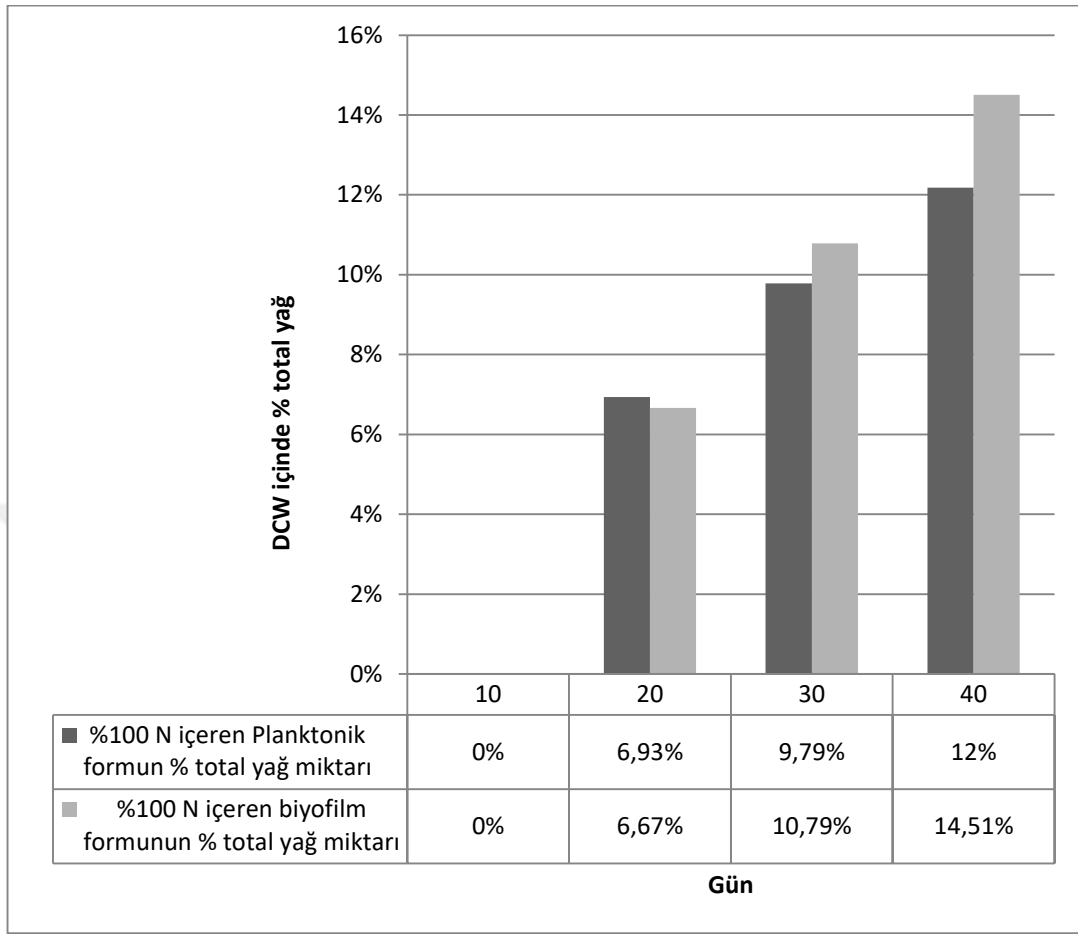
C. vulgaris mikroalginin %100 azot bulunduran biyofilm ve planktonik formu üzerinde yapılan incelemede elde edilen yağ miktarı en düşük 0 mg/g iken en yüksek yağ miktarı ise 145 mg/g olarak belirlenmiştir. 10. günde prosedürü uygulayabilmek için gereken kuru madde miktarı elde edilemediğinden total yağ ekstraksiyonu yapılamamıştır ve 10. günündeki değer 0 olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.1).

C. vulgaris mikroalginin %25 azot bulunduran biyofilm ve planktonik form üzerinde yapılan incelemede elde edilen en düşük yağ miktarı 0 mg/g iken en yüksek yağ miktarı ise 168,6 mg/g olarak belirlenmiştir. 10. günde prosedürü uygulayabilmek için gereken kuru madde miktarı elde edilemediğinden total yağ ekstraksiyonu yapılamamıştır ve 10. günündeki değer 0 olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. %100 azot bulunduran ve %25 azot bulunduran biyofilm ve planktonik formunun total yağ miktarları (mg/g).

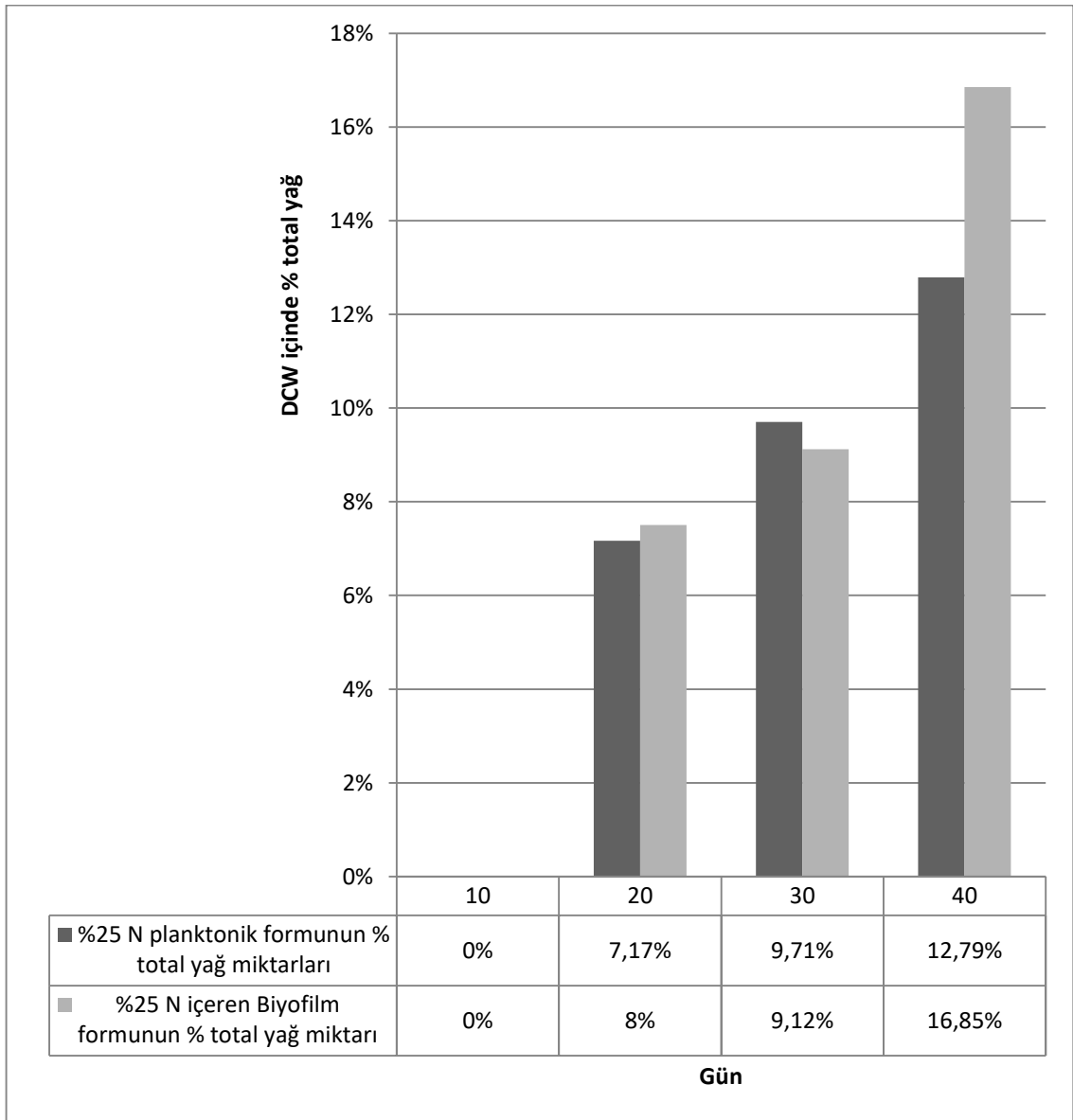
Total lipid (mg lipid/g kuru mikroalg biyokütle)				
	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün
%100 N İçeren Planktonik Ortam	0	64,4	97,8	121,8
%25 N İçeren Planktonik Ortam	0	71,6	97	127,8
%100 N İçeren Biyofilm Ortamı	0	66,6	107,2	145
%25 N İçeren Biyofilm Ortamı	0	75	91,2	168,6

C. vulgaris mikroalginin %100 azot bulunduran biyofilm ve planktonik formu üzerinde yapılan incelemede elde edilen % yağ miktarı en düşük %0 iken en yüksek % yağ miktarı ise %14,51 olarak belirlenmiştir. Denemenin 10. gününde prosedürü uygulayabilmek için gereken kuru madde miktarı elde edilemediğinden total yağ ekstraksiyonu yapılamamıştır ve 10. günündeki değer 0 olarak kabul edilmiştir. %100 azot bulunduran biyofilm ve planktonik formundan elde edilen % cinsinden total yağ miktarı grafiği Şekil 4.11’ de verilmiştir.



