

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROALGLERİN SUDAN AYRIŞTIRILMASINDA VE
BİYOETANOL ÜRETİMİNDE OZON ve ULTRASES
KULLANIMI

ÜLKER DİLER KERİŞ ŞEN
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2016

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROALGLERİN SUDAN
AYRIŞTIRILMASINDA VE BİYOETANOL
ÜRETİMİNDE OZON VE ULTRASES
KULLANIMI

ÜLKER DİLER KERİŞ ŞEN
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MİRAT D. GÜROL

GEBZE
2016

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**OZONE AND ULTRASOUND APPLICATION IN
HARVESTING OF MICROALGAE AND
BIOETHANOL PRODUCTION FROM
MICROALGAL BIOMASS**

ÜLKER DİLER KERİŞ ŞEN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MİRAT D. GUROL

GEBZE

2016



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 13/064/2016 tarih ve 2016/28 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/04/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ülker Diler KERİŞ ŞEN'in tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

Murat D. Gürol
: Prof. Dr. Mirat D. GÜROL

ÜYE

Meriç Albay
: Prof. Dr. Meriç ALBAY

ÜYE

Bülent Keskinler
: Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

ÜYE

Zehra Semra Can
: Prof. Dr. Zehra Semra CAN

ÜYE

Ahmet Karagündüz
: Prof. Dr. Ahmet KARAĞÜNDÜZ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Tez çalışmasının amacı, biyoyakıt hammaddesi olarak üretilen mikroalglerin hasat edilmesinde ve hücre içi organiklerin hücrelerden ayrıştırılmasında yenilikçi bir yaklaşım olarak ozon (O₃) ve ultrases (US) uygulamalarının hem ayrı ayrı hem de birlikte kullanılmalarının etkinliğinin belirlenmesidir. Ozonlama ile hücrelerin parçalanması ve hücre içi değerli organiklerin çözelti fazına taşınması sağlanmıştır. Biyokütledeki toplam karbonhidratın en fazla %80'inin 0,4 g O₃/g kuru-biyokütle (KB) ozon dozunda, proteinin ise en fazla %30'unun 0,3 g O₃/g KB de hasatlanabildiği görülmüştür. Bu durum ozonlamanın mikroalglerden karbonhidrat ve protein hasatında kullanılabilineceğini göstermektedir. Ancak, ozonun lipitle reaksiyona girerek ekstraksiyon verimini düşürdüğü ve bu nedenle lipit ekstraksiyonunda kullanılamayacağı tespit edilmiştir. Mikroalglerden lipit ekstraksiyonunda US uygulamalarının daha etkin bir yöntem olduğu ve özellikle US sonrası kloroform/metanol karışımının kullanılmasıyla lipit ekstraksiyon veriminin %83 oranında arttığı bulunmuştur. Ayrıca US'in lipit kompozisyonunu değiştirerek bir kısım digliseritleri, monogliseritlere dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Mikroalg hücrelerinden karbonhidrat hasatlanmasında O₃ sonrası US uygulanmasıyla karbonhidrat hasat verimi 0,15 ve 0,27 g O₃/g KB ozon dozları için sırasıyla 0,3 ve 0,2 kWh/g KB ultrases dozlarında en yüksek değer olan %80'e ulaştığı görülmüştür. Biyoetanol üretiminin ilk aşaması olarak, sadece enzim kullanılarak gerçekleştirilen ön işlem çalışmalarında, mikroalg polisakkaritlerin glikoza dönüşüm veriminin düşük olduğu görülmüştür. Ancak enzimatik hidrolize yardımcı ön işlem olarak ozon kullanıldığında glikoza dönüşüm veriminin yaklaşık 5 kat arttığı ve en yüksek dönüşüm veriminin 80 ± 8 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ozonun alkali, seyreltik asit ve US ile ön işlem yöntemlerine nazaran daha yüksek ürün verimi sağladığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, Ozon, Ultrases, Toplam Karbonhidrat ve Lipit, Hücre Parçalama, Biyoetanol.

SUMMARY

The aim of this thesis study is to investigate the effectiveness of two innovative cell disruption techniques, ozone (O₃) and ultrasound (US) applications, in disruption of microalgal cell walls for revealing its constituents to use them as biofuel feedstock. Ozone application has provided significant cell disruption and delivery of cell constituents to the solution. It was found that 0.4 g O₃/g dry weight biomass (DWB) ozone dose could harvest 80% of total carbohydrate content, whereas the maximum protein release was seen at 0.3 g O₃/g DWB ozone application. This shows that ozone application could be used for harvesting of carbohydrates and proteins from microalgae. On the other hand, it was found that ozone reacts with lipids and lowers lipid extraction efficiency, so it cannot be used for lipid extraction method. Ultrasound application, on the contrary, produced more effective results in lipid extraction by increasing the lipid extraction efficiency about 83% especially when chloroform/methanol mixture was used as extraction solvent after US application. Also, it was determined that US application altered the lipid composition by converting a part of diglycerides to monoglycerides. Application of US following ozone application to harvest carbohydrates was also investigated. The maximum carbohydrate harvesting yield was achieved for 0.15 and 0.27 g O₃/g DWB ozone and 0.3 ve 0.2 kWh/g DWB ultrasound dosage pairs, respectively. Enzymatic pretreatment was used as a first step for bioethanol production to convert the harvested microalgal polysaccharides to glucose, but the overall conversion efficiency was found to be very low. When ozone was used following the enzymatic pretreatment step, the glucose conversion efficiency increased by 5-folds and reached a maximum conversion yield of 80% ± 8. Moreover, the comparison of ozone with other pre-treatment methods (alkali, acid and US pretreatments) showed that ozone is a more effective cell disruption method when used after enzymatic pretreatment step.

Key Words: Microalgae, Ozone, Ultrasound, Total Carbohydrate and Lipid, Cell Disruption, Bioethanol.

TEŞEKKÜR

Bana birlikte çalışma imkânı veren, tüm çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe, saygı ve sevgisini esirgemeyerek yol gösteren, akademik olarak gelişmemi sağlayan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Mirat D. GÜROL'a

Akademik camiaya katılmamı sağlayan bilgi ve tecrübesinden yararlanma imkânı vererek bu yolda ilerlememi sağlayan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Bülent KESKİNLER'e

Tez izleme komitemde yer alarak beni onurlandıran bilgi ve desteğini sonsuz bir şekilde benimle paylaşan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Meriç ALBAY'a

Deneyisel çalışmaların yürütülmesi ve analizlerin ölçülmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK ÇAYDAG'a (109Y296 Nolu proje),

Tüm akademik hayatım boyunca her daim saygı, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, moral desteği ile her daim yanımda olan ve mücadeleyi bırakmama izin vermeyen ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yanımda olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Ahmet KARAGÜNDÜZ ve Doç. Dr. M. Salim ÖNCEL'e

Deneyisel çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve uzayan gece mesailerinde yanımda olan sevgili arkadaşım Gülfem SOYDEMİR'e,

Doktora maratonum boyunca yanımda olan pozitif enerjileri ile beni mutlu eden, yılmadan yolumda yürümemde büyük destekleri olan sevgili arkadaşlarım Dr. Pınar KARAGÖZ, Doç. Dr. Derya İMER ve Doç. Dr. Elif İNCE ve İnci TÜRK'e

Hayatım boyunca yanımda olan, sevgi ve saygılarını esirgemedi önüme seren, büyük bir manevi güçle beni destekleyen, başarılı bir bilim insanı olacağıma dair inançlarını asla kaybetmeyen, sevgili aileme

Güler yüzü ile her daim motivasyon kaynağım olan, sevgi, saygı ve deneyimlerini benimle sonsuz bir şekilde paylaşan, her sıkıntılı anımda elimden tutan, yol gösteren destek veren sevgili eşim Ünal ŞEN'e

Varlığıyla beni dünyanın en mutlu insanı yapan, sonsuz sevgi ile bağlı olduğum canım oğlum M. Nogay ŞEN'e

Son olarak bana inanan ve göstermiş oldukları desteklerinden dolayı tüm akraba ve arkadaşlarıma...

En içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Mikroalglerin Üretimi ve Hasatlanması	4
2.1.1. Mikroalg Üretimi	4
2.1.1.1. Mikroalglerin Lipit İçeriği	6
2.1.1.2. Mikroalglerin Karbonhidrat İçeriği	7
2.1.1.3. Diğer Hücresel Bileşenler	11
2.1.1. Mikroalglerin Hasatlanması	11
2.1.2.1. Geleneksel Hasatlama Yöntemleri	12
2.1.2.2 Mikroalglerin Hasatlanmasında Ozon Kullanımı	15
2.1.2.1 Mikroalglerin Hasatlanmasında Ultrases Kullanımı	17
2.2. Lipit Ekstraksiyonu ve Biyodizel Üretimi	18
2.2.1. Lipit Ekstraksiyonu	18
2.2.2. Biyodizel Üretimi	23
2.3. Fermentasyon ve Biyoetanol Üretimi	25
2.3.1. Biyokütlenin Ön Arıtımı	26
2.3.1.1. Fiziksel Yöntemler	27
2.3.1.1.1. Hidrotermal Ön Arıtım	27
2.3.1.1.2. Ultrases ile Ön Arıtım	28
2.3.1.2. Kimyasal Yöntemler	29

2.3.1.2.1. Asit ile Ön arıtım	29
2.3.1.2.2. Alkali ile Ön Arıtım	30
2.3.1.2.3. Karbondioksit Patlaması	32
2.3.1.2.4. Ozon ile Ön arıtım	33
2.3.1.3. Biyokimyasal Yöntemler	34
2.3.1.3.1. Enzimatik sakkarifikasyon	34
2.3.2. Biyoetanol Üretimi	35
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Mikroalglerin Üretimi	37
3.2. Mikroalglerin Hasatlanması	39
3.2.1. Mikroalglerin Hasatlanmasında Ozon Kullanımı	39
3.2.1.1. Ozon Üretimi ve Ozon Reaktörü	40
3.2.1.2. Etkin Ozon Dozu Belirleme	42
3.2.1.2.1. Düşük Dozda Ozon Kullanımı	43
3.2.1.2.2. Yüksek Dozda Ozon Kullanımı	43
3.2.2. Ultrases Çalışmaları	44
3.2.3. Ozonlama Sonrası Ultrases Kullanım Çalışmaları	46
3.3. Lipit Ekstraksiyonu	48
3.3.1. Biyokütleden Lipit Ekstraksiyonu (Bligh and Dyer Metodu)	48
3.3.2. Mikroalg Çözeltilisinden Lipit Ekstraksiyonu (Gravimetrik)	50
3.3.3. Ultrases Destekli Lipit Ekstraksiyonu	51
3.4. Mikroalgal Biyokütlenin Fermentasyon Öncesi Ön Arıtımında Uygulanan Yöntemler	52
3.4.1. Ozon ile Ön Arıtım	50
3.4.2. Ultrases ile Ön arıtım	54
3.4.3. Seyreltik Asit ile Ön Arıtım	54
3.4.4. Alkali ile Ön arıtım	55
3.4.5. Enzimatik Hidroliz	55
3.5. Analitik Metotlar	56
3.5.1. Kimyasal Analizler	56
3.5.2. GC Analizi	56
3.5.3. HPLC Analizi	57
3.5.4. Ozon Dozu Ölçümü	58

3.5.5. Fiziksel Analizler	58
3.5.5.1. AKM Analizi	58
3.5.5.2. Optik Yoğunluk Analizi	58
3.5.5.3. Çökme Testi	59
3.5.5.4. FAR Ölçümü	59
3.5.5.5. Mikroskobik Analizler	59
3.5.6. İstatistiksel Analizler	59
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	61
4.1. Mikroalgal Biyokütle Üretimi	61
4.2. Mikroalglerin Hasatlanması Ozon Kullanımı	65
4.2.1. Etkin Ozon Dozu Belirleme	65
4.2.1.1. Düşük Dozda Ozonlama Çalışmaları	65
4.2.1.2. Yüksek Dozda Ozonlama Çalışmaları	69
4.3. Ultrases Çalışmaları	76
4.3.1. Ultrases Destekli Lipit Ekstraksiyonu	81
4.4. Ozonlama Sonrası Ultrases Kullanım Çalışmaları	85
4.5. Mikroalgal Biyokütlenin Fermentasyon Öncesi Ön Arıtımında Uygulanan Yöntemler	94
4.5.1. Ozon ile Ön Arıtım	94
4.5.2. Ultrases ile Ön arıtım	98
4.5.3. Seyreltik Asit ve Alkali Ön arıtım	99
5. SONUÇLAR ve YORUMLAR	102
5.1. Mikroalgal Biyokütle Üretimi ve Biyokütlenin Temel Bileşenleri	102
5.2. Mikroalglerin Hasatlanması ve Biyokütlenin Parçalanması Çalışmaları	102
5.3. Mikroalgal Biyokütlenin Fermentasyon Öncesi Ön Arıtımı Çalışmaları	106
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	124
EKLER	125

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kisaltmalar</u>	
O ₃	: Ozon gazı
a/h	: Ağırlık-hacim oranında
h/a	: Hacim-ağırlık oranında
h/h	: Hacim-hacim oranında
dev/dk	Devir/dakika
dk	Dakika
sp.	: Türlerinden herhangi biri (<i>species</i>)
AKM	: Askıda katı madde
BAEA	: Biyolojik arıtılmış evsel atıksu
KB	: Kuru biyokütle
KBB	: Kuru biyokütle bazında
K/M	: Kloroform/metanol
KOİ	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
O ₃ /US	: Ultrases destekli ozon
OY	: Optik yoğunluk
OY ₆₈₄	: 684 nm dalga boyundaki optik yoğunluk
TKB	: Toplam karbonhidrat bazında
TLB	: Toplam lipit bazında
US	: Ultrases
YAME	: Yağ asidi metil esteri

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Trigliseritlerin transesterifikasyonu (genel reaksiyon).	22
2.2: Fermentasyonla etanol üretim süreci.	35
3.1: Ozonlama deney düzeneği (şematik).	41
3.2: Ozonlama deney düzeneği.	42
3.3: Ultrases deney düzeneği (şematik).	43
3.4: Ultrases deney düzeneği.	43
3.5: Kurutulan ve toz haline getirilen mikroalg biyokütlesi a) BG11 besin ortamında yetiştirilen, b) atıksuda yetiştirilen.	46
3.6: Biyokütlenin ozonla ön arıtımında kullanılan deney düzeneği	53
4.1: 100 kat büyütmede a) karışık kültüre, b) BG11'de baskın hale gelen <i>Chlorococcum</i> sp.'ye c) atıksuda baskın hale gelen <i>Secenedesmus</i> sp. 'ye ait mikroskop görüntüsü.	62
4.2: Düşük ozon dozlarında (a) 0,01, b) 0,01, c) 0,02, d) 0,03 g O ₃ /g KB) çözeltide ve süzüntüde karbonhidrat miktarının değişimi.	66
4.3: Düşük ozon dozlarında (a) 0,01, b) 0,01, c) 0,02, d) 0,03 g O ₃ /g KB) çözeltide ve süzüntüde protein miktarının değişimi.	67
4.4: Düşük ozon dozlarında (a) 0,01, b) 0,01, c) 0,02, d) 0,03 g O ₃ /g KB) çözeltide ve süzüntüde KOİ miktarının değişimi.	68
4.5: Mikroalg hücresi başına uygulanan ozon miktarının artmasına bağlı olarak çözeltideki renk değişimi: a) 0,05, b) 0,1, c) 0,2, d) 0,3, e) 0,4 g O ₃ /g KB.	70
4.6: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O ₃ /g KB) AKM değişim.	71
4.7: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O ₃ /g KB) çözeltide ve süzüntüde karbonhidrat değişimi.	72
4.8: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O ₃ /g KB) çözeltide ve süzüntüde protein değişimi.	73
4.9: Artan ozon dozuna bağlı olarak biyokütlerdeki ve süzüntüdeki lipid değişimi.	74
4.10: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O ₃ /g KB) çözeltide ve süzüntüde	75

KOI değişimi.

4.11:	Farklı ultrasonik enerji yoğunlukları için a) BG11 ve b) BAEA besi ortamlarında yetişen mikroalg kültürlerine ait süzüntü numunelerindeki karbonhidrat ve protein konsantrasyonlarındaki değişim.	77
4.12:	Farklı ultrasonik enerji yoğunlukları için BG11 ve BAEA besi ortamlarında yetişen mikroalg süspansiyonlarında meydana gelen karbonhidrat hasatlama verimleri.	78
4.13:	Farklı ultrasonik enerji yoğunlukları için a) BG11 ve b) BAEA besi ortamlarında yetişen mikroalg süspansiyonlarında meydana gelen AKM ve optik yoğunluk değişimi.	80
4.14:	Ultrases sonrası doğrudan solvent eklenmesiyle mikroalg süspansiyonunda meydana gelen lipid değişimi.	83
4.15:	Ultrases sonrası, solvent ilavesi öncesinde santrifüj uygulamasıyla mikroalg çözeltilerinde meydana gelen lipid değişimi.	84
4.16:	Değişen ozon dozları sonrası uygulanan farklı ultrases dozları için karbonhidrat hasatlama verimleri.	88
4.17:	Değişen ozon dozları sonrası uygulanan farklı ultrases dozları için lipid hasatlama verimleri.	89
4.18:	Değişen ozon dozları için toplam lipid miktarındaki değişim.	90
4.19:	Karbonhidrat ayırıştırma verimleri için a) ozon dozu-ultrases yoğunluğu, b) ultrases süresi - ultrases yoğunluğu ve c) ozon dozu-ultrases süresi karşılaştırmalı yüzey cevap grafikleri.	93
4.20:	Sadece enzim ve ozon sonrası enzim uygulamalarından elde edilen glikoz verimlerinin 0,5 g O ₃ /g KB ozon dozu için farklı enzim dozlarında karşılaştırılması	95
4.21:	Farklı ozon dozları için ozon sonra enzim uygulaması için 1,2 mL/g KB enzim dozunda glikoz verimlerinin karşılaştırılması.	96
4.22:	Enzimatik hidroliz süresinin ve biyokütle konsantrasyonunun ozon sonra enzim uygulaması için 1,2 mL/g KB enzim dozunda glikoz verimi üzerindeki etkisi.	97
4.23:	Ultrases (1,6 kWh/g KB) sonrası, enzim konsantrasyonlarının artırılmasıyla elde edilen glikoz verimleri.	98
4.24:	Asit ve alkali ön arıtım sonrası enzim uygulamasından elde edilen glikoz	100

verimlerinin 1,2 mL/g KB enzim dozu için karşılaştırılması.

- 4.25: Ozon, ultrases, alkali ve seyreltik asit ön arıtım metotları sonrası enzim uygulamasından ve sadece enzim kullanılarak elde edilen glikoz 101 verimlerinin 1,2 mL/g KB enzim dozu, 10 g/L biyokütle konsantrasyonu ve 4 saatlik enzimatik hidroliz süresi için karşılaştırılması

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Temel karbonhidrat formları.	8
2.2: Mikroalg türüne bağlı olarak karbonhidrat, glikoz içerikleri ve biyoetanol dönüşüm oranları.	10
3.1: BG11 sentetik kültür ortamının içeriği.	37
3.2: Atıksuya ait parametreler ve değerleri.	39
3.3: Deneysel tasarım yöntemi için kullanılan parametrelerin seviye değerleri.	45
4.1: Çalışmada kullanılan mikroalg kültürlerinin karbonhidrat, lipit ve protein içeriklerinin diğer çalışmalarla karşılaştırılması.	64
4.2: Ultrases destekli lipit ekstraksiyonu için uygulanan deney tasarımı.	82
4.3: Uygulanan Box-Behnken deneysel tasarımı.	86
4.4: Box-Behnken deneysel tasarımına göre elde edilen deney sonuçları ve hesaplanan yüzde hasatlama verimleri.	87
4.5: Box-Behnken tasarımıyla elde edilen denklemler için ANOVA analizi sonuçları.	91
4.6: Model katsayılarına ait anlamlılık analizi.	92

1. GİRİŞ

Kömür, petrol ve doğalgaz gibi fosil yakıtlar günümüzde başlıca enerji kaynağı olarak kullanılmakla birlikte kısıtlı rezervlere sahiptirler. Aynı zamanda, bu yakıtların kullanımı sırasında atmosfere salınan yüksek orandaki emisyonlar hem çevre kirliliğine hem de küresel iklim değişimine neden olmaktadır. Günümüzde etkileri her geçen gün daha da fazla hissedilen iklim sorunları, küresel iklim değişikliğinin tüm dünyayı etkisi altına aldığını açık bir şekilde göstermektedir. Bu kapsamda, en sonuncusu geçtiğimiz yıl Paris'te gerçekleşen Küresel İklim Değişikliği Konferansı'nda yer kürenin ortalama sıcaklık artışının 2030 yılına kadar 1,5 ile 2 °C arasında sınırlandırılması için, özellikle fosil yakıtlardan kaynaklanan sera gazı salınımlarını düşürücü önlemler konusunda tüm ülkeleri bağlayıcı kararlar alınmıştır. Alınması planlanan önlemlerin başında da fosil yakıtlara alternatif olarak daha çevreci ve yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımının artırılması gelmektedir.

Günümüzde kullanılan başlıca yenilenebilir enerji kaynakları hidrolik, güneş, rüzgâr, biyokütle, dalga ve jeotermal enerji kaynaklarıdır. Kullanım alanları daha sınırlı ve kısıtlı olan hidrolik enerjiye oranla daha yüksek üretim potansiyeline sahip olan güneş, rüzgâr ve biyokütle enerjisi kaynakları üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle rüzgâr ve güneş enerjisine kıyasla daha az yatırım ve işletme masrafına, küresel karbon dengesini düzenleyici bir role ve yakıt olarak daha kolay kullanılabilme imkânına sahip olan biyokütle enerjisi son yıllarda büyük bir gelişme göstermiştir. Günden güne artan sayıda gelişmiş veya gelişmekte olan ülke biyoyakıtları dış kaynaklı petrol ihtiyacını azaltmada, başta karbondioksit ve metan olmak üzere sera gazı emisyonlarını düşürmede ve çevreyi koruma hedeflerini tutturmada umut vaat eden bir çözüm yolu olarak görülmektedir.

Biyodizel ve biyoetanol gibi biyolojik kökenli ve yenilenebilir yakıtlar bu arayışta oldukça önemli yer tutmaktadır. Bu doğrultuda öncelikle çeşitli tarla bitkileri (şeker pancarı, soya, kanola, mısır vb.) biyodizel ve biyoetanol üretimi için hammadde olarak kullanılmıştır. Birinci nesil biyoyakıtlar olarak da adlandırılan bu yakıtlar dolaylı olarak bu tür enerji bitkilerinin üretim ölçeğinde hızlı ve kontrolsüz bir artışa neden olmuştur. Bu da gıda kaynağı olarak kullanılan diğer tarla bitkileriyle ekim alanı açısından bir rekabet oluşmasına ve sonuçta küresel bir gıda krizine yol

açabilir. Ayrıca bu aşırı orandaki tarım faaliyetleri su kaynaklarının azalmasına, ormanlık alanların tahrip edilmesine ve erozyonla toprak kayıplarına sebep olabilir. Birincil nesil biyoyakıtlar artık bu noktadan sonra çözüm olmaktan çıkmış ve bir sorun niteliği kazanmıştır. Bu sorunu çözmek amacıyla doğrudan tarım bitkilerini kullanmak yerine, özellikle tarım ürünlerinin işlenmesi sonucu ortaya çıkan, lignoselülozik atıkların fermentasyonu yoluyla biyoetanole dönüştürülmesine dayanan ikinci nesil biyoyakıt teknolojileri geliştirilmeye başlanmıştır. Ancak halen teknolojik ve ekonomik açıdan yeterli düzeye gelmesi için yoğun araştırma ve geliştirmeye ihtiyaç duyan ikinci nesil biyoyakıtlar, fosil yakıtlara alternatif olmaktan uzaktır [Brennan and Owende, 2010].

Son yıllarda, üçüncü nesil biyoyakıt teknolojisi olarak da adlandırılan ve doğada yer alan çeşitli alg türlerini birer enerji kaynağı olarak kullanmayı hedefleyen çalışmalar büyük bir artış göstermiştir. Mikroalgal biyoyakıt üretimi genelde proses bazlı zorluklardan dolayı teknolojik olarak henüz gelişme aşamasında olmakla birlikte umut vaat eden bir yöntemdir. Karasal bitkilere kıyasla yüksek yağ ya da karbonhidrat biriktirme kabiliyetine sahip olan ve yüksek fotosentetik verime ulaşan türlerin varlığı mikroalgleri biyoyakıt üretimi için ilgi çekici kılmaktadır. Fotosentez yapmak amacıyla atmosferdeki sera gazlarından biri olan karbondioksiti özümseyen algler, bu özellikleri nedeniyle küresel ısınma problemine çözüm üretebilecek bir alternatif olarak görülmektedir. Bundan dolayı mikroalg kaynaklı biyoyakıtlar “karbon-dostu” olarak da nitelendirilmektedir. Ayrıca üretimi sırasında doğal ekosistem üzerinde karasal enerji bitkileri gibi büyük bir tehlike oluşturmeyen mikroalgler, doğadaki azot ve fosfor gibi kirleticileri atık su arıtımı yoluyla giderme avantajı da sağlayabilirler.

Mikroalglerden üretilen üçüncü nesil biyoyakıtların artan küresel enerji ihtiyacına cevap verilebileceği düşünülmektedir. Öte yandan, ticari ölçekte mikroalg kaynaklı biyoyakıt üretiminin önünde halen çözülmeyi bekleyen pek çok engel bulunmaktadır. Özellikle üretilen mikroalg biyokütlesinin hasatlanması aşaması biyoyakıt üretim maliyetini en çok arttıran unsurdur. Hasatlama işlemi sırasında, mikroalg hücre duvarlarının etkili ve düşük maliyetli bir yöntemle parçalanarak hücre içi değerli materyalin (lipitler, karbonhidrat, vb.) bir sonraki biyoyakıt dönüşüm aşaması için kullanılabilir hale getirilmesi şu sıralar büyük ölçekli

mikroalgal biyoyakıtların üretimi konusunda aşılması gereken bir zorluktur [Christenson and Sims, 2011].

1.1. Amaç ve Kapsam

Bu tez çalışmasının amacı biyoyakıt hammaddesi olarak üretilen mikroalglerin hasatlanması sırasında yenilikçi bir yaklaşım olarak ozonlama ve ultrases uygulamalarının kullanılabilirliğini incelemektir.

Literatür incelendiğinde mikroalglerin sudan ayrıştırılması ve parçalanması amacıyla çeşitli yöntemlerin kullanıldığı ancak hücre parçalamada etkinliği bilinen ozon ve ultrases kullanımının yeterli düzeyde incelenmediği görülmektedir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen tez çalışmasının birinci aşamasında, literatürde yer alan çalışmalardan farklı olarak mikroalglerin hasatlanmasında ve hücrelerden değerli organik madde elde edilmesinde ozon gazının kullanımı araştırılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında ise yine yenilikçi bir yöntem olan ultrases kullanılarak mikroalglerin hasatlanması ve hücre içi materyalin hücre dışına taşınması üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının bir sonraki aşamasında ozon gazı ve ultrases uygulamalarının birlikte kullanılmasının ortak etkisi incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ışığında, tez çalışmasının son aşamasında ise mikroalglerin yine ozon gazı ve ultrases kullanılarak parçalanmasının, biyoetanol üretiminin en önemli basamağı olan hidroliz basamağının hızlandırılması ve enzimatik sakkarifikasyon süreci üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mikroalglerin Üretimi ve Hasatlanması

2.1.1. Mikroalg Üretimi

En eski yaşam formlarından biri olan algler, kök, gövde, yaprak gibi organları bulunmayan, fotosentetik pigment içeren ilkel bitkiler olarak değerlendirilmektedir. Mikroalgler prokaryot (siyanobakteri) ya da ökaryot (yeşil algler, kırmızı algler, diatomlar) olarak farklı hücre yapısında bulunmaktadır. Enerji kaynağı olarak güneş enerjisini kullanan mikroalgler, karbon kaynağına göre, inorganik karbonu kullananlar otorotrofik, organik karbonu kullananlar heterotrofik, ortamda organik karbon olmaması durumunda inorganik karbonu kullananlarsa miksotrofik türler olarak tanımlanan ve fotosentezle yaşamlarını devam ettiren basit canlılardır [Lee, 1980]. Mikroalg hücreleri karbonhidrat, protein, lipit ve pigmentlerden meydana gelmektedir. Bu biyomoleküllerin yapısı ve yüzdesi, mikroalg türüne ve mikroalglerin yetiştirildiği ortama bağlı olarak değişim gösterebilmektedir [Gatenby et al., 2003; Branyikova et al., 2011; Schlagermann et al., 2012]. Karasal bitkilere kıyasla yüksek yağ (*Botryococcus braunii*, vb.) ya da karbonhidrat (*Spirulina fusiformis*, vb.) biriktirme kabiliyetine sahip olan ve yüksek fotosentetik verime ulaşan türlerin varlığı, mikroalgleri biyoyakıt üretimi için ilgi çekici bir hammadde haline getirmektedir. Küresel ısınmaya neden olan en önemli sera gazlarında biri olan karbondioksitin mikroalgler tarafından kullanılması dolayısıyla mikroalglerden elde edilen biyoyakıtlar “karbon dostu” olarak nitelendirilmektedirler.

Mikroalglerin üretimini ışık, sıcaklık, besin konsantrasyonu, oksijen, karbondioksit, pH, tuzluluk ve toksik kimyasallar gibi çevresel faktörlerin yanı sıra ortamdaki patojen mikroorganizmaların (bakteriler, mantarlar, virüsler) varlığı ve diğer mikroalglerle rekabet edebilme durumu gibi biyolojik faktörler etkilemektedir [Williams, 2002].

Mikroalglerin kontrollü şartlar altında üretilmesine imkân sağlayan ve çeşitli konfigürasyonlarda tasarlanan kapalı sistem fotobiyoreaktörlerin, mikroalg üretimi için gerekli ışık yoğunluğunun açık havuzlara nazaran daha iyi sağlanabilmesi, sabit

sıcaklıkta işletilebilmesi, besi ortamının takibinin kolay olması ve düşük hacimde yüksek biyokütle konsantrasyonu ve bekleme süresin kısa olması gibi pek çok avantajı bulunmaktadır. Kesikli ya da sürekli modda çalıştırılabilen bu sistemlerde 1-500 g/m²·gün biyokütle konsantrasyonuna ulaşılabilir [Judd et al., 2015]. Ancak açık sistemlere kıyasla teknik açıdan daha komplike olması, reaktörlerin ışık alan yüzeylerine alg tutunması sonucu sistemin ışık geçirgenliğinin azalması, biyolojik kirlenmenin meydana gelmesi, oksijen birikimi, reaktör temizliğinin kolay olmaması, enerji gereksiniminin fazla olması, yüksek işletim maliyetleri ve yetişmiş personel ihtiyacının gerekliliği gibi bir çok dezavantajı barındırmaktadır [Williams 2002; Mata et al., 2010].

Açık sistem parkurlu havuzların, kapalı fotobiyoreaktörlere nazaran en büyük avantajı düşük ilk yatırım ve işletme maliyetinin yanı sıra kalifiye eleman ihtiyacının olmamasıdır. Açık sistemlerin en büyük dezavantajlarından biri, doğa şartlarına karşı korumasız olan bu sistemlerde, üretilmesi planlanan mikroalg türü dışında, farklı mikroalg türleri veya istilacı bir yapıya sahip protozoa gibi mikroorganizmalar ile sistemin kontamine olmasıdır. Ayrıca havuz içinde karışımın ve aydınlanmanın yeterli düzeyde sağlanamaması durumunda biyokütle üretiminin yaklaşık olarak 10-25 g/m²·gün ile sınırlı kaldığı belirtilmektedir [Shen et al., 2009; Brennan and Owende, 2010; Judd et al., 2015].

Mikroalg üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri de mikroalglerin yetiştirileceği su ve besi ortamıdır. Mikroalgler yaşamlarını devam ettirebilmek için, karbon ve ışık kaynağının yanı sıra azot, fosfor gibi ana besin maddelerine ve iz elementlere (sülfat, magnezyum, potasyum, vb.) ihtiyaç duymaktadırlar [Rippka et al., 1979]. Mikroalg yetiştiriciliğinde araştırma ve geliştirme çalışmaları kapsamında gübre ve şebeke suyu kullanımı makul karşılanırken büyük ölçekli üretiminde, kullanılacak kaynakların çevre üzerinde minimum etki göstermesi ve ekonomik olması gerektiği belirtilmektedir. Bu doğrultuda atıksuda mikroalg üretiminin ekonomik bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir. Atıksu içindeki çeşitli mikroorganizmaların, mikroalglerle rekabete girmesi ya da mikroalgleri besi olarak kullanması önemli bir problemdir [Menon and Mehta, 2013]. Bu nedenle atıksuyun ön arıtımı sağlandıktan sonra mikroalg üretiminde kullanıldığını gösteren çeşitli çalışmalar literatürde yer almaktadır [Chinnasamy et al., 2010; Ruiz-Marin et al., 2010]. Bu çalışmalardan birinde, ikincil atımından geçirilmiş evsel atıksuda, 20 farklı

mikroalg türünün yetiştirilmesi incelenmiş, azot ve fosfor giderimlerine bağlı olarak biyokütle kompozisyonlarındaki değişim izlenmiştir. Model olarak seçilen türlerin %80'inin ikincil arıtılmış atıksuda yaşayabildiği ve lipid sentezinin artması açısından en verimli türün kuru biyokütle bazında (KBB) %36 lipid içeriği ile *Botryococcus braunii* olduğu bildirilmiştir [Sydney et al., 2011]. Biyolojik olarak arıtılmış evsel atıksu ortamında karışık mikroalg üretimi ve üretilen mikroalglerin biyoyakıt olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada *Scenedesmus* türü mikroalglerin zaman içinde baskın hale geldiği görülmüştür. Çalışmada biyolojik arıtılmış atıksu kullanılmasıyla N, P eksikliğinde mikroalglerin strese sokularak lipid biriktirmeye zorlandığı ve bu sayede lipid içeriğinin %27 (KBB) olduğu raporlanmıştır [Gürol, 2013].

2.1.1.1. Mikroalglerin Lipit İçeriği

Lipitler, biyolojik orijinli moleküller olup suda çok az ancak polar olmayan solventlerde tamamen çözünürler. Lipitler temel olarak; yağ asitleri, triağılgliceroller, fosfolipidler, sphingolipidler ve steroidler olarak sınıflandırılabilirler. Yağ asitleri, dallanmamış zincir yapısında ve zincirin sonunda karboksil grubu bulunan hidrokarbonlardır. Molekülde, karbon-karbon arasında tek bağ bulunuyorsa doymuş (lauric, palmitic, stearic, vb.), çift bağ bulunuyorsa doymamış (oleic, linoleic, linolenic, arachidonic, vb.) yağ asidi olarak tanımlanır. Yağ asitlerinin hem fiziksel hem de fizyolojik özellikleri karbon zincirinin uzunluğuna ve moleküldeki çift bağların sayısına (yağ asidinin doymamışlık derecesine) bağlı olarak değişir ve genellikle trigliserid ya da gliserol yapısında yer alırlar. Moleküldeki yağ asidi sayısına bağlı olarak trigliserid, digliserid veya monogliserid olarak adlandırılan yağ asitleri, biyodizel sentezinde kullanılmaktadırlar. Mikroalgal yağ asitleri genellikle 12-22 karbonlu, doymuş ya da doymamış formda bulunmaktadırlar. Mikroalg türüne bağlı olarak hücre bünyesindeki lipid miktarının kuru biyokütle bazında (KBB) %77'ye (*Schizochytrium* sp.) kadar çıkabildiği belirtilmiştir [Metting, 1996]. Mikroalglerin yetiştirilme koşulları da hücre bünyesindeki lipid miktarını önemli derecede etkilemektedir. *Chlorella vulgaris* türü mikroalglerin yetiştirildikleri ortamdan azotun alınması (nitrogen starvation) durumunda lipid sentezinin %18'den %40'a (KBB) çıktığı belirtilirken, yine *Chlorella protothecoides* türü mikroalglerin

kullanıldığı bir başka çalışmada besi ortamındaki azot ve fosforun azaltılması durumunda, hücrelerin lipit sentezin, azot ve fosforun birlikte ortamdaki alınmasıyla %55,8'e (KBB) çıktığı sadece azot eksikliğinde ise %52,5 (KBB) lipit sentezinin gerçekleştiği belirtilmektedir [Illman et al., 2000; Li et al., 2014]. Ayrıca, mikroalgin hasatlama evresine bağlı olarak mikroalg bünyesindeki lipit çeşitlerinin (nötral ve polar lipitler) de değişim gösterdiği bildirilmektedir [Branyikova et al., 2011]. Aynı mikroalg türü için polar lipit sentezinin, logaritmik faza nazaran durgun fazda daha az sentezlendiği görülmüştür [Dunstan et al., 1993; Halim et al., 2012]. Mikroalgal lipit bileşimleri de yine türden türe farklılık gösterebilmektedir. Francisco ve arkadaşları, (2010) farklı mikroalg türlerine ait lipit miktarları ve lipit bileşimlerini inceledikleri çalışmada, *Chlorella vulgaris*'in %27 (KBB) lipit içerdiğini, bu lipitin %46,3'ü doymuş, %53,6'sının doymamış yapıda bulunduğunu raporlamıştır. Yine aynı çalışmada, *Scenedesmus obliquus*'un toplam lipit içeriğinin %14,1 (KBB), doymuş yağ asidi miktarının toplam lipidin %48,1, doymamış yağ asidi ise %51,8 oranında bulunduğu, *Dunaliella tertiolecta* ve *Phaeodactylum tricornutum* için lipit içeriklerinin sırasıyla %17,1 ve %6,3 (KBB) olduğu tespit edilmiştir. Biyodizel üretimine en uygun türün çalışılan türler arasında yüksek lipit içeriği nedeniyle *Chlorella vulgaris* olduğu belirtilmiştir [Francisco et al., 2010].

2.1.1.2. Mikroalglerin Karbonhidrat İçeriği

Karbonhidratlar, karbon, hidrojen ve oksijenden oluşan ve ampirik formülü $C_m(H_2O)_n$ olarak verilen biyolojik moleküller olup mikroorganizma bünyesinde monomerik ya da polimerik yapıda bulunabilir (Tablo 2.1) [FAO, 1998]. Hücrede metabolik ve yapısal fonksiyonlara hizmet etmekte olan karbonhidratlar, fotosentezin ilk ürünü olarak diğer biyokimyasalların sentezi için başlangıç noktasını oluşturmaktadırlar. Mikroalg hücrelerinde, hücre duvarında selüloz ve hemiselüloz, hücre içinde ise genellikle nişasta formunda yer alırlar.

Tablo 2.1: Temel karbonhidrat formları.

Sınıf (polimerizasyon derecesi)	Alt grup	Bileşenler
Şekerler (1-2)	Monosakkaritler	Glikoz, galaktoz, fruktoz, xylose
	Disakkaritler	Sucroze, laktoz, maltoz, trihaloze
	Pollyoller	Sorbitol, mannitol
Oligosakkaritler (3-9)	Malto-oligosakkaritler	Maltodextrinler
	Diğer ligosakkaritler	Raffinose, stachyose, frukto-oligosakkaritler
Polisakkaritler (>9)	Nişasta	Amiloze, amilopektin
	Nişasta dışı polisakkaritler	Selüloz, hemiselüloz, pektinler, hidrokolloidler

Mikroalg türüne ve yetiştirilme koşullarına bağlı olarak hücre tarafından sentezlenen karbonhidrat türü ve miktarı değişim gösterebilmektedir. *Tetraselmis suecica* türü mikroalgin %11-47 (KBB) arasında değişen oranlarla amilaz ve amilopektin içeren nişastayı ürettiği [Williams and Laurens, 2010], *Chlorococcum* türü mikroalglerin ise toplam karbonhidrat bazında (TKB) %32,5'nin selüloz ve hemiselüloz yapısında olduğu [Harun and Danquah, 2011a] raporlanmıştır. Mikroalglerin yetiştirildikleri ortamın hücre tarafından sentezlenen karbonhidrat miktarındaki değişimlerin izlendiği çalışmaların birinde model olarak *Chlorella* türü mikroalg kullanılmıştır. Çalışmada ışık yoğunluğunun $215 \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ olduğu durumda kuru kütle bazında nişasta ihtivasının %8,5 (KBB) olduğu gözlemlenirken, ışık yoğunluğunun $330 \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ 'ye çıkarılması ile nişasta içeriğinin %40'a (KBB) ulaştığı görülmüştür [Branyikova et al., 2011]. Ayrıca, karbonhidrat sentezinin en çok logaritmik fazın hemen öncesinde sağlandığı [Ho et al., 2013], hücrelerin bölünmeye başlamasıyla karbonhidrat sentezinin %45'ten %13'e (KBB) hızla düştüğünü belirtilmiştir [Branyikova et al., 2011]. Aynı çalışmada besin ortamından sülfürün alınmasıyla mikroalglerin nişasta içeriğinin %60'a (KBB) ulaştığı rapor edilmiştir. *Scenedesmus obliquus* CNW-N isolatı kullanılarak karbonhidratça zengin mikroalg üretimi amaçlandığı bir çalışmada mikroalglerin sürekli ve yarı sürekli olarak yetiştirilmeleriyle, hücre büyümesi, karbondioksit tutma kapasitesi ve karbonhidrat sentezlemesinin değişimi incelenmiştir. Sistemin yarı sürekli

alıştırılması ile karbondioksit tutma hızının (1,55 g/L·gün) ve karbonhidrat sentezinin (0,47 g/L·gün) en yüksek değere ulaştığı raporlanmıştır [Ho et al., 2013a].

Tablo 2.2’de farklı mikroalg türlerine ait karbonhidrat ve glikoz içerikleri görölmektedir. Tablo 2.2’den de göröldüğü gibi mikroalg türüne bağlı olarak, hücre yapısında yüksek oranda karbonhidrat bulunabilmektedir, bu durum alglerin biyoetanol ve hidrojen (H₂) gazı üretiminde kullanılabilecek yeni bir hammadde kaynağı olarak dikkat çekmesine neden olmaktadır [Nguyen et al., 2009; Eshaq et al., 2010; Nguyen et al., 2010].

Tablo 2.2: Mikroalg türüne bağlı olarak karbonhidrat, glikoz içerikleri ve biyoetanol dönüşüm oranları.

Tür	Karbonhidrat (% (KBB))	Glikoz (% (KBB))	Biyoetanol (% (KBB))	Kaynak
<i>Chlorella vulgaris</i>	37			Hirano et al., 1997
	55			Illman et al., 2000
	44			Liang et al., 2009
	51	48 (%93 (TKB))		Ho et al., 2013b
	51	46 (%90 (TKB))	23	Ho et al., 2013c
<i>Chlorococum sp.</i>	33			Ike et al., 1997
			38	Harun et al., 2010
<i>Chlorococcum littorale</i>	70			Hu et al., 1998
<i>Chlorococcum humicola</i>	44	15	52	Harun and Danquah, 2011b
<i>Chlorococcum infusionum</i>	44	35	26	Harun et al., 2011
<i>Scenedesmus obliquus</i>	40			Ho et al., 2010
	52	43 (%82 (TKB))		Ho et al., 2012
	53	40 (%80 (TKB))	20	Ho et al., 2013a
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	60			Hirano et al., 1997
	53			Kim et al., 2006
	60	58	29	Nguyen et al., 2009
	60	48	24	Choi et al., 2010

Mikroalg hücreesindeki karbonhidrat içeriğinin belirlenmesinde standartlaşmış bir yöntem olmamakla birlikte, hücrelerin sülfürik asit ile parçalanmasına dayanan Dubois metodu pek çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır [Dubois et al., 1956]. Bu yöntem ile biyokütledeki toplam monomerik şekerler ve onların metil türevleri tespit edilebilmektedir [Pruvost et al., 2011; Sydney et al., 2011]. Bu yöntemin yanı sıra yine hücrelerin sülfürik asit ile parçalanma sonrasında anthrone indikatörünün ilavesi ile toplam karbonhidrat miktarının ölçüldüğü Anthrone Metodu da pek çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır [Choi et al., 2010; Guo et al., 2013].

2.1.1.3. Diğer hücresel bileşenler

Proteinler de karbonhidratlar gibi hücrede yapısal ve metabolik fonksiyonlarda yer almaktadırlar. Özellikle hücre büyümesini sağladığından proteinler hücre metabolizması için en önemli katalistlerdir. Mikroalg biyokütlesindeki proteinler, klorofil moleküllerinin bağlı olduğu kloroplastın, ışık absorblama komplekslerine yapısal bir iskelet sağlamakta ve lipit membranlarında yer almaktadırlar [Williams and Laurens, 2010]. Mikroalg biyokütlesinin protein içeriğinin belirlenmesi için standartlaşmış bir analiz yöntemi olmamakla birlikte, hücrenin sodyum hidroksit ile parçalanmasına dayanan Lowry metodunun, literatürde sıklıkla kullanıldığı görülmektedir [Lowry et al., 1951; Knuckey et al., 2006; Cheng et al., 2010; Pruvost et al., 2011; Sydney et al., 2011; Pranowo et al., 2013].

Mikroalgler ayrıca hücrelerinde klorofil ve karotenoid gibi pigmentleri de içermektedirler. Karotenoidler fotosentezde önemli rol oynamaktadırlar. Işığı absorblamaya, fotosentetik komplekslerin yapısı ve fonksiyonunu sürdürmeye, reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmaya ve fazla enerjiyi dağıtmaya katkıda bulunmaktadırlar [del Campo, 2006]. Mikroalglerin klorofil ve karotenoid içeriğinin ölçülmesinde ise spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır.

2.1.2. Mikroalglerin Hasatlanması

Mikroalg biyokütlesinin sudan verimli ve düşük maliyetli bir yöntemle ayrıştırılması, mikroalgal biyokütle üretim sürecinin en önemli adımını oluşturmaktadır. Algler negatif yüzey yüküne sahip kolloid partiküller olup özgül

ağırlıkları suyun yoğunluğuna yakın hatta daha altındadır. Bu özellik alglerin su içinde topaklaşmadan askıda kalmalarını sağlar ve aynı zamanda kolayca çökmelerini engeller [Shelef et al., 1984; Grima and Belarbi, 2003]. Mikroalglerin hasatlanması amacıyla, hücre yüzey yükünün değiştirilmesine dayanan çeşitli ayırma yöntemleri (koagülasyon, ultra ses ve mikro dalga uygulamaları, ozonlama, vb.) [Moraine et al., 1979; Bosma et al., 2003; Farooq et al., 2013] ve yine hücrenin su ile arasındaki yoğunluk farkına dayanan çeşitli yöntemler (çöktürme, santrifüj, yüzdürme, vb.) kullanılmaktadır [Heasman et al., 2000; Zimmerman et al., 2011].

2.1.2.1. Geleneksel Hasatlama Yöntemleri

Geleneksel ayırma yöntemlerinden biri olan çöktürme işlemi, mikroalglerin bulundukları su ortamından ayrıştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Belli koşullar altında bazı tür mikroalgler tarafından üretilen polimerli enzimlerin, hücrelerin kendiliğinden kümeleşmesini sağladığı ve bu sayede çökme eğilimin arttığı [Garcia et al., 2000] bilinmekle birlikte, suda askıda kalma eğiliminde olan türler için koagülant eklemekten sadece yer çekimi etkisiyle çökelmenin sağlanması neredeyse imkânsızdır [Shelef et al., 1984]. Mikroalg çözeltisine anyonik/katyonik polielektrolit, organik kil gibi çeşitli koagülantlar eklenmesiyle kümeleşme-yumaklaşmanın sağlanabildiği, ağırlaşan bu yumakların çöktürülmesiyle %100 hasatlama verimliliğine ulaşılabildiğini bildiren çalışmalar [Farooq et al., 2013; Lee et al., 2013] olmakla birlikte, yumaklaşma sonrası yüzdürme (çözünmüş hava flotasyonu) ile mikroalglerin %90'ının hasatlanabildiği [Chen et al., 1998] ve santrifüjle ayırma gibi yöntemlerin kullanılmasıyla da yeterli hasatlama verimliliğine ulaşılabileceğini bildiren çalışmalar da mevcuttur [Moraine et al., 1979; Shelef et al., 1984; Borowitzka, 1992]. Koagülasyon-flokülasyon yönteminin en büyük dezavantajı, kimyasal madde kullanımının alg kütlesinin kirlenmesine neden olması ve sonraki lipid ayırma ve biyoyakıt üretim basamaklarını olumsuz yönde etkilemesidir [Estevez et al., 2001; Mojaat et al., 2008; Kim et al., 2013].

Geleneksel koagülasyon yöntemlerinden farklı olarak Gao ve arkadaşları, (2010) elektrokoagülasyon yöntemini kullanarak mikroalglerin hasatlanmasını amaçlayan çalışmalar yürütmüştür. Alüminyum elektrot kullanılarak gerçekleştirilen

çalışmada *Microcystis aeruginosa*'nın sudan ayrıştırılmasında %100 hasatlama verimine ulaşıldığı raporlanmıştır.

