

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CHLORELLA MINUTISSIMA* MİKROALGİNDEN BİYOETANOL ELDESİ**

BURCU ŞERBETÇİOĞLU SERT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DİDEM ÖZÇİMEN

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CHLORELLA MINUTISSIMA* MİKROALGİNDEN BİYOETANOL ELDESİ**

Burcu ŞERBETÇİOĞLU SERT tarafından hazırlanan tez çalışması 21.04.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. M. Sinan BİLGİLİ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Gülen İSKENDER
İstanbul Teknik Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2015-07-04-YL03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında mikroalglerden *Chlorella minutissima*'nın fotobiyoreaktörde üretilmesi ve üretilen mikroalgin biyoetanol eldesinde değerlendirilmesi araştırılmıştır. Farklı ön muamele koşulları altında *C. minutissima*'dan biyoetanol elde edilmiş ve çeşitli parametrelerin biyoetanol verimine etkisi incelenmiştir.

Lisansüstü dönemimde tanıştığım bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp her zaman desteğini esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN'e

Tez çalışmalarım sürecinde çalışmalarına yardımcı olan ve tezime yaptıkları katkılardan dolayı Yüksek Biyomühendis Benan İNAN ve Anıl Tefvik Koçer'e

Her zaman maddi ve manevi destek veren, bana yol gösteren canım aileme,

Ve tüm akademik hayatım boyunca yanımda olan değerli eşim Samet SERT'e teşekkür ediyorum.

Burcu ŞERBETÇİOĞLU SERT

Nisan, 2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Mikroalgler	2
1.1.2 Mikroalglerin yetiştirilmesi	4
1.1.3 Geçmişten Günümüze Alglerin Biyoyakıt Olarak Kullanımı.....	5
1.2 Tezin amacı	6
1.3 Orijinal Katkı.....	6
BÖLÜM 2	
2.1 Fermantasyon	10
2.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.2 Biyometanol Hammaddeleri	12
2.3 Biyometanol Hammaddesi Olarak Mikroalgler.....	12
2.3.1 Mikroorganizmaları Etkileyen Çevresel Faktörler.....	13
2.3.1.1 Işık Şiddeti.....	13

2.3.1.2 Sıcaklık.....	13
2.3.1.3 pH	13
2.3.1.4 Tuzluluk	14
2.4.1 Biyokütleyle Uygulanan Ön Muameleler.....	19
2.4.1.1 Fiziksel Ön Muameler.....	19
2.4.1.2 Mekanik Parçalama Ön muamelesi.....	19
2.4.1.3 Proliz Ön Muamelesi.....	19
2.4.1.4 Mikrodalga Ön Muamelesi.....	19
2.5.1 Fizikokimyasal Ön Muameler.....	19
2.5.1.1 Buhar Patlama Ön Muamelesi.....	19
2.5.1.2 Sıcak Su Ön Muamelesi.....	20
2.5.1.3 Amonyak Fiber Patlaması (AFEX) Ön Muamelesi.....	20
2.5.1.4 CO2 Patlaması Ön Muamelesi.....	20
2.5.1.5 Islak Oksidizasyon Ön Muamelesi.....	20
2.6.1 Kimyasal Ön Muameleler.....	20
2.6.1.1 Asit Ön Muamelesi.....	21
2.6.1.2 Alkali Ön Muamelesi.....	21
2.6.1.3 Organosolv Ön Muamelesi.....	21
2.7.1 Biyolojik Ön Muameleler.....	21
2.7.1.1 Enzimatik hidroliz.....	22
2.8 Biyoetanol hammaddesi olarak <i>Chlorella spp.</i>	23
BÖLÜM 3	
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	26
3.1 Mikroalglerin yetiştirilmesi	26
3.1.1 <i>Chlorella minutissima</i> 'nın sistematığı.....	26
3.1.2 <i>Chlorella minutissima</i> 'nın Kültür Ortamı	28
3.1.3 Toplam Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi	28
3.1.4 Optik Yoğunluk Analizi	30
3.1.5 Alg Büyüme Kinetiği	31
3.2 Mikroalglerden Biyoetanol Eldesi	31
3.2.1 Kimyasal Maddeler	31
3.2.2 Kullanılan Cihazlar	31
3.2.3 Biyoetanol Üretim Prosesi Aşamaları	31
3.2.4 Fermantasyon Öncesi Mikroalglerle Uygulanan Ön Muamele İşlemleri	33
3.2.4.1 Asit ile Ön Muamele	33

3.2.4.2 Alkali ile Ön Muamele	33
3.2.5 Fermantasyon	33
3.2.6 Biyoetanol Konsantrasyonunun Belirlenmesi	34
3.2.7 Farklı Ön Muamelelerin Biyoetanol Verimine Etkisi.....	35
3.2.7.1 Asit Ön Muamelelerin Derişiminin Biyoetanol Verimine Etkisi ...	35
3.2.7.2 Alkali Ön Muamelelerin Derişiminin Biyoetanol Verimine Etkisi.	37
3.2.8 Farklı Ön Muamele Sürelerinde Asit ve Alkali Ön Muamelelerin Biyoetanol Verimine Etkisi	40
3.2.9 Farklı Sıcaklıklarda Asit ve Alkali Ön Muamelelerin Biyoetanol Verimine Etkisi	43
 BÖLÜM 4	
SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	Gram
l	Litre
N	Normalite
w/v	Ağırlık/Hacim

KISALTMA LİSTESİ

BP	British Petroleum
DNA	Deoksiribo nükleik asit
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
RNA	Ribo nükleik asit
VOC	Organik uçucu madde

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Açık havuz tipi alg üretim sistemleri [22]	4
Şekil 1.2 Alg büyütme işleminde kullanılan çeşitli fotobiyoreaktörler [6]	5
Şekil 2.1 Biyoetanolün kimyasal yapısı C_2H_5OH [27]	7
Şekil 2.2 <i>Chlorella</i> spp. 'nin yapısı [22]	22
Şekil 3.1 <i>Chlorella minutissima</i>	26
Şekil 3.2 Fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat tayini için farklı glikoz konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltiler	29
Şekil 3.3 Toplam karbonhidrat analizinde kullanılan PG Instrument T60 model UV spektrofotometre	
Şekil 3.4 <i>C.minutissima</i> 'nın optik yoğunluk analizi.....	30
Şekil 3.5 <i>Chlorella minutissima</i> 'dan biyoetanol üretim sürecinde uygulanan işlemler.....	32
Şekil 3.6 Etanol miktarının belirlenmesinde kullanılan gaz kromatografi cihazı.....	34
Şekil 3.7 24 ve 48. saatlerde asit ön muamelesi sonrasında alınan etanol verimleri.....	37
Şekil 3.8 24 ve 48. saatlerde alkali ön muamelesi sonrasında alınan etanol verimleri.....	39
Şekil 3.9 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H_2SO_4 , 120 °C).....	41
Şekil 3.10 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.50 (w/v) KOH, 100°C).....	43
Şekil 3. 11 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H_2SO_4 , 60 dk).....	44
Şekil 3.12 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.5 (w/v) KOH, 60 dk).....	46

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Etanol ve diğer yakıtların özelliklerinin karşılaştırılması [28].....	8
Çizelge 2. 2 Biyoetanol karışımına bağlı olarak emisyon değişimleri [32], [33].	9
Çizelge 2. 3 Mikroalg üretimine etki eden parametreler için genel değerler.....	14
Çizelge 2. 4 Alglerden etanol üretimi üzerine gerçekleştirilen literatür çalışmaları	24,25
Çizelge 3. 1 <i>C.minutissima</i> 'nın üretim koşulları.....	27
Çizelge 3. 2 Farklı konsantrasyonlarda asit muamelelerinin 24 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.....	36
Çizelge 3. 3 Farklı konsantrasyonlarda asit muamelelerinin 48 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.....	36
Çizelge 3. 4 Farklı konsantrasyonlarda alkali muamelelerinin 24 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.....	38
Çizelge 3. 5 Farklı konsantrasyonlarda alkali muamelelerinin 48 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.....	39
Çizelge 3. 6 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H ₂ SO ₄ , 120 °C).....	41
Çizelge 3. 7 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.50 (w/v) KOH, 100°C).....	42
Çizelge 3. 8 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H ₂ SO ₄ , 60 dk).....	44
Çizelge 3. 9 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.5 (w/v) KOH, 60 dk).....	45

CHLORELLA MINUTISSIMA MİKROALGİNDEN BİYOETANOL ELDESİ

Burcu ŞERBETÇİOĞLU SERT

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Son yıllarda fosil yakıt kaynaklarının sınırlı olması ve bu yakıtların çevresel kirliliklere yol açması sebebiyle alternatif yenilenebilir enerji kaynakları arayışı hız kazanmıştır. Güneş, rüzgar, jeotermal gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının yatırım maliyetlerinin yüksekliği nedeniyle, biyoyakıtlara olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Fosil yakıtlardan biri olan benzine alternatif biyoetanol, çeşitli biyokütle kaynaklarından mikroorganizmalar tarafından fermantasyonla üretilen, biyoyakıt olarak kullanımının yanında sağlık, kimya ve farmasötik alanlarında da değerlendirilebilen bir üründür. Günümüzde artan nüfus ve buna bağlı gelişecek olan gıda sıkıntıları nedeniyle buğday, mısır, şeker pancarı gibi birinci nesil biyoetanol kaynaklarının kısıtlı oluşu ve gıda endüstrisinin temel besin grubunu oluşturması, ikinci nesil biyokütle kaynaklarına yönelimi arttırmıştır. Fakat lignoselülozik maddelerin ön işlemlerinin zorluğu ve ön işlem maliyetlerinin yüksek olması, araştırmacıları yeni kaynak arayışlarına yöneltmiştir. Üçüncü nesil biyoyakıt hammaddesi olan alglerin polisakkarit yapılarının biyoetanol eldesinde değerlendirilmesi biyoetanol üretimi için umut vaat eden bir gelişme olarak sunulmaktadır. Bu tez çalışmasında öncelikle *Chlorella minutissima*'nın üretimi gerçekleştirilmiş, ardından üretimi yapılan mikroalgler biyoetanol üretiminde değerlendirilmiştir. Fermantasyon öncesi yapılacak ön işlem türü (asit veya alkali), ön işlemlerde kullanılan maddelerin konsantrasyonları, ön işlem sıcaklığı, ön işlem süresi ve fermantasyon süresinin biyoetanol verimine olan etkileri araştırılmıştır. İki farklı kimyasal ön muamele gerçekleştirilerek biyoetanol verimleri karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada en yüksek biyoetanol verim değerleri, asit ön muamelesi için mikroalgin 1 N H₂SO₄ asit ile 60 dakika boyunca 100 °C'de muamelesi koşulunda %18.52, alkali ön

muamelesinde ise %0.75 (w/v) KOH ile 60 dakika boyunca 100°C'de muamelesi koşulunda %6.11 olarak elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, mikrolagler, fermentasyon, biyoyakıt, biyokütle



**PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM MICROALGAE *CHLORELLA*
*MINUTISSIMA***

Burcu ŞERBETÇİOĞLU SERT

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

In recent years, usage of renewable energy sources increase due to depletion of fossil fuel resources and environmental problems. Since investment cost of renewable energy sources such as sun, wind and geothermal is high, there is an increasing demand for biofuels. Bioethanol which is an alternative fuel for gasoline, is a product which is produced from various biomass sources via microorganisms and also used in health, chemistry and pharmaceutical industry. Today, increasing population and demand of food products cause utilizing second generation feedstocks for bioethanol production instead of first generation feedstock such as wheat, corn and sugar cane. However, due to the difficulties and the high cost of pretreatment of lignocellulosic material, researchers have investigated new sources. Algae as third generation biofuel feedstock, are promising resources for bioethanol productions because of their high carbohydrate content. In this study, firstly, cultivation of microalgae *Chlorella minutissima* was carried out and then, they were utilized for bioethanol production. Effect of pre-treatment type (acid and alkaline), concentrations of the chemicals, pre-treatment temperature and pre-treatment time on bioethanol yield were also investigated. Highest bioethanol yields for acid and alkaline pre-treatments were obtained as 18.52% and 6.11%, under condition of 1 N H₂SO₄ and 0.75% (w/v) KOH concentrations, pre-treatment temperature of 100 °C, 60 minutes of pre-treatment time, respectively.

Keywords: Keywords: Bioethanol, microalgae, fermentation, biofuel, biomass



1.1 Literatür Özeti

Dünya nüfusundaki artış ve yüksek ölçüde sanayileşme fosil yakıtların hızla tüketilmesine sebep olmaktadır. Fosil yakıt rezervlerinin tükenmeye başlaması ve yüksek maliyetleri sebebiyle, biyokütlenin biyoyakıtla dönüştürülmesi son yıllarda oldukça değer kazanmıştır [1]. 2014 yılındaki British Petroleum (BP) analizleri incelendiğinde petrol tüketimi 2012 yılında 89.931 milyon b/d iken, 2013 yılında 91.331 milyon b/d'ye yükselmiş ve 2013 yılı sonuna gelindiğinde petrol rezervinin 1687.9 milyar varil olarak ön görülmüştür. 2016 BP Dünya Enerji İstatistikleri Raporuna göre de; günlük global sıvı yakıt talebi (petrol, biyoyakıt ve diğer sıvı yakıtlar), yaklaşık 20 milyon varil artarak 2035 yılında günde 112 milyon varile yükseleceğini ön görmektedir [2]. Büyümenin yüzde 60'ından fazlası taşımacılıktan kaynaklanacak. Ayrıca fosil yakıtların yanması sonucu zararlı sera gazlarına (CO_2 , SO_2 , NO_2), bu gazların da küresel ısınma gibi önemli çevresel sorunlara neden olduğu görülmektedir [3].

Günümüzde biyoyakıtta maliyet avantajı konusuna odaklanılmış ve sera gazı etkisini düşürücü, toprak ve su kaynaklarının kullanımını en aza indirerek, akaryakıt dağıtım sistemleri ve araç motorları ile uyumlu çalışabilen biyoyakıtların üretimi hedeflenmiştir [1]. Biyoyakıt üretiminde ilk etapta yağlı tohumlar dikkat çekmiş ancak ekonomik ve iklimsel etkenler sebebiyle diğer kaynaklara yönelinmiştir. Dünyanın %70 oranında denizlerle kaplı olduğunu temel alındığında algal biyoteknoloji de buna bağlı olarak gelişerek önemini artırmaktadır [4].

Mikroalgal biyoteknoloji, araştırmalar süresince çok çeşitli ve farklı türlerin bulunuşu ve ekonomik avantajları sebebiyle araştırmacılar için özellikle son yıllarda ilgi çekici hale gelmiştir. Mikroalglerin kullanım alanlarındaki artış, ülkemiz gibi farklı teknolojilerin gelişimini hedefleyen ülkeler için dikkat çekici hale gelmiştir [5].

1.1.1 Mikroalgler

Mikroalgler prokaryotik ve ökaryotik fotosentetik mikroorganizmalardır ve tek hücreli veya basit koloniler halinde ekstrem koşullarda yaşayabilirler [5]. Mikroalgler tuzlu ya da tatlı su ortamlarında yaşayabilen, fotosentetik mikroorganizmalardır ve güneş ışığı ile karbon dioksitin biyomass ve suya dönüşümünü sağlarlar [1]. Yaklaşık 50.000 tür olduğu tahmin edilirken, 30.000 civarında türün tespiti gerçekleştirilmiştir [6]. Değişik alg türlerinde bulunmakta olan fotosentetik pigmentlerin tür ve çeşitliliği, alglerin sistematüğini oluşturmaktadır. Alg gruplarının tanımlanması sırasında hücre duvarları ve depo ürünlerin kimyasal yapısı oldukça önem arz etmektedir. Sistematik sınıflandırma yapılırken ökaryotik algler beşe ayrılmıştır: *Chlorophyceae* (yeşil algler), *Phaeophyceae* (kahverengi algler), *Pyrrophyceae* (dinoflagellatlar), *Rhodophyceae* (kırmızı algler) ve *Chrysophyceae* (sarı-yeşil algler) [7]. Fitoplankton algler hızlı bir şekilde çoğalma sonucu büyük koloniler oluşturabilirler [1]. Siyanobakteriler ise öteki algal gruplar gibi ökaryot değil, prokaryot olup, bir yandan da mavi-yeşil algler olarak bilinmektedirler. Ayrıca mikroalgler ve siyanobakteriler birlikte fitoplanktonu oluştururlar.

Günümüzde mikroalglerin kültür kapasiteleri, ticari açıdan değerlendirildiğinde 102 litreden 1010 litrele kadar çıkabilmektedir [5]. Mikroalgler fotosentetik yapıları sebebiyle yağ, protein ve karbonhidrat üretimini kısa zamanda yoğun bir şekilde gerçekleştirebilirler. Bu özellik sucul ortamda bütün üretimin temelini oluşturduğundan, o ortamdaki canlıların beslenmesinde oldukça önemlidir. Aynı zamanda mikroalgler çok sayıda habitatın besin zincirinde primer üretici görevindedirler. Bu görevin yanında tüketici organizmaların metabolizmalarına gereken oksijen üretimini de sağlarlar ve azot çevriminde yüksek yapılı bitkilerden sonra en aktif role sahiptirler. Azot bağlama özellikleri sebebiyle serbest azotları fikse edebilirler [8].

Algler, biyoyakıtlar ve biyokimyasallar için üçüncü nesil biyokütle hammaddesi olarak dikkat çekmektedirler. Ayrıca karatabanlı bitkilere ve odun selülozu malzemelerine göre üstünlükleri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra alglerin karasal bitkilere oranla fotosentez yapabilme kabiliyeti daha yüksek olup hemiselüloz ve lignin içeriği olmaması sebebiyle de, fermente olacak şekerlerin eldesindeki işlem sayısı ve maliyeti daha düşüktür [9].

Mikroalglerin, biyolojik kütle kaynağı olarak kullanımının faydaları şu şekilde özetlenebilmektedir.

