



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* MİKROALGİNE  
AİT MUTANTLARININ BİYOHİDROJEN ÜRETİM  
POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

İzel ORAL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir  
2020



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* MİKROALGİNE  
AİT MUTANTLARININ BİYOHİDROJEN ÜRETİM  
POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

İzel ORAL

Danışman: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Biyomühendislik Anabilim Dalı  
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2020



İzel ORAL tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgine ait mutantlarının biyohidrojen üretim potansiyellerinin incelenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07/09/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı : Doç Dr. Suphi Ş. ÖNCEL**

.....

**Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL**

.....

**Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜNGÖRMÜŞLER**

.....



## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgine ait mutantlarının biyohidrojen üretim potansiyellerinin incelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13 / 08 / 2020



İzel ORAL





**ÖZET*****Chlamydomonas reinhardtii* MİKROALGİNE AİT MUTANTLARININ  
BİYOHİDROJEN ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

ORAL, İzel

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

Ağustos 2020, 82 sayfa

Mikroalgler, biyosferde yaşayan tek hücreli, fotoototrofik mikroskobik organizmalardır. Yeşil alglerin ışıkta hidrojen üretme kabiliyeti, 1942 yılında Gaffron ve Rubin tarafından keşfedilmiştir. O zamandan beri, çok sayıda *Chlamydomonas* türü de dahil olmak üzere çeşitli fotoototrofik mikroorganizmaların H<sub>2</sub> ürettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ise, *Chlamydomonas reinhardtii* türüne ait farklı mutantlar kullanılarak, iki farklı üretim prosesindeki hidrojen üretim kapasitelerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu iki farklı üretim prosesinden biri sülfür yoksunluğuna dayanan iki aşamalı üretim, diğeri ise üretim ortamını değişikliği gerektirmeyen HS üretim prosesidir. Yapılan denemeler sonucunda HS (Sueoka's high salt medium) üretim prosesinde hidrojen elde edilememiştir. Toplam 11 suş (CC124, WT, D239-40, D240, D240-41, Véro, 1130, mt (+), mt (-), T-1, AOX) kullanılarak gerçekleştirildiği sülfür yoksunluğuna dayanan üretimde 1L'lik Roux tipi panel fotobiyoreaktör kullanılmış ve en çok üretim yapan D240-41, Véro ve mt (+) mutantları, 2,5L'lik karıştırılmalı tank fotobiyoreaktörde hidrojen üretimleri denenmiştir. Bütün üretimlerde en çok üretim yapan mutant Véro olmuştur.

**Anahtar sözcükler:** Mikroalg, Biyohidrojen, *Chlamydomonas reinhardtii*, Fotobiyoreaktör, Biyoyakıt



**ABSTRACT****EXAMINATION OF THE BIOHYDROGEN PRODUCTION  
POTENTIALS OF MICROALGAE MUTANTS *Chlamydomonas reinhardtii***

ORAL, İzel

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL

August 2020, 82 pages

Microalgae are single-celled, photoautotrophic microscopic organisms that live in the biosphere. The ability of green algae to produce hydrogen in light was discovered in 1942 by Gaffron and Rubin. Since then, various photoautotrophic microorganisms have been shown to produce H<sub>2</sub>, including a large number of *Chlamydomonas* species. In this study, it was aimed to determine hydrogen production capacities in two different production processes by using different mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* species. One of these two different production processes is two-stage production based on sulfur deprivation, and the other is the HS (Sueoka's high salt medium) production process that does not require a change in the culture medium. As a result of the trials, hydrogen could not be obtained in the HS production process. 1L Roux type panel photobioreactor was used in production based on sulfur deprivation in which a total of 11 strains (CC124, WT, D239-40, D240, D240-41, Véro, 1130, mt (+), mt (-), T-1, AOX) was used. D240-41, Véro and mt (+) mutants producing hydrogen have been tried in 2.5L stirred tank photobioreactor. The most productive mutant in all productions was Véro.

**Keywords:** Microalgae, Biohydrogen, *Chlamydomonas reinhardtii*, Photobioreactor, Biofuel



## ÖNSÖZ

Dünyadaki enerji kaynaklarının oldukça azalmasıyla, dünyada yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynağı bulmak için çalışmalar yapılmaktadır. Bu süreçte, bir enerji kaynağı olan hidrojen üretimi önem arz etmektedir.

Bu çalışmada ise, tez konusu bu ihtiyaç göze alınarak belirlenmiş ve bilimsel açıdan yenilik getirilebileceğine inanılarak denemelere başlanmıştır. Tez süresince, gerek üretim aşamasında gerekse analiz aşamasında birçok aksilikle karşılaşmış, ancak bu aksiliklere rağmen denemeler defalarca tekrarlanmıştır. Bununla birlikte, bu çalışma uzun süren bir yolculuk sonunda tamamlanmıştır.

İZMİR

13/08/2020

İzel ORAL



**İÇİNDEKİLER**Sayfa

İÇ KAPAK .....	ii
KABUL ONAY SAYFASI .....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xx
TABLolar DİZİNİ.....	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1 Hidrojen .....	2
2.2 Hidrojen üretim yöntemleri .....	2
2.2.1 Buhar reformasyonu .....	3
2.2.2 Kısmi oksidasyon .....	4

**İÇİNDEKİLER(devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.2.3 Ototermal reformasyon .....	4
2.2.4 Hidrokarbon pirolizi.....	4
2.2.5 Piroliz .....	5
2.2.6 Gazifikasyon .....	6
2.2.7 Biyofotoliz ve foto-fermantasyon .....	6
2.2.8 Karanlık fermentasyon.....	7
2.2.9 Su elektrolizi .....	8
2.2.10 Alkalın elektrolizi .....	9
2.2.11 Proton değişim membranı elektrolizi .....	9
2.2.12 Katı oksit elektrolizi.....	10
2.2.13 Termoliz.....	10
2.2.14 Fotoelektroliz .....	11
2.3 Mikroalgler.....	12
2.3.1 Mikroalglerin taksonomik sınıflandırılması.....	12
2.4 Mikroalglerin kullanım alanları .....	14
2.4.1 Biyogübre olarak kullanımı .....	14



**İÇİNDEKİLER(devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.4.2 Farmasötik kullanımı .....	14
2.4.3 Akuakültür beslemede kullanımı .....	15
2.4.4 Gıdada kullanımı .....	15
2.4.5 Kozmetikte kullanımı .....	16
2.4.6 Gıda renklendirici olarak kullanımı .....	16
2.4.7 Yüksek değerli molekül olarak kullanımı .....	17
2.4.8 Biyoyakıt olarak kullanımı .....	17
2.5 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	18
2.5.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ve biyohidrojen .....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	27
3.1. Gereç .....	27
3.1.1 Mikroalg .....	27
3.1.2 Mikroalg kültürasyonu .....	27
3.1.3 Hidrojen üretimi .....	29
3.1.4 Hidrojen ölçümü .....	30
3.2 Yöntem .....	30

**İÇİNDEKİLER(devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.2.1 Mikroalg kùltivasyonu .....	30
3.2.2 Yapılan analizler .....	31
3.2.3 Hidrojen üretimi .....	32
4. BULGULAR .....	36
4.1 TAP üretimleri .....	36
4.1.1. CC124 .....	36
4.1.2 D239-40 .....	37
4.1.3 D240 .....	38
4.1.4 D240-41 .....	39
4.1.5 WT .....	40
4.1.6 Véro .....	41
4.1.7 1130 .....	42
4.1.8 Mt (-) .....	43
4.1.9 Mt (+) .....	44
4.1.10 T-1 .....	45
4.1.11 AOX .....	46

**İÇİNDEKİLER(devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.2 HS üretimleri .....	47
4.2.1 CC124 .....	47
4.2.2 D239-40 .....	48
4.2.3 D240 .....	49
4.2.4 D240-41 .....	50
4.2.5 WT .....	51
4.2.6 Véro .....	52
4.2.7 1130 .....	53
4.2.8 Mt (-).....	54
4.2.9 Mt (+).....	55
4.2.10 T-1.....	56
4.2.11 AOX.....	57
4.3 TAP-TAP-S metoduyla hidrojen üretimleri .....	58
4.3.1 CC124.....	58
4.3.2 D239-40 .....	59
4.3.3 D240 .....	60

**İÇİNDEKİLER(devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.3.4 D240-41 .....	60
4.3.5 WT .....	61
4.3.6 Véro.....	62
4.3.7 1130.....	62
4.3.8 Mt (-).....	63
4.3.9 Mt (+) .....	64
4.3.10 T-1.....	64
4.3.11 AOX.....	65
4.4 HS metoduyla hidrojen üretimleri.....	66
4.5 Toplam hidrojen üretimi .....	66
4.6 Biyoreaktörde hidrojen üretimleri.....	67
5. TARTIŞMA .....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	76
TEŞEKKÜR.....	81
ÖZGEÇMİŞ .....	82

## İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

EKLER .....



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hidrojen üretim yöntemleri .....	3
3.1 Erlen üretimlerinde ilk ve son gün kültürlerin görüntüleri .....	30
3.2 Thoma lamının mikroskop altındaki görüntüsü.....	31
3.3 Panel fotobiyoreaktörde aerobik kültür üretimi.....	33
3.4 Panel fotobiyoreaktörde anaerobik hidrojen üretimi .....	34
4.1 TAP ortamında CC124 suşunun büyüme eğrileri.....	37
4.2 TAP ortamında D239-40 suşunun büyüme eğrileri.....	38
4.3 TAP ortamında D240 suşunun büyüme eğrileri .....	39
4.4 TAP ortamında D240-41 suşunun büyüme eğrileri.....	40
4.5 TAP ortamında WT suşunun büyüme eğrileri.....	41
4.6 TAP ortamında Véro suşunun büyüme eğrileri .....	42
4.7 TAP ortamında 1130 suşunun büyüme eğrileri .....	43
4.8 TAP ortamında mt(-) suşunun büyüme eğrileri.....	44
4.9 TAP ortamında mt(+) suşunun büyüme eğrileri .....	45
4.10 TAP ortamında T-1 suşunun büyüme eğrileri .....	46
4.11 TAP ortamında AOX suşunun büyüme eğrileri .....	47
4.12 HS ortamında CC124 suşunun büyüme eğrileri .....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13 HS ortamında D239-40 suşunun büyüme eğrileri .....	49
4.14 HS ortamında D240 suşunun büyüme eğrileri .....	50
4.15 HS ortamında D240-41 suşunun büyüme eğrileri .....	51
4.16 HS ortamında WT suşunun büyüme eğrileri .....	52
4.17 HS ortamında Véro suşunun büyüme eğrileri .....	53
4.18 HS ortamında 1130 suşunun büyüme eğrileri .....	54
4.19 HS ortamında mt(-) suşunun büyüme eğrileri .....	55
4.20 HS ortamında mt(+) suşunun büyüme eğrileri .....	56
4.21 HS ortamında T-1 suşunun büyüme eğrileri .....	57
4.22 HS ortamında AOX suşunun büyüme eğrileri.....	58
4.23 CC124 suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi.....	59
4.24 D239-40 suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi.....	59
4.25 D240 suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi .....	60
4.26 D240-41 suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi.....	61
4.27 WT suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi.....	61
4.28 Véro suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi .....	62
4.29 1130 suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi .....	63

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.30 mt(-) suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi .....	63
4.31 mt(+) suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi .....	64
4.32 T-1 suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi.....	65
4.33 AOX suşunun 8 günlük H <sub>2</sub> üretimi.....	65
4.34 8 günlük hidrojen üretimi sonunda elde edilen biyohidrojen miktarı.....	66
4.35 Biyoreaktörde günlük olarak elde edilen hidrojen miktarları.....	67
4.36 8 günün sonunda elde edilen toplam hidrojen miktarları .....	67
5.1 6 suşun iki farklı büyüme ortamındaki karşılaştırması .....	69
5.2 5 suşun iki farklı büyüme ortamındaki karşılaştırması .....	70



**TABLolar DİZİNİ**

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hidrojenin Özellikleri .....	2
2.2 Mikroalglerin taksonomik sınıflandırılması .....	13
3.1 TAP üretim ortamının formülasyonu.....	27
3.2 HS üretim ortamının formülasyonu .....	28
3.3 TAP-S üretimi ortamının formülasyonu.....	29
5.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> suşlarının H <sub>2</sub> üretimi karşılaştırması .....	72
5.2 Farklı reaktördeki H <sub>2</sub> üretimi karşılaştırması .....	73

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
C	Karbon
H <sub>2</sub>	Hidrojen gazı
O	Oksijen
S	Sülfür
$\mu$	Mikro
<u>Kısaltmalar</u>	
AOX	Alternatif terminal oksidaz
CEF	Siklik elektron akışı
DHA	Dokosaheksaenoik asit
PEM	Proton değişim membranı
PGRL1	Proton gradyan regülasyonu benzeri 1
PQ	Plastokinon
PSA	Basınç salınımı adsorpsiyonu
PSII	Fotosistem 2
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
SOE	Katı oksit elektrolizörü
WGS	Su-gaz değişimi

## 1.GİRİŞ

Enerji, küresel olarak hayati önem sahiptir. Ancak birincil enerji kaynağımız fosil yakıtlar, küresel iklim değişikliğine, çevresel bozulmaya ve sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Gelecekte, enerji sistemlerinin yenilenebilir ve sürdürülebilir olmasının yanında verimli, kullanışlı ve güvenli olması gerekmektedir. Hidrojen, gelecekteki bu enerji sistemi için mükemmel bir yakıt olarak önerilmektedir. H<sub>2</sub> (hidrojen gazı) temiz, yenilenebilir enerji kaynağı olarak muazzam bir potansiyel sunmaktadır. Hidrojen, bilinen yakıtlar arasında en yüksek gravimetrik enerji yoğunluğuna sahiptir ve çevre kirliliğine, iklim değişikliğine neden olan karbon bazlı emisyonlar üretmeden elektrokimyasal ve yanma prosesleri ile enerji dönüşümü sağlar. Hidrojen, suyun elektrolizi, hidrojen bakımından zengin organik bileşiklerin termokatalitik reformasyonu ve biyolojik işlemler dahil olmak üzere bir dizi işlemlerle üretilmektedir. Günümüzde hidrojen, neredeyse sadece suyun elektroliziyle veya metanın buharla yeniden şekillendirilmesiyle üretilmektedir. Mikroorganizmalar kullanarak hidrojenin biyolojik üretimi (biyohidrojen), heyecan verici yeni bir teknoloji geliştirme alanıdır. Biyolojik sistemler hidrojen üretmek için çok çeşitli yaklaşımlar sağlar ve doğrudan biyofotoliz, dolaylı biyofotoliz, fotofermantasyon ve karanlık fermentasyonu içermektedir. Biyohidrojen sistemleri H<sub>2</sub> üretebilse de, henüz hiçbir ticari sistem mevcut değildir ve biyohidrojen uygulamasının pratik uygulamasıyla ilgili sorunlar büyüktür.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Hidrojen

Evrende sadece bir proton ve bir elektrondan oluşan en basit element olan hidrojen, evrenin kompozisyonunun büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Dünya yüzeyinde hidrojen, oksijen, karbon ve azot gibi diğer elementlerle bir bileşik olarak bulunur; hidrojenin çoğu, su formunda oksijenli bir bileşik olarak yer almaktadır. Normal olarak, saf hidrojen, iki atomlu H<sub>2</sub> hidrojen atomu formunda bulunmaktadır (Abe, 2008).