Diğer bir hasatlama yöntemi olarak kullanılan flotasyon, çözelti içinde dağılmış durumdaki hava baloncukları ile mikroalg hücrelerinin temasının sağlanması ve mikroalglerin bu baloncuklar ile birlikte su yüzeyine taşınmasından ibarettir [Brennan and Owende, 2010; Uduman et al., 2010]. Genel olarak flotasyon veriminin, flotasyon için oluşturulan baloncuğun büyüklüğü ile bağıntılı olduğu bilinmektedir. Baloncuk boyutunun küçülmesiyle yüzey alanı/hacim oranı büyümekte bu sayede baloncuğun partikül taşıma kapasitesini önemli miktarda artmaktadır. Ayrıca küçük boyutlu baloncukların durağanlığını daha uzun koruyabildiği [Zimmerman et al., 2011], yüzeye yükselmesinin daha yavaş olduğu ve bu esnada baloncuğun mikroalg ile temasının artarak mikroalglerin flotasyonuna imkan sağladığı bildirilmiştir [Hanotu et al., 2012; Kim et al., 2013]. Baloncuk büyüklüğünün yanı sıra, mikroalglerin yüzey yükü ve hidrofobisitesi de hücre ve baloncuk arasındaki etkileşim açısından önemlidir. Ayrıca mikroalg büyüklüğünün de flotasyonun başarılı olması açısından oldukça önemli olduğu ve 500 nm'den daha küçük türlerin bu yöntemle hasatlanabildiği raporlanmıştır [Matis et al., 1993; Uduman et al., 2010].

Bir başka ayırım yöntemi olarak kullanılan santrifüj yönteminde biyokütlenin geri kazanım hızı, hücrelerin çökelme karakterine, santrifüj hızına, sıcaklığına ve süresine bağlı olarak değişmektedir [Brennan and Owende, 2010; Uduman et al., 2010; Rawat et al., 2013]. Santrifüj oldukça çabuk (2-5 dk) ve yüksek verimli (%80-90) bir sistem olmasına karşın ilk yatırım ve işletim maliyeti yüksektir. Laboratuvar ölçekli gerçekleştirilen mikroalg hasatlama çalışmalarında santrifüj uygulamalarının sıklıkla kullanıldığı görülmektedir [Prabakaran and Ravindran 2011; Bai et al., 2013; Piasecka et al., 2014]. Heasman ve ark (2000), 10 farklı mikroalg türü üzerinde üç farklı santrifüj koşulunun denendiği hasatlama çalışmada, 13.000 g'de %95'ten daha fazla hücrenin geri kazanımının sağlandığını raporlamıştır. Ancak bazı mikroalg türlerinde (*Oscillatoria redekei*, *Anabaena flos-aquae* vb.) hücre içi gaz keseciklerinin olması, bu tür mikroalglerin santrifüj yöntemi ile sudan ayrılmasını engellemektedir.

Mikroalglerin hasatlanmasında, mikroalg türü ve büyüklüğüne bağlı olarak, titreşimli elek filtreler ve mikro filtreler kullanılabileceği bildiren çalışmalar,

kullanılacak filtrenin elek açıklığının bu yöntemin kullanılmasında en etkin parametre olduğunu belirtmektedir [Shelef et al., 1984; Wilde et al., 1991]. Bu yöntemle mikroalglerin sudan ayrıştırılması, filtrelere basınç ya da vakum uygulanması ile mümkün olabileceği belirtilmektedir [Grima et al., 2003]. Mikroalglerin hasatlanmasında geleneksel filtrasyon sistemleri 70 µm den daha büyük türler (*Coelastrum proboscideum*, *Spirulina platensis*) için uygulanabilirken [Grima et al., 2003], 30 µm den daha küçük türlerin (*Chlorella sp.*, *Duaniella sp.*, *Scenedesmus sp.*) hasatlanması için uygun olmadığı belirtilmiştir [Mohn, 1980; [Brennan and Owende, 2010; Pittman et al. 2011; Chen et al., 2011; Rawat et al., 2013]. Bununla birlikte, 30 µm'den daha küçük türlerin hasatlanması için membran teknolojileri, mikro ya da ultra filtrasyon yöntemleri, klasik filtrasyona alternatif olarak önerilmektedir [Petrusevski et al., 1995; Grima et al., 2003]. Mikroalg hasatlanmasında membran kullanımının incelendiği bir çalışmada, reaktör içindeki besi ortamının batık membran filtrasyonu kullanılarak yenilenmesi ve bu sayede mikroalg biyokütle konsantrasyonunun arttırılabileceği belirtilmiştir. Özellikle biyolojik arıtılmış evsel atıksu gibi düşük besi içeriğine sahip besin ortamlarında, yoğun mikroalg biyokütle üretiminin sürekli sistem batık membran filtrasyonu kullanılarak sağlanacağı raporlanmıştır [Gürol, 2013]. Ancak filtrasyon yöntemlerinin santrifüj yöntemine nazaran daha çok enerji ve yüksek işletme maliyeti gerektirdiği belirtilmektedir [Petrusevski et al., 1995].

Son zamanlarda çeşitli şekillerde sentezlenen manyetik mikro ve nano parçacıkların kullanıldığı manyetik alan ile ayırma yöntemi de mikroalglerin hasatlanmasında kullanılan bir başka ayırma yöntemidir [Cerff et al., 2012; Lim et al., 2012; Prochazkova et al., 2013]. Bu çalışmalardan birinde, demir sülfattan ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) alkali şartlarda (pH 11-12), mikrodalga kullanılarak manyetik mikro parçacık sentezlenmiştir ve sentezlenen bu parçacıkların *Chlorella vulgaris*'in hasatlanmasında %95 başarı ile kullanıldığı raporlanmıştır [Prochazkova et al., 2013].

Yukarıda da bahsedildiği gibi hasatlama yöntemlerinin kendi aralarında kıyaslandığında çeşitli avantaj ve dezavantajlarının olduğu görülmektedir. Bu bakımdan seçilecek hasatlama yönteminin hem uygulanabilir hem de büyük çaptaki uygulamalar için ekonomik olması önem kazanmaktadır.

2.1.2.2. Mikroalglerin Hasatlanmasında Ozon Kullanımı

Ozon bilinen en kuvvetli oksidantlardan biri olduğu ve ozonlamanın çeşitli mikroorganizmaların membran yapısına zarar verdiği, membran yapısının tamamen parçaladığı ve ozon dozunun artması ile hücre ve hücre içi materyalin tamamen parçalanmasına neden olduğu bilinmektedir [Paralkar and Edzwald, 1996; Dytchaka et al., 2007; Zhang et al., 2009; Cheng et al., 2012]. Aynı durumun mikroalg hücreleri için de geçerli olduğu bildirilmiştir [Miao and Tao, 2009; Hoeger et al. 2002; Huang et al., 2006; Hammes et al., 2007]. Benoufella ve arkadaşları, (1994) *Microcystis* türü mikroalglerin sudan uzaklaştırılması amacıyla gerçekleştirdiği çalışmada, mikroalg başına uygulanan ozon dozunun düşük tutulmasıyla hücre stabilitesinin zarar gördüğü ve koagülasyon veriminin arttığını raporlamıştır. Bu durum ozonun mikroalglerin sudan ayrıştırılmasında kullanılabilinecek yeni bir hasatlama yöntemi olarak ele alınmasını sağlamıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda ozon uygulaması tek başına bir hasatlama yöntemi olarak değil, koagülasyon-flokulasyona ya da flotasyon yardımcı olarak kullanıldığı görülmektedir. Chen ve ark (1998), flotasyon işlemi sırasında “hava” kullanılmasının alglerin yüzey yüklerini etkilemediğini, bu nedenle hücrelerin birbirini itme eğiliminin devam ettiğini ve sonuç olarak flotasyon veriminin düşük olduğunu ve hava yerine ozon kullanılmasıyla mikroalg yüzey yükünün değiştirilebildiği [Cheng, 2010] ve bu sayede flotasyonla hasatlama veriminin %95’in üzerine çıktığı raporlanmıştır [Nguyen et al., 2013]. Mikroalglerin hasatlanmasında koagülasyon-flokulasyona yardımcı olarak ozon kullanılan çalışmaların ortak sonucu, ozonlama ile kolloidlerin stabilitesinin yanı sıra hücre metabolizmasının değişmesi ve hücresel parçalanmaların meydana gelmesidir [Paralkar ve Edzwald, 1996; Chen et al., 2009; Li et al., 2011].

Düşük ozon dozlarında, hücre dışı organik madde (EOM) salınımının arttığı [Li et al., 2011] ve bu materyalin anyonik ve iyonik olmayan polielektrolit [Paralkar and Edzwald, 1996] gibi davranarak flokulasyona yardımcı davranış gösterebileceği belirtilmektedir. Yüksek ozon dozlarında meydana gelen hücresel parçalanma neticesinde ise çözeltiye hücre içi organik maddelerin de (lipit, protein, vb.) salındığı belirtilmiştir [Henderson et al., 2010; Cheng et al., 2010; Cheng et al., 2011]. Mikroalg bünyesinden çözeltiye taşınan proteinin, biyo-polimer gibi davranarak,

flotasyon baloncuğuyla hücrelerin temasını arttırdığı, bu sayede flotasyon verimini pozitif yönde etkilendiği raporlanmıştır [Cheng et al., 2010; Cheng et al., 2011]. Benzer şekilde bir başka araştırma grubu, *Chlorella vulgaris* ve *Secenedesmus obliquus* FSP-3 türlerinin hasatlanmasında ozon-flotasyon yöntemini kullanmışlardır. *Chlorella vulgaris* için 0,005-0,03 g O₃/g biyokütle ve *Senedesmus obliquus* FSP-3 için 0,2-0,5 g O₃/ g biyokütle ozon dozunda flotasyonun oldukça verimli olduğu ve *Secenedesmus obliquus* FSP-3 hasatında *Chlorella vulgaris*'e nazaran daha etkili olduğu raporlanmıştır [Cheng et al., 2010; Cheng et al., 2011]. Aynı araştırma grubu, düşük dozda uygulanan ozonun, hücre içi (lipit, protein, vb.) organik maddeleri hücre dışına çıkarıp yüzey aktif madde gibi yüzeyde toplanmasına imkân sağladığı bildirilmiştir [Cheng et al., 2011].

Literatürde yer alan bazı çalışmalarda ozonlama neticesinde parçalanmış ve hücrelerden çözeltiye taşınan hücre içi organik materyalin yine ozonla reaksiyona girdiği ve hücrelerin parçalanma verimini düşürdüğü [Li et al., 2011] ve yüksek ozon (0,5-2,1 mg/L O₃) dozunda hücre dışı organik yapıların zarar gördüğü ve flokulasyonu engellediği de belirtilmektedir [Chen et al., 2009].

Mikroalglerin hasatlama öncesi ozonla ön oksidasyonun, mikroalg hasatlama verimini önemli oranda arttırdığı belirtilmektedir. Henderson et al., [2010] *Scenedesmus quaricauda* türü mikroalglerin ozonla ön oksidasyonu sonrasında sudan ayrıştırma veriminin %75'ten %93'e çıktığını raporlamıştır. Benzer şekilde Nguyen ve arkadaşları, (2013) ve Pranowo ve arkadaşları, (2013) *Chlorella* türü mikroalglerin ön oksidasyonunda O₃ ve O₃/H₂O₂ kullanımını ve bu işlemin hasatlama verimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Nguyen ve ark (2013) ön oksidasyonu gerçekleştirmiş mikroalg çözeltisine katyonik yüzey aktif madde, Pranowo ve arkadaşları, (2013) ise organik kil (chitosan) ve polialüminyumklorür (PACl) ekleyerek flokulasyonu sağlamış, ardından flotasyonla mikroalglerin hasatını gerçekleştirmiştir. Ozon kullanılmasıyla hasatlama verimini %76,4'ten %95'e çıktığı raporlanmıştır [Nguyen et al., 2013]. Ayrıca ozon dozunun artması ile çözeltinin bulanıklığında azalma meydana geldiği, çözeltideki çözünmüş organik karbon, protein ve polisakkarit konsantrasyonlarının da arttığı belirtilmiştir. [Nguyen et al., 2013; Pranowo et al., 2013].

2.1.2.3. Mikroalglerin Hasatlanmasında Ultrases Kullanımı

Ultrases dalgaları tarafından sıvı faz içinde yaratılan titreşimin, suda bulunan parçacıkların birbirlerine doğru hareket etmesini sağladığı ve bu sayede bir araya toplanan parçacıkların sudan ayrılmasını (çöktürülmesinin ya da flotasyonun) kolaylaştırdığı bilinmektedir [Lee et al., 2001; Zhang et al., 2009; Heng et al., 2009]. Ayrıca ultrases kullanılması ile hücre içindeki gaz keseciklerinin parçalandığı ve bu sayede hücrelerin çökme kapasitesinin arttığı da belirtilmektedir [Walsby, 1992; Lee et al., 2001; Zhang et al., 2009]. Ultrases, bu özellikleriyle, mikroalglerin hasatlanmasında kullanılabilecek alternatif bir yöntem olarak, özellikle son yıllarda dikkat çekmeye başlamıştır.

Mikroalglerin hasatlanmasında ultrases kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, *Monodus subterraneus* UTEX 151 içeren mikroalg çözeltisine uygulanan ultrases frekansının artırılıp (2,1 MHz) dalga büyüklüğünün düşürülmesi ile mikroalg hücrelerin yumaklaştığı ve ağırlaşan yumakların çökerek su ortamından ayrılmasının sağlandığı raporlanmıştır [Bosma et al., 2003]. Ayrıca, mikroalg çözeltisine uygulanan ultrases frekansının düşürülüp (20 kHz), dalga büyüklüğünün artırılmasıyla da hücre yapısında ve hücre içi gaz keseciklerinde parçalanmaların meydana geldiği ve bu sayede hücrelerin suda asılı kalma yetisinin engellenerek hasatlanmasının sağlandığını belirten çalışmalarda mevcuttur [Mason and Peters, 2002; Bosma et al., 2003; Koda et al., 2009; Lecina et al., 2015]. Lecina ve arkadaşları, (2015), *Arthrospira fusiformis* siyanobakterinin hasatlanmasında düşük ses frekansına (20 kHz, 40 W) sahip ultrases uygulamalarının etkinliğini araştırmış ve on saniye gibi kısa sürelerde bile ultrases uygulamasının etkin olduğunu raporlamıştır. Ultrases uygulanan mikroalg çözeltilerinde 4 saat sonunda %90 hücre çökmesi gözlemlenirken ultrases uygulanmayan çözeltide 5 saat sonunda dahi herhangi bir çökme görülmediği bildirilmiştir. Ultrases uygulamasının bir ön hasatlama yöntemi olarak kullanılabileceği ve farklı türler için farklı güç ve yoğunluklarda çalışmaların gerçekleştirilebileceği raporlanmıştır [Lecina et al., 2015].

Mikroalglerin hasatlanmasında ultrases uygulamaları koagülasyon-flokulasyon yöntemine yardımcı bir proses olarak da kullanıldığı görülmektedir. Zhang et al., [2006] *Spirulina platensis* hasatlanmasında ultrasesin polialüminyum klorit (PAC)

ile birlikte kullanıldığı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada kısa süreli (5 saniye) ultrases (48 W, 80 kHz) uygulanmalarıyla flokülasyon veriminin arttığı, koagülant madde gereksiniminin %30 oranında azaldığını ve hasatlama veriminin %100'e ulaştığı belirtilmiştir. Aynı araştırma grubu, *Microcystis aeruginosa*'nın hasatlanmasında da benzer bir prosedür izlemiş ve bu tür içinde hasatlama veriminin ultrases uygulanması ile arttığı ve özellikle PAC konsantrasyonun düşürülmesi ile bu etkinin daha net ortaya çıktığını raporlamıştır [Zhang et al., 2009]. Bu çalışmaya oldukça benzer bir başka çalışmada ultrases (40 W) ile birlikte kullanılan polialüminyum hidroksikloritin hasatlama verimin arttığından bahsedilmektedir [Shi et al., 2008]. Heng ve ark ., (2009), gerçekleştirdikleri çalışmada ise demir klorür ile birlikte ultrases kullanımının koagülasyona olan etkisini araştırmıştır. Ultrasesin 15 saniye boyunca 40 kHz'de ve 60 W gücünde ve 10 mg/L demir klorür ilavesi ile birlikte uygulanmasıyla koagülasyon veriminin, direkt koagülasyona nazaran %12,4 oranında arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca son zamanlarda mikroalglerin hasatlanmasında kullanılan manyetik mikro parçacıkların ultrases ile birlikte kullanılması durumunda %100 hasatlama veriminin sağlandığı bildirilmiştir [Prochazkova et al., 2013].

Ultrasesin, hücre membranı ve bütünlüğü üzerindeki parçalayıcı etkisi, hücreden değerli organik maddelerin (protein, karbonhidrat, lipit vb) ekstraksiyonunda kullanılmasına olanak sağladığı belirtilmektedir [Meijer and Wijffels, 1998; Cravotto et al., 2008; Prabakaran and Ravindran, 2011; Koberg et al., 2011; Gerde et al., 2012]. Bu konuda yapılan çalışmalarla ilgili detaylı bilgi Bölüm 2.2.1 ve Bölüm 2.3.1.1.2'de verilmektedir.

2.2. Lipit Ekstraksiyonu ve Biyodizel Üretimi

2.2.1. Lipit Ekstraksiyonu

Bünyelerinde yüksek oranlarda (%80 (KBB)) lipit depolayabilmesiyle mikroalgler biyodizel üretimi için uygun bir kaynak olarak görülmektedir [Metting, 1996]. Özellikle son yıllarda pek çok araştırmacı bu canlılardan lipit ekstraksiyonu ve elde edilen lipitin biyodizele dönüştürülmesi konusunda çeşitli çalışmalar

yürütmüşlerdir [Illman et al., 2000; Lewis et al., 2000; Shen et al., 2009; El-Moneim et al., 2010].

Mikroalg bünyesinde lipitler nötral (triasilgliseritler) ve polar (fosfolipitler, glikolipitler) olmak üzere iki farklı yapıda bulunmaktadır. Nötral lipitler genellikle hücre içi depo materyali olarak bulunmakta ve bu lipitlerin hücreden ekstraksiyonu non-polar solventler (kloroform, dietileter, hekzan, vb.) kullanılarak sağlanmaktadır. Diğer taraftan polar lipitlerin ekstraksiyonunda, hücre membran yapısında bulunan hidrojen bağlarını ve diğer elektrostatik kuvvetleri yenecek özelliklere sahip olan daha polar çözücülerin (metanol, isopropil alkol, vb.) kullanılmasını gerektirmektedir [Christie, 1993; Ferraz et al., 2004]. Mikroalglerden lipit ekstraksiyonunu; model olarak seçilen mikroalgin hücre yapısı, kullanılan hücre parçalama metodu ve ekstraksiyonda kullanılan solvent türü önemli oranda etkilediği bilinmektedir.

Solvent çeşitliliğinin mikroalglerden lipit ekstraksiyonu üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalardan birinde El-Moneim ve ark (2010), sekiz farklı mikroalg türünde, hekzan/eter ve kloroform/metanol (K/M) kullanımını karşılaştırmıştır. Çalışmada en yüksek lipit ekstraksiyon verimi her tür için, K/M kullanılması ile sağlandığı ve bu solvent karışımının kullanılmasıyla %2,5-12,5 (KBB) aralığında lipit ekstraksiyon verimi elde edilirken, hekzan/eter kullanıldığında ekstraksiyon veriminin %2,3-3,5 (KBB) aralığında kaldığı raporlanmıştır.

Lipit ekstraksiyon veriminin artırılması amacıyla; otoklav, mikrodalga, Fransız presi, bilye mikser (bead-beating), ıslak öğütme, osmotik şok, süper kritik sıvı ve yüksek ısı, gibi çeşitli hücre parçalama metotlarının kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur [Lewis et al., 2000; Shen et al., 2009; Lee et al., 2010; Prabakaran and Ravindran 2011]. Bu çalışmalardan birinde Shen ve ark (2009) *Scenedesmus dimorphus* ve *Chlorella protothecoides* türlerinden lipit ekstraksiyonunu arttırmak amacıyla çeşitli hücre parçalama yöntemlerini ve solvent çeşitliliğini (hekzan ve hekzan/metanol karışımı) karşılaştırmıştır. *Scenedesmus dimorphus* için en yüksek lipit ekstraksiyon verimi ıslak öğütme yöntemi ile sağlanırken *Chlorella protothecoides* için bilye mikser yönteminin daha etkin olduğunu raporlamıştır. Benzer şekilde Lee ve arkadaşları, (2010) *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus* türü ve *Scenedesmus* türü mikroalglerin model olarak kullanıldığı lipit ekstraksiyonu çalışmalarında, *Botryococcus* türü için en yüksek lipit ekstraksiyon verimi bilye

mikser ve mikrodalga, *Chlorella vulgaris* için otoklavlama ve mikrodalga, *Scenedesmus* türü için ise mikrodalga uygulamaları ile elde edildiğini bildirilmiştir.

Mikroalglerden lipit ekstraksiyonuna yardımcı olarak son yıllarda kullanılmaya başlanılan bir diğer hücre parçalama metodu ise ultrases uygulamasıdır. Düşük ses frekansında (40 kHz ve daha düşük), yüksek ultrases gücünde hücrelerin parçalandığı bu sayede hücre içi materyalin ekstraksiyon veriminin arttığını belirten pek çok araştırma mevcuttur [Mason ve Peters, 2002; Bosma et al., 2003; Koda et al., 2009].

Mikroalglerden lipit ekstraksiyonunda ultrases uygulamalarının geleneksel hücre parçalama yöntemleri ile karşılaştırıldığı bir çalışmada *Chlorella* türü, *Nostoc* türü ve *Tolypothrix* türü mikroalgler kullanılmış ve ultrases (50 Hz, 15 dk) uygulamasının bu konuda en etkin yöntem olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada en yüksek lipit içeriğine sahip mikroalg türünün %22 (KBB) ile *Chlorella* türü olduğu raporlanmıştır [Prabakaran and Ravindran, 2011]. *Chlorella protothecoides* türü mikroalglerden lipit ekstraksiyonunda ultrases ve mikrodalga uygulamalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, 500 W, 20 kHz, 90 saniye ultrases gücünde, en yüksek ekstraksiyon veriminin %42 (KBB) elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmada ve her iki parçalama tekniğinin kullanılmasının yağ asidi bileşimindeki doymuş yağ asidi yüzdesini arttırdığı görülmüştür [Piasecka et al., 2014]. Ultrases uygulamasının, klasik homojenizasyon ve ultrases destekli homojenizasyonun sistemleri ile karşılaştırıldıkları çalışma *Chlorella vulgaris* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ultrases destekli homojenizasyon sisteminin kullanılması ile lipit ekstraksiyon veriminin önemli oranda arttığı ve %23,7 lipit (KBB) elde edildiği bildirilmiştir. [Park et al., 2015].

Ultrases sonrasında dietileter [Mecozzi et al., 2002], etanol [Wiyarno et al., 2010; Wiyarno et al., 2011], *n*-hekzan [Cravotto et al., 2008; Wiyarno et al., 2010; Ranjan et al., 2010; Wiyarno et al., 2011], kloroform/metanol karışımı [Lee et al., 2010; Ranjan et al., 2010; Araujo et al., 2011] gibi çeşitli solventlerin lipit ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisinin incelendiği pek çok araştırma literatürde yer almaktadır. Mecozzi ve arkadaşları, (2002) deniz mikroalg türlerinden lipit ekstraksiyonunda ultrases destekli solvent kullanımını araştırmıştır. Çalışmada ultrases sonrası dietileter kullanılması ile metanol'a nazaran daha yüksek lipit kazanım verim elde edildiği belirtilmiştir. Benzer şekilde Cravatto ve arkadaşları, (2008) deniz mikroalglerinin parçalanması amacıyla düşük frekanslı ultrases (25

kHz, 60 W) uygulamalarının ardından hekzan kullanımının, lipit ekstraksiyon verimi üzerindeki değişimini inceleyerek ultrases uygulanmasıyla bu verimin %4,8'den %25,9'a (KBB) çıktığını raporlamıştır. Wiyarno ve arkadaşları, (2010) *Nannochloropsis* türlerinden ultrases destekli lipit ekstraksiyonunda, aynı lipit verimi için etanol kullanımının *n*-hekzana nazaran daha yüksek sıcaklığa ve daha uzun ultrases uygulama süresine ihtiyaç duyduğunu belirtmiştir. Joyce ve arkadaşları, (2014) *Dunaliella salina*, *Chlamydomonas concordia* ve *Nannochloropsis oculata* türü mikroalglerin hücre duvarlarının parçalanmasında ve lipit ekstraksiyonunda 20 kHz (0,086 W/cm³) ultrases kullanmıştır. Ultrases uygulamasının kalın ve dirençli hücre duvarına sahip türlerde bile hücre duvarını parçalamaya muktedir olduğu ve bu sayede lipit ekstraksiyon veriminin arttığı belirtilmiştir. Ultrases sonrasında *n*-hekzan ile lipit ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir başka çalışmada ise üç farklı mikroalg türü kullanılmıştır. Mikroalg içeren solvent ortamına ultrases uygulanması ile *Thalassiosira fluviatilis*'den %40, *Thalassiosira pseudonana*'dan %39,5 ve *Chlorella minutissima* türü mikroalglerden %15,5 (KBB) lipit ekstraksiyonunun sağlandığı raporlanmıştır. Literatürle yapılan karşılaştırma sonrasında ultrases kullanılmasının lipit ekstraksiyon verimini önemli oranda arttırdığı belirtilmiştir [Neto et al., 2013]. Ultrases destekli lipit ekstraksiyonunun homojenizasyon yöntemiyle karşılaştırıldığı bir çalışmada ise çeşitli solvent sistemleri (etanol, hekzan, 2:1 ve 1:2 K/M karışımları) kullanılarak lipit ekstraksiyonu verimi arttırılmaya çalışılmıştır. En yüksek lipit ekstraksiyonu %19 (KBB) olarak, 40 kHz, 34,7 W/L ve 20 dk ultrases uygulanmasıyla ve 2:1 K/M karışımının kullanılmasıyla elde edildiği raporlanmıştır. [dos Santos et al., 2015].

Hücre sel parçalanmada etkisi kanıtlanan ozonlamada, son yıllarda mikroalglerden lipit ekstraksiyonuna yardımcı olarak kullanılmaya başlanmış yeni bir yöntemdir. Komolafe ve arkadaşları, (2014) Ozon-flotasyon yöntemini kullanarak *Desmodesmus* türü ve karışık mikroalg kültürlerinin hasatlanması aynı zamanda ozon uygulamasının lipit ekstraksiyonuna ve yağ asidi metil esteri (YAME) kompozisyonuna olan etkisini incelenmiştir. Ozon dozu 0,4-1,0 g O₃/g biyokütle aralığında tutulduğu çalışmada, lipit ekstraksiyon verimin *Desmodesmus* türünün baskın olduğu kültürde %20'den %26 (KBB) arttığı gözlemlenirken, karışık kültürün kullanıldığı diğer reaktörde ozon-flotasyonun, lipit ekstraksiyonunu olumsuz yönde etkilediği raporlanmıştır. Ayrıca, Ozon-flotasyon uygulanması ile YAME

içeriğindeki doymunluk derecesinin (doymuş yağ asidi içeriğinin) yükseldiği ve böylece üretilen biyodizelin oksidatif stabilite değerin artmasının sağlandığı belirtilmiştir [Komolafe et. al., 2014]. Benzer şekilde gerçekleştirilen bir başka çalışmada *Oscillatoria* ve *Cyclotella* türü mikroalglerin baskın olduğu karışık mikroalg kültürünün hasatlanmasında ve lipit ekstraksiyonunda ozon-flotasyon yöntemi kullanılmıştır [Velasquez-Orta et al., 2014]. En yüksek hasatlama verimi 0,23 g O₃/g kuru biyokütle dozunda %79,6 olarak elde edilmiştir. Çalışmada 0,12 g O₃/g kuru biyokütle ozon kullanılması ile hücrelerden ekstrakte edilen lipit miktarının iki kat ve YAME dönüşüm veriminin ise yaklaşık olarak %38 oranında arttığı belirtilmiştir. Ozon-flotasyonda kullanılan ozon dozunun arttırılması ile lipidin YAME içeriğindeki doymunluk derecesinin önemli miktarda arttığı (%1,1) ancak ozon dozunun arttırılması ile ekstrakte edilen lipit miktarının azaldığı raporlanmıştır [Velasquez-Orta et al., 2014].

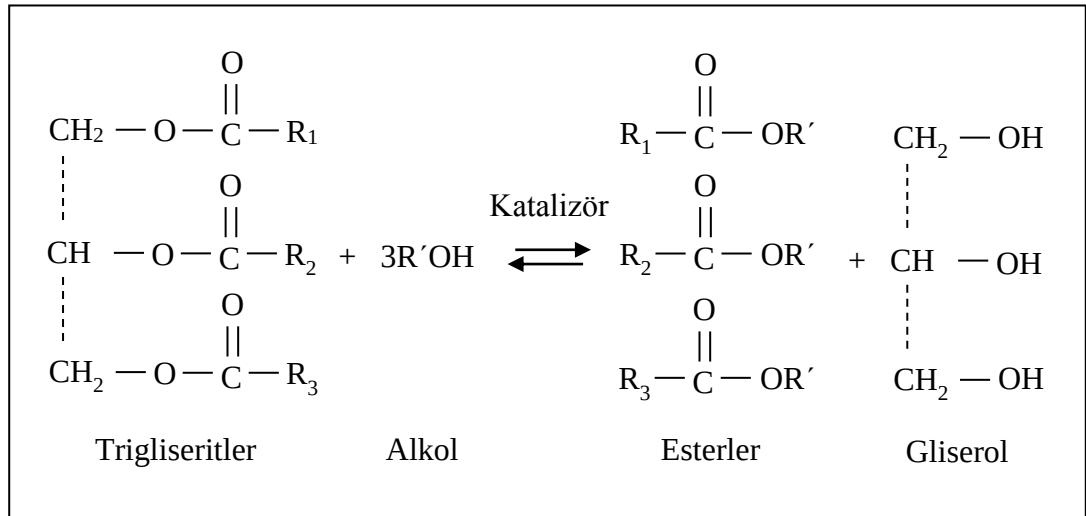
Ozonlama, basınçlı ozonlama ve ultrases yöntemlerinin, hücresel parçalanma ve lipit ekstraksiyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, *Chlorella vulgaris* kullanılmıştır [Huang et al., 2014]. Uygulanan bu parçalama yöntemleri sonrasında sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile çözeltiden lipit ekstraksiyonu sağlanmıştır. Klasik ozonlama (12 mg/L, 60 dk) ile hücrelerden %5 (KBB) oranında lipit ekstrakte edilirken, ultrases (20 kHz, 360 W) kullanılması ile %21 (KBB) lipit ekstraksiyonu sağlanmıştır. Hücre çözeltilisinin bir kolon içinde yer aldığı basınçlı ozonlama sisteminde ise 0,6 MPa basınçta O₃ gazı (2 mg/L, 37 dk) verilmesi ile en yüksek lipit ekstraksiyon verimi (%27 (KBN)) elde edilmiştir. Çalışmada basınçlı ozonlama ve klasik ozonlama yöntemlerinin kullanılması ile YAME içeriğindeki doymuş yağ asidi miktarının arttığı bildirilmiştir. Bu durumun ozonun YAME içeriğindeki çift bağları kırmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Fiziksel bir parçalanma sağlayan ultrases kullanımının doymuş yağ asitleri üzerine bir etkisinin olmadığı raporlanmıştır. Ancak, ozonlamanın hücrelerden dışarı salınan klorofili 10 dakika gibi kısa bir sürede hızla parçaladığını ve bu nedenle klorofil ekstraksiyonu için uygun bir yöntem olmadığını raporlamıştır [Huang et al., 2014].

Lin ve Hong, (2013), *Chlorococcum aquaticum* türü küçük hücre boyutuna (1-10 µm) sahip mikroalglerin hasatlanmasında ve lipit ekstraksiyonunda klasik kum filtrasyonu ile ozonlamanın birlikte ve ayrı ayrı kullanımı araştırılmıştır. Öncelikle mikroalg içeren çözelti kum filtresinden geçirilmiş ve filtre yüzeyinde biyokütlenin

tutulması (hasatlanması) sağlanmıştır. Devamında kum yatağının altından 2 L/dk debi ile %1,5 O₃ içeren gaz karışımı 2 dakika süreyle verilerek hücresel parçalanma gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kum yatağının üzerine metil alkol ilavesi yapılarak lipitin alkol fazına geçmesi sağlanmıştır. Kum filtrasyonu ile %87'lik biyokütle tutulma verimi, %15,7 oranında lipit ekstraksiyon verimi elde edilmiştir [Lin and Hong, 2013].

2.2.2. Biyodizel Üretimi

Biyodizel; genellikle triağılgliceritlerin ve serbest yağ asitlerinin, bir katalizör eşliğinde kısa zincirli bir alkolle (metanol, etanol) transesterifikasyon reaksiyonu ile üretilmektedir. Transesterifikasyon reaksiyonu, birbirini takip eden geri dönüşümlü üç adımdan oluşmaktadır. Trigliceritlerin digliseritlere, digliseritlerin monogliseritlere, monogliseritlerin ise ester(biyodizel) ve yan ürün olarak gliserole dönüşmesiyle oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Trigliceritlerin transesterifikasyonu (genel reaksiyon).

Biyodizel üretim sürecinin etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi için; seçilen hammaddeye göre katalizörün belirlenmesi ve reaksiyon şartlarının optimize edilmesi oldukça önemlidir. Bitkisel yağlardan biyodizel eldesinde alkali (NaOH, KOH), asit (H₂SO₄, HCl) ya da enzimatik (lipaz) katalizörlerin kullanıldığı ve hem biyodizel veriminin hem de biyodizelin ester içeriğinin seçilen hammadde ve

katalizöre bağılı olarak değişiklik gösterebildiği belirtilmektedir [Ma and Hanna, 1999].

Transesterifikasyon reaksiyonlarında alkali katalizör kullanılmasınn önemli avantajları arasında; reaksiyonların oda sıcaklığında, kısa sürelerle sağlanabilmesi (2-60 dk) ve metanol: yağ molar oranının optimize edilmesiyle %98'in üzerinde ester verimi eldesi yer almaktadır. Ancak reaksiyon ortamında nem bulunması ve kullanılan lipidin serbest yağ içeriğinin %1'den büyük olması durumunda transesterifikasyon reaksiyonunun tamamlanmaması ve reaksiyonun kısmi sabunlaşma reaksiyonuna dönmesi alkali katalizör kullanımının en büyük dezavantajını oluşturmaktadır. Bu şekilde üretilen biyodizelin ester veriminin düşük olmasının yanı sıra gliserolden ayrılmasında ve saflaştırılmasında büyük zorluklar yaşanacağı belirtilmektedir [Freedman et al., 1984]. Yüksek sıcaklık (100 °C ve daha düşük), uzun reaksiyon süreleri (3-48 saat) ve yüksek metanol: yağ molar oranı (20:1) gereksinimi gibi önemli dezavantajlara sahip olan asit katalizörlü transesterifikasyonun [Karmakar et al., 2010], en önemli avantajının yüksek serbest yağ asidi içeriğinde dahi reaksiyonun tamamlanabilmesi, sabunlaşmaya kayan reaksiyon ürünlerinin bile biyodizele dönüştürülebilmesi [Van Gerpen et al., 2004] ve reaksiyon şartlarının iyileştirilmesi ile biyodizel üretim veriminin %99'un üzerine çıkabilmesidir [Vicente et al., 2009]. Mikroalglerden biyodizel üretiminde farklı parametrelerin, üretilen ester verimi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, reaksiyon ortamında su bulunması durumunda bile asit katalizör kullanılması ile düşük de olsa ester verimi elde edilebildiği belirtilmiştir [Wahlen et al., 2011].

Mikroalglerden biyodizel üretiminde; hücrelerden lipid ekstrakte edildikten sonra transesterifikasyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği veya ayrıca bir ekstraksiyon işleminin uygulanmadan hücrelerin direk transesterifikasyona tabi tutulduğu iki farklı yöntem uygulanmaktadır [Wahlen et al., 2011]. Direk transesterifikasyonun en büyük avantajının, lipid ekstraksiyonu için gerekli solvent ihtiyacının ortadan kaldırılarak biyodizel üretim maliyetin azaltılması ve ekstraksiyon sırasında meydana gelebilecek lipid kaybının önlenerek daha yüksek (%99 ve daha düşük) ester verimi sağlanabilinmesidir [Vicente et al.2009].

Reaksiyon ortamındaki nemin, biyodizel üretim verimine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla, kuru biyokütlenin saf su ile tekrar süspansiyeye edilmesi ile hazırlanan farklı su içeriklerine sahip mikroalg örnekleri, asit katalizli direk

transesterifikasyon reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Beklenildiği gibi ortamda su bulunması düşük sıcaklıklarda (90 °C) gerçekleştirilen reaksiyonlarda biyodizel verimini düşürürken, reaksiyon sıcaklığının 120 °C çıkarılmasıyla biyodizel üretiminin ortamdaki su varlığından etkilenmediği, %100'ün üzerinde biyodizel verimi ve biyodizeldeki ester içeriğinin ise %87'in üstünde olduğu raporlanmıştır. Biyodizel verimindeki bu beklenmedik sonucun ortamdaki serbest yağ asidi ve triaçilgliseritlerin dışındaki fosfolipit gibi diğer bileşenlerinde biyodizele dönüşmüş olması olarak açıklanmıştır. Çalışma, transesterifikasyon reaksiyonunun yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesinin, suyun negatif etkisini ortadan kaldırdığını ve artan reaksiyon sıcaklığıyla reaksiyonların daha hızlı ve daha etkin bir şekilde gerçekleştiğini belirtmektedir. [Cao et al., 2013].

İkincil arıtım evsel atıksu ortamında üretilen karışık mikroalg biyokütlesinden biyodizel üretilebilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada, asit katalizör varlığında direkt transesterifikasyon yöntemi kullanılmış ve elde edilen mikroalgal biyodizelin yağ asidi metil esteri içeriğinin biyodizel standartlarına uygun ve iyi kalitede bir yakıt olabileceği raporlanmıştır [Soydemir et al., 2016].

2.3. Fermentasyon ve Biyoetanol Üretimi

Günümüzde yaygın biyoetanol üretimi, kullanılan biyokütledeki selüloz, hemiselüloz ve nişastanın çeşitli ön işlemler yardımıyla parçalanarak monomerik şekerlere (glukoz, mannoz, galaktoz, vb.) dönüştürülmesi ve elde edilen bu basit şekerlerin çeşitli mikroorganizmalar tarafından alkol fermentasyonuna uğratılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Neredeyse tüm karbonhidrat türleri, potansiyel bir biyoetanol kaynağıdır.

Geleneksel biyoetanol üretiminde sıklıkla şeker kamışı ve mısır gibi tarla bitkileri kullanılmaktadır [Keeney, 2009]. Fakat son yıllarda gıda sektöründe, bu bitkilerin biyoetanol üretiminde kullanımı ile oluşan rekabet ortamının ortadan kaldırılması amacıyla lignoselülozik biyokütleden (bitkilerin odunsu kısımlarından) yakıt üretimi amaçlanmaktadır. Lignoselülozik biyokütlenin başlıca kaynakları, tarımsal atıklar, orman budama atıkları veya orman ürünleri işleme atıklarıdır (yaprak, talaş, ekin sapı, mısır ve şeker pancarının kullanılmayan kısımları, vb.). Hammaddesinin gıda ürünü olmaması nedeniyle lignoselülozik biyokütlenin,

biyoetanol üretimi için uygun bir hammadde olduğu düşünülmüştür. Ancak lignoselülozik biyokütle yapısında yer alan ligninin, biyokütleden ayrıştırılması oldukça zor ve ekonomik olmayan bir süreçtir [Dragone et al., 2010].

Bu nedenle besin değeri olmayan, hızlı büyüme kabiliyetine sahip ve alan ihtiyacı çok düşük yenilenebilir bir biyokütle kaynağı olarak mikroalgler, potansiyel biyoyakıt hammaddesi haline gelmiştir [Li et al., 2008]. Selülozik ve hemiselülozik hücre duvarları ve nişasta ihtiva eden hücre içi organik yapıları mikroalgleri alternatif bir biyoetanol kaynağı olarak karşımıza çıkarmaktadır. Kuru mikroalg hücresinin yaklaşık %70'i [Hu et al., 1998] polisakkaritlerden meydana gelmekte olup bu kütlenin yaklaşık %65'i biyoetanole dönüştürülebilmektedir [Yang and Wyman, 2008].

Biyokütleden biyoetanol üretimi temelde iki adımda gerçekleşmektedir: (1) Mikroalglerin ön arıtımı ve hidrolizi, (2) Basit şekerlerin fermentasyonu ve alkol distilasyonu.

2.3.1. Biyokütlenin Ön Arıtımı

Mikroalg hücre duvarı ve hücre içi organik yapının parçalanması yoluyla hücredeki tüm selüloz ve hemiselülözün hücre dışına salınması daha sonra gerçekleştirilecek olan fermantasyon etkinliği açısından son derece önemlidir. Mikroalg bünyesinde bulunan polisakkaritlerin, maya hücreleri tarafından besin olarak biyoetanol fermantasyonunda kullanılması bu polisakkaritlerin glikoz gibi basit şekerlere parçalanması ile mümkün olmaktadır. Ön arıtım yöntemleri ile hemiselülözün hidrolize edilmesi, selülözün kristalliğinin azaltılması ve yüzey alanının genişletilmesi hedeflenmektedir [Karagöz, 2013]. Literatürde, hücresel polisakkaritlerden glikoz eldesinde, standartlaşmış bir yöntem olmaması nedeniyle pek çok araştırmacı tarafından farklı ön arıtım metotlarının uygulandığı çeşitli çalışmalar yer almaktadır. Bu ön arıtım metotları fiziksel (cam bilye, ultrases vb.), kimyasal (alkali, asidik), termal (yüksek sıcaklık) ve biyolojik (enzimatik) olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3.1.1. Fiziksel Yöntemler

Kurutulan ve öğütülerek toz haline getirilen biyokütlenin termal, ultrases dalgaları ya da mikrodalga uygulamaları ile parçalanmasını hedefleyen ve hiçbir kimyasal ilave gerektirmeyen avantajlı bir yöntem olarak görülmektedir [Kim et al., 2012; Zhao et al., 2013].

2.3.1.1.1. Hidrotermal Ön Arıtım

Mikroalglerden hidrotermal ön arıtım ile biyoetanol üretiminin amaçlandığı bir çalışmada *Schizocytrium* türü mikroalg kullanılmıştır. Ağırlıkça %5-25 biyokütle içeren mikroalg çözeltisi 60-180 °C sıcaklık ve 30-60 dakika sürelerde termal arıtıma tabi tutulmuştur. Glikoza dönüşüm veriminin en yüksek olduğu (ağırlık bazında % 16,6) şartlar, % 25 biyokütle içeren mikroalg çözeltisi için 115 °C sıcaklık ve 46,7 dakikalık reaksiyon süresinde elde edilmiştir. Ön arıtım sonrasında biyokütle üzerine enzim (α -amilaz) ve mikroorganizma (*E. coli*) eklenerek eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda 25,7 g glikoz/L'den 11,8 g etanol/L üretildiği rapor edilmiştir [Kim et al., 2012].

Trzcinski ve arkadaşları, (2012) farklı büyüme seviyelerindeki Diatomlardan karbonhidrat ekstraksiyonu ve karbonhidratın hücresel enzimlerle (*in situ*) glikoza dönüştürülmesini araştırmıştır. Hücresel karbonhidratın glikoza dönüştürülmesinde çeşitli ön arıtım (asit hidroliz, Fransız presi, bilye öğütücü, otoklav, sonikasyon, mikrodalga, mantarsal ve bakteriyel hidroliz ve enzimatik hidroliz) yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada glikoza dönüşümün sadece sıcaklık (30-100 °C) kullanılarak da sağlanabildiği raporlanmıştır. Su banyosu kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalarda hem hücresel karbonhidratın ekstraksiyonu hem de bu karbonhidratların yine hücrelerden salınan enzimler ile glikoza dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Çalışmada farklı büyüme evrelerinde üretilen karbonhidrat miktarının değiştiği ve en yüksek karbonhidrat birikiminin, hasatlamadan hemen öncesinde %20 (KBB) olduğu ve %75 glikoza dönüşüm verimi sağlandığı raporlanmıştır. Ekstraksiyon ve glikoza dönüşüm için 55°C ve 20 saat reaksiyon süresinin yeterli olduğu daha yüksek sıcaklıklarda ise hücrelerden salınan enzimlerin aktivitelerini kaybettiği ve daha

düşük sıcaklıklarda ise ortamda bulunan bazı istilacı türlerin glikozu tükettiği raporlanmıştır [Trzcinski et al., 2012].

Miao ve arkadaşları, (2012) *Chlorella sorokiniana* türü mikroalglerden polisakkarit ve lipit eldesinde direk ve ardışık hidrotermal sıvılaştırma yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Maksimum polisakkarit ekstraksiyon verimi %32 olarak ardışık hidrotermal sıvılaştırma yönteminin 1:9 biyokütle: su içeriğine sahip çözeltinin 160 °C’de 20 dakika işleme tabii tutulması ile elde edilmiştir. Ardışık hidrotermal sıvılaştırma yönteminin direk hidrotermal sıvılaştırmaya nazaran %15 daha ekonomik olduğu raporlanmıştır. Yine enerji geri kazanımı açısından da ardışık hidrotermal sıvılaştırma yöntemin %4 daha verimli olduğu belirtilmiştir [Miao et al., 2012].

2.3.1.1.2. Ultrases ile Ön Arıtım

Kavitasyon milisaniye gibi çok sınırlı sürelerde mikro kabarcıkların oluşması, büyümesi ve parçalanmasıyla, büyük miktarda enerji açığa çıkması olarak tanımlanmıştır [Gogate and Pandit, 2004]. Yeterince büyük şiddetli ultrases dalgalarının çözeltide mikro kabarcıklar yarattığı ve böylelikle sıvı içinde bulunan katı cisimlerin ve bakterilerin parçalanabildiği raporlanmıştır [Günaydın, 2010]. Ultrasesin bu parçalayıcı etkisinin, mikroalglerin hücre duvarı ve hücre içi polisakkaritlerin parçalanarak biyoetanol üretimi için ön arıtım yöntemi olarak kullanılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Woods ve arkadaşları, (2011) *Cladophora* türü yeşil alg türünden protein ve karbonhidrat ekstraksiyonunu için ultrases ve ultrases ile birlikte hücre aşındırıcı madde kullanımının ekstraksiyon verimi üzerindeki üzerinde ki ortak etkisi araştırılmıştır. Aşındırıcı madde olarak 0,1 mm silika ve 1 mm nehir kumu kullanılmıştır. Çalışmada ultrases ile birlikte aşındırıcı madde kullanımının ekstraksiyon için daha etkin olduğu gösterilmiştir. Ultrases ile birlikte nehir kumunu kullanılması ile karbonhidrat salınımının 1,6 kat arttığı raporlanmıştır [Woods et al., 2011].

Mikroalglerden elde edilecek karbonhidratın etanol fermantasyonu için kullanılmasının amaçlandığı bir çalışmada hücresel karbonhidratın parçalanıp glikoza dönüştürülmesinde ultrases destekli ekstraksiyon, solvent ekstraksiyonu ve

akışkan yatak ekstraksiyonu metotlarının karşılaştırılması yapılmıştır. Değişen ekstraksiyon koşullarının karşılaştırıldığı çalışmada, en yüksek ekstraksiyon verimi hücre konsantrasyonu 0,3 g/L olan mikroalg çözeltilisine yaklaşık 0,6 kWh/L güçte ultrases enerjisi uygulanmasıyla elde edilmiştir. Çalışmada glikoza dönüşüm veriminin %36,9 g glikoz/g biyokütle olarak bulunduğu raporlanmıştır [Zhao et al., 2013].

2.3.1.2. Kimyasal Yöntemler

Mikroalg çözeltilisinin bir kimyasal (asit ya da alkali) ile yüksek sıcaklık ya da basınç altında muamele edilmesine dayanmaktadır. Böylece hücresel selüloz ve hemiselülozun parçalanması sağlanmaktadır. Literatürde mikroalglerden biyoyakıt eldesinde, kimyasal ön arıtım yöntemlerinin kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaları asit ya da alkali ön arıtım çalışmaları olarak sınıflandırmak mümkündür.