- ✓ Mikroalgler fotosentezle birlikte ışıktaki enerjiyi organik bileşiklere çevirirler.
- ✓ Biyokütleleri hasat edildiğinde direkt olarak kullanımı uygundur
- ✓ Mikroalglerin yapısında bulunabilen pigment, protein, karbonhidrat ve yağlar ticari açıdan oldukça önem arz etmektedir.
- ✓ Hücre bölünme şekilleri basit ve yaşam döngüleri kısadır, bu sebeple genetik modifikasyonları çabuk ve zorlanmadan gerçekleştirilebilmektedir.
- ✓ Tuz oranı yüksek sularda gelişebilirler ve düşük verimli topraklarda oluşturulan havuzlarda üretim yapıldığında çevrenin protein verimini yükseltebilirler [4].

Farklı bölgelere özgü fosfor ve potasyum bakımından zengin içeriğe sahip algler gübre olarak da tercih edilirler [10].

Mikroalgler çeşitli kimyasal ve biyokimyasalların eldesinde kaynak olarak kullanılabilirler. Mikroalgal biyoteknoloji esas alındığında 1953-80 yıllarında ilgili konuda patent 77 adet olarak görülürken, 1981-93 yıllarında bu sayı 194'e yükselmiştir [4]. Üretim yapılmak üzere toplanmış olan ve kültüre alınan alglerin % 50'si gıda sektöründe, % 40'ı kozmetik ve ilaç sektöründe ve % 10 kadarlık kısmı da diğer sektörlerde kendisine uygulama alanı bulmaktadır [11].

Deniz yosunları, biyolojik tarımda kalite ve verimliliğin artışında, bitkilerin gelişiminin düzenlenmesinde, hastalık ve zararlılara karşı direncin artışında, toprağın yapısının iyileştirilmesinde ve hayvan besiciliğinde kullanılmaktadır [12]. Alglerin kullanımı sonrasında toprağa yıllık bazda 3200 kg/ha azot kazandırılması sonrasında pirinç üretiminde % 20 oranında verimlilik artışı görülmüştür. Algler besin bakımından

içerikleri yönünden gerek organik madde içeriğinin yüksekliği gerekse büyümeyi destekleyici etkileri sebebiyle gübre olarak kullanılabilirler [13]. Algler bunların yanı sıra köklenmeyi arttıran, büyüme ve gelişimi tetikleyerek verimliliğin artışına sebep olan Chlorophyll, Auxin ve Cytokininlerin üretilmesini sağlamaktadır [14].

1.1.2 Mikroalglerin Yetiştirilmesi

Besin kalitesi, besin miktarı, ışık, pH, tuzluluk, türbülans ve sıcaklık, algal büyümenin düzenlenmesini sağlayan en önemli etmenlerdir. Tolerans aralıkları ve en ideal parametreler türlere göre değişiklik göstermektedir [5].

Alglerin yetiştirilmesinde genellikle havuz şeklinde açık sistemler ve kapalı fotobiyoreaktörler kullanılmaktadır. Bu sistemler içinde endüstriyel alanda en yaygın kullanılan alg yetiştirme sistemleri açık havuzlardır. Yatırım ve işletim maliyetlerindeki düşüklük, endüstriyel alanda bu yaygın kullanımın sebebi iken üretim koşullarındaki zorluklar ve kontaminasyon riski bu sisteme ait dezavantajları oluşturmaktadır (Şekil 1. 1). Ancak enerji ihtiyacındaki düşüklük ve temizlenme kolaylığı açıkhavuzların avantajları arasındadır. Açık sistemlerde *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* cinsi algler üretimi en çok yapılan alglerdir [15].



Şekil 1. 1 Açık havuz tipi alg üretim sistemleri [16]

Fotobiyoreaktörlerin fotosentetik etkinlikleri açık sistemlere oranla daha fazladır ve bu da biyokütle verimini arttırmaktadır [17]. Mikroalglerin üretim aşamasında kontaminasyonun engellenmesi, ısıda kontrol ve optimum ışık kullanımı sayesinde kapalı sistemlerde yüksek verimlilik söz konusudur. Kapalı fotobiyoreaktörlerin ortam

şartlarında kontrol imkanı daha kolay olmakla birlikte son üründe de kalite ve verimlilik yüksek seviyededir. Kirlilik önleildiği takdirde biyoreaktörler dış ortam koşullarında da kullanılabilirken geniş yelpazede türlerin üremesine imkan sağlarlar [18]. Sistem kapalı olduğunda evaporasyon gerçekleşmemesi durumu ile çeşitli biyokimyasal maddelerin üretimi için elverişli şartlar oluşmaktadır. Dikey tipli tübüler kolonlar, düz plaka tipli fotobiyoreaktörler ve yatay tipli tübüler fotobiyoreaktörler en geniş kullanım alanı olan fotobiyoreaktör çeşitleridir [17].



Şekil 1. 2 Alg büyütme işleminde kullanılan çeşitli fotobiyoreaktörler [10]

1.1.3 Geçmişten Günümüze Alglerin Biyoyakıt Olarak Kullanımı

Mikroalgler, çeşitli yapılarda kimyasal ve biyojik bileşikleri üretebilmeleri sebebiyle ticari açıdan önem taşırlar [19]. Günümüzde enerji kaynağı olması adına yenilenebilen ve toksik özelliği olmayan biyodizel yakıt kaynağında, mikroalglerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Yağ içerik oranı ve büyümedeki hızı yüksek olan mikroalglerin tayininde ve mevcut hücrelerdeki yağ içeriklerinin artışı sağlayan etkenlerin araştırılması hala

devam etmektedir. Biyodizelin yanında alglerin içerdđđi karbonhidratlar da çeşitli hidroliz yöntemlerinin ardından etanol üretimi için kullanılabilir düzeye gelmektedir. Suda mevcut olan algler, hücresel yapılarında karasal ortamda gerekli hemiselüloz ve lignin benzeri biyopolimerlere ihtiyaç duymamaktadırlar [19]. Bunun sonucu olarak da biyoetanol üretimindeki ön muamele işlemleri sadeleşmektedir [20]. Mikroalglerdeki bu işletim kolaylığı maliyet düşürücü etkisinin yanında biyoetanol üretiminde büyük önem arz etmektedir [21].

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı ülkemizde mikroalglerin biyoetanol üretimi için yetiştirilmesi ve mikroalglerden farklı deney koşulları altında biyoetanol üretiminin gerçekleştirilmesi ve çeşitli ön muamelelerin ve deneysel koşulların biyoetanol üretim verimine olan etkisinin incelenmesidir.

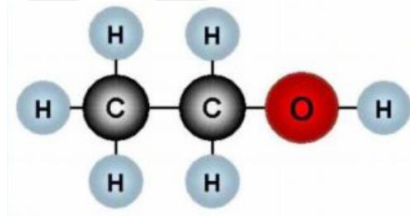
1.3 Orijinal Katkı

Bu çalışmada, biyoetanol üretimi için üçüncü nesil biyoyakıt hammaddesi olarak önemli bir potansiyele sahip olan mikroalglerin biyoetanol üretiminde değeriendirilmesi araştırılmıştır. Benzinin alternatifi olan biyoetanolün üretiminde alglerin kullanımına yönelik ülkemizde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen tez çalışması, *Chlorella minutissima* türü mikroalgin biyoetanol üretiminde kullanılmak üzere yetiştirilmesi ve çeşitli koşullar altındaki biyoetanol veriminin incelenmesi ve verimi arttırıcı çeşitli hidroliz koşullarının denenmesi ile literatüre orijinal katkı sağlayacaktır.

BÖLÜM 2

BİYOETANOL

Kimyasal yöntemlerle etilenden ya da farklı biyokütle kaynaklarından fermantasyon sonucu üretimi yapılan sıvı ürün etanol ($\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--OH}$ ya da EtOH) olarak adlandırılır. Biyokütleden üretilmiş olan etanol ise literatürde biyoetanol olarak adlandırılmaktadır [26]. Etanol renksiz ve berrak bir yapıda olmasının yanı sıra tıp, kozmetik, ilaç, temizlik endüstrilerinde, kimya sanayinde çözücü ve bazı organik kimyasalların sentezlenmesi sonrasında yakıt olarak kullanılabilir [24].



Şekil 2. 1 Biyoetanolün kimyasal yapısı $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ [27]

Biyoetanolün sahip olduğu çeşitli özellikler aşağıdaki gibidir [28].

- Biyoetanol renksiz ve berrak bir yapıdadır ve karakteristik bir kokuya sahiptir,
- Biyoetanol yakıt olarak yüksek oktanlıdır (113),
- Biyoetanolün kaynama noktası $78,5\text{ }^\circ\text{C}$, donma noktası $-114,1\text{ }^\circ\text{C}$ 'dir,
- Biyoetanol $20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de $0,789\text{ gr/ml}$ yoğunluktadır,
- Biyoetanol yeniden bir yapılandırma gerekmeksizin içten yanmalı motorlarda % 10 oranında kullanım alanı bulabilir,

- Biyolojik olarak bozunur ve çevresel tehdit oluşturmaz, yenilenebilir özellik gösterir,
- Fosil yakıtlara oranla %80 daha az sera gazı yaymaktadır,
- Yakıtta oksijen seviyesindeki artış ile verimlilik artışı ve zararlı gazlarda azalma sağlanır, bunun en basit yöntemi de yakıt içerisindeki biyoetanolün oranını arttırmaktır,
- Benzen, metil tersiyer bütül eter gibi kanserojen maddelere göre yakıtların oktanında artışa çevresel açıdan daha avantajlıdır,
- Biyoetanol egzoz emisyonlarını azaltıcı etkidedir,
- Ozon tabakasına zarar veren, hidrokarbon emisyonlarında önemli oranda düşüşe sebebiyet verir,
- Yüksek seviyedeki biyoetanol karışımları azot oksit emisyonlarında %20 oranında azaltıcı etkidedir,
- Yüksek seviyedeki biyoetanol karışımlarının kullanılması sonrasında Uçucu Organik Madde (VOC's)'lerde 30% ve üstü azalma görülmektedir,
- Biyoetanol kanserojen etkideki benzen ve butadin emisyonlarını 50% oranında azaltıcı etkidedir,
- Biyoetanol, sülfür dioksit ve partikül emisyonlarında önemli oranda düşüş sağlamaktadır.

Çizelge 2. 1 Etanol ve diğer yakıtların özelliklerinin karşılaştırılması [28].

ÖZELLİK	METANOL	ETANOL	BENZİN
Kimyasal Formül	CH ₃ OH	C ₂ H ₅ OH	C ₄ -C ₁₂ Zinciri
Ana Maddeler (% Ağırlık)	38C, 12H, 50O	52C, 13H, 35O	85-88C, 12-15H

Çizelge 2. 1 Etanol ve diğer yakıtların özelliklerinin karşılaştırılması [28].(devamı)

Alt Isı Değeri (Btu/lb)	8,570	11,500	18,000-19,000
Benzine Göre Galon Başına Yapılan Mil	55%	70%	-
Teorik Hava/Yakıt Oranı (Ağırlık)	6,45	9,00	14,70

- Biyoetanolle ait en yaygın iki kullanım şekli E-10 (% 10 Biyoetanol+%90 Benzin) ve E-85 (% 85 Biyoetanol+%15 Benzin)'dir. [28]

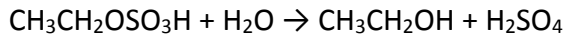
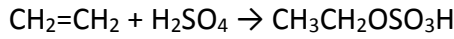
Çizelge 2. 2 Biyoetanol karışımına bağlı olarak emisyon değişimleri [32], [33].

	Biyoetanol Karışım Oranı		
Emisyon	2%	5%	10%
Karbon Monoksit (CO)	% 5 azalma	% 10 azalma	% 25-30 azalma
Karbon Dioksit (CO ₂)	% 2 azalma	% 5 azalma	% 10 azalma
Hidro Karbon (HC)	% 5 azalma	% 10 azalma	% 25-30 azalma
Azot Oksit (NO _x)		% 3 azalma	% 5 azalma
Egzoz	% 2 azalma	% 4 azalma	% 7 azalma
Sülfür Dioksit (SO ₂) ve partikül	Azalma	Azalma	Azalma

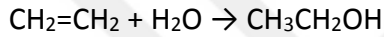
Biyoetanol biyo esaslı ve yenilenebilirliği sebebiyle fosil yakıtlar karşısında önemli bir alternatiftir [23]. Biyoetanol yüksek sıkıştırma, kısa yanma ve yağsız yanma gibi özellikler sayesinde teorik açıdan benzine göre üstün özellik göstermektedir [25]. Motorlu taşıtlarda kullanılan en yaygın sıvı yakıtlardan biri biyoetanol iken benzin karşısında da önemli bir alternatiftir. Dünya biyoetanol üretim miktarları 2001 yılında 31 milyar litre, 2006 yılında 39 milyar litre ve 2000-10 yılları arasında da 100 milyar litre olarak artış göstermiştir [29], [30]. Biyoetanol, sağlık açısından tehlike oluşturan

karbonmonoksit, uçucu organik bileşik, toksik madde ve solunabilir partikül miktarlarını da azaltıcı etkidedir [34].

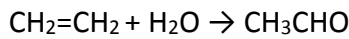
Etanolün üretiminde kimyasal ve biyolojik olarak iki temel metot mevcuttur. Kimyasal üretimde % 35-95 etilen içeriğindeki hidrokarbon kaynağı ile %95-98 oranında sülfürik asit çözeltisinin, suyla hidrolizi sonrasında sıyırma kolonu yardımıyla ayrılması gerçekleşmektedir.



Diğer bir poseste ise sülfürik asit kullanımı olmadan sabit yataklı bir reaktör yardımıyla etilenin direkt olarak hidrasyonu söz konusudur.

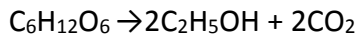


Bu iki yönteme ilaveten sülfürik asit ya da civa (II) sülfat gibi bir katalizör kullanımı sonrasında etilenin hidrasyonu ile ara ürünün asetaldehit olduğu oktakarbonildikobalt katalizörlüğü ile asetaldehitin hidrojenasyonu prosesi ile de etanol üretimi mümkündür.



2.1 Fermantasyon

Proses glikozun alkol ve karbondioksite dönüştürülmesinden oluşmaktadır.



Gerçekleşen reaksiyonlara göre kg başına glikozdan teorik maksimum verimde 0.51 kg biyoetanol ve 0.49 kg CO₂ oluşmaktadır. Ancak pratikte mikroorganizmalar ortamda bulunan glikozu büyümeleri için de kullandıklarından dolayı gerçek verim %100'den azdır [60].

Fermentasyon, uygulama ve işleyiş bakımından temel olarak üçe ayrılır:

- Kesikli fermentasyon; fermentasyon başlamadan önce reaktör içerisine tüm ortam bileşenlerinin eklenmesi ve fermentasyon sonunda tüm materyalin uzaklaştırılması ile

işleyen sistemdir. Fermentasyon boyunca reaktöre hiçbir bileşen eklenmez veya ortamdan hiçbir bileşen uzaklaştırılmaz. Endüstride kullanılan uygulamaların büyük kısmında kesikli sistemler kullanılmaktadır.

- Sürekli fermentasyon; başlangıç olarak fermentöre gerekli bileşenler konularak işlemin başlatıldığı ve uygulama boyunca ortama substrat eklenirken aynı zamanda oluşan ürünün de, birikim yapmaması için (inhibisyona neden olabilir) sürekli uzaklaştırılmasıyla, reaktör içinde dengenin sağlandığı sistemlerdir.
- Yarı-kesikli fermentasyon ise; zorunlu olarak kesikli uygulama yapılmasına karşın, fermentasyon süreci içerisinde ya sürekli bir giriş ya da sürekli bir çıkışın olduğu sistemlerdir [54].

Günümüzde fermentasyon teknolojisi; ilaçlar, gıda bileşenleri gibi birçok ürün elde edilmesinde kullanılırken aynı zamanda atık suların arıtılması ve enerji eldesi gibi yöntemlerde de kullanılmaktadır [54]. Fermentasyon prosesleri genellikle eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon ile hidroliz ve fermentasyonun ayrı aşamalarda gerçekleştirildiği prosesler olmak üzere iki temel proses üzerinden gerçekleştirilmekle birlikte yeni üretim prosesleri geliştirilmeye devam etmektedir [29].

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Fermentasyon işleminde kullanılan mikroorganizmalar etanol üretiminde 6-karbonlu şekerlerden faydalanırlar. Bu yüzden yüksek miktarda glikoz içeren selülozik biyokütleler biyoetanol üretiminde en kolay dönüşüme sahip materyallerdir. En etkili biyoetanol üreten mayalardan biri *Saccharomyces cerevisiae*'dir [61]. Mikroorganizmalar çevredeki pek çok kimyasal ve fiziksel durumlardan etkilenirler. Mikroorganizmaların biyoetanol verimleri sıcaklık, pH aralığı, alkol toleransı, ozmotik toleransı, inhibitörlere karşı direnci, büyüme hızı ve genetik stabilitesine bağlıdır [25]. Maya ve mantarlar 3.5-5.0 pH aralığını tolere edebilmektedirler [53]. *S.cerevisiae* yüksek ozmotik dirence sahip olmakla beraber 4.0 gibi düşük pH seviyelerini de tolere edebilmektedir [63].

2.2 Biyoetanol Hammaddeleri

Biyoetanolün üretimi, şeker içeriği olan tarımsal hammaddelerle mümkün olup, bu hammaddeler şeker ve nişasta içeren birinci nesil hammaddeler ve lignoselülozik şekerleri içeren ikinci nesil hammaddeler olarak ayrılmaktadır. Şeker kamışı, melas, şeker pancarı ve meyvelerden temin edilen şekerlerin direkt olarak maya ile fermentesi mümkündür. Bu hammaddeler hektar başına yüksek oranda verimliliğe sahipken, düşük oranda dönüşüm maliyetleri de avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Yılın sadece bazı zamanlarında üretimin gerçekleştirilmesi ise dezavantaj olarak görülmektedir. Şeker pancarı Avrupa ve Kuzey Amerika'da asıl şeker kaynağı iken ortalama olarak bir ton şeker pancarı ile 25 galon etanol eldesi mümkündür. Ancak şeker kamışına oranla çok daha pahalı bir üretim aşaması gerekmektedir [30].

