



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

***Chlorella vulgaris*'de Biyodizel Hammaddesi Üretimi Üzerine Borlu
Bileşiklerin Etkilerinin Değerlendirilmesi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEYZULLAH YILMAZ

ARALIK 2019



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Chlorella vulgaris'de Biyodizel Hammaddesi Üretimi Üzerine Borlu
Bileşiklerin Etkilerinin Değerlendirilmesi

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEYZULLAH YILMAZ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. TURGAY ÇAKMAK

ARALIK 2019

BİLDİRİM

Hazırladığım tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt ederim.


Feyzullah YILMAZ

Danışmanlığını yaptığım işbu tezin tamamen öğrencinin çalışması olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı taahhüt ederim.


Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK

İMZA SAYFASI

Feyzullah YILMAZ tarafından hazırlanan '*Chlorella vulgaris*'de Biyodizel Hammaddesi Üretimi Üzerine Borlu Bileşiklerin Etkilerinin Değerlendirilmesi' başlıklı bu yüksek lisans tezi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalında hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İMZA



Üyeler:

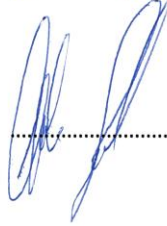
Doç. Dr. Murat KAZANCI

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi



Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL

Kurumu: Marmara Üniversitesi



Tez Savunma Tarihi: 27 /12 / 2019

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince deęerli bilgi, birikim ve tecrűbeleri ile bana yol gűsterici ve her zaman destek olan kıymetli danıőman hocam Sayın Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK'a ve bilgi ve tecrűbelerini esirgemeyerek bana yardımcı olan kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Zeynep ELİBOL ÇAKMAK'a sonsuz teőekkűr ve saygılarımı sunarım. Numunelerin hazırlanması ve űlűmlerin alınması sırasında yardımlarını esirgemeyen Doktora Őęrencisi Sayın Tuęba DAYIOęLU'na, bu zorlu tez sűrecinde benden desteęini bir an için bile esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili eőim Elif Nur YILMAZ'a, tez çalıőmam boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Baőhekim Dr. Aydan UZUN'a, Uzm. Dr. Reyhan YILMAZER'e, Diő Hekimi H. Zafer YILMAZER'e ve Baőhemőire Belkıs Sultan ŐZAY'a teőekkűrlerimi bir borç bilirim.

ÖZET

***Chlorella vulgaris*'de Biyodizel Hammaddesi Üretimi Üzerine Borlu Bileşiklerin Etkilerinin Değerlendirilmesi**

Feyzullah YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı,

Nanobilim ve Nanomühendislik Programı

Danışman: Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK

Aralık 2019 34 Sayfa.

Bor (B) bütün bitkisel organizmaların büyüme ve gelişimi için gerekli bir elementtir. Bu tez çalışmasında, çeşitli borlu bileşiklerin (Borik asit, Kolemanit ve Uleksit) *Chlorella vulgaris*'in büyüme ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol (TAG) üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bununla birlikte büyümede en az baskılanma ile nötral lipid içeriğinde en fazla artışın kaydedildiği B konsantrasyonları belirlenerek B elementinin ve borlu bileşiklerin mikroalglerden biyodizel hammaddesi üretiminde kullanılabilirliğinin tanımlanması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, *C.vulgaris* içerisinde artan yoğunluklarda borlu bileşiklerin bulunduğu büyütme ortamında kültüre alınmış ve 30 günlük inkübasyon süresince mikroalglerin büyüme, toplam lipid, nötral lipid, TAG, Yağ asidi metil ester (YAME) içerikleri ile toplam klorofil, karotenoid, protein ve karbohidrat içerikleri de belirlenmiştir.

C.vulgaris'in büyüme ortamına artan konsantrasyonda borlu bileşikler uygulandığında TAG üretimi artmış, yağ asidi metil ester içeriğindeki çoklu doymamış yağ asidi oranında da azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada, 0,93mM Uleksit uygulamasının büyümede düşük düzeyde sayılabilecek bir baskılanma ile kısa sürede lipid üretiminde artışı tetiklediği, böylece 8 gün boyunca 0,93mM Uleksit uygulamasının *C.vulgaris*'ten biyodizel hammaddesi üretimi için diğer uygulamalara göre daha üstün olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu tez çalışması ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan borlu bileşiklerin *C. vulgaris* de biyodizel hammaddesi üretimi amacıyla kullanılabilir olacak ekonomik ve potansiyel bir yaklaşım olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyodizel, Borik asit, *Chlorella vulgaris*, Uleksit

ABSTRACT

Evaluation of the Impact of Boron Compounds on Biodiesel Feedstock Production from
Chlorella vulgaris

Feyzullah YILMAZ

Master Thesis, Nanoscience and Nanoengineering Department, Nanoscience
and Nanoengineering Program

Supervisor: Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK

December 2019. 34 Pages.

Boron (B) is an element which is necessary for growth and development of plant-like organisms. In this thesis research, impact of different boron compounds (Boric acid, Colemanit, Ulexit) on growth and triacylglycerol production, used as biodiesel feedstock, was investigated. Moreover, it was aimed to identify potential use of B for maximization of biodiesel feedstock production from microalgae by determining the level of B concentration causing least decrease in growth and highest increase in neutral lipid production.

With this aim, *C.vulgaris* was cultured in growth media with increasing concentrations of B-compounds and growth, total lipid, neutral lipid, TAG, fatty acid methyl ester (FAME) content, total chlorophyll, carotenoid, protein and carbohydrate contents were determined during 30 days of incubation period.

Increased concentrations of B-compounds induced TAG production which was accompanied by decrease in polyunsaturated fatty acid levels in *C.vulgaris*. Besides, 0.93mM Ulexit application stimulated a rapid induction of lipid productivity which was evaluated as more favourable than other applications for biodiesel feedstock production from *C.vugaris*. To conclude, this thesis research showed that application of different concentrations of B-compounds may stand as a potential economic approach for production of biodiesel feedstock from *C.vulgaris*.

Key Words: Biodiesel, Boric acid, *Chlorella vulgaris*, Ulexit

İÇİNDEKİLER

BİLDİRİM.....	iii
İMZA SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
TABLolar.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
GRAFİKLER.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mikroalg.....	1
1.2. <i>Chlorella vulgaris</i>.....	2
1.3. Borun önemi.....	3
1.4. Boratlar.....	4
1.4.1.Uleksit.....	4
1.4.2. Kolemanit.....	5
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	7
2.1. Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Biyodizel.....	7
2.2. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi.....	9
2.3. Ülkemizde Biyodizel Üretiminde Durum.....	11
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Kültür şartları ve deneysel yaklaşım.....	12
3.2. Toplam lipit tayini.....	13
3.3. Sitoplazmik Lipit Cisimlerinin Floresans Görüntülenmesi.....	13
3.4. FT-IR analizi ile Triaçilgliserollerin miktarsal tayini.....	13
3.5. Mikroalgal lipitlerin transesterifikasyonu ve yağ asidi metil ester (YAME) analizi.....	14

3.6. Toplam nişasta tayini.....	15
3.7. Toplam protein tayini.....	15
3.8. Toplam Klorofil ve Toplam Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini.....	16
3.9. İstatistik hesaplamalar	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	17
4.1. Uygulanacak Borik Asit yoğunluğunun belirlenmesi.....	17
4.2. <i>C.vulgaris</i> 'in TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler	20
4.3. Sitoplazmik lipit cisimlerinin floresans görüntülenmesi.....	23
4.4. Mikroalglerin Yağ asidi metil ester (YAME) analizleri.....	24
4.5. Mikroalglerin toplam protein ve karbohidrat içeriklerinde meydana gelen değişimler.....	25
4.6. Mikroalglerin toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler.....	26
5. SONUÇ.....	27
KAYNAKÇA.....	29
ÖZGEÇMİŞ.....	34

TABLULAR

Tablo 1. Çeşitli bor mineralleri ve kimyasal formülleri.....	4
Tablo 2. 2008-2016 yılları arası Türkiye'nin ürettiği ve tükettiği petrol miktarı.....	7
Tablo 3. Algler ve diğer biyodizel kaynaklarının karşılaştırılması.....	11
Tablo 4. İlk büyüme analizi sonrasında <i>C.vulgaris</i> 'e uygulanan borlu bileşik konsantrasyonları.....	12
Tablo 5. İlk büyüme analizi sonrasında <i>C.vulgaris</i> 'e uygulanan borlu bileşik konsantrasyonları.....	18



ŞEKİLLER

- Şekil 1.** *C. vulgaris*'in organelleriyle gösterildiği şematik morfolojisi (C. Safi vd., 2014).....2
- Şekil 2.** Farklı görünümde üleksit.....5
- Şekil 3.** Kolemanit.....6
- Şekil 4.** Mikroalglerden biyodizel üretiminin şematik gösterimi.....10
- Şekil 5.** Yağ içeren bitkilerin (a) ve alglerin (b) petrolün yerine tamamen geçmesi durumunda ekilmesi gereken tarım alanlarının dağılımı.....10
- Şekil 6.** Toplam karbohidrat tayini için kullanılmış olan standart grafik.....15
- Şekil 7.** Protein tayini için hazırlanmış standart grafik.....16
- Şekil 8.** *C.vulgaris*'in büyümesi üzerine artan H_3BO_3 yoğunluğunun etkileri.....18
- Şekil 9.** *C. vulgaris*'in büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri.....19
- Şekil 10.** *C.vulgaris*'in TAG (a), Nötral lipit (b) ve Toplam lipit (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8., 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler en az %95 güven aralığında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.....21
- Şekil 11.** Logaritmik büyüme evresinde mikroalglerin sitoplazmik lipit cisimlerinin floresans görüntüleri (M.B. 40x10). Mikroalgler inkübasyonun 12. gününde hasat edilmiştir. Açık turuncu renkte görünen noktalar sitoplazmik lipit cisimleridir.....23
- Şekil 12.** Artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin logaritmik büyüme evresindeki mikroalglerin ürettikleri lipitlerdeki YAME içerikleri üzerine etkileri.....24
- Şekil 13.** *C.vulgaris*'in toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8. 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.....25
- Şekil 14.** *C.vulgaris*'in toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8., 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.....26

GRAFİKLER

- Grafik 1.** Dünya genelindeki petrol alternatifi kimyasalların üretimi (biyodizel ve etanol). Biyodizel üretimi özellikle son yıllarda gelişmeye başlamıştır (mavi renkli kısım).....8
- Grafik 2.** Petrol yerine biyodizel kullanıldığında; havadaki kirli gazların emisyon değişimi (U.S. EPA 2002).....9



1. GİRİŞ

Dünya genelinde yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Fosil yakıtların belirli rezerv ömürleri, artan nüfus, hızla gelişen teknoloji ve sanayi bu durumun sebepleri arasında gösterilebilir (1,2). Biyokütle, hidrogüç, jeotermal, güneş, rüzgar ve dalga enerjisi yenilenebilir enerji kaynakları olarak adlandırılabilir (3,4). Bu kaynaklar içerisinde biyokütleyle olan ilgi, son dönemlerde daha da artmıştır (5,6). Ana bileşeni karbonhidrat olan bitkisel ve hayvansal tüm organik maddeler biyoyakıt kapsamında değerlendirilebilir. Biyokütlerden biri olan bitkisel yağdan, biyodizel ve biyoetanol gibi ürünler elde edilmesi mümkündür (7). Biyoyakıtlar geleneksel enerji kaynaklarına kıyasla daha avantajlı ve çevre dostudurlar (8). Enerji kaynağı olarak biyoyakıtların tercih edilmesi, fosil yakıtlardan kaynaklanan karbondioksit salınımını ve çevre kirliliğini azaltır ayrıca enerji güvenliğine katkı sağlar (9). Yağlı bitki ve atık yağlardan da biyoyakıtlar elde edilmektedir (10). Ancak bu kaynaklar mevcut ihtiyaç için yeterli olmamakta ve mikroalgler bu konuda umut vaat eden bir ham madde kaynağı olmaktadır (6,11).

Biyoyakıt üretiminde kullanılan diğer kara bitkileriyle mukayese edildiğinde mikroalglerin fotosentez hızının yaklaşık 50 kat fazla olduğu görülür (12). Ayrıca mikroalglerin kara bitkilerine göre biyoyakıt verimlilikleri de daha fazladır (13). Yetiştirilmeleri için verimli topraklara gerek duyulmamasına ek olarak; trigliserit üretiminde mikroalglerden kara bitkilerine kıyasla 45 ila 220 kat daha fazla verim elde edilebilmektedir (14). Bu çalışmada bir mikroalg cinsi olan *Chlorella vulgaris*'in biyodizel hammaddesi üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri değerlendirilecektir.