2.3.1.2.1. Asit ile Ön arıtım

Asit ile ön arıtım işlemi, hücrede yer alan selüloz ve hemiselülozun parçalanması ve hücre dışına salınmasında, derişik ya da seyreltik (sülfürik, perklorik veya hidroklorik) asit çözeltileri kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Literatürde lignoselülozik biyokütlenin asit ile ön arıtmada, yüksek sıcaklık-seyreltik asit ve düşük sıcaklık-derişik asit kullanımı olmak üzere iki farklı yöntem uygulandığı görülmektedir [Saha et al., 2005; Hayashida, 1974, Janssens et al., 1983]. Mikroalglerin asit ile ön arıtımında ise derişik asit kullanımından ziyade yüksek sıcaklıklarda seyreltik asidin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Mikroalglerin asitle ön arıtımından sonra elde edilen biyoetanol veriminin ön arıtım sıcaklığı ile doğrudan bağıntılı olduğu bildirilmiş [Grohmann, 1986; Harun et al., 2011], 140 °C altında yeterli düzeyde parçalanmanın sağlanamadığı ve 180 °C üzerinde ise fermente edilebilen şekerlenin parçalandığı raporlanmıştır. En uygun sıcaklığı 140-160 °C olduğu belirtilmiştir. Ayrıca seyreltik asit kullanımının, derişik asit kullanımına nazaran daha kısa sürede reaksiyonun tamamlanmasını sağladığı belirtilmiştir. Asit konsantrasyonunun ve reaksiyon süresinin artırılması ile fermente

edilebilen şekerlerin parçalanabildiği raporlanmıştır [Broder et al., 1995; Saha et al., 2005; Harun et al., 2011]. Bununla birlikte derişik asit kullanılarak gerçekleştirilen ön arıtım sonrası protein, lipit gibi hücre içi organik maddelerin de biyoetanole dönüşebileceği bildirilmiştir [Hayashida, 1974; Janssens et al., 1983; Harun et al., 2011].

Nguyen ve arkadaşları, (2009) *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 isolatından elde edilen karbonhidratın biyoetanole dönüştürülmesinde asit ön arıtım yöntemini değişen reaksiyon koşullarında incelemişlerdir. Biyokütle içeriği % 5 olan mikroalg çözeltisi üzerine final konsantrasyonu % 1-5 (h/h) olacak şekilde sülfürik asit ilave edilmiş, 100-120 °C’de 15-120 dk süreyle hidroliz reaksiyonu takip edilmiştir. Sonuç olarak biyokütleden glikoza dönüşüm oranı % 58 (ağırlık bazında) olarak, 110 °C’de 30 dakikalık reaksiyon süresinde % 3 sülfürik asit ile ön arıtım sonrasında elde edilmiştir. Asit ile ön arıtım sonrasında *Saccharomyces cerevisiae* S288C mayası kullanılarak 30 °C’de 24 saat fermantasyona tabi tutulan biyokütleden % 29,2 (ağırlık bazında) biyoetanol elde edildiği raporlanmıştır. Biyokütlenin asit ile ön arıtım sonrasında fermantasyona tabi tutulmasının, düşük kimyasal maliyeti, düşük bekleme süresi ve uygulama kolaylığı açısından büyük sisteme geçişinin kolay olacağı belirtilmiştir [Nguyen et al., 2009].

Guo ve arkadaşları, (2013), Biyoetanol üretimi amacıyla 18 farklı mikroalg türündeki karbonhidrat birikimi üç farklı kültür (durgun, karıştırmalı, havalandırmalı) koşulunda incelenmiştir. En yüksek karbonhidrat sentezinin (0,11 g/L·gün) kültür ortamının havalandırılması ile sağlandığı belirtilmiştir. Biyokütlenin ön arıtımının asitle sağlandığı bu çalışmada pH ayarlaması yapıldıktan sonra çözelti üzerine selüloz, α -amilaz ve glikoamilaz enzimleri eklenmiş ve enzimatik hidrolizin tamamlanması sağlanmıştır. En yüksek etanol dönüşüm verimi asit ön arıtımı sonrası selüloz enzimin eklenmesi ile %10,3 g etanol/g biyokütle olarak *Scenedesmus abundans* PKUAC 12 türünde elde edildiği raporlanmıştır.

2.3.1.2.2. Alkali ile Ön Arıtım

Lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımında alkali kullanımı oldukça yaygın bir uygulamadır. Bunun için sodyum, potasyum, kalsiyum ve amonyum hidroksit gibi alkali bileşikler kullanılmaktadır. Alkali ön arıtım mekanizmasının hemiselüloz-

lignin arasındaki çapraz ester bağlarının sabunlaşması olduğuna inanılmaktadır. Alkali ön arıtımın en büyük etkisinin lignoselülozik biyokütledeki ligninin biyokütleden ayrıştırılması ve geride kalan polisakkaritlerin parçalanabilirliğinin kolaylaşması olduğu belirtilmektedir [Li et al., 2014]. Mikroalg bünyesinde lignin bulunmaması ve hücrenin rijit yapısı nedeniyle alkali ön arıtım mikrolaglerin ön arıtımı için tercih edilmemektedir. Ancak, bununla birlikte alkali ön arıtımın düşük sıcaklık ve basınç gereksinimi, fermantasyon esnasındaki inhibisyon derecesini düşürmesi ve diğer ön arıtım yöntemlerine nazaran daha düşük maliyete sahip olması nedeniyle mikrolaglerin hidrolizi için uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir [Rabelo et al., 2009; Harun et al., 2011]. *Chlorococcum infusionum* türü mikrolaglerden biyoetanol üretiminin amaçlandığı bir çalışmada, alkali ön arıtım yöntemi (%0,5-2 (a/h) NaOH çözeltisi) kullanılarak, mikroalg hücre duvarındaki polisakkaritlerin parçalanması ve bu polisakkaritlerin glikoza dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Mikroalg hücrelerinin yaklaşık olarak %44 oranında polisakkarit ihtiva ettiği ve bu miktarın %32,5'nin karbonhidrat, %11,3'nün nişasta yapısında yer aldığı belirtilmiştir. Mikroalg çözeltisi (5g alg/100 mL saf su) üzerine NaOH çözeltisinin %0,75 (a/h) oranında eklenmesi ve 120 °C 'de 30dk, 500 rpm de karıştırılması ile en yüksek glikoza dönüşüm verimi (%35 (KBB)) elde edilmiştir. Çalışmada biyoetanol fermantasyonu sonucunda biyokütleden %26,1 biyoetanol elde edildiği raporlanmıştır [Harun et al., 2011].

Alkali ön arıtım yönteminin uygulandığı bir başka çalışma ise *Spirogyra* türü mikrolaglerin hücre duvarında yer alan nişasta ve selülozun parçalanması üzerine gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kuru biyokütle üzerine %1'lik NaOH çözeltisi ilave edilerek 2 saat boyunca hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Kimyasal arıtmadan geçen hücreler üzerine doğal olarak selülaz ve amilaz enzimleri içeren bir mantar türü olan *Aspergillus niger* eklenmiş ve sakkarifikasyonun gerçekleşmesi için kültür 6 gün, 30 °C'de inkübe edilmiştir. Böylelikle hücrelerden salınan nişasta ve selülozun basit şekerlere dönüştürülmesi sağlanmıştır. Daha sonra aseptik koşullar oluşturularak *Aspergillus niger* ortamdan uzaklaştırılmıştır. Enzimatik hidroliz sonucunda oluşan bu basit şekerlerin biyoetanole dönüştürülmesinde %10'luk *Saccharomyces cerevisiae* çözeltisi kullanılmıştır. *Spirogyra* hücre duvarının hassas olması nedeniyle ön arıtım yapıldığında bir kısım karbonhidratın parçalandığı ve biyoetanol üretiminin düştüğü, bu nedenle ön arıtım yapılmasının tavsiye edilmediği

belirtilmiştir. Bu çalışmada ön arıtım sonrası en yüksek biyoetanol dönüşümünün %8 g etanol/g hücre olduğu raporlanmıştır [Eshaq et al., 2010].

2.3.1.2.3. Karbondioksit Patlaması

Karbondioksit patlaması buhar ve amonyak patlamasıyla aynı prensibe dayanmaktadır ve CO₂'in yüksek sıcaklık ve basınç altında karbonik aside dönüştürülmesi ve oluşan karbonik asidin biyokütlenin hidrolizinde kullanılmasıyla sağlanmaktadır. Ön arıtım olarak bu metodun, buhar ve amonyak patlaması metodlarına kıyasla daha düşük verime sahip olmasına rağmen amonyak patlamasına göre daha ekonomik ve buhar patlamasının tersine hiç inhibitör ürün meydana getirmediği tespit edilmiştir [Sun and Cheng, 2002]. Bu metodun mikroalg biyokütlesi üzerinde kullanılmasının getireceği olası avantaj, mikroalglerin fotosentez için ihtiyaç duyduğu karbondioksiti proses sonucunda ortamda kalan karbondioksit ile karşılayarak çevreye olan olası zararı bertaraf edilebilmesidir.

Harun ve arkadaşları, (2010) *Chlorococum* türü mikroalglerin biyoetanol fermantasyonu için süper kritik karbondioksit metodunun uygunluğu değişen fermantasyon koşullarında araştırılmıştır. Çalışma hücrelerden lipit ekstraksiyonu yapılmadan ve yapıldıktan sonra olmak üzere iki farklı şekilde yürütülmüştür. Mikroalg hücrelerinin parçalanması 60 °C sıcaklıkta 400 mL/dk karbondioksit geçirilmesi ile sağlanmış ve sonrasında lipit ekstraksiyonu yapılmıştır. Lipit ekstraksiyonu yapılmayan biyokütle 60 °C'de kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Her iki şekilde elde edilen biyokütle, 10 ve 30 g/L olmak üzere iki farklı başlangıç konsantrasyonunda biyoetanol fermantasyonuna tabi tutulmuştur. En yüksek biyoetanol verimi 30 °C ve 10 g/L başlangıç hücre konsantrasyonunda %38,3 biyoetanol/biyokütle olarak elde edilmiştir. Başlangıç biyokütle konsantrasyonunun 30 g/L'ye çıkarılmasıyla, maya hücrelerince üretilen biyoetanolün, yine bu hücreler üzerinde toksik etkiye neden olduğu (ürün inhibisyonu) bu nedenle de biyoetanol üretim veriminin düştüğü raporlanmıştır. En uygun fermantasyon sıcaklığının 30 °C olduğu, bu sıcaklığın üzerindeki koşulların maya hücrelerinin ölmesine ve biyoetanol verimin düşmesine neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca fermantasyonda kullanılan mayanın yetiştirildiği ortamın (Luria ve Terrific Broth) biyoetanol üretimi üzerindeki etkisinin önemli olduğu, *Saccharomyces bayanus* mayasının fosforca zengin (Terrific

Broth) besi ortamında yetiştirilmesi ile daha yüksek biyoetanol dönüşümü sağladığı raporlanmıştır [Harun et al., 2010].

2.3.1.2.4. Ozon ile Ön arıtım

Ozon; lignin ve hemiselüloz yapısındaki çift bağları kırarak, lignoselülozik biyokütlenin düşük molekül ağırlığına sahip ve çözünebilir forma dönüşmesini sağlar. Biyokütle yapısının bu şekilde açılmasıyla enzimatik hidrolizin etkinliği artar ve daha yüksek şeker geri kazanımı elde edilir. Biyokütlenin ozonlanmasında oda sıcaklığı ve atmosfer basıncının yeterli olması ve ozonlama sonrası kalıntı ya da fermentasyonu inhibe edici hiçbir toksik madde oluşmaması bu yöntemi avantajlı kılmaktadır. [Bensah and Mensah, 2013; Karunanithy et al., 2014].

Literatürde lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımında ozon kullanımına dair çeşitli araştırmalar bulunmaktadır [Silverstein et al., 2007; García-Cubero et al., 2009]. Bu çalışmalardan birinde şeker kamışı küspesinden biyoetanol eldesinde biyokütlenin ön arıtımını ozon kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Ozonlamanın enzimatik hidroliz sırasında fermente edilebilir karbonhidrat miktarını önemli oranda arttırdığı görülmüştür. Çalışmada 0,09-0,32 g O₃/g biyokütle ozon dozları ve enzim NS NS50013 (selülaz) ve NS NS50010 (β-glukosidaz) enzim kompleksleri kullanılmıştır. En yüksek şeker dönüşüm verimi 0,21 g O₃/g biyokütle ozon dozunda elde edilmiştir. Kontrol numunesine oranla glikoz dönüşüm veriminin %6,6'dan %41,8'e, ksiloz dönüşüm veriminin ise %2,1'den %52,4'e çıktığı görülmüştür. Ayrıca ozonlama sonrası çözeltide fermentasyonu inhibe edici (furfural, hidroksimetilfurfural, vb.) hiçbir toksik madde oluşumu görülmemiştir. Bu çalışma lignoselülozik biyokütleden biyoetanol eldesinde ozon kullanımının, etkin ve gelecek vaadeden bir yöntem olduğu göstermektedir [Travaini et al., 2013]. Ancak literatürde mikroalglerin ön arıtımında ozon kullanımına dair bir çalışma bulunmamaktadır.

2.3.1.3. Biyokimyasal Yöntemler

Biyokimyasal ön arıtım yöntemi; Doğal yapısında çeşitli enzimler (selüloz, amilaz, lakkaz v.b) ihtiva eden mikroorganizmalardan (kahverengi, beyaz yumuşak çürükçül mantarlar ve bakteriler) izole edilen enzimlerin, yoğunlaştırılarak biyokütle arıtımında kullanılmasıyla gerçekleştirilir.

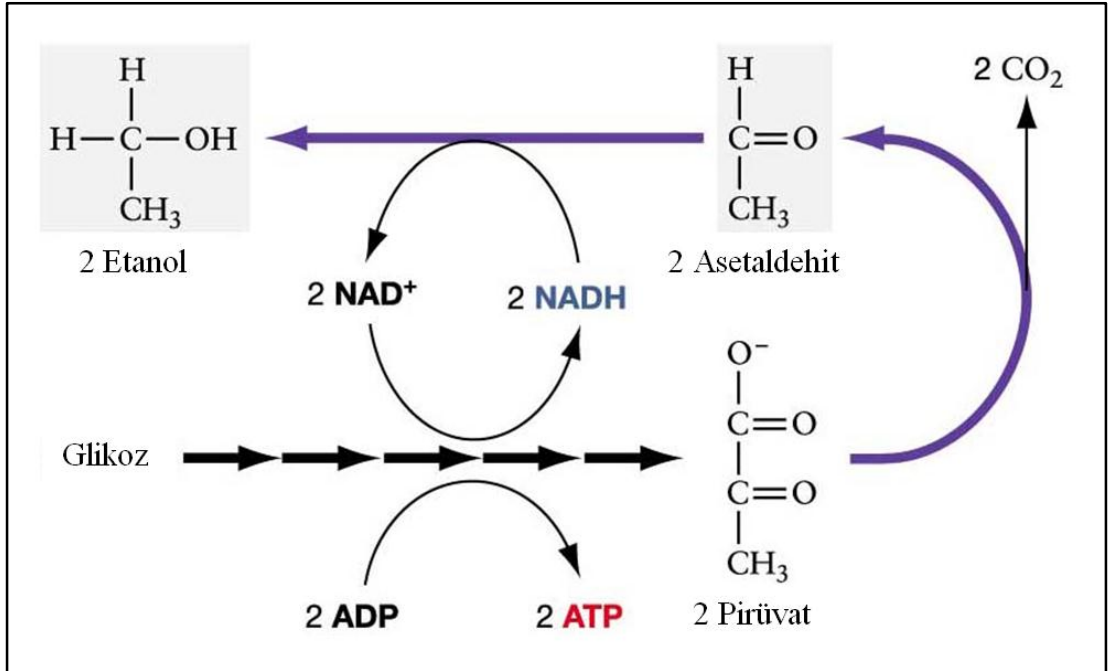
2.3.1.3.1. Enzimatik sakkarifikasyon

Biyokütlenin çeşitli ön arıtım yöntemlerinden geçirilerek parçalanmasının ardından ortama salınan polisakkaritlerin, spesifik enzimler kullanılarak basit şekerlere dönüştürülmesidir. Bu doğrultuda, genel adıyla selüloz ve hemiselüloz enzimleri kullanılmaktadır. Enzimatik sakkarifikasyon, temiz ve substrata özgü olması nedeniyle kimyasal yöntemlere nazaran daha verimli bir proses olarak görülmektedir [Karagöz, 2013]. Literatürde lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidroliz ile sakkarifikasyon ve fermantasyonunun gerçekleştirildiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [Karagöz, 2013]. Ancak mikroalg üzerinde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Mikroalglerden biyoetanol eldesinde enzimatik hidroliz metodunun uygulandığı bir çalışmada, mikroalg hücre duvarının parçalanmasına gerek duyulmadan, hücre içi nişastanın tamamının glikoza dönüştürülmesinde α -amilaz ve amiloglukosidaz enzimleri kullanılmıştır. *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 türü mikroalglerin kullanıldığı bu çalışmada hücrelerin karbonhidrat içeriğinin %59,7 olduğu raporlanmıştır. Enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, reaksiyon süresi gibi parametrelerin değişen kombinasyonları hem sıvılaştırma hem sakkarifikasyon reaksiyonları için uygulanmıştır. Mikroalg çözeltisi %5 katı içerecek şekilde su ile hazırlanmış ve sıvılaştırma reaksiyonu için çözeltiye %0,0001-0,02 oranında α -amilaz ilave edilerek hidroliz reaksiyonunun gerçekleşmesi sağlanmıştır. En yüksek verim %0,005 enzim konsantrasyonunda, 90 °C de 30 dk sonunda 25,21 g dextrin/L olarak elde edilmiştir. Hücrelerin hidrolizi sonrasında 0,001-0,3% (h/a) amiloglukosidaz eklenerek sakkarifikasyonun tamamlanması gerçekleştirilmiştir. Sakkarifikasyon reaksiyonu için en yüksek verim %0,2 enzim konsantrasyonunda, 55 °C’de, pH 4,5’te ve 30 dk sonunda 11,7 g etanol/L olarak elde edilmiştir. Uygulanan

bu işlemler sonrasında mikroalg biyokütlesinin %29,2 biyoetanole dönüştüğü raporlanmıştır [Choi et al., 2010].

2.3.2. Biyoetanol Üretimi

Biyoetanol üretimi en genel tabiriyle çeşitli ön işlemler sonucu monosakkaritlerine (glukoz, ksiloz v.b) kadar parçalanmış biyokütlenin oksijensiz solunum prosesi sonucunda etanole dönüştürülmesidir. Şekil 2.2’de şematik olarak biyoetanol üretimini gösterilmektedir [Web 1, 2015].



Şekil 2.2: Fermentasyonla etanol üretim süreci.

Biyoetanol fermentasyonunda genellikle maya (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Pichia stipitis*) ya da bakteri (*Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*) hücreleri kullanılmaktadır. Kullanılan mikroorganizma türüne bağlı olarak fermentasyon prosesinin sıcaklığı (35-40 °C) ve süresi (2-24 saat) değişim gösterebilmektedir. Fermentasyon prosesinin tamamlanması, istenilen düzeyde biyoetanol dönüşümü ve mikroorganizmanın reaksiyon sırasında inhibe olmaması için, kullanılacak mikroorganizma türünün, biyokütle yapısındaki selüloz, hemiselüloz, lignin vb. içeriğine uygun olacak şekilde seçilmesi gerekmektedir. Maya hücrelerinin mikroalglerden elde edilen basit şekerleri hızla tüketip

biyoetanole dönüştürdükleri ancak ortamda basit şekerlerin kalmaması durumunda maya hücrelerinin karbon kaynağı olarak biyoetanolu tüketmeye başladıkları görülmüştür. Bu nedenle fermantasyon süresine önemle dikkat edilmesi gerektiği belirtilmiştir. [Wasungu, 1982; Harun et al., 2011]. Ayrıca biyokütle konsantrasyonunun artırılması ile maya hücrelerinin metabolizmalarının aşırı yüklendiği ve oluşan etanolün maya hücreleri üzerinde toksik etkiye (ürün inhibisyonu) neden olduğu bildirilmiştir [Harun et al., 2010]. Bu nedenle fermantasyonda kullanılacak maya/biyokütle oranı ve fermantasyon süresi oldukça önemlidir.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Mikroalglerin Üretimi

Çeşitli doğal su ortamlarından toplanan ve mikroalg içeren su örnekleri laboratuvarında 20 L'lik havuzda, sürekli aydınlatma altında ve 20 ± 2 °C sabit sıcaklıkta pH 7-7,5 aralığında BG11 besi ortamına alınmış ve aklımasyonlarının sağlanması amacıyla on beş gün süreyle beklenmiştir. Havuzdaki karışım havuz tabanına yerleştirilen difüzörlerden hava verilerek sağlanmıştır. Bu karışım sayesinde mikroalglerin kendiliğinden çökelmeleri engellenmiş ve havuz içindeki karışımın nisbeten eşit düzeyde ışık alması sağlanmıştır. BG11 besi ortamının hazırlanmasında Tablo 3.1'de verilen temel besin maddeleri ve iz elementler kullanılmıştır. Hazırlanan her 1 L BG11 besi ortamı çözeltisine 1 mL iz element çözeltisi eklenmektedir.

Tablo 3.1: BG11 sentetik kültür ortamının içeriği.

Besin kategorisi	Kimyasal	Konsantrasyon (mg/L)
Temel besin maddeleri	Sodyum nitrat (NaNO_3)	1500
	Dipotasyum fosfat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	40
	Magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	75
	Kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36
	Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	6
	Demir amonyum sitrat ($(\text{NH}_4)_5\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2$)	6
	Disodyum EDTA (Na_2EDTA)	1
	Sodyum karbonat (NaCO_3)	20
İz element çözeltisi	Borik asit (H_3BO_3)	2,86
	Manezyum klorür ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1,81
	Çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,222
	Sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,390
	Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,079
	Kobalt (II) nitrat ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,0494

Aklımasyon süresince biyokütlenin çoğalması optik yoğunluk ve askıda katı madde analizi yapılarak kontrol edilmiştir. Havuzların aydınlatılması için gün ışığı spektrumuna sahip olan flouresan lambalar (85 W Philips Master TL-D-90 Graphica ve 18 W Osram Lumiux de Luxe) kullanılarak havuz yüzeyinde 150 µmol foton/m²·sn fotosentetik aktif radyasyon (FAR) yoğunluğu sağlanmıştır. Havuzlardaki ışık yoğunluğunun ölçümünde FAR metre (Licor, LI193-SA) kullanılmıştır. Mikroalgal hücre konsantrasyonu, OY₆₈₄ ölçümü ve AKM-OY₆₈₄ kalibrasyon eğrisinden (Ek B, Şekil B1.1) elde edilen

$$C_b = 526,3 \times OY_{684} \quad (3.1)$$

bir eşitlik yardımıyla tespit edilmiştir. Burada C_b biyokütle konsantrasyonunu (mg/L) ve OY_{684} 684 nm'deki optik yoğunluğu göstermektedir.

Tez çalışmasının büyük bir bölümünde BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır. Bu karışık kültürü oluşturan mikroalg türlerinin belirlenmesi Carl Zeiss Marka, Dijital kamera ataçmanlı, Axio Scope Trinoküler Faz-Kontrast Mikroskop kullanılarak yapılmıştır.

BG11 besi ortamında yetiştirilen mikroalg kültürün yanı sıra, biyolojik olarak arıtılmış evsel atıksuda yetiştirilen karışık mikroalg kültürü kullanılarak karşılaştırma deneyleri yürütülmüştür (Bölüm 3.3.2 ve Bölüm 3.3.3). Atıksuda mikroalg üretimi için, BG11 sentetik besi ortamında 500 mg/L biyokütle konsantrasyonuna erişildikten sonra havuzdan 500 mL alınarak, biyolojik arıtılmış 20 L'lik havuzlardaki evsel atıksu içerisine ekim yapılmıştır. Mikroalglerin atıksuda yetiştirilme koşulları, sentetik besi ortamındaki koşullarla aynı tutulmuştur. Havuz hacminin sabit tutulması ve aynı zamanda mikroalgler için gerekli besinin sağlanması amacıyla buharlaşan su yerine her gün 500 ile 1000 mL arası atıksu ilavesi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan evsel atıksu İstanbul'un Çekmeköy ilçesinde bulunan ve İstanbul Su ve Kanalizasyon İşletmesi (İSKİ) tarafından işletilen Ömerli Biyolojik Evsel Atık Su Arıtma Tesisi çıkış suyudur. Atık suyun genel karakteri Tablo 3.2'de verilmektedir. Atıksuda üretilen mikroalgal hücre konsantrasyonu, AKM-OY₆₈₄ kalibrasyon eğrisinden (Ek B, Şekil B1.2) elde edilen bir eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

Tablo 3.2: Atıksuya ait parametreler ve değerleri.

Parametre	Birim	Değer
pH		7,4
Çözünmüş oksijen (O)	mg/L	8,4
Alkalinite	mg/L	110
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)	mg/L	34
Biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ ₅)	mg/L	6
Amonyak azotu (NH ₃ - N)	mg/L	0,24
Nitrat azotu (NO ₃ ⁻ -N)	mg/L	15,6
Fosfat fosforu (PO ₄ ³⁻ -P)	mg/L	1,9
Toplam azot (TN)	mg/L	17
Toplam karbon (TC)	mg/L	50,5
Toplam inorganik karbon (TIC)	mg/L	37,8
Toplam organik karbon (TOC)	mg/L	12,7

3.2. Mikroalglerin Hasatlanması

Mikroalglerin bulundukları su ortamından ayrıştırılmasında ozonlama ve ultrases uygulamaları kullanılmıştır. Bu yöntemler ilerleyen bölümlerde sırasıyla anlatılmaktadır.

3.2.1. Mikroalglerin Hasatlanmasında Ozon Kullanımı

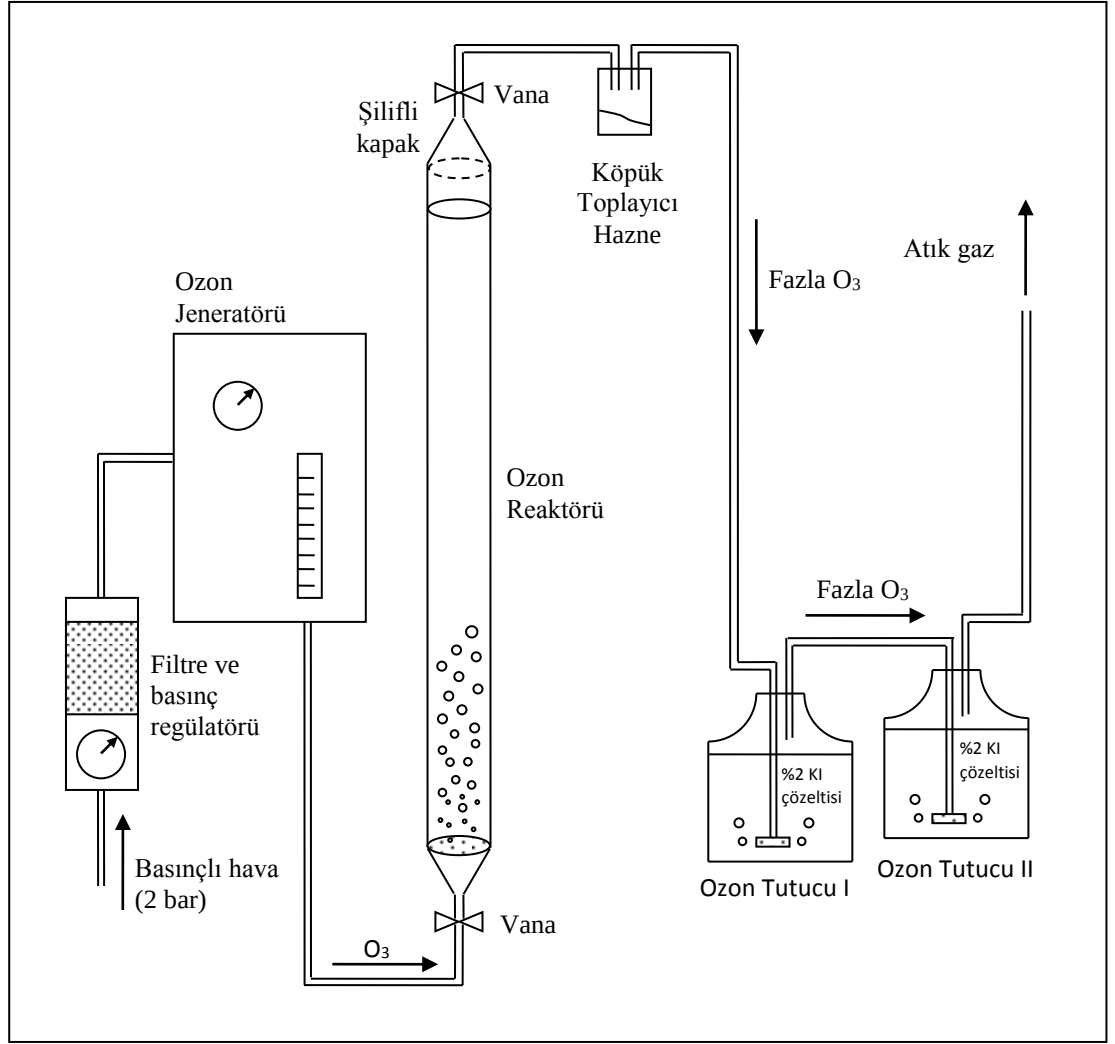
Ozon kullanılarak mikroalglerin hasatlanması ve hücre içi değerli organiklerin süzüntüye taşınarak çözeltiden ekstraksiyonunun sağlanması amacıyla bir dizi deney yürütölmüştür. Bu deneyler boyunca, uygulanan çeşitli ozon dozlarının hücre membran yapısında meydana getirdiğı parçalanma ve parçalanan hücrelerden süzüntüye (hücrelerden arındırılmış çözeltiliye) taşınan hücre içi organik madde (karbonhidrat, protein, lipit) miktarındaki değişim izlenmiştir. Ayrıca, ozonlama ile stabilitesi bozulan ya da parçalanan hücrelerin kendiliğinden çökme eğilimindeki değişim zamana bağlı olarak takip edilmiştir.

3.2.1.1. Ozon Üretimi ve Ozon Reaktörü

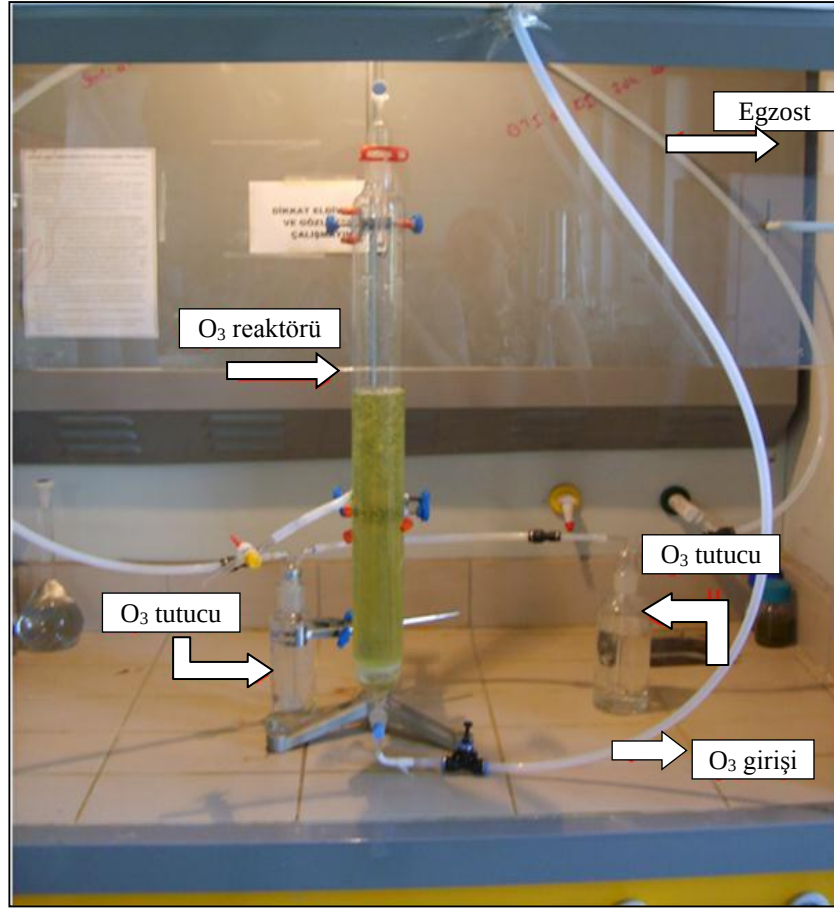
Ozonlama çalışmaları boyunca, ozon üretiminde yüksek ve düşük ozon üretim kapasitelerine sahip, iki ayrı ozon jeneratörü kullanılmıştır. Yüksek ozon üretim kapasitesine sahip olan ozon jeneratöründe (Kauffmann, OZ10-LSC) ozon üretimi basınçlı hava (2 bar) kullanılarak sağlanmaktadır. Jeneratör, öncelikle nem tutucudan ve basınç regülâtöründen geçerek gelen basınçlı havadan oksijeni ayırmakta daha sonra da ayırdığı oksijeni ozona dönüştürmektedir. Jeneratörün gaz üretim debisi 0,5-5 L/dk aralığında olup cihaza monte edilmiş bir debimetre yardımıyla ayarlanabilmektedir. Bölüm 3.5.3.'te anlatıldığı şekilde ozon dozu ölçüm metodu kullanılarak jeneratörün birim ozon üretim kapasitesi 40 mg O₃/dk olarak hesaplanmıştır. Diğerine göre daha düşük ozon üretim kapasitesine sahip olan ozon jeneratörü (BNP, YX-1000) ile yapılan ozon üretiminde atmosferik hava basıncına sahip olan ortam havası kullanılmıştır. Sisteme gelen hava, nem tutucu filtreden geçirildikten sonra jeneratöre iletilmektedir. Jeneratöre gelen havadan oksijen ayrıldıktan sonra oksijeninin ozona dönüştürülmesi sağlanmaktadır. Jeneratör, 1,4 L/dk debiye ve 1,3 mg O₃/dk birim ozon üretim kapasitesine sahiptir. Ozon jeneratörlerinin kapasitesi belirlenirken yarı kesikli ozon ölçüm metodu olan KI metodu (Standard Methods 2350-E) ve Potasyum indigotrisülfonat boyasının kullanıldığı kolorimetrik analiz (Standard Methods 4500 O₃-B) yöntemlerinden yararlanılmıştır. Bu yöntemlerle ilgili detaylı bilgi ve aralarındaki korelasyon grafiği Ekler bölümünde verilmiştir.

Ozonlama deneylerinin gerçekleştirildiği düzenek Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Ozon ile mikroalg hücrelerini içeren çözelti arasında temas süresini yeterli düzeyde sağlamak amacıyla, reaktör boyu mümkün olduğunca uzun tasarlanmış olup, 50 cm yüksekliğe, 6 cm çapa ve yaklaşık 1400 cm³ hacme sahip, cam malzemeden üretilmiştir. Reaktör, üst kısmındaki şilifli kapak kısmından doldurulmaktadır. Ozon gazı, üretilen ozon kabarcıklarının reaktör içine tamamen dağılmasını sağlayan ve ozona dayanıklı, cam, poroz bir taş içinden geçirilerek reaktör tabanından sisteme verilmektedir. Bu sayede ozonlanan çözeltinin tam karışımı ve yeterli düzeyde ozon ile reaksiyonu sağlanmaktadır. Bu süreçte olası bir taşma ve çözelti kaybının yaşanmaması için reaktör çıkışı "köpük toplayıcı hazneye" bağlanmıştır. Bu hazne daha sonra seri bağlanmış iki adet %2'lik potasyum iyodür

(KI) çözeltisi içeren ozon tutucuya bağlanarak ozonlama sırasında reaksiyona girmeden sistemden kaçan gaz miktarı ölçülebilmektedir. Ozon tutuculardan çıkan ozondan arındırılmış atık gaz bir baca yardımıyla dışarı atılmıştır. Ozonlama deney düzeneğinin bir fotoğrafı Şekil 3.2’ de gösterilmektedir.



Şekil 3.1: Ozonlama deney düzeneği (şematik).



Şekil 3.2: Ozonlama deney düzeneği.

3.2.1.2. Etkin Ozon Dozu Belirleme

Literatürde yer alan kısıtlı sayıdaki araştırmada, hasatlama amacıyla kullanılan ozon dozunun 0,005-1,0 g O₃/g kuru biyokütle (KB) aralığında değiştiği görülmektedir [Cheng et al., 2010; Cheng et al., 2011; Komolafe et al., 2014]. Bu çalışmalar göz önüne alınarak, yürütülen deneylerde hem düşük (0,01-0,03 gO₃/g KB) hem de yüksek (0,03-0,5 g O₃/g KB) ozon dozları kullanılmıştır. Belirlenen bu ozon dozları için ozon jeneratörünün çalıştırılma süresi

$$B_{O_3} = \frac{M_{O_3} \times t}{C_b \times V} \quad (3.2)$$

eşitliliği yardımıyla bulunmuştur. Burada B_{O_3} birim biyokütle ozonlama miktarını (g O_3 /g KB), M_{O_3} ozon üretim kapasitesini (g O_3 /dk), t ozonlama süresini (dk), C_b biyokütle konsantrasyonunu (g/L) ve V çözelti hacmini (L) temsil etmektedir.

Mikroalgler yetiştirilirken, atıksu yerine sentetik kültür ortamının kullanılması ile mikroalg biyokütlesinde hızlı bir artışın meydana geldiği, bu sayede ozonlama çalışmaları için gerekli yoğun biyokütle gereksinimin daha kolay sağlanabildiği görülmüştür. Bu nedenle yarı sürekli olarak gerçekleştirilen ozonlama çalışmalarında, BG 11 sentetik besi ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır.

3.2.1.2.1. Düşük Dozda Ozon Kullanımı

Mikroalg hücrelerinde meydana gelebilecek hücresel parçalanmanın takibi için başlatılan bu çalışmalarda; 0,01 g O_3 /g KB ozon dozu, 0,64, 1,00 g/L biyokütle konsantrasyonundaki mikroalg çözeltilerine uygulanırken, 0,02 ve 0,03 g O_3 /g KB ozon dozları sırasıyla 0,33 ve 0,5 g/L biyokütle konsantrasyonlarına sahip alg çözeltilerine uygulanmıştır. Her deney için 500 mL çözelti hacmi kullanılmıştır ve her deney kontrol amacıyla iki defa tekrarlanmıştır. Deneysel çalışmalar boyunca toplanan bütün numunelerin karbonhidrat, protein ve KOİ analizleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

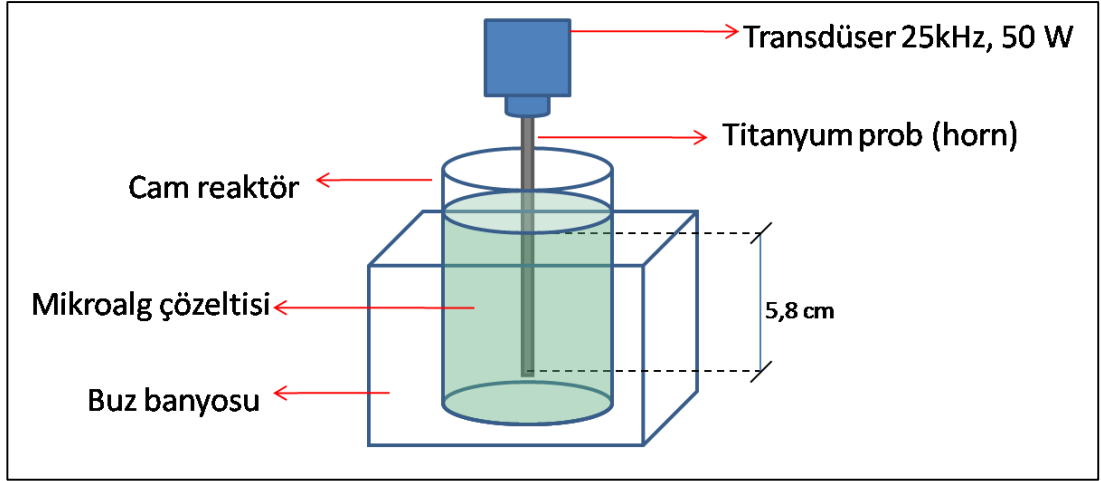
3.2.1.2.2. Yüksek Dozda Ozon Kullanımı

Yüksek dozdaki ozonlama çalışmalarında BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürün kullanıldığı ozonlama çalışmalarında 0,032-0,4 g O_3 /g KB ozon dozlarında 500 mg/L biyokütle konsantrasyonuna sahip 500 mL alg çözeltisi kullanılmıştır. Her deney iki defa tekrarlanmış ve çalışmalar boyunca toplanan tüm numunelerin karbonhidrat, protein ve KOİ analizleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

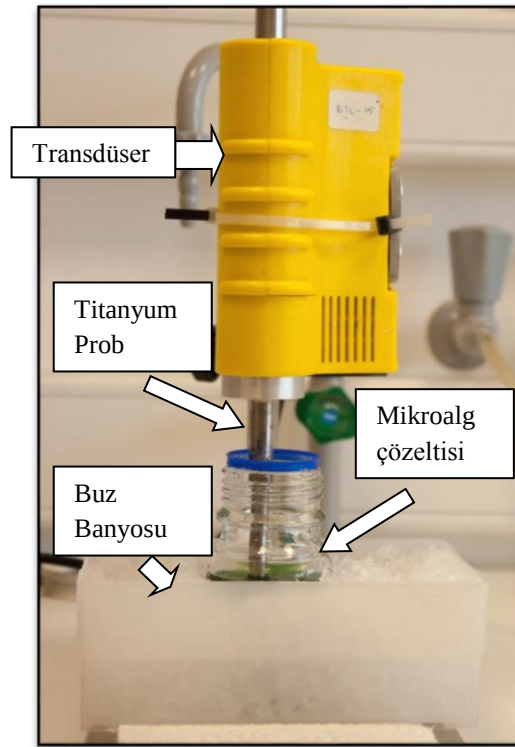
3.2.2. Ultrases Çalışmaları

Mikroalglerin hasatlanmasında kullanılan bir diğer yöntem ise ultrases uygulamalarıdır. Ozonlamanın kimyasal etkisinden farklı olarak, ultrases uygulamaları ses dalgalarının oluşturduğu titreşime dayanan fiziksel bir yöntemdir. Ancak ultrases dalgalarıyla çözeltide mikro kabarcıklar yaratılarak çözeltideki katı partiküllerin ve bakterilerin parçalanabilindiği bilinmektedir [Sivakumar and Pandit, 2001]. Ultrasesin bu özelliğinden yararlanılarak mikroalg hücrelerinin membran yapılarına zarar verilmesi hedeflenmiştir. Membran yapısında meydana gelen parçalanma neticesinde hücre içi organik materyalin (protein, karbonhidrat, lipit vb.) çözeltiye geçmesi ve süzüntüdeki (hücrelerden arındırılmış çözeltideki) organik madde konsantrasyonlarını arttırması beklenmektedir.

Ultrases uygulamalarının tamamında kullanılan Hielscher marka ultrases cihazına ait transdüser sabit 50 W gücünde olup güç ayarı yapılamamaktadır. Sistem ses frekansı 30 kHz'dir. US sistemine ait titanyum prob 5 mm çapında 78 mm boyundadır (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Deneysel çalışmaların tamamında ultrasese ve ısıya dayanıklı cam reaktörler kullanılmıştır. Transdüserin güç ayarının yapılamaması nedeniyle istenilen ultrases yoğunlukları (W/L) mikroalg çözeltisinin hacminin değiştirilmesi ile sağlanmıştır. Belirlenen ultrases yoğunluğu (örneğin 100 W/L) için gerekli hacimdeki (100 mL) mikroalg çözeltisi cam reaktöre alınmıştır. Ultrases probu çözelti yüzeyinden 58 mm içeri daldırıldıktan sonra transdüser çalıştırılmıştır. Reaksiyon süresi boyunca çözeltideki ısı takibi çözelti içine yerleştirilen harici bir termometre ile sağlanmıştır. Çözelti sıcaklığının artmasını engellemek için buz banyosuna belirli aralıklarla buz ilavesi yapılmıştır. Tüm reaksiyonlar boyunca çözelti sıcaklığı 20 ± 2 °C olacak şekilde kontrol altında tutulmuştur.



Şekil 3.3: Ultrases deney düzeneği (şematik).



Şekil 3.4: Ultrases deney düzeneği.

Uygulanan ultrases yoğunluğuna ve ultrasese maruz kalma süresine bağlı olarak mikroalg biyokütlesindeki değişim deneysel olarak incelenmiştir. Bu deneylerde iki farklı tip mikroalg kültürü kullanılmıştır: (1) evsel atıksuda yetiştirilen zamanla *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü (2) BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen zaman içinde *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü.

Deneyisel çalışmada, her iki kültür ortamından alınan 250 mg/L hücre konsantrasyonuna sahip mikroalg çözeltilerine beş farklı ultrases yoğunluğunda (100, 200, 300, 400 ve 500 W/L) ve her ultrases yoğunluğu için beş farklı süre boyunca (5, 15, 30, 45 ve 60 dk) ultrases uygulanmıştır. Mikroalg çözeltilerine uygulanan ultrases dozuna (UD) bağlı olarak, reaksiyon sonunda çözeltilerden alınan numunelerde optik yoğunluk (684 nm) ve AKM analizleri yapılmıştır. AKM analizi sırasında elde edilen süzüntü numunelerinde ise protein ve karbonhidrat analizleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan ultrases dozları

$$UD = \frac{P_u \times t_u}{KB} \quad (3.3)$$

eşitliği yardımıyla kWh/g KB cinsinden hesaplanmıştır. Burada P_u uygulanan ultrases şiddetini (kW), t_u ultrases uygulama süresini (saat) ve KB ultrasese maruz bırakılan çözeltideki toplam kuru mikroalg kütlesini (g) temsil etmektedir.

3.2.3. Ozonlama Sonrası Ultrases Kullanım Çalışmaları

Mikroalglerin sudan hasatlanması amacıyla kullanılan ozon ve ultrases uygulamalarının etkileri Bölüm 4.3 ve 4.4'te ayrı ayrı verilmiştir. Bu uygulamalardan elde edilen bilgiler değerlendirilerek ozon ve ultrasesin birlikte kullanılmasının mikroalglerin parçalanması üzerindeki ortak etkisinin belirlenmesine çalışılmıştır. Ultrases destekli ozon (O_3/US) uygulamasıyla daha düşük ozon dozlarında daha yüksek parçalama veriminin elde edilebileceği ve bu sayede ozonlamadan kaynaklanan maliyetin azaltılacağı öngörülmüştür.

Deney şartlarının belirlenmesinde Box-Behnken deneysel tasarımından ve bir önceki ozon ve ultrases uygulamalarından elde edilen sonuçlardan faydalanılmıştır. Bölüm 4.3.'te yer alan veriler incelendiğinde mikroalg hücrelerinin istenilen düzeyde parçalanmasının 0,1 g O_3 /g KB ve üstündeki ozon dozlarında gerçekleştiği görülmüştür. Daha düşük ozon dozlarında (0,03 g O_3 /g KB ve daha düşük) ise beklenen etki görülmemiştir. Bu nedenle düşük ozon dozunun ultrases ile desteklenmesiyle istenilen hücresel değişimin sağlanmasının mümkün olabileceği düşünülmüş ve O_3/US uygulaması hem düşük hem de yüksek ozon dozlarında

gerçekleştirilmiştir. Seçilen ozon dozları 0,03, 0,15 ve 0,27 g O₃/g KB şeklindedir. O₃/US çalışmalarında uygulanacak US gücü belirlenirken Bölüm 4.4'te yer alan bilgilerden yararlanılmıştır. Bu bölümde, mikroalg hücrelerindeki parçalanma veriminin en yüksek olduğu US gücünün 400 W/L olduğu belirtilmiş ve düşük US güçlerinde de hücre parçalanmasının sağlandığı belirtilmiştir. Düşük ultrases gücünün ozonla desteklenmesi ile istenilen hücresel değişimin sağlanabilmesi için uygulanacak US gücü 300, 400 ve 500 W/L olarak seçilmiştir. Ayrıca Bölüm 4.4'te ultrasese maruz kalma süresinin de hücresel parçalanmanın sağlanmasında etkin bir rol oynadığı bildirilmiştir. O₃/US çalışmalarında ultrasese maruz kalma süreleri 10, 20 ve 30 dakika olarak seçilmiş ve sürenin hücresel parçalanma üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışılan deneysel tasarım yönteminde incelenmek üzere seçilen parametreler ve bu parametrelere ait seviye değerleri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Deneysel tasarım yöntemi için kullanılan parametrelerin seviye değerleri.