2.3 Biyoetanol Hammaddesi Olarak Mikroalgler

Alg kültürleri, açık ve kapalı (fotobiyoreaktörler) olmak üzere iki farklı üretim sisteminde yetiştirilebilirler [19]. Açık havuzlarda sığ su koşullarında algler kültüre alınmaktadır. Bu yetiştirme tipinde besinler çevre arazilerden akan sular ile ya da kanalizasyon / su arıtma tesislerinden temin edilebilmektedir. Açık sistemlerdeki teknik ve biyolojik kısıtlamalar kapalı sistemlerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya koymuştur. Mikroalglerden değerli kimyasalların üretimi için kapalı fotobiyoreaktörler kullanılmaktadır ancak bu tip üretim şekillerinin maliyeti oldukça yüksektir. Fotobiyoreaktörlerde optimum şartlarda kültüre alınma gerçekleştirildiğinde yüksek verimlilik sonrasında yıllık 19,000-57,000 litre / dönüm yağ elde edilebilir. Bu miktarlar da verimliliğin en iyi düzeyde olduğu bitkilere oranla 200 kat yüksek verimlilik anlamına gelmektedir. Mikroalglerin etanol üretiminde kullanımında ise hücredeki nişastanın açığa çıkarılması gerekmektedir ve bunun için de çeşitli fiziksel, kimyasal veya biyolojik parçalanma yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hücrelerin parçalanması sonrasında fermentasyonu başlatmak için ortama uygun bir mikroorganizma inoküle edilerek fermentasyon işlemi gerçekleştirilmektedir [19].

2.3.1 Mikroalgleri Etkileyen Çevresel Faktörler

Algal biyoteknolojideki gelişimlere rağmen mikroalg çeşitlerinin kültürlerinde bazı güçlükler mevcuttur. Mikroalg kültürlerinde biyokütlenin biyokimyasal kompozisyonu ve yağ asidi değerleri, besin ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık gibi büyüme koşullarına bağlı olarak değişim gösterir [55].

2.3.1.1 Işık Şiddeti

Mikroalgler farklı kaynaklardan gelen basit molekülleri ışık sayesinde yaşamları için gerekli olan kompleks moleküllere çevirirler [55]. Temel üretici olarak kabul edilen fitoplanktonun vertikal dağılımına etki eden sebepler; biyotik ve abiyotik koşullardır. Abiyotik etmenlerin en önemlilerinden biri ışıktır. Burada çeşitli olayların gerçekleşmesinde sadece ışığın etkisinin olduğu görülmektedir. Daha alt bölgelerde ise ışığın sınırlayıcı bir faktör olduğu bilinmektedir. Işığın dalga boyu, planktonun vertikal dağılımında etkileyici faktördür [56], [57].

2.3.1.2 Sıcaklık

Doğada bulunan alglerden bazıları yüksek sıcaklıkta yaşayabilirken bazıları bu sıcaklıkta canlılığını sürdüremezler. Bu sebeple üretimi yapılacak türün optimum büyüme sıcaklığına dikkat edilmesi gerekir. Üretimlerde mikroalglerin çoğu 16-27°C arasındaki sıcaklığı tolere edebilirken, 16°C'den düşük sıcaklıklar üremeyi yavaşlatır ve 35°C'den yüksek sıcaklıklar ise genellikle öldürücü etki gösterir [13].

2.3.1.3 pH

Mikroalg ve siyanobakterilerin üretimine etki eden diğer bir parametre ise pH olarak karşımıza çıkar. Her tür, spesifik olarak belirli bir pH aralığında üreyebilmektedir ve pH, bir çok alg türünün kültüründe 7-9 aralığında olmaktadır. Kültür için uygun pH'nın sağlanamaması, hücrelerin parçalanarak içeriğinin ortama geçmesine ve sonuçta kültürün ölümüne yol açar. Bu sorunun kültürün havalandırılmasıyla aşılması mümkün olmaktadır. Çok yoğun kültürlerde, zamanla pH artışı meydana gelmektedir ancak pH dengesi, belirli miktarlarda eklenen CO₂ ile uygun aralıkta tutulabilmektedir. Ayrıca

kontrollü sistemler ile çalışılması durumunda gerekli asit ve baz ilaveleri ile de pH istenen aralıkta tutulabilmektedir [37].

2.3.1.4 Tuzluluk

Deniz panktonlarının tuzluluk değişimine olan toleransları oldukça iyi düzeydedir.. Pek çok tür, doğal ortamdaki tuzluluğa göre daha düşük tuzlulukta iyi bir büyüme göstermektedir. Pek çok alg türü %12-44 ppt, optimum %20-24 ppt tuzluluğu tercih etmektedir [58].

Algal büyümeyi düzenleyen en önemli değişkenler besin miktarı, kalitesi, ışık, pH, havalandırma, karıştırma, tuzluluk ve sıcaklığı içermektedir. Değişkenlerin optimum değerleri çalışılan türe özgü olmakla beraber, genel değişken değerleri Çizelge 2. 3'te gösterilmiştir [37], [38].

Çizelge 2. 3 Mikroalg üretimine etki eden parametreler için genel değerler.

Mikroalg Üretimine Etki Eden Parametreler İçin Genel Değerler		
Parametreler	Aralık	Optimum
Sıcaklık (°C)	16 - 27	18 - 24
Tuzluluk (g.L ⁻¹)	12 - 40	20 - 24
Işık Yoğunluğu (lüks)	1000 - 10000	2,500 - 5,000
Fotoperiyot (aydınlık:karanlık,saat)		16:8 (minimum) 24:0 (maksimum)
pH	7 - 9	8.2 - 8.7

Temel fitoplankton gruplarından alınan örnek türlerin kültürleri yapılarak, büyümeleri üzerine farklı fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkilerinin saptanması, bu grupların doğal popülasyonlarının büyümeleri için gerekli olan sıcaklık, CO₂ düzeyi, besin kaynağının kalitesi ve düzeyi, ışığın yoğunluk ve süresi gibi kritik faktörlerin saptanması açısından da önemlidir [8]. Bu fotosentetik canlılar fotosentez sonucu ortama oksijen vermektedirler ve olumsuz çevre koşullarına (yüksek ışık, yüksek sıcaklık gibi) karşı tepki olarak metabolizmalarında değişiklikler yapabilmektedirler.

Chlorophyceae sınıfına ait *Chlorella* ve *Neochloris* türlerinin azot eksikliği olan ortamda kültüre alınmaları halinde kuru hücre ağırlıklarında yağ miktarlarını %60'a çıkardıkları literatür çalışmalarında belirtilmiştir [39].

Besin ortamı ve çevresel faktörler, lipid içeriği kadar yağ asitlerinin birbirlerine göre oranlarını da etkileyebilmektedir. Azot sınırlaması ile büyüyen birçok mikroalg türünde artan lipid içeriği gözlenmiştir. 1940'lı yılların sonlarında azot limitasyonunun yağ üretimi üzerinde etkili olduğu saptanmış ve kuru ağırlıkta %70-85 yağ düzeyine erişildiği çalışma sonucunda rapor edilmiştir. *Dunaliella* sp. ve *Tetraselmis suecica* gibi bazı alg türleri ise düşük miktarda lipid içermekte ve genellikle lipidden çok karbohidrat üretmektedirler [53].

P. tricornutum türü, yeterli düzeyde azot bulunan bir ortamda ve azot eksikliğinin yapıldığı bir ortamda kültüre alınmış ve protein, karbohidrat, lipid, kül ve biyomas miktarları saptanmıştır. Çalışma sonucunda, protein oranı %55'den %25'e, karbohidrat %10'dan %15'e, lipid %20'den %30'a, kül %12'den %16'ya değişim göstermiştir. Lipid oranının %30'a çıkmasının ise biyokütle miktarının azalmasından dolayı önemli bulunmadığı bildirilmiştir [40].

Diğer bir çalışmada ise, üç deniz türü (*I. galbana*, *Chaetoceros calcitrans* ve *Thalassiosira pseudonana*) dört farklı ortam koşullarında (N, P, Si eksikliği ve ışık sınırlaması) kültüre alınmış ve biyokimyasal kompozisyonu incelenmiştir. Azot stresi yapılan üç kültürde ikinci günde lipid oranında bir değişim olmazken, karbohidrat oranında artış, protein oranında ise azalış gözlenmiştir. Silisyum eksilmesi yapılan kültürlerde de altıncı saatin sonunda lipid, protein ve karbohidrat oranında bir değişim olmamıştır. Ancak P sınırlamasının yapıldığı kültürlerden *T. pseudonana*'da 20:5 ω 3 ve 22:6 ω 3 yağ asitlerinde önemli düzeyde azalmalar tespit edilmiştir. 20:5 ω 3 yağ asidi *I. galbana* türünde diğer iki türe göre önemli düzeyde az bulunmuştur. Işık sınırlamasının yapıldığı üç türde ise lipid oranında bir tutarlık gözlenmediği belirlenmiştir [41].

I. affinis galbana'da farklı çevresel koşulların lipid miktarına etkisini belirlemek amacıyla yüksek ışık ve azot sınırlaması uygulamaları yapılmıştır. Yüksek ışık şiddeti altında karbohidrat birikiminin olduğu ve lipid miktarında düşük bir oranda azalma

meydana geldiği; azot sınırlamasında ise hem karbohidrat hem de lipid oranında artış olduğu belirlenmiştir [42].

Farklı bir çalışmada ise *Isochrysis* sp., *P. lutheri* ve *N. oculata* kesikli ve yarı sürekli kültür sistemiyle kültüre alınmış ve mikroalgler büyümenin farklı fazlarında hasat edilerek lipid, protein ve karbohidrat seviyeleri belirlenmiştir. Kesikli sistemde logaritmik evrede tüm türlerin protein oranı yüksek (%25.2-41.1), karbohidrat (%7.1-10.3) ve lipid (%8.8-14.9) oranı düşük bulunurken; dinlenme fazında *Isochrysis* sp. ve *N. oculata*'da protein (sırasıyla %21.8 ve %20.3) önemli miktarda düşmüş, *P. lutheri*'de lipid (%16.6) oranı artmış ve tüm türlerde karbohidrat miktarında artış olmuştur. Yarı sürekli kültürde ise logaritmik artış fazına göre logaritmik fazın sonunda tüm kültürlerde karbohidrat oranı artış gösterirken, *Isochrysis*'de protein oranı düşmüş ve *P.lutheri*'de ise lipid oranı artış göstermiştir [43].

Ortam koşullarının etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise denizel mikroalg *Isochrysis* sp. türüne 12:12 aydınlık periyodu uygulanarak 50µE.m-2s-1'dan 1000µE.m-2s-1'ya kadar 5 farklı ışık yoğunluğunda mikroalgler kültüre alınmış ve logaritmik fazın sonunda hasat edilerek, biyokimyasal kompozisyonu incelenmiştir. *Isochrysis* sp. 'nin biyokimyasal yapısı ışık şiddetlerine bağlı olarak değişim göstermiş ve en yüksek protein oranı 100 ve 250µE.m-2s-1 ışık şiddetinde, en düşük karbohidrat ve lipid oranı 50µE.m-2s-1 ışık şiddetinde kaydedilmiştir [44].

Yeşil alg *Ankistrodesmus falcatus* türü nutrient sınırlaması yapılan ortamda kültüre alınarak, biyokimyasal içeriğindeki değişim incelenmiş, azot sınırlaması yapılan kültürdeki hücrelerin büyüklüğü ve hücre yoğunluğu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha küçük ve yoğunluğu daha az, fosfor sınırlaması yapılan kültürdeki hücrelerin ise daha büyük ve daha yoğun olduğu bildirilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azot sınırlaması yapılan kültürlerde protein oranı düşük, fosfor sınırlaması yapılan kültürlerde ise karbohidrat ve lipid oranı yüksek bulunmuştur. Fosfor sınırlaması yapılan kültürlerde lipid oranı azot sınırlaması yapılan kültürlerden daha yüksek bulunmuştur. Protein: lipid oranı azot sınırlaması yapılan kültürde 0.38 olarak en düşük, fosfor sınırlaması yapılan kültürde ise 0.44 ve kontrol grubunda ise 1.14 olarak gözlenmiştir [45].

Düşük miktarda azot uygulamasına maruz bırakılan farklı *Chlorella* türlerindeki klorofil değerlerin değişimi incelendiğinde hem normal koşullarda hem de düşük miktarda azot beslemesi yapıldığında *C. vulgaris*'in diğer dört türe göre en iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada azot stresi, beş türün yetiştirildiği biyoreaktör sisteminde uygulanmış ve kontrol guruplarıyla karşılaştırılmıştır. *C. emersonii*'nin bu uygulamadan diğer türlere göre daha fazla etkilendiği ve hücre sayısındaki artışın diğer türlere göre en fazla olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca beş farklı *Chlorella* türünde ölçülen yüzde lipid değerlerinin *C. sorokiniana* dışındaki diğer dört türde (*C. vulgaris*; *C. minutissima*; *C. emersonii*, *C. protothecoides*) yaklaşık olarak ikişer kat arttığı belirlenmiştir. *C. sorokiniana*'da ise bu değer hemen hemen kontrol gurubu ile aynı seviyede kalmıştır [35].

Nannochloropsis sp. türünün farklı ışık yoğunluklarında (40, 60, 80, 220 ve 480µmolquantam-2s-1) kültüre alınıp; biyokimyasal yapısı incelendiğinde en yüksek protein oranı, 220 µmolquantam- 2s-1 ışık şiddetinde %42.76 olarak belirlenirken, en yüksek lipid (%60.71) ve karbohidrat (%29.02), 40µmolquantam-2s-1 ışık şiddetinde saptanmıştır. Düşük ışık şiddetinde (40µmolquantam-2s-1) %28.9 olan EPA değerinin ışık şiddetinin 480µmolquantam-2s-1'e çıkarıldığı zaman %8.02'ye düştüğü gözlenmiştir [46].

Bir başka çalışmada ise *Nannochloropsis* sp. farklı azot, fosfor, sıcaklık ve tuzluluk seviyelerinde kültüre alınarak, CO₂ oranı 2.800 µll-1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada, azot ve fosfor beslemesi arttıkça protein ve PUFA'ların miktarında artış olduğu ancak karbohidrat, lipid ve yağ asitlerinin azaldığı sonucuna varılmıştır. Tuzluluğun azaltılmasıyla yağ asitlerinin ve PUFA'ların arttığı, sıcaklığın artışıyla da yağ asitlerinin arttığı; PUFA'ların ise azalış gösterdiği belirtilmiştir [47].

C. protothecoides'in heterotrofik ve ototrofik yetiştirme şartlarında ise biyodizel olarak kullanım olanakları karşılaştırılmıştır. Buna göre *C. protothecoides*'in ototrofik olarak kültüre alındığında, hücre içerisindeki protein oranının heterotrofik beslemeye göre beş kat arttığı (54.64 (Ot.)/10.28 (Het.)), ancak lipid oranının dört kat (14.57 (Ot)/55.20(Het)) ve karbohidrat oranının 1.5 kat (10.62 (Ot)/15.43 (Het)) daha düşük olduğu saptanmıştır [48].

C. calcitrans laboratuvar koşullarında farklı sıcaklık (20-25°C), farklı tuzluluk (%25-30) ve CO₂ ile havalandırma koşullarında kültüre alınıp; büyüme, karbohidrat, lipid ve protein değerlerini belirlenmiştir. Bu araştırmada biyokütle değerleri karbondioksit ilavesinden etkilenirken, tuzluluk ve sıcaklık değişiminden çok az etkilenmiştir. Karbondioksit eklemesi protein değerini artırırken, karbohidratı düşürmüş, lipid oranını değiştirmemiştir. Yüksek tuzlulukta karbohidrat artış göstermiş, protein ve lipid oranlarında düşüşler olmuştur. Düşük sıcaklıkta ise lipid ve karbohidrat değerleri artarken, protein oranının etkilenmediği gözlenmiştir [49].

N. oleoabundans türü biyoyakıt elde etmek amacıyla farklı kültür koşullarında kültüre alınarak, biyokütle ve lipid miktarı incelenmiştir. Ortalama biyokütle üretimi 30°C'de, yeterli miktarda azot bulunan ve CO₂ ilavesi yapılan ortamda gözlenmiştir. En yüksek biyokütle miktarı 30°C'de ve yeterli miktarda azot bulunan ortamda saptanmıştır. Maksimum lipid oranı ise %56 ile altı gün azot sınırlaması yapılan ve 30°C'deki kültürde saptanmış, bunu %52 lipid oranı ile azot stresi yapılan 30°C deki ve CO₂ ilavesi yapılan kültür izlemiştir [50].

Skeletonema costatum ve *Prorocentrum donghaiense* türleri farklı miktarda azot ve fosfor içeren ortamlarda 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulayarak kültüre alınmış ve lipid, karbohidrat ve protein değişimi takip edilmiştir. Çalışmanın sonunda *S. costatum*, fosfor sınırlaması yapılan besi ortamında lipid miktarını artırırken; hem azot hem de fosfor sınırlaması yapılan ortamda karbohidrat miktarını artırmıştır. Toplam protein ise azot-fosfor içeren ortamda yüksek oranda tespit edilmiştir. *P. donghaiense* hücrelerinde azot ve fosfor sınırlamasının yapıldığı ortamda lipid ve karbohidrat miktarı artış gösterirken; besin sınırlamasının yapıldığı ortamlarda toplam proteinde değişim gözlenmemiştir. Ayrıca *S. costatum*'un bu üç biyokimyasal yapıyı biriktirme yeteneğinin *P. donghaiense*'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir [51].