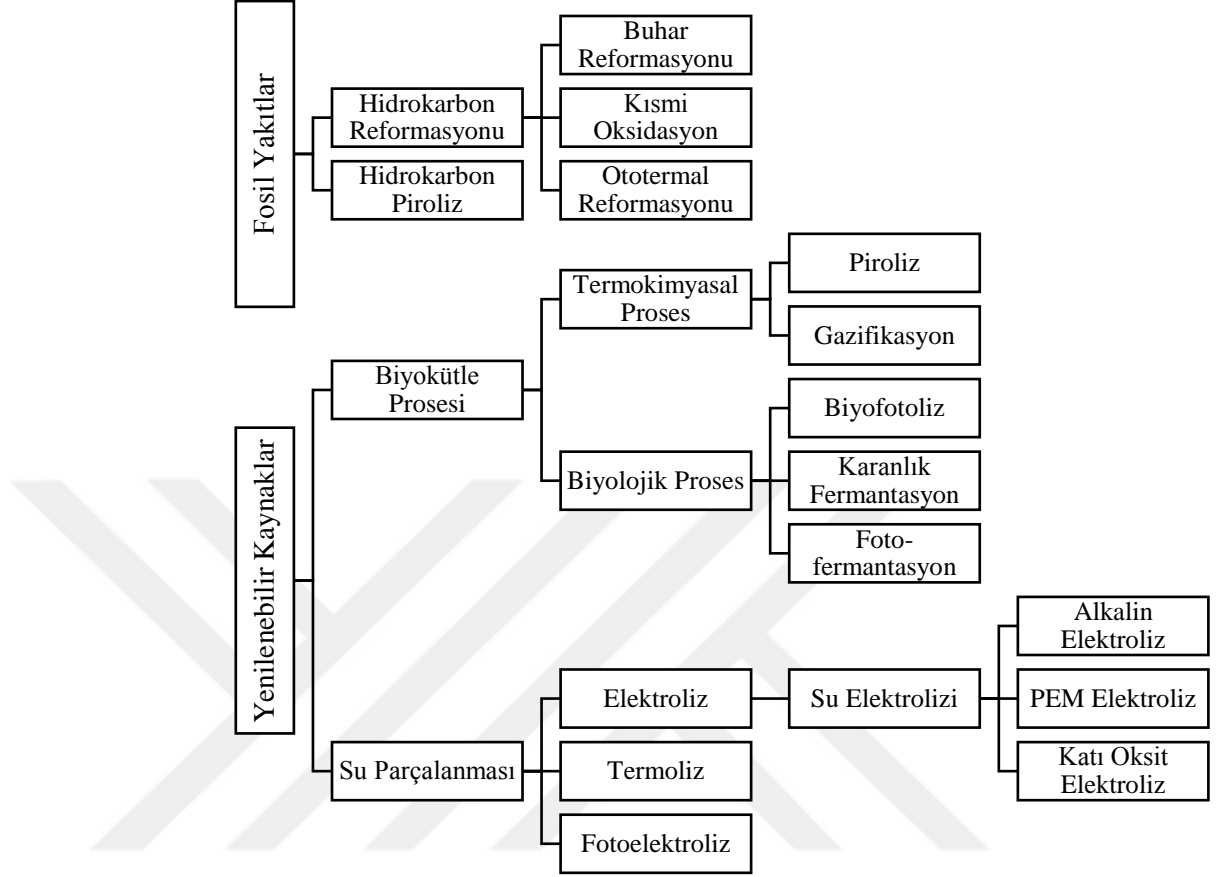
**Tablo 2.1:** Hidrojenin Özellikleri (Chauhan and Singh, 2015).

Özellik	Değer
Moleküler Ağırlık	2,01594
Gaz Yoğunluğu (@ 0°C, 1 atm)	0,08987 kg/m <sup>3</sup>
Katı Yoğunluğu (@ -259°C)	858 kg/m <sup>3</sup>
Sıvı Yoğunluğu (@ -253°C)	708 kg/m <sup>3</sup>
Erime Sıcaklığı	-259 °C
Kaynama Sıcaklığı (@ 1 atm)	-253 °C
Kritik Sıcaklık	-240 °C
Kritik Basınç	12,8 atm
Kritik Yoğunluk	31,2 kg/m <sup>3</sup>
Füzyon Isısı (@ -259°C)	58 kJ/kg
Buharlaştırma Isısı (@ -253°C)	447 kJ/kg
Isıl İletkenlik (@ -253°C)	0,019 kJ/(ms°C)
Viskozite (@ 25°C)	0,00892 centipoise
Gazın Isı Kapasitesi (Cp, @ 25°C)	14,3 kJ/(kg°C)
Sıvının Isı Kapasitesi (Cp, @ -256°C)	8,1 kJ/(kg°C)
Katının Isı Kapasitesi (Cp, @ -259,8°C)	2,63 kJ/(kg°C)

### 2.2 Hidrojen üretim yöntemleri

Doğada bulunan birçok madde hidrojen içerir. Bunlar arasında doğal olarak tuzlu su (deniz suyu), nehir suyu, yağmur veya kuyu suyu olarak

bulunmaktadır. Hidrojen ayrıca fosil hidrokarbonlar, biyokütle, hidrojen sülfür veya diğer bazı maddelerden de ekstrakte edilebilir (Dincer, 2012).

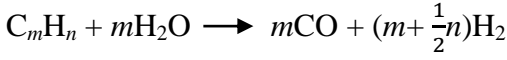


**Şekil 2.1:** Hidrojen üretim yöntemleri (Nikolaidis and Poullikkas, 2017; Břáčková and Straka, 2010)

### 2.2.1 Buhar reformasyonu

Katalizörler iki tipe ayrılmaktadır: değersiz metaller (nikel gibi) ve Grup VIII elemanlarından değerli soymetaller (platin veya rodyum gibi). Ağır kütle ve ısı transferi sınırlamaları nedeniyle, buhar reformasyon katalizörleri için etkinlik faktörleri sınırlıdır. Bu nedenle daha az pahalı olan nikel katalizörleri kullanılmaktadır. Bunun yanında, kütle ve ısı transferi sınırlamalarının mikrokanaal bazlı reaktörler kullanılarak aşıldığı ve buhar reformunun iç kinetiğinden faydalanabileceği gösterilmiştir. Bu sistemlerde özellikle rodyum tercih edilmektedir. Çünkü nikel göre daha yüksek spesifik aktivitelere sahiptir. Bununla birlikte rodyumun yüksek maliyeti, araştırmacıları kobalt tabanlı katalizörler gibi alternatif katalizörler geliştirmeye itmektedir. Buhar reformasyonu sanayide yaygın olarak, daha yüksek ısıtma değerlerine dayanarak

yaklaşık %85'e varan yüksek termal verimlerin elde edildiği metandan hidrojen üretimini kullanmaktadır (Holladay et al., 2009).



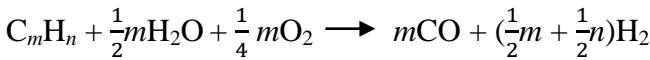
### 2.2.2 Kısmi oksidasyon

Kısmi oksidasyon yöntemi, ekzotermik bir reaksiyondur. Bu yöntemle üretilen hidrojen, su-gaz değiştirme (Water-Gas Shift-WGS) reaktörüne gönderilir ve daha sonra uygun yöntem kullanılarak saflaştırılmaktadır. Buhar reformasyonu ile karşılaştırıldığında bu yöntemin verimliliğinin düşük ve yüksek miktarda saf oksijen kullanımı nedeniyle işletme maliyeti çok yüksektir. Katalizörler kullanılarak hidrokarbonun kısmi oksidasyonundan hidrojen üretimi ticari uygulamalarda ve otomobil yakıt hücrelerinde kullanılmıştır (El-Shafie et al., 2019).



### 2.2.3 Ototermal reformasyon

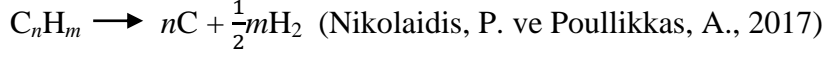
Ototermal reformasyon işlemi, katalitik kısmi oksidasyon işlemine buhar eklenmesidir (Holladay et al., 2009). Kısmi oksidasyon sürecine kıyasla düşük basınçta yapılmaktadır. Buhar yenileme reaksiyonlarını yürütmek için katalitik bölgede gerekli olan ısı, kısmi oksidasyon işlemi kullanılarak üretilmiştir. Kısmi oksidasyon prosesi ile karşılaştırıldığında ototermal reaksiyon prosesinin önemli bir avantajı, başlatma ve durdurma çok hızlı bir şekilde iken büyük miktarda hidrojen gazı üretilmektedir. Ototermal reaksiyon işleminde, hem buhar/karbon oranı hem de oksijen/yakıt oranı kullanılarak sıcaklığın kontrol edilmesi ve kok oluşumunun önlenmesi gerektiği düşünülmüştür (El-Shafie et al., 2019).



### 2.2.4 Hidrokarbon pirolizi

Hidrokarbon pirolizi, tek hidrojen kaynağının hidrokarbonun kendisi olduğu ve termal ayrışmaya maruz kalarak gerçekleşen bir işlemdir (Nikolaidis and Poullikkas, 2017). Bu işlemin reaksiyonları kömür özelliklerine bağlı olarak

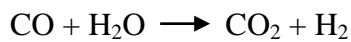
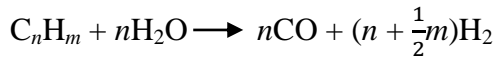
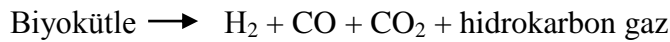
350°C ile 400°C arasında yapılmaktadır. Metan gibi diğer hidrokarbonların termal ayrışmasına bakıldığında, termal ayrışma sıcaklığı 1400°C gibi yüksek sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Bunun yanında, piroliz işleminin sıcaklığı, geçiş metali katalizörü (Ni, Fe, Co) kullanılarak düşürülebilmektedir (El-Shafie et al., 2019).



Piroliz işlemi kullanılarak hidrokarbonların kimyasal ayrışma denklemi, su ve havanın kullanılmadığını göstermektedir. Sonuç olarak, reaksiyon yan ürünlerinde karbon oksitler görünmemektedir. Piroliz işleminin, kompaktlığına ek olarak herhangi bir organik yakıt kullanma esnekliğine sahip olduğu ve işlem yan ürününün karbon içermediği ortaya konmaktadır. Piroliz işleminin avantajları olmasına rağmen, büyük bir kirlenme potansiyeli bulunmaktadır (El-Shafie et al., 2019).

### 2.2.5 Piroliz

Biyokütle pirolizi, 0,1–0,5 MPa'da 650-800 K sıcaklıkta biyokütlenin ısıtılmasıyla sıvı yağların, katı kömür ve gaz bileşiklerinin üretimini sağlayan termokimyasal işlemdir. Kısmi yanma işlemi için, gereken termal enerjinin sağlanmasına izin verilen durumlar dışında, oksijen yokluğunda meydana gelmektedir. Metan ve diğer hidrokarbon gazlar buhar reformasyonu ile üretilir ve daha fazla hidrojen üretimi için WGS reaksiyonu uygulanabilir. CO, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>'ye dönüştürüldükten sonra, istenen saflaştırılmış hidrojen, PSA (basınç salınımı adsorpsiyonu) ile elde edilmektedir. Biyokütle piroliz işleminin tek tek aşamaları aşağıdaki denklemlerle temsil edilmiştir:

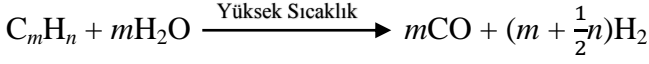


Biyokütle pirolizinden hidrojen üretiminin verimi, hammadde tipine, kullanılan katalizörün tipine, sıcaklığa ve kalış süresine bağlıdır. Biyokütle pirolizinin hidrojen üretim maliyetinin, tesis büyüklüğüne ve biyokütle tipine

bağlı olarak 8,86 \$/GJ ile 15,52 \$/GJ (veya 1,25 \$/kg ile 2,20 \$/kg) arasında olması beklenmektedir (Nikolaidis and Poullikkas, 2017).

### 2.2.6 Gazifikasyon

Biyokütle ile gazifikasyon (gazlaştırma) işlemi, katı biyokütlenin buharla reaksiyonudur.



Gazifikasyon sürecini etkileyen ana parametreler buhar/yakıt oranı, proses sıcaklığı ve basıncı gibi parametrelerdir. Gazifikasyon işleminde farklı gaz dönüştürücüler kullanılmaktadır: sabit yatak, hareketli yatak ve akışkan yatak. İşlem, bu ısının nasıl sağlandığına bağlı olarak oto-termal veya tamamen-termal gerçekleşmektedir. Ototermal gazifikasyon durumunda, gerekli ısı doğrudan gaz dönüştürücünün kendisinde kısmi oksidasyon yoluyla üretilmektedir. Sıvı biyoyakıtlar (etanol, metanol vb.) ve biyogaz, gazifikasyon ile oldukça analog bir işlem olan termokimyasal işlemlerle hidrojene dönüştürülebilmektedir (Dincer, 2012).

### 2.2.7 Biyofotoliz ve foto-fermantasyon

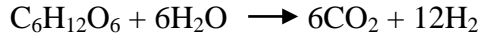
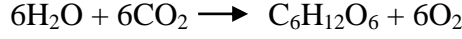
Biyo-fotoliz ve foto-fermantasyon, sudan fotonik güdümlü biyokimyasal hidrojen üretim işlemidir. Biyo-fotoliz yoluyla hidrojen üretimi, doğrudan ve dolaylı türler ve foto-fermantasyon türü olarak ayrılabilir (Dincer, 2012).

Biyo-fotolizde, ışığa duyarlı bazı mikroorganizmalar, özel olarak tasarlanmış bir fotobiyoreaktörde biyolojik dönüştürücü olarak kullanılmaktadır. En uygun mikroorganizmalar mikroalglerdir, çünkü hidrojen evrimi sergilerler ve hidrojen tutulmasına izin verebilen kapalı sistemlerde kültürlenebilmektedirler. Yüksek hidrojen verimleri sergileyen mikroalg suşları kültürlenebilir. Biyo-fotolizin dikkate değer bir avantajı, sulu bir ortamda sudan standart sıcaklık ve basınçta hidrojen üretilmesidir. Biyo-fotoliz henüz ticari kullanım için geliştirilememiştir, ancak laboratuvar ölçeğinde gösterilmiştir. Bu yöntemin enerji verimliliği potansiyel olarak % 10'a kadar ulaşabilmektedir (Dincer, 2012).

Su molekülü, özel koşullar altında siyanobakterilerin eylemiyle biyo-fotoliz yoluyla bölünebilmektedir. Bu mikroorganizmalar nitrojenaz ve hidrojenaz



enzimlerini sudan hidrojen ve oksijen üretebilecekleri şekilde üretilip yönetmektedirler. Hidrojen ürettiği tespit edilen bakteriler: *Anabaena variabilis* PK84, *Anabaena cylindrica*, *Anabaena* AMC 414, *Gloebacted* PCC742, *Synechococcus* PCC602, *Aphanocapsa montana*; ayrıca mikroalg olan *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 ve CC1036'nın hidrojen ürettiği kanıtlanmıştır. Foto-aktifleştirilen enzimler yardımıyla sudan hidrojen üreten genel reaksiyonlar aşağıdaki şekilde yazılabilir:



### 2.2.8 Karanlık Fermantasyon

Organik maddede depolanan biyokimyasal enerji, oksijen yokluğunda veya varlığında hidrojeni çıkarmak için mikroorganizmalarla elde edilebilmektedir. Oksijen tamamen yok olduğunda veya çok düşük miktarlarda mevcut olduğunda, organik maddenin biyokimyasal dönüşümü anaerobik sindirim olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle hidrojen üretim yöntemi için iki önemli taraf vardır: (i) organik atıklardan hidrojen üretilebilmesi; (ii) biyolojik türlerin kontaminasyon tehlikesi ile kontrolsüz mikrobiyal büyümenin kaynağı olabilecek atıkları stabilize edebilmesi (Dincer, 2012).

*Clostridium* türü bakteriler, belirli koşullar altında hidrojen üretim oranını olumlu yönde etkilemiştir. Anaerobik sindirim reaktörlerinde reaksiyon kontrolü ile ilgili önemli bir problem, hidrojen tüketen bakterileri temsil eden metanojenlerin inhibisyonudur. Organik substratta normal olarak bulunan bu bakterileri elimine etmenin bir yolu, substratı tüm bakteri popülasyonunu öldürecek şekilde yaklaşık 100 °C'de kısa süre ısıtmaktır. Ayrıca, *Clostridium* ve *Bacillus* türleri gibi hidrojen üreten bakteriler biyokütle olarak ekilmektedir (Dincer, 2012).