Seviye	Ozon dozu (g O ₃ /g KB) (x ₁)	Ultrases yoğunluğu (W/L) (x ₂)	Ultrases uygulama süresi (dk) (x ₃)
-1	0,03	300	10
0	0,15	400	20
+1	0,27	500	30

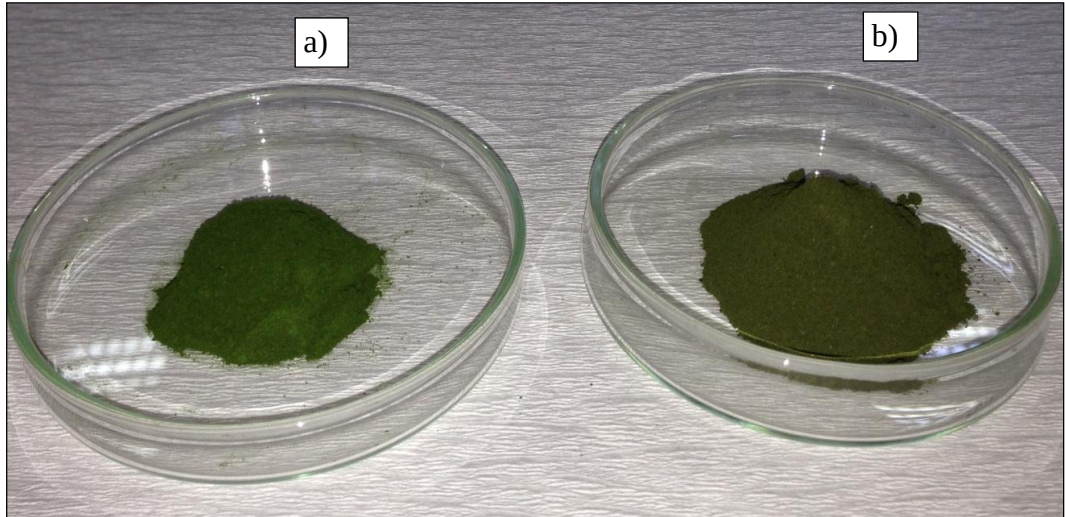
O₃/US deneylerinde 500 mg/L biyokütle konsantrasyonuna sahip BG11 kültür ortamında yetiştirilen ve *Chlorococcum* türlerinin baskın olduğu mikroalg kültürü kullanılmıştır. O₃/US çalışmaları, mikroalg çözeltisinin önce ozonlanması ve ardından ultrasese tabi tutulması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Mikroalg çözeltilerine ozon ve ultrases uygulanması sırasıyla Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Ozonlanan çözelti zaman kaybedilmeden ultrases reaksiyonlarının gerçekleştirileceği cam reaktöre alınmıştır.

3.3. Lipit Ekstraksiyonu

Mikroalg hücrelerini içeren çözeltide lipit (1) hücre bünyesinde (membran yapısında ya da hücre içinde) (2) sıvı fazda (parçalanmış ya da ölen hücrelerden dışarı taşınmış halde) bulunabilir. Her iki formdaki lipidin ekstraksiyonunda farklı ayırım yöntemleri kullanılmıştır.

3.3.1. Biyokütleden Lipit Ekstraksiyonu (Bligh and Dyer Metodu)

Lipit analizi çalışmalarında sentetik kültür ortamında (BG11 besi ortamı) yetiştirilen mikroalg biyokütlesi kullanılmıştır. Mikroalg çözeltisi 8000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı faz atılmıştır. Altındaki macun kıvamındaki yoğun biyokütle 40 °C'de etüvde 2 gün süre ile kurutulmuş, desikatörde sabit tartıma gelene kadar beklendikten (24 saat) sonra havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Şekil 3.5'te BG11 besin ortamı ve evsel atıksudan elde edilen kuru biyokütleler görülmektedir.



Şekil 3.5: Kurutulan ve toz haline getirilen mikroalg biyokütlesi, a) BG11 besin ortamında yetiştirilen türler, b) atıksuda yetiştirilen türler.

Mikroalgal biyokütlenin lipit içeriğinin gravimetrik olarak belirlenmesinde biyolojik materyallerden lipitin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan Bligh and Dyer metodundan faydalanılmıştır. Bligh and Dyer metodu % 80 sıvı içeriğine sahip numuneye klorofom/metanol/su (1:1:0,5, h/h) içeren çözeltilerin birkaç adımda

eklendikten sonra, numunenin 1 dk süre ile çok hızlı karıştırılması (vortex) ve ardından 1000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edilmesine dayanmaktadır. Böylece hücresel parçalanma ve yağ ekstraksiyonu sağlanmaktadır. Bu yöntem kullanılarak, BG11 besi ortamında üretilen mikroalgal biyokütle üzerinde yapılan lipid ekstraksiyonu ölçümlerinde oldukça düşük ve tekrarlanabilirliği olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Bunun üzerine Bligh and Dyer metodu, mikroalgal biyokütleyle çeşitli modifikasyonlarda (farklı biyokütle miktarları ve farklı çözücü miktarları için) uygulanmıştır. Bu sayede biyokütlerdeki lipidin biyokütleden ayrıştırılmasında güvenilir bir ekstraksiyon yönteminin oluşturulması hedeflenmiştir.

Yapılan denemeler sonrası belirlenen metot ve yöntem ise şu şekildedir: 25 mg kuru biyokütle 50 mL'lik falkon tüpüne alınır ve üzerine CHCl_3 /metanol/su (1:1:0,5, h/h) çözücüleri, toplam hacim 25 mL olacak şekilde birkaç adımda eklenir. Her çözücü ilavesinden sonra biyokütle-çözücü karışımı 2 dk hızlıca karıştırılır (vortex) ve ardından 75 °C su banyosunda 5 dk süre ile bekletilir. Biyokütle-çözücü karışımı 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek faz ayırımı sağlanır. Üst fazda metil alkol, su ve hücre parçaları yer alırken, alt fazda kloroform ve lipid bulunmaktadır. Alttaki faz (kloroform-lipit karışımı) cam pastör pipeti ile dikkatlice çekilir ve falkon tüpüne alınır. Karışım üzerine 2,5 mL saf su eklenerek tekrar hızlıca karıştırılır ve tekrar santrifüj edilir. Böylece kloroform ve lipid içeren karışım içinde kalan biyokütle artıklarının su fazına geçmesi ve karışımın yıkanması sağlanmış olunur. Bu işlem kloroform-lipit fazının tamamen berraklaşması sağlanana kadar yaklaşık 5 defa tekrarlanır. En son yıkama sonrası kloroform-lipit içeren faz, darası alınan numune şişesine koyulur. 40 °C'de çözücüsü uçurulan numunenin son tartımı alınır. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak ilk tartım (*A*) ve son tartım (*B*) arasındaki fark kuru biyokütle miktarına (*m*) bölünerek, kuru ağırlık bazında % lipid içeriği hesaplanır.

$$\% \frac{\text{Lipit}}{\text{Biyokütle}} = \frac{(A - B)}{m} \times 100 \quad (3.3)$$

Bu yöntem kullanılarak, BG11 besi ortamı ve evsel atıksuda yetiştirilen mikroalgal biyokütle üzerinde yapılan lipid ekstraksiyonuna ait veriler, Bölüm 4.2.1'de gösterilmektedir.

3.3.2. Mikroalg Çözeltisinden Lipit Ekstraksiyonu (Gravimetrik)

Mikroalg hücrelerinden çözeltiye geçen lipidin ekstraksiyonunda, Standard Metotlar 5520-B bölümünde yer alan lipit analiz yönteminden yararlanılmıştır. Standard Metot 5520-B’de yer alan *n*-hekzan ve Bligh and Dyer yönteminde yer alan kloroform/metanol karışımı kullanılarak lipidin çözeltiden ayrıştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, lipit ekstraksiyonunda farklı solvent kullanımının etkileride K/M ve *n*-hekzan karşılaştırılmasıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalarda BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü ve biyolojik arıtılmış evsel atıksuda (BAEA) yetiştirilen *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır

Karışık mikroalg kültüründen alınan 100 mL mikroalg çözeltisi üzerine 50 mL solvent (*n*-hekzan ya da kloroform/metanol karışımı) eklenmiş ve 5 dk boyunca hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi sonunda faz ayrımının sağlanması için çözelti ayırma hunisinde bekletilmiştir. Böylelikle mikroalg hücrelerin solventlerle reaksiyonu ve hücre yapılarının bozunması sağlanmıştır. Ekstraksiyonda kullanılan solvent sudan hafif (*n*-hekzan) ise lipit üst fazda, ağır (kloroform) ise alt fazda yer alır. Bu durum göz önünde bulundurularak faz ayrımı sağlanmıştır. Lipit içeren solvent önceden darası alınan cam balona alınmış ve su banyosunda vakum altında solventin uçurulması sağlanmıştır. Devamında ise cam balonun sabit tartıma gelmesi için desikatörde bir gün süre ile bekletilmiş ve tartımı alınmıştır. Numunedeki lipit aşağıda verilen eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$C_L = \frac{(A - B) \times 1000}{V} \quad (3.4)$$

Burada C_L çözeltideki lipit konsantrasyonunu, A lipit içeren cam balon joje ağırlığını, B cam balon jojeninin darasını ve V numune hacmini temsil etmektedir. Deneysel çalışmalara ait veriler Bölüm 4.3.1’de gösterilmektedir.

Mikroalg hücrelerinin normal yaşam döngüsü süresince parçalanmaları ya da ölmeleri neticesinde hücre içi organik materyalin (lipit, protein, karbonhidrat vb) çözeltiye geçmesi doğal olarak beklenmektedir. Bu nedenle öncelikle mikroalg hücre

yapısına solvent ilavesi ile zarar verilmeden hücrelerin çözeltiden ayrılması ve kalan sıvıdaki lipidin belirlenmesi gerekir. Böylece solvent ilavesiyle hücreye verilen zarar ve akabinde çözeltideki lipit miktarındaki artış sağlıklı olarak ölçülebilir.

Bu nedenle öncelikle homojen haldeki mikroalg çözeltisinden alınan 100 mL mikroalg çözeltisi 6000 dev/dk'da 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücrelerden ayrılan sıvı faz ayırma hunisine alınmış ve üzerine 50 mL solvent ilave edilmiştir. Solvent ilavesi sonrası çözelti 5 dakika boyunca hızla çalkalanmış ve tam karışım sağlanmıştır. Daha sonra faz ayrımının gerçekleşmesi için askıya alınmıştır. Çözelti lipit içeren solvent ve su olarak iki faza ayrılmıştır. Faz ayrımı sağlandıktan sonra lipit içeren solvent fazı önceden darası alınan cam balona alınmış ve solvent uçurulması sağlanmıştır. Bu sayede hücrelerden arındırılan çözeltideki lipit miktarı belirlenmiştir. Numunedeki lipit yine Eşitlik (3.4) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.3. Ultrases Destekli Lipit Ekstraksiyonu

Bu safhada, mikroalg içeren çözeltideki lipidin solvent ilavesi ile ekstraksiyonuna yardımcı olması amacıyla, ultrases çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen zaman içinde *Chlorococcum sp.* baskın hale geldiği mikroalg kültürü ve BAEA'da yetiştirilen *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır

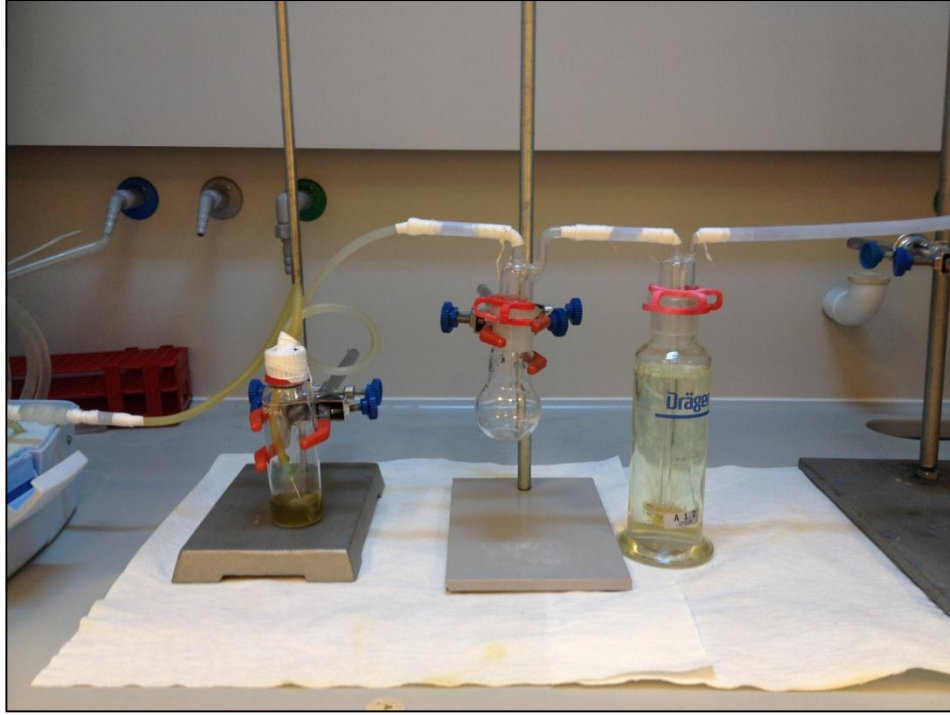
Deneyisel çalışmalarda 250 mg/L hücre konsantrasyonuna sahip 125 mL mikroalg çözeltisi kullanılmıştır. Ultrases destekli lipit ekstraksiyonu çalışmalarında, mikroalg çözeltisine 400 W/L gücünde ve 60 dakika sürede US uygulanmıştır. Ultrases uygulaması Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Ultrases reaksiyonun tamamlanmasının ardından gerçekleştirilen lipit ekstraksiyonu yukarıda anlatılan adımların sırasıyla uygulanması ile sağlanmıştır. Deneyisel çalışmalara ait sonuçlar Bölüm 4.3.1'de verilmiştir.

3.4. Mikroalgal Biyokütlenin Fermentasyon Öncesi Ön Arıtımında Uygulanan Yöntemler

Tez çalışması kapsamında, mikroalglerin ve hücrel polisakkaritlerin parçalanmasında ultrases, ozon, asit ve alkali ön arıtım yöntemleri kullanılmış ve ön arıtılan biyokütle enzimatik hidrolize tabi tutularak polisakkaritlerin glikoza dönüşümü incelenmiştir.

3.4.1. Ozon ile Ön Arıtım

Mikroalglerin ve hücre içi polisakkaritlerin ozon kullanılarak parçalanmasının ve glikoza dönüştürülmesinin araştırıldığı bu çalışmalarda BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen ve zaman içinde *Chlorococcum* türü mikroalglerin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır. Mikroalg çözeltisi önce 6000 dev/dk santrifüj edilerek yoğunlaştırılmış daha sonra liyofilizatörde -50 °C’de vakum altında içerisindeki su alınarak kurutulmuştur. Tüm ön arıtım çalışmalarında kuru biyokütlenin saf su ile çözelti haline getirilmesi ile elde edilen 10 g/L biyokütle konsantrasyonuna sahip 3 mL homojen mikroalg çözeltileri kullanılmıştır. Yarı sürekli ozonlama çalışmalarından farklı olarak bu çalışmalarda kullanılan çözelti miktarının düşük olması nedeniyle düşük hacimlerde çalışmaya olanak sağlayan cam gaz (Drechsel trap reactor) yıkama şişelerinde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Ön arıtım çalışmalarında kullanılan deney düzeneği Şekil 3.6’da verilmektedir. Kullanılan cam reaktör dışında geri kalan her şey yarı sürekli ozonlama çalışmalarında kullanılan düzeneğe aynı şekilde kurulmuştur.



Şekil 3.6: Biyokütlenin ozonla ön arıtımında kullanılan deney düzeneği.

Ozonla ön arıtım çalışmalarında kullanılan ozon dozları, yarı sürekli ozonlama çalışmalarında uygulanan ozon dozları göz önüne alınarak 0,25-2,0 g O₃/g KB aralığında tutulmuştur.

Hücre konsantrasyonu belirlenen çözelti ozonlama deney düzeneğine alınmış ve belirlenen ozon dozu için ozon jeneratörü çalıştırılmıştır. Reaksiyon süresi sonunda ozon jeneratörü durdurulmuş ve ozonlanan mikroalg çözeltisi alınmıştır. Ozonlama sonrası vakit kaybedilmeden çözelti sıcak su banyosuna daldırılarak çözelti içinde kalan ozonun parçalanması ve reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Hücresel parçalanma sonrası glikoza dönüşümün belirlenmesi için, çözeltilerden 1mL numune alınarak 0,45 µm şırınga filtreden süzölmüş ve önceden glikoz kalibrasyonu yapılan yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazında (HPLC) glikoz içeriği ölçölmüştür. Bu çalışmaya ait sonuçlar Bölüm 4.5.1’de verilmektedir.

Ozonla ön arıtımın enzimatik hidroliz üzerindeki etkisinin belirlenmesi için enzim miktarı 1,2 mL/g KB sabit tutulduğu ve mikroalg biyokütlesi birimi başına uygulanan ozon miktarının 0,25-2,0 g O₃/g KB aralığında değıştirildiğı ozonlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Mikroalg çözeltilerin ozonlanması yukarıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Ozonlanan ve içindeki kalan ozonu giderilen çözeltilerin pH’sı 4,8 ± 0,5’e ayarlanmış ve daha sonra enzimatik sakkarifikasyona

(Bölüm 3.4.5) tabi tutularak süreç sonlandırılmıştır. Bu çalışmaların yanı sıra mikroalg biyokütlesi birimi başına uygulanan ozon dozunun 0,5-1,0 g O₃/g KB olarak sabit tutulduğu ve enzim miktarının (0,15-1,5 mL g/KB (Celluclast 1.5L/Novozym 188, 1:2, h/h) aralığında değiştirildiği bir dizi deney yürütülmüştür. Bu sayede enzim miktarının arttırılmasının, ozonla ön arıtılan biyokütlelerdeki polisakkaritlerin glikoza dönüşüm verimi üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalara ait sonuçlar Bölüm 4.5.1’de verilmektedir.

3.4.2. Ultrases ile Ön arıtım

Ultrases ile mikroalglerin hasatlanması araştırıldığı çalışmalarda hücresel parçalanma ve hücre içi materyal salınımının en yüksek olduğu değer 0,4 kWh/L ultrases enerji yoğunluğunun kullanılması ile elde edildiği görülmektedir. Uygulanan bu ultrases enerjisinin biyokütle konsantrasyonu ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde biyokütle başına 1,6 kWh/g KB ultrases uygulandığı görülmektedir. Enzimatik sakkarifikasyon öncesi biyokütlenin ultrases ile ön arıtımında bu değer kullanılmıştır. 1 g/L biyokütle konsantrasyonuna sahip mikroalg çözeltisinden 20 mL alınarak ultrasese tabi tutulmuştur. Ultrases uygulaması Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda çözelti önce derin dondurucuda dondurulmuş daha sonra freze dryer cihazına konularak kurutulmuştur. Kurutulan biyokütle tekrar tartılarak 10 g/L biyokütle konsantrasyonu elde edilecek şekilde saf su ile çözelti haline getirileştir. Enzimatik sakkarifikasyon için gerekli olan pH 4,8 ± 0,5 ayarlaması seyreltik H₂SO₄ ve seyreltik NaOH çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bütün numuneler bir sonraki adım olan enzimatik sakkarifikasyona (Bölüm 3.4.5) tabi tutulmuştur. Bu çalışmalara ait sonuçlar Bölüm 4.5.2’de verilmektedir.

3.4.3. Seyreltik Asit ile Ön Arıtım

Mikroalg hücre duvarının parçalanması ve enzimatik sakkarifikasyonun verimini arttırmak amacıyla asit ile ön arıtım yapıldığı bu çalışmalarda seyreltik sülfürik asit kullanılmıştır. Ön arıtım çalışmalarında 10 g/L biyokütle konsantrasyonuna sahip 3 mL mikroalg çözeltisine final asit konsantrasyonu %1-6

aralığında değişen oranlarda %10'luk sülfürik asit ilave edilmiştir. Mikroalg çözeltileri 10 dakika süreyle 500 dev/dk manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış daha sonra 121 °C'de, 1,1 bar basınç altında, 30 dk otoklavlanmıştır. Reaksiyon sonunda numunelerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve 10 N NaOH (ve gerekli olduğunda 1 N H₂SO₄) kullanılarak numunelerin pH değerleri, enzimatik sakkarifikasyon için gerekli olan pH 4,8 ± 0,5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.4.4. Alkali ile ön arıtım

Alkali ile ön arıtım çalışmalarında 30 mg kuru biyokütle değişen oranlarda NaOH (% 0,75-3) içeren alkali çözeltiler içine eklenerek manyetik karıştırıcıda (500 dev/dk) 10 dakika süreyle karıştırılarak çözülmüştür. Mikroalg çözeltileri daha sonra 121°C'de, 1,1 bar basınç altında, 30 dk otoklavlanmıştır ve reaksiyon sonunda numunelerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Enzimatik sakkarifikasyon için gerekli olan pH 4,8 ± 0,5 ayarlaması derişik H₂SO₄ (ve gerekli olduğunda 1 N NaOH) kullanılarak yapılmıştır.

3.4.5. Enzimatik Hidroliz

Mikroalg biyokütlesinin parçalanmasında ve hücresel polisakkaritlerin glikoza dönüştürülmesinde enzim kullanımının araştırıldığı bu çalışmalarda Novozymes tarafından sağlanan Novozym 188 (β-glukosidaz) ve Celluclast 1.5 L (Endo glukonoz) enzim kompleksleri kullanılmıştır.

Ozonla ön arıtım çalışmalarında olduğu gibi bu çalışmalarda da 10 g/L biyokütle konsantrasyonuna sahip 3 mL mikroalg çözeltisi kullanılmıştır. Enzimatik sakkarifikasyon çalışmalarının tamamı üretici firma tarafından enzim aktivitesinin maksimum olduğu belirtilen pH 4,8 ± 0,5'te gerçekleştirilmiştir. Mikroalg çözeltisinin pH ayarlamasında 0,1 N H₂SO₄ ve 0,1 N NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Mikroalg çözeltisinin enzimatik sakkarifikasyonun gerçekleşmesi için 4 saat süreyle 50 °C de, 160 dev/dk'da çalkalanmıştır. Süre sonunda çözeltiler 80 °C su banyosunda 2 dk süre ile bekletilerek enzim aktivitesi sonlandırılmıştır. Daha sonra çözeltiler 6000 dev/dk'da 10 dk santrifüj edilerek üst faz 0,45 µm gözenek genişliğine sahip

filtreden süzölmüş ve glikoza dönüşüm veriminin belirlenmesi için HPLC’de analiz edilmiştir.

3.5. Analitik Metotlar

3.5.1. Kimyasal Analizler

Mikroalgal biyokütle ve çözeltideki proteinin tayininde Lowry metodu [Lowry et al., 1951], karbonhidrat tayininde Dubois metodu [Dubois et al., 1956] kullanılmıştır. Protein ve karbonhidrat tayini için oluşturulan kalibrasyon grafikleri Ek B, Şekil B1.3 ve Şekil B1.4’te verilmektedir. Mikroalg çözeltisinin KOİ tayini Standart Metotlar 5220 C’ye göre yapılmıştır [APHA, 2005].

3.5.2. GC Analizi

Mikroalgal biyokütlenin nötral lipit miktarının (trigliserit içeriğinin) belirlenmesinde, gaz kromatografisi (GC) kullanılmıştır. GC ile analiz çalışmaları, mikroalgal biyokütleden Bligh and Dyer metodu ile lipidin ekstrakte edilmesi ve elde edilen lipidin kapiler gaz kromatografisi ile analizi adımlarını içermektedir.

Kromatografik analiz için Agilent 6890 N marka FID detektörlü gaz kromatografisi, uzunluğu 30 m, iç çapı 0,53 mm ve film kalınlığı 0,1 µm olan DB-5HT kapiler kolon (JandV Scientific) kullanılmıştır. Fırın için seçilen başlangıç sıcaklığı 50 °C (1 dk) ve sonrasında 15 °C/dk’da 180 °C’ye, 7 °C/dk’da 230 °C’ye ve 10 °C/dk’da 370 °C’ye artacak şekilde programlanmış, bu sıcaklıkta 10 dk tutulmuştur. Maksimum fırın sıcaklığı 400 °C olarak belirlenmiştir. Toplam analiz süresi 40 dk’dır. FID detektörün sıcaklığı 380 °C, detektör gazı 350 mL/dk hava ve 35mL/dk ile H₂ gazıdır. İnlet modu splitless ve sıcaklığı ise 350 °C’dir. Kolon akışı 2,6 mL/dk (80 kPa’lık sabit basınç modunda), kolon için taşıyıcı gaz helyum ve make up (süpürme) gazı ise azottur.

Mikroalgal lipit örneklerinin analizi için; 4 mg lipit örneğine 40 µL Internal Standard#1 (ASTM D6584 1, 2, 4 -Butanetriol Solution, 1 mg/mL), 50 µL Internal Standard#2 (ASTM D6584 Tricaprin Solution, 8 mg/mL) ve 100 µL türevlendirme reaktifi N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) eklenmiş, 2 dk

vortekslenmiştir. Numunelerin silanlanması için 30 dakika beklenmiştir. Silanlamayla numune içindeki gliseritlerin buharlaşma sıcaklığını düşürülerek uçuculuğunun artırılması sağlanmıştır. Silanlama işleminin ardından hazırlanan lipit numunelerine 1 mL heptan eklenerek GC’de analiz edilmiştir. GC analizi için kullanılan analitik standartlardan Internal Standard#1 (ASTM D6584 1, 2, 4 - Butanetriol Solution, 1 mg/mL), Internal Standard#2 (ASTM D6584 Tricaprin Solution, 8 mg/mL) ve lipit standardı olarak triolein (5 mg/mL), monoolein (10 mg/mL) ve 1, 3-diolein (5 mg/mL) Sigma Aldrich’den, silanlama için kullanılan türevlendirme reaktifi N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) ve n-heptan (GC grade) Merck’ten temin edilmiştir.

Mikroalgal biyokütleden ekstrakte edilen lipidin GC’de analizi için öncelikle mono-, di- ve triolein standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiklerine örnek teşkil etmesi amacıyla trioleine ait kalibrasyon grafiği Ek B Şekil 1.8’de verilmektedir.

3.5.3. HPLC Analizi

Mikroalg biyokütlesindeki polisakkaritlerin belirlenen ön arıtım (ozon, ultrases) yöntemleri ile monomerlerine parçalanması ve enzimatik hidroliz ile glikoza dönüştürülmesinin belirlenmesinde Shimadzu marka HPLC kullanılmıştır. HPLC cihazına numune verilmeden önce, 1 mL numune 6000 rpm’deki santrifüjde 10 dk çöktürülmüş ve üst faz 0,45 µm gözenek genişliğine sahip filtreden süzölmüştür. 63 °C’de çalışan kolon fırını içine yerleştirilmiş Tessek Polimer Sugar H form 8 µm şeker kolonu ve 50 °C’de çalışan refraktif indeks dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir. HPLC’de mobil faz olarak 4 mM Sülfürik asit çözeltisi kullanılmış ve akış hızı 0,6 mL/dak olarak ayarlanmıştır. Cihazın numune içindeki madde konsantrasyonunu hesaplayabilmesi için standart glikoz çözeltileri hazırlanarak cihaza verilmiş ve dedektör aracılığıyla elde edilen alan değerleri kullanılarak standart grafikler ve denklemler elde edilmiştir. Bu grafikler ve denklemler Ek B, Şekil B1.5, 1.6 ve 1.7’de verilmiştir.

3.5.4. Ozon Dozu Ölçümü

Ozon uygulaması boyunca üretilen ozon dozu miktarının tayini için Standart Metotlar, 2350-E bölümünde yer alan yarı kesikli ozon dozu analiz yöntemi ve kolorimetrik analiz yöntemi olan 4500 O₃-B kullanılmıştır [APHA, 2005]. Analiz metoduyla ilgili ayrıntılı bilgi Ek C kısmında verilmektedir.

3.5.5. Fiziksel Analizler

3.5.5.1. AKM Analizi

Biyokütle içeren çözeltideki toplam askıda katı madde miktarının tayininde Standart Metotlar, 2540-D yöntemi kullanılmıştır [APHA, 2005].

3.5.5.2. Optik Yoğunluk Analizi

Mikroalg çözeltileri içindeki biyokütle konsantrasyonundaki artışın belirlenmesinde Lambert-Beer kanunundan yararlanılmıştır. Lambert-Beer kanununa göre bir çözeltiden geçen monokromatik bir ışığın şiddeti çözeltinin derişimi ve kalınlığı ile ters orantılı olarak azalır. Optik yoğunluk ölçümlerinde Genesys 10S UV-Vis Spectrophometer kullanılmıştır. Mikroalg çözeltilerinden alınan 2,5 mL örneğin öncelikle 300-750 nm aralığında dalga boyu taraması yapılarak maksimum absorbansın verildiği dalga boyu belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlara sahip mikroalg çözeltileri, belirlenen dalga boyunda okutularak absorbans değışimleri ölçülmüştür.

Mikroalg çözeltilerine ait absorbans değeri ve AKM analizi ile bulunan konsantrasyon değeri korelasyonuna ait grafik ve denklem Ek B Şekil B1.1 ve 1.2’de verilmektedir. Bu denklem kullanılarak ışık absorbansı belirlenen çözeltinin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.5.5.3. Çökme Testi

Biyokütle çökme kabiliyeti belirlenmesi için Standart Metotlar, 2540-F bölümünde yer alan çökebilir katılar yöntemi kullanılmıştır [APHA, 2005].

3.5.5.4. FAR Ölçümü

Mikroalg hücrelerinin fotosentez için kullanabildiği ışık miktarını ölçmek amacıyla fotosentetik aktif radyasyon (FAR) ölçümü gerçekleştirilmiştir. FAR, bitkiler tarafından fotokimyasal reaksiyonlar için kullanılabilen, ışık spektrumunun 400-700 nm dalga boyu aralığındaki bölümünü temsil etmektedir. Havuz yüzeyine ulaşan FAR miktarı Licor marka LI-193 tipi kuantum sensörüyle ölçülmüş ve yine Licor marka LI-1400 cihazıyla düzenli şekilde kaydedilmiştir.

3.5.5.5. Mikroskopik Analizler

Mikroalg çözeltilerinde bulunan türlerin belirlenmesinde Carl Zeiss Marka, Dijital kamera ataçmanlı, Axio Scope Trinoküler Faz-Kontrast Mikroskop kullanılarak aydınlık alan görüntüleme yöntemi kullanılmıştır.

Mikroalglerin hücresel boyutta tanımlanmasında, yüksek vakum altında hücrelerin altınla kaplanarak incelenmesini sağlayan, taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Philips, XL 30 SFEG) kullanılmıştır.

3.5.6. İstatistiksel Analizler

Ozon sonrası ultrases denemelerinde en uygun ozon dozu, ultra ses düzeyi ve süresini içeren kombinasyonu belirleyebilmek amacıyla Box-Behnken deneysel tasarım metodundan faydalanılmıştır. Bir tür tepki yüzey yöntemi olan bu tasarım metodu, tepkinin birkaç değişken tarafından etkilendiği ve amacın bu tepkiyi optimize etmek olduğu problemlerin modellenmesi ve analizi için kullanılan bir istatistiksel metottur. Box-Behnken tasarımı için oluşturulan polinom modeli Eşitlik (3.4)'te verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (3.4)$$

Burada Y sistem cevabını, β_0 denklem sabitini, β_i , β_{ii} , β_{ij} faktör katsayılarını, x_i , x_j faktörleri ve k faktör sayısını temsil etmektedir. Bu eşitlik üç faktör için düzenlendiğinde aşağıdaki ikinci dereceden polinom elde edilir.

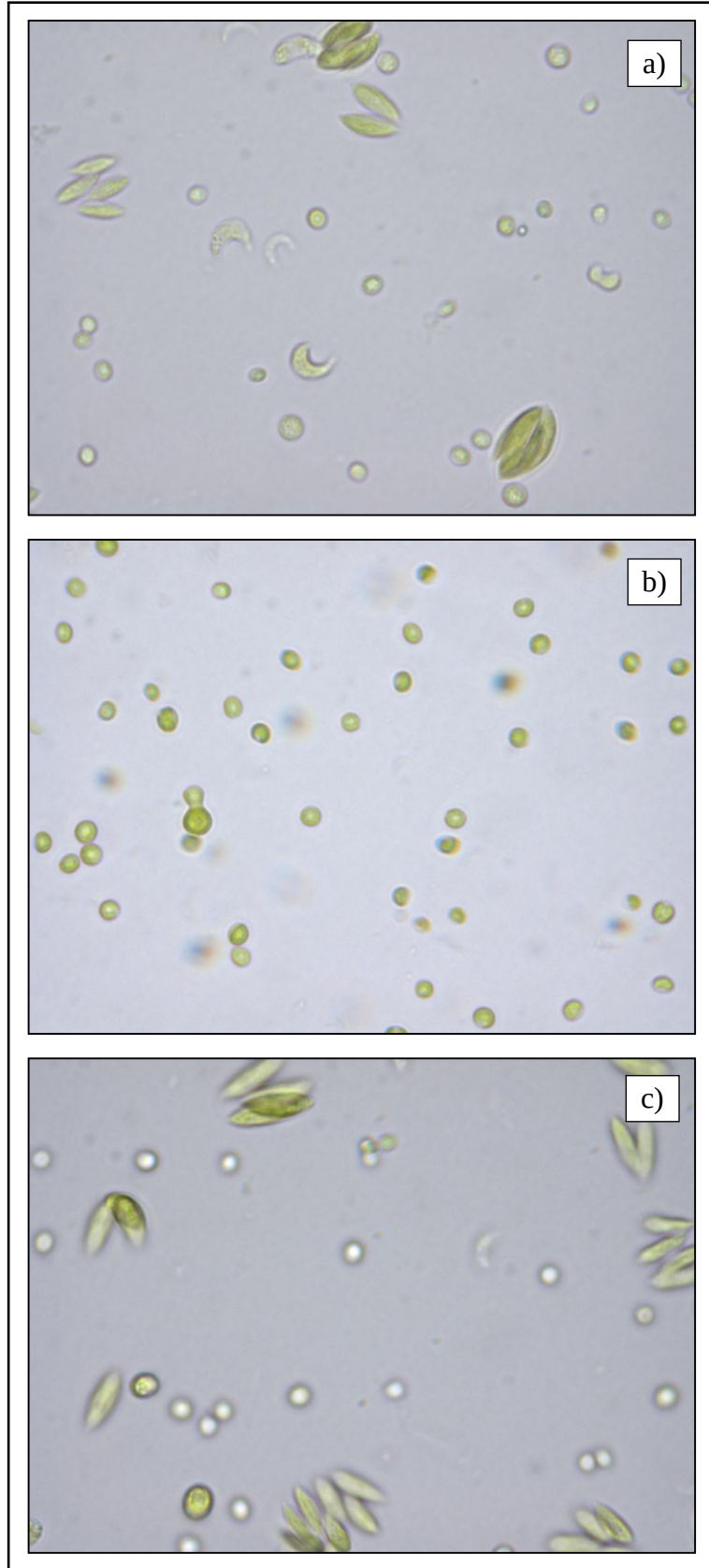
$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \quad (3.5)$$

Bu çalışmada Box-Behnken Tasarım yöntemi ile model eldesi için Eşitlik (3.5) kullanılmıştır. Model oluşturmak için gerekli katsayıların hesaplanması amacıyla kullanılan regresyon analizinde, JMP 10 (SAS) yazılımı kullanılmıştır. Deneylerde elde edilen sonuçlar ile model denklemleri olarak elde edilen polinomlar arasındaki uygunluk derecesini anlayabilmek için kalanların toplamına ve korelasyon katsayılarına bakılmıştır. Kalanların toplamının (Σe) 0'a, korelasyon katsayısının (R^2) ise 1'e yakınlık derecesi, elde edilen model denkleminin sonuçları ile deneysel sonuçlar arasındaki yakınlık derecesini göstermiştir. Ayrıca, elde edilen bütün model denklemleri, istatistiksel anlam açısından uygunluklarının test edilmesi amacıyla, varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. İstatistiksel açıdan kayda değer sonuçlar verilen polinomlar için optimizasyon hesaplamaları MATLAB 7.7 (Mathworks) yazılımında yer alan optimizasyon araçları (optimtool) yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Mikroalgal Biyokütle Üretimi

Çeşitli doğal su ortamlarından toplanan ve mikroalg içeren su örnekleri laboratuvarında 20 L'lik havuzda BG11 besi ortamına alınmış, 150 μmol foton/ $\text{m}^2 \cdot \text{sn}$ sürekli aydınlatma altında, pH $7 \pm 0,5$ aralığında ve 20 ± 2 °C sıcaklıkta aklime edilmiştir. Türlerin morfolojik olarak tanımlanması için çeşitli alg sistematigi kitaplarından [Linne von Berg et al., 2004; Graham and Wilcox, 2000; Barsanti and Gualtieri, 2006; Pröschold and Leliaert, 2007; Bellinger and Sigee, 2010] ve internet görüntü veri tabanından yararlanılmıştır. Aklimasyon süresinin ilk ayında, havuzlarda *Scenedesmus rubescens*, *Selanastrum capricornutum*, *Oocystis sp.*, ve *Chlorococcum sp* gibi çeşitli mikroalg türlerinin yer aldığı görülmektedir. Ancak yetiştirilme ortamının sabit tutulmasıyla tür çeşitliliğinin azaldığı, BG11 besi ortamında *Chlorococcum* türlerinin, evsel atıksu ortamında ise *Scenedesmus sp.* mikroalglerin baskın hale geldiği yapılan mikroskobik analizler sonucunda görülmüştür. Mikroalg kültürlerindeki türlere ait aydınlık alan görüntülemesi ve 100x büyütme kullanılarak çekilen mikrografları Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1: 100 kat büyütmede a) karışık kültüre, b) BG11’de baskın hale gelen *Chlorococcum sp.*’ye c) atıksuda baskın hale gelen *Secenedesmus sp.*’ye ait karışık mikroalg türlerine ait mikroskop görüntüleri.

Daha öncede bahsedildiği gibi mikroalg bünyesinde bulunan organik yapılar, (karbonhidrat lipit ve protein) türden tre ya da hücrelerin yetiştirildiği ortam şartlarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Tez alışması boyunca mikroalg zeltiilerinde meydana gelen tür değişimlerinin, mikroalg zeltiilerindeki organik madde miktarlarındaki değişime olan etkisi Tablo 4.1’de gösterilmektedir. Yine Tablo 4.1’de literatürde yer alan bazı mikroalg türlerine ait hücresel bileşenlere yer verilmiştir, grldğ üzere aynı mikroalg türü için farklı araştırma grupları farklı sonuçlar elde etmektedir. Bu durum mikroalglerin ve mikroalg üzerinde yürütülen çalışmaların birbirleri ile karşılaştırılmalarını zorlaştırmaktadır.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan mikroalg kültürlerinin karbonhidrat, lipid ve protein içeriklerinin diğer çalışmalarla karşılaştırılması.

Mikroalg kültürü	Besi ortamı	Toplam karbonhidrat (TK) (% KBB)	Toplam lipid (TL) (% KBB)	Toplam protein (TP) (% KBB)	Kaynak
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	BG11	17	21	48	Garcia-Moscoso et al., 2013
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	Tris-acetate-phosphate (TAP) medium,	59,7 ± 0,5		9,2 ± 0,6	Choi et al., 2010
<i>Chlorella sp.</i>		26	2	57	Becker, 2007
<i>Chlorella sp.</i>		12-17	14-22	51-58	Becker, 2007
<i>Chlorococcum littorale</i>	MC medium	46-70	10-15	12,5-26	Hu et al., 1998
<i>Chlorococcum sp.</i>	(F medium)	43,8			Harun et al., 2011
<i>Chlorococcum sp.</i>	(F medium)		7		Halim et al., 2011
<i>Scenedesmus obliquus</i>		10-17	12-14	50-56	Becker, 2007
Karışık mikroalg kültürü	BG11	46	26	25	Bu çalışmada
<i>Chlorococcum sp.</i> baskın olduğu karışık kültür	BG11	62	19	18	Bu çalışmada
<i>Secenedesmus sp.</i> baskın olduğu karışık kültür	İkincil biyolojik arıtım sonrası evsel atıksu	33	27	33	Bu çalışmada

4.2. Mikroalglerin Hasatlanmasında Ozon Kullanımı

Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen ozonlama çalışmalarına ait sonuçlar, aşağıda alt başlıklar altında sunulmuştur.

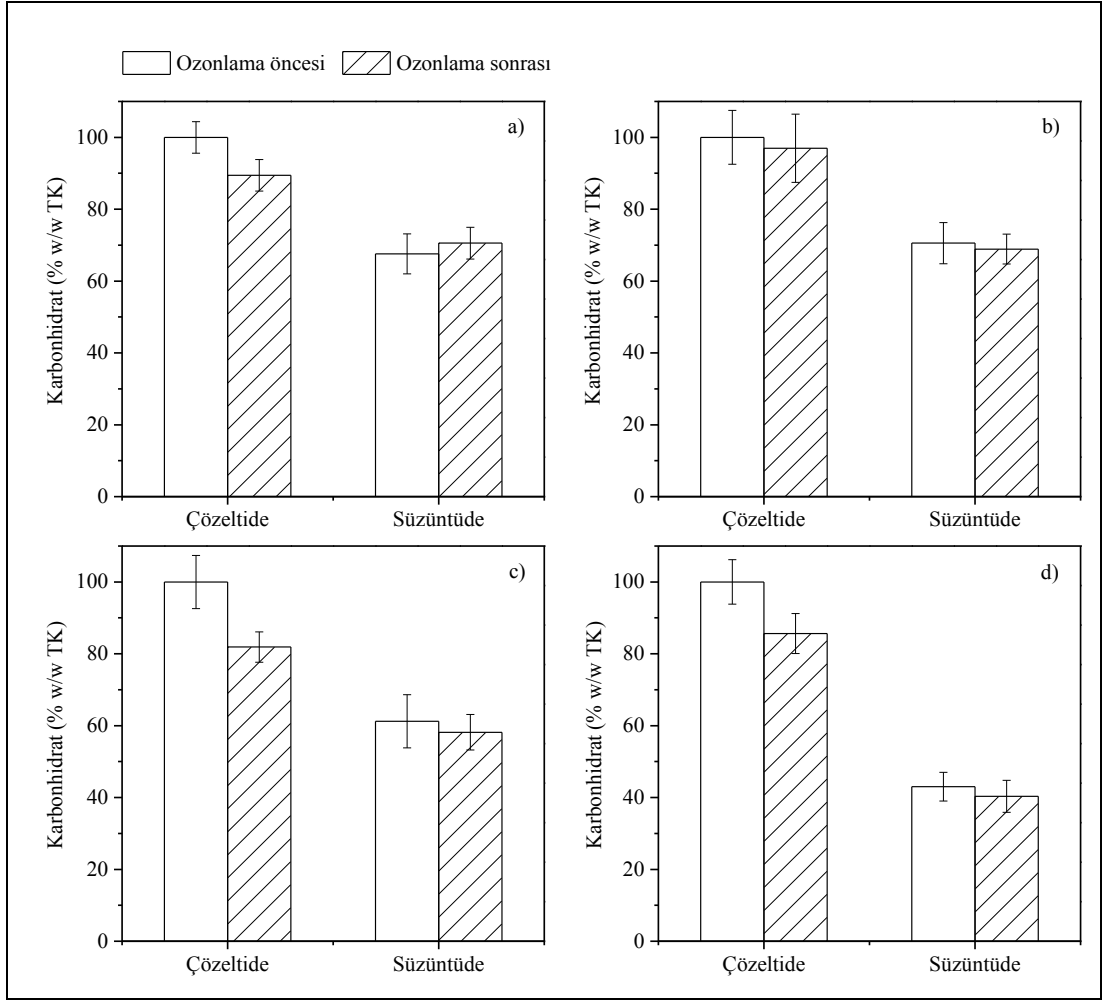
4.2.1. Etkin Ozon Dozu Belirleme

Mikroalglerin ve hücresel bileşenlerin (lipit ve karbonhidrat) hasatlanması amacıyla gerçekleştirilen yarı sürekli ozonlama çalışmaları, düşük dozda ozonlama çalışmaları ve yüksek dozda ozonlama çalışmaları olarak ikiye ayrılmıştır.

4.2.1.1. Düşük Dozda Ozonlama Çalışmaları

Bu çalışmada birim mikroalg biyokütlesi başına uygulanan ozon dozunun 0,01-0,3 g O₃/g KB aralığında tutulmasıyla, hücre duvarına zarar verilerek, hücresel materyalin (protein, karbonhidrat, lipit) hasatlanması ve hücre stabilitesi bozulan hücrelerin kendiliğinden çökelme eğiliminin arttırılarak sudan ayrıştırılması hedeflenmiştir.

Ozonlama öncesi ve sonrası mikroalg çözeltilerinde ve çözeltilerin 0,45 µm gözenek genişliğine sahip filtrelerden geçirilerek elde edilen süzüntülerinde yapılan karbonhidrat analizlerine ait veriler Şekil 4.2’de verilmektedir.

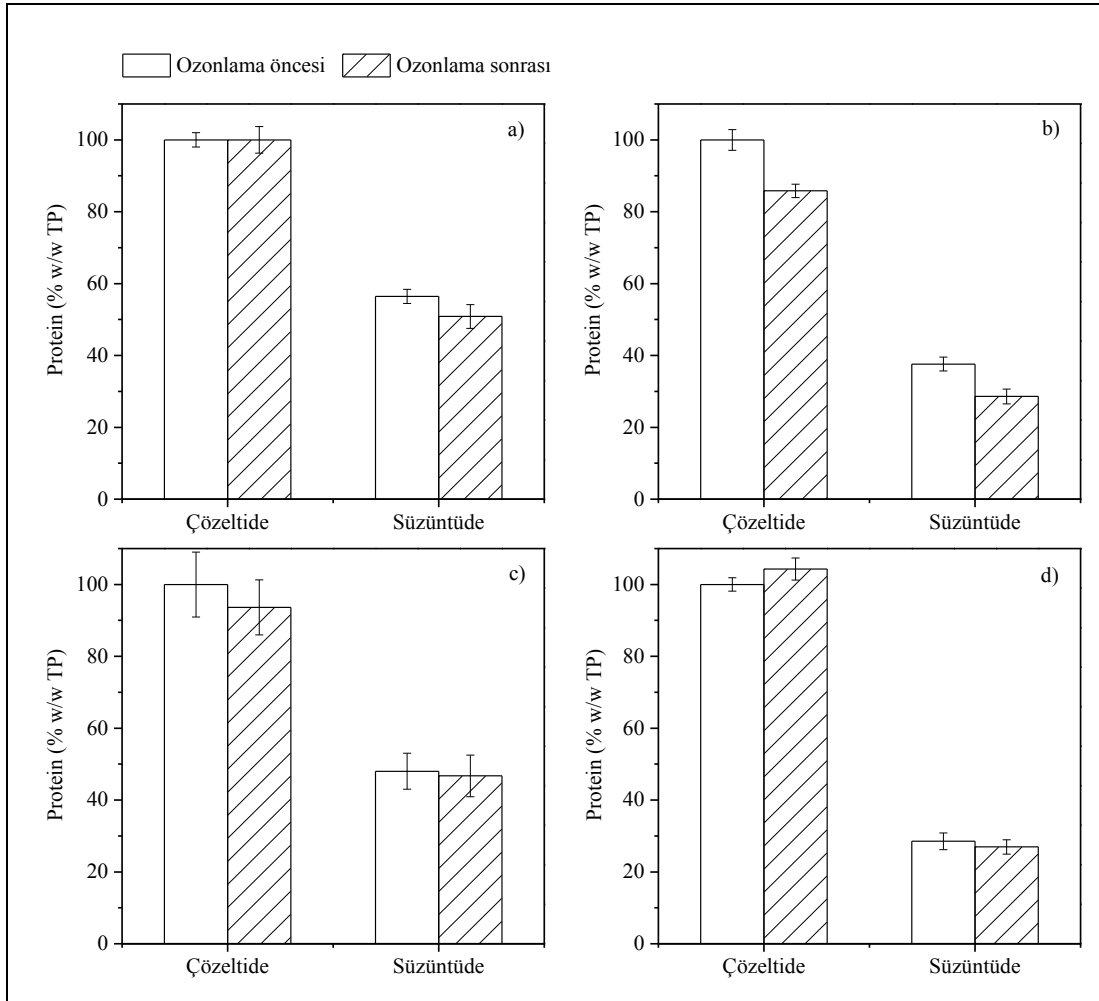


Şekil 4.2: Düşük ozon dozlarında (a) 0,01¹, b) 0,01², c) 0,02, d) 0,03 g O₃/g KB) çözeltide ve süzüntüde karbonhidrat miktarının değişimi.

¹ 0,64 g/L biyokütle konsantrasyonunda

² 1,00 g/L biyokütle konsantrasyonunda

Süzüntü numunelerinde yapılan protein analizlerine ait veriler Şekil 4.3’de verilmektedir.