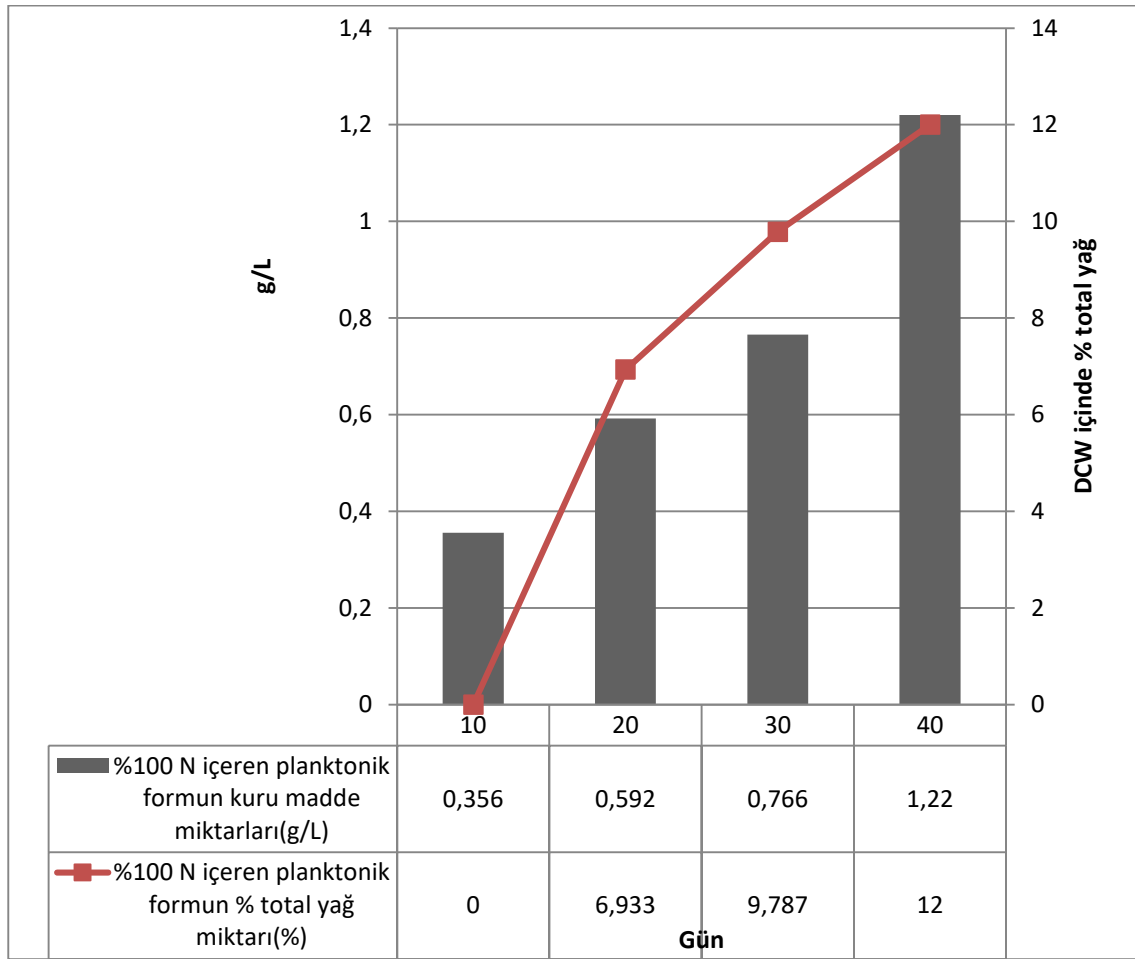
Şekil 4.11. Biyofilm ve planktonik formlarda kuru hücre ağırlığının (DCW) %100 azot bulunduran ortamda % yağ miktarı üzerine etkisi.

C. vulgaris' in %25 N içeren biyofilm ve planktonik formunda gerçekleştirilen incelemede elde edilen en düşük % yağ miktarı %0 iken en yüksek % yağ miktarı ise %16,85 olarak saptanmıştır. Denemenin 10. gününde prosedürü uygulayabilmek için gereken kuru madde miktarı elde edilemediğinden total yağ ekstraksiyonu yapılamamıştır ve 10. günündeki değer 0 olarak kabul edilmiştir. %25 azot bulunduran biyofilm ve planktonik formundan elde edilen % cinsinden total yağ miktarı grafiği Şekil 4.12' de verilmiştir.



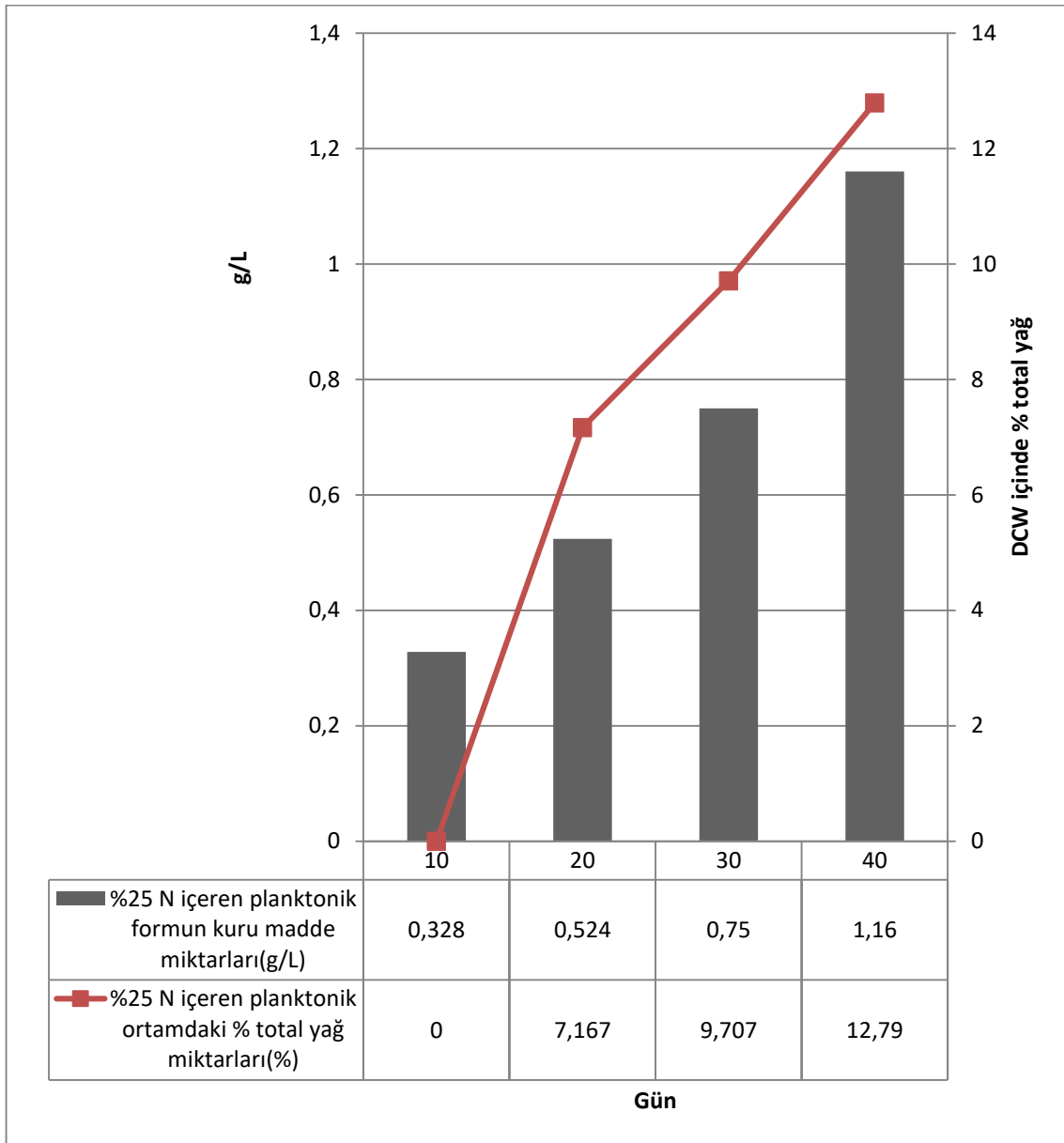
Şekil 4.12. Biyofilm ve planktonik formda kuru hücre ağırlığının (DCW) N eksiltmesi uygulanan koşullarında % yağ miktarına etkisi.

C. vulgaris' in %100 azot bulunduran planktonik formunun % total yağ miktarları ile kuru madde miktarlarının kıyaslanması neticesinde en düşük DCW' nin 0,356 g/L olduğu günde % total yağ miktarı %0 olduğu saptanmıştır. Kıyaslama neticesinde oluşan en yüksek DCW' nin 1,22 g/L olduğu günde ise % total yağ miktarı %12 olduğu saptanmıştır. %100 azot bulunduran planktonik formdaki % total yağ miktarları DCW'nin kıyaslaması Şekil 4.13' de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. %100 azot bulunduran planktonik formdaki % total yağ miktarları ile kuru madde miktarı (g/L) kıyaslaması.