Hidrojenojenler tarafından üretilen enzimlerin (yani hidrojenaz) tercih ettiği olası kimyasal reaksiyonlardan biri, sükrözdan asetik asit fermantasyonudur:



Organik bir substratta, hem nitrojenaz hem de hidrojenaz enzimleri, genel reaksiyonlara göre serbest protonları azaltarak hidrojen üretimine katkıda bulunur:



Burada ATP, adenosin tri-fosfat, ADP, adenosin di-fosfattır ve Pi, yaklaşık 30,5 kJ / mol serbest enerji salan,  $\text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$  reaksiyonuna göre ATP molekülünden ayrılan inorganik fosfat için kısayoldur; bu biyokimyasal enerji reaksiyonu yürütmek için kullanılmaktadır (Dincer, 2012).

Bir çalışmada, 1 mol glikoz başına 7 mol  $\text{H}_2$  hidrojen verimi göstermiştir. Hidrojen üretimi için aerobik sindirim ile ilgili en büyük zorluk, tesisteki her bir sermaye yatırımı başına düşen üretim oranıdır. Melasın (şeker işlemenin bir yan ürünü) anaerobik sindiriminde, %28'de dikkate değer enerji dönüşüm verimliliği gözlenmektedir (Das and Veziroglu, 2008).

### 2.2.9 Su elektrolizi

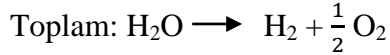
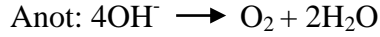
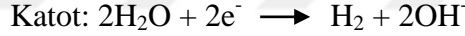
Suyun elektrolizi, suda iki elektrot kullanılarak, elektrik akımın sudan geçirilerek hidrojen ve oksijen elde etme işlemidir. Suyun elektroliz yöntemi, üç farklı tipte elektrolit (alkalin, proton değişim membranı (Proton Exchange Membrane-PEM) ve katı oksit elektrolizörü (Solid Oxide Electrolyser-SOE)) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem için, ticari olarak düşük sıcaklıklı elektrolizörler geliştirilmiş ve 1 atm ve 25°C'de 70,1 – 53,4 kWh\*kg<sup>-1</sup>  $\text{H}_2$  koşullarında %56 - %73 verime sahiptir. Alkalin elektroliz sistemi, diğer su elektroliz yöntemlerine kıyasla en yaygın olanıdır. Katı oksit elektrolizi, elektrik açısından en verimli olmasına rağmen hala geliştirilme aşamasındadır. Korozyon, contalar, termal döngü ve krom göçü katı oksit teknolojisinin karşılaştığı en büyük zorluklardandır. PEM elektroliz sistemi alkalin elektrolizöründen daha verimlidir. Ayrıca, korozyon ve conta sorunları mevcut değildir, ancak maliyeti alkalin elektrolizör sistemlerine kıyasla çok yüksektir. Alkalin elektrolizör sistemi en düşük sermaye maliyetine ve en düşük verime sahiptir, bu nedenle elektrik enerjisi maliyeti çok yüksektir. Son zamanlarda saf hidrojen üretmek için elektrolizörler kullanılmaktadır ve yüksek basınç birimler geliştirilmiştir. Yüksek basınçlı çalıştırma ünitesini kullanmanın avantajı, pahalı hidrojen kompresör kullanımını ortadan kaldırmasıdır. Su elektroliz sistemleri kullanılarak hidrojen üretmek, büyük ölçekte yüksek maliyete neden olmaktadır. Ek olarak, su

elektroliz sistemleri, elektrik üretmek için yenilenemeyen güç üretim kaynağından yararlanmaktadır (El-Shafie et al., 2019).

#### 2.2.10 Alkalın elektrolizi

Alkalın elektrotlar, mikro gözenekli bir ayırıcı ve ağırlıkça yaklaşık %30'luk potasyum hidroksit veya sodyum hidroksit alkalın çözeltisinden oluşmaktadır. Alkalın elektrolizörlerinde en yaygın kullanılan katot malzemesi, katalitik bir platin tabakası olan nikeldir. Anot, metal oksitleri (mangan, wolfram, rutenyum) ile kaplanmış nikel veya bakırdan oluşmaktadır. Elektrolit reaksiyona girmez, ancak hidrojenin yenilenmesi gibi diğer sistemlerin kaybı nedeniyle sürekli olarak tamamlanmalıdır (Bičáková and Straka, 2010).

Alkalın elektrolizörde su, katoda beslenir ve burada elektrolitik malzemeden oksijenin oluştuğu anoda geçen hidrojen ve hidroksil iyonlarına ayrılır. Hidrojen bir alkalın çözeltisi bırakır ve elektrolizörün dışındaki bir gaz-sıvı ayırma ünitesinde sudan ayrılır. Tipik akım yoğunluğu 100-300 mA/cm<sup>2</sup>'dir. Alkalın elektrolizörlerin verimliliği hidrojenin kalorifik değerine göre yaklaşık %50-60'a ulaşmaktadır.

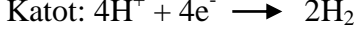


Kloratların veya perkloratların elektrokimyasal üretimi gibi diğer işlemlerde de belli miktarda hidrojen oluşturulabilmektedir (Bičáková and Straka, 2010).

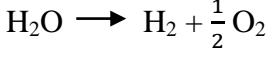
#### 2.2.11 Proton değişim membranı elektrolizi

Proton değişim membran elektrolizörü, polimer elektrolit membranlı bir yakıt hücresi teknolojisi ile çalışmaktadır. Tipik PEM elektrolizörlerinin temeli, elektrot katalizörleri için siyah platin, iridyum, rutenyum ve rodyum kullanılmakta ve bir gaz ayırıcısı olarak işlev gören ince Nafion polimer membranlardan oluşmaktadır. PEM elektrolizöründeki su, hidrojen katyonuna ve oksijene bölündüğü anoda beslenir. Hidrojen katyonları polimer zardan katoda geçer. Katotta, hidrojen katyonları dış devreden akan elektronlarla birleşerek

hidrojen gazı oluşmasına neden olur. Bir PEM elektrolizörünün verimliliği %55-70 civarındadır.



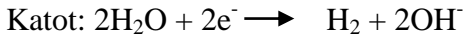
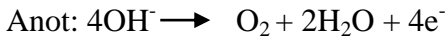
Toplam, alkalın elektrolizör ile aynıdır:



Hidrojenin üretimindeki elektrolitin genel verimliliği esas olarak elektrik enerjisi üretiminin verimliliğine (geleneksel kaynaklar için %30-40) bağlanabilir. Elektrolizin genel etkinliği kabaca %25-35 arasındadır. Bu işlemin avantajı, geniş uygulamalar için aynı anda oksijen üretmesidir (Bıçáková and Straka, 2010).

#### 2.2.12 Katı oksit elektrolizi

Katı oksit elektroliz hücreleri (SOEC) esasen, elektrolit olarak katı madde kullanan yakıt hücrelerinin katı oksitleridir. Elektrolit, artan sıcaklıkta oksijen anyonlarını seçici olarak aktarır. SOEC alkalın sistemi gibi çalışır, çünkü elektrolitten geçerken oksijen iyonu, hidrojeni reaktif olmayan bir buhar akışında bırakır. Katotta su, hidrojen gazı ve negatif yüklü oksijen iyonları oluşturmak için dış devreden elektronlarla bağlanır. Oksijen iyonları zardan geçer ve anotta reaksiyona girerek oksijen gazı oluşturur ve elektronları dış devrede bırakır.

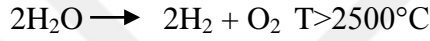


Katı oksit elektroliz hücreleri, 80-100 °C sıcaklıklarda çalışan PEM elektrolizörlerine ve 100-150 °C sıcaklık aralığında çalışan alkalın elektrolizörlere kıyasla 500-800 °C'lik yüksek sıcaklıklarda çalışır. SOEC için kullanılan malzemeler, ZrO<sub>2</sub>'deki Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gibi katı oksit yakıt hücreleri için geliştirilen malzemelere benzer. Anot için malzeme Co-ZrO<sub>2</sub> veya Ni-ZrO<sub>2</sub>'dir, oysa stronsiyum ile katkılı LaMnO<sub>3</sub> katot için kullanılır. Yüksek sıcaklık elektrolizinin verimliliği sıcaklığa ve termal kaynağa bağlıdır ve % 85-90 değerlerine ulaşabilir (Bıçáková and Straka, 2010).

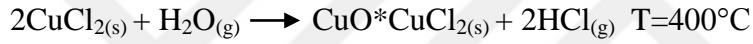
### 2.2.13 Termoliz

Termoliz veya termokimyasal su ayrımı, suyun hidrojen ve oksijene ayrılana kadar yüksek bir sıcaklıkta ısıtılma işlemidir. Birincil enerji giderleri sürdürülebilir ısı kaynakları ile sağlanamadığından, sıcaklığı düşürmek ve genel verimliliği artırmak için birkaç termokimyasal su ayırma çevrimi önerilmiştir. Termokimyasal döngüler, farklı sıcaklıklarda bir dizi kimyasal reaksiyondan oluşur ve ısının, hidrojen formunda kimyasal enerjiye dönüştürüldüğü en umut verici süreçlerden birini oluşturmaktadır. Termokimyasal çevrimin iki örneği aşağıda gösterilmektedir:

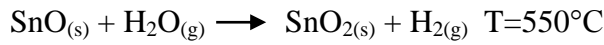
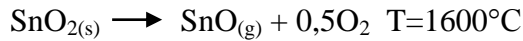
Tek-kademeli su ayrımı:



Çok-kademeli Cu-Cl döngüsü:



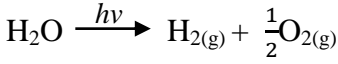
Yeni iki-adımlı SnO<sub>2</sub>/SnO döngüsü:



Gerekli olan yüksek sıcaklık güneş enerjisi veya nükleer enerji ile sağlanabilmektedir. Günümüzde, en umut verici, atmosfere herhangi bir sera gazı (greenhouse gases-GHG) salmadan ve en az 550 °C ısı gerektirmeden Cu-Cl ve Mg-Cl gibi düşük sıcaklık termokimyasal çevrimler görünmektedir. Gerekli ekipman için yapılan sermaye yatırımının yanı sıra, ilgili elementlerin toksisitesi, kimyasalların bulunabilirliği ve maliyeti, malzeme ayrımı ve korozyon problemleri gibi kriterlerin hidrojen üretim maliyetine yansıdığı belirtilmektedir (Nikolaidis and Poullikkas, 2017).

### 2.2.14 Fotoelektroliz

Fotoelektroliz, direkt güneş ışığını kullanarak suyu hidrojen ve oksijene ayırma işlemidir. Fotoelektroliz sistemleri fotovoltaiik sistemlerle aynıdır, her iki teknoloji de yarı iletken malzemeler kullanılmaktadır. Fotovoltaiikte p-tipi ve n-tipi yarı iletken malzemeler kullanılmaktadır. Elektrik akımı, elektronun ters yönündeki zorlanmış hareketi nedeniyle oluşur. Fotoelektroliz işleminde elektrik akımı üretmek yerine su, hidrojen ve oksijene ayrıştırılır. Fotoelektroliz reaksiyonu aşağıdaki şekilde gösterilmiştir:



$\text{WO}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ve  $\text{TiO}_2$  gibi farklı foto elektrot malzemelerinin fotoelektroliz yönteminde ince film olarak kullanılması araştırılmıştır. Fotoelektroliz sistemlerinin performansı esas olarak fotoelektrotlara ve kullanılan yarı iletkenlerin malzemelerine dayanır. Hidrojen üretim verimliliği, tek bant aralığında % 8,3, çift bant aralığında %30 olduğu saptanmıştır (El-Shafie et al., 2019).

### 2.3 Mikroalgler

Mikroalgler, biyosferde yaşayan tek hücreli, fotoototrofik mikroskobik organizmalardır. Çok çeşitli şekil, boyut ve habitata sahiptirler. Aynı zamanda renkleri de yeşil, turuncu ve mor arasında değişmektedir. Bu organizma grubunun taksonomik sınıflandırılması birkaç yüzyıldan beri düzenlenmeye çalışılmaktadır. Ancak hala tamamen çözülemediği ve yeni cihazların ve gözlem tekniklerin geliştirilmesiyle yeni bilgiler eklenmektedir (Naselli-Flores and Barone, 2009).

#### 2.3.1 Mikroalglerin taksonomik sınıflandırma

Algler en az on farklı taksonomik bölüme aittir. Sınıflandırma dört ana hususa dayanmaktadır: (1) pigmentasyon, (2) dahili depolama ürünleri, (3) hücre duvarı ve (4) flajelasyon (Tablo 2.2). Bu taksonomik parametrelerin tümü evrimsel olarak klasik kabul edilir ve bu nedenle taksonomik olarak algleri tanımak için iyi araçlardır (Lowe and LaLiberte, 2006).

**Tablo 2.2:** Mikroalglerin taksonomik sınıflandırılması (Lowe and LaLiberte, 2006).

Şube	Pigmentasyon	Hücre duvarı	Depolama ürünü	Flajel
Bacillariophyta (diyatom)	Klorofil a ve c, fakat karotenoidler baskı, hücre renkleri genellikle altınsı kahverengi	Çoğunlukla SiO <sub>2</sub> ve üst üste binen iki yarıdan oluşmakta	Yağ ve Lökizin	Vejetatif formlarında yok
Chlorophyta (yeşil alg)	Klorofil a ve b baskın	Selüloz ve pektin	Bitki nişastası	Mevcut olduğunda genellikle 2-4 ve eşit uzunlukta
Cyanophyta (mavi-yeşil alg)	Klorofil a ve fikobilinler; mavi-yeşil ile zeytin yeşili renklerinde	Peptidoglikan, gram-negatif	Glikojen benzeri	Yok
Chrysophyta (sarı-yeşil alg)	Klorofil a ve c; sarı-yeşil renk	Pektin ve selüloz	Yağ ve Lökizin	Vejetatif formlarında yok
Rhodophyta (kırmızı alg)	Klorofil a ve Fikoeritrin; zeytin yeşili ve kestane renklerinde	Manna ve ksilan (ince olarak)	Glikojen benzeri	Yok

## 2.4 Mikroalglerin kullanım alanları

### 2.4.1 Biyogübre olarak kullanımı

Mikroalgler, tarımda biyogübre ve toprak düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Siyanobakterilerin çoğu, atmosferik azotu sabitleyebilmekte ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, toprak verimliliğinin korunmasında önemli rol oynamakta, dolayısıyla pirinç büyümesini arttırmaktadır (Sharma and Sharma, 2017). Pirinç yetiştiriciliğinde siyanobakterilerin tarımsal önemi, azot, toprak ve bitki için diğer olumlu etkileri düzeltebilme yetenekleriyle doğrudan ilişkilidir. Sudan sonra azot, birçok alanda bitki büyümesi için ikinci sınırlayıcı faktördür. Bu elementin eksikliği gübreler tarafından karşılanmaktadır. Mavi-yeşil alglerin kullanımıyla, verim artışı ve gübre azotu tasarrufunun yanı sıra, toprağın azot ve karbonunun birikmesi, toprak pH'nın ve elektrik iletkenliğinin artması gibi fiziko-kimyasal özellikleri de gelişmiştir (Priyadarshani and Rath, 2012).