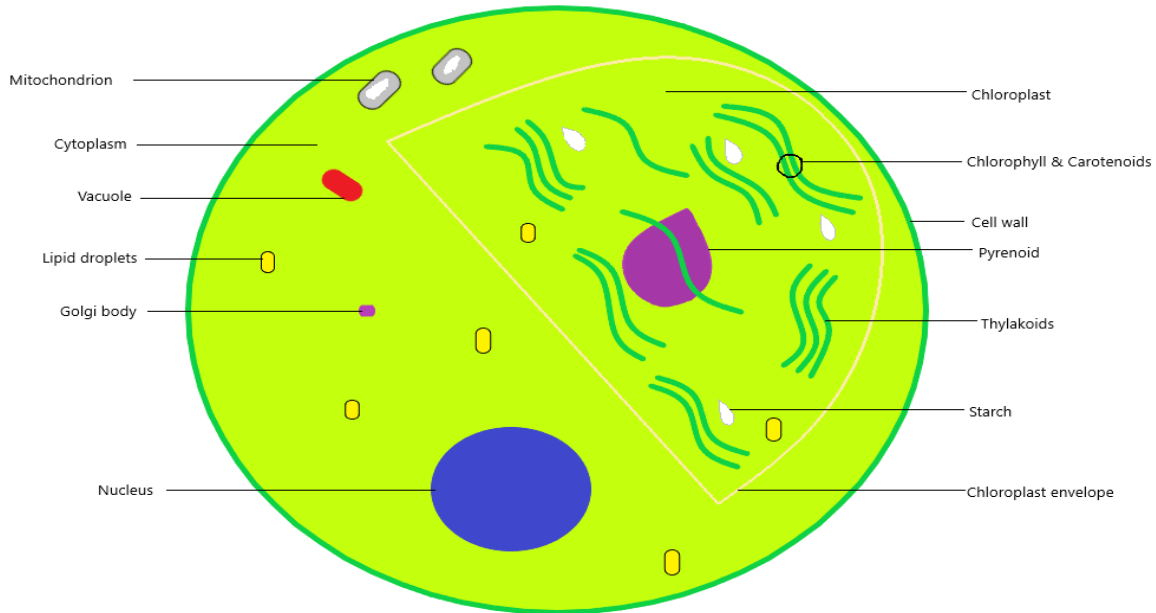
1.1.Mikroalg

Mikroalgler tek veya çok hücreli yapılara sahip olabilen, basit mikroskobik heterotrofik ve/veya ototrofik, fotosentez yapabilen ve sucul ortamlarda gelişimini sürdüren organizmalardır (15). Hızlı şekilde çoğalma özelliğine sahip olup prokaryotik veya ökaryotik yapıda bulunabilirler. Tek hücreli veya basit çok hücreli yapıları onları olumsuz çevresel şartlardan korur ve bu koşullarda bile hayatta kalmalarını sağlar (16). Kimyasal stokiyometrileri kimi kaynaklarda $CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$ (17, 18) olarak, kimi kaynaklarda ise $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P_1$ (19) olarak geçer. Şimdiye kadar yaklaşık 30000 farklı mikroalg türü belirlenmiş olsa da yeryüzünde yaklaşık 80000 farklı mikroalg türü olduğu tahmin edilmektedir (16). Yapılarında değişen miktarlarda lipit, karbonhidrat ve protein bulunur. Önceden yapılan araştırmalarla bazı mikroalg türlerinin kuru ağırlıkça %70'den fazlasının lipit olduğu ortaya çıkmıştır. (12, 13). Mikroalglerin kimyasal yapısı türleri ve kültür koşulları değişmektedir (15). Genellikle ototrofik yaşayan mikroalgler, klorofilleri yardımıyla fotosentez yapabilir ve karbondioksit, su ve güneş ışığını biyokütleyle dönüştürebilir (7,15). Ancak *chlorella vulgaris*'in de aralarında bulunduğu bazı türler ototrofik gelişime ek olarak heterotrofik ve miksotrofik olarak da gelişme kapasitesine sahiptir (26, 27). Heterotrofik mikroalgler karanlık koşullar oluştuğunda organik karbonu karbon kaynağı olarak kullanır (28). Organik karbondan elde edilen enerji, hücre sentezinde kullanılır. Kimyasal enerji ise ışık enerjisinden dönüştürülür ve depolanır (27).

1.2.Chlorella vulgaris

Chlorella ismi Yunanca yeşil anlamına gelen bir sözcük olan chloros ile, mikroskobik büyüklüğüne ithafen verilen ella ekinin birleşiminden oluşur. Hem bilinen en eski canlılardan, hem de en eski besin gruplarından biridir. Chlorella 2.5 milyar yıldır yeryüzünde varlığını sürdüren organizmalardan biri olup günümüze dek genetik kombinasyonu büyük bir değişikliğe uğramamıştır. Çoğunlukla 5 ila 8,5 micron çapında küresel görünüme sahip bir canlıdır. Kloroplastları kase görünümünde olup, bazı durumlarda pyrenoidler bulundurmayabilir (20). Yeşil ökaryotik mikroalglerden biri olan C. vulgaris, protista aleminin chlorophyta şubesine ve bu şubenin trebouxiophyceae sınıfına mensuptur. Takımı chlorellales olup, familyası ise chlorellaceae'dir (C. Safi, vd., 2014). Hollandalı bir araştırmacı olan Martinus Willem Beijerinck ilk alg 1890'da iyi bir şekilde belirlenmiş nükleusu ile tanımlamıştır (22). Erken 1900'lerden başlayarak %55 i aşkın protein içeriğiyle Alman bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve o zamana kadar bilinmeyen yeni bir besin grubu olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Chlorella türleri vitamin, mineral, aminoasit, protein, DNA ve RNA gibi nükleik asitler, temel yağ asitleri, enzim ve karotenoidleri üzerinde barındırıp biriktirebilen önemli bir organizmadır. Bu besinleri tamamen saf ve katkısız olarak bulundurmasıyla başlı başına bir besindir. Yapısının en az yarısını proteinler oluşturur ve buna ilaveten demir, iyot, çinko, magnezyum, fosfor ve kalsiyum da içerir. Sığır karaciğerinin içerdiğinden daha fazla miktarda B12 vitaminine sahiptir. Bu sebeple de günümüzde besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Chlorella'nın ürünleri buna ek olarak ilaç, boya, hayvan yemi, kültür ve kozmetik ürün üretiminde kullanılabilir.



Şekil 1. C. vulgaris'in organelleriyle gösterildiği şematik morfolojisi (C. Safi vd., 2014)

Günümüzde Japonya, medikal amaçlarla Chlorella tüketiminde dünya lideridir (23, 24). İmmün sistemi düzenleyen ve anti-kanser özelliklere sahip olması bu durumu oluşturan en

önemli sebeplerdir. Fare ve tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki *Chlorella*'nın yaşla beraber gelişen kardiyovasküler hastalıklara, yüksek tansiyona ve katarakta karşı koruyucu özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca ateroskleroz riskini düşürüp ciltteki kolajen üretimini de artırır. Bütün bunlara ek olarak *C. vulgaris* önemli miktarda lipiti özellikle nitrojen açlığı sonrası sunduğu yağ asidi profiliyle, bünyesinde biriktirme kapasitesine sahiptir ve bu özelliği onu biyodizel üretimi için önemli bir organizma yapar.

1.3.Borun önemi

Bor bitkisel organizmaların büyümesine olan katkıları sebebiyle, bu canlıların büyüme ortamlarında mutlaka bulunması gereken önemli bir elementtir. Fakat farklı bitkilerin bor elementine gereksinimleri birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Lateks üreten bitkilerin bor elementine olan gereksinimleri en fazla iken, otsu bitkilerde bor ihtiyacı en düşüktür (28). Borun bitkisel hücreler için en önemli rolü hücre duvarının yapısına katılan pektin sentezi ile ilgilidir (29). Bor elementinin hücre duvarı bulundurmayan bazı mayalar (30) ile hayvanlarda embriyo gelişimine bir takım sınırlandırıcı etkileri bulunmaktadır. (31).

Bor periyodik tablodaki yarı metaller arasında en düşük elektronegativiteye sahip elementtir. Bu özelliği kimyasal ve biyokimyasal süreçlerde baskın bir rol oynamasının önünü açmaktadır (32). Bu element elmasa yakın bir sertliğe sahip olup, ışığı kırabilir. Atom numarası 5'tir ve sembolü 'B'dir. Doğada serbest halde bulunmayıp, uygun koşullar meydana geldiğinde yüksek seviyede yanıcı ve patlayıcı özellikler gösterebilmektedir. Dışarı ısı çıkışının gözlemlendiği bu kimyasal tepkimenin sonucunda gaz emisyonu ise olmamaktadır. Bu özelliği borun alternatif bir yakıt olarak kullanılması fikrinin oluşmasına yol açmıştır.

Bor elementinin bitki büyümesine olan katkıları ise ilk olarak geçtiğimiz yüzyılın başlarında belirlenmiştir. Günümüzde ise bitkilerin büyümesinde olmazsa olmaz bir rol oynayan esansiyel bir element olduğu kanıtlanmıştır. Bitkilerdeki öncelikli rolünün hücre duvarının yapısı ve görevleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu element yalnızca bitkiler için değil, aynı zamanda mantar, hayvansal hücreler, siyanobakteri ve algler için de sürekli ihtiyaç duyulan bir element olarak karşımıza çıkmaktadır. Şu anda bitki, mantar, maya ve alg kültürlerine dışardan eklenen ve sürekli bulunması gereken tek yarı metal durumundadır. Farklı türdeki mikroalglerin büyüme ortamlarında ne kadar bor bulunması gerektiğine dair yeterli bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Çeşitli mikroalg türlerinin bor gereksinimleri ile ilgili olarak şimdiye dek yalnızca bazı diatomlarda hücre duvarı oluşumu (32) ve bazı siyanobakterilerde ise heterosist oluşumu üzerine bulgular edinilmiştir (33). Bu çalışma, bor içeriğince zengin besiyerinde bulunan *Pinnularia gibba* mikroalginin özellikle erken büyüme evrelerinde lipit içeriğini hızlı bir şekilde arttırmasından hareketle yapılmıştır (34).

1.4.Boratlar

Bor elementi üç oksijen atomu ile birleşerek $(BO_3)^{-3}$ anyon kökünü oluşturur. Kalsiyum, sodyum, magnezyum gibi katyonlar da bu anyonik kök ile birleşerek 100 kadar minerali meydana getirir. Boraksit dışında bütün boratlar kristal suyu taşır. Volkanizma yakınlarında bulunan bağlantısız göllerde bu volkanizmadan etkilenen borun evaporatik olarak çökmesiyle oluşurlar. Özellikle batı Anadolu'da neojen göllerinin içinde biriken bor mineralleri Dünya'nın en önde gelen bor cevherlerini oluşturmaktadır. Bu yataklarda en çok aşağıda sıralanan bor mineralleri görülür:

Bor Minerali	Kimyasal Formülü
Boraks	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$
Kernit	$Na_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$
Ueksit	$NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$
Pandermit	$Ca_4B_{10}O_{13} \cdot 7H_2O$
İnyonit	$Ca_2B_6O_{11} \cdot 13H_2O$
Meyerhoferit	$Ca_2B_6O_{11} \cdot 7H_2O$
Kolemanit	$Ca_2B_6O_{11} \cdot 5H_2O$
Hidroborasit	$CaMgB_6O_{11} \cdot 6H_2O$
Veaçit	$Sr_4B_{22}O_{37} \cdot 7H_2O$
Tunelit	$SrB_6O_{10} \cdot 4H_2O$

Tablo 1. Çeşitli bor mineralleri ve kimyasal formülleri

1.4.1.Uleksit

Kristallenmesi triklinik sistemde gerçekleşir. Genellikle yuvarlak köşeli, yığılımlar, kılcal kristalli veya asiküler, gevşek yapılı, lif, rozet veya pamuk yumağı görünümünde bulunur. Fiziksel özellikleri bakımından mükemmel dilinimli, sertliği 2.5, yoğunluğu ise 1.96'dır. İpek veya cam parıltılı olabilir ve rengi beyazdır. Bileşimine bakıldığında değişen oranlarda (%7.7) Na_2O , (%13.8) CaO , (%43) B_2O_3 ve (%35.5) H_2O , ayrıca az miktarda K_2O ve MgO bulundurduğu görülür.

İpek parlaklığı, yumuşak görünümü, lifsel konumu ve düşük özgül ağırlığı ayırt edici özelliklerini oluşturur. Soğuk suda çözünmeyip, sıcak suda köpürerek ergir. Göllerde buharlaşma ürünü olarak ortaya çıkar. En çok boraks ve kolemanit ile beraber görülür.



Şekil 2. Farklı görünümelerde üleksit

1.4.2. Kolemanit

Kristallenmesi monoklinik sistemde gerçekleşir. Genellikle kısa prizmatik, masif kompakt ve taneli olarak bulunup, mükemmel dilinimli bir fiziksel görünüme sahiptir. Sertliği 4-4.5, yoğunluğu ise 2.4'tür. Camsı parıltılı bir görünümde dir. Renksiz bulunabileceği gibi beyaz, sarı veya gri de olabilir. Bileşiminde değişen oranlarda (%27.2) CaO, (%50.9) B₂O₃ ve

(%21.9) H₂O bulunur. Üfleçte çıtırdayıp alevi yeşile boyamasıyla ayırt edilebilir. Kapalı tüpte ısıtıldığında ise bol miktarda su açığa çıkarır. Kristal bir şekle sahiptir ve borakstan daha sert bir yapısı vardır. Genellikle tersiyer yaşlı göl çökelleri içinde bulunur. Diğer bor mineralleri ile kil ve kalkerli malzemeler kolemanite eşlik eder. Ülkemizde Balıkesir, Kütahya, Eskişehir ve Bursa'da neojen yaşlı kalker, marn, kif, tuf tabakaları içinde değişen kalınlıklardaki seviyesiyle killere karışık olarak karşımıza çıkar.