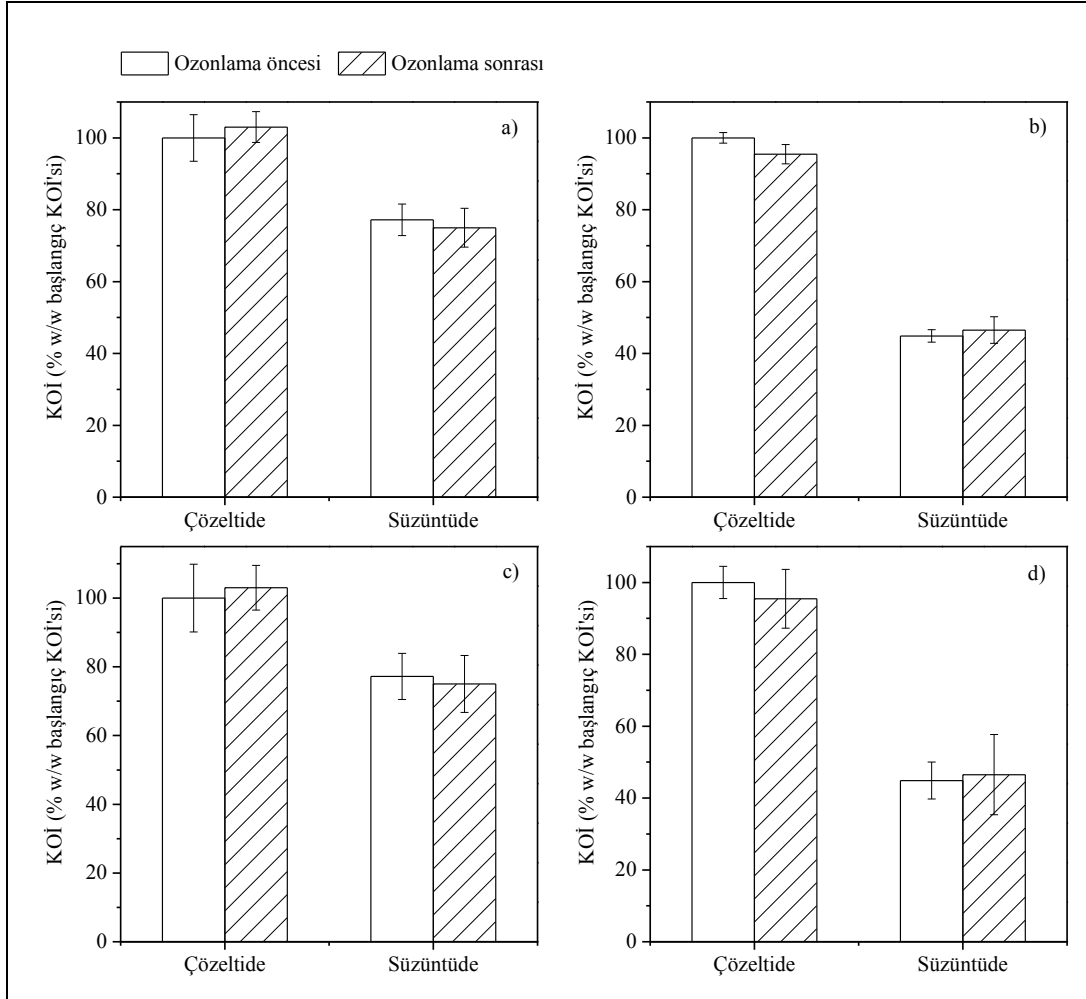


Şekil 4.3: Düşük ozon dozlarında (a) 0,01³, b) 0,01⁴, c) 0,02, d) 0,03 g O₃/g KB) çözeltide ve süzüntüde protein miktarının değişimi.

³ 0,64 g/L biyokütle konsantrasyonunda

⁴ 1,00 g/L biyokütle konsantrasyonunda

Süzüntü numunelerinde yapılan KOİ analizlerine ait veriler Şekil 4.4'de verilmektedir.



Şekil 4.4: Düşük ozon dozlarında (a) 0,01⁵, b) 0,01⁶, c) 0,02, d) 0,03 g O₃/g KB) çözeltide ve süzüntüde KOİ miktarının değişimi.

⁵ 0,64 g/L biyokütle konsantrasyonunda

⁶ 1,00 g/L biyokütle konsantrasyonunda

Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4 değerlendirildiğinde düşük dozda ozon uygulamalarının çözelti (ozonlama öncesi ya da sonrası) ve süzüntü numunelerindeki protein, karbonhidrat ve KOİ değerlerini etkilemediği görülmektedir. Bu durum, uygulanan ozon dozunun, hücresel parçalanma için yeterli düzeyde olmadığını göstermektedir.

Ozonlamanın, hücrelerin kendiliğinden çökelme eğilimi üzerindeki etkisinin belirlenmesinde, aktif çamur sistemlerinde çamurun çökebilme özelliğinin göstergesi olan ve otuz dakikada çamurun çökebilen kısmının tayin edilmesine imkân sağlayan İmhoff hunisi kullanılmıştır. Mikroalg çözeltisi ozonlama deneyinin hemen ardından homojen bir haldeyken İmhoff hunisine aktarılmış ve çökelme durumu takip edilmiştir. Ancak, ozon uygulamasının beklenilen aksine, hücrelerin kendiliğinden çökelme eğilimini değiştirmede ve ancak 24 saat sonunda tam bir çökmenin meydana geldiği gözlenmiştir. Kontrol amaçlı aynı şartlarda İmhoff hunisine aktarılan ozonlanmamış numunede de çökelme süresinin değişmediği görülmüştür. Bu durum, uygulanan ozon dozunun hücrelerin birbirlerini itme ve suda askıda kalma eğilimini etkilemediği göstermektedir.

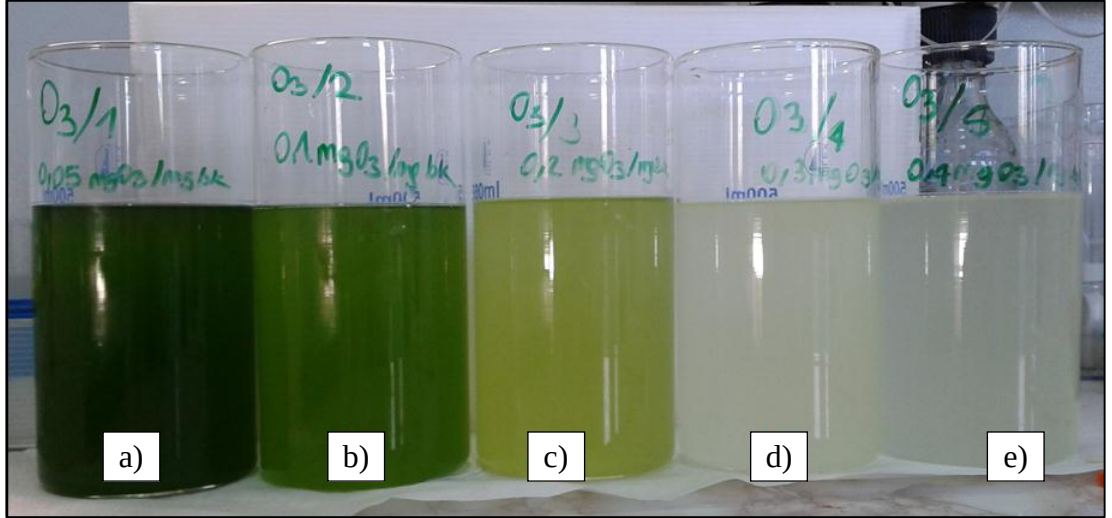
4.2.1.2.Yüksek Dozda Ozonlama Çalışmaları

Mikroalg biyokütlesine uygulanan düşük dozdaki ozon (0,01-0,03 g O₃/g KB) uygulamalarının, biyokütle üzerinde istenilen değişimi sağlayamaması üzerine, birim mikroalg biyokütlesi (gram) başına uygulanan ozon dozu 0,05-0,4 g O₃/g KB aralığında olacak şekilde arttırılarak deneysel çalışmalara devam edilmiştir. Düşük dozda ozon uygulamalarında olduğu gibi bu çalışmaların da amacı, hücresel parçalanma sonrası hücre içi materyalin ve hücrelerin hasatlanabilirliğinin sağlanmasıdır.

Yüksek dozda ozonlama çalışmalarında BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda, kullanılan çözelti hacmi 500 mL ve biyokütle konsantrasyonu 500 mg/L olacak şekilde sabit tutulmuştur.

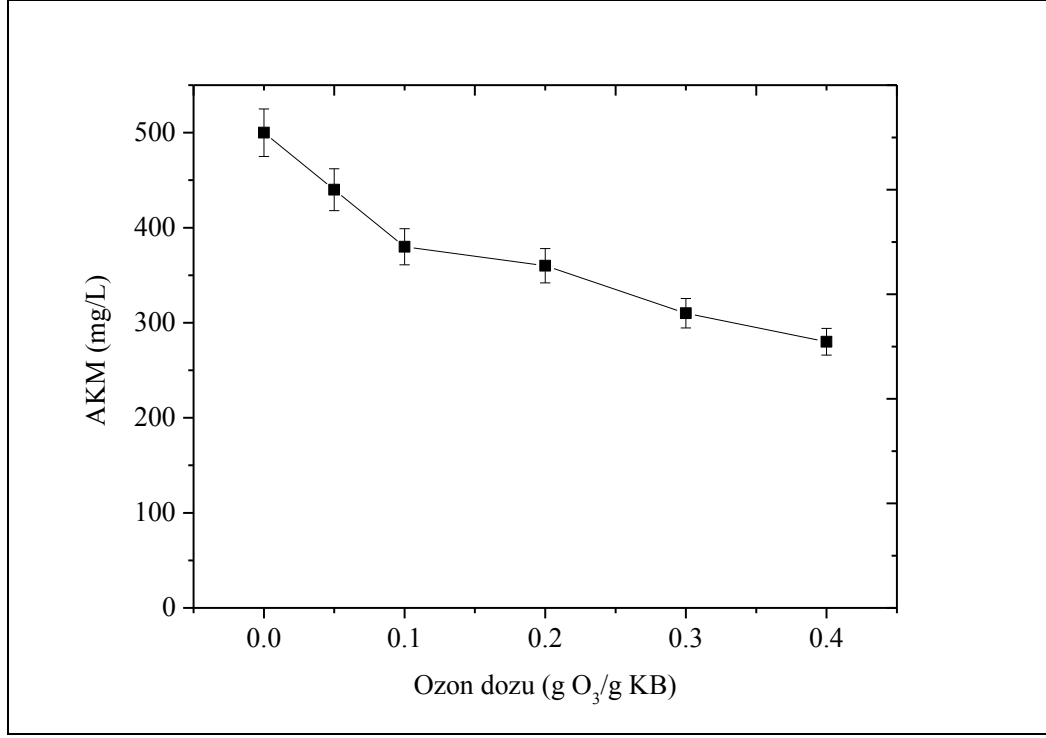
Mikroalg içeren çözelti mikroalg yapısında bulunan klorofilden kaynaklı olarak yeşil renge sahiptir. Yüksek dozda ozonlama çalışmaları süresince, ozonla temas eden çözeltinin rengi uygulanan ozon dozuna bağlı olarak hızla açılmıştır (Şekil 4.5). Mikroalg çözeltilerinin rengine meydana gelen bu değişim, mikroalg biyokütle

bileşenlerinin hücre dışına salındığının ve ozonla reaksiyona girerek parçalandığının bir göstergesidir. Benzer şekilde Huang ve arkadaşları, (2014) *Chlorella vulgaris* türü mikroalglerin ozonla parçalanması ve ozonun lipit ekstraksiyonu üzerine etkisini belirlemek için gerçekleştirdiği çalışmada, ozonlama ile hücrelerden dışarıya salınan klorofilin ozonla reaksiyona girerek hızla parçalandığını ve bu nedenle ozonlamanın hücrelerden klorofil ekstraksiyonu için uygun bir yöntem olmadığını belirtmiştir.



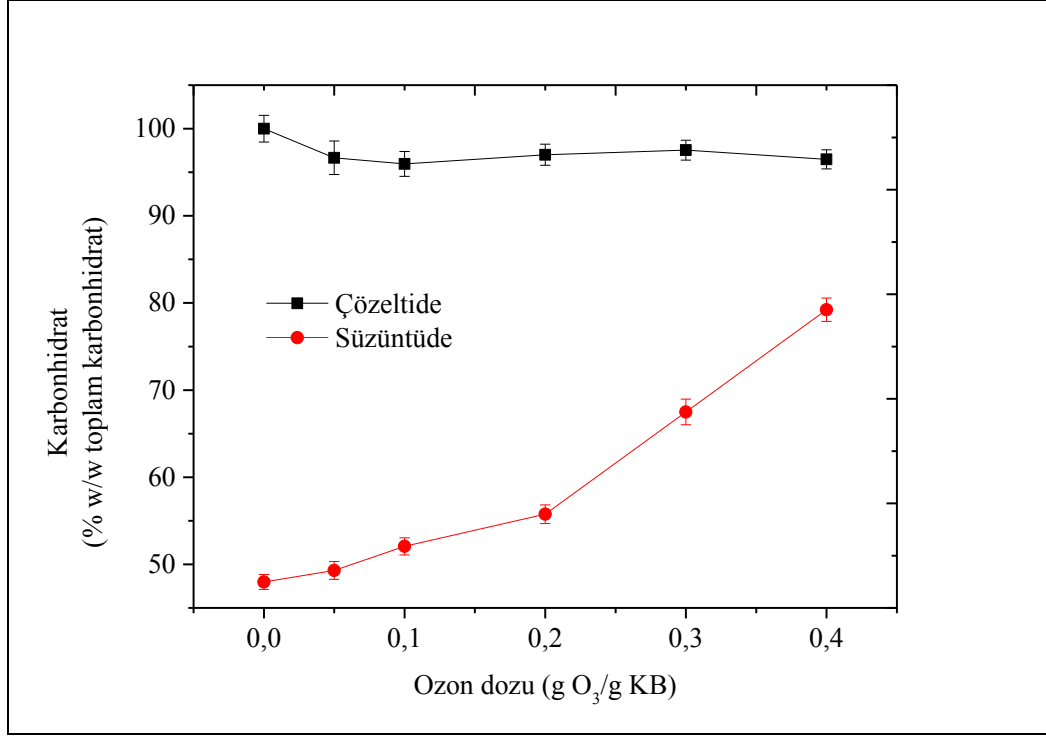
Şekil 4.5: Mikroalg hücresi başına uygulanan ozon dozunun artmasına bağlı olarak çözeltideki renk değişimi, a) 0,05, b) 0,1, c) 0,2, d) 0,3, e) 0,4 g O₃/g KB.

Başlangıç biyokütle konsantrasyonu 500 mg/L olan mikroalg çözeltisinden ozon geçirilmeye başlanmasıyla, hücrelerin ozonla reaksiyona girerek parçalandığı ve parçalanma neticesinde çözeltideki askıda katı madde (AKM) konsantrasyonunun hızla düştüğü ve en yüksek (0,4 g O₃/g KB) ozon dozunda, 280 mg/L biyokütle konsantrasyonuna indiği görülmektedir (Şekil 4.6). AKM konsantrasyonunda meydana gelen bu azalma mikroalg biyokütlesinin beklenildiği gibi ozonla parçalandığının bir göstergesidir.



Şekil 4.6: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O₃/g KB) AKM değişim.

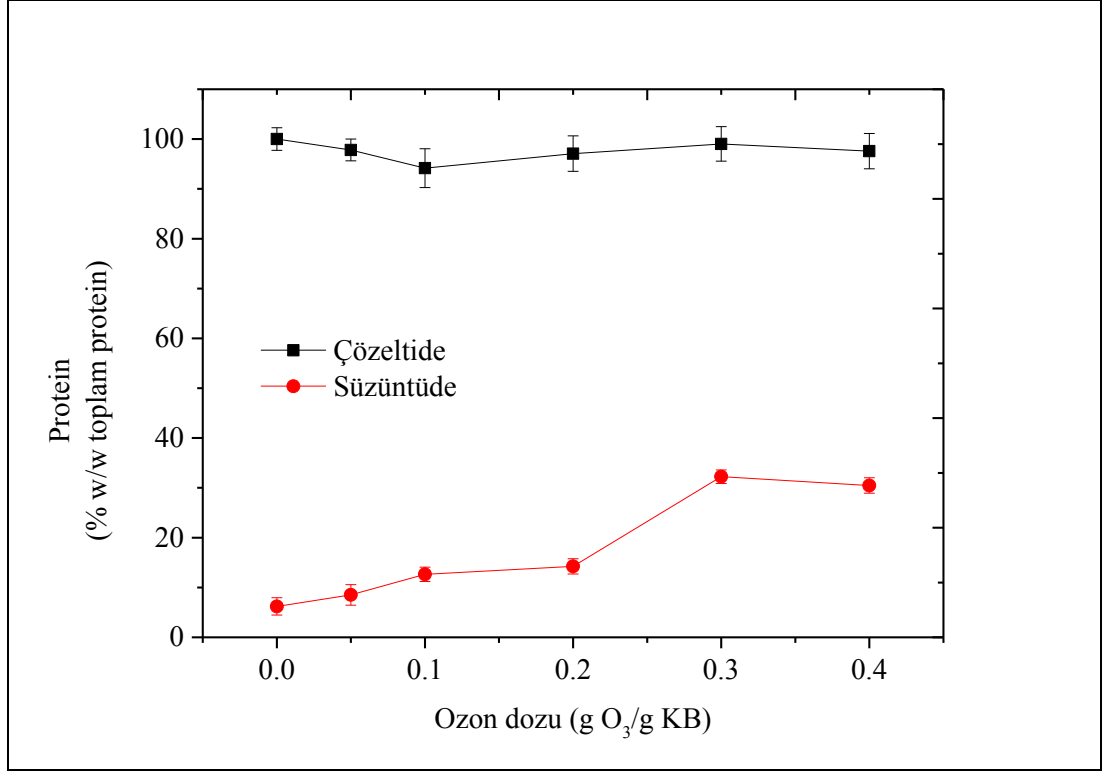
Ozonlama sonrası çözelti ve süzüntü numunelerindeki karbonhidrat miktarının, mikroalg hücresinde bulunan toplam karbonhidrata yüzdece oranının, uygulanan ozon dozuna bağlı olarak değişimi Şekil 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4.7: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O₃/g KB) çözeltide ve süzüntüde karbonhidrat değişimi.

Şekil 4.7 incelendiğinde süzüntü numunelerine ait karbonhidrat miktarının, artan ozon dozu ile arttığı ve en yüksek ozon dozu olan 0,4 g O₃/g KB’de, hücredeki toplam karbonhidratın %80’inin hücre dışına çıkarılmasının sağlandığı görülmektedir. Çözelti numunelerindeki karbonhidrat miktarlarında ise önemli bir değişim gözlenmemiştir. Lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasında ozon kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, ozonun karbonhidratlarla çok nadiren reaksiyona girdiği ancak çift bağ sayısı yüksek olan ligninle reaksiyona girmeyi tercih ettiği raporlanmıştır [Bule et al., 2013]. Gerek bu çalışmadaki bulgular ve gerekse literatürdeki sonuçlar, ozonun mikroalglerden karbonhidrat hasatlanmasında kullanılabilirliğini göstermektedir.

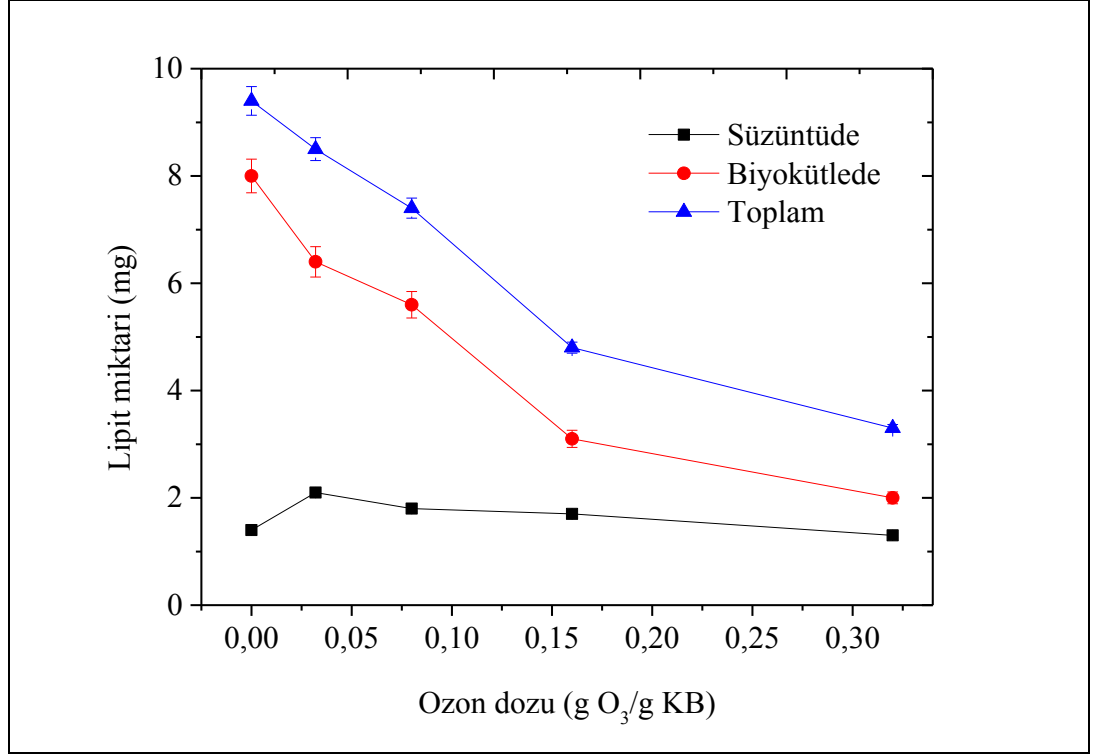
Şekil 4.8, mikroalg çözelti ve süzüntü numunelerinden ölçülen protein miktarının, hücredeki toplam protein miktarına yüzdece oranının, artan ozon dozuna bağlı olarak değişimini göstermektedir.



Şekil 4.8: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O₃/g KB) çözeltide ve süzüntüde protein değişimi.

Şekil 4.8 incelendiğinde, süzüntü numunelerine ait proteinin hücre dışına çıkarılma verimin, ozon dozunun artırılmasıyla az da olsa artan bir eğilim sergilediği ve süzüntüde en yüksek protein miktarının % 30 ile 0,3 g O₃/g KB ozon dozunda elde edildiği görülmektedir. Çözelti numunelerindeki protein miktarının sabit kalması, ozonun protein yapısını önemli oranda değiştirmedini göstermektedir. Sonuç olarak ozonlamanın, mikroalglerden protein hasatlanmasında kullanılabilir bir yöntem olduğu bulunmuştur. Ancak pH, sıcaklık, reaktör boyutu ve tipi gibi parametrelerin değiştirilmesiyle, daha yüksek protein hasatlama verimlerinin elde edilebileceği düşünülmektedir.

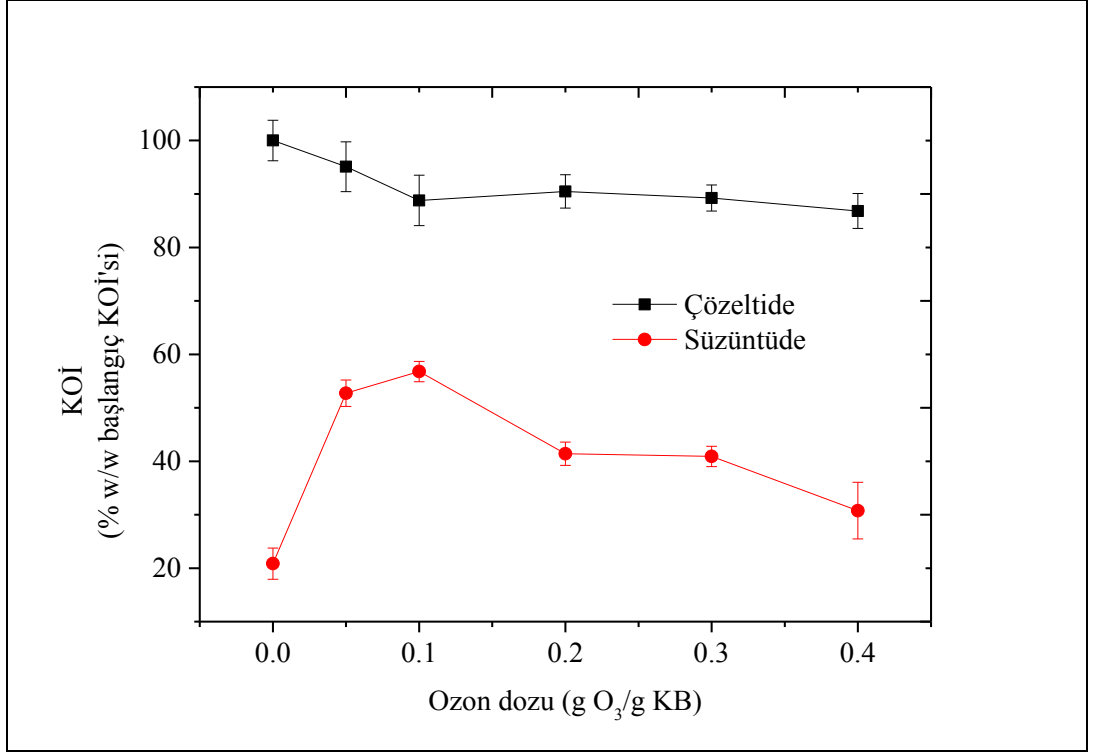
Mikroalg çözeltisinin ozonlanması sonrasında mikroalgal biyokütle ve süzüntüdeki lipit miktarının, artan ozon dozuna bağlı olarak değişimi Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9: Artan ozon dozuna bağlı olarak biyokütlerdeki ve süzüntüdeki lipit değişimi.

Şekil 4.9 incelendiğinde, süzüntü numunelerindeki lipit miktarı, mikroalg çözeltilisine 0,032 g O₃/g KB ozon uygulanmasıyla az da olsa bir artış göstermiş ancak ozon dozunun arttırılmasıyla birlikte azalmaya başlamıştır. Mikroalgal biyokütlerdeki %24 (KBB) lipit içeriğinin, ozonlamayla birlikte hızla azaldığı en yüksek ozon dozunda %6'ya (KBB) düştüğü görülmektedir. Artan ozon dozlarıyla birlikte hem süzüntüde hem de biyokütlerdeki lipit miktarında meydana gelen bu azalmanın, ozonun lipitle reaksiyona girerek (lipiti oksitliyerek) lipit yapısına zarar vermesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bilindiği gibi ozon, doymamış yağ asidindeki karbon-karbon (C=C) çift bağlarını parçalayarak lipit yapısını değiştirmektedir [Hewitt and Terry, 1992]. Literatürle uyum içinde elde edilen bu sonuç, ozonlamanın mikroalglerden lipit hasatlanmasında kullanılabilir bir yöntem olmadığı yönündedir.

Şekil 4.10'da mikroalg çözelti ve süzüntü numunelerine ait KOİ değerlerinin, uygulanan ozon dozuna bağlı değişimi görülmektedir.



Şekil 4.10: Yüksek ozon dozlarında (0,05 - 0,4 g O₃/g KB) çözeltide ve süzüntüde KOİ değişimi.

Çözelti numunelerindeki KOİ değerlerinde artan ozon dozuna bağlı olarak bir azalma meydana geldiği ancak süzüntü numunelerinde 0,1 g O₃/g KB ozon dozuna kadar KOİ değerinin arttığı, ozon dozunun arttırılmasıyla (0,2 g O₃/g KB ve üzeri), KOİ değerlerinin düştüğü görülmektedir. Süzüntü numunelerine ait KOİ değerlerinde meydana gelen artışın sebebi, ozonla temas eden hücrelerin parçalanması ve hücrel lipidin hücre dışına salınması olarak izah edilebilir. Artan ozon dozlarında, KOİ değerlerinde meydana gelen azalmaya hücrelerden salınan lipidin ozonla reaksiyona girerek oksitlenmesinin neden olduğu düşünülmektedir.

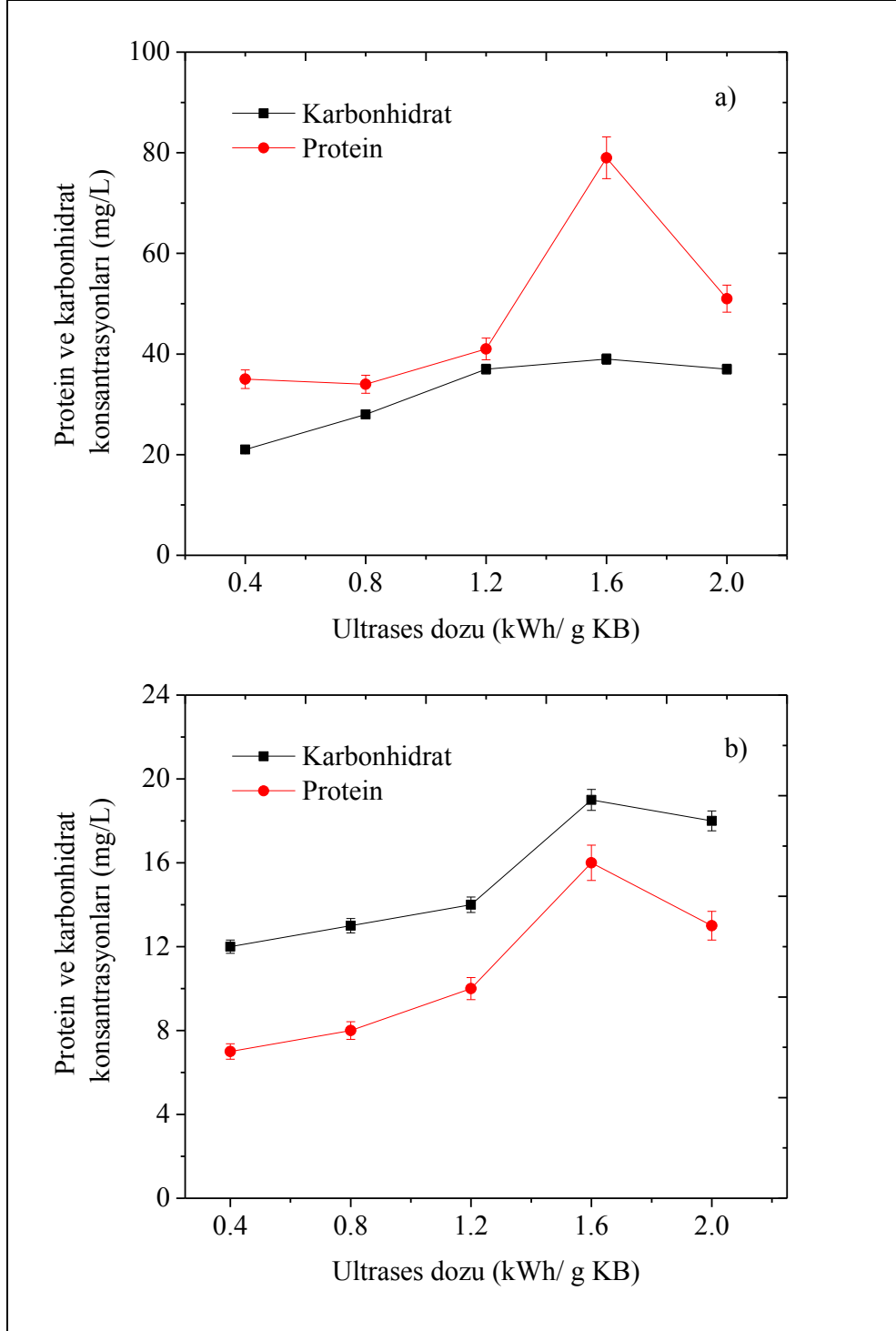
Yüksek dozda ozon uygulamalarında da, hücrelerin kendiliğinden çökme eğilimini değiştirmediği ve tam çökmenin 24 saat sonunda elde edildiği görülmüştür.

4.3. Ultrases Çalışmaları

Mikroalglerin bulundukları su ortamından ve mikroalg hücre içi materyalin hücreden ayıştırılmasında, araştırılan bir diğer yöntem ise ultrases uygulamalarıdır. Hücre parçalamada etkinliği kanıtlanan ultrasesin, mikroalg türünün değişmesiyle, etkinliğinin nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla karşılaştırılmalı olarak gerçekleştirilen bu çalışmalarda BG11 sentetik besi ortamında yetiştirilen *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü ve BAEA’da yetiştirilen *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır.

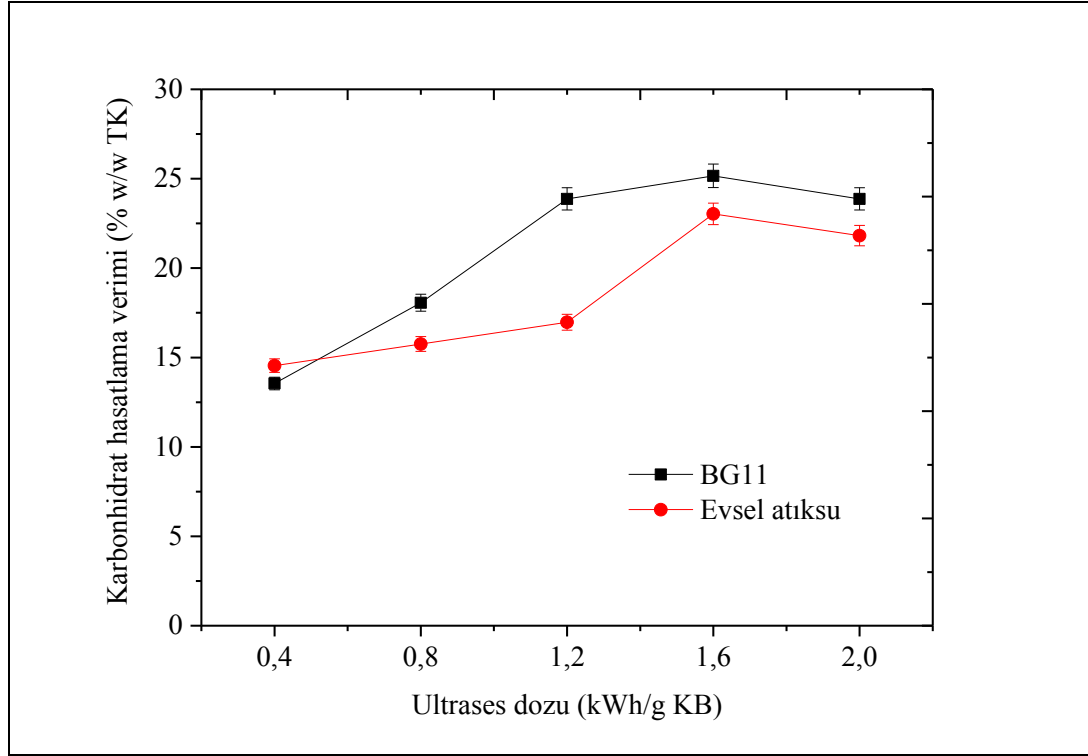
Her iki kültür ortamında yetiştirilen mikroalg çözeltilerine uygulanan ultrases dozuna (UD) bağlı olarak, süzüntü numunelerindeki protein ve karbonhidrat konsantrasyonlarındaki değişim Şekil 4.11’de gösterilmektedir. Her iki kültürde de ultrasonik enerji yoğunluğunun 0,4 kWh/L’ye kadar arttırılmasıyla hem protein hem de karbonhidrat konsantrasyonlarının arttığı görülmektedir.

Chlorococcum türlerinin baskın olduğu kültürden karbonhidrat ayrıştırılma veriminin yaklaşık 4 kat, protein ayrıştırılma veriminin yaklaşık 13 kat arttığı, *Scenedesmus* türlerinin baskın olduğu kültürde ise karbonhidrat ve protein ayrıştırılma verimlerinin ise yaklaşık olarak 5 kat arttığı görülmektedir.



Şekil 4.11: Farklı ultrasonik enerji yoğunlukları için a) BG11 ve b) BAEA besi ortamlarında yetişen mikroalg kültürlerine ait süzüntü numunelerindeki karbonhidrat ve protein konsantrasyonlarındaki değişim.

Her iki kültür ortamında yetiştirilen mikroalgelere ultrases uygulandıktan sonra elde edilen süzöntü numunelerindeki karbonhidrat miktarının, hücredeki toplam karbonhidrat miktarına yüzde olarak oranının, artan ultrases dozuna bağlı değişimi Şekil 4.12’de gösterilmektedir.



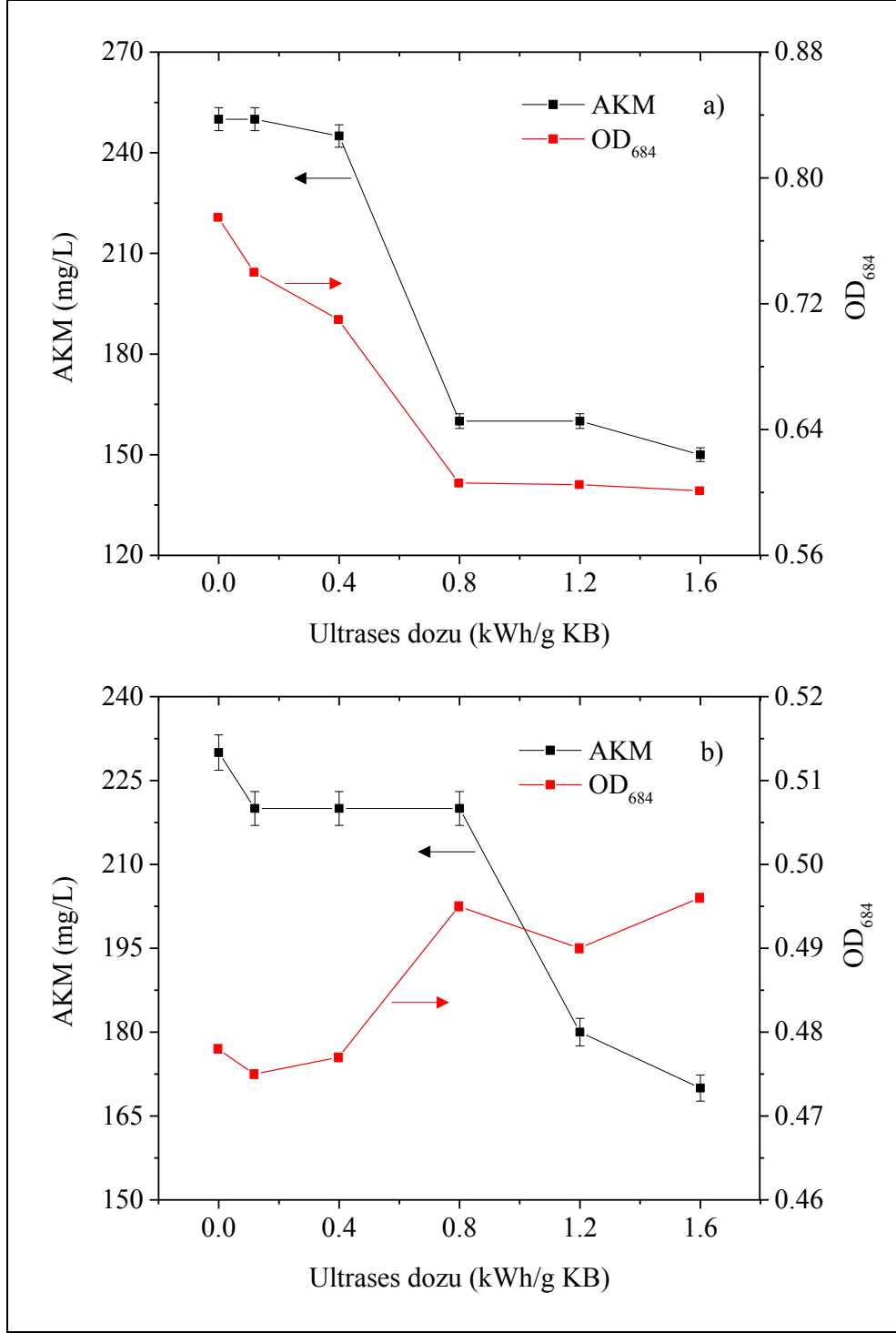
Şekil 4.12: Farklı ultrasonik enerji yoğunlukları için BG11 ve BAEA besi ortamlarında yetişen mikroalg süspansiyonlarında meydana gelen karbonhidrat hasatlama verimleri.

Şekil 4.12 incelendiğinde US gücünün 1,6 kWh/gKB olarak uygulanmasıyla *Chlorococcum* türlerinin baskın olduğu kültürde hücredeki toplam karbonhidratın %25’inin, *Scenedesmus* türlerinin baskın olduğu kültürde ise %23’ünün hücre dışına çıkarılmasının asğılandığı tespit edilmiştir.

Sonuçlar ultrases uygulamalarının, mikroalg türlerinden bağımsız olarak, protein ve karbonhidrat hasatlanmasında kullanılabilinecek başarılı bir yöntem olduğunu göstermektedir. US uygulamalarının hücresel parçalamada etkin rol aldığı yapılan SEM görüntülemeleriyle de tespit edilmiştir (Ek D). Ancak, Şekil 4.12’den de görüldüğü gibi ultrases dozunun 2,0 kWh/gKB’ye çıkarılmasıyla hasatlanan madde miktarının düştüğü ve bu durumun sonikasyon sırasında oluşan mikro kabarcıkların, hücreler yerine birbirleriyle etkileşime girmelerinden

kaynaklanabileceği düşünülmüştür [Sivakumar and Pandit, 2001]. Bu durum için geçerli olabilecek bir başka açıklama ise US uygulamaları sırasında oluşan OH[•] radikallerin, ortama salınan hücre içi maddelerle reaksiyona girerek, organik yapıları oksitlemesidir [Zhang et al., 2006].

Mikroalg çözeltilerindeki hücre yoğunluğunun, çözeltiden geçecek ışık miktarını etkilediği ve artan hücre konsantrasyonlarında, çözeltilerin ışık absorblama kapasitesinin artacağı bilinmektedir. Çözeltideki hücre yoğunluğun belirlenmesinde kullanılan AKM analizinin, çözeltilerin optik yoğunluğu (OY), yani ışık absorblama kapasitesi, ile olan bağıntısı, çalışmada kullanılan her iki mikroalg kültürü için de belirlenmiş ve korelasyon grafikleri EK B’de sunulmuştur. Literatürde çeşitli hücre parçalama metotlarının performanslarının OY ölçümleri vasıtasıyla belirlendiği görülmektedir [Zhang et al., 2006; Joyce et al., 2010; Rajasekhar et al., 2012; Wu et al., 2012]. Bu nedenle US çalışmalarında hücre parçalanma, AKM analizleri ve OY ölçümleri yapılarak takip edilmiştir. US sonrası, BG11 besi ortamında yetiştirilen türlere ait AKM ve OY değişimlerinin benzer bir eğilim gösterdiği ve ultrasonik enerji yoğunluğunun artmasıyla AKM ve OY değerlerinin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.13a)). Ancak, BAEA ortamında yetiştirilen kültüre uygulanan ultrasonik enerji yoğunluğunun artmasıyla, AKM değerlerinin azaldığı buna karşılık OY değerlerinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.13 b)). US uygulanmasının her iki kültürde farklı OY değişimleri göstermesinin, mikroalg türlerinin yapısal özelliklerinin birbirlerinden farklı olması nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. BAEA ortamında yetiştirilen mikroalglerin parçalanması sonucu çözeltiliye geçen hücre parçalarının 684 nm’de ışık absorpladığı bu nedenle OY değerlerinin arttığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, OY ölçümlerinin, AKM yerine hücre parçalanmasını gösterebilecek bir analiz metodu olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.13: Farklı ultrasonik enerji yoğunlukları için a) BG11 ve b) BAEA besi ortamlarında yetişen mikroalg süspansiyonlarında meydana gelen AKM ve optik yoğunluk değişimi.

Ultrases uygulamalarının, hücrelerin kendiliğinden çökelme eğilimi üzerindeki etkisinin belirlenmesinde ozonlama deneylerinde anlatıldığı gibi İmhoff hunisi kullanılmıştır. Kendiliğinden çökelme eğiliminde olan *Chlorococcum* türlerinin baskın olduğu kültürün US uygulanması sonucunda çökelme eğiliminden uzaklaştığı ve su ortamında daha dağınık bir hal aldığı görülmüştür. İstenilen derecede çökelme yaklaşık 48 saat sonunda meydana gelmiştir. Askıda kalma eğiliminde olan ancak karanlık ve soğuk ortamda yaklaşık 24 saat içinde çökelme görülen BAEA ortamında yetiştirilen *Scenedesmus* türlerinin, US uygulama sonrasında 48 saat sonunda bile tam bir çökelme göstermediği gözlenmiştir. Sonuçlar, US uygulamalarının mikroalglerin bulundukları su ortamından ayrıştırılmasında kullanılabilecek bir yöntem olmadığını göstermektedir.

4.3.1. Ultrases Destekli Lipit Ekstraksiyonu

Ultrases destekli lipit ekstraksiyonu çalışmalarında ultrasesin hücresel parçalanma ve lipit ekstraksiyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi için, mikroalg çözeltilerinin bir kısmına 30 kHz ses frekansında 0,4 kWh/L ultrasonik enerji yoğunluğunda ultrases uygulanmış, bir kısmına ise hiçbir ön işlem uygulanmamıştır. Mikroalgal biyokütle çözeltiden ayrılmadan, karışım halindeki çözeltiler üzerine 50 mL *n*-hekzan ya da K/M (1:1, h/h) karışımı eklenerek 5 dk boyunca hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi sonunda faz ayrımının sağlanması için çözelti ayırma hunisinde bekletilmiştir. Ekstraksiyonda kullanılan solvent sudan hafif (*n*-hekzan) ise lipit üst fazda, ağır (kloroform) ise alt fazda yer alır. Bu durum göz önünde bulundurularak faz ayrımı sağlanmıştır. Lipit içeren solvent fazındaki lipit miktarı Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde tespit edilmiştir. Biyokütle içeren su fazındaki lipit miktarının tespitinde ise Bölüm 3.2.1’de anlatılan modifiye Bligh and Dyer yöntemi kullanılmıştır.

Yukarıda anlatılan bu süreç sayesinde ultrasesin mikroalgal biyokütledeki lipit ekstraksiyonuna olan etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, mikroalgal biyokütle içeren çözeltiye solvent ilavesinin de, hücresel parçalanma sağladığı ve hücrelerden lipidin ekstrakte edilmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Bu nedenle, solventlerin neden olduğu hücresel parçalanma etkisini, ultrasesin etkisinden ayırmak için bir kısım çözelti US sonrası 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek algal biyokütlenin çözeltiden

ayrılması sağlanmıştır. Böylece Tablo 4.2’den de görüleceği gibi, mikroalg biyokütleden lipit ekstraksiyonunu etkileyen üç farklı parametre (i) sonikasyon (uygulandı ya da uygulanmadı), (ii) solvent ilavesi öncesi santrifüj (uygulandı ya da uygulanmadı), (iii) ekstraksiyonda kullanılan solventin türü (*n*-hekzan ya da K/M karışımı) etkisi, sekiz farklı deney gerçekleştirilerek belirlenmiştir.

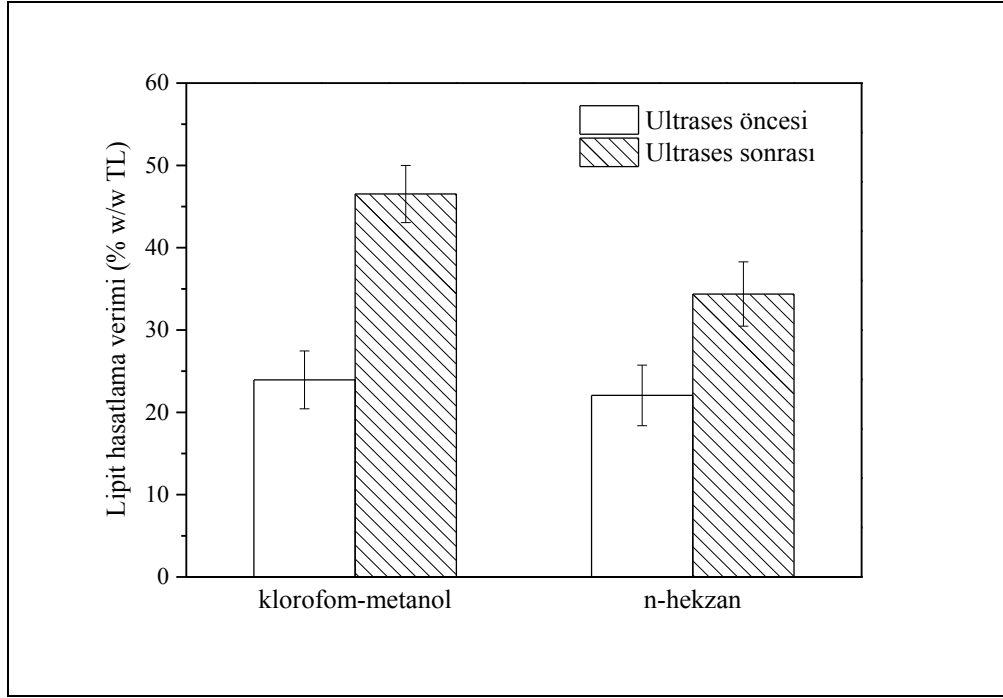
Tablo 4.2: Ultrases destekli lipit ekstraksiyonu için uygulanan deney tasarımı.