### 2.4.2 Farmasötik kullanımı

Mikroalgler, biyolojik olarak aktif primer (birincil) ve sekonder (ikincil) metabolitler açısından oldukça zengindir. Bu metabolitler, ticari kullanım için farmasötik endüstrisinde potansiyel biyoaktif bileşiklerdir. Farmasötik ve besinsel öneme sahip önemli protein kaynakları ve katma değerli bileşikler olarak ortaya çıkmıştır. Mikroalgler, doğal biyoaktif moleküllerin kaynağı olarak önemli bir çekiciliğe sahiptir. Kimyasal sentezi ile üretilmesi zor olan biyoaktif bileşikleri kültürde üretme potansiyeli bulunmaktadır (Priyadarshani and Rath, 2012). Mikroalglerin içerdiği bileşikler antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar ve antikanser özelliklere sahiptir (Metsoviti et al., 2019). Çeşitli mikroalglerin (örneğin; *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas pyrenoidosa*) ekstraktlarının hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı in vitro antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Sharma and Sharma, 2017). Ayrıca, yeşil alg, diyatom ve dinoflagellat ekstraktlarının in vitro antifungal aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir. *Ochromonas sp.*, *Prymnesium parvum* ve birçok mavi-yeşil alglerin, farmasötik uygulamalarına sahip olabilecek toksinler üretmektedir (Priyadarshani and Rath, 2012). Farmasötik uygulamalarda mikroalgal biyokütleden çıkarılan çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) ve



dokosaheksaenoik asitin (DHA) yıllık 10 milyar dolarlık piyasa değeri vardır ve ayrıca bebeklerin günlük beslenmelerinde önerilmektedir (Naruka et al., 2019).

#### 2.4.3 Akuakültür beslemede kullanımı

Mikroalgler, larva ve yavru balık kültüründe kullanılmasının yanı sıra yavru hayvanların beslenmesinde gerekli olan zooplankton için de kullanılmaktadır. Akuakültürde kullanılan en sık türler; *Chlorella*, *Skeletonema*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* ve *Thalassiosira*'dır (Khatoon and Pal, 2015). Kedi, köpek, akvaryum balıkları, süs kuşları, atlar, kümes hayvanları için genellikle *Spirulina* ve *Chlorella* kullanılmaktadır. Larva beslemelerinde ise *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* ve *Nannochloropsis* tercih edilen mikroalg türleridir. Mikroalg türlerinin özellikle protein açısından zengin olan *Hypnea cervicornis* ve *Cryptonemia crenulata*'nın karides beslenmesinde test edilmesi su ürünleri yetiştiriciliğinde mikroalglerin kullanılmasına bir örnektir. Diğer bir örnek ise, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* ve *Spirulina* gibi mikroalgler karides, salmonid balığı ve süs balığı kültürü için doğal pigment kaynağı olarak kullanılmaktadır (Priyadarshani and Rath, 2012).

#### 2.4.4 Gıdada kullanımı

Mikroalgler, zengin bir karbonhidrat, protein, enzim ve lif kaynağıdır. Ayrıca, A, C, B1, B2, B6, niasin, iyot, potasyum, demir, magnezyum ve kalsiyum gibi birçok vitamin ve mineral mikroalglerde bulunmaktadır. Bu kadar zengin bir temel besin kaynağı olması, özellikle Çin, Japonya ve Kore gibi Asya ülkelerinde önemli bir gıda kaynağıdır (Priyadarshani and Rath, 2012). İnsan beslenmesi için günümüzde tabletler, kapsüller ve sıvılar gibi farklı şekillerde pazarlanmaktadır. Ayrıca makarnalar, atıştırmalık yiyecekler, şeker çubukları veya sakızlar ve içeceklere de dahil edilmektedir (Spolaore et al., 2006). Biyoteknolojik açıdan en uygun mikroalglerden bazıları; *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* çoğunlukla insanlar için besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Mavi-yeşil bir alg olan *Spirulina platensis*, insanlığın bildiği en besleyici gıdalardan biridir. Mükemmel bir protein kaynağı, çoklu doymamış yağ asitleri, pigmentler, vitaminler ve fenolikler içerdiği gösterilmiştir. Günümüzde

*Spirulina*'nın esas kullanımı, mavi fotosentetik bir pigment olan fikosiyaninin elde edilmesi içindir (Priyadarshani and Rath, 2012).

Gıda olarak kullanılan bir diğer potansiyel mikroalg, *Chlorella*'dır. *Chlorella*'nın en önemli ekonomik ürünü, meyve ve sebze koruyucularında kullanılan çeşitli yan ürünlerdir. Bir diğer önemli mikroalg ise *Dunaliella salina*'dır. Bu tür, fotosentetik pigment ve  $\beta$ -karoten kaynağı için yetiştirilmektedir.  $\beta$ -karoten, C vitamini takviyesi olarak kullanılmaktadır. Şuanda mikroalg pazarına *Chlorella* ve *Spirulina* hakimdir. Temel olarak yüksek protein içeriği ve besin değerlerine sahip, ayrıca büyümeleri kolaydır (Priyadarshani and Rath, 2012).

#### 2.4.5 Kozmetikte kullanımı

Mikroalg bileşenleri kozmetikte çoğunlukla kıvamlaştırıcı maddeler, su bağlayıcı maddeler ve antioksidanlar olarak kullanılmaktadır. Kozmetik için kullanılan tipik türler; *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *Ascophyllum nodosum*, *Alaria esculenta*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* ve *Dunaliella salina*'dır. Mikroalg ekstreleri sıklıkla yüz ve cilt bakım ürünlerinde, yaşlanma karşıtı krem, canlandırıcı veya yumuşatıcı bakım ürünlerinde bulunmaktadır. Bunun dışında güneşten korunma ve saç bakım ürünlerinde de kullanılmaktadır (Priyadarshani and Rath, 2012). Bazı mikroalgler, fotosentezde yer alan görünür radyasyonun geçmesine izin verirken kendilerini UV radyasyonundan korumak için sporopollenin, scytonemin ve mikosporin benzeri aminoasitler gibi organik metabolitler üretmektedir (Sharma and Sharma, 2017).

#### 2.4.6 Gıda renklendirici olarak kullanımı

Mikroalgal pigmentler, doğal gıda boyası olarak kullanılmaktadır. Bazı mikroalgler önemli miktarlarda karotenoit içermektedir. Bu karotenoitler, margarine sarı rengi sağlamada, balık etinin ve yumurta sarısının rengini arttırmakta ve tahıl sağlığını ve verimliliğini arttırmakta gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Sharma and Sharma, 2017). Özellikle, doğal  $\beta$ -karoten, sentetikle kıyaslandığında daha üstün fiziksel özelliklere sahiptir. Ulusal Kanser Enstitüsü,  $\beta$ -karotenin antikanserojen olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, kolesterolü kontrol etmede ve kalp hastalığı riskini azaltmada  $\beta$ -karotenin etkili olduğu

yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu bulgular,  $\beta$ -karoteni değerli kılmakta ve talebin artmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, mikroalglerin bir gıda boyası olarak kullanılma potansiyeli sınırlıdır. Bu sınırlamaya rağmen, mikroalg kaynaklı gıda renklendirme pazarı geniştir. *Dunaliella salina*, fotosentetik pigment olan  $\beta$ -karoten için yetiştirilmektedir ve turuncu bir boya olarak kullanılmaktadır (Priyadarshani and Rath, 2012).

#### 2.4.7 Yüksek değerli molekül olarak kullanımı

Bilinen en az 30.000 mikroalg türü bulunmaktadır. Sadece bir kısmı şunda ticari öneme sahiptir. Bunlar genellikle pigmentler veya proteinler gibi yüksek değerli bileşenlerin çıkarılması için yetiştirilmektedir. Mikroalgler, fonksiyonel içerik olarak kullanılacak biyolojik aktiviteye sahip yeni bileşik kaynağı olarak gösterilmektedir. Aslında, bazı mikroalgler ekstrem koşullarda (yüksek tuzluluk, düşük sıcaklık, UV ışınları gibi) yaşayabilmektedir. Bu nedenle hayatta kalabilmek için diğer canlılarda bulunmayan çok çeşitli ikincil metabolitler üretmektedirler. Ayrıca, büyük taksonomik çeşitlilik göz önüne alındığında, biyolojik olarak yeni aktif bileşiklerin aranması oldukça geniş bir alan olarak görülebilir. Deniz mikroalgleri, birkaç hastalığın önlenmesinde veya tedavisinde etkili olduğu gösterilen yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile önemli bir yenilenebilir biyoaktif lipid kaynağı olarak kabul edilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri, kardiyovasküler bozukluklar, kanser, tip 2 diyabet, enflamatuar bağırsak rahatsızlıkları, astım, artrit, böbrek ve cilt rahatsızlıkları dahil olmak üzere depresyon ve şizofreni gibi birçok hastalığın önlenmesinde veya tedavisinde etkili olduğu gösterilmektedir. *Dunaliella*, *Chlorella* ve *Spirulina* türleri, lipidler, protein ve pigmentler gibi yüksek değerli bileşikler üretmek için başarıyla kullanılmaktadır (Priyadarshani and Rath, 2012; Sharma and Sharma, 2017).

#### 2.4.8 Biyoyakıt olarak kullanımı

Mikroalgler, yüksek yağ içeriği ve hızlı biyokütle üretimi nedeniyle biyoyakıt üretimi için potansiyel olarak iyi kaynaklar olarak kabul edilmektedir (Khatoon and Pal, 2015). Son yıllarda, alternatif bir biyodizel hammaddesi olarak mikroalg kullanımı, araştırmacılardan ve girişimcilerden büyük ilgi görmektedir. Mikroalgler bu konuyla ilgili birçok avantaj sunmaktadır:

- Soya fasulyesi ve diğer yağ bitkilerinden daha yüksek (1000-4000 galon/dönüm/yıl) üretilebilmektedirler.
- Geleneksel tarımla rekabet edemezler, çünkü geleneksel yiyecek ve yem değildirler. Ayrıca, büyük açık havuzlarda veya tarıma elverişli olmayan arazilerde bulunan kapalı fotobiyoreaktörlerde üretilebilirler.
- Çok çeşitli iklim ve su koşullarında yetişebilir ve CO<sub>2</sub>'yi pek çok kaynaktan kullanabilirler.

Trans-esterifikasyon yoluyla biyodizel, fermantasyon yoluyla biyoetanol, anaerobik sindirim yoluyla metan, yanma yoluyla ısı, termokimyasal dönüşüm yoluyla biyo-yag, biyolojik kömür ve yüksek proteinli hayvan yemi gibi geniş ürün yelpazesine sahiptir (Priyadarshani and Rath, 2012).

Algal biyoyakıt çalışmalarındaki en son trendlerden biri olan biyohidrojen ise, ilk olarak 1942'de literatürde ortaya çıkmaktadır. Günümüzde algal hidrojen üretiminin bilinen metabolizması, hidrojenaz olarak adlandırılan bazı enzimlerin anaerobik koşullar altında aktivasyonudur. Algal biyohidrojen üretimi bazı yönlerden değerlendirilmektedir: (1) hidrojenaz enzimlerinin oksijene duyarlılığı; (2) inhibitörlerin hidrojen üretim mekanizması ile ilişkisi; (3) mikroalg türlerine özgü hidrojen üretimi; (4) hidrojen üretiminin genetik temeli; (5) depolama metabolizmasını değiştirmek için hücre metabolizmasının düzenlenmesi; (6) beslenmenin PSII sistemine etkisi; (7) biyofotolizin değerlendirilmesi; (8) verimli bir üretim için genetik mühendisliği araçları; (9) ticarileştirme ve büyüme; (10) sürdürülebilir biyohidrojen üretimi için immobilizasyon (Öncel et. al, 2015b).

### 2.5 *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii*, adı; χλάμυς (chlamys) pelerin veya örtü, μόνος (monas) tek olan Yunancadan gelen tek hücreli bir yosundur (Dubini, 2011). *Chlamydomonas reinhardtii* hücreleri, ön uçlarında iki flagel bulunan, oval şekilli, yaklaşık 10 µm uzunluk ve 3 µm genişliğindedir. Hücreler, hücre hacminin %40'ını işgal eden tek bir kloroplast ve birkaç mitokondri içerir. Bu hücreler çiftleşme tipi (+) veya çiftleşme tipi (-) olarak bulunur. Haploid vejetatif hücreler mitotik bölünmelerle çoğalır. Bununla birlikte, azot açlığı üzerine vejetatif hücreler, uygun aydınlık-karanlık koşullar altında mayoz geçirecek ve vejetatif büyümeye devam edebilen dört haploid kız hücresi üretecek olan bir zigot

oluşturacak şekilde gametlere ve çapraz çiftleşme tipi kaynaşmayla oluşan hücrelere farklılaşırlar. Çiftleşme reaksiyonundan sonra mitotik olarak bölünen diploid hücrelerin geri kazanılması da mümkündür (Rochaix, 2013). Bu tatlı su yosunu, sıralı bir genomun mevcudiyeti, genomunu manipüle etmek için çok çeşitli karmaşık genetik araçlar, eksprese edilmiş bir sekans etiketi gibi biyoinformatik araçların varlığı, klasik genetik analizlere ve çeşitli genotiplerin üretilmesine / incelenmesine izin veren basit bir eşeyssel döngüye sahip olması nedeniyle yeşil alglerde biyoyakıt çalışmaları için bir model organizma haline gelmiştir. *Chlamydomonas* bu nedenle hidrojen, etanol ve lipit üretim yollarında bir dizi bilginin mevcut olduğu iyi bir çalışma modelidir (Dubini, 2011).

Ehrenberg, 1833'te *Chlamydomonas* cinsini ve 1888'de Dangeard *C. reinhardtii* türünü tanımlamıştır. *Chlamydomonas*, 20. yüzyılın başlarında genetik çalışmalar için uygun bulunurken, *C. reinhardtii*'nin model bir organizma olarak gelişimi, ilk mutantların üretildiği 1950'lere dayanmaktadır (Harris, 2009). *C. reinhardtii*, iç transkripsiyonlu aralayıcıların (ITS) veya çeşitli filogenetik olarak bilgilendirici genlerin sekanslanması yoluyla açık bir şekilde tanımlanabilir (Pröschold et al., 2005). Yine de birçok ekolojik çalışma *Chlamydomonas* türlerini tanımlamak için ışık mikroskobuna dayanmaktadır (Sasso et al., 2018).

Optimum koşullar altında *C. reinhardtii* çok hızlı büyür ve yaklaşık 8 saatte bir ikiye katlanabilmektedir (Sasso et al., 2018). Büyüme ortamında asetat mevcudiyetinde, *C. reinhardtii* hücrelerinin fotosentetik fonksiyonuna gerek kalmayabilir. Bu özellik, fotosentetik aktivitede eksik olan mutantların izole edilmesi ve muhafaza edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücreler böylece, tek karbon kaynağı olarak CO<sub>2</sub> ve ışık içeren minimal ortam (fototrofik büyüme), ışıklı (miksotrofik büyüme) veya ışısız (heterotrofik büyüme) asetat içeren ortam olmak üzere üç farklı koşulda büyütülebilir. Daha da önemlisi, karanlıkta yetişen *C. reinhardtii* hücreleri, ışık yokluğunda klorofil sentezleme kabiliyetlerinden dolayı fonksiyonel bir fotosentetik araç sağlarlar. Hücrelerin büyümesi aydınlık-karanlık döngülerle kolayca senkronize edilebilir (Rochaix, 2013).

### 2.5.1 *Chlamydomonas reinhardtii* ve biyohidrojen

Tek hücreli yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*, kloroplast stromada lokalize olmuş oldukça aktif olan [FeFe] -hidrojenaz HydAl enzimine sahiptir. Bu molekül  $O_2$ 'ye karşı oldukça duyarlıdır ve sadece  $O_2$  yokluğunda ifade edilebilmektedir. Enzim, fotosentetik elektron taşıma zincirinin indirgeyici bölgesinde yer almaktadır ve elektronları doğrudan ferrodoksenden kabul etmektedir. Bu nedenle hidrojen,  $CO_2$  asimilasyonu olan diğer indirgeyici yollardaki elektronlar için rekabet eder. *C. reinhardtii*'de hidrojen üretimi,  $CO_2$  konsantrasyonu düşük olduğunda veya tam tersi olduğunda en yüksek olduğu gösterilmiştir (Hemschemeier et al., 2008).