Yapılan bu çalışmalardan da anlaşılacağı gibi algler yaşadıkları ortama uyum sağlamak için metabolizmalarını stres koşullarına göre düzenleyebilmekte ve ortama uygun şekilde adaptasyon yeteneklerini geliştirebilmektedirler.

2.4.1 Biyokütle Uygulanan Ön Muameleler

Biyoetanol üretimi sırasında gözlenen en önemli işlemlerden biride biyokütlenin ön muamelesidir. Fiziksel, kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik olmak üzere biyokütle uygulanan dört tip ön muamele tekniği bulunmaktadır [29].

2.4.1.1 Fiziksel Ön Muameleler

2.4.1.2 Mekanik Parçalama Ön muamelesi

Öğütme, ezme, yongalama fiziksel işlemlerin ilk basamağı olarak bilinmektedir. Amaç biyokütlenin yüzey alanını arttırarak sonraki ön muameleler için şekere daha kolay ulaşmayı sağlar [22], [101], [29].

2.4.1.3 Proliz Ön Muamelesi

Bu ön muamelede en düşük enerji girdisi olan endotermik bir proses olup biyokütlenin 300°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda muamele görmesi selülozun char ve CO ile H₂ gibi gaz ürünlere dönüşerek kimyasının bozulduğu gözlenir. Oluşan Char su veya düşük asit konsantrasyonu ile yıkandığında kalan su biyoetanol üretimi için mikrobiyal büyümeyi destekleyecek kadar şeker kaynağı bulunabilmektedir. Biyokütle ağırlığının yaklaşık olarak %55'i su ile yıkama aşamasında kayıp olmaktadır [30].

2.4.1.4 Mikrodalga Ön Muamelesi

Mikrodalga yöntemi yüksek ısıtma etkinliği ve düşük enerji girdisi ile kolay uygulanan bir muamele çeşitidir. Mikrodalga yöntemi sıvı ortamda mikrodalgaların oluşturduğu termal ve termal olmayan etkileri kullanır. Biyokütlenin içinde oluşan ısı polar bağların titreşimini sağlar ve bunun sonucunda partiküller arasında bir patlamaya yol açar ve lignoselüloz yapının bozulmasına sebep olur. [29], [30], [36].

2.5.1 Fizikokimyasal Ön Muameleler

2.5.1.1 Buhar Patlama Ön Muamelesi

Bu yöntemde biyokütle yüksek basınçlı buhar (20–50 bar, 160-270 °C) kullanılarak birkaç dakika boyunca ısıtılır ardından basıncın atmosferik koşullara gelmesi ile reaksiyonun durması sağlanır. Buharın lignoselülozik matrikste yayılması fiberlerin dağılmasına sebep olup, yöntemde katalizör kullanılmamaktadır. [25], [52].

2.5.1.2 Sıcak Su Ön Muamelesi

170-230 °C 'de sıkıştırılmış sıcak su ile 15-20 dakika boyunca bir kimyasal ya da katalizör olmadan biyokütlenin ön muamelesinde kullanılmasını içermektedir. Bu işlem sonucunda karboksilik asit ve furfural gibi mikroorganizmaların büyümesini inhibe edici toksik maddeler oluşmaktadır. [30], [36], [52].

2.5.1.3 Amonyak Fiber Patlaması (AFEX) Ön Muamelesi

Amonyak fiber patlaması (AFEX) ön muamelesi sıvı amonyak ve buhar patlamasının bir arada gerçekleştirildiği bir yöntemdir. %15-30 nem içeriğine sahip biyokütle 1–2 kg NH₃/kg kuru biyokütle oranında sıvı amonyakla basınçlı bir tankta (12 atmosferin üzerinde) basınca muamele edilir. Kısa reaksiyon süresi ve kolay uygulanabilir bir yöntem olmasının aksine lignin içeriği yüksek hammaddelerde etkili değildir [25], [30].

2.5.1.4 CO₂ Patlaması Ön Muamelesi

Bu yöntem AFEX yöntemine benzerliği ile dikkat çekmektedir. AFEX yönteminden farkı daha düşük sıcaklıklarda oluşu ve bu durumun proses maliyetinin düşük düşürmesi bunun yanında da buhar patlamasındaki inhibitörler bu ön muamelede rastlanılmaması. Ayrıca dönüşüm verimleri de buhar patlamasına göre çok daha yüksektir [30], [36], [59].

2.5.1.5 Islak Oksidasyon Ön Muamelesi

Kullanılacak hammaddenin 120 °C sıcaklığın üzerinde hava ya da oksijenin katalizör olarak kullanılarak su ile muamele edilmesi yöntemidir. Yöntemle hemiselüloz ve ligninin çözünürlüğü artmaktadır ancak bu teknikle serbest hemiselüloz molekülleri hidrolize olmazlar. Buhar patlama ve seyreltik asit ön muamelelerinde şeker monomerleri oluşurken, ıslak oksidasyonda açığa çıkan şekerlerin yapısı oligomer şeklindedir [30], [66], [103]

2.6.1 Kimyasal Ön Muameleler

Çeşitli kimyasalların kullanılması (seyreltik asit, baz, organik çözücü vb.) ile uygulanan ön muamele çeşitlidir. Uygulaması kolay ve geri dönüşümleri hızlı olduğundan proseslerde tercih edilme sebebidir [29], [30].

2.6.1.1 Asit Ön Muamelesi

Bu yöntemde lignoselulozik şeker içeren hammaddelerin 130-210 °C 'de %0.2-2.5 (w/w) konsantrasyon asit muamelesinde uygulanan bir muameledir. Yaygın olarak sülfirik asit, hidroklorik asit ve nitrik asit kullanılmaktadır [30]. Derişik asit kullanımı yüksek miktarda inhibe edici bileşenlerin oluşumuna yol açması ve kullanılan ekipmanda korozyona yol açmasından dolayı seyreltik asit kullanımına göre daha az kullanılmaktadır [67].

2.6.1.2 Alkali Ön Muamelesi

Sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH), kalsiyum hidroksit (CaOH₂) ve amonyum bu yöntemde en çok kullanılan katalizörler olup, diğer tekniklere göre düşük sıcaklık ve basınçta gerçekleşmektedir [93]. Bununla birlikte hemiselülozun ve selülozun çözünebilirliği asit ile yapılan ön muamelelere kıyasla daha azdır [103]. Alkali ön muamele biyokütledeki lignin ve hemiselüloz içeriğini azaltarak yüzey alanını artırır ve su moleküllerinin hemiselüloz ile lignin arasındaki bağları kırmasına yardımcı olur [25], [30].

2.6.1.3 Organosolv Ön Muamelesi

Metanol, etanol, aseton, etilen glikol gibi organik solventlerin kullanıldığı prosesler olmasının yanında hidroklorik asit, sülfirik asit, sodyum hidroksit ve amonyak gibi maddelerde katalizör olarak kullanılmaktadır. Uygulanan ön muamele ile lignin ve hemiselüloz bağları kırılabilenkte ayrıca yan ürün olarak saf ve yüksek kalitede lignin elde edilebilmektedir [98]. Devantajı ise organik solventler kullanıldığı için yanma, uçma, yüksek basınçlı işlemlerde yüksek risk oluşturmaktadır. Ayrıca önemli miktarda furfural ve çözünür fenoller meydana geldiği için ve maliyetini düşürmek için solventler geri kazanılmalıdır [30], [36], [67].

2.7.1 Biyolojik Ön Muameleler

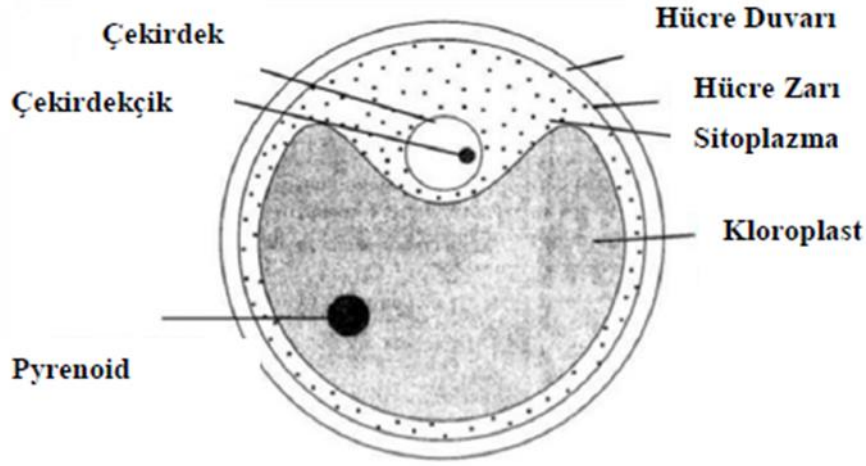
Biyolojik ön muameleler; kimyasalların kullanılmaması, enerji girdisinin az olması, basınçlı ve korozyona dirençli reaktörlere ihtiyaç duyulmaması ve minimum inhibitör oluşumu ile çevre dostu olarak biyolojik ön muameleler dikkat çekmektedir. [50]. Biyolojik ön muamelelerde kullanılan mantarlar genellikle kahverengi, beyaz ve

yumuşak küf mantarlarıdır. Bu mantarlar lignin, hemiselüloz ve selülozun bir kısmının yapısını bozabilmektedirler [30], [103]. Uzun proses süresi, geniş alan ve mikroorganizma büyümesi için sürekli kontrol ihtiyacı ticari üretimler için dezavantaj olarak görülmektedir [36].

2.7.1.1 Enzimatik hidroliz

Hidroliz işleminde kullanılan selüloz enzimleri bakteriler ve mantarlar tarafından üretilmektedir. Bu mikroorganizmalar aerobik, anaerobik, mezofilik ya da termofilik olabilirler. Enzimatik hidroliz (pH 4.8, 45-50°C sıcaklık) aralığında gerçekleştiğinden asit ve alkali ön muamelelere göre maliyeti ve toksit madde oluşumu daha düşük bir prosestir. Hidroliz işlemi sonrası elde edilen ürünler glikoz içeren basit şekerlerdir [25], [30]. Selüloz enzimini üreten bakterilere Clostridium, Cellulomonas, Bacillus, Thermomonospora, Ruminococcus, Bacteriodes, Erwinia, Acetovibrio, Microbispora ve Streptomyces örnek verilebilir. Mantarlar arasında ise Trichoderma, Penicillium, Fusarium, Phanerochaete, Humicola ve Schizophillum sp. selüloz üreten mantarlar olarak belirlenmiştir [29]. Selüloz enzimleri endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukosidaz enzimlerinin birleşiminden meydana gelmektedir. Endoglukanaz enzimi selüloz fiberlerindeki düşük kristalinitenin olduğu bölgelere hücum ederken, ekzoglukanaz endoglukanazın etkisi ile serbest kalan zincirlerden selüloz birimlerini uzaklaştırarak molekülün bozunmasını sağlar. β -glukosidaz ise selüloz birimlerini hidrolize ederek glikozun oluşumunu sağlar [30], [102].

2.8 Biyoetanol hammaddesi olarak *Chlorella spp.*



Şekil 2. 2 *Chlorella spp.* 'nin yapısı [16]

Basit, tek hücreli, hareketsiz yeşil tatlı su mikroalgi olan *Chlorella spp.* klorofil içeriği sayesinde yüksek fotosentez kapasitesine sahiptir. Mikroalglerden olan *Chlorella* türleri, klorofil özelliklerine, şekillerine ve farklı özelliklerine göre sistematik olarak sınıflandırılmaktadır. *Chlorella spp.*'nin 20 ila 30 arasında türü tespit edilmiş olup, bunlara *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* ve *Chlorella ellipsoidea* örnek olarak verilebilir [35], [36]. Vücudumuzun ihtiyaç duyduğu esansiyel aminoasitler *Chlorella sp.*'nin yapısında bulunmaktadır ve miktarları günlük alınması gereken düzeylere eş değerdir. Hücrelerin genetik formüllerini taşıyan ve hücre yenileme hızını arttıran RNA ve DNA da *Chlorella'* nin yapısında bulunmaktadır. Özellikle RNA oranı *Chlorella'* da yüksek seviyededir. *Chlorella sp.*'nin yağ asitlerinin çoğunluğunu doymamış yağ asitleri oluşturur. Doymamış yağ asitlerinin oranı % 80 seviyesindedir. *Chlorella'*daki mineral madde miktarları da yüksek düzeydedir.

Çizelge 2. 4 Alglerden etanol üretimi üzerine gerçekleştirilen literatür çalışmaları.

Algal hammadde ve türü	Ön muamele ve sakkarifikasyon	Fermante eden organizma, proses ve süre	Verim (%)	Ref.
<i>Chlorococum</i> sp. (Mikroalg)	Superkritik CO ₂ lipid ekstraksiyonu	<i>Saccharomyces bayanus</i> , SHF, 60 sa	38.30	[68]
<i>Chlorococcum infusionum</i> (Mikroalg)	120°C 'de 30 dk %0.75 (w/v) NaOH muamelesi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SHF, 72 sa	26.00	[69]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90 (Mikroalg)	110°C 'de 30 dk %3 H ₂ SO ₄ muamelesi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C, SHF, 24 sa	29.10	[70]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90 (Mikroalg)	a-amylase (90 °C, 30 dk) ve glucoamylase (55 °C, 30 dk) enzimatik hidroliz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C, SSF, 40 sa	23.50	[71]
<i>Chlorella vulgaris</i> (Mikroalg)	110 °C 'de 105 dk %3 H ₂ SO ₄ muamelesi	<i>Escherichia coli</i> SJL2526, SHF, 24 sa	40.00	[72]
<i>Schizochytrium</i> sp (Mikroalg)	Hidrotermal parçalama ve a-enzimatik hidroliz	<i>Escherichia coli</i> KO11, SSF, 72 sa	5.51	[73]
<i>Chlorococcum humicola</i> (Mikroalg)	H ₂ SO ₄ ile asit ön muamele	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SHF, 50 sa	48	[85]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cw15 (Mikroalg)	12 N H ₂ SO ₄ ile asit ön muamele	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SHF, 48 sa	44	[86]
<i>Kappaphycus alvarezii</i> (Makroalg)	120 °C 'de 60 dk 0.9 N H ₂ SO ₄ muamelesi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM 455,SHF, 96 sa	15.4	[74]
<i>Kappaphycus alvarezii</i> (Makroalg)	130 °C'de 15 dk %0.2 H ₂ SO ₄ muamelesi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SHF, 4sa	1.31	[75]
<i>Gracilaria salicornia</i> (Makroalg)	120 °C 30 dk %2 H ₂ SO ₄ ve 40 °C 'de cellulase enzimi ile hidroliz	<i>Escherichia coli</i> KO11, SHF, 48 sa	7.90	[76]
<i>Gelidium elegans</i> (Makroalg)	50 °C'de 120 sa Meicelase muamelesi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4178, SHF, 48 sa	36.7	[77]
<i>Sargassum sagamianum</i> (Makroalg)	15 MPa 200 °C 'de 15 dk boyunca termal sıvılaşma	<i>Pichia stipitis</i> CBS 7126, SHF, 48 sa	10.0	[78]
<i>Laminaria japonica</i> (Makroalg)	0.1 N HCl, 121 °C 15 dk ön muamele ve Celluclast 1.5 L, Viscozyme L enzimatik hidroliz	<i>Escherichia coli</i> KO11, SSF, 72 sa	16.1	[79]

Çizelge 2. 4 Alglerden etanol üretimi üzerine gerçekleştirilen literatür çalışmaları
(devamı)

<i>Laminaria hyperborea</i> (Makroalg)	Kesilme ve pH 2'de 65 °C suda yıkama	<i>Pichia angophorae</i> , SHF, 48 sa	0.86	[80]
<i>Saccharina latissima</i> (<i>Laminaria hyperborea</i>) (Makroalg)	Parçalama ve sakkarifikasyon için laminarinase ön muamelesi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ethanol Red, SSF, 48 sa	0.47	[81]
<i>Laminaria digitata</i> (Makroalg)	Parçalama ve sakkarifikasyon için laminarinase ön muamelesi	<i>Pichia angophorae</i> , SSF, 96 sa	13.2	[82]
<i>Laminaria japonica</i> (Makroalg)	0.1 M H ₂ SO ₄ ile 121 °C'de 1 sa muamele ve cellulase, cellobiase enzimleri ile hidroliz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SHF, 36 sa	11.3	[83]
<i>Laminaria japonica</i> (Makroalg)	Biyokütlenin öğütülmesi ve 120 °C ,15 dk otoklavlanması	<i>Pichia stipitis</i> KCTC7228	2.9	[84]
<i>Gracilaria verrucosa</i> (Makroalg)	Selülaz ve β-glukosidaz enzimleri ile enzimatik hidroliz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SHF, 48 sa	43	[87]
<i>Gelidium corneum</i> (Makroalg)	30 ve 60 dk boyunca 121°C'de %0.5–1% oksalik asit muamelesi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SHF, 96 sa	5.8	[88]
<i>Ulva lactuca</i> (Makroalg)	2 N H ₂ SO ₄ ile 60 dk 100°C'de ön muamele	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 48sa	24.48	[20]
<i>Ulva lactuca</i> (Makroalg)	%0.75 KOH ile 60 dk 100°C'de ön muamele	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 48sa	11.47	[20]
<i>Sargassum spp.</i> (Makroalg)	%3.4-4.6 H ₂ SO ₄ ile asit ön muamele ve selülaz ve β- glukosidaz enzimleri ile enzimatik hidroliz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SHF, 48 sa	65- 89	[89]
<i>Saccharina japonica</i> (Makroalg)	%0.06 H ₂ SO ₄ ile 170 °C'de 15dk ön muamele ve selülaz β-glukosidaz enzimleri ile enzimatik hidroliz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SSF 48 sa	67.41	[92]
<i>Gracilaria sp.</i> (Makroalg)	60 dk 0.1 N H ₂ SO ₄ 121°C'de enzimatik hidroliz 6 sa 50°C'de	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 24 sa	59.26	[91]
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Mikroalg)	%2 H ₂ SO ₄ 121°C'de 20dk	<i>Z. mobilis</i> , 30°C'de SHF, 4 sa	99.8	[93]

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Deneyisel çalışma mikroalglerin yetiştirilmesi ve biyoetanol eldesi olmak üzere iki bölümden oluşmakta olup; birinci kısımda *Chlorella minutissima* 'nın üretim koşulları ve karbonhidrat içeriği tesbiti yapılmış, ikinci kısımda ise *C. minutissima* 'nın farklı ön muameleler sonrasındaki biyoetanol verimliliği saptanmıştır.