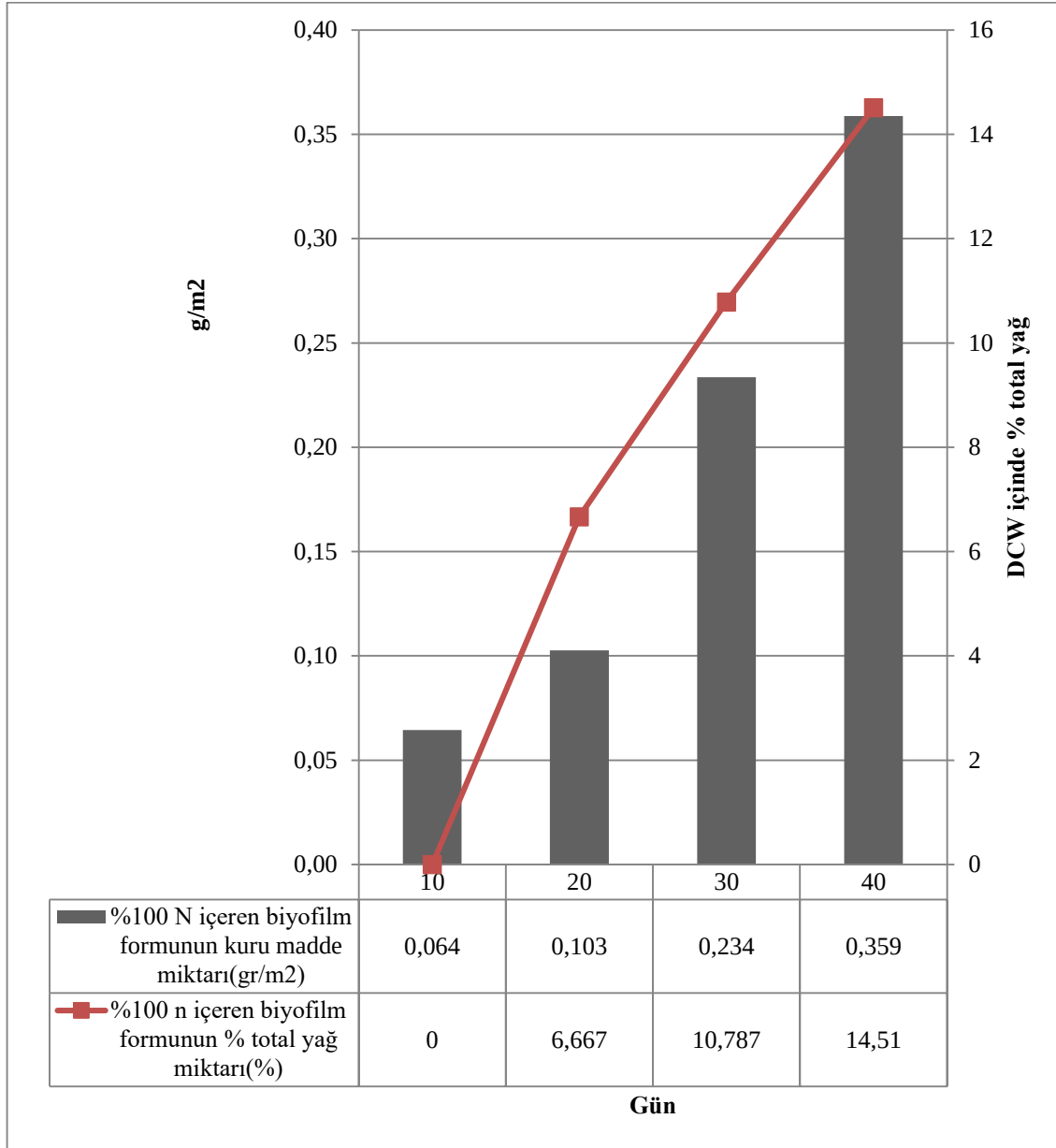
C. vulgaris' in planktonik olarak kültürlendiği % 25 azot içerikli formundaki ölçülen DCW ve % total yağ miktarlarının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinin sonucunda en düşük DCW miktarı 10. günde 0,328 g/L olarak belirlenmiş ve 10. gündeki % total yağ miktarı %0 olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu karşılaştırmalı değerlendirme sonucunda en yüksek DCW miktarı 40. günde 1,16 g/L olarak belirlenmiş ve 40. gündeki % total yağ miktarı %12,79 olarak hesaplanmıştır. %25 azot içerikli planktonik olarak kültürlenmesi sağlanan formun DCW ve % total yağ miktarlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.14' de verilmiştir.



Şekil 4.14. %25 N içeren planktonik formun kuru madde (g/L) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırması.

C. vulgaris' in biyofilm oluşumunun incelenebilmesi için oluşturulan %100 azot içerikli besi ortamında ölçülen DCW ve % total yağ miktarlarının karşılaştırılması olarak değerlendirilmesinin sonucunda en düşük DCW miktarı 10. günde 0,064 g/m² olarak belirlenmiş ve 10. günde ölçülen % total yağ miktarı %0 olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu karşılaştırmalı değerlendirme sonucunda en yüksek DCW miktarı 40. günde 0,359 g/m² olarak belirlenmiş ve 40. gündeki % total yağ miktarı %14,51 olarak hesaplanmıştır. %100 azot

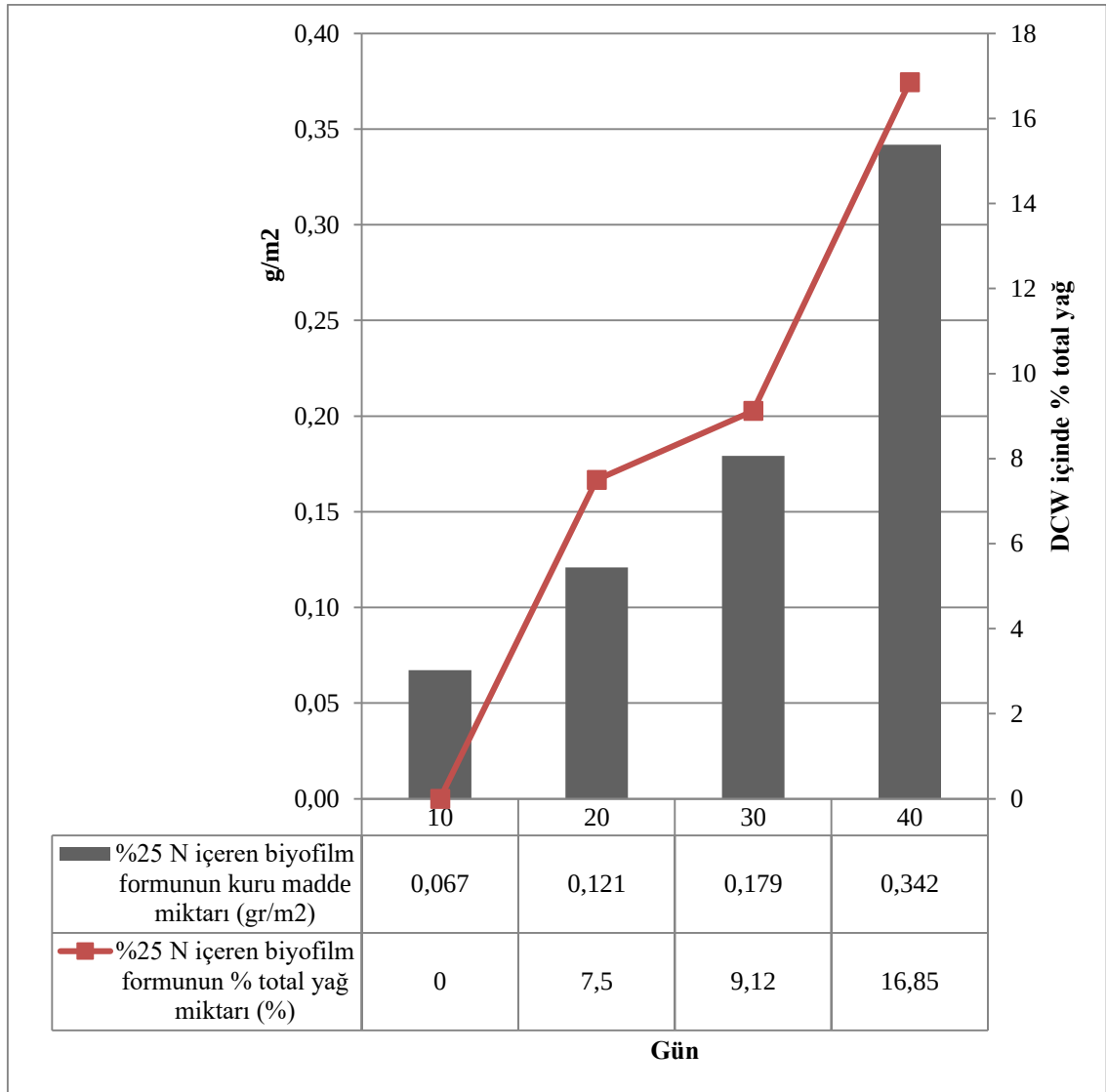
içerikli biyofilm formasyonunda ölçülen DCW ve % total yağ miktarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.15’ de verilmiştir.