Hidrojen üretimi sadece ışıpta gözlenmektedir. Bu da fotosentetik ışık reaksiyonlarından kaynaklanan elektronların  $H^+$  indirgenmesi için ana elektron kaynağı olduğunu göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda, PSI'in *C. reinhardtii*'de hidrojen üretimi için vazgeçilmez olduğu, oysa PSII'nin olmadığı gösterilmiştir. PSII'nin hidrojen foto-evrimi için gerekli olmamasına rağmen, hidrojenaz için bir elektron kaynağı olmaktadır, bunun sonucunda aynı anda  $H_2$  ve  $O_2$  üretimi ile sonuçlanmıştır. Ancak, bu işlem sadece geçici olarak (60-90 s) gerçekleşmektedir. Çünkü hidrojenaz fotosentetik olarak üretilen  $O_2$  tarafından inhibe edilmektedir. Hidrojen foto-evrimi için elektron sağlayabilen ikinci bir yol, NAD(P)H-plastokinon-oksidoredüktaz ile plastokinon (PQ) havuzundaki NAD(P)H'den elektron aktararak gerçekleştirilen fotosentetik elektron taşınması ile organik substratların oksidatif degradasyonunu birleştirmektir. PQ havuzundaki fotokimyasal olmayan indirgenme yüksek bitkilerde ve *C. reinhardtii*'de gözlemlenmiştir (Hemschemeier et al., 2008).

Melis et al. (2000), sülfür (S) yoksunluğuna dayanan ve uzun süreli hidrojen üretimine izin veren bir deney protokolü önermişlerdir. Bu protokol iki aşamalı bir sürece dayanır: ilk aşamada, oksijenli fotosentez, biyokütle ve karbonhidrat depolarının üretimini yönlendirir ve ikinci bir anaerobik aşama sırasında hidrojenaz indüklenerek hidrojen üretilir. Sülfür açlığının hidrojen üretimine iki önemli etkisi vardır: (1) besin açlığına genel bir yanıtı tanımlayan büyük bir nişasta birikimi, (2) PSII aktivitesinde kademeli bir düşüş. Fotosentetik  $O_2$  oluşum hızı solunum hızının altına düştüğünde, hidrojenazın indüklenmesini

ve birkaç gün boyunca önemli miktarlarda hidrojen üretilmesini sağlayan anaerobik koşullar oluşarak hidrojen biriktirmeye başlar. Hidrojen üretimine paralel olarak nişasta parçalanır (Chochois et al., 2009; Hemschemeier et al., 2008).

Hidrojen üretimini analiz etmek için yapılan deneyler gözlemlendiğinde, sülfür yoksunluğunda hidrojen üreten *C. reinhardtii* hücrelerinde, protonların indirgenmesi için elektronlar farklı kaynaklardan meydana getirilmiştir. Bu elektron kaynaklarından biri, PSII'nin artık su-ayırma aktivitesiyle, diğeri ise elektronların fotokimyasal olmayan PQ indirgenmesi yoluyla fotosentetik elektron taşıma zincirine aktarılma sonucu gerçekleşmiştir. Melis et al. (2000), hücre içi rezervlerin (nişasta, protein) oksidasyonunun hidrojenaz yolu için ana elektron kaynağı olduğunu öne sürerken, diğeri PSII aktivitesinin temel elektron donörü olduğunu belirtmiştir. DCMU'nun (3-(3,4-diklorofenil) -1,1-dimetilüre) H<sub>2</sub>-evrimi üzerindeki uzun vadeli etkisi ile ilgili sonuçlara bakıldığında, sülfür içermeyen ortama transfer edildikten hemen sonra DCMU ile muamele edilen alg kültürlerinde nişasta birikiminin ve hidrojen üretiminin neredeyse tamamen önlendiği gösterilmiştir. Ancak, DCMU ilavesinden önce nişasta biriktirebilen *C. reinhardtii* kültürleri hidrojen üretmiştir, bu da PSII'nin hidrojen üretimi için vazgeçilmez olan nişastanın oluşumu için gerekli olduğunu göstermektedir.

Hidrojen üretiminde nişasta fermantasyonunun önemi, Gibbs et al. (1986)'nın öncü çalışmalarında fark edilmiştir. Sta6 ve sta7'nin nişastasız *C. reinhardtii* mutantlarının hidrojen üretme yeteneklerinin güçlü bir şekilde etkilendikleri gözlemine dayanarak, Posewitz et al. (2004) nişasta metabolizmasının *C. reinhardtii* hidrojen üretiminde merkezi bir rol oynadığını ileri sürmüştür (Chochois et al., 2009).

#### 2.5.1.1 D1 proteini

İki fotosistem (PS) reaksiyon merkezi, PSII ve PSI tarafından başlatılan çoklu birim klorofil-protein kompleksleri, güneş ışığından toplanan enerjiyi kullanarak sudan NADP + 'ya elektron transferini katalize eder. PSII reaksiyon merkezinin özünde, redoks kofaktörleri ile iki protein, D1 ve D2'den oluşan bir heterodimer bulunur. D1 proteini, hızlı, foton-akışa bağımlı bir dönüş ile

karakterize edilir ve doğrudan fotosentetik elektron taşınmasına ve oksijen gelişimine aracılık eder (Antonacci et al., 2018).

Sülfürün D1 protein sentez mekanizmasındaki rolü 1998'den beri bilinmektedir. Sülfür yoksunluğunun hücrelerin fotosentetik aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olduğu ve ayrıca D1 sentezinde bozulma olduğu belirtilmiştir. D1 proteinindeki amino asitlerin yapı taşlarından biri olan kükürt, D1 aktivitesini kontrol etmek için kilit noktadır. Bu bulgularla genetik manipülasyonlar yapılarak, D1 protein onarım aktivitesini azaltması böylece PSII aktivitesinin düşürülmesiyle hidrojen üretimine katkı sağlaması amacıyla da kullanılmaktadır (Öncel et al., 2015a).

Genellikle, D1 proteininin hızlı, ışığa bağımlı devrinin PSII fotoinaktivasyonu (PSIPI) tarafından tetiklendiği varsayılmaktadır ve bu nedenle asıl amaç fotoinaktif PSII komplekslerinin onarımıdır (Komenda, 2000). PSII reaksiyon merkezini oluşturan alt birimlerin işlevselliğine büyük ilgi gösterilmiştir. Bunlar arasında D1 proteini, ışığa bağlı bir şekilde meydana gelen en yüksek devir hızına sahiptir. D1 reaksiyon merkezi proteininin QB bağlanma yerinin PSII yoluyla fotosentetik elektron taşınması için gerekli olduğu ve hasar oluşumunun sinyalizasyonunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Faraloni and Torzillo, 2010). Bu bölgede yapılan birçok amino asit süstitüsyonundan sadece birkaçında D1 fonksiyonu fotosentetik kabiliyetinin kaybına neden olur ve bu durum çoğu pozisyonun kalıntı grubu konformasyonunda veya yükünde önemli farklılıkları tolere edebileceğini ve hala D1 fonksiyonuna izin verebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, optimum PSII aktivitesi için belirli kalıntılar gerekli olabilir veya belirli çevresel koşullar altında fonksiyonel avantajlar sağlayabilir (Torzillo et al., 2008).

PSII reaksiyon merkezinin yapısal çözünürlüğü, D1 ve D2 protein heterodimerinin ışıkla çalışan fotokimyasal reaksiyonlarda yer alan, bağlı redoks kofaktörleri de dahil olmak üzere atom detayları ve yapısal / fonksiyonel ilişkiler sağlamıştır. Daha önce, herbisite (örneğin, atrazine, DCMU) dirençli yabancı otların D1 proteinlerinde tek amino asit kalıntısı ikameleri olduğu, ancak D1 protein sentezinden etkilenmediği tespit edilmiştir. Herbisit duyarlılığının değiştirilmesinin yanı sıra, D1'in DE-stromal halkasındaki bölgeye özgü



mutasyonlar, çoğunlukla birincil (QA) ve ikincil (QB) PSII kinonları arasındaki elektron transferinin bozulması nedeniyle mutant fotoototrofik büyümenin ve fotosentetik performansın ciddi şekilde azalmasına neden olmuştur (Antonacci et al., 2018).

D1 proteininin bir başka temel işlevi, PSII aracılı elektron taşınmasında yer alan kofaktörlerin çoğuna bağlanmasıdır. S155 ve D170 arasındaki amino asit kalıntılarının çoğu, oksijen gelişen kompleks seviyesinde D1-Y16'dan P680 + 'a elektron transferine aracılık etmede çok önemli olabilir ve bazılarının manganez kümesinin bağlanması için çok önemli olduğu keşfedilmiştir (Torzillo et al., 2008).

D1'in QB bağlanma bölgesindeki tek noktalı mutasyonların metabolik sonuçları, QB bölgesi ana herbisit bağlayıcı niş olan bu nedenle hem yapısal hem de düzenleyici fonksiyonlar açısından büyük ilgi çekmektedir. QA'dan QB'ye elektron transferi, PSII'nin indirgeyici hızını belirleme aşamasıdır ve bu nedenle, D1 üzerindeki QB bağlanma bölgesi, fizyolojik stresle başa çıkma olgularını akış yönündeki genetik kontrolü için avantajlı bir yerdir (Antonacci et al., 2018).

Bir çalışmada, *C. reinhardtii*'nin bir D1 mutant suşu, hidrojen oluşum kapasitesi açısından taranmıştır (Torzillo et al., 2008). Makarova et al., (2007), D1 proteini üzerindeki mutasyonlara olan ilgi (1) PSII reaksiyon merkezinde önemli bir rol oynaması ve (2) sülfat eksikliğinde üretim hacminin büyük ölçüde etkilenmesi nedeniyle artmaktadır. Hidrojen üretim metabolizmasında yer alan ana yolların katkısının daha iyi anlaşılması hidrojen çıktılarını iyileştirmek için esastır (Scoma et al., 2012).

#### 2.5.1.2 Siklik elektron akışı

Fotosentezin doğrusal elektron akışına ek olarak, PSI çevresindeki siklik elektron akışı (CEF), PSI'nin alıcı tarafında bulunan elektronların (azaltılmış ferredoksin veya NADPH) sistemler arası elektron taşıma zincirine, yani PQ havuzuna veya sitokrom b6 / f kompleksine izin verir. CEF'nin, fotokimyasal olmayan sönüm (NPQ) oluşumunda yer alan bir tilakoid trans-membran proton gradyanı oluşturduğu gösterilmiştir. *Chlamydomonas*'ta CEF, PSI ve PSII arasındaki uyarma enerjisinin yeniden dağıtılmasında yer alan bir olgu olan durum geçişiyle düzenlenir. Durum 1'den durum 2'ye geçiş, örneğin anaerobik koşullar

altında PQ havuzunun redoks durumundaki bir artışa yanıt olarak gerçekleşir. Bu, STT7 kinazı mobil ışık hasat kompleksi II'yi (LHCII) fosforile etmek için tetikler, bu da fosforile LHCII'nin PSII'den PSI'ya taşınmasına neden olur. CEF'nin, CEF'de yer alan fonksiyonel bir süper kompleksin varlığının son zamanlarda tanımlandığı durum 2'de özellikle aktif olduğu gösterilmiştir. PGR5 ilk olarak *Arabidopsis thaliana*'da NPQ'dan etkilenen *Arabidopsis* mutantlarının bir ekranından CEF'nin temel bir moleküler bileşeni olarak tanımlanmıştır. Daha yakın zamanlarda, Proton Gradyan Regülasyonu Benzeri 1 (PGRL1) *Arabidopsis*'te CEF'nin bir başka önemli bileşeni olarak tanımlanmıştır ve hem PGR5 hem de ferredoksin ile etkileşime girmiştir. *C. reinhardtii*'de PGRL1'in aşağı regülasyonu, özellikle demir eksikliği koşulları altında CEF'de bir bozulma ile sonuçlanmıştır. Hidrojen üretimi ve CEF arasında çekirdeğe kodlanmış bir mitokondriyal proteinden etkilenen *C. reinhardtii* mutantının çalışmasına dayanarak bir ilişki önerilmiş olsa da, bu korelasyonun mekanik doğası henüz belirlenmemiştir (Tollete et al., 2011).

Mitokondride, elektronların NADH substratlarından ve süksinattan transferi, enzimatik kompleksler I, II, III, IV tarafından katalize edilmektedir ve moleküler oksijen nihai alıcıdır. Elektron transferi, I, III ve IV kompleksleri tarafından üretilen bir elektrokimyasal transmembran gradyanı vasıtasıyla ATP sentezine tekrar bağlanmaktadır. Kloroplastlarda olduğu gibi elektronlar, alternatif oksidaz (AOX) yoluyla kompleks III ve IV aktivitelerini atlayarak veya alternatif bir NADH dehidrojenaz (Nda1 gibi) yoluyla kompleks I aktivitesini atlayarak alternatif yolları takip edebilmektedir. Bu iki yol, elektrokimyasal transmembran gradyanının oluşumuna bağlı değildir ve solunumun enerji verimini azaltmaktadır. Aynı zamanda ubikinonun azaltılmış ve oksitlenmiş formları arasındaki oranı veya NADH tüketimini koruyarak stres koşullarında düzenleyici olarak da hareket eder (Larosa et al., 2018).

Fotosentetik organizmalarda hem kloroplast hem de mitokondri, ortamdaki kaynaklanan birçok farklı uyarana cevap verir ve sürekli iletişim halindedir. Bu, CEF'nin aktivasyonu yoluyla kloroplastta NADP<sup>+</sup> azalmasına karşı ATP sentezini tercih eden fotosentetik sistemin yeniden düzenlenmesini sağlayan solunum komplekslerinden etkilenen *Chlamydomonas reinhardtii* mutantları tarafından iyi örneklenmiştir. Öte yandan, kloroplast proteinlerindeki değişikliklerin

mitokondriyi etkilediği gösterilmiştir. Örneğin, CEF'de değiştirilen fotosentetik PGRL1 mutanlığı solunumda artış göstermiştir (Larosa et al., 2018).

### 2.5.1.3 Alternatif oksidaz

Mitokondriyal alternatif oksidaz (AOX), solunum zincirinin kompleks III ve kompleks IV'ünü atlayan bir terminal ubikinol oksijen oksidoredüktazdır. Aktivitesi, sitokrom yolağı ile AOX'un kendisi arasında bir elektron ayrışması oluşturur, bu da sonuçta solunum zincirinin elektronu başına proton pompalama verimliliğinde bir azalmaya yol açar. Böylece, AOX'un aktivitesi ATP üretimiyle birleştirilmez ve üretilen serbest enerji ısı olarak dağıtılır. Bu, AOX'un çok yaygın olduğu özelleşmiş dokudaki termojenizden sorumludur (Araceae çomacağı). Termojenik olmayan dokularda ve hücrelerde AOX'a iki önemli rol bağlanmıştır. İlk olarak, indirgenmiş ve oksitlenmiş ubikinon formları arasında uygun bir oran korunarak, AOX'un aktivasyonu, zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine yol açabilecek solunum zinciri bileşenlerinin aşırı azaltılmasını önleyen bir mekanizma olabilmektedir. İkincisi, mitokondriyal ubikinon havuzu, enerji metabolizmasının redoks güç tıkanıklığı olarak kabul edilebilir ve çeşitli dehidrojenaz türlerinden elektronları kabul eder. Sonuç olarak, ubikinolün AOX tarafından yeniden oksidasyonu, yüksek indirgenmiş substrat arzı ve / veya yüksek fosfat potansiyeli durumunda solunum zincirinin yukarıdaki oksitlenmiş kofaktörlerin rejenerasyonuna da izin verecektir. Daha yüksek bitkilerde, çok çeşitli stres faktörlerinin AOX gen transkripsiyonunu ve / veya AOX protein ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir. Bunlar arasında soğutma, oksidatif stres, tuz stresi, ağır metallerle maruz kalma, fosfat sınırlaması ve sitokrom yolunun inhibisyonu veya kısıtlaması bulunmaktadır (Mathy et al., 2010).