3.1 Mikroalglerin yetiştirilmesi

3.1.1 *Chlorella minutissima*'nın sistematigi

Alem : Protista (Bitkiler ve Hayvanlar)

Bölüm : Chlorophyta (Yeşil algler)

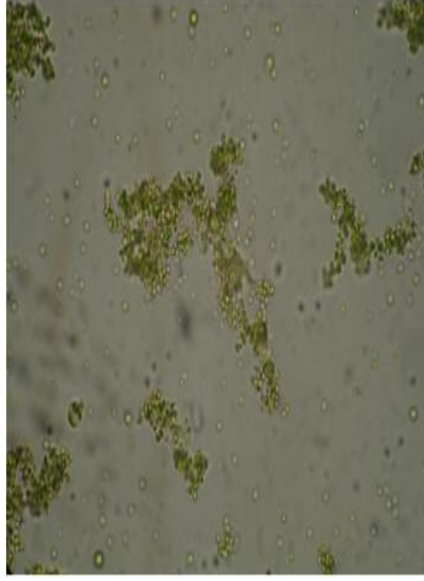
Sınıf : Chlorophyceae

Takım: Chlorococcales

Aile : Oocystaceae

Cins : Chlorella

Tür : Chlorella minutissima [62]



Şekil 3. 1 *Chlorella minutissima*

Chlorella minutissima tek hücreli ökaryotik bir mikroalg olup hızlı büyüme oranına sahip, biyokütle üretimi için yaygın olarak kullanılan mikroalg türüdür. Chlorophyta bölümünden olan *Chlorella minutissima* küresel şekilde, klorofil a ve b'ye sahip, kamçısı olmayan ve bitkiler gibi nişasta sentezleme yeteneğine sahiptir. *Chlorella minutissima* amino asitler ve çoklu doymamış yağ asitleri bakımından da oldukça zengin olup, bu özelliği mikroalgı tıp, gıda ve ilaç endüstrisinde önemli kılmaktadır. Potansiyel alg türleri arasından olan, *Chlorella minutissima* mikroalgleri yüksek lipid içeriğine (kuru ağırlık biyokütle% 57) sahip olup ayrıca atık su arıtma çalışmalarında kullanılmaktadır [59]. Bu suş benzersiz özelliklere sahip olup, çeşitli ve ekstrem durumlarda da yüksek büyüme yeteneğine sahiptir. Kirlilik toleransının yanında, asidik koşullar altında ve organik C₁ substratların aralığı içerisindeki ışık varlığında, mikсотrofik ve karanlıkta heterotrofik olarak büyütüldüğü görülmüştür [64]. *C. minutissima* diğer alg türlerine göre en kararlı ve büyüme grafiğine sahip olan bir mikroalgdir.

Çizelge 3. 1 *C.minutissima*'nın üretim koşulları

Tür	<i>C. minutissima</i>
Aydınlatma (lux)	6500(±)300
Sıcaklık (oC)	27

Çizelge 3. 1 C.minutissima'nın üretim koşulları (devamı)

Tuzluluk (%)	Değişken
pH	7-9
Besi Ortamı	BG-11 ve BBM
Doğal Ortamı	Tatlı Su
Karıştırma	150 rpm
Absorbans	680nm

3.1.2 Chlorella minutissima'nın Kültür Ortamı

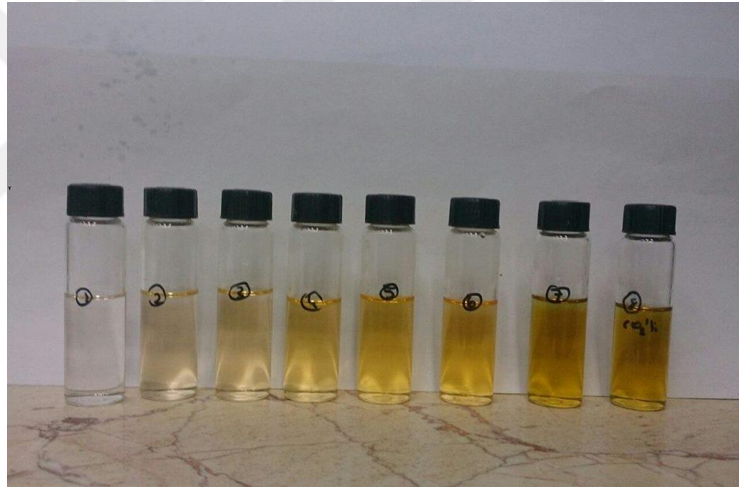
Chlorella minutissima bir tatlı su algı olup, yetiştirilmesi için kültür ortamına distile su ile seyreltilmiş BBM ilave edilmiştir. Toplam 300 ml olarak hazırlanan kültüre 30 ml stok alg kültüründen ilave edilip, geri kalan 270 ml'ye 5.4 ml BBM ve 264.6 ml distile su ilave edilmiş ve inkübatörün içinde $25\pm3^{\circ}\text{C}$ 'de 150 rpm çalkalama ve floresan lamba altında sürekli aydınlatma koşulları altında büyümeye alınmıştır. Ayrıca kültürün multimetre ölçüm değeri pH 8.35, 256 ms/cm olarak kaydedilmiştir.

Üretimi yapılan mikroalglerin optik yoğunluklarının belirlenmesinde gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler PG 60 Instrument UV-Vis Spektrofotometre cihazı ile Şekil 3. 3 'de belirtilmiş olan absorbanlarda yapılmıştır [42].

3.1.3 Toplam Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

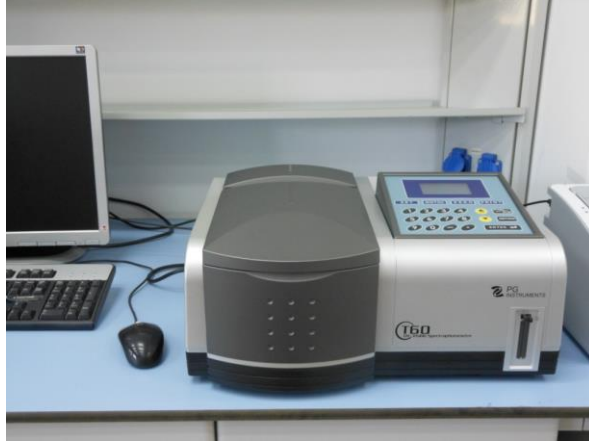
Yarı asetal veya yarı ketal formundaki monosakkaritler indirgen özellik gösterirler. Bu karbohidratlar birçok yükseltgen tarafından oksitlenirken sakkaroz trehaloz tipi disakkaritler etkilenmezler. Karbohidrat tayininde yaygın olarak kullanılan metot Fenol-Sülfürik asit yöntemidir. Bu yöntemde, derişik mineral asitler karbohidratlardan su çekerek furan aldehytleri açığa çıkarırlar. Furan aldehytleri de fenoller ile karakteristik

boyar maddeler oluştururlar. Bu çalışmada da toplam karbonhidrat tayini için Fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonu bilinmeyen örneğin bulunması amacıyla standart olarak da glikoz çözeltisi kullanılmıştır. Tabloda belirtilen konsantrasyonlarda glikoz çözeltisi hazırlanarak, bu zeltelerin spektrofotometrede 490 nm' de okunan absorbans değerleri ile grafik oluşturulup alg içeriğindeki karbonhidrat miktarı tespit edilmilmiştir. Fenol reaktifi %80 (w/w) olacak şekilde 20 g distile suya 80 g fenol eklenmesi ile hazırlanmıştır. Analiz için standart olarak glikoz uygulaması yapılmıştır. Standart eğrisini oluşturmak için tüplerin içerisinde şekil 2. 3 'de verilen farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış glikoz çözeltilerine 0.05 ml fenol reaktifi eklenmiş ardından 5 ml H₂SO₄ eklenmiştir [67]. Sonuç olarak karbonhidrat içeriği *C. minutissima* için %33.05 bulunmuştur.



şekil 3. 2 Fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat tayini için farklı glikoz konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltiler.

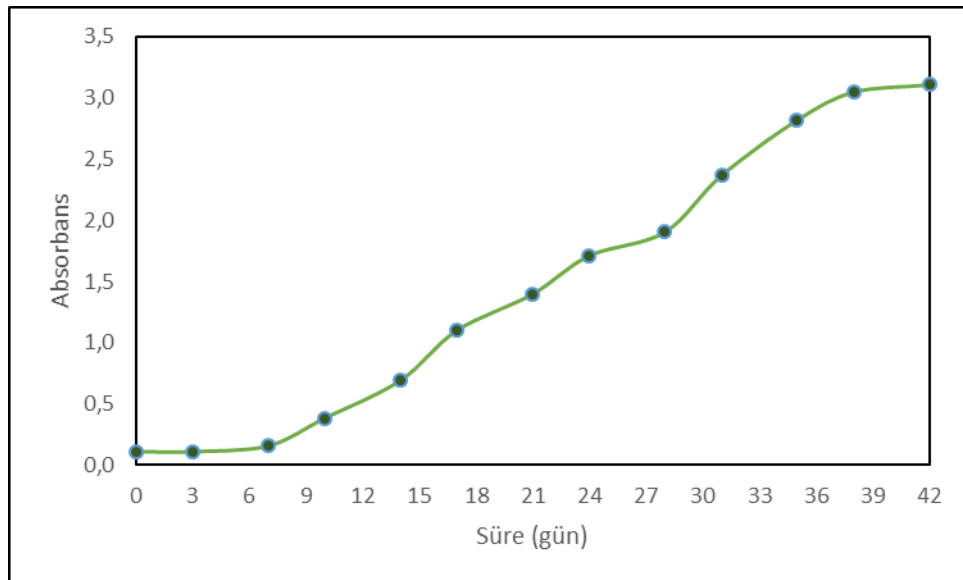
Oda sıcaklığında 10 dk bekletilen tüplerden alınan örneklerin PG Instruments T60 model UV spektrofotometrede 490 nm' de absorbansları llmştir.



Şekil 3. 3 Toplam karbonhidrat analizinde kullanılan PG Instrument T60 model UV spektrofotometre.

3.1.4 Optik Yoğunluk Analizi

Optik yoğunluk analizi PG Instruments markalı T-60 Uv Visible Spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler esnasında kuartz ve disposable küvetler kullanılmış olup, optik yoğunluk her alg türü için haftada iki gün düzenli olarak ölçülmüş ve değişimler not edilmiştir. Ölçümlerde her alg türü homojen olarak karıştırıldıktan sonra bir pasteur pipeti yardımıyla yaklaşık 3 ml örnek alınmış, tüplerden alınan örnekler küvetlere konularak spektrofotometrede Şekil 3. 4' de belirtilen dalga boyunda okuma yapılmıştır.



Şekil 3. 4 *C.minutissima*'nın optik yoğunluk analizi

3.1.5 Alg Büyüme Kinetiği

$\ln(x_v/x_{v0}) = \mu \cdot (t - t_{lag})$ formülünden spesifik büyüme hızı $\mu = 0.0879 \text{ gün}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Canlı hücre sayısının iki katına çıktığı zaman ise

$\ln 2 = 0.0879 \cdot t_d$ $t_d = 7,8$ gün olarak belirlenmiştir.

3.2 Mikroalglerden Biyoetanol Eldesi

3.2.1 Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmada alkali ön muamelesi için potasyum hidroksit (Merck), asit ön muamelesi için %98'lik sülfürik asit (Merck), etanol miktar tayinleri için %96 saflıkta etil alkol (Merck), karbonhidrat tayini için fenol (Sigma-Aldrich) ve D-Glikoz (Sigma-Aldrich), fermantasyon aşaması için LB Broth (Merck) kullanılmıştır.

3.2.2 Kullanılan Cihazlar

Alglerin kurutulması ve ön muamele aşamasında Ecocell marka etüv, mikroalglerin fermantasyonu aşamasında Wisd Laboratory Instrument marka çalkalayıcılı Kerman marka inkübatör, karbonhidrat tayini için PG Instruments T60 model UV spektrofotometre, etanol miktarının belirlenmesinde YL Instruments 6100 GC marka gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır.

3.2.3 Biyoetanol Üretim Prosesi Aşamaları

Chlorella minutissima'dan biyoetanol üretim süreci çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Üretim sürecinde uygulanan işlemler Şekil 3. 5 'de gösterilmektedir. Mikroalgler önce fotobiyoreaktörde uygun koşullarda yetiştirilmeye alınmış, büyüme tamamlanınca kaplarda depolanmıştır. Mikroalgler santrüflendikten sonra etüvde 70 °C'de 24 saat süreyle kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra biyoetanol üretiminde kullanılacak mikroalgler petrilerde saklanmıştır. Uygulanacak asit ve alkali ön muamelesi hazırlanmış, daha sonrada fermantasyon işlemine bırakılmıştır.



Şekil 3. 5 *Chlorella minutissima*'dan biyoetanol üretim sürecinde uygulanan işlemler.

3.2.4 Fermantasyon Öncesi Mikroalgelere Uygulanan Ön Muamele İşlemleri

3.2.4.1 Asit ile Ön Muamele

Kurutulmuş mikroalgler fermantasyon işlemi öncesinde mikroalgin yapısındaki fermente olabilen şeker komponentlerine ulaşabilmek için selülozik hücre duvarının deformasyonunu sağlamak amacıyla seyreltik asit ile ön muamele yapılmıştır. Deneysel çalışmada %98'lik H_2SO_4 çözeltisinden 0.5 N, 1 N, 2 N, 3 N ve 5N H_2SO_4 çözeltileri hazırlanmıştır. Kurutulmuş makroalgler 100, 120 ve 140°C gibi farklı sıcaklık değerlerinde, hazırlanan asidik çözeltiler ile 15, 30 ve 60 dakika gibi farklı sürelerde ön muamele işlemine uğratılmıştır. Belirtilmiş zaman aralıklarında etüvden alınan mikroalg örnekleri fermantasyon öncesi oda sıcaklığına düşene kadar soğumaya alınmıştır.

3.2.4.2 Alkali ile Ön Muamele

Deneysel çalışmada asit ön muamelenin yanısıra alkali ön muamele işleminde mikroalg biyokütlesi deformasyonu ve biyoetanol verimi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmada %0.5, %0.75, %1, %1.5, %2 (w/v) konsantrasyonlarında KOH çözeltileri hazırlanmış olup, mikroalgler hazırlanan çözeltiler ile 80, 100 ve 120°C gibi farklı sıcaklık değerlerinde etüv içerisinde 15, 30 ve 60 dakika gibi farklı sürelerde ön muamele işlemine maruz bırakılmıştır. Muamele sürecinin ardından mikroalg örnekleri oda sıcaklığına düşene kadar soğumaya alınmıştır.

3.2.5 Fermantasyon

Fermantasyon işlemi öncesi maya bir gün önceden LB besiyeri ortamında 40°C sıcaklık altında ve 150 rpm karıştırma hızı ile büyümeye bırakılmıştır. Deneysel çalışmada ön muamele sonrası kültür ortamına *S.cerevisia* mayasının %3 (v/v) inokulasyonu yapılmıştır. Erlenler 30°C sıcaklık altında ve 150 rpm karıştırma hızına ayarlı inkübatöre yerleştirilerek 48 saat boyunca fermantasyon için bırakılmıştır (Şekil). 24. ve 48. saatlerde üretilen etanol miktarının belirlenmesi amacıyla 5 ml'lik örnekler çözeltilerden çekilerek gaz kromatografi cihazında ölçüm yapmak amacıyla hazır edilmiştir.

3.2.6 Biyoetanol Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mikroalglerden üretilen biyoetanol miktarının belirlenmesi amacıyla gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Analizler YL Instruments 6100 GC marka gaz kromatografisi cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Gaz kromatografisi cihazı alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm ZB-FFAP kolonu içermektedir. Enjektör, dedektör ve fırın sıcaklıkları sırasıyla 150, 250 ve 100°C’de tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak hidrojen gazı kullanılmıştır. Biyoetanol konsantrasyonu %0.1-10 (v/v) aralığında farklı konsantrasyonlardaki etanol standartlarının enjekte edilmesiyle hazırlanmış kalibrasyon eğrisi ile çizilmiştir. Biyoetanol miktarının belirlenmesi için çözeltiden alınan örnekler kolonu tıkamaması için 0.45 µm’lik filtrelerden geçirilmiş daha sonra kolona verilmiştir.



Şekil 3. 6 Etanol miktarının belirlenmesinde kullanılan gaz kromatografi cihazı.