Şekil 3. Kolemanit

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu proje Ju Z.'nin 2011 yılında yaptığı bor içeriğince zengin besi yerinde bulunan *Pinnularia gibba* mikroalginin erken büyüme evrelerinde hızla lipit içeriğinin arttığı rapor edildiği çalışması göz önüne alınarak yapılmıştır. Bor atık suların çoğu için toksik etki gösterse de, *Chlorella* türü arındırma işlemi için olumlu sonuçlar göstermekte, alglerin bor biriktirme özelliği ile ilgili fikir vermektedir (Taştan B. E. 2012). *Anabaena PCC 7119* ve *Anacystis nidulans* türlerinin yüksek bor konsantrasyonlarında büyüme, fikobiliprotein, klorofil, fotosentetik oksijen değişimi, nitrat alımı ve nitrat redüktazda azalmaya sahip olduğu gösterilmiş, bunun yanı sıra fotosentezden etkilenmediği ve karbonhidrat ile lipit içeriğini artırdığı ortaya konmuştur. Ancak bu konularda yapılan çalışmalar yeterince kapsamlı değildir. Üstelik biyodizel üretimi ile de ilişkilendirilmemiştir.

Bu çalışma için yapılan ön araştırmalar farklı bor konsantrasyonlarının tek hücreli bir model organizma olan *Chlamydomonas reinhardtii*'nin büyümesi üzerine bir takım etkileri olduğunu göstermiştir. Bu ön çalışmalarda Tris-Asetat-Fosfat (TAP) besiyeri kullanılmış ve 10 kata kadar yapılan bor konsantrasyonu artışında mikroalgin optimum büyüme hızının değişmediği ancak nötral lipit içeriklerinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir.

2.1. Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Biyodizel

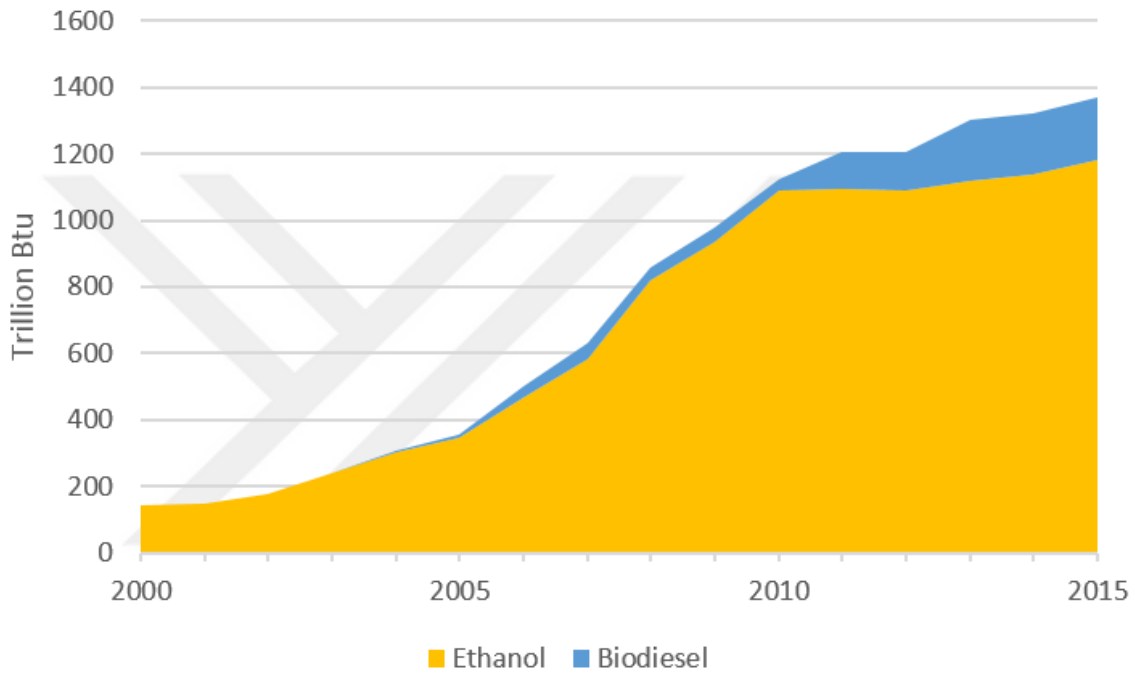
Günümüzde enerji ihtiyacının %70'i petrol bazlı kimyasal ürünlerden giderilse de, zaman içinde yeraltından çıkan petrol miktarında azalma gerçekleşmekte, petrol çıkarmanın maliyeti artmakta ve petrol fiyatlarının günden güne artmasına yol açmaktadır (Gouveia, L., A. Oliveira A. 2009.) Aşağıdaki tablodan ülkemizin petrol üretimi ile tüketimi arasındaki fark açıkça görülebilir.

Yıl	Üretim	İthalat	İhracat	Tüketim	Üretim Artış Oranı	Tüketim Artış Oranı
2008	198.418	789	1.122	198.085	3,6%	4,3%
2009	194.813	812	1.546	194.079	-1,8%	-2%
2010	211.208	1.144	1.918	210.434	8,4%	8,4%
2011	229.315	4.556	3.645	230.306	8,6%	9,4%
2012	239.417	5.826	2.954	242.370	4,4%	5,2%
2013	240.154	7.429	1.227	246.357	0,3%	1,6%
2014	251.963	7.953	2.696	257.220	4,9%	4,4%
2015	261.783	7.153	3.194	265.724	3,9%	3,3%
2016	273.387	6.400	1.442	278.345	4,4%	4,7%

Kaynak: Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Dünya ve Türkiye Enerji ve Tabii Kaynaklar Görünümü 2017, s.13.

Tablo 2. 2008-2016 yılları arası Türkiye'nin ürettiği ve tükettiği petrol miktarı.

Maliyetinin yanı sıra petrol stratejik bir ürün olup, enerjide dışa bağımlılığı bulunmayan devletler daha güçlü bir konuma yükselmektedir. Buna ilaveten günümüzde petrol ve türev yakıtlar kullanılmasının zararları da bilinmektedir. Araçlardan çıkan yakıtın yanmasıyla oluşan gazların hava kirliliği sorununa önemli ölçüde katkıda bulunduğu bilinen bir gerçektir (Kim, J. 2004). Özellikle büyük şehirlerde yaşayan insanların bu sorundan ciddi şekilde etkilendiği ve astım benzeri sorunlar ile oto-immün hastalıkları geliştirmelerinin hızla arttığı gözlenmektedir (Sheppard, L. 1999).

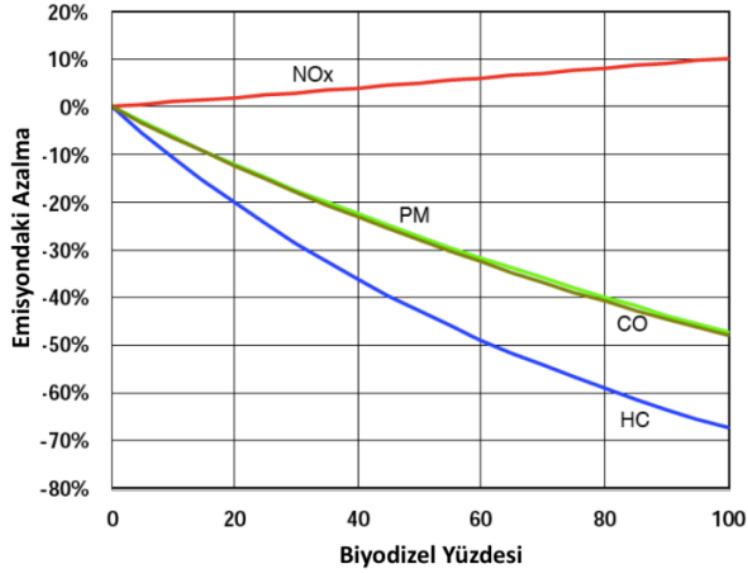


Grafik 1. Dünya genelindeki petrol alternatifi kimyasalların üretimi (biyodizel ve etanol). Biyodizel üretimi özellikle son yıllarda gelişmeye başlamıştır (mavi renkli kısım).

Bu durum dünya genelinde alternatif bir yakıt üretimi konusunu gündeme getirmiştir. Mısır ve ayçiçeğinden biyodizel, rüzgar tribünleri, güneş enerjisi üzerine çalışmalar uzun süredir devam etmektedir. Özellikle mısır gibi bitkiler ile alglerden biyodizel üretimi önemli bir yer tutmaktadır.

Biyodizel, dizel motorlar için kullanabilen bitkisel ve hayvansal yağlar gibi kaynaklardan üretilen geleneksel yakıtlara alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Avrupa Birliği'nin direktifi ile 2005 yılı sonunda fosil yakıtlara %2 oranında biyoyakıt eklenmesi bir zorunluluk haline almıştır. Biyodizel toksik olmayan, doğada kolay bozulabilen, çevre dostu bir yakıt türü olması nedeniyle her geçen gün daha da rağbet görmektedir. Biyodizel üretiminin temel yöntemini transesterifikasyon reaksiyonu oluşturur. Bu reaksiyon sırasında serbest yağ asit seviyesi, alkolün kimyasal yapısı, katalizör tipi, reaksiyon sıcaklığı ile reaksiyon süresi biyodizel üretimini etkileyen önemli parametreler olarak karşımıza çıkar.

Biyodizel, petrol gibi çevre kirliliğine yol açmamaktadır. Suya bırakıldığında biyodizelin 28 günde neredeyse tamamı (%95'i), motorinin ise yarıdan azı (%40'ı) bozunur. Aşağıdaki grafikten normal dizel yerine biyodizel kullanıldığında kimi maddelerde oluşacak emisyon değişikliği gösterilmektedir.

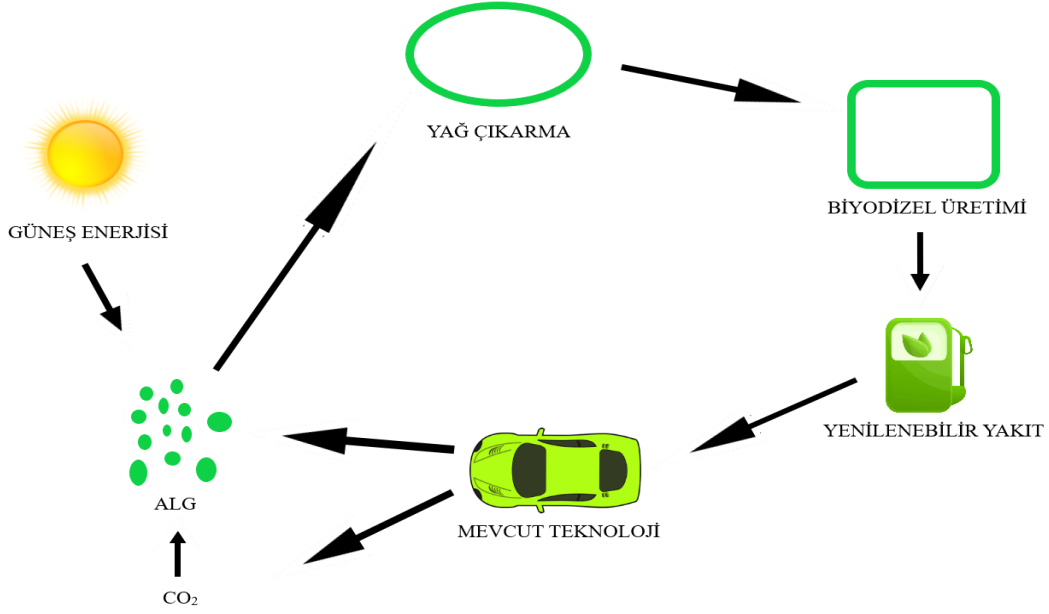


Grafik 2. Petrol yerine biyodizel kullanıldığında; havadaki kirli gazların emisyon değişimi (U.S. EPA 2002)

Geçtiğimiz yıllarda biyoetanol üretimine daha çok ağırlık verilmiştir. Fakat son yıllarda biyoteknolojideki ilerlemeler ile alglerin yağ potansiyelinin keşfi gibi gelişmeler mikroalg kullanımını yaygınlaştırmıştır.

2.2.Mikroalglerden Biyodizel Üretimi

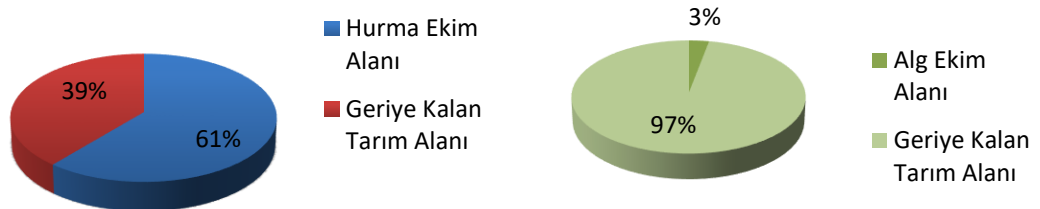
Işığın, suyun, minerallerin varlığı tıpkı diğer fotosentetik organizmalar gibi mikroalglerin de büyümesi ve gelişmesi için ihtiyaç duydukları kaynaklardır. Mikroalgler de diğer fotosentetik organizmalara benzer şekillerde değişen oranlarda karbonhidrat, protein ve lipit içeriğine sahiptir. Alglerin ürettikleri doğal yağ formu biyodizel üretimi için uygun yapıdadır. Karasal bitkilerle kıyaslandığında mikroalgler çok daha hızlı büyümeleriyle göze çarparlar. Genellikle 24 saatten kısa bir sürede sayılarını iki katına çıkarma kapasitesine sahiptirler. Bazı algler ise büyüme evrelerinin en üst noktalarına her 3.5 saatte bir bölünerek ulaşır. Mikroalglerdeki yağ miktarı %20 ila %50 arasında olup, %80'e kadar çıkabilmektedir. Alglerden elde edilecek biyoyakıtlar sayesinde karbondioksit salınımı önemli ölçüde azaltılabilir. Bu sebeple de mikroalgler global çerçevede yakıt talebini karşılamada en güçlü kaynak olarak görülmektedir.