Tüm bu çalışmalar, hücre fizyolojisindeki AOX'un farklı olası rollerini tanımlamış, AOX'un aerobik metabolizma dengesinin son kontrol noktasını oluşturduğunu ve çeşitli streslerle karşı en uygun metabolik kararlı durumun korunmasını sağladığını göstermiştir. Dolayısıyla, enerji dağıtma sistemlerinin aşırı ekspresyonu veya inaktivasyonu yoluyla oksidatif fosforilasyon veriminin bozulması, bu sistemlerin ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri dengelemek için yukarıdaki metabolik yollar üzerinde küçük bir etkiye sahip olduğu

belirtilmektedir. Ayrıca, bu gibi durumlarda önemli sayıda faktörün etkilenmesi muhtemel olduğundan, karşılaştırmalı proteomik gibi küresel araştırma tekniklerinin kullanılması, etkilenebilecek önemli metabolik yolları tanımlamak için uygun bir seçenek gibi görünmektedir (Mathy et al., 2010).

#### 2.5.1.4 Proton gradyan regülasyonu benzeri 1 kompleksi

Fotosentetik ökaryotik organizmaların metabolizmalarında, NADPH ve ATP'yi besleyen molekülerin sentezi için kloroplast ve mitokondri olmak üzere iki organel bulunmaktadır. Bu iki organel, proton translokasyonuna bağlı elektron transferinde yer alan, membrana bağlı enzimatik kompleksler ve ATP sentezini yönlendiren bir proton hareket kuvveti gibi ortak özellikleri bulunmaktadır (Larosa et al., 2018).

Kloroplastlarda ışık enerjisi, fotosistem II (PSII), sitokrom b6f (Cyt b6f) kompleksi ve fotosistem I (PSI) ile doğrusal elektron akışı (LEF) olarak adlandırılan bir yolda, NADPH üretmek için sudan NADP + 'ya elektron taşınmasını sağlamaktadır. LEF, kloroplast stromadaki tilakoid lümeninden proton translokasyonuna bağlanmaktadır ve ATP sentezi için ATP sentazından faydalanan bir transmembran elektrokimyasal potansiyel oluşturmaktadır. Ancak elektronlar, ATP ve NADPH'nin talebinin / mevcudiyetinin sürekli değiştiği koşullarda, özellikle dalgalanan ışık yoğunluğunda, önemli bir rol oynayan alternatif yolları da takip edebilmektedir. Bu alternatif elektron akış yollarına örnek olarak plastid alternatif oksidaz, su-su döngüsü ve PSI etrafındaki siklik elektron akışını içermektedir. CEF ile ilgili iki yol yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii* model organizmada tanımlanmıştır: (1) NDA2 NADPH: plastokinon oksidoredüktaz, plastokinonda indirgenen NADPH'ı kullanmaktadır. (2) Ferrodoksin: plastokinon oksidoredüktaz aktivitesi ile PGR5-PGRL1 kompleksi (Larosa et al., 2018).

Bu çalışmadaki amaç, biyohidrojen üretiminde model organizmalardan biri olan *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgine ait farklı mutasyonları içeren suşların biyohidrojen üretim potansiyellerini belirlemektir. Bunun için, iki farklı biyohidrojen üretim metodu denenmiş ve elde edilen veriler doğrultusunda en çok hidrojen üreten suşlar ile 2,5 L'lik karıştırmalı tank fotobiyoreaktöründe hidrojen üretimleri gerçekleştirilmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereç

##### 3.1.1 Mikroalg

Kültivasyon ve hidrojen üretiminde model organizma olarak *Chlamydomonas reinhardtii*'nin 11 farklı suşu, CC124, D1 mutantları D239-40, D240, D240-41 (Dr. Giuseppe Torzillo and Dr. Cecilia Faraloni, CNR, İtalya), WT (wild type), PGRL1 mt (-), PGRL1 mt (+), PGRL1xΔnd4 Véro, PGRL1xΔnd4 1130, AOX, T-1 (Prof. Dr. Claire Remacle, Liège Üniversitesi, Belçika) kullanılmıştır.

##### 3.1.2 Mikroalg kültivasyonu

Büyüme eğrisi için, 250 ml'lik erlenmayer şişeler kullanılarak iki farklı üretim ortamında kültivasyon gerçekleştirilmiştir. Bu ortamlar TAP (Tris-Asetat-Fosfat) (Tablo 3.1) ve HS (Sueoka's high salt medium) (Tablo 3.2) 'dir. Bütün çalışmalar aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Ortam sterilizasyonları ve kullanılacak gereçlerin sterilizasyon işlemleri 121 °C'de 20 dakika otoklav cihazı kullanılarak buhar sterilizasyon yöntemiyle steril edilmiş ve Biyogüvenlik Seviyesi 2 çalışma kabininde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.1:** TAP üretim ortamının formülasyonu.

Kimyasal Adı	Miktar (g/L)	Stok İsmi	Konsantrasyon (ml/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	108	Fosfat	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56	Tamponu	
NH <sub>4</sub> Cl	40	Nutrient Stok	10
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	5		
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	10		
Na <sub>2</sub> EDTA	57,05	Hutner's Trace Element	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4		

MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	5,06		
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,61		
Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> *4H <sub>2</sub> O	1,1		
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	22		
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	4,99		
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	1,57		
Tris	121,14	Tris	20
Asetik asit	Sıvı formda	Asetik Asit	1

**Tablo 3.2:** HS üretim ortamının formülasyonu (Nagy et al., 2018).

Kimyasal Adı	Miktar (g/L)	Stok İsmi	Konsantrasyon (ml/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	288	Fosfat	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	144	Tamponu	
NH <sub>4</sub> Cl	100	Beijerinck's Stok	5
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2		
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	4		
Na <sub>2</sub> EDTA	57,05	Hutner's Trace Element	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4		
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	5,06		
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1,61		
Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> *4H <sub>2</sub> O	1,1		
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	22		
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	4,99		

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57		
---	------	--	--

### 3.1.3 Hidrojen üretimi

Hidrojen üretimi aerobik ve anaerobik olarak iki fazdan oluşmaktadır. İki faz için de 1L'lik Roux tipi panel fotobiyoreaktörler ve 2,5L'lik karıştırılmalı tank (Sartorius Biostat A-plus; Almanya) tipi fotobiyoreaktörler kullanılmıştır. Anaerobik faz için sülfür içermeyen TAP-S ortamı (Tablo 3.3) kullanılarak hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.3:** TAP-S üretim ortamının formülasyonu.

Kimyasal Adı	Miktar (g/L)	Stok İsmi	Konsantrasyon (ml/L)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	108	Fosfat	1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	56	Tamponu	
$\text{NH}_4\text{Cl}$	40	Nutrient Stok	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5		
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,67		
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	57,05	Sülfürsüz Trace Element	1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	11,4		
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5,06		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,61		
$\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,1		
$\text{ZnCl}_2$	16,67		
Fe(III) Sitrat	4,7		
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,07		
Tris	121,14	Tris	20

Asetik asit	Sıvı formda	Asetik Asit	1
-------------	-------------	-------------	---

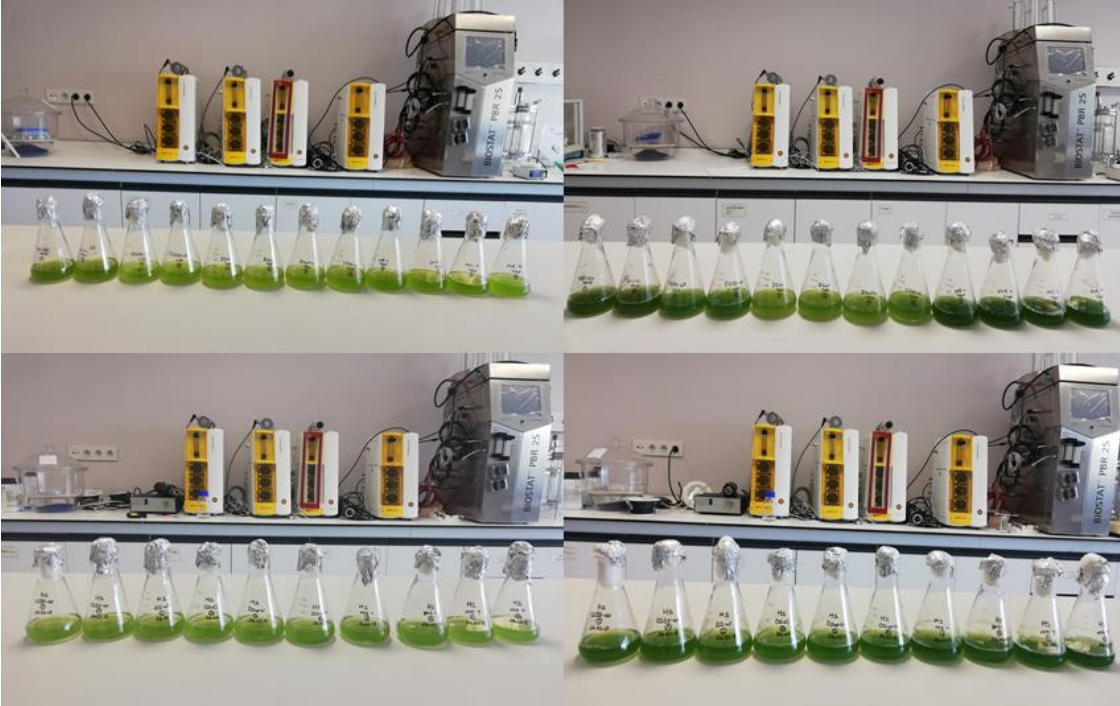
### 3.1.4 Hidrojen ölçümü

Uzun, silindirik şeklindeki su dolu cam kolonlarda suyun hareketine göre günlük olarak hidrojen gazının ölçümleri yapılmıştır.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Mikroalg kültürasyonu

Stok kültürler için, petriyelerden alınan 11 suş sırayla ölçek büyütme yapılarak 25 ml, 100 ml, 250 ml’lik erlenlerde hazırlanmıştır. Büyüme eğrisi için HS ve TAP besin ortamlarında 250 ml’lik erlenlere, stok kültürlerden başlangıç klorofil konsantrasyonu  $4 \pm 1$  mg/L olacak şekilde inokulum yapılmıştır (Şekil 3.1). Erlenlerin çalışma hacmi 100 ml’dir. Kültürler, 21 °C’de, 100 rpm karıştırma hızında,  $\sim 40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde üretilmiştir. 10 gün boyunca kültürlerin büyüme fazları analizler yapılarak izlenmiştir.



**Şekil 3.1:** Erlen üretimlerinde ilk ve son gün kültürlerin görüntüleri



### 3.2.2 Yapılan analizler

#### 3.2.2.1 pH analizi

pH ölçümler masa tipi pH metre (HANNA Instrument, Woonsocket, USA) kullanılarak pH değerleri kaydedilmiştir.

#### 3.2.2.2 Klorofil Tayini

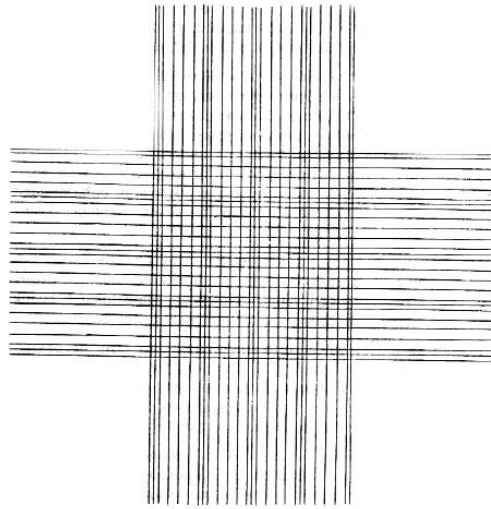
1 mLörnek cam tüplere alınarak 3500 rpm, 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatanttan ayrılan pellet halindeki biyokütleyle 5 mL%90'lık aseton eklenmiştir. 1-2 dakika karanlıkta bekletildikten sonra, 3500 rpm, 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant, cam küvetlerde sırasıyla, 450, 630, 645, 663 ve 750 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçülmüştür. Kör olarak %90'lık aseton kullanılmıştır. Spektrofotometrede ölçüm sonucunda aşağıdaki formüle bu dalga boylarındaki absorbanslar yerleştirilerek klorofil-a miktarları hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil-a } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) =$$

$$\left[ \left( 11,64 * (A_{663} - A_{750}) \right) - \left( 2,16 * (A_{645} - A_{750}) \right) + \left( 0,1 * (A_{630} - A_{750}) \right) \right] * \left[ \frac{\text{Aseton Hacmi}}{\text{Örnek Hacmi}} \right]$$

#### 3.2.2.3 Hücre Sayımı

Işık mikroskopunda Thoma lamı ile günlük hücre sayımları yapılmıştır. Kültür yoğunluğuna bağlı olarak seyreltmeler yapılmıştır.



Şekil 3.2: Thoma lamının mikroskop altındaki görünümü

Sayım lamı içerisinde 25 küçük ve 16 büyük olmak üzere toplam 400 kare bulunmaktadır (Şekil 3.2). Lam üzerinde 1 mL hacme sahip iki alan bulunmaktadır. Bu iki alandaki 16 büyük kare ayrı ayrı sayılarak ortalaması alınmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Hücre Sayısı} \left( \frac{\text{Hücre}}{\text{ml}} \right) \\ = 16 \text{ büyük karede sayılan hücre} * \text{Seyreltme faktörü} * 10^4 \end{aligned}$$

#### 3.2.2.4 Fotosentetik aktivite ölçümü

Üretim boyunca günlük olarak erlenlerin dış yüzeyinden PSII değerleri fotosentetik aktivite cihazı (Hansatech FSM1, Norfolk, İngiltere) ile ölçülmüştür.

#### 3.2.2.5 Kuru ağırlık tayini

2 ml'lik ependorf ile kuru ağırlık tayininde 1 gün önceden boş ependorflar, 60 ° C'de etüvde bekletilerek nemin giderilmesi sağlanmıştır. Etüvden çıkarılan ependorflar sabit tartıma gelmesi için desikatörde bekletilmiştir. Ardından hassas terazide boş ependorfların darası alınmıştır. 2 mL örnek ependorflara alınarak mikrosantrifüjde (Sigma, Osterode am Harz, Almanya) 14800 rpm, 3 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra 3 kere distile su ile yıkama işlemi yapılarak, tekrar 60 ° C etüvde 1 gün bekletilmiştir. Ertesi gün desikatörde bekletilen ependorflar hassas terazide tartılmıştır. Aşağıdaki denklem kullanılarak örneklerin kuru ağırlıkları hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Net Kuru Ağırlık} \left( \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) \\ = (\text{Kuru Ağırlık} - \text{Ependorf Darası}) / (\text{Örnek Hacmi}) \end{aligned}$$

#### 3.2.2.6 Spektrofotometrik ölçüm

Hücre yoğunluğunu belirlemek için, 1 mL örnek spektrofotometrik küvetlere alınarak, 560 ve 750 nm dalga boylarında spektrofotometre cihazı (Optizen, Daejeon, Güney Kore) ile ölçülmüştür. Ölçümde kör olarak distile su kullanılmıştır.

#### 3.2.3 Hidrojen üretimi

Hidrojen üretiminde iki farklı metot kullanılmıştır. Bu metotlardan biri sülfür yoksunluğuna dayanan TAP – TAP-S metodu, diğeri ise organik karbon

kaynağı olmayan tamamen fotoototrofik olan ortam değişikliğine ihtiyaç duymayan HS metodudur.