3.2.7 Farklı Ön Muamelelerin Biyoetanol Verimine Etkisi

3.2.7.1 Asit Ön Muamelelerin Derişiminin Biyoetanol Verimine Etkisi

Mikroalglerden biyoetanol üretiminde fermantasyon öncesi muamelelerin etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen asidik ön muamele deneyleri, 100°C muamele sıcaklığı ve 60 dakika muamele süresi için 0.5 N, 1 N, 2 N, 3 N ve 5N şeklinde farklı H₂SO₄ konsantrasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. 24 saat ve 48 saat sonunda elde edilen biyoetanol verim değerleri Çizelge 3. 2 ve 3. 3 'de verilmiştir. Alınan biyoetanol verimlerinin 24 saat süren fermantasyonda %2.92-4.78 arasında, 48 saat süren fermantasyonda ise %5.26-18.52 arasında değiştiği görülmüştür. Yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlara göre ön muamele işleminde uygulanan asit konsantrasyonu belli bir noktaya kadar biyoetanol veriminde artışa yol açmaktadır. Yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlara göre ön muamele işleminde uygulanan asit konsantrasyonu belli bir noktaya kadar biyoetanol veriminde artışa yol açmaktadır. 2 N asit muamelesine kadar yapılan ön muamelelerde fermente edilebilecek şekerler elde edilmiş ve giderek artan biyoetanol verimleri gözlenmiştir. En yüksek biyoetanol verimi de 1 N H₂SO₄ muamelesinde elde edilmiştir. 1 N asit muamelesinden sonra 2 N, 3 N ve 5 N asit muamelelerinde ise biyoetanol veriminde bir düşüş meydana gelmektedir. Tez çalışmasında gözlenen bu düşüşün nedeni artan asit konsantrasyonunun şekerin yapısında bozunmaya yol açarak asetik asit, formik asit ve furfural hidrolizatları hidroksimetilfurfural gibi fermantasyon üzerinde katı tortu birikimi gibi etkileri bulunan, fermantasyon işlemini inhibe etmeye yol açan ürünlerin oluşumundan kaynaklanmaktadır [90]. Düşük asit konsantrasyonlarında etanol veriminin artarken yüksek konsantrasyonlarda ise verimin düşmesi fermantasyon öncesi biyokütle üzerine yapılan ön muamele araştırmalarında gözlenen bir durumdur. Bir makroalg türü olan *Sargassum* spp. 'de H₂SO₄ ön muamelesi ile yapılan çalışmada %1.0-5.0 (m/v) arası değişen asit konsantrasyonlarında en iyi sonucun %3.4-4.6 asit muamelesi ile alındığı ve asit konsantrasyonu arttıkça biyoetanol veriminin düştüğü belirtilmiştir [89]. Başka bir makroalg türü olan *Gracilaria* sp.'ye 0.05-0.1-0.3-0.5N sülfirik asit konsantrasyonlarında ön muamele işlemi gerçekleştirilmiş ve en iyi verim

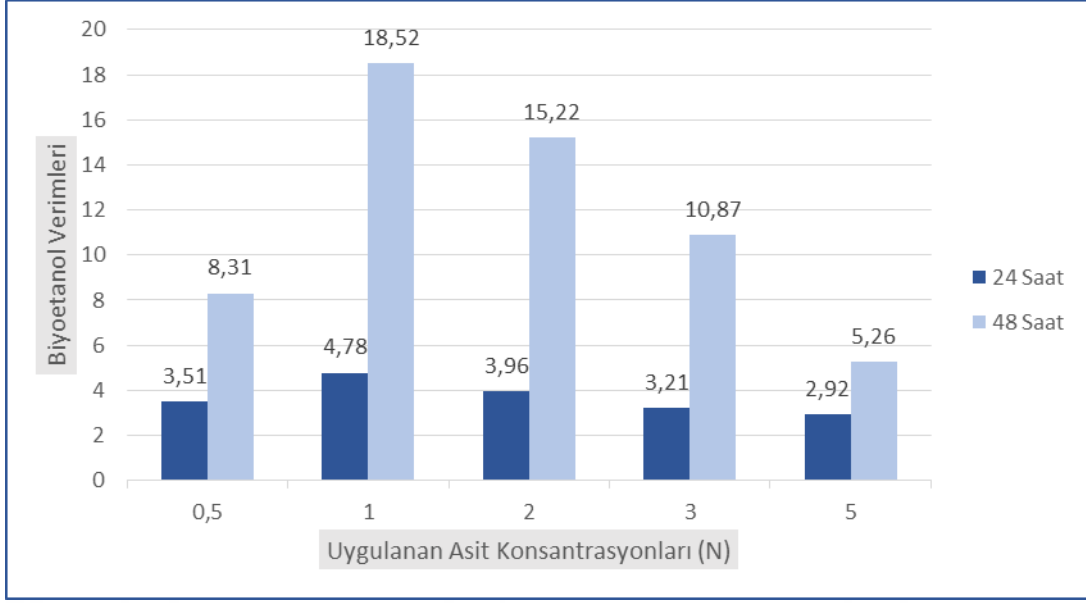
0.1 N 'lik asit ön muamelesinde gerçekleşmiş ve asit konsantrasyonu yükseldikçe şekerin yapısında bozulmalar oluşmuştur [91].

Çizelge 3. 2 Farklı konsantrasyonlarda asit muamelelerinin 24 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.

H ₂ SO ₄ Derişimi (N)	Biyoetanol Verimi (%)
0,5	3,51
1	4,78
2	3,96
3	3,21
5	2,92

Çizelge 3. 3 Farklı konsantrasyonlarda asit muamelelerinin 48 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.

H ₂ SO ₄ Derişimi (N)	Biyoetanol Verimi (%)
0,5	8,31
1	18,52
2	15,22
3	10,87
5	5,26



Şekil 3. 7 24 ve 48. saatlerde asit ön muamelesi sonrasında alınan etanol verimleri.

3.2.7.2 Alkali Ön Muamelelerin Derişiminin Biyoetanol Verimine Etkisi

Mikroalglerden biyoetanol üretiminde fermantasyon öncesi muamelelerin etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen alkali ön muamele deneyleri, 100°C muamele sıcaklığı ve 60 dakika muamele süresi için %0.5, %0.75, %1, %1.5, %2 (w/v) şeklinde farklı KOH konsantrasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında yapılan deneylerin sonuçları Çizelge 3. 4 ve 3. 5’de verilmiştir. Deney sonuçları incelendiğinde, alınan biyoetanol verimlerinin 24 saat süren fermantasyonda %1.01-1.92 arasında olup, 48 saat süren fermantasyonda ise %1.43-6.11 arasında değiştiği görülmüştür. En yüksek biyoetanol verimi değerine % 0.75 (w/v) KOH ile yapılan ön muamele sonrası ulaşıldığı görülmüştür. Tez çalışmasında gözlenen bu düşüşün nedeni artan alkali konsantrasyonunun asit ön muamelelerindeki duruma benzer olarak belli bir konsantrasyon dayanımını aştıktan sonra şekerin yapısında bozunmaya yol açarak formik asit, asetik asit ve furfural gibi fermantasyon üzerinde engelleyici etkileri bulunan, fermantasyon işlemini inhibe eden ürünlerin oluşumundan kaynaklandığı bilinmektedir. *Chlorococcum infusionum* mikroalginde %0.75 (w/v) NaOH muamelesi ile en yüksek etanol verimine ulaşıldığı bildirilmiştir [69]. Mısır koçanından şeker elde etmek için yapılan bir çalışmada NaOH alkali ön muamelesi sonucu lignin içeriği %85,9-89,4 oranında parçalanıp çıkarılmıştır [90].

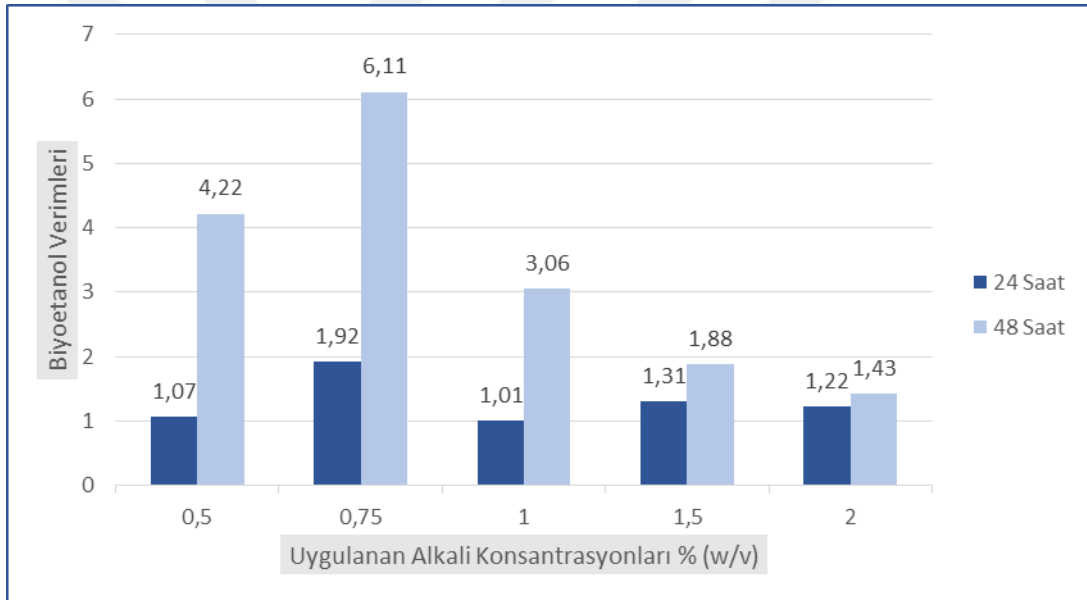
Marmara denizi kıyılarından toplanan *Ulva lactuca* makroalgi üzerine uygulanan alkali ön muamelesi çalışmalarında da alkali konsantrasyonu arttıkça biyoetanol verimliliğinin bir noktaya kadar artıp daha sonra da azaldığı gözlemlenmiştir [21]. Kullanılan hammadde değıştikçe alkali ön muamelenin ürün verimlerine ve lignin parçalayışına olan etkisinin farklı olduğu gözlenmektedir. Ayrıca seyreltik alkali ön muameleler de seyreltik asit ön muameleleri gibi furfural, hidroksimetilfurfural ve formik asit gibi inhibe edici yan ürünlerin oluşumuna neden olduğu saptanmıştır [94]. Çizelge 'de sunulmuş olan verilerdeki biyoetanol verimlerindeki bu değışimin toksik maddelerin etkisinden ve kullanılan hammaddenin yapısından kaynaklanmış olabileceğı düşünölmektedir.

Çizelge 3. 4 Farklı konsantrasyonlarda alkali muamelelerinin 24 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.

KOH Derişimi (% (w/v))	Biyoetanol Verimi (%)
0,5	1,07
0,75	1,92
1	1,01
1,5	1,31
2	1,22

Çizelge 3. 5 Farklı konsantrasyonlarda alkali muamelelerinin 48 saat sonunda elde edilen biyoetanol verimine olan etkisinin sonuçları.

KOH Derişimi (% (w/v))	Biyoetanol Verimi (%)
0,5	4,22
0,75	6,11
1	3,06
1,5	1,88
2	1,43



Şekil 3. 8 24 ve 48. saatlerde alkali ön muamelesi sonrasında alınan etanol verimleri.

Asit ve alkali ön muamele sonrası fermantasyon süresinin biyoetanol verimine olan etkisi Şekil ve 'da gösterilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde 24 ve 48. saatler arasında alınan ölçümlerde 48.saatte biyoetanol veriminin 24.saate göre belirgin bir şekilde artmış olduğu gözlenmektedir. Bu artıştan fermantasyon işleminin devam ettiği dolayısıyla biyoetanol üretiminde devam ettiği anlaşılmaktadır. Fermantasyon işlemi mikroorganizmalara bağlı olduğundan her ürünün mayalanma ve ürün oluşturma

işlemi farklılık gösterebilmektedir. Literatür incelemelerinde 16,24,48 ve 72 saatten 5 güne kadar fermantasyon süreleri gözlenmektedir [21], [92], [94],[95].

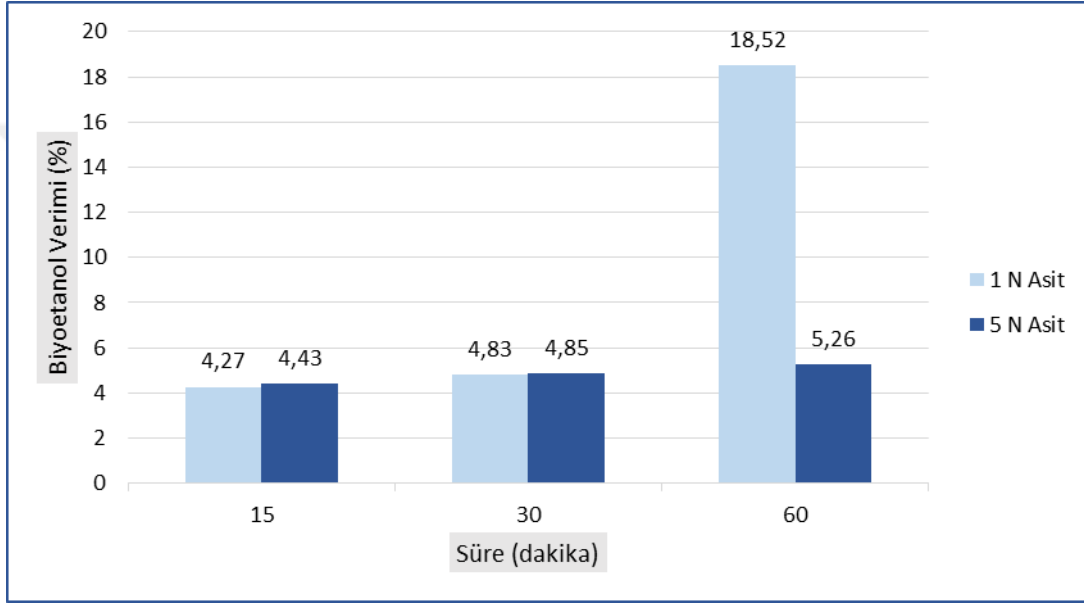
Mısır koçanından biyoetanol eldesi için yapılan çalışmada hem bakteriyel hem de fungal fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiş, yüksek biyoetanol eldesinin bakteriyel fermantasyon ile 5. günde sağlandığı gözlemlenmiştir [94]. *S. japonica* makroalginde ise en yüksek biyoetanol verimliliği 48. saatte gözlenmiştir [92]. Tayland makroalglerinden biyoetanol üretimi çalışmalarında da en yüksek biyoetanol verimine 10. saatte ulaşılmış ardından 48 saatin sonuna kadar etanol verimi azaldığı saptanmıştır [96]. Biyoproseslerde ortamda oluşan ürünün artmaya devam durumlarda ürün inhibisyonuna neden olmaktadır. Ürün inhibisyonuna verilen en iyi örneklerden biri olan biyoetanol fermantasyonunda da ortamda oluşan biyoetanolün yüzde olarak çokluğu, önce ortam pH'ını indirerek mikroorganizmaların hücre zarında fosfolipid tabakanın parçalanmasına, daha sonrada enzimlerinin denatüre olmasına ve hücrenin ölümüne sebep olduğu bilinmektedir [21].

3.2.8 Farklı Ön Muamele Sürelerinde Asit ve Alkali Ön Muamelelerin Biyoetanol Verimine Etkisi

15, 30 ve 60 dakika süren ön muamele sürelerinde 120 °C sıcaklıkta 1 N ve 5 N H₂SO₄ çözeltileri ile gerçekleştirilen deneylerin biyoetanol verimine etkisinin sonuçları Şekil3.9 'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde muamele süresi arttıkça hem 1 N hem de 5 N asit muameleleri sonrası biyoetanol veriminin arttığı görülmektedir. *Scenedesmus obliquus* mikroalginde %0.5-5 lik H₂SO₄ 121 °C' de 20 dk muamelesine tutulmuş en yüksek biyoetanol eldesi %2'lik asit konsantrasyonunda sağlanmıştır [92]. Diğer bir çalışmada ise mısır koçanı %1'lik HCl çözeltisi ile 20-40 dakika boyunca ön muamele edilmiş olup, 100-130°C sıcaklıklarda gerçekleştirilen işlem sonucunda muamele süresi arttıkça glikoz verimlerinde artış gözlenmiştir [97]. Bir başka çalışma olan *Kappaphycus alvarezii* makrolaginde yapılan çalışmada 20, 40, 60 dk %1-1.5-2 'lik H₂SO₄ ön muamelesiyle 121 °C 'de gerçekleşmiş en yüksek verimlilik 60 dk 'da %1'lik konsantrasyonda gerçekleşmiştir [99]. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar literatürde bulunan çalışmaların sonuçları ile uyumlu olup, birbirini destekler niteliktedir.