Şekil 4. Mikroalglerden biyodizel üretiminin şematik gösterimi

Biyodizel üretiminde kullanılan algler genellikle tek hücreli yeşil alglerdir. Bu tür algler fotosentetik canlılar olup, yüksek büyüme oranı ve yüksek popülasyon yoğunluğuna sahiptir. Bu özellikleri bu canlıları biyodizel üretimi konusunda önemli bir kaynak yapmaktadır (Chisti, 2007). 2010 yılında Donald Danforth Bitki Bilimleri Enstitüsü'nün kendi web sitesinde yaptığı açıklamaya göre; Enstitü alg bazlı biyodizel üretimi için Birleşik Devletler Enerji Departmanından 44 milyon dolar bütçe almıştır. Özel şirketler de son yıllarda alglerden biyoyakıt üretimi konusuna daha çok önem vermeye başlamışlardır. Amerika merkezli Greenfuel Technology Corporation bu konu için 13.9 milyar dolar bütçe ayırmıştır.

Uygun çalışmaların ardından mikrolaglerin biyodizel üretiminde petrole iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Amerika'da yapılan bir araştırma ülkenin petrol ihtiyacının tamamının alg bazlı biyodizelle karşılanması durumunda bu üretim için yalnızca 5.4 milyon hektar alan gerektiğini ortaya koymuştur.



Şekil 5. Yağ içeren bitkilerin (a) ve alglerin (b) petrolün yerine tamamen geçmesi durumunda ekilmesi gereken tarım alanlarının dağılımı

2.3.Ülkemizde Biyodizel Üretiminde Durum

Bir tarım ülkesi olarak Türkiye, biyodizel üretimi için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Biyodizel her çeşit bitkisel, hayvansal ve kullanılmış yağlardan üretilebilmektedir. Ülkemizde iklime uygun çeşitli yağ bitkilerinden biyodizel üretilebilmektedir. Ancak karasal ürünlerin dönemsel olarak büyümeleri ve sahip oldukları yağ miktarlarının genellikle %20 ile %50 arasında bulunması, Türkiye’de de alg bazlı biyodizel üretimine öncelik verilmesi gerektiğini göstermektedir. Ülkemizde biyodizel üretimi bitkisel kaynaklardan yağ elde edilmesiyle başlamış ve günümüzde çok büyük bir değişikliğe uğramamıştır.

Her ne kadar konvansiyonel yöntemlere göre daha avantajlı olsa da mikroalglerden biyodizel üretimi yeterli seviyede değildir. Bunun en büyük sebebi olarak petrol ile mücadele edememesini verebiliriz. Bu çalışma kapsamında bor kullanımının alglerden biyodizel üretimini nasıl daha ekonomik hale getirebileceği üzerine yoğunlaşmıştır. Eğer maliyetlerle ilgili bir takım bilgiler vermek gerekirse, ABD’de dizelin litre fiyatı 2.564 dolardır. Şuanki teknolojiyle alglerden 1 litre biyodizel üretilmesi ise 2.10 dolar civarında bir paraya malolacaktır. Bu miktarın biyodizel üretiminde yapılacak optimizasyonlarla (alglerin bölünme hızının artırılması, yağ içeriği zengin algler üretilmesi vb.) 0.48 dolar gibi bir değere düşmesi beklenmektedir (Coyle, W. 2007; Chisti, Y. 2007).

KAYNAK	YAĞ İÇERİKLERİ (Litre/Dönüm)
Mısır	172
Soya	446
Kanola	1190
Jatropha	1892
Hindistan Cevizi	2689
Palmiye	5950
Mikroalg (%30 Yağ İçerikli)	58700
Mikroalg (%70 Yağ İçerikli)	136900

Tablo 3: Algler ve diğer biyodizel kaynaklarının karşılaştırılması

3. MATERYAL VE METOT

3.1.Kültür şartları ve deneysel yaklaşım

Bu çalışmada kullanılan *Chlorella vulgaris* sp. TMCC6 (Sekans# KP259884.1) türü Nemrut kalderasından izole edilmiş olup İstanbul Medeniyet Üniversitesi mikroalg kültür koleksiyonunda muhafaza edilmektedir. Mikroalgler 250 mL hacimli cam erlenlerde 100 mL kültür ortamında 120 rpm devir hızına ayarlanmış sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatörde, 25±2 °C sıcaklıkta 100 µmol foton m⁻²s⁻¹ sürekli ışık şiddeti altında kültüre alınmıştır.

Deneysel çalışmalar için *Chlorella vulgaris*; içerisinde 0,882mM NaNO₃, 0,3mM MgSO₄7H₂O, 0,175mM K₂HPO₄, 0,25mM CaCl₂2H₂O, 0,0312mM sitrik asit, 0,03mM Ferrik amonyum sitrat, 2,8µM Na₂EDTA2H₂O, 0,189mM Na₂CO₃, 1µM H₃BO₃, 0,158µM MnCl₂4H₂O, 1µM ZnSO₄7H₂O, 0,01µM CuSO₄5H₂O, 0,01µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄4H₂O, 0,3µM Thiamine HCl, 2nM Biotin, 0,37nM Cyanocobalamin içeren BG-11 ortamında (Rippka ve Herdman, 1993) kültüre alınmıştır.

Büyütme ortamı olarak kullanılan BG-11 ortamındaki H₃BO₃ yoğunluğu 1µM iken, ortam H₃BO₃ yoğunluğu 184 kat dahi artırıldığında büyümede önemli bir değişim görülmemiştir. 184 µM H₃BO₃ yoğunluğu, TAP ortamı ve BBM temel üretim ortamlarında kullanılan H₃BO₃ yoğunluğudur. Bu sebeple büyütme ortamı olarak BG-11 kullanmamıza rağmen kullanılan B element yoğunluğu 184 µM olarak belirlenmiş, artan konsantrasyonlarda borlu bileşik konsantrasyonları da bu değere göre hesaplanarak uygulanmıştır. Bu değerlendirmelere göre çalışma için kullanılan siyanobakteri ve mikroalgler uygulanan borlu bileşiklerin konsantrasyonları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekli ile uygulanmıştır (Tablo 4).

Borlu Bileşik yoğunlukları	Mikroalgler uygulanan
1x H ₃ BO ₃	0.184 mM
10x H ₃ BO ₃	1.84 mM
25x H ₃ BO ₃	4.6 mM
50x H ₃ BO ₃	9.2 mM
25x CaB ₃ O ₄ (OH) ₃ H ₂ O (Kolemanit)	1.54mM
50x CaB ₃ O ₄ (OH) ₃ H ₂ O (Kolemanit)	3.08 mM
25x NaCaB ₅ O ₉ 8H ₂ O (Uleksit)	0.93 mM
50x NaCaB ₅ O ₉ 8H ₂ O (Uleksit)	1.85 mM

Tablo 4. İlk büyüme analizi sonrasında *C.vulgaris* 'e uygulanan borlu bileşik konsantrasyonları.

3.2. Toplam lipit tayini

Toplam lipit miktarları Bligh ve Dyer (1959)'a göre tespit edilmiştir. 500 mg mikroalg örneği 10 ml metanol içerisinde vortekslenerek, 5 ml kloroform ve 1 ml ddH₂O ilave edilip 1 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra santrifüj edildi (5000 rpm, 15dk) ve üst kısımda bulunan metanol/su tabakası uzaklaştırıldı. Alt kısımdaki metanol/kloroform tabakası ise temiz bir tüpe aktarıldı. Elde edilen lipit sıvısı Whatmann no 1 filtre kağıdı kullanılarak filtrelendi ve rotary evaporator kullanılarak (50°C sıcaklık ve düşük basınç altında) metanol ve kloroformun buharlaştırılması sağlandı. Tüpler tekrar tartılarak lipit miktarı ağırlıksal olarak hesaplandı. Örnekte bulunan lipit miktarının yüzde olarak hesaplanmasında ise aşağıdaki formül kullanıldı

$$\text{Lipit yüzdesi} = (\text{ekstrakt edilen lipit miktarı (gr)} / \text{mikroalg örnek ağırlığı (g)}) \times 100$$

3.3. Sitoplazmik Lipit Cisimlerinin Floresans Görüntülenmesi

Mikroalglerde oluşan sitoplazmik lipit cisimlerinin görüntülenmesi amacıyla mikroalgler Elsey vd. (2007) tarafından tarif edildiği şekilde Nil kırmızısı ile boyanmıştır. Buna göre, 680nm dalga boyunda yapılan ölçüme göre alınarak absorbans değerleri 0,2-0,3 aralığında seyreltilmiş olan 1 ml hacimde mikroalg örneklerinin içerisine 5µg/ml Nil kırmızısı (Invitrogen) ilave edilmiş ve mutlak karanlıkta 15dk boyunca oda şartlarında hafif şekilde çalkalanmak suretiyle karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklerin floresans görüntüleri TXRED (560nm ex-630nm em) filtresi ile floresans mikroskop sistemi (Zeiss AXIO Imager M2) kullanılarak elde edilmiştir.

3.4. FT-IR analizi ile Triaçilgliserollerin miktarsal tayini

Mikroalglerin ürettikleri triaçilgliserollerin (TAG) miktarsal tayinleri Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile nisbi olarak belirlenmiştir. Ölçüm için 50mg liyofilize edilmiş mikroalg örnekleri pens yardımıyla doğrudan ATR modülü ile desteklenmiş FT-IR (PerkinElmer-L160000A, USA) cihazının örnek modülüne yerleştirilmiştir. Numune alıcısının kızılötesi spektrumu, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında 128 tarama ile kaydedilmiştir. FTIR analizinde çevresel koşullardan fazla etkilenmeyen absorpsiyon bandı olan Amid 1 (1652 cm⁻¹) değeri doğrulama değeri olarak seçilmiştir. Böylece, trigliseritlerin ester grubunun (C=O) titreşimi (1744 cm⁻¹) ile verdiği absorpsiyon değerinin Amid 1 değerlerine oranlanarak mikroalglerdeki triaçilgliserol miktarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Mairet vd., 2011). Daha sonra farklı konsantrasyonlarda

Borik asit, Uleksit ve Kolemanit uygulanan mikroalglerden elde edilen TAG/Amid 1 oranları, kontrol grubu ile elde edilen TAG/Amid 1 oranına bölünerek mikroalglerin TAG içeriklerinde meydana gelen nisbi değişim “-n katı değişim” olarak grafiklendirilmiştir.

3.5. Mikroalgal lipitlerin transesterifikasyonu ve yağ asidi metil ester (YAME) analizi

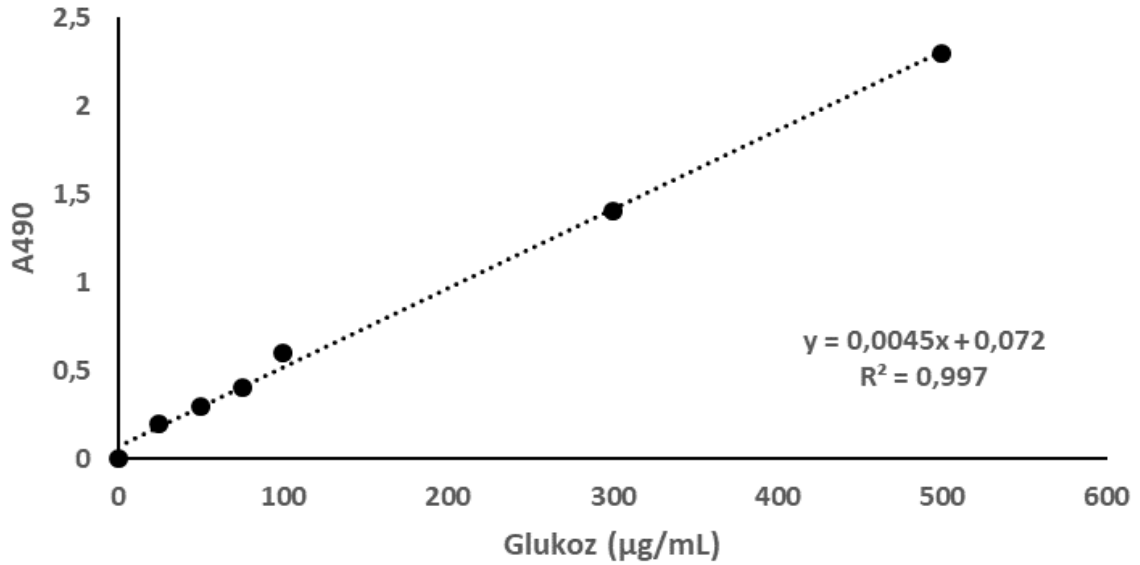
Siyanobakteri ve mikroalglerin yağ asidi profillerinde meydana gelen değişimin belirlenmesi amacıyla yağ asitlerinin ekstraksiyonu, metilleştirilmesi ve analizi için Xu vd. (2010), tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu amaçla, liyofilize edilmiş 100mg mikroalg ya da siyanobakteri biyomas örnekleri kullanılmıştır.