### 3.2.3.1 TAP – TAP-S metodu

#### 3.2.3.1.1 Aerobik faz

1L'lik Roux tipi panel fotobiyoreaktörlerde ve 2,5L'lik karıştırılmalı tank tipi fotobiyoreaktörlerde, kültürler stasyoner faza gelene kadar üretilmiştir. Üretimler  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda olacak şekilde inokulum yapılarak başlanmıştır. Her iki tip fotobiyoreaktörde de  $21 \pm 2$  °C'de, TAP besin ortamında,  $40-45 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  ışık şiddetinde steril hava verilerek üretimler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Panel fotobiyoreaktörde aerobik kültür üretimi

#### 3.2.3.1.2 Anaerobik faz

Kültürler logaritmik fazlara geldiğinde TAP ortamından uzaklaştırılmak için 4100 rpm, 3dk santrifüj edilmiştir. Steril hasat edilen kültürleri sülfürden uzaklaştırmak için TAP-S ortamı ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi biten kültürler TAP-S ortamına 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda 1L'lik Roux tipi panel tipi ve 2,5L'lik karıştırılmalı tank tipi

fotobiyoreaktörlere aktarılmıştır. 1L'lik Roux tipi panel tipi fotobiyoreaktörde sızdırmaz tıplar kullanılmıştır (Şekil 3.4). 8 gün boyunca hidrojen ölçümleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4: Panel fotobiyoreaktörde anaerobik hidrojen üretimi

### 3.2.3.2 HS metodu

#### 3.2.3.2.1 *Aerobik faz*

Kültürler belli klorofil yoğunluğuna gelene kadar 1L'lik Roux tipi panel fotobiyoreaktörlerde  $4\pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda olacak şekilde inokulum yapılarak HS besin ortamında üretimler gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.3.2.2 *Anaerobik faz*

1L'lik Roux tipi panel fotobiyoreaktörlerde kültürler logaritmik fazdayken, 4100 rpm, 3 dk santrifüj edilerek hasat edilmiştir. Hasat edilen kültürler sızdırmaz tıplar kullanılarak 1L'lik Roux tipi panel fotobiyoreaktörlere yıkama işlemi gerekmeden 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda olacak şekilde HS ortamına aktarılmıştır. Rouxlara 5 dk boyunca  $N_2$  gazı basılmış, sonrasında 4 saat karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda kolonlara bağlanan Rouxlarda günlük hidrojen ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3.3 Hidrojen ölçümü

Günlük olarak su kolonlarındaki su seviyesi ölçülmüştür. 8 günün sonunda su kolonlarındaki ve tepe boşluğundaki gaz hacmi toplanarak toplam hidrojen miktarı elde edilmiştir.

### 3.2.3.4 Gaz kromatografisi

Su kolonlarından tek kullanımlık polipropilen steril şırınga ile alınan gaz örnekleri gaz kromatografisinde (Agilent, Santa Clara, USA) Termal Kondüktivite Dedektörü ile Hayesep D 80/100 dolgulu kolonda analiz edilerek, hidrojenin varlığı gösterilmiştir. GC gaz metodunda inlet sıcaklık 120 °C, dedektör sıcaklığı 140 °C ve kolon sıcaklığı 35 °C'dir. Argon gazı 20 mL/dk akım debisi ile taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. GC'nin gaz kalibrasyonu için yüksek saflıkta %30 H<sub>2</sub>, %30 CH<sub>4</sub>, %30 CO<sub>2</sub> gaz karışımı kullanılmıştır.

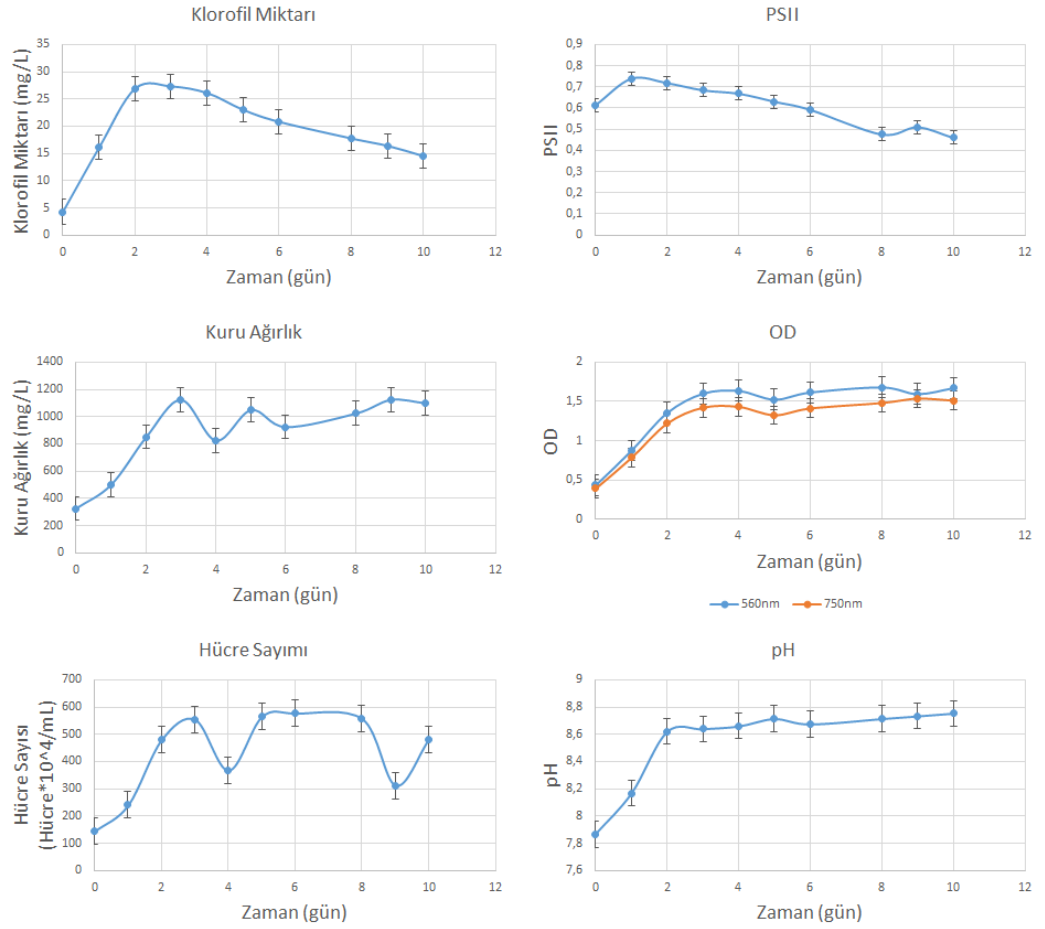
## 4. BULGULAR

### 4.1 TAP üretimleri

11 farklı suşu bulunan *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin hidrojen üretim potansiyelini belirlemek için üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu suşların iki farklı üretim ortamındaki büyümelerini takip edebilmek amacıyla aerobik olarak TAP ve HS ortamlarında üretimleri yapılmıştır.

#### 4.1.1 CC124

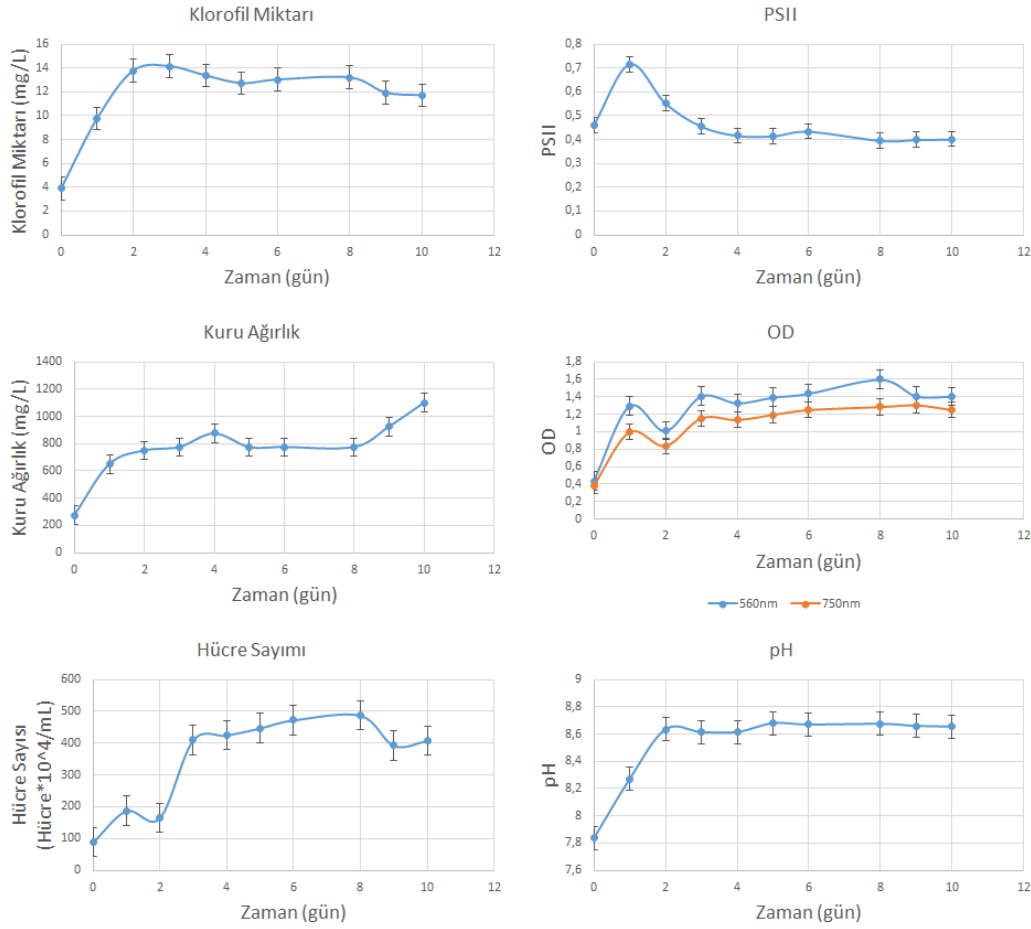
CC124 suşu, *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin yabanıl tipidir. Bu çalışmada kontrol suşu olarak kullanılmıştır  $4\pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonu ile başlatılan kültür 100 rpm karıştırma hızında iki paralelli olarak 250 ml'lik erlenlerde 100 ml'lik çalışma hacminde üretim yapılmıştır. 10 günlük üretim boyunca günlük analizler (klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık tayini, optik yoğunluk, hücre sayımı, pH ölçümü) yapılarak CC124 suşunun büyümesi takip edilmiştir. Kültür en yüksek klorofil miktarına 3. günde 27,32 mg/L klorofile ulaşmıştır. Sonrasında kültürün stasyoner fazda devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: TAP ortamında CC124 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.2 D239-40

D239-40 suşu, *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin D1 proteini üzerinde D ve E helislerini bağlayan halkada 239 ve 240 pozisyonlarında aminoasidik delesyonlarını içeren çift mutant tiplerinden biridir. Klorofil miktarı  $4 \pm 1$  mg/L olacak şekilde inokulum yapılarak başlatılan üretimler 10 gün boyunca takip edilmiştir. Klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılarak günlük analizleri gerçekleştirilmiştir. Klorofil miktarı maksimum 3. günde ulaşmış, sonrasında kültür stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.2).

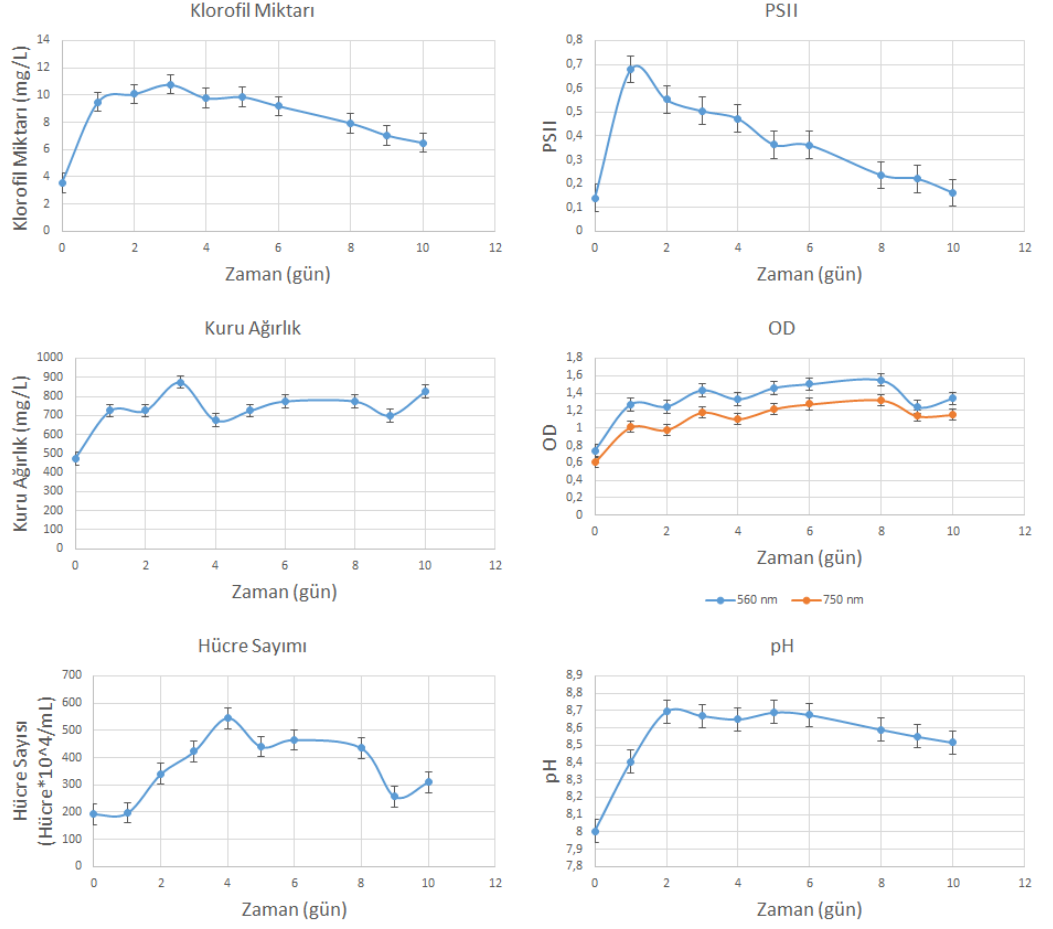


Şekil 4.2: TAP ortamında D239-40 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.3 D240

D240 suşu, *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin D1 proteini üzerinde D ve E helislerini bağlayan halkada 240 pozisyonunda amino-asidik delesyonunu içeren tek mutant tipidir. D240 suşu,  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda kültür başlatılarak 100 rpm karıştırma hızında üretimler gerçekleştirilmiştir. 10 günlük üretimde günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı, pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum 3. günde klorofil miktarına ulaşmıştır. Sonrasında kültürün stasyoner faza girdiği görülmüş, 6. günden sonra kültür ölüm fazına girmiştir (Şekil 4.3).