Çizelge 3. 6 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H₂SO₄, 120 °C)

Süre (dakika)	1 N	5 N
15	4,27	4,43
30	4,83	4,85
60	18,52	5,26



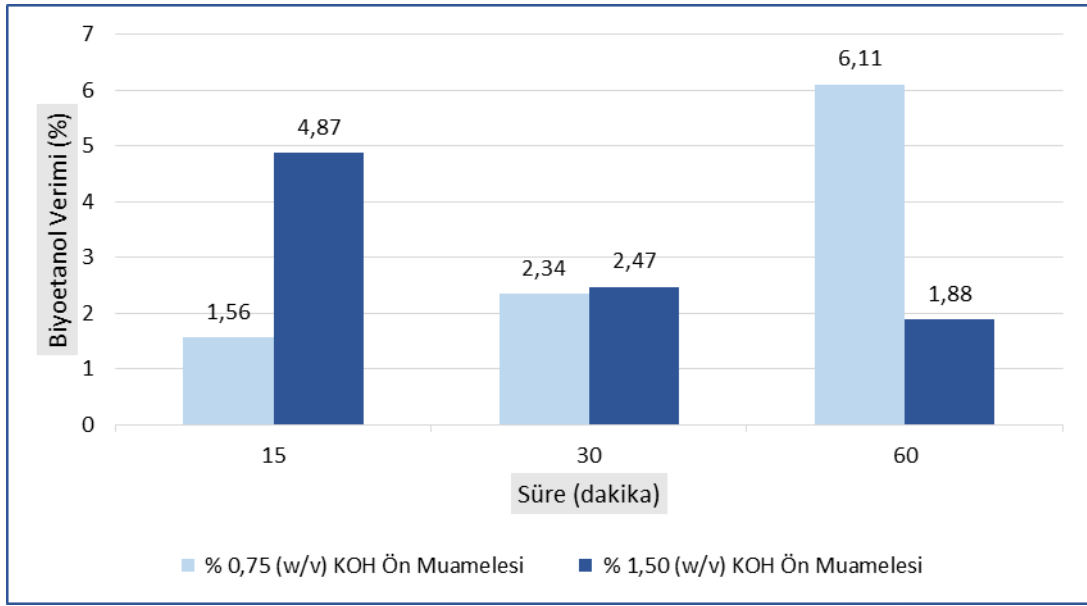
Şekil 3. 9 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H₂SO₄, 120 °C)

15, 30 ve 60 dakika süren ön muamele sürelerinde 100 °C sıcaklıkta %0.75 ve %1.5 (w/v) KOH çözeltileri ile gerçekleştirilen deneylerin biyoetanol verimine etkisinin sonuçları Şekil 'de gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde en yüksek verimin %0.75 (w/v) KOH ön muamelesinde 60 dakika ön işlem sonrası alındığı görülmektedir. %1.50 (w/v) KOH ön muamelesinde ise en yüksek verim 15 dakika muamele sonrası alınmıştır. Koşullar kendi içinde değerlendirildiğinde %0.75 (w/v) KOH ön muamelesinin verdiği etanol verimlerinin muamele süresi 15-30 dakikalara süresince birbirine yakın olduğu 60. dakikada ise artış gösterdiği görülmüştür. %1.5 (w/v) KOH ön muamelesinde ise en yüksek biyoetanol verimi 15. dakikada alınmış ilerleyen dakikalarda ise biyoetanol veriminde düşüş gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *Chlorococcum infusionum*

mikroalgi biyoetanol eldesi için kullanılmış ön işlem olarakta NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Bu çalışmada NaOH konsantrasyonu, proses sıcaklığı ve zamanı olarak üç parametre incelenmiştir. Çalışma sonucunda 80°C’de 30 ve 60 dakika boyunca gerçekleştirilen %0.75 (w/v) NaOH ön muamelelerinin sonucunda verimin %12.88’den %21.26’ya çıktığı gözlenmiştir. 120°C’de ise bu muamele sürelerinde %26.13 ve %23.37 olarak azalma görülmüştür. 80°C ve 120°C’de 30 ve 60 dakika boyunca uygulanan %2 (w/v) NaOH ön muamelelerinde ise küçük artış ve azalışlar gözlenmiştir [69]. Bu sonuca dayanarak 60 dakika boyunca %0.75 (w/v) KOH ön muamelesinden sonra elde edilen biyoetanol veriminde artış gözlenmesi muhtemel bir sonuçtur. Literatürde bulunan çalışmalarda bitkilerden ve bitki artıklarından elde edilen alkali ön muamelelerinde konsantrasyon ve süre arttıkça elde edilen biyoetanol verimliliğinin artmış olduğu görülmektedir [94], [90]. Ancak mikroalgler, lignin içeriği oldukça düşük yapılar olduğundan dolayı yüksek sıcaklık değerlerinde uygulanan kimyasalın konsantrasyon derecesi arttıkça biyokütleyi oluşturan yapılarında da bozunma gerçekleşebileceği olasılığı bulunduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle %1.50 (w/v) KOH muamelesinde biyokütlenin alkaliye maruz kalma süresi arttıkça toksisitenin arttığı ve biyoetanol veriminde düşüşün gerçekleştiği düşünülmektedir.

Çizelge 3. 7 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.50 (w/v) KOH, 100°C)

Süre (dakika)	0,75 % KOH	1,50 % KOH
15	1,56	4,87
30	2,34	2,47
60	6,11	1,88



Şekil 3. 10 Muamele süresinin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.50 (w/v) KOH, 100°C)

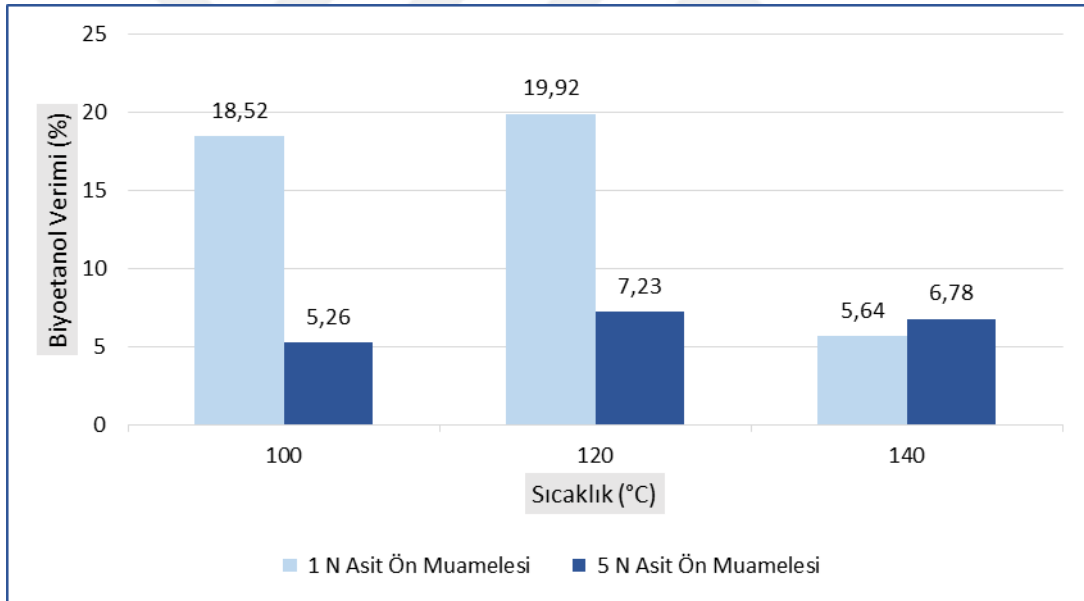
3.2.9 Farklı Sıcaklıklarda Asit ve Alkali Ön Muamelelerin Biyoetanol Verimine Etkisi

60 dakika süren ön muamele sürelerinde 100, 120 ve 140 °C sıcaklıkta 1 N ve 5 N H₂SO₄ çözeltileri ile gerçekleştirilen deneylerin biyoetanol verimine etkisinin sonuçları Şekil 'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde 120°C'ye kadar iki asit konsantrasyonu sonrası elde edilen etanol verimlerinde artış gözlenmiştir. 140°C'de gerçekleştirilen ön muameleler sonrasında ise etanol verimlerinde bir düşüş meydana gelmiştir. Yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen ön muamelelerde alınan verim belli bir sıcaklığa kadar artarken daha sonra azalma göstermektedir. Bunun sebebi bu muamelelerin kompleks şekerlerin doğrudan çözünabilirliğini ve basit şekerlerin yapılarını bozmasıdır [85]. Genel olarak lignin ve hemiselüloz içeren hammaddelerin 160 °C 'den yukarı sıcaklıklarda %0.5-1.5 arasında asit muamelesine maruz bırakılması ön görülmüştür [99]. Mısır liflerinin seyreltik sülfürik asit ön muamelesinin yapıldığı bir başka çalışmada ise 120 ve 140°C'lerde 60 dakika boyunca süren ön muamelelerde elde edilen monomerik şekerlerin veriminin düştüğü gözlenmiştir [100]. Hammadde içeriğindeki mevcut lignin miktarı azaldıkça sıcaklık ve düşük asit konsantrasyonlarında ön muamelelerin gerçekleştirilmesi gerektiği literatür çalışmaları tarafından ortaya

konulmuştur. Mikroalg yapısı diğer hammaddelere kıyasla daha basit olduğundan yüksek sıcaklıkta mikroalgin yapısındaki glikozun zarar gördüğü düşünülmektedir.

Çizelge 3. 8 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H₂SO₄, 60 dk)

Sıcaklık (°C)	1 N	5 N
100	18,52	5,26
120	19,92	7,23
140	5,64	6,78



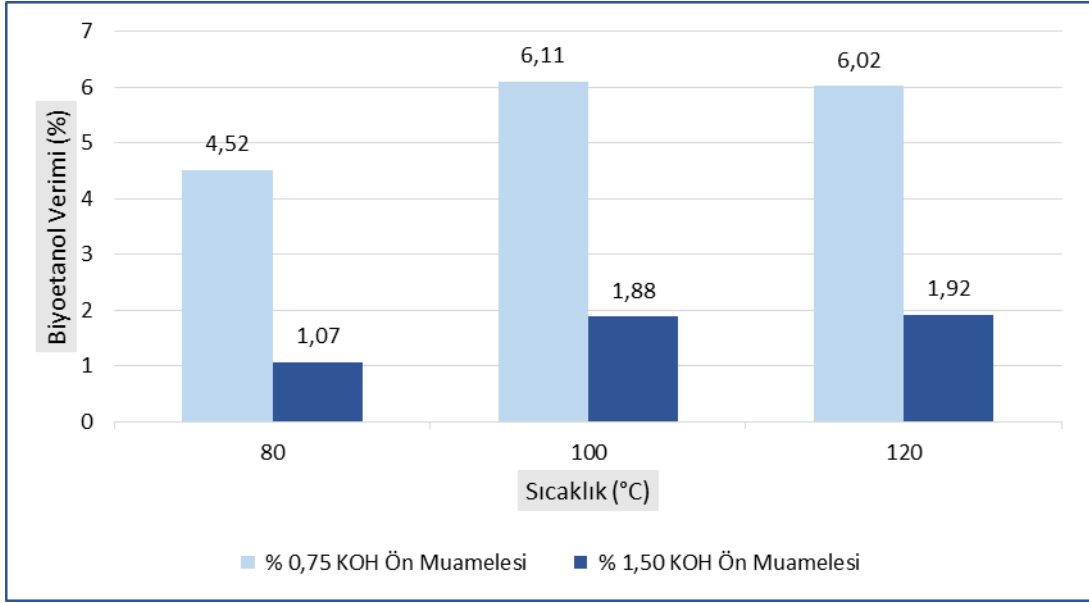
Şekil 3. 11 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (1 N ve 5 N H₂SO₄, 60 dk)

Çalışmalarda 60 dakika süren ön muamele sürelerinde 80, 100 ve 120°C sıcaklıkta %0.75 ve %1.5 (w/v) KOH çözeltileri ile gerçekleştirilen deneylerin biyoetanol verimine etkisinin sonuçları Şekil 'de verilmiştir. Asit ön muameleden farklı şekilde, %0.75 (w/v) KOH çözeltisi ile yapılan muamele sonrası sıcaklık arttıkça etanol verimi 100 °C'ye kadar

artmış 120 °C’de ise azalmış olmasına karşın %1.5 (w/v) KOH çözeltisi ile yapılan muamele sonrasında 120 °C’ye kadar etanol veriminde artış görülmektedir. *Chlorococcum infosionum* mikroalgi üzerine yapılan alkali muamelelerde de tez çalışmada elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar alındığı görülmektedir. *Chlorococcum infosionum* mikroalgi üzerine yapılan çalışmada 80 ve 120°C ‘lerde 60 dakika boyunca %0.75 (w/v) NaOH muameleleri sonucunda sırasıyla %21.26 ve %23.37 etanol verimleri elde edilmiştir. Daha yüksek NaOH konsantrasyonlarında ise (%2 (w/v) NaOH ön muamelesinde) 80°C’de elde edilen verim %23.75 iken 120°C’de elde edilen verim %18.74’e düşmüştür [69]. Yapılan deneysel çalışmada elde edilen sonuçlar bu çalışma ile karşılaştırıldığında beklenen şekilde gözlenmiştir. Asit ile muameleye benzer şekilde, uygulanan kimyasalın biyokütle üzerindeki etkinin daha yüksek olduğu şartlarda sıcaklık değerinde de artış yapıdaki şekerlerin parçalanmasına neden olmaktadır. Aynı anda farklı parametrelerin farklı oranlarının etkisinin değişken olduğu görülmüş yani bir parametrenin tek başına bağımsız olarak değerlendirilmesinin zor olacağı anlaşılmıştır.

Çizelge 3. 9 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.5 (w/v) KOH, 60 dk)

Sıcaklık (°C)	0,75 % KOH	1,50 % KOH
80	4,52	1,07
100	6,11	1,88
120	6,02	1,92



Şekil 3.12 Farklı sıcaklıklarda yapılan ön muamelelerin biyoetanol verimine etkisi (%0.75 ve %1.5 (w/v) KOH, 60 dk)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Laboratuvar ortamında yetiştirilen *Chlorella minutissima* mikroalginden farklı deney koşulları altında biyoetanol üretimi gerçekleştirilerek, bu deneysel koşulların biyoetanol verimine olan etkisinin incelendiği bu tez çalışmasının genel sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

1. Asit ve alkali ön muameleler sonrası elde edilen biyoetanol verimleri incelendiğinde asit ön muamelesinin alkali ön muameleye göre daha etkili olduğu ve yüksek biyoetanol verimlerinin alındığı gözlenmiştir. Alınan en yüksek biyoetanol verimi 100°C sıcaklıkta 60 dakika muamele süresinde 1 N H₂SO₄ asit muamelesi sonucunda %18.52 olarak bulunmuştur. Alkali ön muamelesinde ise 100°C sıcaklık ve 60 dakika muamele süresinde en yüksek biyoetanol verimi %0.75 (w/v) KOH muamelesinde %6.11 olarak elde edilmiştir.

2. Gerçekleştirilen asit ve alkali ön muamelelerin konsantrasyonları arttıkça biyoetanol verimlerinde belli bir noktaya kadar artış sonrasında ise azalış gözlenmiştir. Bu azalışın literatür çalışmaları tarafından ortaya konan, lignin ve hemiselülozdan kimyasal muameleler sonrası ortaya çıkan furfural, hidroksimetilfurfural gibi toksik maddelerin fermantasyonu inhibe etmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

3. Uygulanan asit ve alkali ön muamelelerin süreleri arttıkça 1 N ve 5 N asit ön muameleleri sonrası biyoetanol verimlerinde artış, alkali ön muamelelerinde ise %0.75 (w/v) KOH kullanımında biyoetanol veriminde artış, %1.50 (w/v) KOH kullanımında ise biyoetanol veriminde azalış görülmüştür. %0.75'in üzeri konsantrasyonlarda bu alg türü için alkali ön muamelenin muamele süresi arttıkça fermantasyon veriminde düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir.

4. Mikroalg biyokütlesine uygulanan asit ve alkali ön muamelelerin uygulanma sıcaklıkları arttıkça biyoetanol verimlerinde artışlar ve azalışlar gözlenmiştir. Uygulanan asit ön muamelelerin belli bir sıcaklık değerine kadar yüksek biyoetanol verimlerinin alınmasını sağladığı ancak bir noktadan sonra yüksek sıcaklığın hammaddenin yapısındaki şekerleri bozduğu için alınan verimlerde düşme gözlenmiştir. Alkali ile yapılan ön muamelelerde ise %0.75 (w/v) konsantrasyonunda yapılan ön muamelenin giderek artan sıcaklıklarda da biyoetanol veriminde artışa yol açması bu konsantrasyon oranının muamele süresi ve sıcaklığı parametreleri de dikkate alınarak biyokütle için en ideal muamele konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir. Artan alkali konsantrasyonunda da hem sıcaklık değerleri arttıkça ortamdaki şekerlerin yapılarının bozulması hem de ortaya çıkabilecek toksik maddelerin fermantasyon verimlerinde düşüşe sebep olduğu düşünülmektedir.

5. Fermantasyon süresi arttıkça alınan etanol verimlerinin iki ön muamele sonucunda da arttığı görülmüştür. 24 saat ve 48 saat sonunda alınan ölçümlerden elde edilen sonuçlardan, kullanılan mikroorganizmanın 24 saat sonunda ortamdaki şekerlerin hepsini tüketmediği ve fermante etmeye devam ettiği anlaşılmıştır. Literatür çalışmalarında etanol üretiminin ilerleyen sürelerde her zaman artmadığı belirtilmiştir. Bazı özel koşullar altında da etanolün ortamdaki mikroorganizma tarafından ortamda şeker kalmaması durumunda substrat olarak tüketildiği görülmüştür. Bu nedenle hammadde besleme kontrolünün kontrollü bir şekilde yapılması gerekmektedir.

6. Algal biyoetanol üretimine yönelik ileriki çalışmalarda çeşitli enzimlerin kullanılması ile hidrolizi arttırarak daha fazla biyoetanol verimi elde edilebileceği ön görülmektedir.