Şekil 4.15. %100 N içeren biyofilm formun kuru madde (g/m^2) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırması.

C. vulgaris’ in biyofilm oluşumunun incelenebilmesi için oluşturulan %25 azot içerikli besi ortamında ölçülen DCW ve % total yağ miktarlarının karşılaştırılmalı olarak

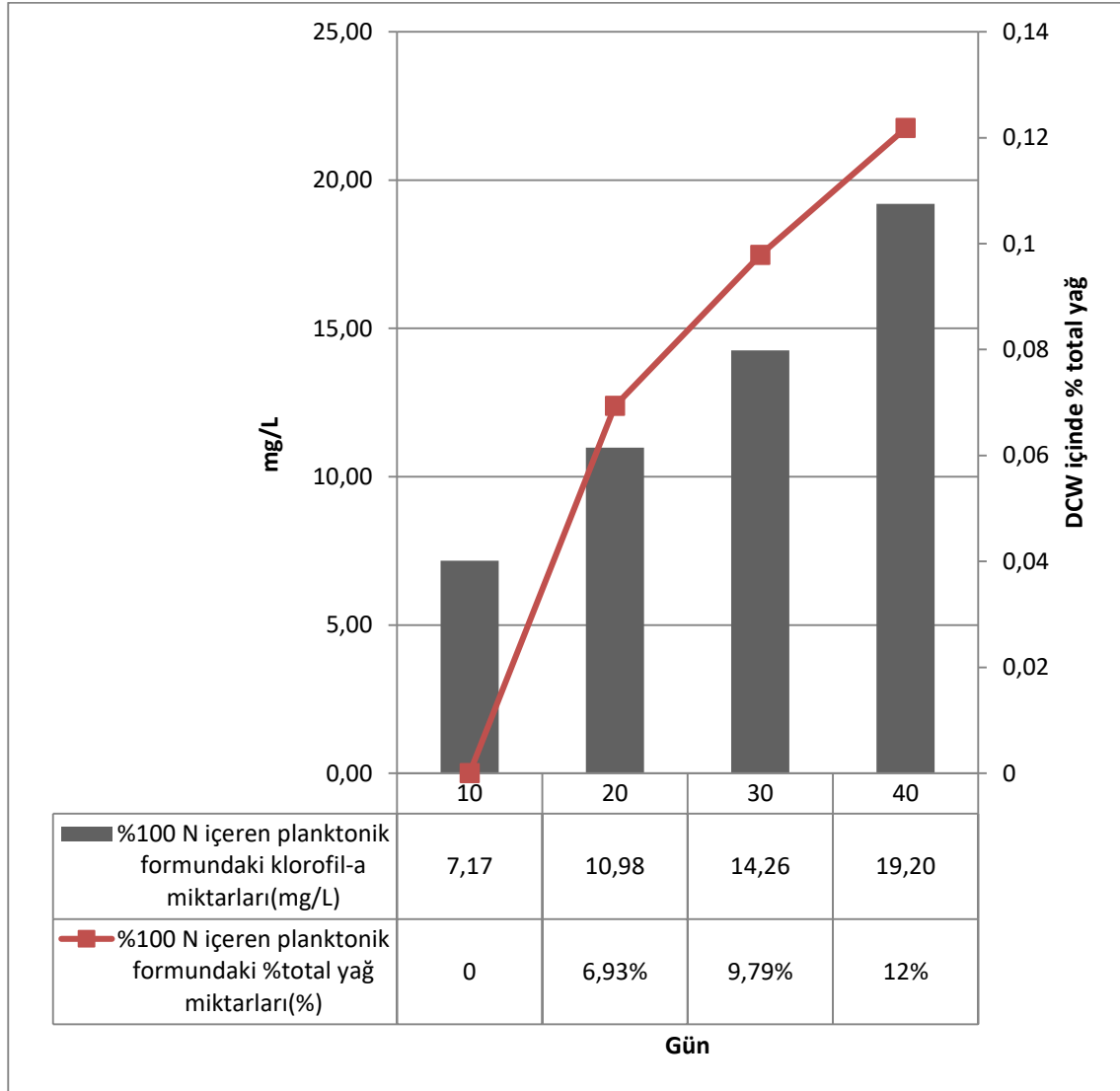
değerlendirilmesinin sonucunda en düşük DCW miktarı 10. günde $0,067 \text{ g/m}^2$ olarak belirlenmiş ve 10. günde ölçülen % total yağ miktarı %0 olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu karşılaştırmalı değerlendirme sonucunda en yüksek DCW miktarı 40. günde $0,342 \text{ g/m}^2$ olarak belirlenmiş ve 40. günde % total yağ miktarı %14,51 olarak hesaplanmıştır. %25 azot içerikli biyofilm formasyonunda ölçülen DCW ve % total yağ miktarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.16' da verilmiştir.



Şekil 4.16. %25 N içeren biyofilm formunun kuru madde (g/m^2) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırması.

C. vulgaris' in planktonik olarak kültürlendiği %100 N içerikli besi ortamında ölçülen klorofil-a ve % total yağ miktarlarını karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinin sonucunda en

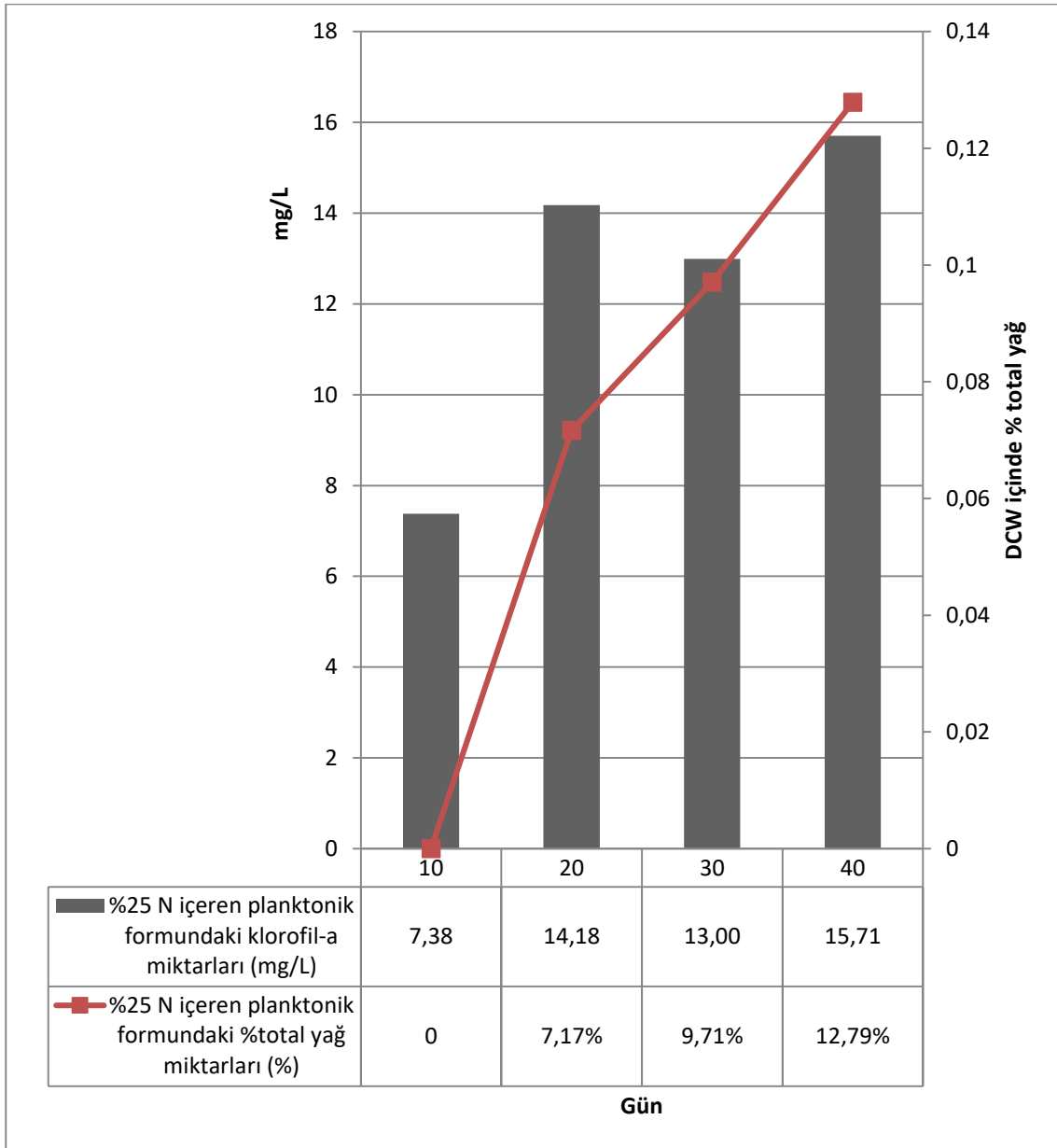
düşük % total yağ miktarı 10. günde %0 olarak belirlenmiş ve 10. gündeki klorofil-a miktarı 10,98 mg/L olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu karşılaştırmalı değerlendirme sonucunda en yüksek % total yağ miktarı 40. günde %12 olduğu ve 40. gündeki klorofil-a miktarı 19,20 mg/L olarak hesaplanmıştır. %100 azot içerikli planktonik olarak kültürlenmesi sağlanan formun klorofil-a ve % total yağ miktarlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.17’ de verilmiştir.