Deney no	Deneysel değişkenler		
	Ultrases	Ön santrifüj	Kullanılan solvent
1	Uygulanmadı	Uygulanmadı	Kloroform-metanol
2			<i>n</i> -hekzan
3	Uygulandı		Kloroform-metanol
4			<i>n</i> -hekzan
5	Uygulanmadı	Uygulandı	Kloroform-metanol
6			<i>n</i> -hekzan
7	Uygulandı		Kloroform-metanol
8			<i>n</i> -hekzan

Mikroalg çözeltilisine ultrases uygulandığı ya da uygulanmadığı her iki durumda da mikroalg çözeltilisine solvent ilavesi sonrası, çözeltideki lipit miktarındaki değişimin toplam lipit üzerindeki etkisi Şekil 4.14’te gösterilmektedir. Mikroalg çözeltilisine direk solvent eklenmesiyle K/M kullanıldığında çözeltide %23,9 (TLB), *n*-hekzan kullanıldığı durumda ise %22,1 (TLB) bulunmuştur. Mikroalg çözeltilisine US uygulandıktan sonra bu solventlerin kullanılmasıyla elde edilen lipit miktarları K/M için çözeltide %46,5 (TLB), *n*-hekzan için %34,4 (TLB) olarak tespit edilmiştir. Mikroalg çözeltilisine ultrases uygulanmasının lipit ekstraksiyonunu her iki solvent için de önemli oranda etkilediği görülmüştür.

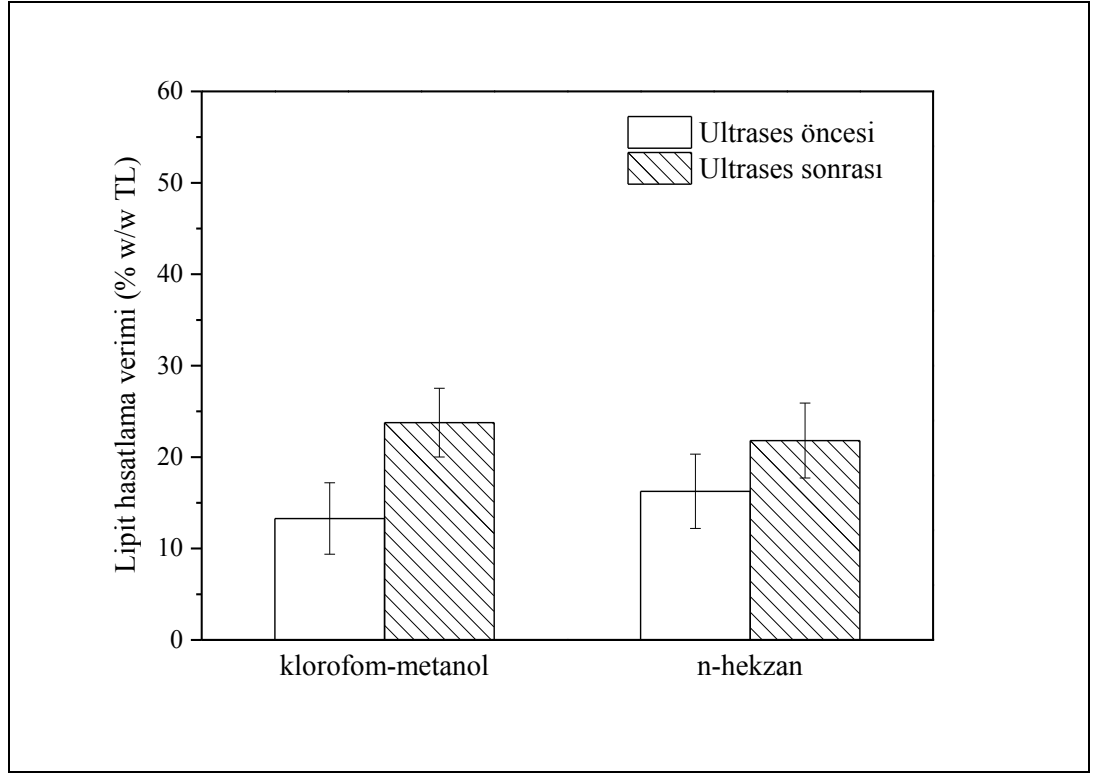
Literatürle uyum içerisinde olan sonuç, mikroalg çözeltilisinden lipit ekstraksiyonunda, US sonrası K/M kullanılmasıyla en yüksek lipit ekstraksiyon verimi elde edileceği yönündedir. Bu durum K/M karışımının polar ve polar olmayan çözücülerini içermesi, böylelikle hem hücre içi hem de hücre membrandaki lipitleri ekstrakte etmesiyle açıklanmaktadır [Ranjan et al., 2010; Prommuak et al., 2012;

Araujo et al., 2013] ancak, polar olmayan bir solvent olarak *n*-hekzanın sadece hücre içindeki lipitleri ekstrakte etmede başarılı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.14: Ultras es sonrası doğrudan solvent eklenmesiyle mikroalg süspansiyonunda meydana gelen lipit değişimi.

Ultras es ve solvent kullanımının, hücresel parçalanma ve lipit ekstraksiyonu üzerindeki ortak etkisi bu şekilde belirlendikten sonra, ikinci set deneylerinde, solventlerin neden olduğu hücresel parçalanma etkisini, ultras esin etkisinden ayırmak için bir kısım çözelti solvent ilavesi öncesinde santrifüj edilerek algal biyokütlenin çözeltiden ayrılması sağlanmıştır. Böylelikle sadece ultras esin lipit ekstraksiyonu üzerindeki etkisi tespit edilebilmiştir. Şekil 4.15’de de görüldüğü gibi ultras es uygulamaları lipit ekstraksiyon verimini *n*-hekzan kullanıldığında %16,3’ten %21,8’e (TLB) artırırken, K/M kullanımı sonucunda %13,3’ten, %23,8’e (TLB) bir artış elde edilmiştir. Bu da ultras es uygulamasıyla lipit ekstraksiyon verimlerinde, toplam lipit bazında, K/M için yaklaşık %59, *n*-hekzan için yaklaşık %67 artış sağlandığını göstermektedir.



Şekil 4.15: Ultrases sonrası, solvent ilavesi öncesinde santrifüj uygulamasıyla mikroalg çözeltilerinde meydana gelen lipid değişimi.

Tüm deneysel çalışmalar değerlendirildiğinde, hücresel parçalanma ve lipid ekstraksiyonuna ultrases ve solventin birlikte kullanılmasının, tek başlarına kullanılmalarına nazaran daha etkili olduğu görülmüştür. Ultrases uygulamaları sonrasında çözeltideki lipid miktarının başlangıca nazaran yaklaşık iki kat arttığı ancak, bu uygulamaların hücrelerdeki lipidin tamamını çözeltiliye geçirmede başarılı olmadığı halen daha biyokütle bünyesinde önemli miktarda lipid kaldığı görülmektedir. Çalışmada en yüksek lipid ekstraksiyon verimi, mikroalg çözeltilisine ultrases uygulaması sonrasında K/M ilavesiyle %26,8 KB olarak elde edilmiştir. Ayrıca ultrases destekli lipid ekstraksiyonu çalışmalarında biyokütledeki toplam lipid miktarının sabit kalması, ultrasesin lipid yapısı üzerinde parçalayıcı bir etkiye neden olmadığını göstermektedir.

Ultrases uygulamalarının, mikroalgal lipidin kimyasal yapısı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla 0,4 kWh/L ultrasonik enerji yoğunluğunda ultrases uygulanan ve ultrases uygulanmayan mikroalg çözeltilerinden elde edilen lipid örnekleri Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde GC/FID kullanılarak analiz edilmiştir. GC/FID analizleri sonucunda tespit edilen lipid miktarları, Bligh and Dyer metodu

kullanılarak ölçülen toplam lipid miktarlarına oranlanmasıyla belirlenen nötral lipid içeriğinin US uygulanan ya da uygulanmayan her iki örnek için de yaklaşık olarak %75 civarında olduğu bulunmuştur. Ayrıca GC/FID analizleri sonucunda US uygulanmayan numunedeki monogliserit içeriğinin, nötral lipidlerin %23'ünü oluştururken US uygulamasıyla bu değerin %39'a yükseldiği, bunun karşılığında US uygulanmayan numunedeki digliserit içeriğinin US uygulanmasının ardından %47'den %30'a düştüğü tespit edilmiştir. US uygulanan ya da uygulanmayan her iki numunedeki trigliserit içeriğinin sabit kaldığı ve yaklaşık olarak nötral lipidlerin %30'unu teşkil ettiği bulunmuştur. Digliserit miktarı düşerken, monogliserit miktarının artmasının; bir kısım digliseritlerin US uygulamasıyla monogliseritlere parçalanmasından meydana geldiği düşünülmektedir. Bu durum için geçerli olabilecek bir başka açıklama ise; sonikasyonla, hücre içi enzimlerin hücre dışına salınarak, ortamdaki lipidi enzimatik hidrolize uğratmasıyla lipidin zincir yapısına zarar vermesidir. Ayrıca, ultrases uygulamaları sırasında olduğu bilinen bölgesel "sıcak noktalarda" ortamdaki metanol varlığında digliseritlerin monogliseritlere transesterifikasyonla dönüşmüş olma ihtimali de bu durum için geçerli olabilecek bir başka açıklamadır.

4.4. Ozonlama Sonrası Ultrases Kullanım Çalışmaları

Bir önceki kısımda hücre parçalanmasına olan etkileri ayrı ayrı incelenen ozon ve ultrases uygulamaları bu bölümde beraber kullanılmış ve ortak etkileri incelenmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda yapılan deneylerde bu ortak etkiyi daha başarılı bir şekilde belirlemek için yaygın olarak kullanılan Box-Behnken deneysel tasarım metodundan yararlanılmıştır. Tüm deneysel çalışmalarda 500 mg/L biyokütle konsantrasyonuna sahip BG11 kültür ortamında yetiştirilen ve *Chlorococcum* türlerinin baskın olduğu mikroalg kültürü kullanılmış ve deneyler Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi doğrultusunda belirlenen plan gereğince yapılan deneylere ilişkin seviyeler ile her deney seti için değişen parametreler Tablo 4.3'de verilmektedir.

Tablo 4.3: Uygulanan Box-Behnken deneysel tasarımı.

No	Deneysel tasarım seviyeleri	Ozon dozu (g O ₃ /g KB)	Ultrases yoğunluğu (W/L)	Ultrases uygulama süresi (dk)	Ultrases dozu (kWh/g KB)
0		0	0	0	0
1	-- 0	0,03	300	20	0,20
2	- 0 -	0,03	400	10	0,07
3	- 0 +	0,03	400	30	0,20
4	- + 0	0,03	500	20	0,34
5	0 --	0,15	300	10	0,10
6	0 - +	0,15	300	30	0,30
7	0 0 0	0,15	400	20	0,26
8	0 0 0	0,15	400	20	0,26
9	0 0 0	0,15	400	20	0,26
10	0 + -	0,15	500	10	0,16
11	0 + +	0,15	500	30	0,50
12	+ - 0	0,27	300	20	0,20
13	+ 0 -	0,27	400	10	0,14
14	+ 0 +	0,27	400	30	0,40
15	+ + 0	0,27	500	20	0,34

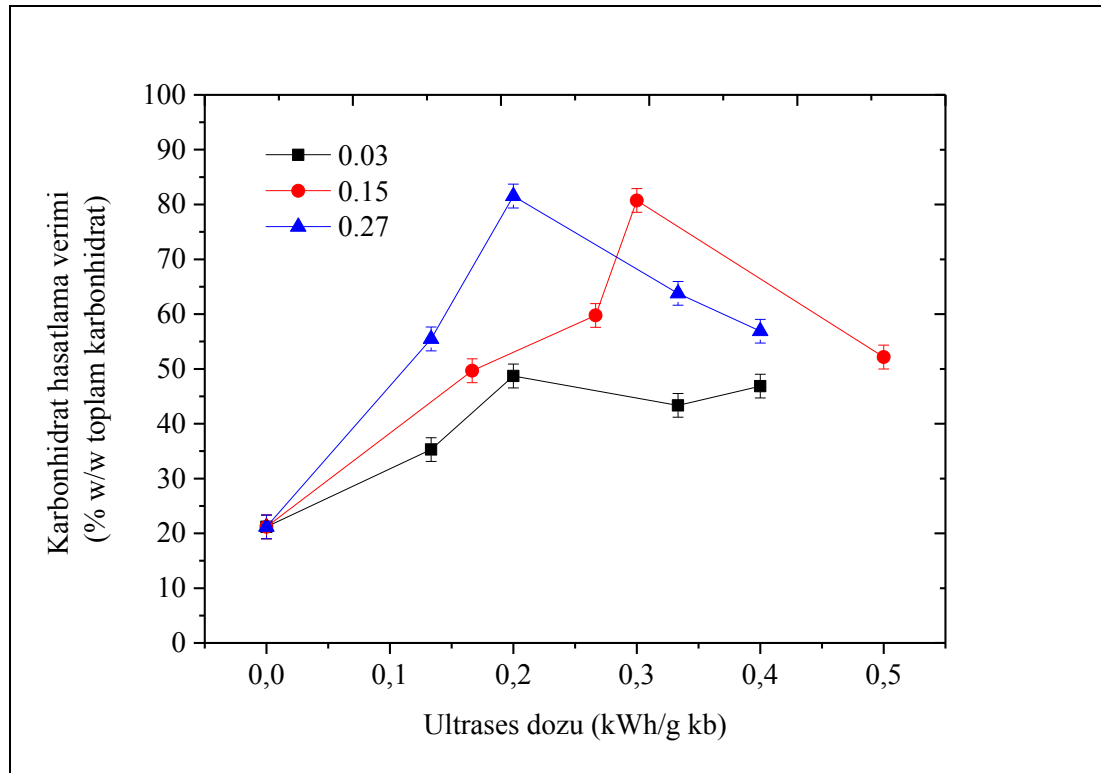
Bu deneylerde elde edilen sonuçlar ile hesaplanan yüzde hasatlama verimleri isse Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4: Box-Behnken deneysel tasarımına göre elde edilen deney sonuçları ve hesaplanan yüzde hasatlama verimleri.

No	Deneysel tasarım seviyeleri	Ultrases dozu (kwh/L)	Karbonhidrat (mg/L)	Lipit (Çözelti) (mg)	Lipit (Süzüntü) (mg)	Lipit (Toplam) (mg)	Karbonhidrat hasatlama verimi (% (TKB))	Lipit hasatlama verimi (% (TLB))
0		0	71,0	6,9	1,2	8,1	21,2	14,8
1	– – 0	0,10	90,8	6,7	2,3	9,0	48,7	25,3
2	– 0 –	0,07	84,2	6,9	1,2	8,2	35,3	15,3
3	– 0 +	0,20	103,2	8,6	2,8	11,4	46,9	24,4
4	– + 0	0,17	106,0	6,9	1,0	7,9	43,4	13,0
5	0 – –	0,05	109,8	6,0	1,3	7,3	70,1	17,8
6	0 – +	0,15	114,9	4,6	4,8	9,4	80,7	51,0
7	0 0 0	0,13	123,0	4,1	2,8	7,0	62,2	40,6
8	0 0 0	0,13	118,7	5,4	2,1	7,5	58,1	28,0
9	0 0 0	0,13	124,4	5,5	2,4	7,9	58,9	30,1
10	0 + –	0,08	110,3	4,3	1,7	6,1	49,7	28,5
11	0 + +	0,25	105,5	4,2	2,2	6,4	52,2	34,6
12	+ – 0	0,10	116,4	7,4	3,8	11,2	81,5	33,9
13	+ 0 –	0,07	121,8	4,7	1,4	6,2	55,5	23,2
14	+ 0 +	0,20	120,7	4,0	2,0	6,0	56,9	34,1
15	+ + 0	0,17	143,7	3,7	1,6	5,4	63,8	30,8

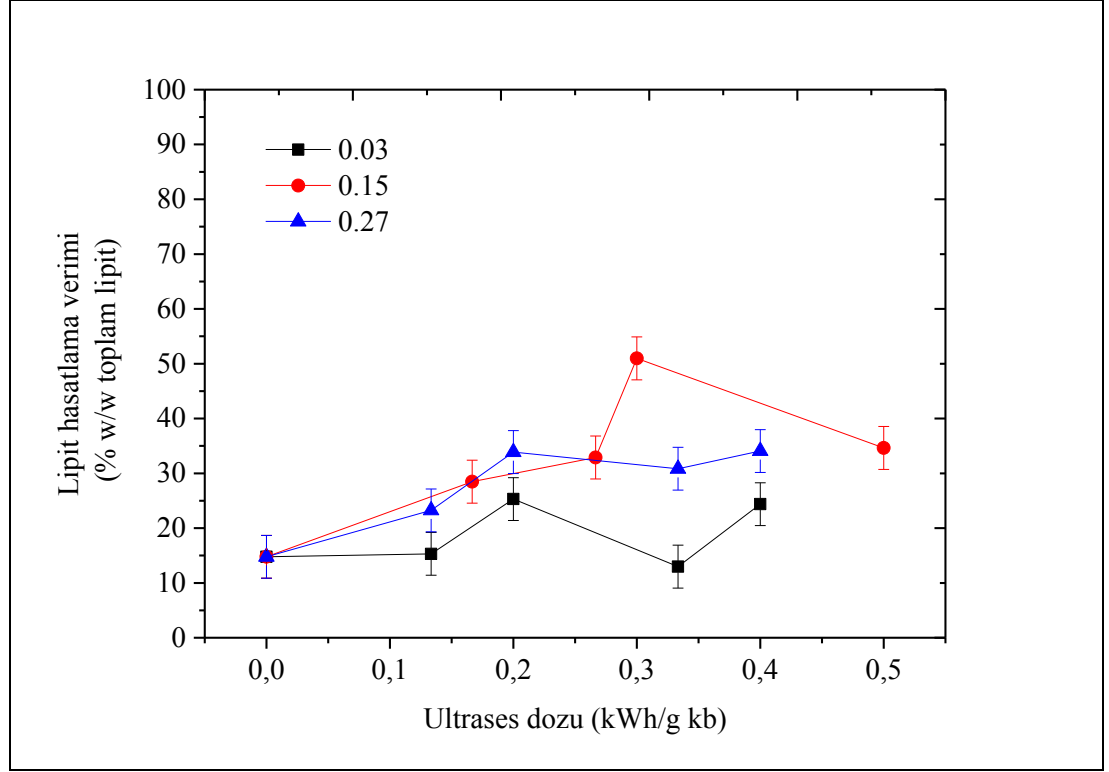
Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de görüldüğü üzere mikroalg biyokütlesi farklı ozon ve ultrases dozlarına maruz bırakılarak ortamdaki lipit ve karbonhidrat miktarlarındaki değişim izlenmiş ve her deney seti için yüzde karbonhidrat ve lipit hasatlama verimleri hesaplanmıştır. Birbiriyle kıyaslanabilir ve hasatlama verimliliğine dayanan bu yüzde oranları Box-Behnken deneysel tasarımında birer sistem cevabı olarak tanımlanmıştır.

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilen, ozon ve ultrases dozuna bağlı olarak karbonhidrat ve lipit hasatlama verimlerindeki değişim incelendiğinde, ultrases enerjisinin ve ozon dozunun artmasıyla beraber karbonhidrat hasatlama veriminde belirgin artışlar gözlemlenirken aynı durum lipit için söylenememektedir. Karbonhidrat hasatlama verimi 0,15 ve 0,27 g O₃/g KB ozon dozları için sırasıyla 0,3 ve 0,2 kWh/ g KB ultrases dozlarında en yüksek değerine (%80 (TKB)) ulaşmıştır. Bu da her iki ozon ve ultrases dozu çifti arasında bir optimum noktası olduğuna işaret etmektedir. Tüm ozon dozları için 0,3 kWh/ g KB ultrases dozundan sonra hasatlama veriminde artışın sonlandığı ve bir düşüşün yaşandığı gözlemlenmektedir. Bu durum artan ultrases dozunun ozonun etkisini azalttığını göstermektedir.

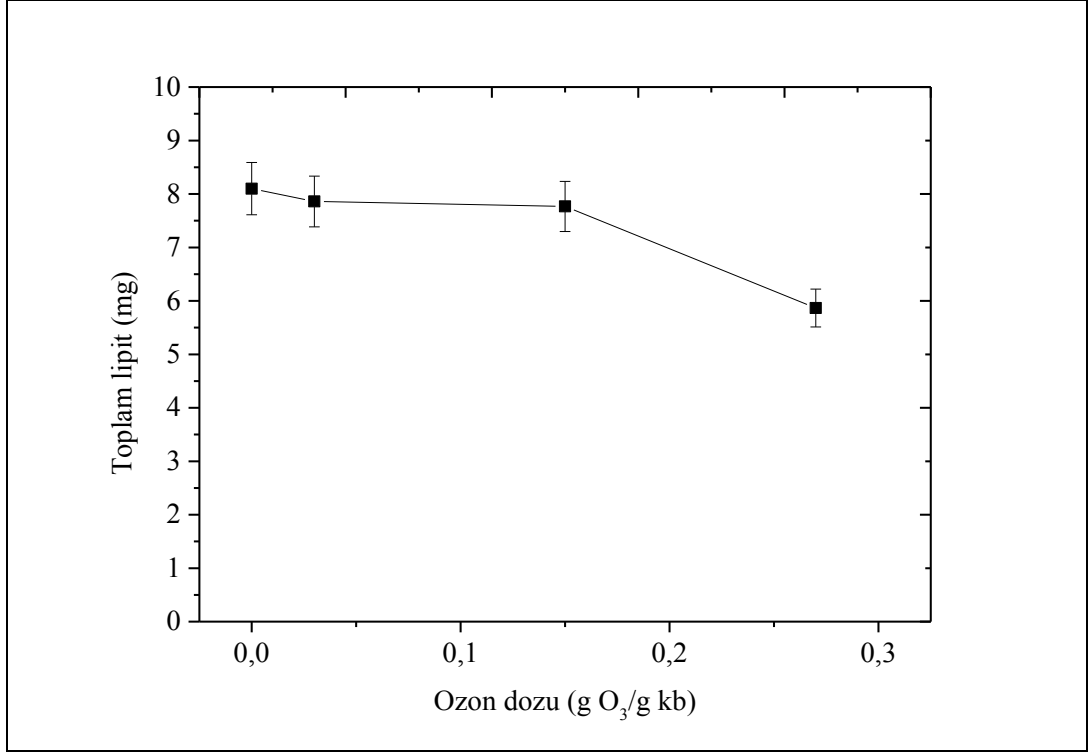


Şekil 4.16: Değişen ozon dozları sonrası uygulanan farklı ultrases dozları için karbonhidrat hasatlama verimleri.

Öte yandan ulaşılan en yüksek lipit hasatlama verimi %52 (TKB) olup, artan ozon dozuyla bu verimin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.17). Buna artan ozon dozuyla beraber artan lipit oksidasyonunun neden olduğu düşünülmektedir. Özellikle toplam lipit miktarının artan ozon dozuyla değişiminin verildiği Şekil 4.18’de de görüldüğü gibi lipit miktarı 0,15 g O₃/g KB ozon dozundan sonra belirgin (%25 civarında) bir düşüş göstermektedir.



Şekil 4.17: Değişen ozon dozları sonrası uygulanan farklı ultrases dozları için lipit hasatlama verimleri.



Şekil 4.18: Değişen ozon dozları için toplam lipit miktarındaki değişim.

Box-Behnken deneysel tasarımı kapsamında üretilen sistem cevapları (yüzde hasatlama oranları) üç farklı deney değişkeni (ozon dozu, ultrases yoğunluğu ve ultrases süresi) arasındaki ilişkiyi bulabilmek için bir istatistik yazılımı (JMP 10, SAS) kullanarak varyans analizi (ANOVA) ve regresyon modeli gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen ANOVA analiz sonuçları üç ayrıştırma oranından sadece karbonhidrat ayrıştırma oranına dayanan model için hesaplanan p değerinin (istatistiksel anlamlılık seviyesinin) 0,05'ten küçük olduğunu göstermiştir. Bu da sadece karbonhidrat ayrıştırma oranlarına dayanan modelin sağlanması istenen %95 anlamlılık seviyesine ulaştığını ve istatistiksel anlamda anlamlı sonuçlar verebileceğini göstermektedir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Box-Behnken tasarımıyla elde edilen denklemler için ANOVA analizi sonuçları.

Sistem cevapları	Kaynak	Serbestlik derecesi	Karelerin toplamı	Ortalama kare	F oranı	p-değeri
Karbonhidrat ayrıştırma oranı	Model	9	0,0844	0,0094	7,2231	0,0212*
	Kalan	5	0,0065	0,0013		
	Toplam	14	0,0909			
Lipit ayrıştırma oranı	Model	9	0,1201	0,0133	3,9659	0,0717
	Kalan	5	0,0168	0,0034		
	Toplam	14	0,1369			

Kullanılan istatistik yazılımı tarafından karbonhidrat ayrıştırma oranı için oluşturulan regresyon model eşitliği aşağıda verilmiş olup modelin korelasyon katsayısı (R^2) 0,93'tür.

$$Y = 0,037 + 0,066x_1 - 0,055x_2 + 0,019x_3 - 0,02x_1x_2 - 0,018x_1x_3 - 0,01x_2x_3 - 0,048x_1^2 + 0,045x_2^2 - 0,023x_3^2 \quad (4.2)$$

Burada Y sistem cevabını (karbonhidrat ayrıştırma verimini), x_1 birinci değişken (ozon dozu), x_2 ikinci değişken (ultrases yoğunluğu) ve x_3 üçüncü değişken (ultrases süresi) temsil etmektedir.

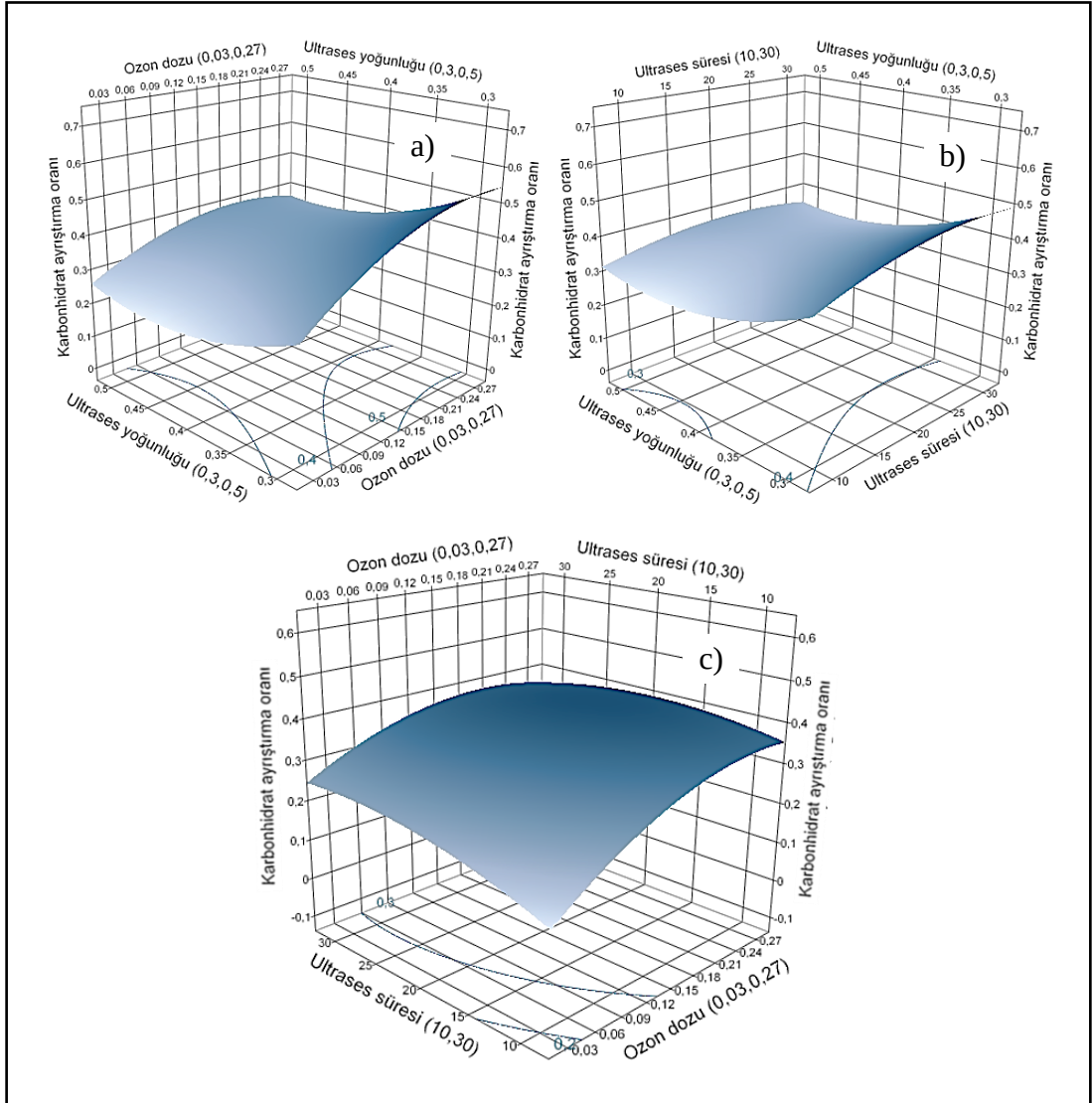
Elde edilen model katsayılarına ait anlamlılık analizi incelendiğinde (Tablo 4.6), karbonhidrat hasatlama verimi üzerinde diğer faktörlere kıyasla ozon dozunun daha belirgin bir pozitif ve ultrases yoğunluğunun diğer faktörlere kıyasla sırasıyla daha belirgin bir negatif etkisi vardır denebilir. Tablodan da görülebileceği gibi ozon dozunun ve ultrases uygulama süresinin ayrıştırma oranını arttırıcı etkisine rağmen ultrases uygulamasının bu etkiye zıt yönde ve azaltıcı şekilde, bir etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu durumun başlıca nedeni ultrasesin, kısa ultrases uygulama süreleri için, ozonun sahip olduğu oksitleme kabiliyetini indirgeyici (ozon ve ozonun parçalanmasıyla oluşan serbest radikalleri bozarak) yönde etki gösterirken, ultrases uygulama süresinin artışıyla beraber ortamdaki ozonun da yok olmasıyla birlikte ultrasesin baştaki bu negatif etkiden pozitif etkiye geçiş yapmasıdır.

Tablo 4.6: Model katsayılarına ait anlamlılık analizi.

Faktörler	Katsayı	t oranı	t oranı (bar)	p değeri
Ozon dozu	0,0662	5,20		0,0035*
Ultrases yoğunluğu	-0,055	-4,32		0,0076*
Ozon dozu ²	-0,0479	-2,56		0,0509
Ultrases yoğunluğu ²	0,0445	2,38		0,0634
Ultrases süresi	0,0188	1,47		0,2010
Ultrases süresi ²	-0,0229	-1,22		0,2761
Ozon dozu × Ultrases yoğunluğu	-0,02	-1,11		0,3175
Ozon dozu × Ultrases süresi	-0,0175	-0,97		0,3760
Ultrases yoğunluğu × Ultrases süresi	-0,01	-0,56		0,6028

Bu faktörlerin birbirleriyle olan ilişkileri, oluşturulan yüzey cevap grafiklerinde ayrıca gösterilmiştir (Şekil 4.19). Yüzey cevap grafikleri incelendiğinde, ozon dozu ve ultrases yoğunluğu ikilisi arasında ozon dozunun, ultrases süresi ve ultrases yoğunluğu arasında ise ultrases süresinin karbonhidrat hasatlama verimini artırıcı değişken olduğu görülmektedir (Şekil 4.19 a)ve b)). Öte yandan ozon dozu ve ultrases süresi değişkenlerinin hasatlama verimi üzerindeki etkisinin pozitif olduğu, ozonun ultrases süresine göre hasatlama verimi artışı üzerinde daha fazla etkisi olduğu görülmektedir (Şekil 4.19c)).

İstatistiksel açıdan kayda değer sonuçlar verilen karbonhidrat hasatlama modeli için optimizasyon hesaplamaları MATLAB 7.7 (Mathworks) yazılımında yer alan optimizasyon araçları (optimtool) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve model için optimum parametre kombinasyonu şu şekilde bulunmuştur: 0,25 g O₃/g KB ozon dozu, 0,3 W/L ultrases yoğunluğu ve 23 dk ultrases uygulama süresi (0,23 kWh/ g KB ultrases dozu).0



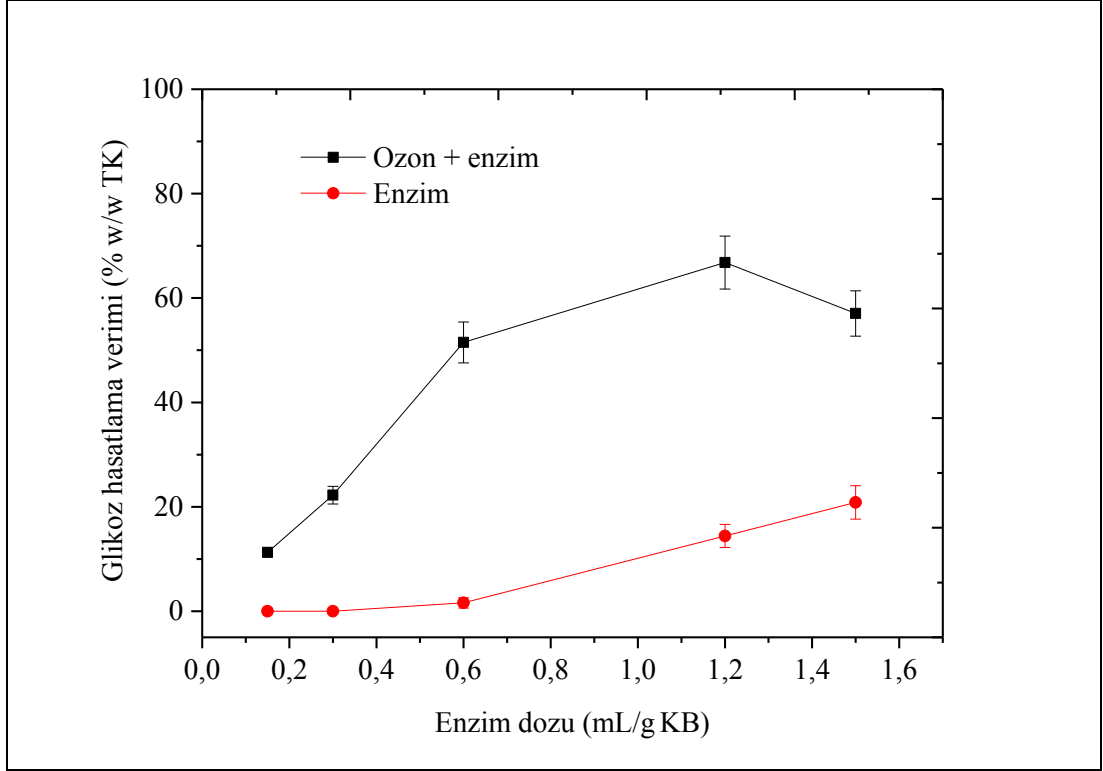
Şekil 4.19: Karbondhidrat ayrıştırma verimleri için, a) ozon dozu - ultras ses yoğunluğu, b) ultras ses süresi - ultras ses yoğunluğu c) ozon dozu - ultras ses süresi karşılaştırmalı yüzey cevap grafikleri.

4.5. Mikroalgal Biyokütlenin Fermentasyon Öncesi Ön Arıtımında Uygulanan Yöntemler

4.5.1. Ozon ile Ön Arıtım

Mikroalg biyokütlesine sadece ozon uygulanmasıyla hücresel polisakkaritlerin, monomerik şekerlere (glikoz) kadar parçalanmasının araştırıldığı bu çalışmalarda 0,25 – 2,0 g O₃/g KB aralığında değişen ozon dozları, hücre konsantrasyonu 10 g/L olan, 3 mL mikroalg çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde yürütülmüş ve ozonlama sonrası süzöntü numunelerindeki glikoz miktarı, önceden glikoz kullanılarak kalibrasyonu yapılan HPLC’de analiz edilmiştir. Herhangi bir enzim ilavesi yapılmadan gerçekleştirilen bu çalışmalarda çok düşük glikoz dönüşüm verimleri (% 0,5 altında (TKB)) elde edilmiştir. Bu çalışmalar, enzim ilavesi olmadan ozonlamanın, hücresel polisakkaritleri glikoza dönüştürmede etkili olmadığını ancak hücresel parçalanmada etkin rol aldığı yapılan SEM görüntülemeleriyle tespit edilmiştir (Ek D).

Bu çalışmaların ışığı altında gerçekleştirilen ikinci set deneylerde, 0,5 g O₃/ g KB ozon dozu kullanılarak ozonlanan mikroalg çözeltileri üzerine artan konsantrasyonlarda enzim karışımları (0,15-1,5 mL g/KB Celluclast 1.5L/Novozym 188 ¹/₂ v/v) ilave edilmiştir. Sonuçlar sadece enzimlerin kullanıldığı ön arıtım çalışmalarıyla birlikte sunulmuştur. Ön arıtım çalışmaları sonrasında süzöntü numunelerindeki glikoz miktarının, mikroalg hücresinde bulunan toplam karbonhidrata yüzdece oranının, artan enzim dozuna bağlı olarak değişimi Şekil 4.20’de verilmiştir.



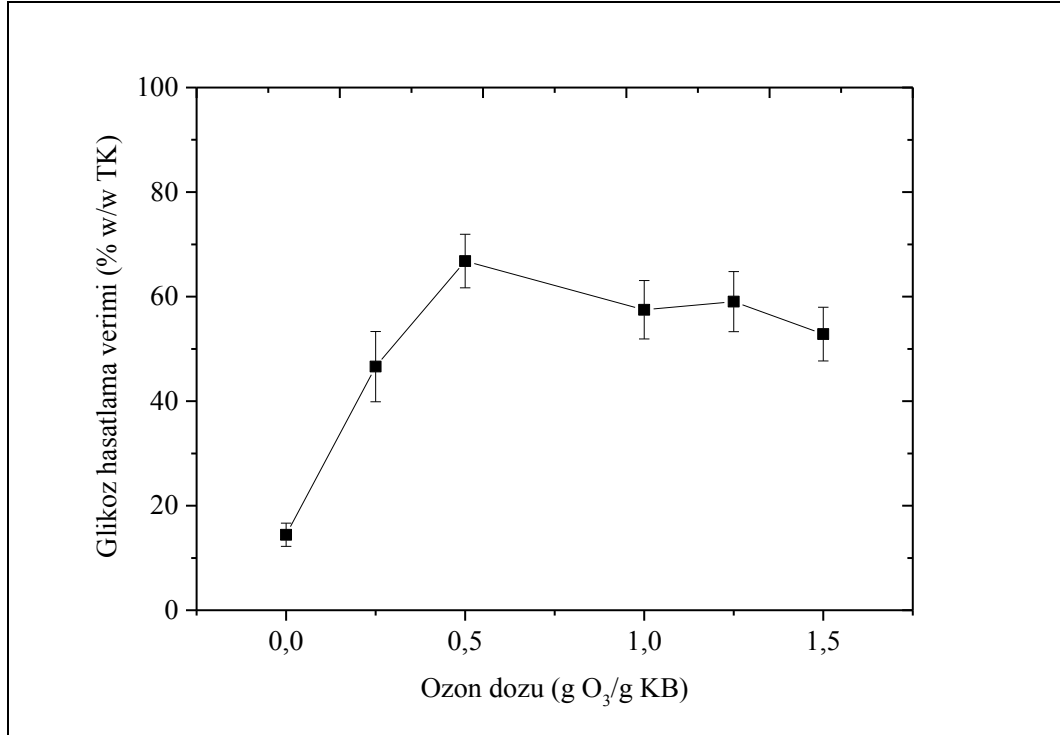
Şekil 4.20: Sadece enzim ve ozon sonrası enzim uygulamalarından elde edilen glikoz verimlerinin 0,5 g O₃/g KB ozon dozu için farklı enzim dozlarında karşılaştırılması.

Glikoza dönüşüm veriminin, enzim miktarının arttırılmasına bağlı olarak arttığı, 1,2 mL/g KB enzim dozunda en yüksek glikoza dönüşüm veriminin % 66,8 ± 5,1 TK olarak elde edildiği görülmektedir. Bu tepe noktasında ozon uygulamalarının enzimatik sakkarifikasyonu önemli derecede etkileyerek glikoza dönüşüm verimini yaklaşık 4,6 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Buna karşılık sadece enzimlerin kullanıldığı ön arıtım çalışmalarında en yüksek glikoza dönüşüm verimi %14,5 (TKB) olarak 1,5 mL/g KB enzim dozunda elde edilmiştir. Çalışma sonucunda ozon ve enzim ile ön arıtım yöntemlerinin tek başlarına kullanılmalarından ziyade birlikte kullanılmalarıyla çok daha yüksek glikoza dönüşüm verimi elde edileceği görülmüştür.

Mikroalg biyokütlesindeki polisakkaritlerin glikoza dönüştürülmesinde etkin enzim konsantrasyonu bu şekilde tespit edildikten sonra mikroalg çözeltileri farklı ozon dozlarında ozonlanarak en etkin ozon dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Sadece ozonlamanın etkilerinin araştırıldığı ilk set deneylerinde olduğu gibi bu deney setinde de 0,25 – 2,0 g O₃/g KB aralığında değişen ozon dozları, sabit hücre konsantrasyonu ve hacmi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ozonla ön arıtım

alışmaları bu şekilde yürütüldükten sonra mikroalg çözeltileri üzerine 1,2 mL/g KB enzim eklenerek enzimatik sakkarifikasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır.

şekil 4.21’de ozon ve enzimle ön arıtım çalışmaları sonrasında sznt numunelerindeki glikoz miktarının, mikroalg hücresinde bulunan toplam karbonhidrata yüzdece oranının, artan ozon dozuna bağlı olarak değişimi gösterilmektedir.

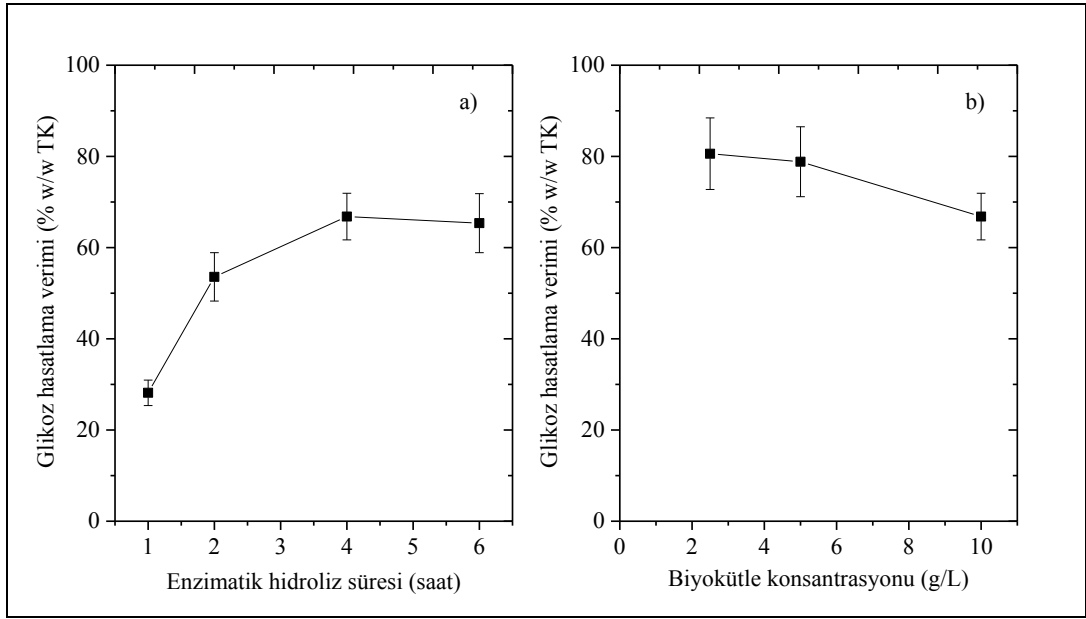


şekil 4.21: Farklı ozon dozları için, ozonlama sonrası sabit enzim dozu (1,2 mL/g KB) kullanılarak elde edilen glikoz verimlerinin karşılaştırılması.

şekil 4.21 inceendiğinde en yüksek glikoza dönüşüm verimi 0,5 g O₃/g KB ozon dozunda elde edilmiştir. 0,5 g O₃/g KB ozon dozunun altındaki ozon dozlarında, daha düşük glikoza dönüşüm verimi elde edilmesine, ozonla hücrelerin yeterli düzeyde etkileşime girmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Artan ozon dozlarında meydana gelen verimdeki azalmaya, ozonlama sırasında çözeltiye salınan polisakkaritlerin yine ozonla reaksiyona girmesi sonucu parçalanmasının neden olduğu düşünülmektedir.

Ozon destekli enzimatik sakkarifikasyon çalışmalarına ek olarak enzimatik hidroliz süresi ve biyokütle konsantrasyonunun glikoza dönüşüm verimi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. alışmalar daha önce anlatıldığı şekilde üç tekrarlı olarak

0,5 g O₃/g KB ozon dozunda ve 1,2 mL/g KB enzim konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.22’de enzimatik hidroliz süresinin glikoza dönüşüm verimi üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Glikoza dönüşüm veriminin enzimatik hidroliz süresinin artmasıyla arttığı görülmüştür. En yüksek glikoza dönüşüm veriminin 4 saatlik hidroliz süresi sonunda 68 ± 5 (TKB) olarak elde edildiği ve hidroliz süresinin daha da arttırılmasının glikoza dönüşüm verimini etkilemediği tespit edilmiştir.



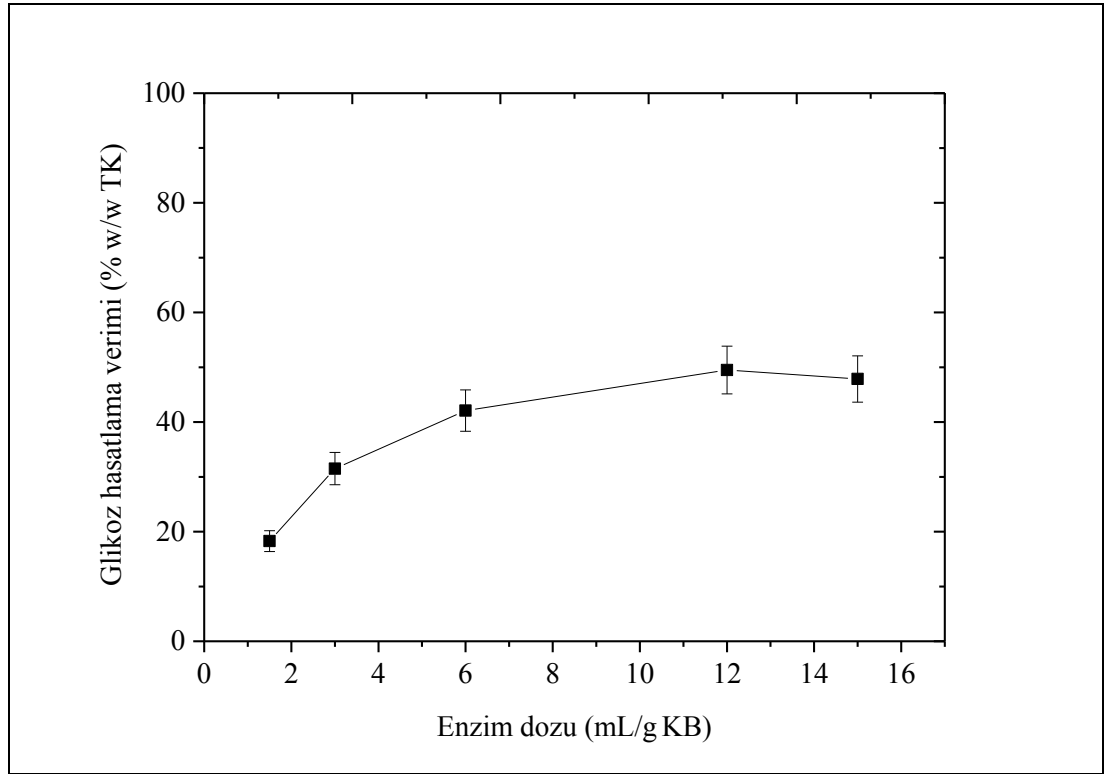
Şekil 4.22: Enzimatik hidroliz süresinin ve biyokütle konsantrasyonunun ozon sonra enzim uygulaması için 1,2 mL/g KB enzim dozunda glikoz verimi üzerindeki etkisi.