- a.** İçerisinde 100mg biyomas bulunan vida kapaklı tüplere 300 µl ekstraksiyon solüsyonu (metanol içerisinde hazırlanmış %2’lik H₂SO₄ çözeltisi) ilave edilmiştir.
- b.** İnternal standart olarak, kör numune dahil her tüpe 30 µg nonadecanoic acid ilave edilmiştir.
- c.** Örnekler 2 saat boyunca 80 °C sıcaklıkta termomikser yardımı ile 750 rpm devir hızında sürekli çalkalanarak hücrelerin parçalanması ve lipitlerin açığa çıkması sağlanmıştır
- d.** İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dk oda şartlarında bekletilmiş ve sıcaklığın düşmesi sağlanmıştır
- e.** Tüplerin içerisine 300 µl %0,9 konsantrasyonda NaCl ve 300 µl hekzan ilave edilmiştir.
- f.** Böylece metanolde bulunan lipitlerin hekzan fazına geçmesi için örnekler 30 sn boyunca vortekslenmiş ve 10 dk boyunca da nutating mikser üzerinde çalkalanmıştır
- g.** Daha sonra örnekler 3 dk boyunca 20 °C sıcaklıkta 3000 g devir hızında santrifüjlenmiştir
- h.** Son olarak üstteki hekzan tabakasından 150 µl örnek alınarak GC-MS tüplerine aktarılmıştır
- i.** Tüplere aktarılan örnekler analiz için Agilent marka GC-MS cihazına yerleştirilmiştir. Ölçüm için cihaza 130°C başlangıç sıcaklık, 240°C ye kadar her 5°C de 5 dk beklenmesi talimatı işlenmiştir.
- j.** Standart olarak 37 komponentli YAME (Supelco FAME-37) karışımı kullanılmıştır.

- k. Ölçüm sonucu elde edilen pikler analiz edilmiş, alan hesaplaması yapılarak belirlenen metil esterlerin yüzdeleri oransal olarak sunulmuştur.

3.6. Toplam nişasta tayini

Sıvı kültürden toplanarak santrifüjlenmiş ve 80°C de 48 saat kurutulmuş olan mikroalg örneklerinden 50 mg tartılarak alınmış nişasta ekstraksiyonu için örnekler üzerine 10 kat hacimde etanol ilave edilerek 90°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde, inkübasyon süreleri değişmekle birlikte örnekler tümüyle homojenize olup, mikroalg/etanol çözeltisi tümüyle renksiz bir hal alıncaya kadar inkübe edilmiştir (süre örneğe göre 10 dk ile 70 dk arasında değişmiştir). İnkübasyondan sonra eşit hacimde %35'lik perklorik asit ilave edilmiş, 5 dk vorteksledikten sonra 2 ml H₂SO₄ ilave edilerek 3 dk daha karıştırılan örnekler süzülerek 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen değerler glukoz standartları kullanılarak % nişasta % kuru ağırlık olarak sunulmuştur (Şekil 6) (Rose vd., 1991).

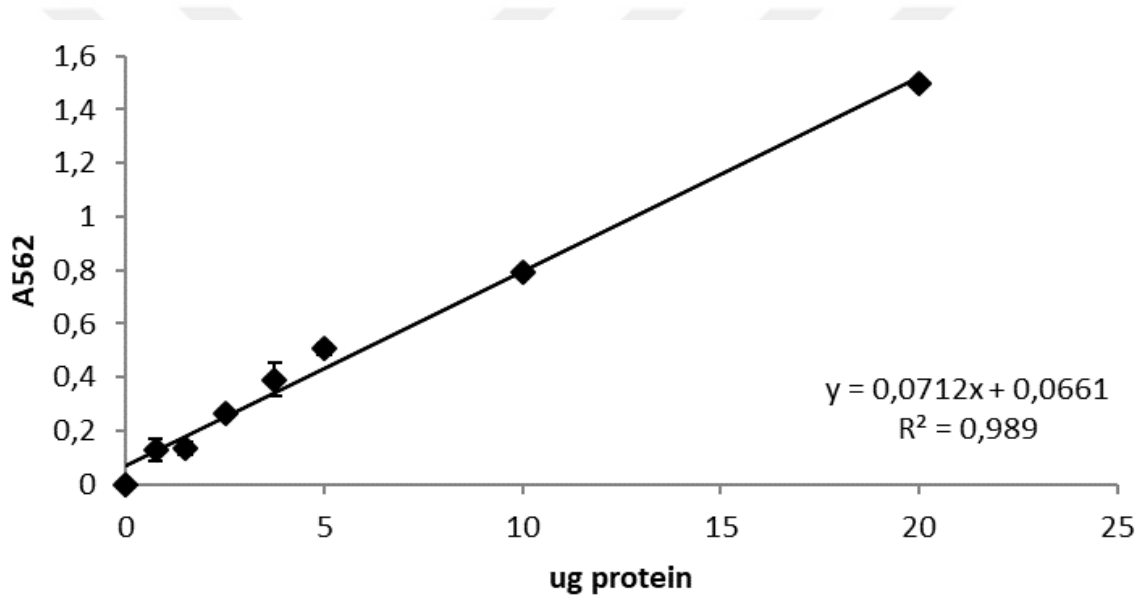


Şekil 6. Toplam karbohidrat tayini için kullanılmış olan standart grafik.

3.7. Toplam protein tayini

Bu amaçla liyofilize edilmiş mikroalg örnekleri liziz tamponu (50 mM Tris-HCl pH 8,0, %2 SDS, 10 mM EDTA, ve protease inhibitor mix) içerisinde yeniden süspanse edilmiş, 1 dk boyunca sonikasyona maruz bırakılmış (%60 güç 7W/pin) ve 4°C sıcaklıkta 13000rpm devir hızında santrifüjlenmiştir. Örneklerdeki protein miktarı Bichinoninic asit (BCA) metodu kullanılarak belirlenmiştir (Smith vd., 1985). Çalışma solüsyonu karışımı olarak 1 kat %4 bakır sülfat / 50 kat Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma) oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

Standart için 0,5 mg/ml Bovin Serum Albumin çözeltisinden kuyucuklara sırasıyla -0, -1,5, -3, -5, -7,5 ve -10 ul ilave edilerek son hacim saf suyla 10 ul'ye tamamlanmıştır. Mikroalg ekstraktlarından 5ul alınarak 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarıldı ve son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan çalışma solüsyonundan 190 µl alınarak örnekler ve standartların üzerine ilave edilmiştir. İçerisinde standart ve örnekler bulunan 96 kuyucuklu mikropalaka 60°C de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve meydana gelen renk değişimi 562 nm de okunmuştur. Elde edilen değerler, Bovin serum albumin ile hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkılarak (Şekil 7) mikroalg örneklerinin protein değerleri mg protein/gr örnek olacak şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 7. Protein tayini için hazırlanmış standart grafik

3.8. Toplam Klorofil ve Toplam Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini

Mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil ve karotenoid miktarı Jeffrey ve Humphrey (1975)'den modifiye edilerek spektrofotometrik metodla belirlenmiştir. Tayin için 100mg mikroalg örneği üzerine 500 µl %90'lık aseton ilave edilerek 15 dk boyunca karıştırılmış ve 10000 xg devir hızında 5 dk boyunca 4°C'de santrifüj edilmiş, 250µl süpernatant 96 kuyucuklu plağa yüklenmiştir. Süpernatant absorbansları sırasıyla 750, 664, 647, 470 ve 630 nm'dalgaboylarında %90'lık aseton körüne karşı okunmuştur. Toplam klorofil ve karotenoid miktarları Jeffrey ve Humphrey (1975) tarafından bildirilen denklemler kullanılarak hesaplanmış olup toplam klorofil sonuçları klorofil a ve b'nin toplamı olarak sunulmuştur.

$$\text{Chla} = (11,85(E_{664}-E_{750})-1,54(E_{647}-E_{750})-0,08(E_{630}-E_{750})) \times \text{dilüsyon oranı}$$

$$\text{Chlb} = (-5,43(E_{664}-E_{750})+21,03(E_{647}-E_{750})-2,66(E_{630}-E_{750})) \times \text{dilüsyon oranı}$$

$$\text{Toplam karotenoid} = (1000E_{470} - (1,86 \times \text{Chla}) - (74,08 \times \text{Chlb})) / 206$$

Synechocystis sp. siyanobakterisinin içerdiği klorofil-a yoğunluğu Zavřel vd., (2015)'e göre belirlenmiştir. Bu amaçla yaklaşık 50mg siyanobakteri örneği 1,5mL metanol (%100, önceden 4°C'de soğutulmuş) içerisinde çözülmüş, 1dk boyunca vortekslenmiş ve 20dk boyunca karanlık ortamda oda şartlarında rotator üzerine yerleştirilerek alt-üst edilmiştir. Daha sonra örnekler 10000cg de 5dk boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatantın absorbansı 664 ve 720nm dalga boylarında okunarak değerler kaydedilmiştir. Siyanobakterideki Klorofil-a yoğunluğu aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Chla [mg/L]} = 12,9447 (E_{665} - E_{720})$$

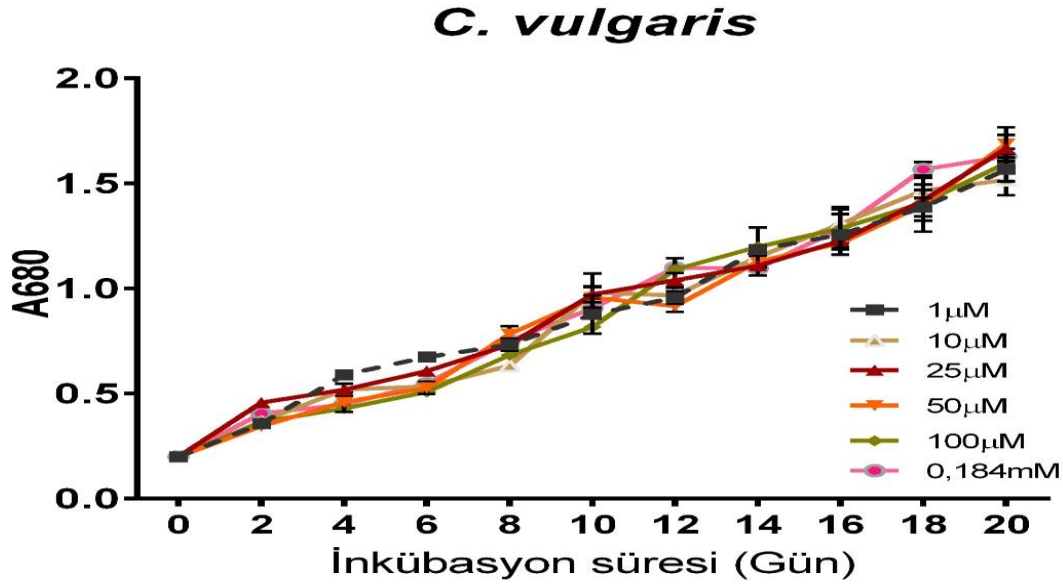
3.9. İstatistik hesaplamalar

Grafiklerde belirtilen değerler en az 3 farklı kültürden iki farklı zamanda alınmış verilerin ortalamasıdır ($n \geq 3$). Uygulamalı gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Student *t* test (2;2) analizi ile belirlenmiştir ($P < 0,05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Uygulanacak Borik asit yoğunluğunun belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan *C.vulgaris* TMCC6 mikroalginin kültüre alındığı BG-11 büyütme ortamında 1 µM yoğunlukta uygulanan H₃BO₃, yine yeşil mikroalglerin kültüre alındığı BBM ve TAP ortamlarında 0.184 mM yoğunlukta uygulanmaktadır. Bu sebeple, öncelikli olarak *C.vulgaris*, içerisinde 1,10, 25, 50, 100, 184 µM yoğunlukta H₃BO₃ bulunan BG-11 çözeltisi içerisinde 20 gün boyunca kültüre alınmış ve büyümeleri takip edilmiştir. Ölçümler, ortam H₃BO₃ yoğunluğunun 0.184mM'a kadar çıkarıldığında bu mikroalgin büyümesinde önemli bir değişim olmadığını göstermiştir (Şekil 8).