Şekil 4.17. %100 N içeren planktonik formun klorofil-a (mg/L) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırılması.

C. vulgaris’ in planktonik olarak kültürlendiği %25 N içerikli besi ortamında ölçülen klorofil-a ve % total yağ miktarlarını karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinin sonucunda en

düşük % total yağ miktarı 10. günde %7,17 olarak belirlenmiş ve 10. gündeki klorofil-a miktarı 14,18 mg/L olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu karşılaştırmalı değerlendirme sonucunda en yüksek % total yağ miktarı 40. günde %12,79 olduğu ve 40. gündeki klorofil-a miktarı 15,71 mg/L olarak hesaplanmıştır. %25 azot içerikli planktonik olarak kültürlenmesi sağlanan formun klorofil-a ve % total yağ miktarlarının karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.18’ de verilmiştir.



Şekil 4.18. %25 N içeren planktonik formun klorofil-a (mg/L) ve % total yağ miktarlarının karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Chlorella vulgaris ticari olarak üretimi sağlanan bir çok mikroalg türünün içerisinde yer almaktadır. Bu çalışma içerisinde *C. vulgaris* biyofilm kültürlerinde azot açlığının lipid birikimi üzerine etkisi incelenmiştir.

Bu çalışmanın içerisinde *C. vulgaris* mikroalginin gelişim gösterebilmesi için %100 ve %25 N içeren besi ortamları oluşturulmuş ve buna bağlı olarak planktonik form ve biyofilm formu üzerinde yağ depolama kabiliyetleri incelenmiştir. Mikroalgdeki biyofilm oluşumunu inceleyebilmek için laboratuvar koşullarına uygulanarak RABR tasarlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda besinlerin kullanılabilme oranlarının alglerdeki yağ üretim tepkimelerinde çok önemli bir rol oynadığı ve buna bağlı olarak mikroalglerde besin stresinin uygulanması sonucunda yağ miktarının arttığı fakat hücrenin mitotik aktivitesinin zaman içerisinde azalma gösterdiğini rapor etmişlerdir (Thompson, 1996). Bu çalışma içerisinde deneyin yürütülebilmesi amacıyla *C. vulgaris* mikroalgi kullanılmış olup ve standart azot içerikli (%100) planktonik formun OD değerlerinin azot eksiltmesi uygulanan (%25) planktonik forma göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Standart azot içerikli (%100) planktonik ortamdan ölçülen en yüksek OD değeri 40. günde elde edilmiş ve 1,680 ($\pm 0,02$) olarak hesaplanmıştır. Azot eksiltmesi uygulanan (%25) planktonik ortamdan ölçülen en yüksek OD değeri ise 40. günde elde edilmiş ve 1,887 ($\pm 0,002$) olarak hesaplanmıştır. *C. vulgaris*' in biyofilm oluşum potansiyelinin incelenebilmesi için laboratuvar koşullarına modifiye edilerek kurulan dönen algal biyofilm reaktöründe, standart azot içerikli (%100) ortamdan ölçülen OD değerlerinin azot eksiltmesi uygulanan (%25) ortama nazaran daha düşük olduğu belirlenmiştir. Standart azot içerikli biyofilm formundan ölçülen en yüksek OD değeri 40. günde elde edilmiş ve 0,738 ($\pm 0,06$) olarak hesaplanmıştır. Azot eksiltmesi (%25) uygulanan biyofilm formundan ölçülen en yüksek OD değeri ise 40. günde elde edilmiş ve 0,746 ($\pm 0,009$) olarak hesaplanmıştır. % 100 azot ve %25 azot içerikli planktonik ortamdan ölçülen OD değerlerinin, %100 azot ve %25 azot içerikli biyofilm formuna göre daha fazla miktarlarda olmasının nedeni biyofilm formasyonlarında OD tayinin reaktör teknesi içerisinde yapılması ve mikroalglerin polietilen halat üzerinde biyofilm meydana getirmesidir. Procházková ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışma içerisinde mikroalglerin üzerinde azot açlığının uygulanmasına bağlı olarak hücredeki bazı kimyasal bileşenlerin miktarının artış gösterdiğini fakat azot stresinin mikroalglerden elde edilecek biyokütlelerin veriminde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir (Procházková, vd., 2013). *C.vulgaris* mikroalginin planktonik olarak kültürlendiği, standart azot içerikli ve azot

eksiltmesi uygulanan ortamlardan elde edilen DCW verilerine göre, %100 azot içerikli ortamdan elde edilen DCW miktarının %25 azot içerikli ortama göre daha yüksek olduğu hesaplanmıştır. *C.vulgaris*' in biyofilm oluşturmak için kültürlendiği RABR' da, standart azot içerikli ve azot eksiltmesi uygulanan ortamlardan elde edilen DCW verilerine göre, %100 azot içerikli ortamdan elde edilen DCW miktarının %25 azot içerikli ortama göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Azot eksiltmesi uygulanan planktonik ve biyofilm ortamlarından elde edilen DCW miktarlarının, standart azot içeren ortamlara göre daha yüksek miktarlarda olmasının nedeni azot eksiltme işleminin mikroalglerin mitotik hızını azaltması ve buna bağlı olarak hücre sayısının düşmesine neden olmasıdır. Azot stresinin kuru madde miktarı ve OD üzerine olan etkisini araştırmak için yürütülen bu çalışma içerisinde elde edilen sonuçlar ışığında mikroalgler üzerinde azot stresinin uygulanmasının OD miktarlarını artırıcı etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Elde ettiğimiz bu veriler daha önce yapılmış olan çalışmalarla aynı doğrultuda değildir ve bunun nedenin kullanılan mikroalg türünün farklı olması, deney süresinin uzunluğu ve kullanılan besi ortamının farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Mikroalgler, kültürlendiği koşulların değiştirilmesine yanıt olarak lipid metabolizmasında etkin bir biçimde değişkenlik meydana getirebilmektedirler. Uygun olmayan çevre koşullarında ya da stres ortamları oluşturulduğunda ağırlıklarının %20-50' si kadar nötral yağ biriktirebilirler ve bu sayede değişen çevre koşullarına karşı dayanıklılıklarını arttırabilirler (Sharma, vd., 2012). Mutlu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada kontrol grubu, %50 N içeren ortam ve %0 N içeren ortamlarda *C. vulgaris*' in lipid depolama kabiliyetlerini incelemiş ve azot miktarının %0 olduğu besi ortamında *C. vulgaris* mikroalginde lipid üretiminin en yüksek seviyeye çıktığını rapor etmişlerdir (Mutlu, vd., 2010). Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre %100 azot içerikli ve %25 azot içerikli planktonik olarak kültürlenmesi sağlanan ortamlardan ölçülen total yağ miktarlarında artış meydana geldiği yapılan hesaplamalarla belirlenmiştir. %100 azot içerikli planktonik ortamın en yüksek total yağ miktarına 40. günde ulaşılmış ve 121,8 mg/g olduğu saptanmıştır. %25 azot içerikli planktonik ortamın en yüksek total yağ miktarına ise 40. günde ulaşılmış ve 127,8 mg/g olduğu saptanmıştır. Planktonik olarak kültürlendiği ortamlarda ölçülen total yağ miktarlarının % cinsinden değerleri ise standart azot içeren ortamda en yüksek %12, azot eksiltmesi uygulanan ortamda ise %12,79 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler ışığında planktonik ortamda uygulanan azot eksiltme işleminin mikroalgler üzerinde total yağ miktarlarını artırıcı yönde etki ettiği sonucu çıkmaktadır. Dönen algal biyofilm reaktöründe yapılan %100 azot içerikli ve %25 azot içerikli ortamda ölçülen total yağ miktarlarının günlük olarak artış göstermiş olduğu belirlenmiştir. Standart azot içeren biyofilm formasyonundan elde edilen en yüksek total yağ