KAYNAKLAR

-
- [1] Demirbas, M. F., (2011). "Biofuels from algae for sustainable development", Applied Energy, 88(10): 3473-3480.
 - [2] www.bp.com
 - [3] BP. (2014). BP statistical review of world energy, 63rd ed.,
 - [4] Önal, T., (2010). Bazı Mikroalglerin Yağ İçeriğine Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
 - [5] Dalay, M. C., İmamoğlu, E. ve Öncel, S., (2008). "Mikroalgal Biyokütle Üretimi için Düşük Maliyetli Fotobiyoreaktör Tasarımı", izmir.
 - [6] Mata, T. M., Martins, A. A. ve Caetano, N. S., (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: a review", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(1): 217-232.
 - [7] Guschina, I.A., Harwood, J.L., (2006)., "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae", Progress in Lipid Research 45, 160–186.
 - [8] Cirik S. ve Gökpınar Ş., (2006). Plankton Bilgisi ve Kültürü Ders Kitabı 4. Baskı, Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 47 Bornova/ İzmir
 - [9] Van Hal, J.W., Huijgen, W.J.J., Lopez-Contreras, A.M., (2014). Opportunities and challenges for seaweed in the biobased economy. Trends Biotechnol. 32, 231– 233.
 - [10] Atasayar, B., (2014). Akuakültürde Kullanılan Mikroalglerin Fotobiyoreaktörde Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
 - [11] Güner, H., ve Aysel, V., (1999)., The systematic of Cryptogams, (in Turkish). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 108, 249s., İzmir
 - [12] Yazıcı, K., ve Kaynak, L., (2001). Deniz Yosunlarının Organik Tarımda Kullanım Olanakları Türkiye 2. Ekolojik Tarım Sempozyumu Bildirileri 14-16 Kasım 2001.
 - [13] Sukatar, A., (2002). Alg Kültür Yöntemleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 184

- [14] Ergün, O., (2011). Su Kültüründe Yetiştirilen Kıvırcık Marul Bitkisinde Mikroalg (Chlorella Vulgaris) Uygulamasının Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [15] Vieira Costa, J.A. ve de Moraes, M.G., (2014). "An Open Pond System for Microalgal Cultivation" Biofuels From Algae, Chapter 1, Edited by Pandey, A., Lee., D, Chisti, Y. Ve Rsoccol, C., USA. 1-22.
- [16] Temli, G., (2013). Farklı Fotobiyoreaktörlerin Chlorella Vulgaris' in Büyümesine Etkisinin Araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [17] Yen, H., Hu, I., Chen, C. ve Chang, J., (2014). "Design of Photobioreactors for Algal Cultivation", Biofuels From Algae, Chapter 2, Edited by Pandey, A., Lee., D, Chisti, Y. Ve Rsoccol, C., USA. 23-46
- [18] Sukatar, A., (2002). Alg Kültür Yöntemleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 184
- [19] John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M. ve Pandey, A., (2011). "Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol", Bioresource Technology, 102(1): 186-193.
- [20] İnan, B., (2014). Alglerin Biyoetanol Üretiminde Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [21] Sason, A., (1997). Microalgal Biotechnology, XII. National Fisheries symposium, 2-5 September 2003, Elazığ-Türkiye.
- [22] Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M. ve Ardjmand, M., (2013). "Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27: 77-93.
- [23] Kaplan, M., Aydın, S. Ve Fidan, M. S. (2009). "Geleceğin Alternatif Enerji Kaynağı Biyoetanolün Önemi ve Sorgum Bitkisi", KSÜ Mühendislik Bilimleri Dergisi , 12 (1).
- [24] Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H. B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M. B., Markager, S., ... & Jensen, P. D., (2011). "Bioenergy potential of Ulva lactuca : Biomass yield, methane production and combustion", Bioresource technology, 102(3): 2595-2604.
- [25] Koçtürk, D. ve Avcioğlu, A. O., (2013). "Benzin-Biyoetanol Karışımlarının Motor Yakıtı Olarak Kullanılmasında Performans ve Ekonomikliğinin İncelenmesi", Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 30 (2): 37-44.
- [26] Kaplan, M., Aydın, S. Ve Fidan, M. S. (2009). "Geleceğin Alternatif Enerji Kaynağı Biyoetanolün Önemi ve Sorgum Bitkisi", KSÜ Mühendislik Bilimleri Dergisi , 12 (1).
- [27] Bayındırlı, C. (2007). Biyoetanol'ün Özellikleri, Otto Ve Dizel Motorlarda Alternatif Yakıt Olarak Kullanımı, Yüksek Lisans Semineri, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- [28] Ma, H., Wang, Q., Qian, D., Gong, L., Zhang, W., (2009)., The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage, *Renewable Energy*, 34: 1466–1470.
- [29] Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. ve Tiffany, D., (2006). “Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30): 11206-11210.
- [30] Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. ve Aikat, K., (2012). “Bioethanol production from agricultural wastes: An overview”, *Renewable Energy*, 37(1): 19-27.
- [31] Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S. ve Patil, S., (2014). “Bioethanol production: Feedstock and current Technologies”, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1): 573-584.
- [32] Acaroğlu, M. 2007. Alternatif Enerji Kaynakları, Genişletilmiş İkinci Baskı, Nobel Yayın Dağıtım Ltd.Şti., ISBN 978-605-395-047-9.
- [33] Ar, F.F., (2008). Biyoyakıtlar Tehdit mi-Fırsat mı?, *Mühendis ve Makina*, 49: 3-9.
- [34] Malça, J., Freire, F., (2006). Renewability and life-cycle energy efficiency of bioethanol and bio-ethyl tertiary butyl ether (bioETBE): assessing the implications of allocation. *Energy*, 31, 3362–3380.
- [35] Ilman, A.M., Scragg A.H. and Shales, S.W., (2000)., Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 631-635.
- [36] Tabil, L., Adapa, P. ve Kashaninejad, M., (2011). “Biomass feedstock pre-processing–part 1: pre-treatment”, *Biofuel’s engineering process technology*.
- [37] Coutteau, P., (1996)., *Micro-algae, Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, Food and Agriculture Organization of the United Nations 7–48.
- [38] Daşdemir, O., (2012)., *Denizel Ortamdan Bazı Mikroalg Ve Siyanobakterilerin İzolasyonu Ve Uygun Kültür Ortamının Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [39] Saut, M., Heijde, M., Mangogna, M., Montsant, A., Coesel, S., Allen, A., Manfredonia, A., Falciatore, A., Bowler, C., (2007). *Molecular Toolbox For Studying Diatom Biology In Phaeodactylum Tricornutum*. Gene.Doi:10.1016/J.Gene.2007.05.022 Golden, Co, 149p
- [40] Thomas, W.H., Seibert, D.L.R., Alden, M., Neori, A. And Eldridge, P., (1984). Yields, Photosynthetic Efficiencies And Proximate Composition Of Dense Marine Microalgal Cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum Tricornutum* Experiments. *Biomass*, 5(3): 181-209.

- [41] Harrison, P.J., Thompson, P.A., and Calderwood, G.S., (1990). Effects Of Nutrient and Light Limitation On The Biochemical Composition Of Phytoplankton. *J. Appl Phycol.*, 2: 45-56.
- [42] Sukenik, A., Carmeli, Y. And Berner, T., (1989). Regulation Of Fatty Acid Composition By Irradiance Level In The Eustigmatophyte *Nannochloropsis* Sp. *J. Phycology*, 25: 686-692.
- [43] Brown, M.R., Garland, C.D., Jeffry, S.W., Jameson, I.D. And Leroi, J.M., (1993). The Gross And Amino Acid Compositions Of Batch And Semicontinuous Cultures Of *Isochrysis* Sp., *Pavlova Lutheri* And *Nannochloropsis Oculata*. *J. Appl. Phycol.*, 5: 285-296.
- [44] Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffry, S.W., Volkman, J.K., Barrett, S.M. And Leroi, J.M., (1993). The Influence Of Irradiance On The Biochemical Composition Of The Prymnesiophyte *Isochrysis* Sp.(Clone T-Iso). *J. Appl. Phycol.*, 29(5): 601-612.
- [45] Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Goulden, C.A. And Lynn, S.G., (1997). Effects Of Nutrient Limitation On Biochemical Constituents Of *Ankistrodesmus Falcatus*. *Freshwater Biology*, 38: 591-596.
- [46] Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A. And Otero, A., (2004). The Cell Composition Of *Nannochloropsis* Sp. Changes Under Different Irradiances In Semicontinuous Culture. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 20: 31-35.
- [47] Hu, H. And Gao, K., (2006). Response Of Growth And Fatty Acid Compositions Of *Nannochloropsis* Sp. To Environmental Factors Under Elevated CO₂ Concentration. *Biotechnology Letters*, 28: 987-992.
- [48] Xu, H., Miao, X. And Wu, Q., (2006). High Quality Biodiesel Production From Microalgae *Chlorella Protothecoides* By Heterotrophic Grown In Fermenters. *Journal Of Biotechnology*, 126: 499-507.
- [49] Raghavan, G., Haridevi, C.K., Gopinathan, C.P., (2008). Growth And Proximate Composition Of The *Chaetoceros Calcitrans* F. *Pumilus* Under Different Temperature, Salinity And Carbon Dioxide Levels. *Aquaculture Research*, 39: 1053-1058.
- [50] Gouveia, L., Marques, A.E., Lopes Da Silva, T. And Reis, A., (2009). *Neochloris Oleabundans* Utex1185: A Suitable Renewable Lipid Source For Biofuel Production. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, 36: 821-826.
- [51] Zhao, Y., Yu, Z., Song, X. And Cao, X., (2009). Biochemical Compositions Of Two Dominant Bloom-Forming Species Isolated From The Yangtze River Estuary In Response To Different Nutrient Conditions. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, 368: 30-36.
- [52] Mabee, W. E., Gregg, D. J., Arato, C., Berlin, A., Bura, R., Gilkes, N., ... ve Saddler, J. N., (2006). " Updates on softwood-to-ethanol process development", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129(1-3): 55-70.

- [53] Piorreck, M., Pohl, P., (1984). Formation Of Biomass, Total Protein, Chlorophylls, Lipids And Fatty Acid İn Green And Bluegreen Algae During One Growth Phase. *Phytochemistry* 23: 217-223.
- [54] Bayrakçı, A. G., (2009), Değişik Biyokütle Kaynaklarından Biyoetanolün Elde Edilmesi Üzerine Bir Araştırma, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir
- [55] Kendirlioğlu, G., (2012) *Chlorella vulgaris*’ in Hücre Sayısı, Klorofil Miktarı ve Büyüme Hızına Aydınlanma Süresinin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ
- [56] Davis, A.R. , (1997). .Principle of Oceanography , Univ of South Florida Aquafarms, Inc, Florida, 126.
- [57] Graham, L. E., Wilcox, and L.W. (2000). *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River. Harper, J. L., and D. L. Hawksworth. (1994). Biodiversity: measurement and estimation *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 345: 5-12.
- [58] Vonshak, A., Tomaselli, L, (2000). *Arthrospira (Spirulina): systematics and ecophysiology*. In. *The Ecology of Cyanobacteria* (eds B.A. Whitton & M. Potts) 505-22. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- [59] Chundawat, S. P., Venkatesh, B. ve Dale, B. E., (2007). “Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility”, *Biotechnology and bioengineering*, 96(2): 219-231.
- [60] Balat, M. ve Balat, H., (2009). “Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel”, *Applied energy*, 86(11): 2273-2282.
- [61] Demirbaş, A., (2004). “Ethanol from cellulosic biomass resources”, *International journal of green energy*, 1(1): 79-87.
- [62] Demiriz, T., Yüksek Lisans Tezi, Bazı Alglerin Antibakteriyal Etkileri, Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Cumhur Çökmüş, Ankara (2008).
- [63] Doran-Peterson, J., Cook, D. M. ve Brandon, S. K., (2008). “Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol”, *The Plant Journal*, 54(4): 582-592.
- [64] <http://www.researchalgae.com/basic/get-to-know-chlorella.html>
- [65] Prasad, S., Singh, A. ve Joshi, H. C., (2007). “Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues”, *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1): 1-39.
- [66] Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2011). “Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion”, *Biofuels* , Edited by: Ashok Pandey, Christian Larroche, Steven C. Ricke, Claude-Gilles Dussap ve Edgard Gnansounou 149-176

- [67] Martin, C., Klinke, H. B. ve Thomsen, A. B., (2007). "Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse", *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3): 426-432.
- [68] Harun, R., Danquah, M. K. ve Forde, G. M., (2010). "Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(2): 199-203.
- [69] Harun, R., Jason, WSY., Cherrington, T. ve Danquah, MK., (2011). "Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production", *Appl Energy*, 88:3464–7.
- [70] Nguyen, MT., Choi, SP., Lee, J., Lee, JH. ve Sim, SJ., (2009). "Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production", *J Microbiol Biotechnol*, 19:161–6.
- [71] Choi, SP., Nguyen, MT. ve Sim, SJ., (2010). "Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production", *Bioresour Technol*, 101:5330–6.
- [72] Lee, S., Oh, Y., Kim, D., Kwon, D., Lee, C. ve Lee, J., (2011). "Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains", *Appl Biochem Biotechnol*, 164:878–88.
- [73] Kim, J., Um, B-H. ve Kim, T., (2012). "Bioethanol production from micro-algae, *Schizocytrium* sp., using hydrothermal treatment and biological conversion", *Korean J Chem Eng*, 29:209–14.
- [74] Khambhaty, Y., Mody, K., Gandhi, M. R., Thamby, S., Maiti, P., Brahmabhatt, H., ... ve Ghosh, P. K. (2012). "*Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol", *Bioresource technology*, 103(1): 180-185..
- [75] Meinita, M. D. N., Kang, J. Y., Jeong, G. T., Koo, H. M., Park, S. M. ve Hong, Y. K., (2012). "Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii)", *Journal of Applied Phycology*, 24(4): 857-862.
- [76] Wang, X., Liu, X. ve Wang, G., (2011). "Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation", *Journal of integrative plant biology*, 53(3): 246-252.
- [77] Yanagisawa, M., Nakamura, K., Ariga, O. ve Nakasaki, K., (2011). "Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides", *Process Biochemistry*, 46(11): 2111-2116.
- [78] Lee, H. Y., Jung, K. H. ve Yeon, J. H., (2011). "Repeated-batch operation of surface-aerated fermentor for bioethanol production from the hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*", *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(3): 323-331.
- [79] Kim, N. J., Li, H., Jung, K., Chang, H. N. ve Lee, P. C., (2011). "Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11", *Bioresource technology*, 102(16): 7466-7469.

- [80] Horn, S. J., Aasen, I. M. ve Østgaard, K., (2000). "Ethanol production from seaweed extract", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(5): 249-254.
- [81] Adams, J. M., Gallagher, J. A. ve Donnison, I. S., (2009). "Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments", *Journal of applied Phycology*, 21(5): 569-574.
- [82] Adams, J. M. M., Toop, T. A., Donnison, I. S. ve Gallagher, J. A., (2011). "Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels", *Bioresource technology*, 102(21): 9976-9984.
- [83] Ge, L., Wang, P. ve Mou, H., (2011). "Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol", *Renewable energy*, 36(1): 84-89.
- [84] Lee, S. M. ve Lee, J. H., (2012). "Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(1): 16-18.
- [85] Harun, R. ve Danquah, M. K. (2011). "Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production", *Process Biochemistry*, 46 (1): 304-309.
- [86] Scholz, M. J., Riley, M. R. ve Cuello, J. L., (2013). "Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Biomass and Bioenergy*, 48: 59-65.
- [87] Kumar, S., Gupta, R., Kumar, G., Sahoo, D. ve Kuhad, R. C., (2013). "Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach", *Bioresource technology*, 135: 150-156.
- [88] Yoon, M. H., Lee, Y. W., Lee, C. H. ve Seo, Y. B., (2012). "Simultaneous production of bio-ethanol and bleached pulp from red algae", *Bioresource technology*, 126: 198-201.
- [89] Borines, M. G., de Leon, R. L. ve Cuello, J. L., (2013). "Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp", *Bioresource technology*, 138: 22-29.
- [90] Lee J. W., Kim J. Y., Jang H. M., Lee M. W., Park J. M., (2015). "Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: Sugar recovery efficiency and structural characterization." *Bioresource technology*, 182: 296-301
- [91] Wu F. C., Wu J. Y., Liao Y. J., Wang M. Y., Shih L., (2014). "Sequential acid and enzymatic hydrolysis in situ and bioethanol production from *Gracilaria* biomass." *Bioresource technology*, 156: 126-131.
- [92] Lee J., Li P., Lee J., Ryu H. J., Oha K. K., (2013). " Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation." *Bioresource technology*, 127:119-125

- [93] Wan, C., Zhou, Y. ve Li, Y., (2011). "Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility", *Bioresource technology*, 102(10): 6254-6259
- [94] Vincent, M., Pometto III, A.L. ve van Leeuwen, J., (2014), "Ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation of sodium hydroxide treated corn stover using *Phanerochaete chrysosporium* and *Gloeophyllum trabeum*", *Bioresource Technology*, 158:1–6.
- [95] Kim H. M., Wi S. G., Jung S., Song Y., Bae H. J., (2015). "Efficient approach for bioethanol production from red seaweed *Gelidium amansii*", *Bioresource Technology*, 175: 128-134
- [96] Chirapart, A., Praiboon, J., Puangsombat, P., Pattanapon, C. ve Nunraksa, N., (2014). "Chemical composition and ethanol production potential of Thai seaweed species", *J Appl Phycol*, 26: 979–986.
- [97] Zu, S. , Li, W., Zhang, M., Li, Z., Wang, Z., Jameel, H. ve Chang, H., (2014). "Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime", *Bioresource Technology*, 152: 364–370.
- [98] Mesa, L., González, E., Cara, C., González, M., Castro, E. ve Mussatto, S. I., (2011). "The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse", *Chemical Engineering Journal*, 168(3): 1157-1162.
- [99] Hargreaves P. L. , Barcelos C. A., Augusto da Costa A. C., Pereira Jr. N., (2013)., "Production of ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of different process strategies", *Bioresource technology*, 134: 257-263.
- [100] Nouredini, H. ve Byun, J., (2010). "Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber", *Bioresource technology*, 101(3): 1060-1067..
- [101] Karimi, K., Shafiei, M. ve Kumar, R. (2013). "Progress in Physical and Chemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass", *Biofuel Technologies Recent Developments*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 53-96.
- [102] Potumarthi, R., Baadhe, R.R. ve Bhattacharya, S., (2013). "Fermentable Sugars from Lignocellulosic Biomass: Technical Challenges", *Biofuel Technologies Recent Developments*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3-28.
- [103] Carvalheiro, F., Duarte, L. C. ve Gírio, F. M., (2008). "Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments".



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Burcu ŞERBETÇİOĞLU SERT
Doğum Tarihi ve Yeri :1987-Yalova
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :burcu_nisa14@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans			
Lisans	Biyoloji	Uludağ Üniversitesi	2010
Lise	Fen Bilimleri	Fatih Sultan Mehmet Lisesi	2005

YAYINLARI

Bildiri

- Özçimen D., Şerbetçioğlu B., Enerji Bitkilerinden Biyoetanol Eldesi, YTÜ 2014 Arge Pazarı, Poster Yarışması
- Demirer B.Ö., Özçimen D., Vehapi M., Karakaş C.Y., İnan B., Akış S., Koçer A.T., Şerbetçioğlu B., Effect of Different Growth Parameters on Cell Proliferation of *Chlorella vulgaris*, BIO ENG'14 Bioengineering

Conference, Istanbul, November 2014

Proje

1. Mikroalg Üretimi ve Biyoetanol Eldesinde Değerlendirilmesi, YTÜ YULAP, 2016, No: 2015-07-04-YL03, Görevi: Araştırmacı