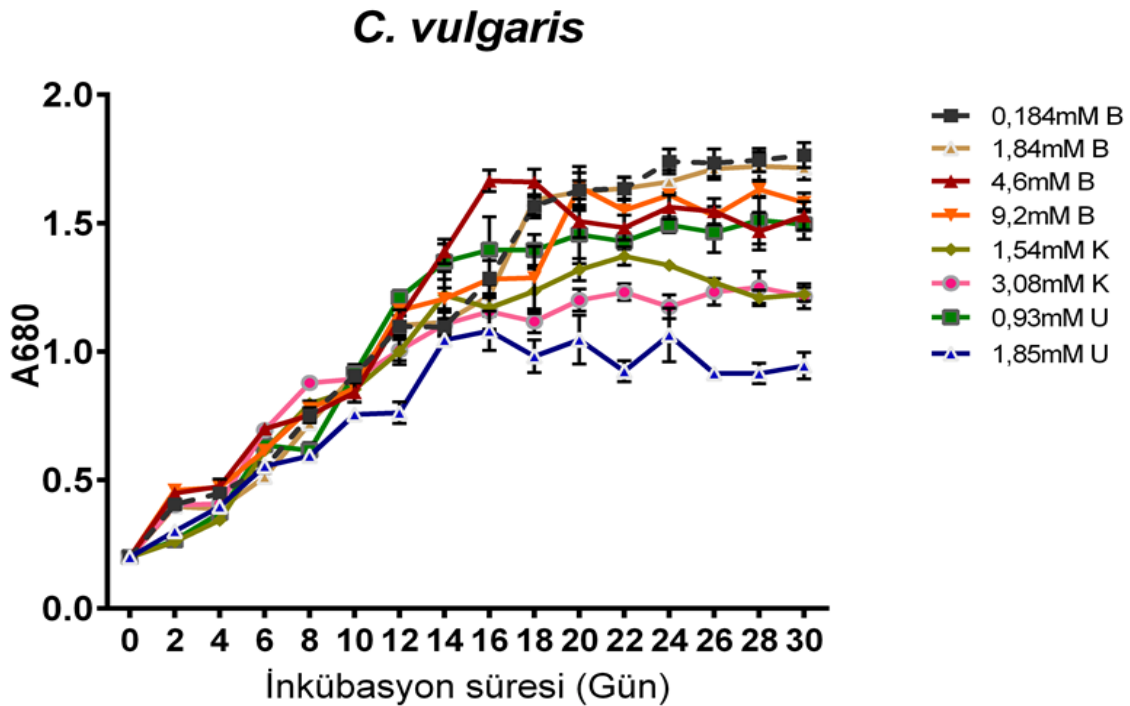
Şekil 8. *C.vulgaris*'in büyümesi üzerine artan H₃BO₃ yoğunluğunun etkileri.

Ortam H₃BO₃ yoğunluğu 1µM dan 0.184mM'a çıkarıldığında büyümede önemli bir değişim görülmediğinden dolayı yeşil mikroalglerin kültüre alındığı diğer büyütme ortamlarında olduğu gibi BG-11 büyüme ortamında da 0.184mM H₃BO₃ yoğunluğu referans H₃BO₃ konsantrasyonu olarak kullanılmış, Uleksit ve kolemanit bileşiklerinin uygulama konsantrasyonları da 0,184mM H₃BO₃ 'de bulunan Bor elementi yoğunluğuna göre hesaplanarak uygulanmıştır. Bu durumda yapılan hesaplama sonucunda 0,184mM H₃BO₃ kullanıldığında çözeltideki Bor element miktarı 2mg/L olarak hesaplanmış, Kolemanit (CaB₃O₄(OH)₃H₂O) ve Uleksit (NaCaB₅O₉8H₂O) konsantrasyonları da içerdikleri Bor element miktarına göre belirlenmiş ve bileşikteki Bor elementi yoğunluğuna göre 25x ve 50x konsantrasyonda uygulanmıştır. Böylece proje çalışması için oluşturulan deney gruplarını gösteren tablo aşağıda sunulmuştur (Tablo 5).

Borlu Bileşik yoğunlukları	Mikroalgler uygulanan
1x H ₃ BO ₃	0,184 mM
10x H ₃ BO ₃	1,84 mM
25x H ₃ BO ₃	4,6 mM
50x H ₃ BO ₃	9,2 mM
25x CaB ₃ O ₄ (OH) ₃ H ₂ O (Kolemanit)	1,54mM
50x CaB ₃ O ₄ (OH) ₃ H ₂ O (Kolemanit)	3,08 mM
25x NaCaB ₅ O ₉ 8H ₂ O (Uleksit)	0,93 mM
50x NaCaB ₅ O ₉ 8H ₂ O (Uleksit)	1,85 mM

Tablo 5. İlk büyüme analizi sonrasında *C.vulgaris*'e uygulanan borlu bileşik konsantrasyonları.

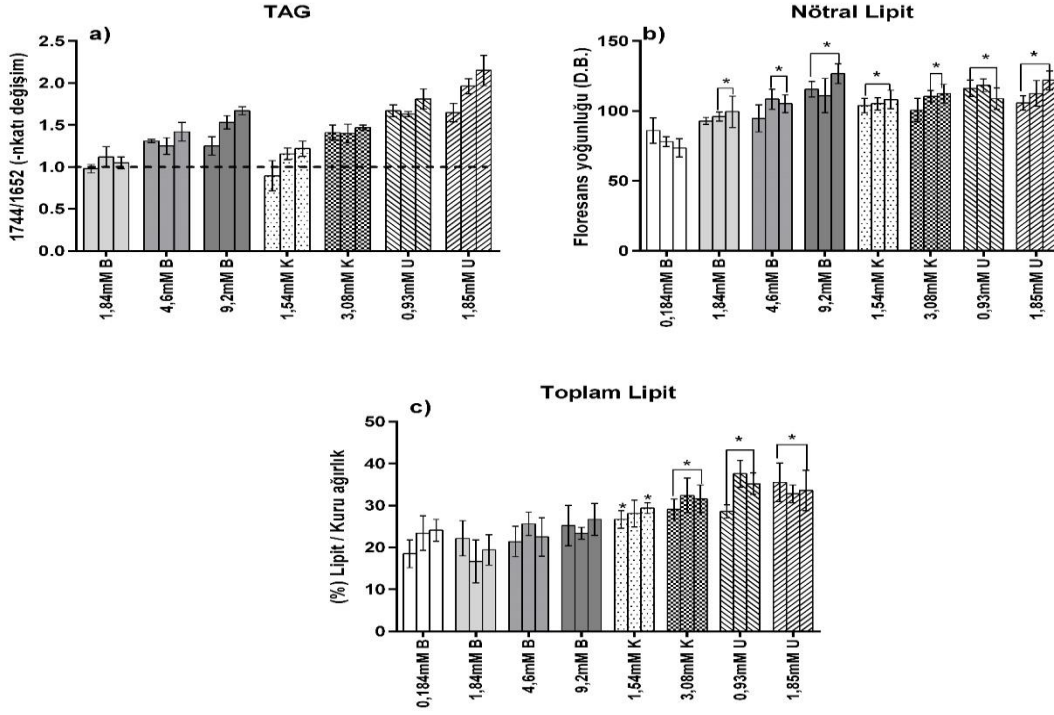
Chlorella vulgaris mikroalginin büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin etkilerini değerlendirmek amacıyla mikroalgler 30 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol ortamında kültüre alınan mikroalgler inkübasyonun 18. gününden itibaren lineer büyüme evresine girmişlerdir. Bu mikroalgde 30 günlük inkübasyon süresinde H₃BO₃ uygulaması dikkate değer bir değişikliğe sebep olmamıştır. Diğer taraftan artan konsantrasyonlarda kolemanit ve uleksit uygulanan mikroalglerin büyümelerini inkübasyonun 18.gününden itibaren önemli oranda baskılamıştır. Öte yandan 50x konsantrasyonda Uleksit (1,85mM) ve Kolemanit (3,08mM) uygulanan mikroalglerin eksponensiyal büyüme evreleri kısalmış, bu gruplar inkübasyonun 14.gününden itibaren lineer büyüme evresine girmişlerdir. Sırasıyla 1,54mM ve 3,08mM konsantrasyonda Kolemanit uygulanan *C.vulgaris* mikroalginin büyümesi inkübasyonun 18. gününde %21,1 ve %28,6 oranında baskılanmışken 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda büyümedeki baskılanma sırasıyla %30,7 ve %31,2 düzeylerinde kaydedilmiştir. Diğer taraftan Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in büyümesi artan Uleksit yoğunluğuna da net cevaplar sergilemiştir. Büyüme ortamına 0,93mM konsantrasyonda Uleksit uygulandığında büyümedeki baskılanma 22.günden itibaren %12-15 düzeylerinde iken 1,85mM konsantrasyonda Uleksit uygulaması büyümenin 16. gününde yaklaşık %16 oranında baskılanmış ve bu noktadan sonra artan büyümedeki baskılanma 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda yaklaşık %46,5 düzeylerinde belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. *C. vulgaris*'in büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri.

4.2. *C.vulgaris*'in TAG, nötral lipit ve toplam lipit içeriğindeki değişimler

Chlorella vulgaris'in TAG, nötral lipit ve toplam lipit içerikleri ortamdaki borlu bileşiklerin çeşitleri ve konsantrasyonlarına cevapta artma eğilimi sergilemiştir (Şekil 10). Bu mikroalgın büyüme ortamına 0,184mM olarak uygulanan H_3BO_3 yoğunluğu 10 kat artırıldığında TAG içeriğinde önemli bir değişim kaydedilmemiş olsa da H_3BO_3 yoğunluğu 25 ve 50 kat artırıldığında TAG içeriğinde dikkate değer artışlar belirlenmiştir (Şekil 10a). Büyütme ortamında 4,6mM H_3BO_3 bulunan *C.vulgaris*'in TAG içeriği kontrol grubuna (0,184mM) kıyasla inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde sırasıyla 1,31, 1,25 ve 1,42 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Büyütme ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu 9,2mM'a çıkarıldığında kontrole kıyasla 8.,-16.,-24., günlerde elde edilen veriler TAG içeriğinin ortalama 1,25-1,67 arasında daha yüksek düzeylerde olduğunu göstermiştir. Kolemanit ve Uleksit uygulamalarının bu mikroalgın TAG içeriği üzerine önemli etkileri olmuştur. Büyütme ortamında 1,54mM Kolemanit uygulanan *C.vulgaris*'in TAG içeriği ancak 24. günde 1,22 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiş olsa da Kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında (3,08mM) inkübasyonun ilk 8 gününde görülen yaklaşık 1,41 katlık artış inkübasyon boyunca korunmuş ve nihayet inkübasyonun 16. ve 24. günlerinde de kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,4 ve 1,47 kat daha yüksek düzeyde TAG içeriği belirlenmiştir. Borlu bileşikler içerisinde Uleksit uygulaması hem borik asit ve hem de kolemanit uygulamalarına kıyasla *C.vulgaris*'de TAG üretimi açısından daha etkili olmuştur. Büyütme ortamına 0,93mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in TAG içeriği logaritmik büyüme evresini yansıtan 8. ve 16. günlerde sırasıyla 1,67 ve 1,63 kat daha yüksek düzeyde belirlenmişken geç logaritmik büyüme evresini yansıtan 24. günde de TAG içeriği kontrol grubuna kıyasla 1,81 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Ortam Uleksit yoğunluğu 2 kat artırıldığında (1,85mM) dahi TAG içerikleri inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 1,65, 1,96 ve 2,15 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiştir (Şekil 10a,b,c).



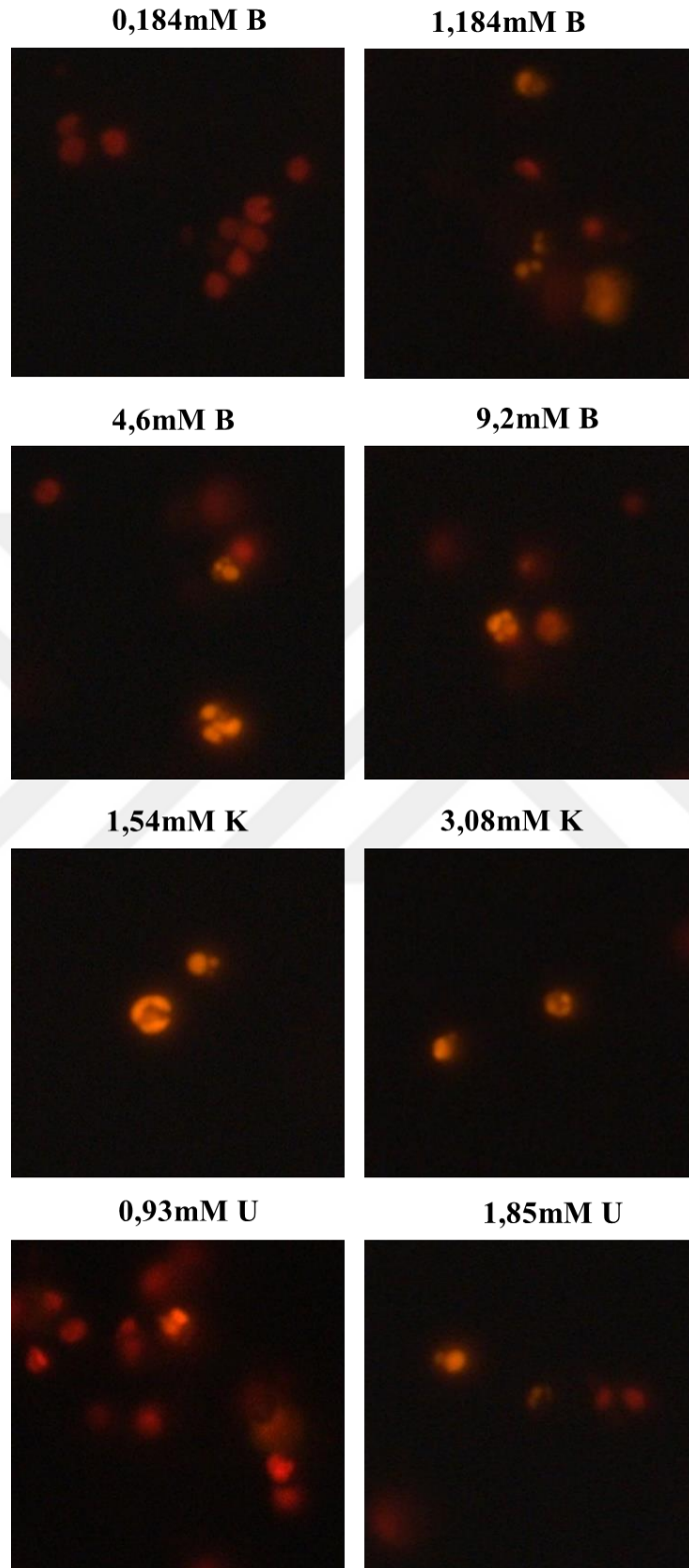
Şekil 10. *C.vulgaris*'in TAG (a), Nötral lipit (b) ve Toplam lipit (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8., 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler en az %95 güven aralığında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