miktarına 40. günde ulaşılmış ve 145 mg/g olarak belirlenmiştir. Azot eksiltmesi uygulanan biyofilm formasyonundan elde edilen en yüksek total yağ miktarına ise 40. günde ulaşılmış ve 168,6 mg/g olarak saptanmıştır. % 100 azot içerikli biyofilm formasyonundan elde edilen total yağ miktarlarının % cinsinden değerlerine bakıldığında en yüksek %14,51, % 25 azot içerikli biyofilm formasyonunda ise en yüksek %16,85 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ışığında biyofilm formasyonunun üzerinde azot eksiltme işleminin total yağ miktarlarını artırıcı yönde etki ettiği sonucu çıkmaktadır. Aynı zamanda elde edilen verilere bakıldığında %100 azot içerikli ortamın DCW miktarının, %25 azot içerikli ortama göre daha yüksek çıktığını fakat elde edilen DCW' lere oranlandığında yağ miktarının %25 azot içerikli ortamda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. %100 azot içerikli ortamın en yüksek DCW miktarının 1,22 g/L olduğu günde total yağ miktarının %12 olduğu, %25 azot içerikli planktonik ortamın en yüksek DCW miktarının 1,16 g/L ise total yağ miktarının %12,79 olduğu belirlenmiştir. % 100 azot içerikli biyofilm formasyonundan elde edilen en yüksek DCW miktarının 0,359 g/m² olduğu dünde total yağ miktarı %14,51, %25 azot içerikli biyofilm formasyonunda en yüksek DCW miktarının 0,342 g/m² olduğunda ise total yağ miktarının %16,85 olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda mikroalgler üzerinde azot stresinin uygulanmasının oluşan hücrelerin sayısını ve klorofil-a miktarlarını azaltıcı etki gösterdiğini fakat mikroalgal hücrelerin biyokimyasal kompozisyonlarında lipitler gibi organik moleküllerin miktarlarında artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte azot stresinin uygulanması klorofil-a miktarlarını azaltırken karoten miktarlarında artış meydana getirdiği için besi ortamlarında sararmalar oluşturduğunu rapor etmişlerdir (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukenik, vd., 1989). Mutlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada klorofil-a miktarının, lipit içeriğinin en yüksek olduğu %0 N içeren besi ortamında en düşük seviyeye geldiğini rapor etmişlerdir (Mutlu, vd., 2010). 40 gün süresince devam eden bu çalışmada, standart azot içerikli ve azot eksiltmesi uygulanan planktonik ortamların üzerinde yapılan klorofil-a tayininin sonucunda elde edilen verilere bakıldığında standart azotlu ortamdaki klorofil-a miktarının, azot eksiltmesi uygulanan ortama göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ve yapılan morfolojik incelemelerde azot eksiltmesi uygulanan besi ortamında sararmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu morfolojik gözlem sonucunda azot eksiltmesi uygulanan planktonik ortamın standart azotlu ortama göre yağ içeriğinin daha fazla olabileceği düşünülmüştür.

Gross ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışma içerisinde, mikroalglerin kültürlenmesi için kurulan süspansiyon temelli sistemlere nazaran RABR sisteminin, maliyetli olmayan hasat işlemine ve yüksek miktarlarda biyokütlenin elde edilmesi sebebiyle alg üretim sistemleri

içerisinde daha fazla avantaja sahip olan bir sistemdir (Gross ve Wen, 2014). Ticari olarak alg yetiştiriciliğinde, mikroalglerin kültür sisteminden hasatlanarak biyokütlenin elde edilmesi işlemi en önemli olaydır ve süspansiyon bazlı kültür sistemlerinde hasat işlemi oldukça maliyetlidir. Bu uygulama içerisinde denenen planktonik kültürlenme sistemindeki, biyokütlenin hasatlanması için fazla miktarda santrifüj işlemi çok maliyetli bir işlemdir. Bu nedenle, ticari olarak alg yetiştiriciliğinde biyofilm bazlı kültürlenme sistemlerinin kullanılmasının, hasatlanacak biyokütlenin işleme ve hasatlama maliyetini düşürecektir ve bu uygulama sonucunda elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Dönen algal biyofilm reaktörünün tespit edilen avantajları ve dezavantajları vardır. Dezavantajlardan birincisi kültivasyon sisteminin açık bir sistem olmasından kaynaklı olarak farklı türdeki alg ve bakteri kontaminasyonuna sebebiyet vermesidir. Tespit edilen bir diğer dezavantaj ise kapalı bir sistem olmadığı için buharlaşmanın görülmesidir. Bu yüzden sistem kurulduğunda besiyeri miktarına dikkat edilmeli ve besiyeri miktarı gereken limitin altına indiğinde besiyeri eklemesi yapılmalıdır. Gross ve diğerlerinin yapmış oldukları bir çalışmada RABR sisteminin, fotobiyoreaktörler ve açık havuz sistemlerine oranla daha fazla avantajlara sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Gross ve Wen, 2014). Bu avantajların içerisindeki en önemli olanı, kültürlenmesi sağlanan mikroalglerin ışık kaynağına ve besin ortamına eşit derecede maruz kalabilmeleridir. Laboratuvar ortamına modifiye edilecek olan RABR sisteminde dikkat edilecek en önemli nokta, silindir tekerleğin üstüne kaplanması planlanan materyalin biyofilm oluşumuna uygun olmasıdır. Gross ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışma içerisinde biyofilm reaktörlerini kullanarak gerçekleştirilen kültivasyon sistemlerin daha çok laboratuvar ortamlarında uygulandığını ve biyofilm oluşturabilmesi için seçilen kaplama materyalinin pamuk içerikli malzemelerden, polimerleşmiş tabakalara kadar farklılık göstermekte olduğunu rapor etmişlerdir. Daha önce yapılan başka çalışmalarda ise kaplama materyali olarak cam tabaka, polisitren köpük, tül bent kumaş, pamuk ipi, jüt ip, karton plaka, cam elyafı, vermikülit gibi materyalin denendiğini rapor etmişlerdir (Gross, vd., 2013; Shen, vd., 2014; Johnson ve Wen, 2010). Bu konuda yapılmış olan bir diğer çalışma içerisinde tutunma matertallerinin seçiminde dikkat edilecek en önemli olayın, malzemenin dayanıklılığı ve yeniden kullanılabilirliğinin yanı sıra mikroalgal hücrelerin absorpsiyon yeteneklerinin olması gerektiğini bildirmişlerdir. (Gross, vd., 2013). Kaplanacak malzeme deneyleri yapılmadığında mikroalglerin yeterli düzeyde biyofilm oluşturmaları ve istenilen biyokütlenin eldesinde başarısızlık meydana gelecektir. Bu nedenle ticari olarak alg üretim tesislerinde maliyeti minimuma indirebilmek için bu denemelerin mutlaka gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Mantzourou ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, biyofilmin oluşturulması istenilen

kaplama materyalinin dokusunun pürüzlü bir yüzey olmasının, biyofilm oluşumu için önemli bir yer teşkil ettiğini bildirmişlerdir (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Bu deneyde çalışılan en pürüzlü yüzey hava taşıdır ve elde edilen verilere bakılarak, mikroalglerin absorpsiyon özellikleri hava taşıda oldukça yüksektir fakat mikroalglerin ortamdan hasatlanması esnasında biyokütle kaybı yaşandığı için kaplama materyali olarak tercih edilmemiştir. Dönen algal biyofilm reaktöründe kaplama materyali olarak uyguladığımız polietilen halatın yüzeyi, hava taşına nazaran daha az pürüze sahiptir fakat alglerin yüksek biyofilm oluşturmaları ve biyokütlenin hasatlanmasının kolay olması sebebiyle kaplama materyali olarak tercih edilmiştir. Bununla birlikte yapılmış olan çalışmalarda biyofilm oluşumunun gerçekleştirilebilmesi için kullanılacak standart özelliklere sahip bir kaplama malzemesinin bildirilmediğini rapor etmişlerdir (Mantzorou ve Ververidis, 2019). Bu nedenle RABR sisteminde kültürlenmesi sağlanacak mikroalgin biyofilm oluşturabilmesini sağlayabilmek amacıyla daha fazla malzeme deneylerinin yapılması gerekmektedir. Ayrıca Mantzorou ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışma içerisinde, süspansiyon bazlı kültürasyonu sağlanan mikroalglerin hasatlanmasında birçok sorunun ortaya çıktığını, biyofilm kültürasyonunda ise biyokütlenin hasatlanmasının oldukça kolay olduğunu ve kaplama malzemesinden sıyrarak gerçekleştirilebileceğini bildirmişlerdir (Mantzorou ve Ververidis, 2019). RABR sisteminde silindir tekerleğin üstünde biyofilm oluşturmuş mikroalgleri, tutunma materyalinin yapısına göre kazıma ya da solüsyon içerisinde çalkalama yöntemi kullanılarak hasatlamak mümkündür. Bu deney sonucunda sonucunda raporlanan avantajlar daha önce yapılmış olan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Mikroalglerin türüne bağlı olarak farklı özellikleri ve davranışları vardır ve bu yüzden bazı alg türleri biyofilm oluşturarak, bazılarının ise planktonik formda gelişim gösterdiği bilinmektedir. Biyofilm sistemlerini kurarken göz önünde bulundurulacak en mühim husus elverişli mikroalg türünün seçilmesidir (Katarzyna, vd., 2015). Bu denemede laboratuvar koşullarında çalışılmak üzere dizayn edilen RABR sistemiyle gerçekleştirilen ölçümlerin sonucunda *C. vulgaris*' in biyofilm oluşturabilme kapasiteleri gözlemlenmiştir ve polietilen halatın üstünden hasatlanan DCW miktarına bakılarak *C. vulgaris* mikroalginin biyofilm meydana getirme kapasitesinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Griffiths ve diğerlerinin yaptığı bir deneyde besi ortamlarındaki N miktarının azaltılmasının, biriktirilen lipid miktarı arttırımında çoğunlukla kullanılmış bir sistem olduğunu rapor etmişlerdir (Griffiths, vd., 2011). Yapılan bu deneyde biyofilm ve planktonik formasyonu üstünde gerçekleştirilen stres koşullarından N eksiltme yöntemi neticesinde oluşan lipid miktarının artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Griffiths ve diğerlerinin yaptığı başka bir deneyde