Biyokütle konsantrasyonunun artmasıyla, ozonun tüm biyokütle ile tam olarak reaksiyona girememesi ve bu nedenle ozonun kütle transfer hızının sınırlanması söz konusu olabilir. Ozon destekli enzimatik sakkarifikasyon deneylerinde kullanılan biyokütle konsantrasyonunun 10 g/L’den 5 ve 2,5 g/L düşürülmesiyle bu durum net bir şekilde gözlenmiştir. Beklenildiği gibi biyokütle konsantrasyonunun düşürülmesiyle glikoza dönüşüm verimi artmış, 5 g/L biyokütle konsantrasyonunda $78,8 \pm 7,7$ (TKB) elde edilirken biyokütle konsantrasyonunun en az kullanıldığı deney setinde glikoza dönüşüm verimi $80,6 \pm 7,8$ (TKB) olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda biyokütle konsantrasyonunun düşük tutulmasının glikoza dönüşüm verimi açısından daha avantajlı olduğu görülmüştür. Ancak biyokütle konsantrasyonunun düşürülmesi, sonraki proseslerin (hasatlama, kurutma vb) maliyetinin artmasına neden olacağından

yoğun biyokütle konsantrasyonu ile çalışmanın daha ekonomik olacağı düşünülmektedir.

4.5.2. Ultrases ile Ön arıtım

Ultrases ile mikroalglerin hasatlanması araştırıldığı Bölüm 4.3’de gerçekleştirilen çalışmalarda hücresel parçalanma ve hücre içi karbonhidrat salınımının en yüksek olduğu ultrases enerjisinin, birim biyokütle başına 1,6 kWh/g KB uygulanmasıyla elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle fermentasyon öncesi mikroalg çözeltilerinin ultrases ile ön arıtımında bu US gücü kullanılmıştır. Ultrases dozunun sabit tutulup, enzim konsantrasyonun kademeli olarak artırıldığı çalışmalarda, elde edilen glikoza dönüşüm verimleri Şekil 4.23’te verilmektedir.



Şekil 4.23: Ultrases (1,6 kWh/g KB) sonrası, enzim konsantrasyonlarının artırılmasıyla elde edilen glikoz verimleri.

US sonrası glikoza dönüşüm veriminin artan enzim konsantrasyonu ile arttığı ve en yüksek glikoza dönüşüm veriminin $49,5 \pm 4,4$ (TKB) olarak 1,2 mL/g KB enzim konsantrasyonunda elde edildiği görülmektedir. Ultrases ile ön arıtım sonucunda elde edilen bu glikoz dönüşüm veriminin kuru biyokütlenin $30,9 \pm 2,1$ 'e

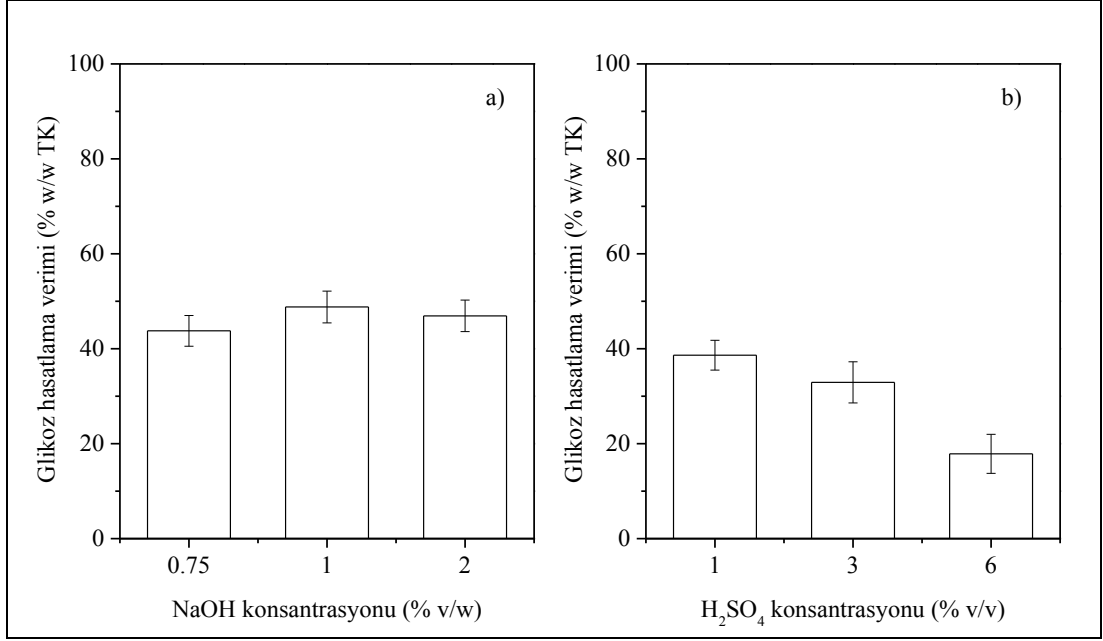
tekabül ettiği ve literatürde yer alan çalışmalarda farklı biyokütle konsantrasyonları (0,3-10 g/L) kullanılmasına rağmen benzer glikoza dönüşüm verimleri elde edildiği görölmektedir [Zhao et al., 2013].

4.5.3. Seyreltik Asit ve Alkali Ön arıtım

Fermentasyon öncesi biyokütlenin ozonla ön arıtımı çalışmalarında elde edilen sonuçların klasik ön arıtım yöntemlerinden seyreltik asit ve alkali ön arıtım ile karşılaştırılmasının yapıldığı bu deneylerde biyokütle konsantrasyonu 10 g/L ve çözelti hacmi 3 mL olarak sabit tutulmuştur. Ön arıtım sonrası çözeltiler üzerine 1,2 mL/g KB enzim ilavesi yapılarak enzimatik sakkarifikasyon Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

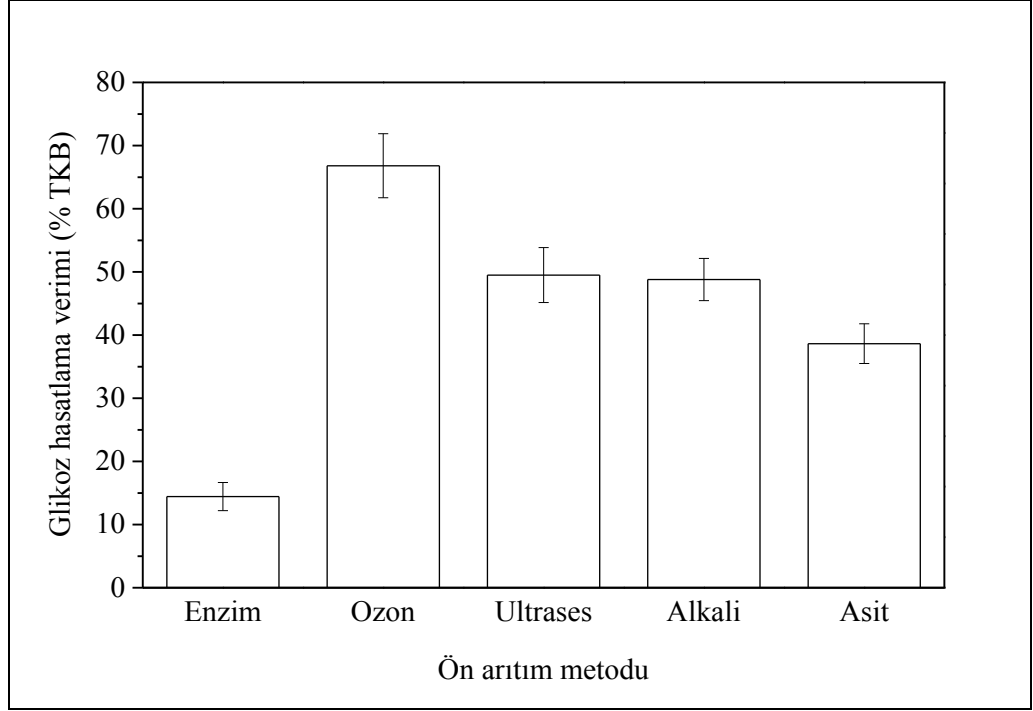
Asit ve alkali ön arıtım çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda H₂SO₄ ve NaOH çözeltileri kullanılarak elde edilen glikoza dönüşüm verimleri Şekil 4.24 a,b'de sunulmuştur. Asitle ön arıtım çalışmaları en yüksek glikoza dönüşüm verimi en düşük asit konsantrasyonunda %38,6 ± 3,1 (TKB) olarak elde edilmiştir. Asit konsantrasyonun %1'in altına düşürölmesinin toplam glikoza dönüşüm verimi üzerinde önemli derecede etki göstermeyeceği ancak asit konsantrasyonun artırılmasıyla glikoza dönüşüm verimin önemli oranda düştüğü görölmektedir (Şekil 4.24a)). Bu durumun yüksek asit konsantrasyonlarında ortamdaki monomerik şekerlerin yine asit tarafından parçalanması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir [Yu and Zhang, 2003].

Alkali ön arıtımın çalışmaları ise kullanılan her NaOH konsantrasyonu için benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.24b)). En yüksek glikoza dönüşüm verimi %1 NaOH kullanılmasıyla %48,5 ± 3,3 (TKB) olarak bulunmuştur. Alkali ön arıtım çalışmalarına ait numunelerin HPLC analizinde, selölözün hidroliz ürünü olan ve iki glikoz molekülünden oluşan sellobiyoz konsantrasyonunun, artan NaOH konsantrasyonu ile arttığı ancak glikoz konsantrasyonunda önemli bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir. Sellobiyoz konsantrasyonunda meydana gelen bu artış, mikroalgal selölöz ya da hemiselölözün, alkali ön arıtımla parçalandığının bir göstergesidir. Ancak kullanılan enzim konsantrasyonunun yeterli olmadığı ve nihai ürün olarak istenen glikoza dönüşümün sağlanması için ek olarak β -glikosidaz enzimi gerekli olduğu görölmektedir.



Şekil 4.24: Asit ve alkali ön arıtım sonrası enzim uygulamasından elde edilen glikoz verimlerinin 1,2 mL/g KB enzim dozu için karşılaştırılması.

Çalışmalar sonucunda, ozonla ön arıtımın alkali ön arıtıma nazaran daha düşük enzim konsantrasyonlarında daha yüksek glikoza dönüşüm verimleri sağladığı görülmektedir (Şekil 4.25). Ayrıca ozonla ön arıtım çalışmalarında, ozonlama sonrası çözeltilerin pH değerlerinin $5,6 \pm 0,5$ 'e düştüğü ve çok düşük miktarlarda seyreltik sülfürik asit ilavesi ile enzimatik sakkarifikasyon için önerilen (üretici tarafından tavsiye edilen) pH'nın 4,8 değerine ayarlamasının yapılabildiği tespit edilmiştir. Ancak, asit ve alkali ön arıtım sonrasında enzimatik sakkarifikasyon için gerekli pH 4,8'e ayarlanması her iki arıtım için de yüksek miktarlarda konsantre alkali ya da asit kullanımı gerekmektedir. İlave kimyasal kullanımı bu ön arıtım proseslerinin maliyetini önemli oranda arttırmaktadır.



Şekil 4.25: Ozon, ultrases, alkali ve seyreltik asit ön arıtım metotları sonrası enzim uygulamasından ve sadece enzim kullanılarak elde edilen glikoz verimlerinin 1,2 mL/g KB enzim dozu, 10 g/L biyokütle konsantrasyonu ve 4 saatlik enzimatik hidroliz süresi için karşılaştırılması.

5. SONUÇLAR ve YORUMLAR

5.1. Mikroalgal Biyokütle Üretimi ve Biyokütlenin Temel Bileşenleri

Tez çalışması kapsamında mikroalgal biyokütle üretimi amacıyla biyolojik arıtılmış evsel atıksu ortamı ve BG11 sentetik besin ortamı kullanılmıştır. Laboratuvar koşullarında sabit çevresel şartlarda ($150 \mu\text{mol foton/m}^2\cdot\text{sn}$ sürekli aydınlatma altında, $\text{pH } 7,0 \pm 0,5$ aralığında ve $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta) yetiştirilen mikroalg kültürlerinin, zaman içerisinde BG11 besi ortamında *Chlorococcum* türlerinin, evsel atıksu ortamında ise *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği yapılan mikroskobik analizler sonucunda görülmüştür.

İki farklı besin ortamında yetiştirilen mikroalg kültürlerinin hücresel bileşenlerinin hücrelerin yetiştirildiği besin ortamına ve yetiştirilme süresine bağlı olarak değişim gösterdiği görülmüştür. BG11 sentetik besin ortamındaki türlerin protein, karbonhidrat ve lipid içeriklerinin sırasıyla %25, %46 ve %26 (KBB) olduğu, ancak zaman içerisinde *Chlorococcum* türlerinin baskın hale gelmesiyle protein, karbonhidrat ve lipid içeriklerinin sırasıyla %18, %62 ve %19 (KBB) olarak değiştiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, evsel atıksu ortamında yetiştirilen türlerin hücresel bileşenlerinin zamanla değişim göstermediği ve protein, karbonhidrat ve lipid içeriklerinin sırasıyla %33, %33 ve %27 (KBB) olduğu belirlenmiştir.

5.2. Mikroalglerin Hasatlanması ve Biyokütlenin Parçalanması Çalışmaları

Çalışma kapsamında ozonlamanın, *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürünün hasatlanması ve biyokütlenin parçalanması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Beklenildiği gibi ozonlama ile hücrelerin parçalanması ve hücre içi değerli organiklerin çözelti fazına taşınması sağlanmıştır. Bu taşınım birim hücre başına uygulanan ozon dozunun $0,05 \text{ g O}_3/\text{g KB}$ ve daha yüksek olduğu ozon dozlarında görülmüştür. Ozonlama sonrası süzöntü numunelerindeki protein konsantrasyonunun artan ozon dozu ile arttığı görülmüş ve en yüksek protein hasatlama verimi (toplam protein bazında %30) ile $0,3 \text{ g O}_3/\text{g KB}$ ozon dozunda elde edilmiştir. Bu durum ozonlamanın hücrelerden protein hasatlanmasında da

kullanılabilir bir yöntem olduğunu ve reaksiyon şartlarının değiştirilmesi ile daha yüksek protein hasatlama verimlerinin elde edileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasının birinci hedefi mikroalg hücrelerin parçalanması ve hücrel karbonhidratın hasatlanarak biyoetanol fermentasyonunda kullanılması amacıyla optimum bir ozon dozunun belirlenmesidir. Deneysel çalışmalar, ozonlama sonrası süzöntü numunelerindeki karbonhidrat miktarının, artan ozon dozu ile arttığı ve en yüksek ozon dozu olan 0,4 g O₃/g KB'de, hücredeki toplam karbonhidratın %80'inin hasatlanmasının sağlandığı görülmektedir. Özellikle biyokütleden karbonhidrat ayırımında ortaya çıkan bu yüksek verim, ozon uygulamalarının mikroalglerden biyoetanol üretiminde bir ön arıtım yöntemi olarak kullanabileceğini göstermektedir. Biyokütlenin ön arıtımında ozon kullanımına dair sonuçlar bir sonraki bölümde özetlenmiştir.

Diğer taraftan, ozonlamanın lipit ayrıştırma verimini arttırdığını söylemek zordur. Bir önceki bölümde de belirtildiği gibi, ozonlama sonrasında biyokütledeki lipit miktarı (%24 (KBB)) azalırken, çözeltideki lipit miktarlarının aynı oranda artmadığı (%6 (KBB)) gözlemlenmiştir. Bu durumun, hücrel membranları parçalamak amacıyla verilen yüksek dozda ozonun hücreden ekstrakte edilen lipit ile reaksiyona girmesi sonucunda lipit yapısını bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde de ozonun doymamış yağ asitlerindeki karbon-karbon çift bağlarını (C=C) bozarak lipit yapısını değişime uğrattığı bilinmektedir [Hewitt and Terry, 1992]. Özellikle suların ozon ile dezenfeksiyon işlemi sırasında mikroorganizmaların pek çok dış etkiye dayanıklı olan membran yapısının bozulduğu ve ozonlama sırasında ortaya çıkan serbest radikallerin ve peroksit karakterli ozonlama ara ürünlerinin de bu parçalanma aktivitesini sürdürdüğü bilinen bir durumdur [Roshchina and Roshchina, 2003]. Ozonun lipit gibi karmaşık hidrokarbonlarla girdiği reaksiyonlarda sayısız reaktif ara ürün meydana getirdiği ve sonuçta ozon dozuna bağlı olarak moleküler yapısını değişime uğrattığı ve karbonil ve karboksil grupları içeren bileşiklere sahip olan son ürünleri ortaya çıkardığı çeşitli çalışmalarda gözlemlenmiştir [Ackman et al., 1961; Criegee, 1975; Salter and Hewitt, 1992]. Ancak özellikle mikroalgal lipitlerin ozonla parçalanması hususunda literatürde yayınlanan çok az sayıda çalışma, ozonlama sonucu oluşacak ürünlerle ilgili yeterli bilgi sunmamaktadır. Görüldüğü gibi lipit yapısı ve çeşidine göre farklı ara ve son ürünler oluşturan bu karmaşık parçalanma reaksiyonlarının takibi detaylı ve kontrollü bir ek çalışmayı gerektirmektedir.

Bu tez çalışmasının amaçlarından birisi de ozon kullanarak hücre yapısının bozulmasıdır. Ozon uygulamalarının, mikroalglerin hücre bütünlüğü üzerindeki parçalayıcı etkisi yapılan SEM görüntülemeleriyle de belirlenmiştir (Ek D). Ancak, hücre yapısının bozulması ile beraber hücre içindeki lipitler ozon ile reaksiyona girerek biyodizele dönüştürülebilecek lipitleri de bozmuştur. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar ışığında ozon uygulamasının, biyodizel eldesi için üretilen mikroalglerden lipit ayrıştırılması amacıyla bir parçalama metodu olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir.

Ayrıca, ozonlanan hücrelerin çözelti içinde daha dağınık bir hal aldığı ve çökme eğiliminden daha da uzaklaştığı görülmüştür. Bu gözlem, ozonlamanın hasatlama ve hücreden lipit ekstraksiyonu amacıyla kullanımından ziyade hücre içi maddelerden karbonhidrat ve proteinlerin eldesi için etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında mikroalglerin hasatlanmasında kullanılan bir diğer yöntem de ultrases (US) uygulamasıdır. US uygulamasında BG11 sentetik besi yerinde yetiştirilen *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü ve evsel atık suda yetiştirilen *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır. Mikroalg çözeltilerine uygulanan US enerjisi 0,4-2,0 kWh/g KB aralığında olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Beklenildiği gibi US uygulaması ile hücrelerin parçalanması sağlanmış ve hücre içi değerli organikler (protein, karbonhidrat, lipit) çözelti fazına taşınmıştır. Çalışmada 1,6 kWh/g KB enerjinin (400 W/L güç ve 60 dakika uygulama süresi) en etkin US uygulaması olduğu görülmüştür.

Chlorococcum türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürüne bu güçteki US uygulanması ile süzüntü numunelerindeki protein miktarında 13 kat ve karbonhidrat miktarında ise yaklaşık 5 kat artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde *Scenedesmus* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültüre bu güçte US uygulanmasıyla protein ve karbonhidrat konsantrasyonlarında yaklaşık 5 katlık artış tespit edilmiştir. Ancak, ultrasonik enerjinin 2,0 kWh/gKB'ye çıkarılmasıyla hasatlanan madde miktarının düştüğü görülmüştür. Bu durum US sırasında oluşan mikro kabarcıkların, hücreler yerine birbirleriyle etkileşime girmesi ya da US uygulanmasıyla oluşan OH[•] radikallerinin, ortamadaki maddelerle reaksiyona girerek, organik yapıları oksitlemesi şeklinde açıklanabilir [Sivakumar and Pandit, 2001; Zhang et al., 2006].

Mikroalg çözeltisine ultrases uygulanmasıyla, mikroalg lipidin ekstraksiyonunun daha etkin bir şekilde sağlanabildiği görülmüştür. Ultrases uygulanmasının ardından mikroalg çözeltisine K/M eklenmesiyle lipid ekstraksiyon verimi %83 oranında artarken *n*-hekzan kullanıldığında %69'luk bir artış tespit edilmiştir. Bu durum K/M karışımının polar ve polar olmayan çözücülerini içermesi, böylelikle hem hücre içi hem de hücre membranındaki lipidleri ekstrakte etmesiyle açıklanmaktadır. Bu sonuçlar US yönteminin hücre içi maddeleri etkili biçimde hücre dışına taşıdığını ve bu teknolojinin hücre içi maddelerin eldesinde verimli olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Ultrases uygulamalarının mikroalg lipid kompozisyonunu değiştirdiği, US uygulanmayan numunedeki monogliserit içeriğinin, nötral lipidlerin %23'ünü oluştururken US uygulamasıyla bu değerin %39'a yükseldiği, bunun karşılığında US uygulanmayan numunedeki digliserit içeriğinin US uygulanmasının ardından %47'den %30'a düştüğü tespit edilmiştir. US uygulanan ya da uygulanmayan her iki numunedeki trigliserit içeriğinin sabit kaldığı ve yaklaşık olarak nötral lipidlerin %30'unu teşkil ettiği bulunmuştur. Digliserit miktarı düşerken, monogliserit miktarının artmasının; bir kısım digliseritlerin US uygulamasıyla monogliseritlere parçalanmasından meydana geldiği düşünülmektedir. Mikroalg hücrelerindeki toplam nötral lipid içeriğinin US uygulanan ya da uygulanmayan her iki örnek içinde yaklaşık olarak %75 civarında olduğu bulunmuştur.

Diğer taraftan, US uygulanan hücrelerin çökme eğiliminden uzaklaştığı ve çözelti içinde daha dağınık bir hal aldığı tespit edilmiştir. Bu sebeple ultrasesin, mikroalg biyokütle için tek başına bir hasatlama yöntemi olarak kullanılmasının uygun olmayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında mikroalglerin hasatlanmasında denenen bir diğer yöntem ise ozonlama sonrası ultrases uygulamalarıdır. Ozonlamanın lipid üzerindeki olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak ve düşük ozon ve US gücünde yüksek lipid ekstraksiyonu sağlayabilmek için gerçekleştirilen bu çalışmalarda ozon dozu 0,03-0,27 g O₃/g KB ve hemen sonrasında US gücü 300-500 W/L ve 10-30 dakika US uygulama süresi tatbik edilmiştir. Bu çalışmada BG11 sentetik besi yerinde yetiştirilen *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır. Artan ozon dozu ve birim ultrases uygulama enerji (kWh/L) ile ayrıştırılan protein ve karbonhidrat miktarlarında orantılı bir artış görülürken, aynı durum lipid için söylenememektedir. Ozonun tek başına etkisinin incelendiği önceki

Çalışmalarda olduğu gibi ozonun hücre parçalamada pozitif etkisi ve lipid ekstraksiyonunda negatif etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Box–Behnken metodu doğrultusunda yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar kullanılarak oluşturulan yüzey modeli incelendiğinde ozonlama sonrası kullanılan ultrases yönteminin ozonun bu ikili etkisini azalttığı ve artan ultrases uygulama süresiyle beraber hücre parçalama kabiliyetini ortaya çıkardığı görülmektedir. Model ayrıca ozonun bu yan etkisine rağmen ultrases yoğunluğu ve süresine nazaran ayırıtırma süreci üzerinde daha etkin rol oynadığını göstermektedir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında O₃/US uygulamasının daha düşük ozon dozları için ultrases sonrası ozonlama şeklinde yeniden düzenlenmesinin hücre içi organik materyalin (protein, karbondhidrat, lipid vb.), yapısal zarara uğratmadan, hücreden ayırıtırılmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

Literatürde hücre parçalanmasının gravimetrik AKM lm yerine, zltinin 684 nanometrede optik yoğunluluğu (OY_{684nm}) llerek takip edildiği birçok kez raporlanmıştır. Bizim çalışmalarımızda ultrasese maruz kalan mikroalg zltilerinde gravimetrik olarak llen AKM'nin US gücüne ve sreye bağlı olarak azaldığı, ancak zltilerde okunan OY_{684nm} değerlerinin kültüre göre arttığı veya azaldığı grlmştir. Bu durum, bazı kültür hücrelerinin parçalanması sonucu zltiye geçen hücre parçalarının 684 nm'de ışık absorpladığını göstermektedir. Dolayısıyla, OY_{684nm}'nin AKM yerine hücre parçalanmasını gösterebilecek bir analiz metodu olmadığı ve bu maksat için kullanılmaması gerektiğini ortaya koymuştur.

5.3. Mikroalgal Biyokütlenin Fermentasyon ncesi n Arıtımı alışmaları

Tez alışması kapsamında mikroalgal biyokütlenin parçalanarak hücredeki tüm selüloz ve hemiselülozun hücre dışına taşınması ve bu polisakkaritlerin glikoz gibi basit şekerlere dönüştürülmesi amacıyla da ozon uygulaması kullanılmıştır. Bu alışmalarda *Chlorococcum* türlerinin baskın hale geldiği karışık mikroalg kültürü kullanılmıştır. Deneysel alışmalar sonucunda, sadece ozon kullanıldığı durumlarda istenilen hücresel parçalanmanın sağlandığını ancak glikoza dönüşümün sağlanamadığını göstermiştir. İstenilen glikoza dönüşüm veriminin sağlanması için ek olarak enzim ilavesinin gerektiği tespit edilmiştir. En yüksek glikoza dönüşüm verimi 0,5 g O₃/g KB ozon dozunda ve 1,2 mL/g KB enzim konsantrasyonunda 4

saatlik enzimatik hidroliz süresi sonunda 68 ± 5 (TKB) glikoz dönüşümü elde edildiği görülmüştür. Bu ozon dozundan daha düşük ve daha yüksek ozon dozlarında glikoza dönüşüm verimlerinde azalma elde edildiği görülmüştür. Bu durum düşük ozon dozlarında hücrelerin ozon ile yeterli düzeyde etkileşeme girememesi ile açıklanırken, yüksek ozon dozlarında ise ozonun çözeltiye salınan polisakkaritleri parçalayıcı yönde hareket etmesi ile açıklanmıştır. Ayrıca enzimatik hidroliz süresinin arttırılmasının ya da azaltılmasının glikoza dönüşüm verimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı da görülmüştür. Deneysel çalışmada kullanılan biyokütle konsantrasyonun düşürülmesiyle glikoza dönüşüm veriminin $80,6 \pm 7,8$ (TKB) değerine yükseldiği görülmüş ve bu durum ozonun kütle transfer hızının artması sonucunda biyokütlenin tamamıyla reaksiyona girebilmesi şeklinde açıklanmıştır. Ancak yoğun biyokütle konsantrasyonu ile çalışmanın, devam eden proses (hasatlama, kurutma, vb.) maliyetlerini azaltmak açısından daha avantajlı olacağı düşünülmektedir.

Biyokütlenin fermentasyonu öncesi biyokütlenin ön arıtımında kullanılan bir diğer yöntem ise ultrases uygulamalarıdır. Bir önceki bölümde yüksek karbonhidrat hasatlama verimi US dozu 1,6 kWh/g KB kullanılarak elde edildiğinden, ön arıtım çalışmalarında da US dozu sabit tutulmuştur. Farklı enzim konsantrasyonları kullanılarak yürütülen deneysel çalışmalar sonucunda, US uygulaması enzimatik sakkarifikasyonu pozitif yönde etkilemiş ve en yüksek glikoza dönüşüm verimi $49,5 \pm 4,4$ (TKB) olarak 1,2 mL/g KB enzim konsantrasyonunda elde edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda farklı biyokütle konsantrasyonları kullanılmasına rağmen, benzer glikoza dönüşüm verimleri elde edildiği görülmektedir [Zhao et al., 2013].

Enzimatik sakkarifikasyon üzerine ozon ve ultrasesin etkileri biyokütlenin ön arıtımında kullanılan geleneksel yöntemlerden seyreltik asit ve alkali ön arıtım yöntemleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Seyreltik asit ile ön arıtım çalışmalarında en yüksek glikoza dönüşüm verimi en düşük asit konsantrasyonunda $38,6 \pm 3,1$ (TKB) olarak elde edilmiştir. Asit konsantrasyonun %1'in altına düşürülmesinin glikoza dönüşüm verimi üzerinde önemli derecede etki göstermeyeceği ancak asit konsantrasyonun arttırılmasıyla ortamdaki monomerik şekerlerin yine asit tarafından parçalanarak glikoza dönüşüm verimini önemli oranda düşürdüğü tespit edilmiştir [Yu and Zhang, 2003]. Alkali ön arıtım çalışmalarında ise en yüksek glikoza dönüşüm verimi %1 NaOH kullanılmasıyla $48,5 \pm 3,3$ (TKB)

olarak bulunmuştur. Alkali ön arıtım ile selülozun hidroliz ürünü olan ve sellobiyoz konsantrasyonunun, artan NaOH konsantrasyonu ile arttığı ancak glikoz konsantrasyonunda önemli bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir. Sellobiyoz konsantrasyonunda meydana gelen bu artış, mikroalgal polisakkaritlerin, alkali ön arıtımla parçalandığını göstermektedir. Ancak son ürün olarak istenen glikoza dönüşümün enzim konsantrasyonunun arttırılmasıyla sağlanacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak, *Chlorococcum* türü mikroalgler için, alkali ön arıtımın seyreltik asit ile ön arıtıma nazaran daha etkili bir yöntem olduğu görülmüştür.

Glikoz dönüşüm verimlerinin düşük enzim konsantrasyonlarında ozonla ön arıtımda alkali ön arıtıma nazaran daha yüksek olduğu fermentasyon öncesindeki ön arıtım çalışmalarında gözlemlenmiştir. Ozonlama çalışmaları sonucunda pH 5,06 düşmüş olup istenilen pH değeri olan 4,8'e düşük miktarda seyreltik sülfürik ilavesiyle ulaşılmıştır. Ozon çalışmalarının aksine pH ayarlama işlemi (pH 4,8) alkali ve asit ön arıtımında çok daha konsantre asit ve alkali kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenle alkali ya da asit ön arıtma maliyetleri önemli oranda artmakta olup ozonla ön arıtım yöntemi tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Adam F., Abert-Vian M., Peltier G., Chemat F., (2012), ““Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a Green, Clean And Scalable Process.”, *Bioresource Technology*, 114, 457-465.
- Ackman, R.G., Retson, M.E., Gallay, L.R., Vandenheuvel, F.A., (1961), “Ozonolysis of unsaturated fatty acids: I. Ozonolysis of oleic acid”, *Canadian Journal of Chemistry*, 39, 1956-1963.
- APHA, (2005), “Standard Methods For The Examination of Water And Wastewater”, 21st Edition, American Public Health Association.
- Araujo G. S., Matos L. J. B. L., Fernandes J. O., Cartaxo S. J. M., Gonçalves L. R. B., Fernandes F. a N., Farias W. R. L., (2013), “Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method.”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (1), 95-98.
- Araujo G. S., Matos L. J. B. L., Gonçalves L. R. B., Fernandes F. A. N., Farias W. R. L., (2011), “Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains.”, *Bioresource Technology*, 102 (8), 5248-5250.
- Bai R., Silaban A. G., Gutierrez-Wing M. T., Benton M. G., Negulescu I. I., Rusch K. A., (2013), “Silver nanofiber assisted lipid extraction from biomass of a Louisiana *Chlorella vulgaris*/Leptolyngbya sp. co-culture”, *Chemical Engineering Journal*, 225, 100-108.
- Barsanti L., Gualtieri P., (2006), “Algae anatomy, biochemistry, and biotechnology”, 2nd Edition, CRC Press.
- Bellinger E. G., Sigee D. C., (2010), “Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators”, 1st Edition Wiley-Blackwell.
- Becker E. W., (1994), “Microalgae: biotechnology and microbiology”, Cambridge Studies in Biotechnology, Cambridge University Press.
- Benoufella F., Laplanche A., Boisdon V., Bourbigot M. M., (1994), “Elimination of microcystis cyanobacteria (blue-green algae) by an ozoflotation process: a pilot plant study”, *Water Science and Technology*, 30 (8), 245-257.
- Bensah E. C., Mensah M., (2013), “Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and innovations”, *International Journal of Chemical Engineering*, 2013, 1-21.
- Borowitzka M. A., (1992), “Algal biotechnology products and processes - matching science and economics”, *Journal of Applied Phycology*, 4, 267-279.

Bosma R., Van Spronsen W. a., Tramper J., Wijffels R. H., (2003), "Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae", *Journal of Applied Phycology*, 15 (2-3), 143-153.

Brányiková I., Maršáľková B., Doucha J., Brányik T., Bišová K., Zachleder V., Vítová M., (2011), "Microalgae-novel highly efficient starch producers", *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (4), 766-776.

Brennan L., Owende P., (2010), "Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2), 557-577.

Broder J. D., Barrier J. W., Lee K. P., Bulls M. M., (1995), "Biofuels system economics", *World Resource Review*, 7 (4), 560-569.

Bule M. V., Gao A. H., Hiscox B., Chen S., (2013), "Structural Modification of Lignin and Characterization of Pretreated Wheat Straw by Ozonation", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (16), 3916-3925.

Cao H., Zhang Z., Wu X., Miao X., (2013), "Direct Biodiesel Production from Wet Microalgae Biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through In Situ Transesterification", *BioMed Research International*, 2013, ID 930686, 1-6.

Cerff M., Morweiser M., Dillschneider R., Michel A., Menzel K., Posten C., (2012), "Harvesting fresh water and marine algae by magnetic separation: Screening of separation parameters and high gradient magnetic filtration", *Bioresource Technology*, 118, 289-295.

Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J., Chang J.-S., (2011), "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review.", *Bioresource Technology*, 102 (1), 71-81.

Chen J.-J., Yeh H.-H., Tseng I.-C., (2009), "Effect of ozone and permanganate on algae coagulation removal--pilot and bench scale tests.", *Chemosphere*, 74 (6), 840-846.

Chen Y. M., Liu J. C., Ju Y.-H., (1998), "Flotation removal of algae from water", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12 (1), 49-55.

Cheng C. J., Andy Hong P. K., Lin C. F., (2012), "Improved solubilization of activated sludge by ozonation in pressure cycles", *Chemosphere*, 87 (6), 637-643.

Cheng Y.-L., Juang Y.-C., Liao G.-Y., Ho S.-H., Yeh K.-L., Chen C.-Y., Chang J.-S., Liu J.-C., Lee D.-J., (2010), "Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*", *Bioresource Technology*, 101 (23), 9092-9096.

Cheng Y.-L., Juang Y.-C., Liao G.-Y., Tsai P.-W., Ho S.-H., Yeh K.-L., Chen C.-Y., Chang J.-S., Liu J.-C., Chen W.-M., Lee D.-J., (2011), "Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation.", *Bioresource Technology*, 102 (1), 82-7.

Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R. W., Das K. C., (2010), "Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications.", *Bioresource Technology*, 101 (9), 3097-105.

Choi S. P., Nguyen M. T., Sim S. J., (2010), "Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production.", *Bioresource Technology*, 101 (14), 5330-5336.

Christenson L., Sims R., (2011), "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts", *Biotechnology Advances*, 29 (6), 686-702.

Christie W. W., (1993), "Preparation of lipid extracts from tissues", *Advances in Lipid Methodology*, 2, 195-213.

Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., Cintas P., (2008), "Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves.", *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (5), 898-902.

Criegee, R., (1975), "Mechanism of Ozonolysis", *Angewandte Chemie (International Edition)*, 14, 745-52.

del Campo I., Alegría I., Zazpe M., Echeverría M., Echeverría I., (2006), "Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production", *Industrial Crops and Products*, 24 (3), 214-221.

dos Santos R. R., Moreira D. M., Kunigami C. N., Aranda D. A. G., Teixeira C. M. L. L., (2015), "Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass", *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 95-99.

Dragone G., Fernandes B., Vicente A. A., Teixeira J. A., (2010), "Third generation biofuels from microalgae", In: A. Méndez-Vilas, Editor, "Current Research, Technology and Education in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology", Formatex.

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., (1956), "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356.

Dunstan G. A., Volkman J. K., Barrett S. M., Garland C. D., (1993), "Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture", *Journal of Applied Phycology*, 5, 71-83.

Dytczak M. A., Londry K. L., Siegrist H., Oleszkiewicz J. A., (2007), "Ozonation reduces sludge production and improves denitrification", *Water Research*, 41 (3), 543-550.

El-Moneim M. R. Afify A., Shalaby E. A., Shanab S. M. M., (2010), "Enhancement of biodiesel production from different species of algae", *Grasas Y Aceites*, 61 (4), 416-422.

Eshaq F. S., Ali M. N., Mohd. M. K., (2010), "Spirogyra biomass a renewable source for biofuel (bioethanol) Production", *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2 (12), 7045-7054.

Estevez M. S., Malanga G., Puntarulo S., (2001), "Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*", *Plant Science*, 161 (1), 9-17.

FAO, (1998), "Carbohydrates in human nutrition - Chapter 1 - The role of carbohydrates in nutrition". Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation ISBN: 92-5-104114-8, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Farooq W., Lee Y.-C., Han J.-I., Darpito C. H., Choi M., Yang J.-W., (2013), "Efficient microalgae harvesting by organo-building blocks of nanoclays", *Green Chemistry*, 15 (3), 749-755.

Ferraz T. P. L., Fiúza M. C., Dos Santos M. L. A., Pontes De Carvalho L., Soares N. M., (2004), "Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation.", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 58 (3), 187-193.

Francisco É. C., Neves D. B., Jacob-Lopes E., Franco T. T., (2010), "Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85 (3), 395-403.

Freedman B., Pryde E. H., Mounts T. L., (1984), "Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils", *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61 (10), 1638-1643.

Galloway A. W. E., Britton-Simmons K. H., Duggis D. O., Gabrielson P. W., Brett M. T., (2012), "Fatty acid signatures differentiate marine macrophytes at ordinal and family ranks", *Journal of Phycology*, 48 (1), 956-965.

Gao S., Yang J., Tian J., Ma F., Tu G., Du M., (2010), "Electro-coagulation-flotation process for algae removal.", *Journal of Hazardous Materials*, 177 (1-3), 336-343.

Garcia J., Hernández-Mariné M., Rafael M., (2000), "Influence of Phytoplankton Composition on Biomass Removal from High-rate Oxidation Lagoons by Means of Sedimentation and Spontaneous Flocculation", *Water Environment Research*, 72 (2), 230-237.

García-Cubero M. A. T., González-Benito G., Indacoechea I., Coca M., Bolado S., (2009), "Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw.", *Bioresource Technology*, 100 (4), 1608-13.

Gatenby C. M., Orcutt D. M., Kreeger D. A., Parker B. C., Jones V. A., Neves R. J., (2003), "Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels", *Journal of Applied Phycology*, 15 (1), 1-11.

Gerde J. A., Montalbo-Lomboy M., Yao L., Grewell D., Wang T., (2012), "Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment.", *Bioresource Technology*, 125, 175-181.

Gogate P. R., Pandit A. B., (2004), "A review of imperative technologies for wastewater treatment II: Hybrid methods", *Advances in Environmental Research*, 8 (3-4), 553-597.

Graham L. E., Wilcox L. W., (2000), "Introduction to the Algae", 1st Edition Prentice-Hall Inc.

Grima E. M., Belarbi E.-H., (2003), "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics", *Biotechnology Advances*, 20, 491-515.

Grohmann K., Torget R., Himmel M., (1986), "Dilute acid pretreatment of biomass at high solids concentrations", *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 17, 135-151.

Guo H., Daroch M., Liu L., Qiu G., Geng S., Wang G., (2013), "Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta.", *Bioresource Technology*, 127, 422-428.

Gurol D.D., Singer P.C. (1982), "Kinetics of ozone decomposition: a dynamic approach", *Environmental Science and Technology*, 16, 377-383.

Gürol M. D., (2013), "Mikroalglerden Biyodizel Üretiminde Yenilikçi (Innovative) Yaklaşımlar", Proje No: ÇAYDAG-109Y296, (2010-2013 dönemi), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Türkiye.

Günaydın, M., (2010), "Ultrasonik radyasyon ile sularından doğal organik madde gideriminin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.

Halim R., Danquah M. K., Webley P. A., (2012), "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review.", *Biotechnology Advances*, 30 (3), 709-732.

Hammes F., Meylan S., Salhi E., Köster O., Egli T., von Gunten U., (2007), "Formation of assimilable organic carbon (AOC) and specific natural organic matter (NOM) fractions during ozonation of phytoplankton.", *Water Research*, 41 (7), 1447-1454.

Hanotu J., Bandulasena H. C. H., Zimmerman W. B., (2012), "Microflotation Performance for Algal Separation", 109 (7), 1663-1673.

Harun R., Danquah M. K., (2011a), "Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production", *Chemical Engineering Journal*, 168 (3), 1079-1084.

Harun R., Danquah M. K., (2011b), "Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production", *Process Biochemistry*, 46 (1), 304-309.

Harun R., Danquah M. K., Forde G. M., (2010), "Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 199-203.

Harun R., Jason W. S. Y., Cherrington T., Danquah M. K., (2011), "Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production", *Applied Energy*, 88 (10), 3464-3467.

Hayashida S., Feng D. Der, Hongo M., (1974), "Function of the High Concentration Alcohol-producing Factor", *Agricultural and Biological Chemistry*, 38 (10), 2001-2006.

Heasman M., Diemar J., O'connor W., Sushames T., Foulkes L., (2000), "Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary", *Aquaculture Research*, 31 (8-9), 637-659.

Henderson R. K., Parsons S. A., Jefferson B., (2010), "The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae.", *Water Research*, 44 (12), 3617-3624.

Heng L., Jun N., Wen-jie H., Guibai L., (2009), "Algae removal by ultrasonic irradiation-coagulation", *Desalination*, 239 (1-3), 191-197.

Hewitt N., Terry G., (1992), "Understanding ozone plant chemistry", *Environmental Science and Technology*, 26 (10), 1890-1891.

Hirano A., Ueda R., Hirayama S., Ogushi Y., (1997), "CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation", *Energy*, 22 (2-3), 137-142.

Ho S.-H., Chen C.-Y., Chang J.-S., (2012), "Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N", *Bioresource Technology*, 113, 244-252.

Ho S.-H., Chen W.-M., Chang J.-S., (2010), "Scenedesmus obliquus CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production.", *Bioresource Technology*, 101 (22), 8725-30.

Ho S.-H., Kondo A., Hasunuma T., Chang J.-S., (2013a), "Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation", *Bioresource Technology*, 143, 163-71.

Ho S.-H., Huang S.-W., Chen C.-Y., Hasunuma T., Kondo A., Chang J.-S., (2013b), "Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock.", *Bioresource Technology*, 135, 191-8.

Ho S.-H., Huang S.-W., Chen C.-Y., Hasunuma T., Kondo A., Chang J.-S., (2013c), "Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E.", *Bioresource Technology*, 135, 157-65.

Hoeger S. J., Dietrich D. R., Hitzfeld B. C., (2002), "Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment", *Environmental Health Perspectives*, 110 (11), 1127-1132.

Hu Q., Kurano N., Kawachi M., Iwasaki I., Miyachi S., (1998), "Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49 (6), 655-662.

Huang W.-J., Cheng B.-L., Hu S.-K., Chu C., (2006), "Ozonation of algae and odor causing substances in eutrophic waters.", *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances and Environmental Engineering*, 41 (8), 1587-605.

Huang Y., Hong A., Zhang D., Li L., (2014), "Comparison of cell rupturing by ozonation and ultrasonication for algal lipid extraction from *Chlorella vulgaris*.", *Environmental Technology*, 35 (5-8), 931-937.

Ike A., Toda N., Tsuji N., Hirata K., Miyamoto K., (1997), "Hydrogen photoproduction from CO₂-fixing microalgal biomass: Application of halotolerant photosynthetic bacteria", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84 (6), 606-609.

Illman A., Scragg A., Shales S., (2000), "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium.", *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (8), 631-635.

Janssens J. H., Burris N., Woodward a., Bailey R. B., (1983), "Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*", *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (2), 598-602.

Joyce E. M., King P. M., Mason T. J., (2014), "The effect of ultrasound on the growth and viability of microalgae cells", *Journal of Applied Phycology*, 26 (4), 1741-1748.

Joyce E. M., Wu X., Mason T. J., (2010), "Effect of ultrasonic frequency and power on algae suspensions.", *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 45 (7), 863-866.

Judd S., van den Broeke L. J. P., Shurair M., Kuti Y., Znad H., (2015), "Algal remediation of CO₂ and nutrient discharges: a review", *Water Research*, 87, 356-366.

Karagöz P., (2013), "Lignoselülozik atıkların ko-fermentasyonla biyoetanole dönüştürülmesi: Ön arıtım ve fermentasyon proseslerinin incelenmesi ve iyileştirilmesi", Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Karmakar A., Karmakar S., Mukherjee S., (2010), "Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production.", *Bioresource Technology*, 101 (19), 7201-10.

Karunanithy C., Muthukumarappan K., Gibbons W. R., (2014), "Sequential Extrusion-Ozone Pretreatment of Switchgrass and Big Bluestem", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 3656-3669.

Keeney D., (2009), "Ethanol USA", *Environmental Science and Technology*, 43 (1), 8-11.

Kim J. K., Um B.-H., Kim T. H., (2012), "Bioethanol production from micro-algae, *Schizocytium* sp., using hydrothermal treatment and biological conversion", *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29 (2), 209-214.

Kim J., Yoo G., Lee H., Lim J., Kim K., Kim C. W., Park M. S., Yang J.-W., (2013), "Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae.", *Biotechnology Advances*, 31 (6), 862-76.

Kim M., Baek J., Yun Y., Junsim S., Park S., Kim S., (2006), "Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (6), 812-816.

Knuckey R., Brown M., Robert R., Frampton D., (2006), "Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds", *Aquacultural Engineering*, 35 (3), 300-313.

Koberg M., Cohen M., Ben-Amotz A., Gedanken A., (2011), "Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation", *Bioresource Technology*, 102 (5), 4265-4269.

Koda S., Miyamoto M., Toma M., Matsuoka T., Maebayashi M., (2009), "Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500kHz.", *Ultrasonics Sonochemistry*, 16 (5), 655-659.

Komolafe O., Velasquez Orta S. B., Monje-Ramirez I., Yáñez Noguez I., Harvey A. P., Orta Ledesma M. T., (2014), "Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater.", *Bioresource Technology*, 154, 297-304.

Lecina M., Prat J., Paredes C. J., Cairó J. J., (2015), "Non-disruptive sonication of *A. fusiformis* (*A. platensis*) cultures facilitates its harvesting", *Algal Research*, 7, 1-4.

Lee R.E. (1980), "Phycology", Cambridge University Press

Lee J.-Y., Yoo C., Jun S.-Y., Ahn C.-Y., Oh H.-M., (2010), "Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae.", *Bioresource Technology*, 101 (1), 75-77.

- Lee T. J., Nakano K., Matsumara M., (2001), "Ultrasonic irradiation for blue-green algae bloom control.", *Environmental Technology*, 22 (4), 383-390.
- Lee Y. C., Kim B., Farooq W., Chung J., Han J. I., Shin H. J., Jeong S. H., Park J. Y., Lee J. S., Oh Y. K., (2013), "Harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. by organoclays", *Bioresource Technology*, 132, 440-445.
- Lewis T., Nichols P. D., McMeekin T. A., (2000), "Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs", *Journal of Microbiological Methods*, 43 (2), 107-116.
- Li H., Yao C., Dong X., Dong W., Fan Z., (2011), "Effect of pH on inactivation of *Microcystis aeruginosa* by ozonation air in sequencing batch reactor", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86 (3), 468-471.
- Li K., Liu S., Liu X., (2014), "An overview of algae bioethanol production", *International Journal of Energy Research*, 38 (8), 965-977.
- Li Y., Han F., Xu H., Mu J., Chen D., Feng B., Zeng H., (2014), "Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P).", *Bioresource Technology*, 174, 24-32.
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C. Q., Dubois-Calero N., (2008), "Biofuels from microalgae", *Biotechnology Progress*, 24 (4), 815-820.
- Liang Y., Sarkany N., Cui Y., (2009), "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions", *Biotechnology Letters*, 31 (7), 1043-1049.
- Lim J. K., Chieh D. C. J., Jalak S. A., Toh P. Y., Yasin N. H. M., Ng B. W., Ahmad A. L., (2012), "Rapid magnetophoretic separation of microalgae", *Small*, 8 (11), 1683-1692.
- Lin C.-C., Hong P. K. A., (2013), "A new processing scheme from algae suspension to collected lipid using sand filtration and ozonation", *Algal Research*, 2 (4), 378-384.
- Linne Von Berg K. H., Hoef-Emden K., Marin B., Melkonian M., (2004), "Der Kosmos-Algenführer. Süßwasseralgen im Mikroskop", Kosmos.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L. A., Randall R. J., (1951), "Protein measurement with the folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Ma F., Hanna M. A., (1999), "Biodiesel production: a review", *Journal Series #12109, Agricultural Research Division, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln*.¹, *Bioresource Technology*, 70 (1), 1-15.