C.vulgaris'in büyüme ortamına uygulanan 0,184mM H_3BO_3 yoğunluğu 10 ve 25 kat artırıldığında bu mikroalgin nötral lipit içeriğinde inkübasyonun ilk 8 gününde önemli bir değişim kaydedilmemiş olsa da inkübasyonun 16. ve 24. günlerinde görülen yaklaşık %22,9-%38,9 ve %35,1-%42,9 düzeylerindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 10b). Keza bu mikroalgin büyütme ortamına 9,2mM H_3BO_3 uygulandığında inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde kaydedilen sırasıyla yaklaşık %34,4, %42,3 ve %72,1 düzeylerinde artışlar kaydedilmiş, böylece zamana ve bor yoğunluğuna cevapta bu mikroalgin nötral lipit içeriğinde anlamlı artışların olduğu anlaşılmıştır. Diğer taraftan Kolemanit ve Uleksit uygulamaları bu mikroalgin nötral lipit içeriğinde benzer düzeylerde artışlara sebep olmuştur. Sırasıyla 1,54mM Kolemanit ve 0,93mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in nötral lipit içeriği inkübasyonun 8. gününde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %20,7 ve %35,1 düzeylerinde iken bu artışlar inkübasyon süresince çok bozulmamış, inkübasyonun 24. gününde sırasıyla yaklaşık %47,1 ve %47,8 düzeylerinde artışlar kaydedilmiştir. Hem kolemanit ve hem de uleksit konsantrasyonları iki kat artırıldığında da yine *C.vulgaris*'in nötral lipit içeriğinde benzer düzeylerde değişim kaydedilmiştir (Şekil 10b).

C.vulgaris'in içerdiği toplam lipit miktarı, büyüme ortamındaki H₃BO₃ yoğunluğu arttığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim sergilememiştir. Ancak Kolemanit ve Uleksit uygulamaları TAG ve nötral lipit üretiminde olduğu gibi toplam lipit içeriklerinde de ciddi artışlara sebep olmuştur (Şekil 10c). Büyüme ortamına 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit uygulanan *C.vulgaris*'i toplam lipit içeriği inkübasyonun 8. gününde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %44,3 ve 57,3 düzeylerinde daha yüksek olarak belirlenmiş, inkübasyonun 24. gününde de yine kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %22,1 ve 31,1 daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Uleksit uygulaması da benzer sonuçlar vermiştir. Büyüme ortamında 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in toplam lipit içeriği kontrol grubuna kıyasla inkübasyonun 8.; 16.; ve 24. günlerinde sırasıyla %54,6 ve 91,8; 60,6 ve 40,2; ile 46,1 ve 39,5 düzeylerinde daha yüksek olarak belirlenmiştir.



4.3. Sitoplazmik lipit cisimlerinin floresans görüntülenmesi

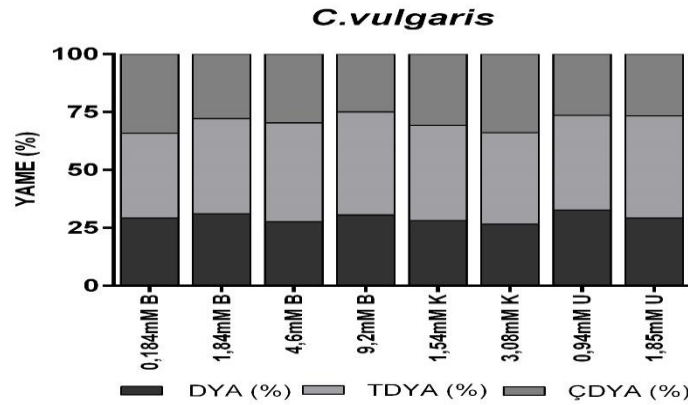


Şekil 11. Logaritmik büyüme evresinde mikroalglerin sitoplazmik lipit cisimlerinin floresans görüntüleri (M.B. 40x10). Mikroalgler inkübasyonun 12. gününde hasat edilmiştir. Açık turuncu renkte görünen noktalar sitoplazmik lipit cisimleridir.

Farklı konsantrasyonlarda Borik asit, Kolemanit ve Uleksit borlu bileşikleri uygulanan türlerin ürettikleri sitoplazmik lipid cisimlerinin görüntülenmesi amacıyla Nil kırmızısı ile boyanan mikroalglerin floresans görüntülenmesi yapılmıştır (Şekil 11). Yukarıdaki resimde de sunulduğu gibi *C.vulgaris*'in artan H_3BO_3 konsantrasyonları ve diğer borlu bileşiklerin uygulanmasına cevapta sitoplazmik lipid cisimi üretiminde artış kaydedilmiştir. Özellikle Kolemanit uygulaması mikroalglerde Uleksit uygulananlara kıyasla nötral lipid üretimini daha belirgin şekilde uyarmıştır. Genel olarak floresans boyama ile gözlemlenen sitoplazmik lipid cisimi üretimindeki değişiklikler spektro(flora)metrik ölçümlerle uyumlu çıkmıştır.

4.4. Mikroalglerin Yağ asidi metil ester (YAME) analizleri

Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik yürütülen çalışmalarda yapılan uygulama sonrasında mikroalgler tarafından üretilen yağ asidi bileşenlerinin oranı önem taşımaktadır. Biyodizelin kalitesini belirleyen ana unsurlar olan setan numarası, iodin numarası, yanma noktası, NOx emisyon değeri, oksidatif durgunluğu ve akışkanlığı gibi değerler temelde biyodizelin içindeki YAME profiline bağlıdır (Saraf ve Thomas, 2007; Francisco vd., 2010). Doymamış yağ asitleri kolay okside olduklarından biyodizelin akışkanlığını etkiler (Saraf ve Thomas, 2007). Bu sebeple biyodizelin doymuş (DYA) ve tekli doymamış yağ asidi (TDYA) içeriği yüksek, çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) içeriği de düşük olmalıdır. Zira Avrupa birliği EN 14214 standartlarına göre biyodizel amaçlı kullanılan yağlardaki DYA ve TDYA oranlarının toplamı %70'den yüksek olmalıdır (European standard EN 14214, 2008). Bu çalışmada artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin logaritmik büyüme evresindeki mikroalglerin ürettikleri lipidlerdeki YAME içerikleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 12).

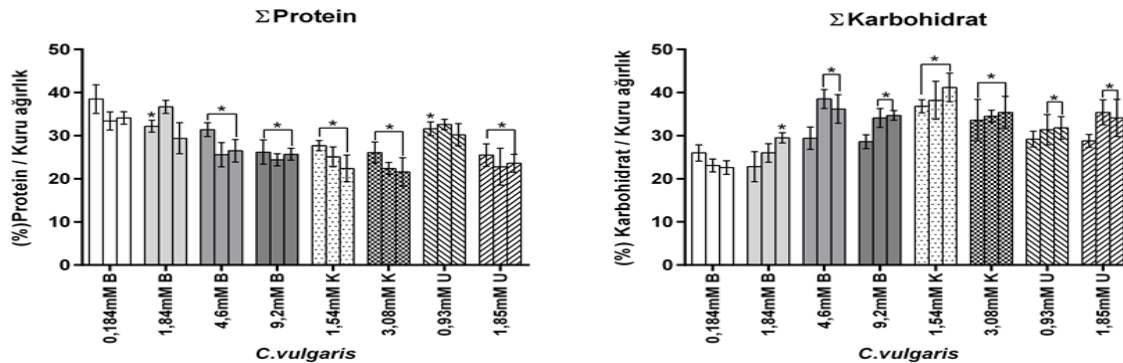


Şekil 12. Artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin logaritmik büyüme evresindeki mikroalglerin ürettikleri lipidlerdeki YAME içerikleri üzerine etkileri.

Büyütme ortamında 0,184mM H₃BO₃ bulunan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriği inkübasyonun logaritmik büyüme evresi olarak belirlenen 16. gününde yaklaşık %34,2 olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Ortam H₃BO₃ yoğunluğu artırıldığında bu mikroalgin ÇDYA içeriğinde dikkate değer azalmalar kaydedilmiştir. Sırasıyla 4,6mM ve 9,2mM H₃BO₃ uygulanan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin %29,7 ve %25'i düzeylerinde belirlenmiştir. Öte yandan Kolemanit uygulanan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin yaklaşık %30,7-%33,9'u düzeylerinde iken Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'te yaklaşık %26,5 düzeylerinde belirlenmiştir. Dolayısıyla bu mikroalge borlu bileşiklerin uygulanması ile üretilen YAME içeriği yine Avrupa standartlarına uygun olduğu değerlendirilmiştir.

4.5.Mikroalglerin toplam protein ve karbohidrat içeriklerinde meydana gelen değişimler

C.vulgaris'in toplam protein içeriği borlu bileşik uygulamasına cevapta düşüş sergilemiştir (Şekil 13). Büyütme ortamındaki H₃BO₃ içeriği 25 ve 50 kat artırıldığında inkübasyonun 8. gününde %18,4 ve %31,9 düzeylerinde düşüş kaydedilmiş, takip eden günlerde de benzer durumlar kaydedilmiş, inkübasyonun 24. gününde kontrol grubuna kıyasla mikroalgin toplam protein içeriği sırasıyla yaklaşık %22,2 ve %24,6 düzeylerinde daha düşük olarak belirlenmiştir. Yine Kolemanit ve Uleksit uygulamaları da bu mikroalgin toplam protein içeriğinde düşüşe sebep olmuştur. Kolemanit uygulaması *C.vulgaris*'in toplam protein içeriğinde yaklaşık olarak %24,8-%36,6 düzeylerinde azalmaya sebep olmuştur. Öte yandan 0,93mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in inkübasyonun 8. gününde sebep olduğu yaklaşık %17,9 oranındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Son olarak 1.85mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in toplam protein içeriği inkübasyonun 8. gününden itibaren yaklaşık olarak %30,8-%33,7 düzeylerinde daha düşük olarak belirlenmiştir.

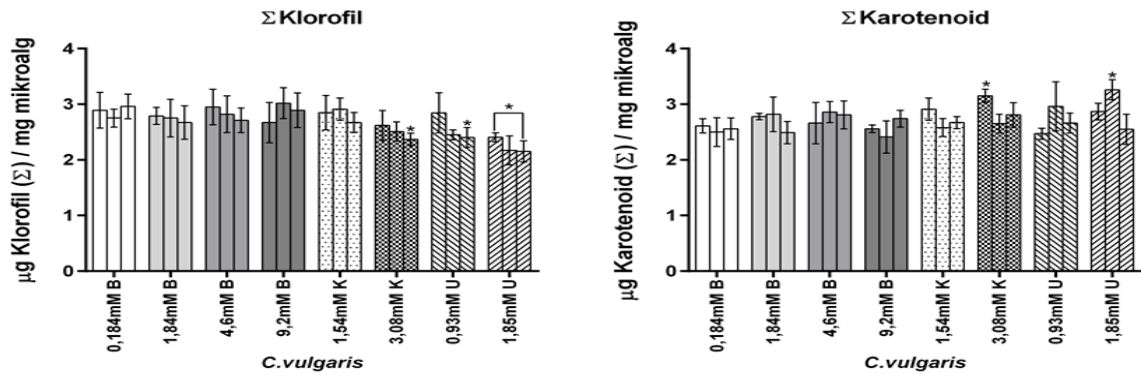


Şekil 13. *C.vulgaris* 'in toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8. 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

C.vulgaris'in toplam karbohidrat içeriği borlu bileşik uygulamasına cevapta artış sergilemiştir (Şekil 13). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu artırıldığında toplam karbohidrat içeriğindeki artış zamana bağlı olarak da süreklilik göstermiştir. Ortamdaki H_3BO_3 yoğunluğu 10, 25 ve 50 kat artırıldığında inkübasyonun 24. gününde sırasıyla %30,5, %60,2 ve %53,5 düzeylerinde artış kaydedilmiştir. *C.vulgaris*'in büyüme ortamına 1,54mM ve 3,08mM konsantrasyonlarında Kolemanit uygulandığında inkübasyonun 8. gününde sırasıyla %41,5 ve %29,2 düzeylerinde artış kaydedilmiş, takip eden günlerde de artış sürmüştü ve inkübasyonun 24. gününde sırasıyla %82,3 ve %56,6 düzeyinde artış kaydedilmiştir. Son olarak 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulaması inkübasyonun ilk günlerinde önemli bir değişime sebep olmamış, ancak inkübasyon süresi uzadıkça karbohidrat içeriğinde artışa sebep olmuş, inkübasyonun 24. gününde *C.vulgaris*'in toplam karbohidrat içeriği 0,184mM H_3BO_3 uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %40,7 ve %50,8 düzeyinde artışa sebep olmuştur.