lipit rantabilitesinin artışı biyodizel eldesini etkileyen en mühim değişken olduğunu bildirmişlerdir (Griffiths ve Harisson, 2009). Yaptığımız bu çalışmadaki veriler ışığında N stresi uygulaması, lipit oluşturma yeteneğinin üst düzeye çıkarttığı sonucunu vermektedir ve bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endüstriyel alanlarda mikroalglerle yapılan çalışmalarda biyokütle ve lipit miktarlarında artış sağlayabilmek için N eksilmesi ve biyofilm meydana getirebilmesi oldukça önemlidir. Yapılmış olan bu deney sonucunda meydana gelen verilerle dönen RABR sisteminin kullanılması ve tercih edilen mikroalge N açığının gerçekleştirilmesi lipit meydana getirilmesini arttırabileceği düşündürmektedir. Mikroalglerdeki lipit miktarının arttırılması için yapılmış olan denemeler oldukça azdır. Mikroalglerde biyofilm formasyonunun meydana getirilmesine tesir eden faktörler üzerinde hala araştırılması yapılmamış durumlar bulunmaktadır. Biyofilm parametrelerini belirleyebilmek için daha önce çalışmalar yapılsa da, biyofilm formasyonunun incelenebilmesi için geniş çaplı sistemler inşaa edilmelidir. Değişkenler iyi tespit edilip, olması gereken ortamlar sağlandığında ticari anlamda biyokütle oluşmasını gerçekleştirmek ve mikroalglerle biyodizel oluşturmakta kullanılan lipitlerin eldesi için çalışmalar devam edilmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmad, M. T., Shariff, M., Yusoff, F. M., Goh, Y. M. ve Banerjee, S. (2018), Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture, *Reviews in Aquaculture*, 1–19. Doi: 10.1111/raq.12320
- Aktar, S., ve Cebe, G. E. (2010), Alglerin genel özellikleri, kullanım alanları ve eczacılıktaki önemi, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39, 237- 264.
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J. N., Tirtiaux, C. (2011), The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis, *Journal of Experimental Botany*, 62, 1775-1801. Doi: 10.1093/jxb/erq411
- Barsanti, L., ve Gualtieri, P. (2005), *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, Second editions, Pisa, Italy: *CRC Press*, 1- 325.
- Baudelet, P. H., Ricochon, G., Linder, M., ve Muniglia, L. (2017), A new insight into cell walls of Chlorophyta, *Algal Research*, 25, 333-371. Doi: 10.1016/j.algal.2017.04.008
- Bhattacharya, D., ve Medlin, L. (1998), Algal phylogeny and the origin of land plants, *Plant Physiology*, 116, 9-15. Doi: 10.1104/pp.116.1.9
- Blatti, J. L., Michaud, J., ve Burkart, M. D. (2013), Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel, *Current Opinion in Chemical Biology*, 17, 497-498. Doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.007
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., ve Wijffels, R. H. (2013), Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*, *Bioresource Technology*, 143, 1-9. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.105
- Bule, M. H., Ahmed, I., Maqbool, F., Bilal, M., Iqbal, H. M. N. (2018), Microalgae as a source of high-value bioactive compounds, *Frontiers in Bioscience (Scholar edition)*, 10, 197-216. Doi: 10.2741/S509
- Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R. D., Drogui, P., ve Surampalli, R. Y. (2018), The potential of microalgae in biodiesel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 336-346. Doi: 10.1016/j.rser.2018.03.073
- Cheng, D., ve He, Q. (2014), Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production an overview, *Frontiers in Energy Research*, 2, 1-19. Doi: 10.3389/fenrg.2014.00026
- Chisti, Y. (2007), Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25, 294–306. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Chisti, Y. (2008), Biodiesel from microalgae beats bioethanol, *Trends in Biotechnology*, 26(3), 126–131. Doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.002

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Choudhary, P., Malik, A., ve Pant, K. (2017), Algal biofilm systems: an answer to algal biofuel dilemma, In: Gupta, S.K., Malik, A., Bux, F. (Eds.), *Algal Biofuels: Recent Advances and Future Prospects*, 77-97. Doi: 10.1007/978-3-319-51010-1_4
- Christenson, L. B., ve Sims, R. C. (2012), Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products, *Biotechnology and Bioengineering*, 1-11. Doi: 10.1002/bit.24451
- Christenson, L., ve Sims, R. (2011), Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and bioproducts, *Biotechnology Advances*, 29, 686–702. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.015
- Chu, W.L., Phang, S.-M., ve Goh, S.H. (1996), Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow, *Journal of Applied Phycology*, 8, 389–396. Doi: 10.1007/bf02178582
- Concas, A., Malavasi, V., Costelli, C., Fadda, P., Pisu, M., ve Cao, G. (2016), Autotrophic growth and lipid production of *C. sorokiniana* in lab batch and BIOCOIL photobioreactors: experiments and modeling, *Bioresource Technology*, 211, 327-338. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.089
- Cui, Y. (2013), Fundamentals in microalgae harvesting: from flocculation to self-attachment, M.S. Thesis, North Carolina State University, 157s.
- Çakmak, Z. E. (2013), Mikroalglerde nötral lipid içeriğinin artırılması üzerine bir araştırma, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, Fen Bilimleri Enstitüsü, 171s.
- Demirbas, A. (2009), Progress and recent trends in biodiesel fuels, *Energy Conversion and Management*, 50(1), 14–34. Doi: 10.1016/j.enconman.2008.09.001
- Demirbaş, A. (2010), Use of algae as biofuel sources, *Energy Conversion and Management*, 51, 2738–2749. Doi: 10.1016/j.enconman.2010.06.010
- Demirbaş, A., ve Demirbaş, F. (2010), Importance of algae oil as a source of biodiesel, *Energy Conversion and Management*, 52, 163-170. Doi: 10.1016/j.enconman.2010.06.055
- Elcik, H., ve Çakmakçı, M. (2017), Mikroalg üretimi ve mikroalglerden biyoyakıt eldesi, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 32(3), 795-820. Doi: 10.17341/gazimmfd.337627
- Fica, Z. T., ve Sims, R. C. (2016), Algae-based biofilm productivity utilizing dairy wastewater: effects of temperature and organic carbon concentration, *Journal of Biological Engineering*, 10(18), 2-7. Doi: 10.1186/s13036-016-0039-y

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Geider, R. J., Macintyre, H. L., Graziano, L. M., ve McKay, R. M. (1998), Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation, *European Journal of Phycology*, 33(4), 315-332. Doi: 10.1080/09670269810001736813
- Gong, Y., ve Jiang, M. (2011), Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel, *Biotechnol Lett*, 33, 1269–1284. Doi: 10.1007/s10529-011-0574-z
- Gour, R. S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R. S., ve Kant, A. (2016), Characterization and screening of native *Scenedesmus* sp. isolates suitable for biofuel feedstock. *Plos One*, 11(5), 1-16. Doi: 10.1371/journal.pone.0155321
- Griffiths, M. J., Hille, R. P., ve Harrison, S. T. (2011), Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions, *Journal of Applied Phycology*, 24, 989–1001. Doi: 10.1007/s10811-011-9723-y
- Griffiths, M. J., ve Harrison, S. T. (2009), Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507. Doi: 10.1007/s10811-008-9392-7
- Gross, M. A. (2015), Development and optimization of biofilm based algal cultivation, M.S. Thesis, Iowa State University, 127s. Doi: 10.31274/etd-180810-4434
- Gross, M., ve Wen, Z. (2014), Yearlong evaluation of performance and durability of a pilot-scale Revolving Algal Biofilm (RAB) cultivation system, *Bioresource Technology*, 171, 50-58. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.08.052
- Gross, M., Henry, W., Michael, C., ve Wen, Z. (2013), Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest, *Bioresource Technology*, 150, 195-201. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.016
- Gross, M., Mascarenhas, V., ve Wen, Z. (2015), Evaluating algal growth performance and water use efficiency of pilot-scale Revolving Algal Biofilm (RAB) Culture Systems, *Biotechnology and Bioengineering*, 112(10), 2040-2050. Doi: 10.1002/bit.25618
- Hsieh, C.-H., ve Wu, W.-T. (2009), Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation, *Bioresource Technology*, 100(17), 3921-3926. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.019
- Irving, T. E., ve Allen, D. G. (2011), Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2), 283-294. Doi: 10.1007/s00253-011-3341-0
- Ishikaa, T., Moheimania, N. R., ve Bahrib, P. A. (2017), Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 356-368. Doi: 10.1016/j.rser.2017.04.110

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Johnson, M. B., ve Wen, Z. (2010), Development of an attached microalgal growth system for biofuel production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 525-534. Doi: 10.1007/s00253-009-2133-2

Jones, C. S., ve Mayfield, S. P. (2012), Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy, *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 346-351. Doi: 10.1016/j.copbio.2011.10.013

Katarzyna, L., Sai, G., ve Singh, O. A. (2015), Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: literature review and research needs, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1418-1427. Doi: 10.1016/j.rser.2014.11.029

Larsdotter, K. (2006), Wastewater treatment with microalgae – a literature review, *Vatten*, 62, 31-38.