Mason T. J., Peters D., (2002), "Practical Sonochemistry Power Ultrasound Uses and Applications", 2nd Edition Horwood Publishing.

Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S., (2010), "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (1), 217-232.

Matis K. A., Gallios G. P., Kydros K. A., (1993), "Separation of fines by flotation techniques", *Separations Technology*, 3 (2), 76-90.

Mecozzi M., Amici M., Romanelli G., Pietrantonio E., Deluca A., (2002), "Ultrasound extraction and thin layer chromatography-flame ionization detection analysis of the lipid fraction in marine mucilage samples.", *Journal of Chromatography A*, 963 (1-2), 363-373.

Meijer E. A., Wijffels R. H., (1998), "Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae", *Biotechnology Techniques*, 12 (5), 353-358.

Menon R., Mehta P. N., (2013), "Eutrophication Treatment by Algae Farming", *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 3 (11), 551-554.

Metting Jr FB., (1996) "Biodiversity and application of Microalgae", *Journal of industrial microbiology*, 17 (5-6), 477-89.

Miao C., Chakraborty M., Chen S., (2012), "Impact of reaction conditions on the simultaneous production of polysaccharides and bio-oil from heterotrophically grown *Chlorella sorokiniana* by a unique sequential hydrothermal liquefaction process.", *Bioresource Technology*, 110, 617-627.

Miao H., Tao W., (2009), "The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal", *Separation and Purification Technology*, 66 (1), 187-193.

Mohn F. H., (1980), "Experiences and strategies in the recovery of biomass in mass culture of microalgae", In: G. Shelef, C. J. Soeder, Editors, "Algal Biomass: Production and Use", Elsevier Science Ltd.

Mojaat M., Pruvost J., Foucault A., Legrand J., (2008), "Effect of organic carbon sources and Fe²⁺ ions on growth and β -carotene accumulation by *Dunaliella salina*", *Biochemical Engineering Journal*, 39 (1), 177-184.

Moraine R., Shelef G., Meydan A., Levi A., (1979), "Algal single cell protein from wastewater treatment and renovation process", *Biotechnology and Bioengineering*, 21 (7), 1191-1207.

Morris J.C. (1988), "The aqueous solubility of ozone –Areview", *Ozone News*, 16, 14-16.

Neto A. M. P., Sotana de Souza R. A., Leon-Nino A. D., da Costa J. D. A., Tiburcio R. S., Nunes T. A., Sellare de Mello T. C., Kanemoto F. T., Saldanha-Corrêa F. M. P., Giancesella S. M. F., (2013), "Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method", *Renewable Energy*, 55, 525-531.

Nguyen M. T., Choi S. P., Lee J., Lee J. H., Sim S. J., (2009), "Hydrothermal Acid Pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* Biomass for Ethanol Production", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19 (2), 161-166.

Nguyen T. D., Kim K., Nguyen M., Sun M., Kim D., Jun S., (2010), "Enhancement of fermentative hydrogen production from green algal biomass of *Thermotoga neapolitana* by various pretreatment methods", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (23), 13035-13040.

Nguyen T. L., Lee D. J., Chang J. S., Liu J. C., (2013), "Effects of ozone and peroxone on algal separation via dispersed air flotation.", *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 105, 246-50.

Paralkar A., Edzwald J. K., (1998), "Effect of ozone on disinfection by-product formation of algae", *Water Science and Technology*, 37 (2), 49-55.

Park J.-Y., Lee K., Choi S.-A., Jeong M.-J., Kim B., Lee J.-S., Oh Y.-K., (2015), "Sonication-assisted homogenization system for improved lipid extraction from *Chlorella vulgaris*", *Renewable Energy*, 79, 3-8.

Petrusevski B., Bolier G., Van Breemen A. N., Alaerts G. J., (1995), "Tangential flow filtration: A method to concentrate freshwater algae", *Water Research*, 29 (5), 1419-1424.

Piasecka A., Krzemińska I., Tys J., (2014), "Physical Methods of Microalgal Biomass Pretreatment", *International Agrophysics*, 28 (3), 341-348.

Pittman J. K., Dean A. P., Osundeko O., (2011), "The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources.", *Bioresource Technology*, 102 (1), 17-25.

Prabakaran P., Ravindran A. D., (2011), "A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae", 150-154.

Pranowo R., Lee D. J., Liu J. C., Chang J. S., (2013), "Effect of O₃ and O₃/H₂O₂ on algae harvesting using chitosan", *Water Science and Technology*, 67 (6), 1294-1301.

Prochazkova G., Safarik I., Branyik T., (2013), "Harvesting microalgae with microwave synthesized magnetic microparticles", *Bioresource Technology*, 130, 472-477.

Prommuak C., Pavasant P., Quitain A. T., Goto M., Shotipruk A., (2012), "Microalgal Lipid Extraction and Evaluation of Single-Step Biodiesel Production", *Engineering Journal*, 16 (5), 157-166.

Pröschold T., Leliaert F., (2007), "Systematics of the green algae: Conflict of classic and modern approach", In: J. Brodie, J.M.Lewis, Editors, "Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics", Taylor and Francis.

Pruvost J., Van Vooren G., Le Gouic B., Couzinet-Mossion A., Legrand J., (2011), "Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application.", *Bioresource Technology*, 102 (1), 150-158.

Rabelo S. C., Filho R. M., Costa A. C., (2009), "Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153 (1-3), 139-150.

Rajasekhar P., Fan L., Nguyen T., Roddick F. A., (2012), "Impact of sonication at 20 kHz on *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis* and *Chlorella* sp.", *Water Research*, 46 (5), 1473-1481.

Ranjan A., Patil C., Moholkar V. S., (2010), "Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49 (6), 2979-2985.

Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F., (2013), "Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production", *Applied Energy*, 103, 444-467.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979), "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria". *Microbiology*, 111(1), 1-61.

Roshchina, V.V., Roshchine, V.D., (2003), "Ozone and Plant Cell", 1st Edition, Kluwer Academic Publisher.

Ruiz-Marin A., Mendoza-Espinosa L. G., Stephenson T., (2010), "Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater.", *Bioresource Technology*, 101 (1), 58-64.

Saha B. C., Iten L. B., Cotta M. a., Wu Y. V., (2005), "Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol", *Process Biochemistry*, 40, 3693-3700.

Salter, L., Hewitt, C.N., (1992), "Ozone-hydrocarbon interactions in plants", *Phytochemistry*, 31, 4045-50.

Schlagermann P., Göttlicher G., Dillschneider R., Rosello-Sastre R., Posten C., (2012), "Composition of algal oil and its potential as biofuel", *Journal of Combustion*, 2012, 1-14.

Shelef G., Sukenik A., Green M., (1984), "Microalgae Harvesting and Processing: A Literature Review", Technical Report No: SERI/STR-231-2396, Solar Energy Research Institute - Department of Energy, USA.

Shen Y., Pei Z., Yuan W., Mao E., (2009), “Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield”, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2 (1), 51-57.

Shen Y., Pei Z., Yuan W., Mao E., (2009), “Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield”, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2 (1), 51-57.

Shi H.-X., Qu J.-H., Liu H.-J., Mu Y.-L., Xiao K.-T., Wang L., (2008), “Effect of ultrasonic irradiation on the coagulation and inactivation of *Microcystis*”, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 57 (2), 101-108.

Silverstein R. A., Chen Y., Sharma-Shivappa R. R., Boyette M. D., Osborne J., (2007), “A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks”, *Bioresource Technology*, 98 (16), 3000-3011.

Sivakumar M., Pandit A. B., (2001), “Ultrasound enhanced degradation of Rhodamine B: optimization with power density.”, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (3), 233-240.

Soydemir G., Keris-Sen U.D. , Sen, U., Gurol M.D., (2016), “Biodiesel production potential of mixed microalgal culture grown in domestic wastewater”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, (1) 45-51.

Sun Y., Cheng J., (2002), “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review”, *Bioresource Technology*, 83 (1), 1-11.

Sydney E. B., da Silva T. E., Tokarski A., Novak A. C., de Carvalho J. C., Woiciechowski A. L., Larroche C., Soccol C. R., (2011), “Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage”, *Applied Energy*, 88 (10), 3291-3294.

Travaini R., Otero M. D. M., Coca M., Da-Silva R., Bolado S., (2013), “Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation”, *Bioresource Technology*, 133, 332-339.

Trzcinski A. P., Hernandez E., Webb C., (2012), “A novel process for enhancing oil production in algae biorefineries through bioconversion of solid by-products.”, *Bioresource Technology*, 116, 295-301.

Uduman N., Qi Y., Danquah M. K., Forde G. M., Hoadley A., (2010), “Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels”, *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2 (1), 012701.

Van Gerpen J., Shanks B., Pruszko R., Clements D., (2004), “Biodiesel Production Technology Biodiesel Production Technology”, National Renewable Energy Laboratory, Golden, USA.

Velasquez-Orta S. B., Garcia-Estrada R., Monje-Ramirez I., Harvey A., Orta Ledesma M. T., (2014), "Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries", *Biomass and Bioenergy*, 70, 356-363.

Vicente G., Bautista L. F., Rodríguez R., Gutiérrez F. J., Sádaba I., Ruiz-Vázquez R. M., Torres-Martínez S., Garre V., (2009), "Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus", *Biochemical Engineering Journal*, 48 (1), 22-27.

Wahlen B. D., Willis R. M., Seefeldt L. C., (2011), "Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures.", *Bioresource Technology*, 102 (3), 2724-2730.

Walsby A. E., (1992), "A control of gas-vacuolate cyanobacteria", In: D.W. Sutcliffe, J.G. Jones, Editors, "Eutrophication: Research and Application to Water Supply", Freshwater Biological Association, Ambleside.

Wasungu K. M., Simard R. E., (1982), "Growth characteristics of bakers' yeast in ethanol", *Biotechnology and Bioengineering*, 24 (5), 1125-1134.

Web 1, (2015), <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am>, (Erişim Tarihi: 05/12/2015)

Wilde E. W., Benemann J. R., Weissman J. C., Tillett D. M., (1991), "Cultivation of algae and nutrient removal in a waste heat utilization process", *Journal of Applied Phycology*, 3 (2), 159-167.

Williams J. A., (2002), "Keys to Bioreactor selection", *Chemical engineering progress*, 98 (3), 34-41.

Williams P. J. L. B., Laurens L. M. L., (2010), "Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics and economics", *Energy and Environmental Science*, 3 (5), 554-590.

Wiyarno B., Yunus R. M., Mel M., (2010), "Ultrasound Extraction Assisted (UEA) of Oil from Microalgae (*Nannochloropsis* sp.)", *International Journal of Science Engineering and Technology*, 3 (1), 1-5.

Wiyarno B., Yunus R. M., Mel M., (2011), "Extraction of Algae Oil from *Nannochloropsis* sp.: A Study of Soxhlet and Ultrasonic-Assited Extractions", *Journal of Applied Sciences*, 11 (21), 3607-3612.

Woods L., Riccobono M., Mehan N., Hestekin J., Beitle R., (2011), "Synergistic Effect of Abrasive and Sonication for Release of Carbohydrate and Protein from Algae", *Separation Science and Technology*, 46 (4), 601-604.

Wu X., Joyce E. M., Mason T. J., (2012), "Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* at different ultrasonic frequencies.", *Water Research*, 46 (9), 2851-2858.

Yang B., Wyman C. E., (2008), "Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol", *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2 (1), 26-40.

Yu Z., Zhang H., (2003), "Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*", *Biomass and Bioenergy*, 24 (3), 257-262.

Zhang G., Wang B., Zhang P., Wang L., Wang H., (2006), "Removal of Algae by Sonication-Coagulation", *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41 (7), 1379-1390.

Zhang G., Yang J., Liu H., Zhang J., (2009), "Sludge ozonation: Disintegration, supernatant changes and mechanisms", *Bioresource Technology*, 100 (3), 1505-1509.

Zhang G., Zhang P., Fan M., (2009), "Ultrasound-enhanced coagulation for *Microcystis aeruginosa* removal.", *Ultrasonics Sonochemistry*, 16 (3), 334-338.

Zhang G., Zhang P., Liu H., Wang B., (2006), "Ultrasonic damages on cyanobacterial photosynthesis.", *Ultrasonics Sonochemistry*, 13 (6), 501-505.

Zhao G., Chen X., Wang L., Zhou S., Feng H., Chen W. N., Lau R., (2013), "Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation", *Bioresource Technology*, 128, 337-344.

Zimmerman W. B., Tesaş V., Bandulasena H. C. H., (2011), "Towards energy efficient nanobubble generation with fluidic oscillation", *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 16 (4), 350-356.

ÖZGEÇMİŞ

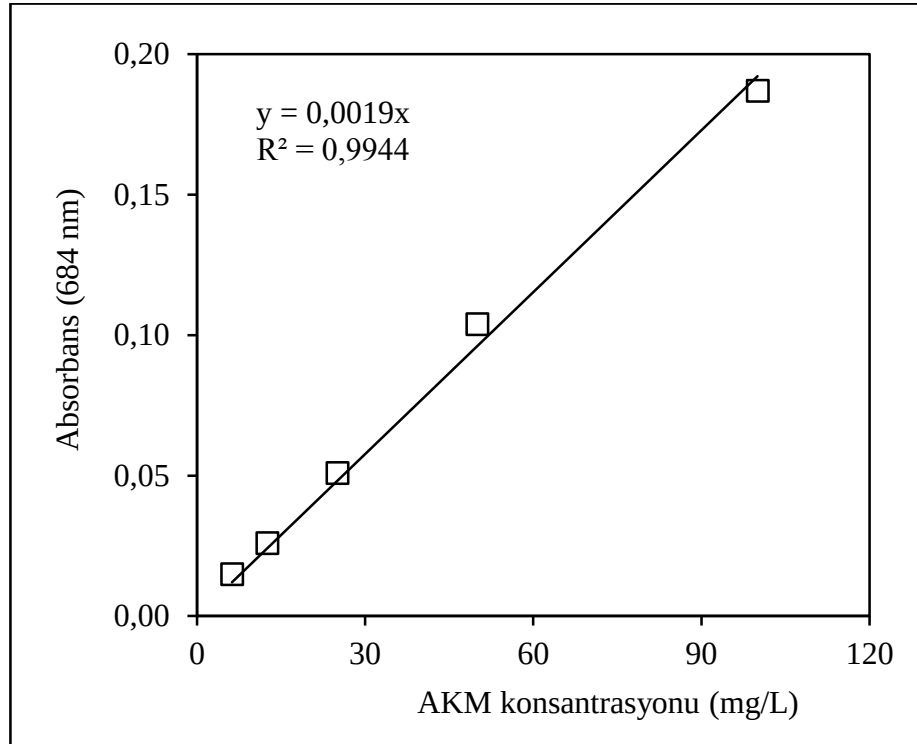
Ülker Diler Keriş Şen 1978’de Erzurum’da doğdu. Trakya Üniversite Çevre Mühendisliği Bölümünden 2002 yılında başarıyla tamamladı. 2001-2004 yılları arasında çeşitli çevre danışmanlık firmalarında Çevre Mühendisi olarak görev aldıktan sonra 2004 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında başladı. 2008 yılında yüksek lisans eğitimini başarıyla tamamlayarak aynı yıl doktora eğitimine yine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında başladı. 2006 yılından bu yana Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

EKLER

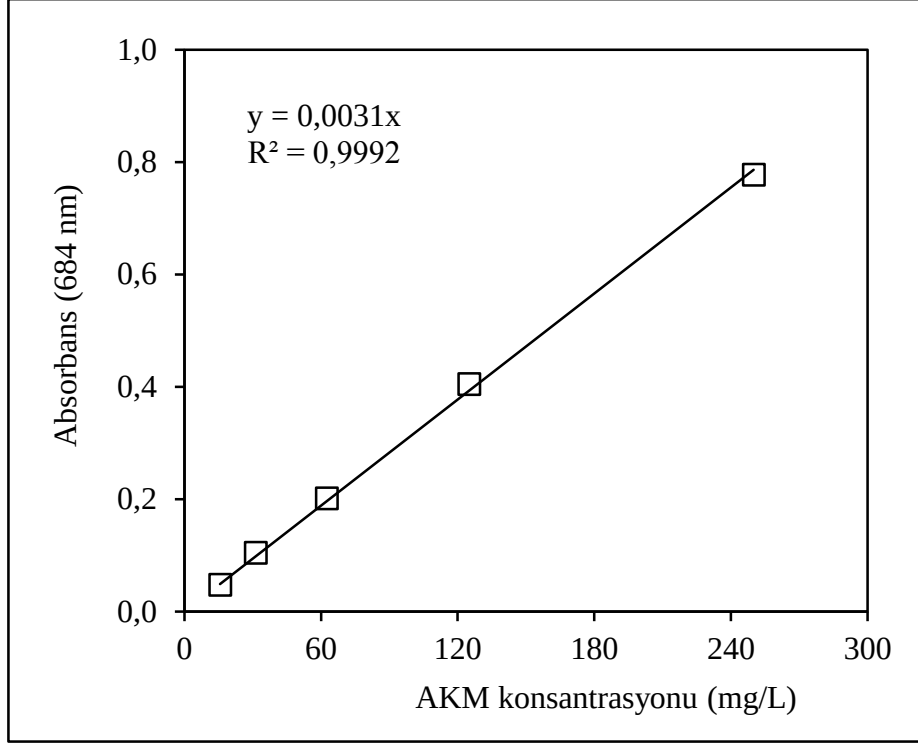
Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Keris-Sen U.D., Sen U., Soydemir G., Gurol M.D., (2014), “An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency”, Bioresource Technology, 152 407-413.

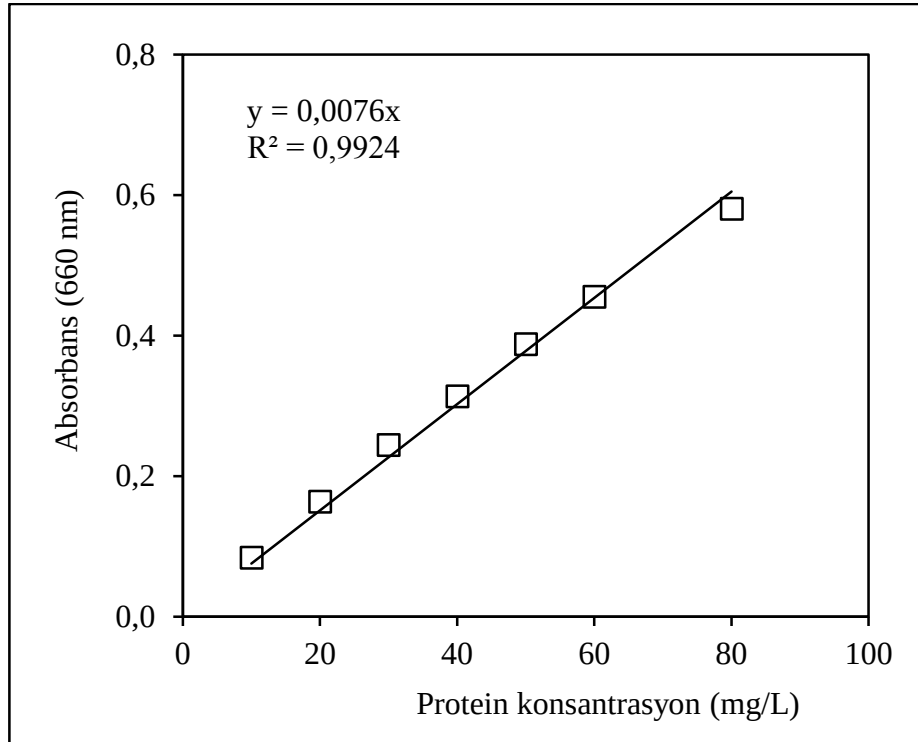
Ek B: Kalibrasyon Eğrileri



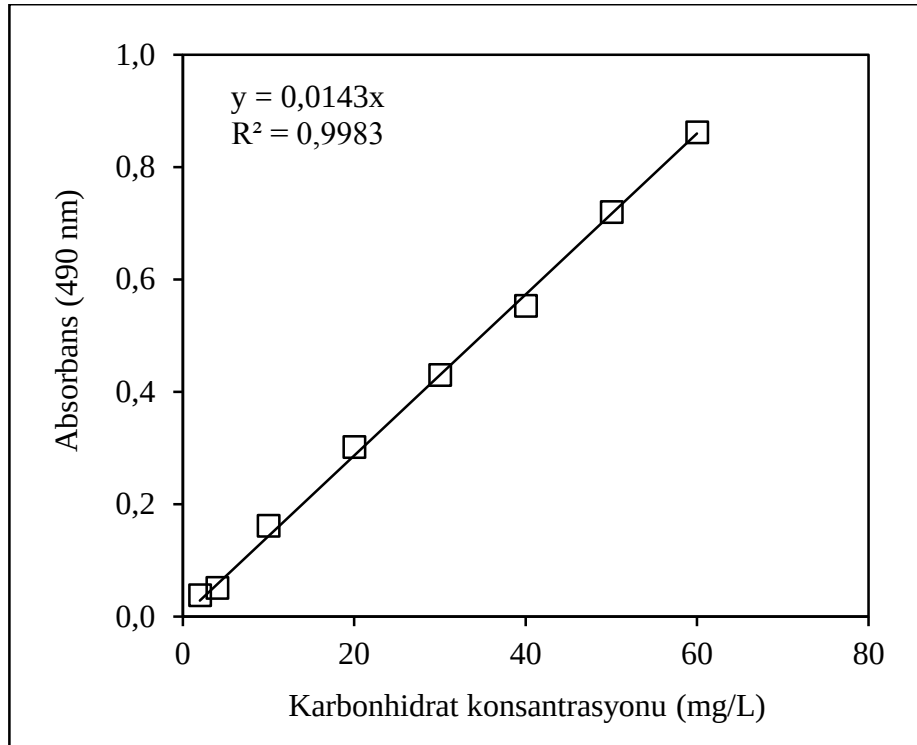
Şekil B1.1: BG11 ortamında yetiştirilen mikroalg kültüründe biyokütle takibi için kullanılan kalibrasyon grafiği.



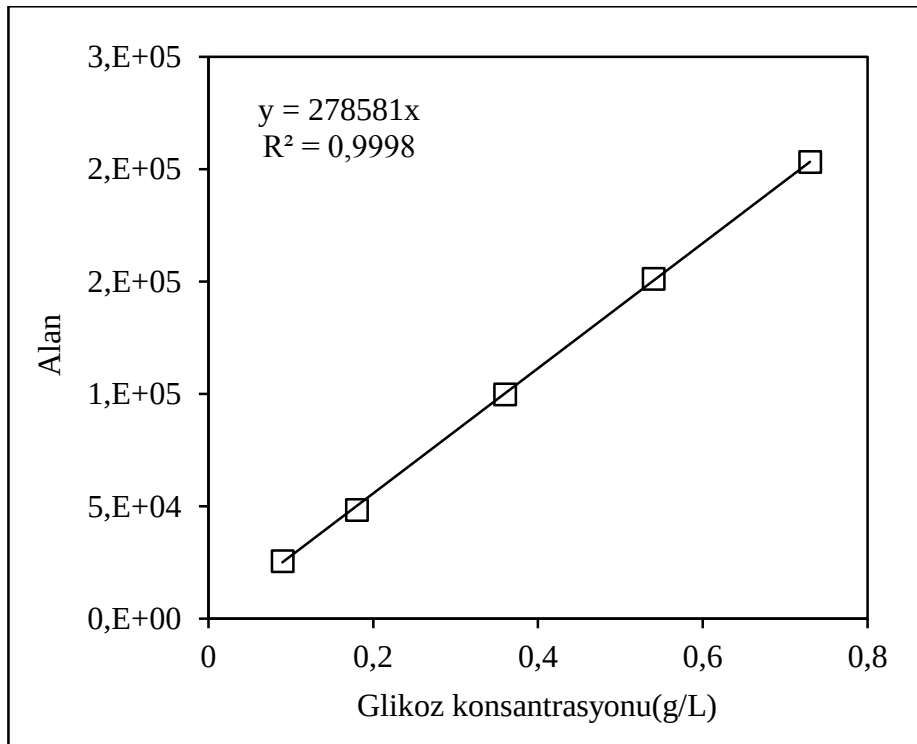
Şekil B1.2: Atıksu ortamında yetiştirilen mikroalg kültüründe biyokütle takibi için kullanılan kalibrasyon grafiği.



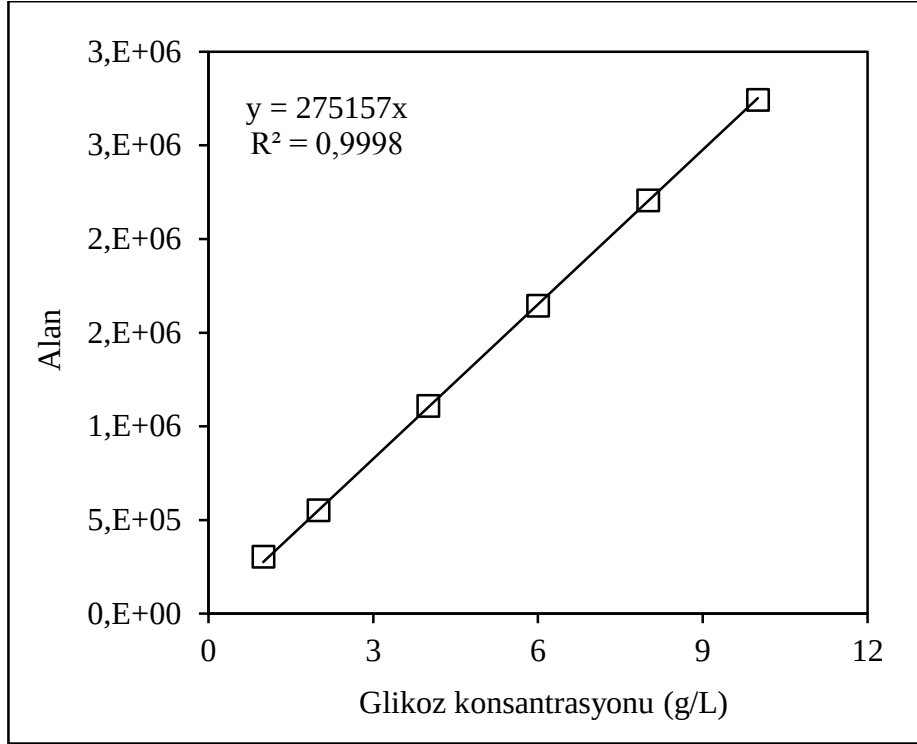
Şekil B1.3: Protein tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği.



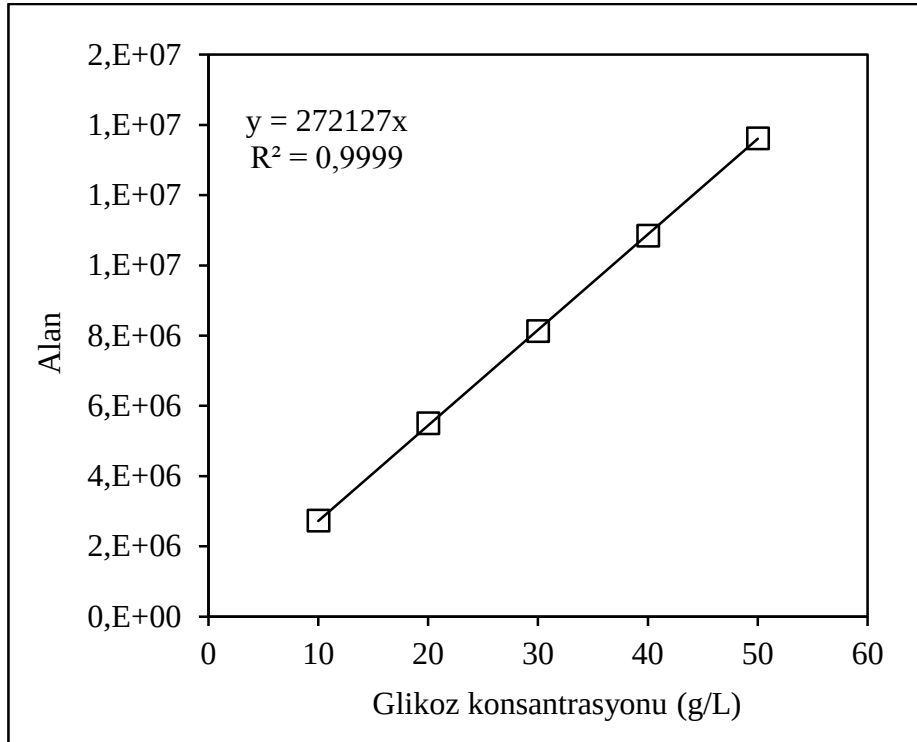
Şekil B1.4: Karbonhidrat tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği



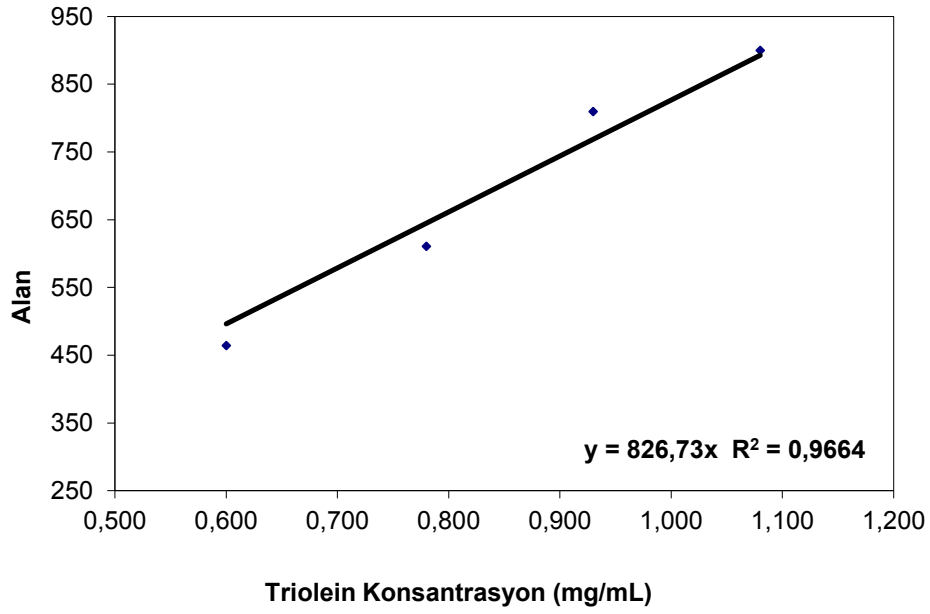
Şekil B1.5: HPLC’de glikoz tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği (0,1-0,8 g/L aralığı için).



Şekil B1.6: HPLC’de glikoz tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği (1-10 g/L aralığı için).



Şekil B1.7: HPLC’de glikoz tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği (10-50 g/L aralığı için).



Şekil B18: GC’de Lipit Analizi için Trigliserit Kalibrasyon Grafiği (referans data triolein standardına ait).

Ek C: Hesaplamalar

• Ozon Jeneratörlerinin Kapasitesinin Belirlenmesi

Kaufman marka ve BNP marka ozon jeneratörlerinin kapasitesi belirlenirken yarı kesikli ozon ölçüm metodu olan KI metodu (Standard Methods, 2350-E) kullanılmıştır. Ozon jeneratöründen çıkan ozon gazı seri bağlı ozon tutuculardan geçerek egzoz kanalı ile dışarıya çıkmaktadır. Ozon tutucu şişelerde %2’lik KI çözeltisi bulunmaktadır. Bu metoda ait deneysel prosedür ve hesaplamalar aşağıda verilmiştir.

•Reaktifler: Ozon ihtiyacı olmayan saf su, 2 N sülfirik asit çözeltisi, potasyum iyodat çözeltisi, standart sodyum tiyosülfat çözeltisi (0,1 N), standart sodyum tiyosülfat çözeltisi (0,005 N), nişasta çözeltisi.

•Prosedür: İki seri bağlı KI şişesinden 10 dk boyunca gaz akışı 1L/dk olacak şekilde ozon geçirilir. Her bir KI şişesinde en az 200 mL %2’lik KI olmalıdır. Transfer olan miktarın belirlenmesi için Her bir şişedeki çözelti behera alınır 10 mL 2 N sülfirik asit çözeltisi eklenir ve standart sodyum tiyosülfat çözeltisi (0,005N) ile

sarı iyot rengi yok olana kadar titrasyona tabi tutulur. Behere 1-2 mL nişasta çözeltisi eklenir ve mavi renk yok olana kadar titrasyona devam edilir.

• Hesaplama: Titrasyon sırasında harcanan titrant miktarı aşağıda verilen formül içerisinde kullanılarak birim sürede A ve B reaktörleri içerisinde KI ile reaksiyona giren toplam ozon miktarı hesaplanır.

$$Ozon\ dozu\ (mg/dk) = \frac{(A + B) \times N \times 24}{t} \quad (C1.1)$$

Burada A A şişesi için harcanan titrant hacmini (mL), B B şişesi için harcanan titrant hacmini (mL), N sodyum tiyosülfat çözeltisi normalitesi (0,005M ve 0,1 M) ve t ozonlama süresini (dk) temsil etmektedir.

Kaufman marka ozon jeneratörü kullanıldığında reaktöre birim sürede giren ozon miktarı aşağıdaki örnekte olduğu gibi hesaplanmıştır. Yapılan denemede 2 dakikalık ozonlama sonrası 8,2 mL titran hacmi elde edilmiştir.

$$\begin{aligned} Ozon\ dozu\ (mg/dk) &= \frac{\left(\frac{V_{reaktör}}{V_{numune}}\right) \times M \times V \times 24}{t} \\ &= \frac{\left(\frac{400\ mL}{100\ mL}\right) \times 0,1\ \frac{mol}{L} \times 8,2\ mL \times 24}{2\ dk} \\ &= 39,4\ mg/dk \end{aligned} \quad (C1.2)$$

Burada $V_{reaktör}$ kullanılan reaktör hacmini (mL), V_{numune} ozonlanan numune hacmini (mL), M sodyum tiyosülfat çözeltisi molaritesi (0,1 M), V kullanılan titrant hacmini (mL) ve t ozonlama süresini (dk) temsil etmektedir. Reaktöre verilen ozon gazının debisi (Q) 0,5 L/dk olduğu için, ortalama konsantrasyonu aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} Ozon\ dozu\ \left(\frac{mg}{dk}\right) &= \frac{Ozon\ dozu\ \left(\frac{mg}{dk}\right)}{Ozon\ debisi\ \left(\frac{L}{dk}\right)} \\ &= \frac{39,4\ mg/L}{0,5\ L/dk} = 79\ mg/L \end{aligned} \quad (C1.3)$$

Yukarıda detaylı olarak açıklanmış olan hesaplamalar sonucu ozonlama süresine bağlı olarak reaktöre gelen gazdaki ozon konsantrasyonu ve dakikada üretilen ozon miktarı hesaplanmıştır. BNP marka ozon jeneratörü kullanılması ile gazdaki ozon konsantrasyonu ve dakikada üretilen ozon miktarı benzer şekilde hesaplanmıştır. BNP marka ozon jeneratörü 1,4 L/dk gaz debisine sahiptir. Her iki jeneratöre için hesaplanan veriler Tablo C1.1’de gösterilmektedir.

Tablo C1.1: Ozonlama süresine bağlı olarak reaktöre gelen gazdaki ozon konsantrasyonu ve dakikada üretilen ozon miktarı (üç ölçümün ortalaması)

Kaufman Ozon Jeneratörü			BNP Ozon Jeneratörü		
Süre (dk)	Gazdaki ozon konsantrasyon (mg/L)	Dakikada üretilen ozon miktarı (mg/dk)	Süre (dk)	Gazdaki ozon konsantrasyon (mg/L)	Dakikada üretilen ozon miktarı (mg/dk)
2	79	40	2	0,92	1,3
4	90	45	4	0,93	1,3
6	87	44	8	0,85	1,2
8	94	47	10	0,92	1,3
10	92	46	20	0,92	1,3

- Kullanılan Kolorimetrik İndigo Metodu ile KI Metodu Arasındaki Bağıntının Belirlenmesi

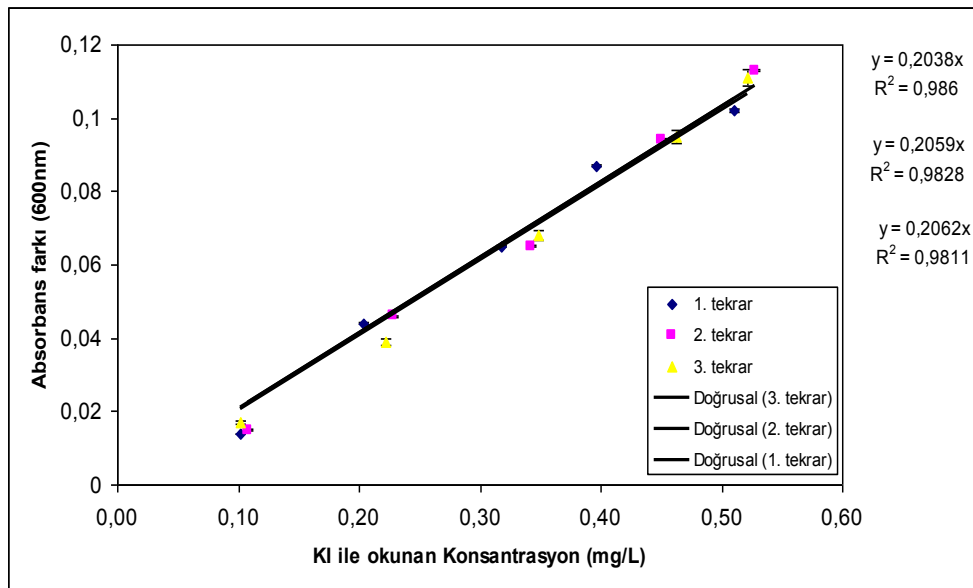
Su ortamında ozon ölçümü güvenilir olarak potasyum indigotrisülfonat boyasının kullanıldığı kolorimetrik analiz ile mümkündür (Standard Methods 4500 O3-B). Kolorimetrik indigo metodu, ozonla reaksiyona giren boyanın parçalanmasına ve bir absorbans farkı oluşturmaya dayanmaktadır. Su içindeki ozon konsantrasyonu bu yöntem kullanılarak aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmaktadır.

$$\frac{mgO_3}{L} = \frac{\Delta A \times 100}{f \times b \times V} \quad (C1.4)$$

Burada ΔA absorbans farkını, f KI ve indigo yöntemleri arasındaki korelasyonu, b spektrofotometrik hücre kalınlığını (1 cm'lik hücre kullanılmıştır) ve V numune hacmini temsil etmektedir.

Kolorimetrik indigo metodu yanı sıra KI (Standard Methods 2350-E) metodu da ozon ölçümünde kullanılmaktadır. Fakat bilindiği üzere KI su ortamında ozon harici radikallerle de reaksiyon vermektedir ki bu tür girişimler ozonun yanlış ölçülmesine neden olmaktadır. Ancak saf su kullanıldığında KI metodu ile sudaki ozon miktarı hesaplanabilmektedir. Deneysel çalışmalar boyunca KI metodu indigo metodunun kalibrasyonunda ve ozon jeneratöründen gelen gazdaki ozon miktarının ölçümünde kullanılmıştır.

KI ve indigo metodu arasındaki korelasyonu ifade eden f faktörünün bulunması amacıyla bir deney tasarlanmıştır. İlk olarak reaktörün içine 1 L (pH 2,5'de) saf su alınmış ve jeneratör 0,5 L/dk debi ile 10 dakika çalıştırılmıştır. Reaktörden alınan numuneler ikiye ayrılmıştır. Numunelerden birine indigo çözeltisi eklenerek 600 nm'de absorbansı okunmuş diğer numuneye KI eklenerek sodyum tiyosülfatla titre edilmiştir. Bu şekilde iki yöntem arasındaki korelasyon ve indigo metodu için kalibrasyon grafiği ortaya çıkartılmıştır (Şekil C1.1). İndigo metoduyla ozon konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan f faktörü 0,204 olarak (üç ayrı ölçümün ortalaması) belirlenmiştir. Ozon gazının sudaki ortalama konsantrasyonu KI ve indigo yöntemleri kullanılarak yaklaşık 20,4 mg O₃/L olarak bulunmuştur.



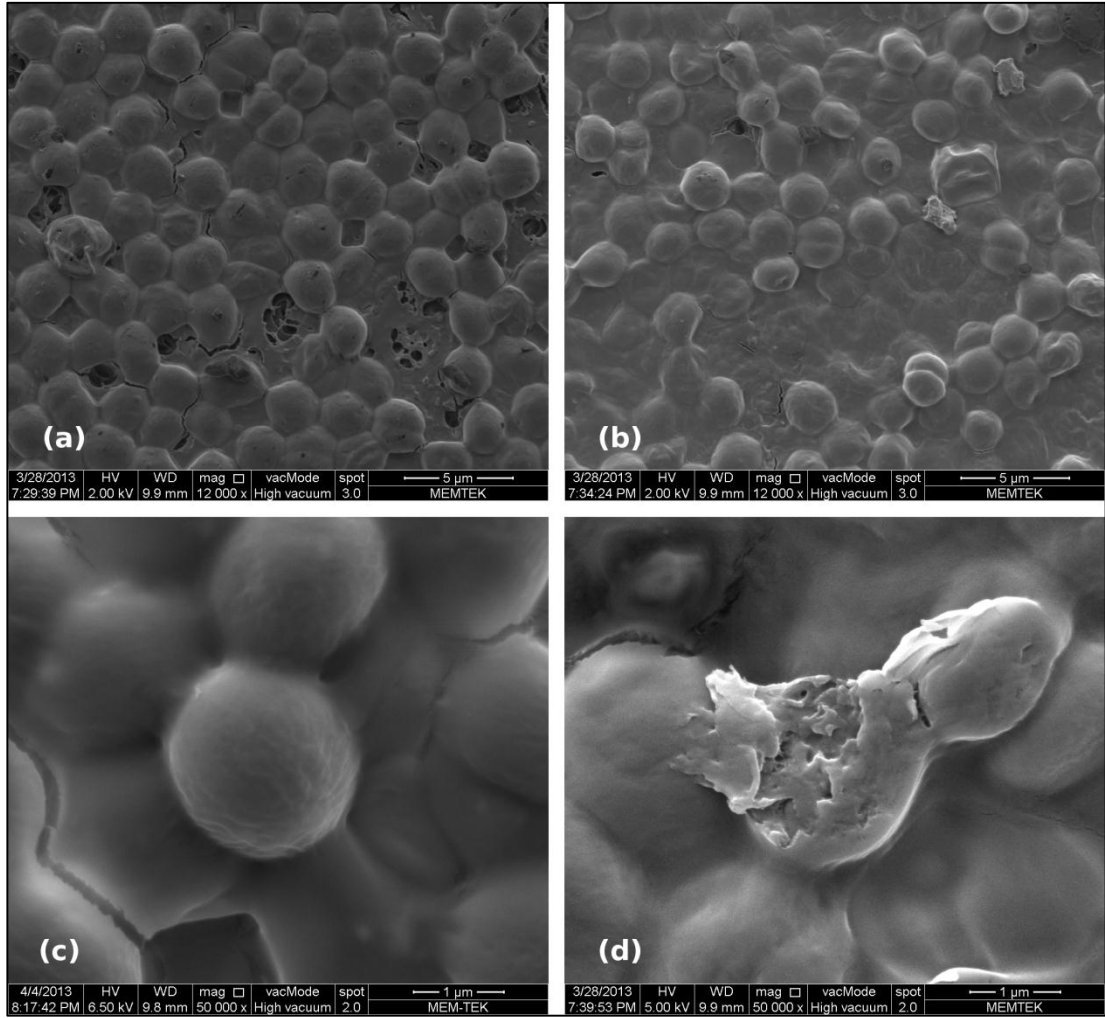
Şekil C1.1: KI ile indigo yöntemleri arasındaki korelasyon grafiği.

Ozon jeneratöründen reaktöre gelen gazdaki ozon konsantrasyonu ortalama 79 mg O₃/L'dir (detaylı bilgi ekler bölümündedir). Ozon gazının sudaki konsantrasyonu ise 20,4 mg O₃/L'dir. Ozon gazının çözünürlük katsayısı (s) 25°C sıcaklık ve 1 µS/cm iletkenlik ($\mu = 1,6 \times 10^{-5}$ M) için aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

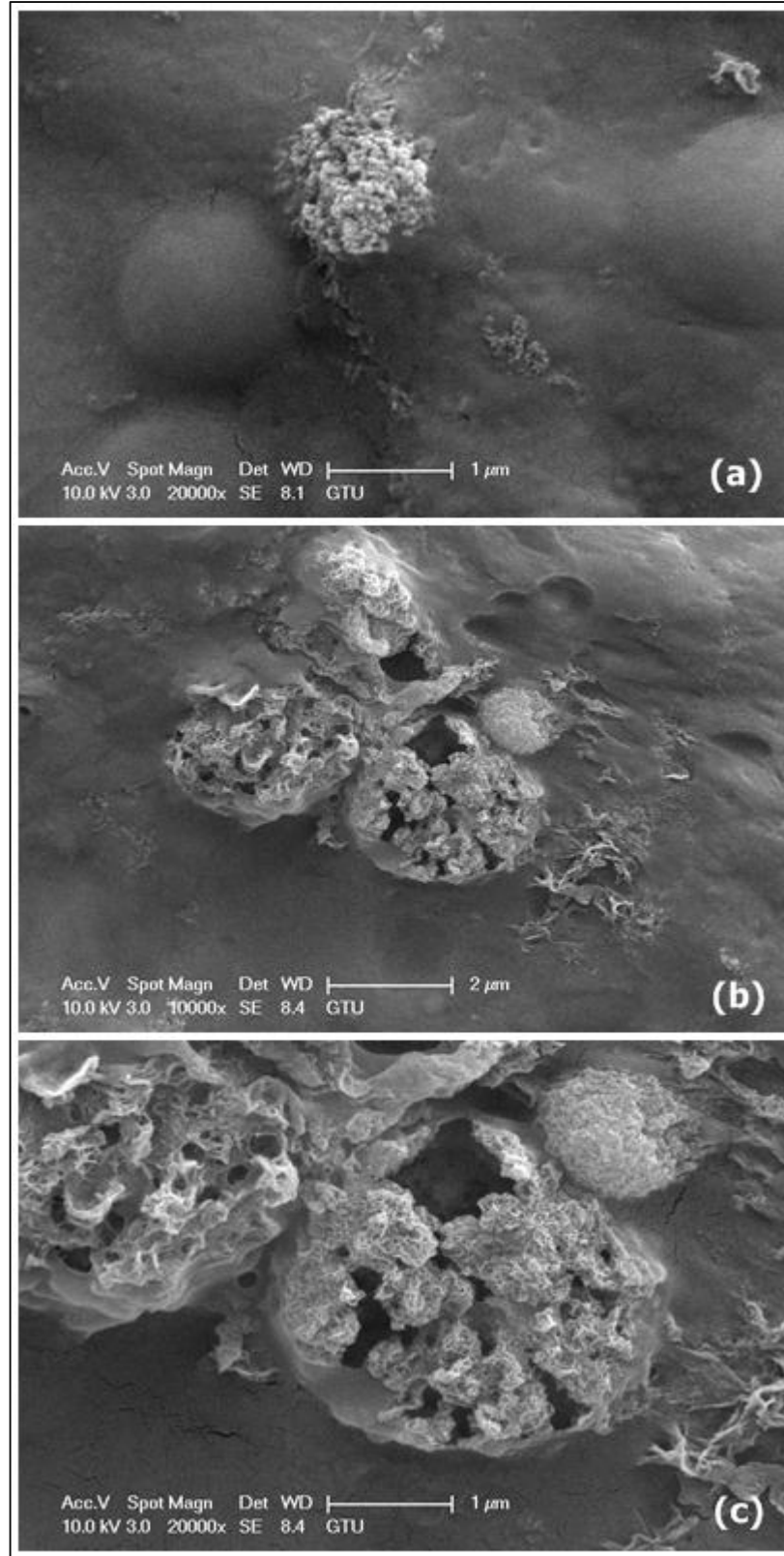
$$s = \frac{\text{Sudaki ozon konsantrasyonu}}{\text{Gazdaki ozon konsantrasyonu}} = \frac{20,4 \text{ mgO}_3/\text{L}}{79 \text{ mgO}_3/\text{L}} = 0,26 \quad (\text{C1.5})$$

Hesaplanan bu değer literatürde yer alan çözünürlük katsayıları (Gurol et al., 1982; Morris, 1988) ile benzer olup, çalışmanın tutarlılığının bir göstergesidir.

Ek D: SEM Görüntüleri



Şekil D1.1: Chlorococcum sınıfı karışık mikroalg kültürünün ultrason uygulaması öncesi (a ve c) ve sonrası (b ve d) 12000 ve 50000 kat büyütülmüş taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.



Şekil D1.2: Chlorococcum sınıfı karışık mikroalg kültürünün ozon uygulaması sonrası 10000 (b) ve 20000 (a ve c) kat büyütülmüş taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.