4.6.Mikroalglerin toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler

C.vulgaris'in toplam klorofil ve karotenoid içeriği ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa cevapta önemli bir değişim sergilememiştir (Şekil 14). Diğer taraftan bu mikroalgin büyüme ortamına 1,54mM Kolemanit uygulandığında yine toplam klorofil ve karotenoid içeriğinde önemli bir değişim görülmesi de kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında ancak inkübasyonun 24. gününde toplam klorofil içeriğinde istatistiksel olarak önemli bir azalma belirlenmiştir. Son olarak 1,85mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in toplam klorofil içeriği inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde %16,8, %21,1 ve %27,4 düzeylerinde azalma gösterse de toplam karotenoid içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek sürekli bir değişim belirlenmemiştir.



Şekil 14. *C.vulgaris*'in toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8., 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

5. SONUÇ

Bor (B) bütün bitkisel organizmaların büyüme ve gelişimi için gerekli bir elementtir. Fotosentez yapan mikroskobik canlılar olan mikroalglerin birçoğunun büyüme ortamlarında da B elementi kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında çeşitli bor bileşiklerinin *Chlorella vulgaris* TMCC6 mikroalginin büyüme ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol (TAG) üretimleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte büyümede en az baskılanma ile nötral lipit içeriğinde en fazla artışın kaydedildiği Bor konsantrasyonlarını belirleyerek Bor elementinin ve borlu bileşiklerin yeşil mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG içeriklerinin artırılmasında kullanılabilirliğinin tanımlanması hedeflenmiştir.

Genel olarak mikroalglerin ürettikleri depo metaboliti olarak rol oynayan nötral lipit üretimindeki artış büyümedeki baskılanma ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (Sharma vd., 2012). Nötral lipit üretimi için uygulanacak boron yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla mikroalglerin büyüme ortamlarına artan konsantrasyonlarda H_3BO_3 uygulanmış ve büyümelerindeki değişim takip edilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen büyüme verileri sonrası büyüme ortamında uygulanacak 0,184mM H_3BO_3 yoğunluğu referans H_3BO_3 yoğunluğu olarak kullanılmış, Uleksit ve kolemanit bileşiklerinin uygulama konsantrasyonları da 0,184mM H_3BO_3 de bulunan Bor elementi yoğunluğuna göre hesaplanarak uygulanmıştır. Bu durumda yapılan hesaplama sonucunda 0,184mM H_3BO_3 kullanıldığında çözeltideki Bor element miktarı 2mg/L olarak hesaplanmış, Kolemanit ($CaB_3O_4(OH)_3H_2O$) ve Uleksit ($NaCaB_5O_98H_2O$) konsantrasyonları da içerdikleri Bor element miktarına göre belirlenmiş ve bileşiklerdeki Bor elementi yoğunluğuna göre 25x ve 50x konsantrasyonda uygulanmıştır. Böylece, borlu bileşik konsantrasyonları için mikroalglerde ortam H_3BO_3 yoğunluğu 0,184mM uygulanan grup kontrol grubu olarak kullanılmış, deney grupları da Tablo 1’de gösterildiği gibi 1,84mM H_3BO_3 , 4,6mM H_3BO_3 , 9,2mM H_3BO_3 , 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit ile 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan mikroalg grupları şeklinde sınıflandırılmıştır.

C.vulgaris’in büyümesinde ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa cevapta önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Bununla birlikte özellikle yüksek konsantrasyonlarda Kolemanit ve Uleksit uygulamaları bu mikroalgin büyümesini baskılamıştır. Buna karşın artan konsantrasyonlarda uygulanan bütün borlu bileşikler bu mikroalgin sentezlediği TAG ve nötral lipit üretiminde artışa sebep olmuştur. Özellikle toplam lipit üretimindeki artış Kolemanit ve Uleksit uygulanan mikroalglerde önemli düzeyde belirlenmiştir. Yine sitoplazmik lipit cisimlerinin floresans

boyaması ile elde edilen görüntüler bu artışları doğrular niteliktedir. Bununla birlikte YAME analizi ile elde edilen veriler borlu bileşik uygulanan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriğinde azalma ile lipit üretiminde artışı tetiklediği anlaşılmaktadır ki bu durum *C.vulgaris*'ten biyodizel hammaddesi üretimi için borlu bileşik uygulamasını avantajlı kılmaktadır. *C.vulgaris*'in toplam protein üretimi artan konsantrasyonlarda borlu bileşik uygulamasına cevapta azalmış, buna karşın toplam karbohidrat üretiminde de önemli artışları tetiklemiştir. Son olarak bu mikroalgin klorofil içeriği yalnızca yüksek konsantrasyonda Uleksit uygulamasında kararlı düşüş sergilemiş ve yapılan tüm uygulamalarda karotenoid içeriğinde sürekli bir değişim belirlenmemiştir. Dolayısıyla bu mikroalgde depo metabolitleri olarak kullanılabilen lipit ve karbohidrat üretimindeki artışla birlikte büyüme faaliyetlerinde önemli bir baskılanma olmaması kullanılan borlu bileşiklerin metabolik faaliyetlerde kullanılabileceğini akla getirmektedir. Bu yönüyle değerlendirildiğinde borlu bileşiklerin uygulandığı *C.vulgaris*'in genomik, metabolomik ve hatta proteomik analizlerinin yapılması ile yeni biyoteknolojik uygulama alanlarının değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

- Bu araştırma projesinde artan konsantrasyonlarda Borik asit, Kolemanit ve Uleksit uygulamalarına verilen fizyolojik cevaplar kullanılan borlu bileşiğin çeşidine ve yoğunluğuna bağlı olarak farklılıklar sergilemiştir.
- *C.vulgaris*'in kültüre alındığı BG-11 ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu son derece düşük ($1\mu M$)tür. Oysa genel manada $4,6mM$ 'a kadar uygulandığında bu mikroalglerin büyümelerinde kaydadeğer bir değişim belirlenmemiştir. Yüksek yapılı bitkilerin büyümeleri için gerekli olduğu giriş kısmında da belirtildiği gibi çok sayıda çalışma ile belgelenmiş olan bu elementin mikroalg büyüme ortamlarında da kullanımının test edilmesi için çok yönlü çalışmaların faydalı olabileceği değerlendirilmiştir.
- *C.vulgaris*'in büyüme ortamına artan konsantrasyonda borlu bileşikler uygulandığında biyodizel hammaddesi üretimi artmış, YAME içerisindeki ÇDYA oranında da azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada, $0,93mM$ Uleksit uygulamasının büyümede düşük düzeyde sayılabilecek bir baskılanma ile kısa sürede lipit üretiminde artışı tetiklediği, böylece 8 gün boyunca $0,94mM$ Uleksit uygulamasının *C.vulgaris*'ten biyodizel hammaddesi üretimi için diğer uygulamalara göre daha üstün olduğu değerlendirilmiştir.

KAYNAKÇA

1. Gülüm M., Bilgin A., Çakmak A., Comparison of optimum reaction parameters of corn oil biodiesels produced by using sodium hydroxide (NaOH) and potassium hydroxide (KOH), Journal of the Faculty of of Engineering and Architecture of Gazi University, 30 (3), 503-511, 2015.
2. Genç N., Atıkların biyohidrojen üretim potansiyellerinin değerlendirilmesi, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17 (2), 63- 77, 2011.
3. Amponsah N.Y., Troldborg M., Kington B., Aalders I., Hough R.L., Greenhouse gas emissions from renewable energy sources: A review of lifecycle considerations, Renewable Sustainable Energy Rev., 39, 461-475, 2014.
4. Singh B., Guldhe A., Rawat I., Bux F., Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae, Renewable Sustainable Energy Rev., 29, 216-245, 2014.
5. Boz N., Calcium oxide based heterogeneous catalyst design for the production of methyl esters from canola oil, Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 30 (4), 641-648, 2015.
6. Christenson L., Sims R., Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts, Biotechnol. Adv., 29 (6), 686-702, 2011.
7. Pragya N., Pandey K.K., Sahoo P.K., A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae, Renewable Sustainable Energy Rev., 24, 159-171, 2013.
8. Rashid N., Ur Rehman M.S., Sadiq M., Mahmood T., Han J.-I., Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production, Renewable Sustainable Energy Rev., 40, 760-778, 2014.
9. Lakaniemi A.M., Microalgal cultivation and utilization in sustainable energy production, Ph. D., Tampere University of Technology, Department of Chemistry and Bioengineering, Tampere, 2012.
10. Farooq W., Suh W.I., Park M.S., Yang J.-W., Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application, Bioresour. Technol., 184, 73-81, 2015.
11. Chisti Y., Biodiesel from microalgae, Biotechnol. Adv., 25 (3), 294-306, 2007.

12. Suali E., Sarbatly R., Conversion of microalgae to biofuel, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 16 (6), 4316-4342, 2012.
13. Bahadar A., Bilal Khan M., Progress in energy from microalgae: A review, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 27, 128-148, 2013.
14. Huber G.W., Iborra S., Corma A., Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering, *Chem. Rev.*, 106 (9), 4044-4098, 2006.
15. Zhu L., Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 41, 1376-1384, 2015.
16. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 14 (1), 217-232, 2010.
17. Singh A., Nigam P.S., Murphy J.D., Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels, *Bioresour. Technol.*, 102 (1), 26-34, 2011.
18. Medeiros D.L., Sales E.A., Kiperstok A., Energy production from microalgae biomass: carbon footprint and energy balance, *J. Cleaner Prod.*, 96, 493-500, 2015.
19. Xu M., Bernards M., Hu Z., Algae-facilitated chemical phosphorus removal during high-density *Chlorella emersonii* cultivation in a membrane bioreactor, *Bioresour. Technol.*, 153, 383-387, 2014.
20. Becker E.W., Micro-algae as a source of protein, *Biotechnol. Adv.*, 25 (2), 207-210, 2007.
21. Miao X., Wu Q., High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*, *J. Biotechnol.*, 110 (1), 85-93, 2004.
22. M. Beijerinck Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen *Botanische Ztg*, 48 (1890), p. 729
23. Yeh K.-L., Chang J.-S., Chen W.-m., Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31, *Eng. Life Sci.*, 10 (3), 201-208, 2010.
24. Hariskos I., Posten C., Biorefinery of microalgae - opportunities and constraints for different production scenarios, *Biotechnol. J.*, 9 (6), 739-752, 2014.

- 25.** Kobayashi M., Kakizono T., Yamaguchi K., Nishio N., Nagai S., Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions, *J. Ferment. Bioeng.*, 74 (1), 17- 20, 1992.
- 26.** Wang H., Xiong H., Hui Z., Zeng X., Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids, *Bioresour. Technol.*, 104, 215-220, 2012.
- 27.** Mitra D., van Leeuwen J., Lamsal B., Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products, *Algal Res.*, 1 (1), 40-48, 2012.
- 28.** Kim S., Park J.-e., Cho Y.-B., Hwang S.-J., Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions, *Bioresour. Technol.*, 144, 8-13, 2013.
- 29.** Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J., Chang J.- S., Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review, *Bioresour. Technol.*, 102 (1), 71-81, 2011.
- 30.** Abreu A.P., Fernandes B., Vicente A.A., Teixeira J., Dragone G., Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source, *Bioresour. Technol.*, 118, 61-66, 2012.
- 31.** Bruton T., Lyons H., Lerat Y., Stanley M., Rasmussen M.B., A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland, *Sustainable Energy Ireland*, 1-88, 2009.
- 32.** BP. BP statistical review of world energy; 2009.
- 33.** European Commission Communication from the commission to the European council and the European parliament: an energy policy for Europe EC COM(2007) 1 Final, Brussels (2007)
- 34.** H.H. Rogner Energy resources
J. Goldemberg (Ed.), *World energy assessment: energy and the challenge of sustainability*, UNDP/UNDESA/WEC, New York (2000)
- 35.** Ugarte DG, Walsh ME, Shapouri H, Slinsky P. The economic impacts of bioenergy crop production in US agriculture, *USDA Agricultural Economic Report No. 816*; 2003. p. 41.

- 36.** IPCC Climate change 2001: impacts, adaptation, and vulnerability
- 37.** A report of working group II of the Intergovernmental Panel on Climatic Change (IPCC), Cambridge (2001)
- 38.** EIA. International carbon dioxide emissions from the consumption of energy, Available from: <http://www.eia.doe.gov/pub/international/iealf/tableh1co2.xls>; 2006 [cited 10.02.09].
- 39.** D. Bilanovic, A. Andargatchew, T. Kroeger, G. Shelef Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations—response surface methodology analysis
- 40.** Energy Conversion and Management, 50 (2) (2009), pp. 262-267
- 41.** B. Wang, Y. Li, N. Wu, C. Lan CO₂ bio-mitigation using microalgae Applied Microbiology and Biotechnology, 79 (5) (2008), pp. 707-718
- 42.** J.P. Soest Climatic change: solutions in sight, a Dutch perspective
- 43.** Energy Policy Platform, Delft (2000)
- 44.** IEA World energy outlook 2007
- 45.** International Energy Agency, Paris (2007)
- 46.** Khosla V. Where will biofuels and biomass feedstocks come from? [White Paper], Available from: <http://www.khoslaventures.com/presentations/WhereWillBiomassComeFrom.doc> [11.06.08]; 2009. p. 31.
- 47.** Saraf, S., Thomas, B. 2007. "Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality", Process Safety and Environmental Protection, 85, 360-364.

48. Sharma, K., Schuhmann, H., Schenk, P., 2012. "High lipid induction in microalgae for biodiesel production", *Energies*, 5(12), 1532–1553.

49. Francisco, E.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.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Feyzullah YILMAZ

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Kasım 1982, Yusufeli

Elektronik Posta: feyzullahyilmaz08@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007
Yüksek Lisans	İMU Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı	2019