Lichtenthaler, H. K., ve Wellburn, A. R. (1983), Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591-592. Doi: 10.1002/btpr.2368

Luna, D. E. (2016), Effect of green and red light in lipid accumulation and transcriptional profile of genes implicated in lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biotechnology Progress*, 32(6), 1404-1411. Doi: 10.1002/btpr.2368

Mantzorou, A., ve Ververidis, F. (2019), Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques, *Science of the Total Environment*, 651(2), 3187-3201. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.355

Mantzorou, A., Navakoudis, E., Paschalidis, K., ve Ververidis, F. (2018), Microalgae: a potential tool for remediating aquatic environments from toxic metals, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(8), 1815-1830. Doi: 10.1007/s13762-018-1783-y

Mata, T. M., Martins, A. A., ve Caetano, N. S. (2009), Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. Doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020

Minkova, V., Razvigorova, M., Bjornbom, E., Zanzi, R., Budinova, T., ve Petrov, N. (2001), Effect of water vapour and biomass nature on the yield and quality of the pyrolysis products from biomass, *Fuel Processing Technology*, 70(1), 53–61. Doi: 10.1016/S0378-3820(00)00153-3

Mutlu, Y. B., Işık, O., Uslu, L., Koç, K., ve Durmaz, Y. (2010), The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae), *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 453-456. Doi: 10.5897/ajb10.1390

Ozkan, A., Kinney, K., Katz, L., ve Berberoglu, H. (2012), Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor, *Bioresource Technology*, 114, 542-548. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.055

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, V. S., Ghosh, T., Dubey, S., ve Mishra, S. (2017), Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae, *Bioresource Technology*, 244, 1216-1226. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.058
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., ve Mishra, S. (2014), Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, *Bioresource Technology*, 156, 146-154. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.025
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., ve Mishra, S. (2015), Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, *Bioresource Technology*, 189, 341-348. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.017
- Pragya, N., Pandey, K. K., ve Sahoo, P. (2013), A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171. Doi: 10.1016/j.rser.2013.03.034
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., ve Brányik, T. (2013), Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae, *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1359–1377. Doi: 10.1007/s10811-013-0154-9
- Polizzi, B., Bernar, O., ve Ribot, M. (2017), A time-space model for the growth of microalgae biofilms for biofuel production, *Journal of Theoretical Biology*, 432, 55-79. Doi: 10.1016/j.jtbi.2017.08.017
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., ve Bux, F. (2010), Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production, *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424. Doi: 10.1016/j.apenergy.2010.11.025
- Richmond, A. (2013), Handbook of Microalgal Culture, *Biotechnology and Applied Phycology*, 2, 3- 566. Doi: 10.1002/9781118567166
- Robles-Medina, L., González-Moreno, R., Esteban-Cerdán, L., ve Molina-Grima, E. (2009), Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production, *Biotechnology Advances*, 27(4), 398–408. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.008
- Rodolfi, L., Zittelli, 1. G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., ve Tredici, M. R. (2009), Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-Cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112.
- Roeselers, G., Loosdrecht, M. C., ve Muyzer, G. (2008), Phototrophic biofilms and their potential applications, *Journal of Applied Phycology*, 20(3), 227-235. Doi: 10.1007/s10811-007-9223-2

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., ve Vaca-Garcia, C. (2014), Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. Doi: 10.1016/j.rser.2014.04.007
- Sankaran, R., Show, P. L. (2018), Exploitation and Biorefinery of microalgae, *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 10(6), 896-916. Doi: 10.1016/B978-0-444-63992.00019-7
- Schnurr, P. J., Espie, G. S., ve Allen, D. G. (2013), Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation, *Bioresource Technology*, 136, 337-344. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.036
- Schuhmann, H., Lim, D. K., ve Schenk, P. M. (2014), Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae, *Biofuels*, 3(1), 71-86. Doi: 10.4155/bfs.11.147
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., ve Schenk, P. M. (2012), High lipid induction in microalgae for biodiesel production, *Energies*, 5(5), 1532-1553. Doi: 10.3390/en5051532
- Shen, Y., Chen, C., Chen, W., ve Xu, X. (2014), Attached culture of *Nannochloropsis oculata* for lipid production, *Bioprocess Biosystems Engineering*, 37(9), 1743-1748. Doi: 10.1007/s00449-014-1147-z
- Shen, Y., Xu, X., Zhao, Y., ve Lin, X. (2014), Influence of algae species, substrata and culture conditions on attached microalgal culture, *Bioprocess Biosystems Engineering*, 37(3), 441-450. Doi: 10.1007/s00449-013-1011-6
- Shifrin, N. S., ve Chisholm, S. W. (1981), Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles, *Journal of Phycology*, 17(4), 374-384. Doi: 10.1111/j.1529-8817.1981.tb00865.x
- Singh, J., ve Gu, S. (2010), Commercialization potential of microalgae for biofuels production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 2596-2610. Doi: 10.1016/j.rser.2010.06.014
- Smith, T., Sathish, A., Thompson, R., ve Sims, D. (2013), Rotating algal biofilm reactor (RABR) for biomass growth and nutrient removal, *Algae Biomass Summit*, Orlanda, FL.
- Soydemir, G. (2016), Atıksu Ortamında Yetiştirilen Mikroalgelerin Yağının Karakterizasyonu ve Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 128s.
- Stephenson, A. L., J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., ve Smith, A. G. (2010), Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks, *Biofuels*, 1(1), 47-58. Doi: 10.4155/bfs.09.1
- Sukenik, A., Carmeli, Y., ve Berner, T. (1989), Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp., *Journal of Phycology*, 25(4), 686-692. Doi: 10.1111/j.0022-3646.1989.00686.x

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sun, X.-M., Ren, L.-J., Zhao, Q.-Y., Ji, X.-J., ve Huang, H. (2018), Enhancement of lipid accumulation in microalgae by metabolic engineering, *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(4), 552-566. Doi: 10.1016/j.bbalip.2018.10.004
- Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., ve Yoshida, T. (2000), Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999, *Applied Microbiology Biotechnology*, 54(1), 112-127. Doi: 10.1007/s002530000333
- Thompson, G. A. (1996), Lipids and membrane function in green algae, *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1032(1), 17-45. Doi: 10.1016/0005-2760(96)00045-8
- Uduman, N., Qi, Y., Danguah, M. K., Hoadley, A. (2010), Dewatering of microalgal cultures : a major bottleneck to algae-based fuels, *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2(1), 012701. Doi: 10.1063/1.3294480
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M., ve Hu, Q. (2012), A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid, *Bioresource Technology*, 129, 289-295. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.062
- Wong, Y., Ho, Y., Ho, K., Leung, H., ve Yung, K. (2016), Maximization of cell growth and lipid production of freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by enrichment technique for biodiesel production, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 9089-9101. Doi: 10.1007/s11356-016-7792-9
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., ve Ying-xue, S. (2010), Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp., *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.016
- Xu, C., Andre, C., Fan, J., ve Shanklin, J. (2016), Cellular organization of triacylglycerol biosynthesis in microalgae, *Subcellular Biochemistry*, 86, 207-221. Doi: 10.1007/978-3-319-25979-6_9
- Xu, X. -Q., ve Beardall, J. (1997), Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake, *Phytochemistry*, 45(4), 655–658. Doi: 10.1016/S0031-9422(96)00868-0
- Zhila, N. O., Kalacheva, G. S., ve Volova, T. G. (2005), Effect of nitrogen limitation on the growth and lipid composition of the green alga *Botryococcus braunii* Kutz IPPAS H-252, *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(3), 311-319. Doi: 10.1007/s11183-005-0047-0
- Zippel, B., Rijstenbil, J., ve Neu, T. R. (2007), A flow-lane incubator for studying freshwater and marine phototrophic biofilms, *Journal Microbiological Methods*, 70(2), 336-345. Doi: 10.1016/j.mimet.2007.05.013

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇEÇEN ERSEL

Doğum tarihi ve yeri : 13/12/1992 BURSA

e-mail : ersel.cecen16@gmail.com

Eğitim

Derece Doktora	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi	2019
Lisans	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi	2015
Lise	Ovaakça Şarık TARA M.T.A.L	2011

Yabancı Dil

İngilizce