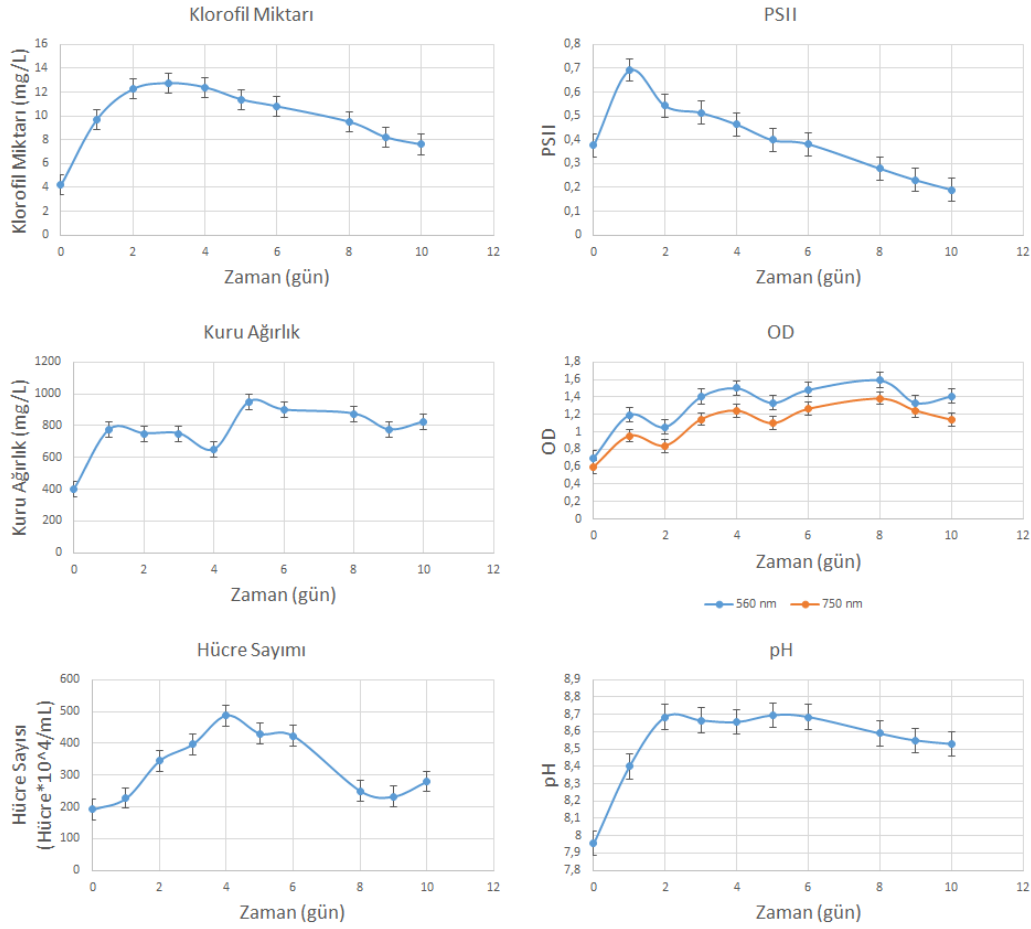




Şekil 4.3: TAP ortamında D240 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.4 D240-41

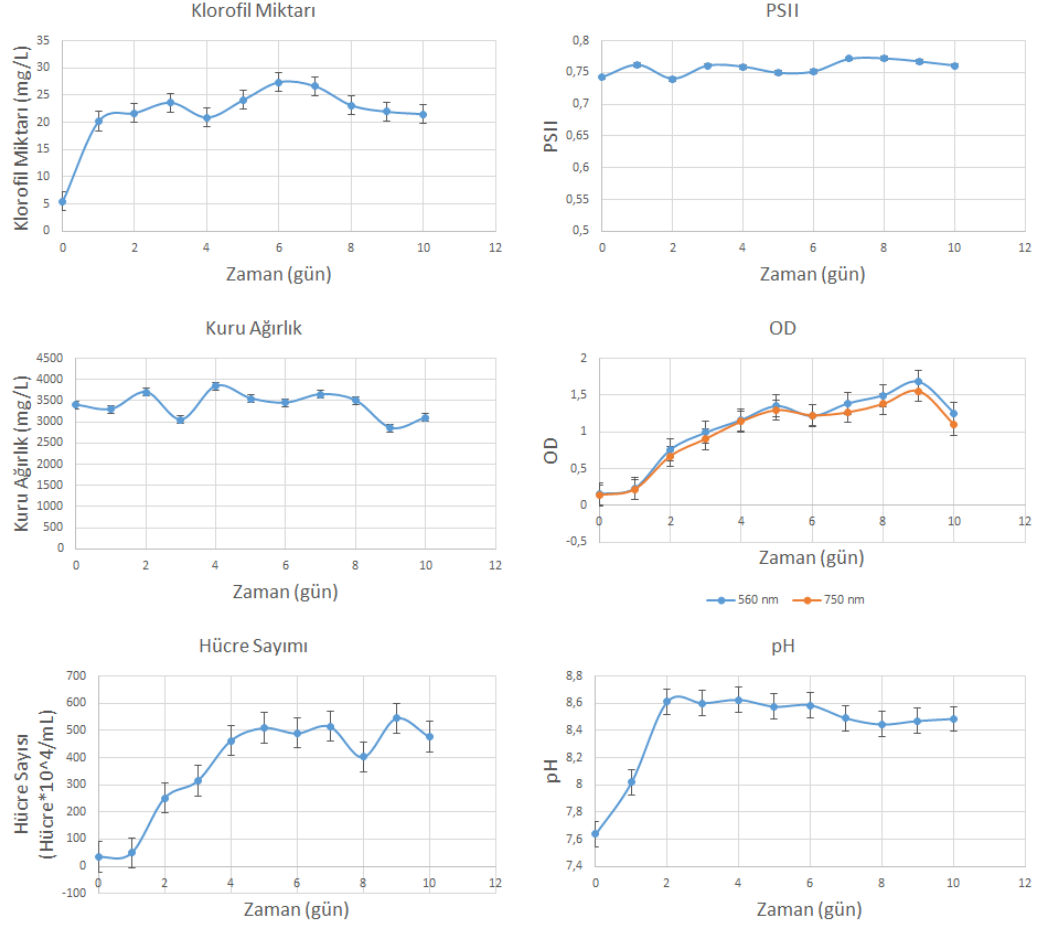
D240-41 suşu, *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin D1 proteini üzerinde D ve E helislerini bağlayan halkada 240 ve 241 pozisyonlarında aminoasidik delesyonlarını içeren çift mutant tiplerindedir.  $4 \pm 1$  mg/L klorofil miktarı ile başlatılan D240-41 suşunun üretimleri 10 gün boyunca devam etmiştir. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, 3. günde maksimum klorofil miktarına ulaşmıştır. Stasyonier fazda devam eden kültür 6. günde ölüm fazına geçmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: TAP ortamında D240-41 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.5 WT

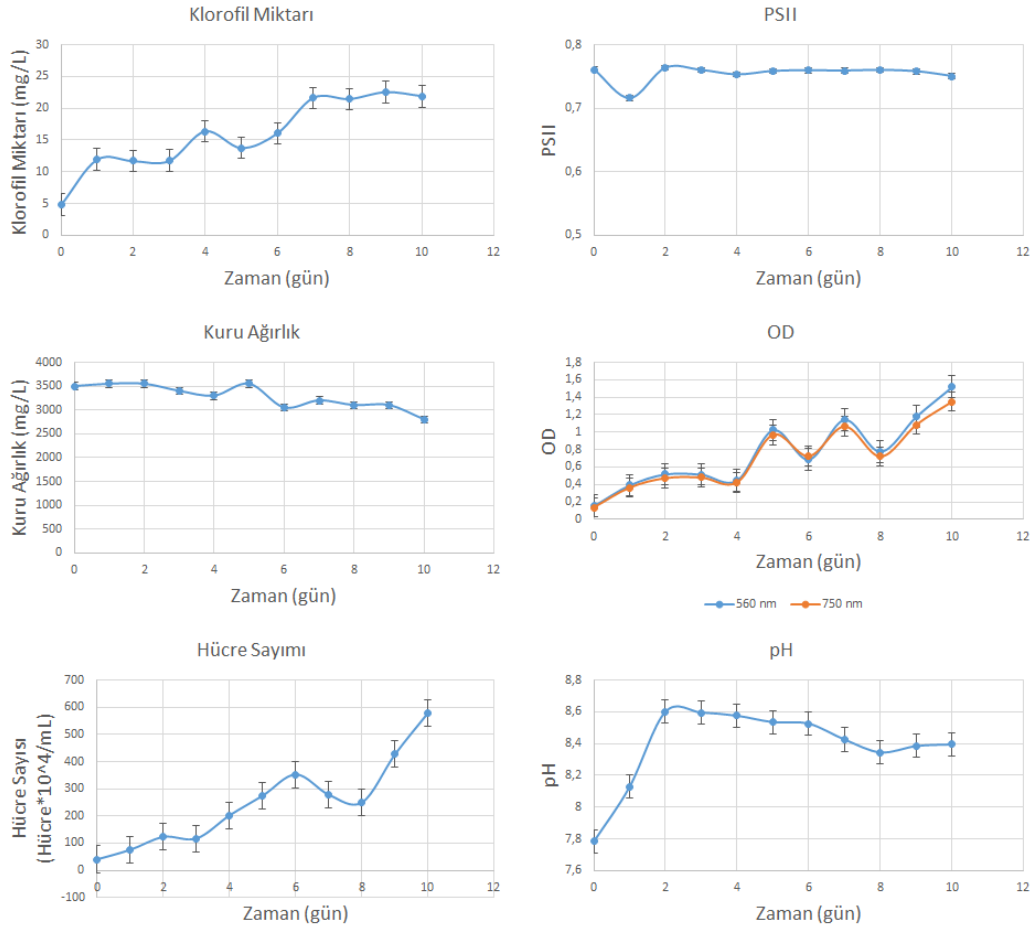
WT suşu, mitokondriyel mutantlar için kontrol suşudur. Büyüme eğrisi çıkarmak için  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda üretimler yapılmıştır. 10 günlük üretim boyunca günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür maksimum klorofil miktarına 6. günde 27,4 mg/L klorofil olarak ulaşmış daha sonra stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: TAP ortamında WT şuşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.6 Véro

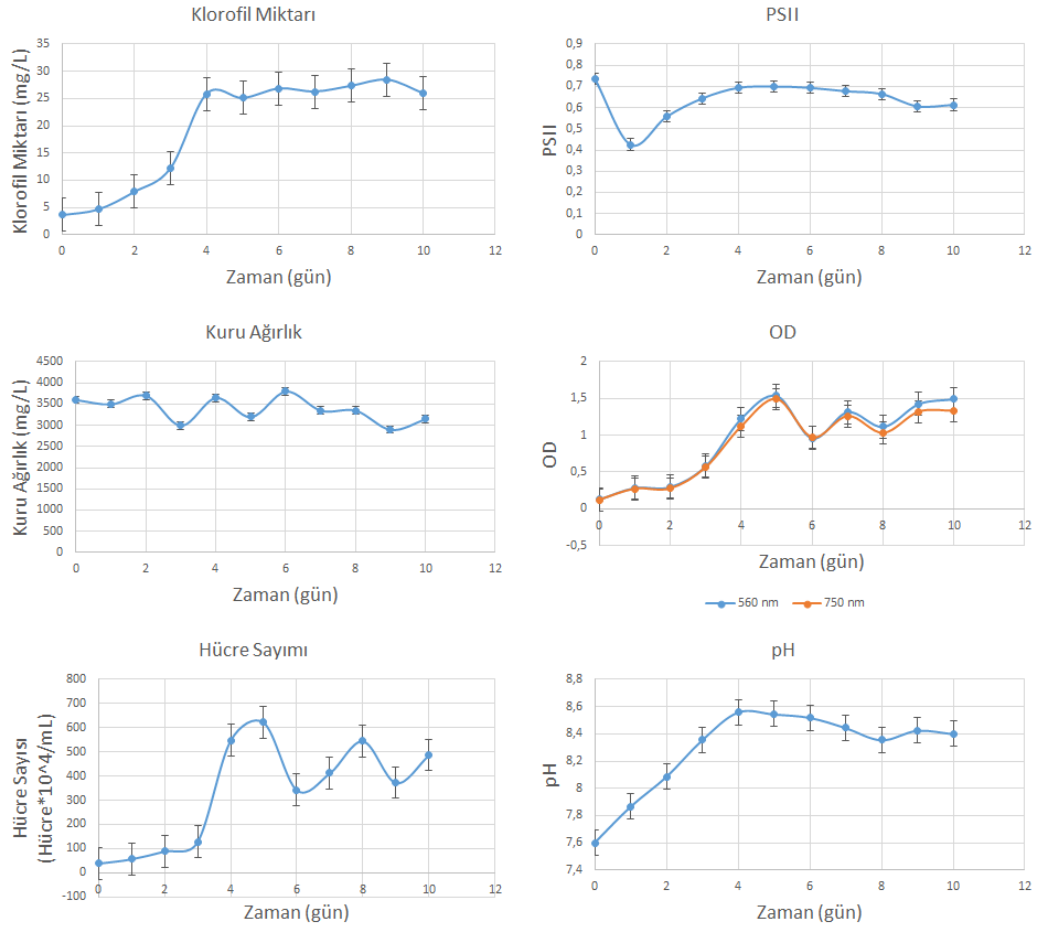
Değiştirilmiş bir CEF ve kloroplast ATP biyosentezine yol açan nükleer gen PGRL1 ve kompleks I aktivitesinin neredeyse tamamen kaybolmasına yol açan mitokondriyal kompleks I geni  $\Delta nd4$ , mutasyonlarını barındıran *Chlamydomonas reinhardtii*  $\Delta nd4xpgrl1$  Véro çift mutantı kullanılmıştır.  $4 \pm 1$  mg/L klorofil miktarı ile başlatılan üretimler 10 gün boyunca devam etmiştir. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayısı ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İki paraleli gerçekleştirilen üretimlerde kültür maksimum klorofil miktarına 7. günde ulaşmıştır. Sonrasında kültür stasyonere faza geçmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: TAP ortamında Véro suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.7 1130

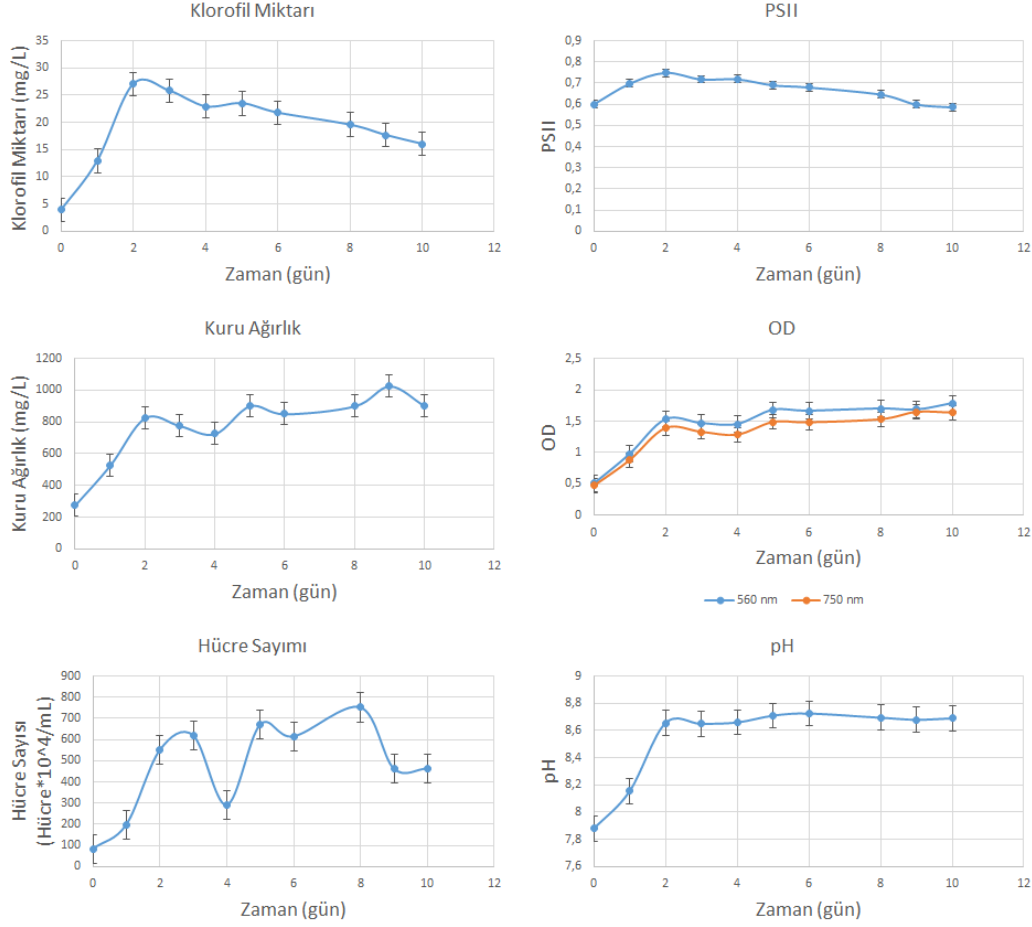
$\Delta nd4xpgr11$  Véro gibi çift mutantlardan biri olan 1130 mutantının üretimleri gerçekleştirilmiştir. Klorofil miktarı  $4 \pm 1$  mg/L olacak şekilde üretimler iki paralelli gerçekleştirilmiştir. 10 günlük üretim boyunca klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü günlük olarak yapılmıştır. Üretimde kültür, 4. günde logaritmik faz sona ulaşmış, sonrasında stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: TAP ortamında 1130 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.8 Mt (-)

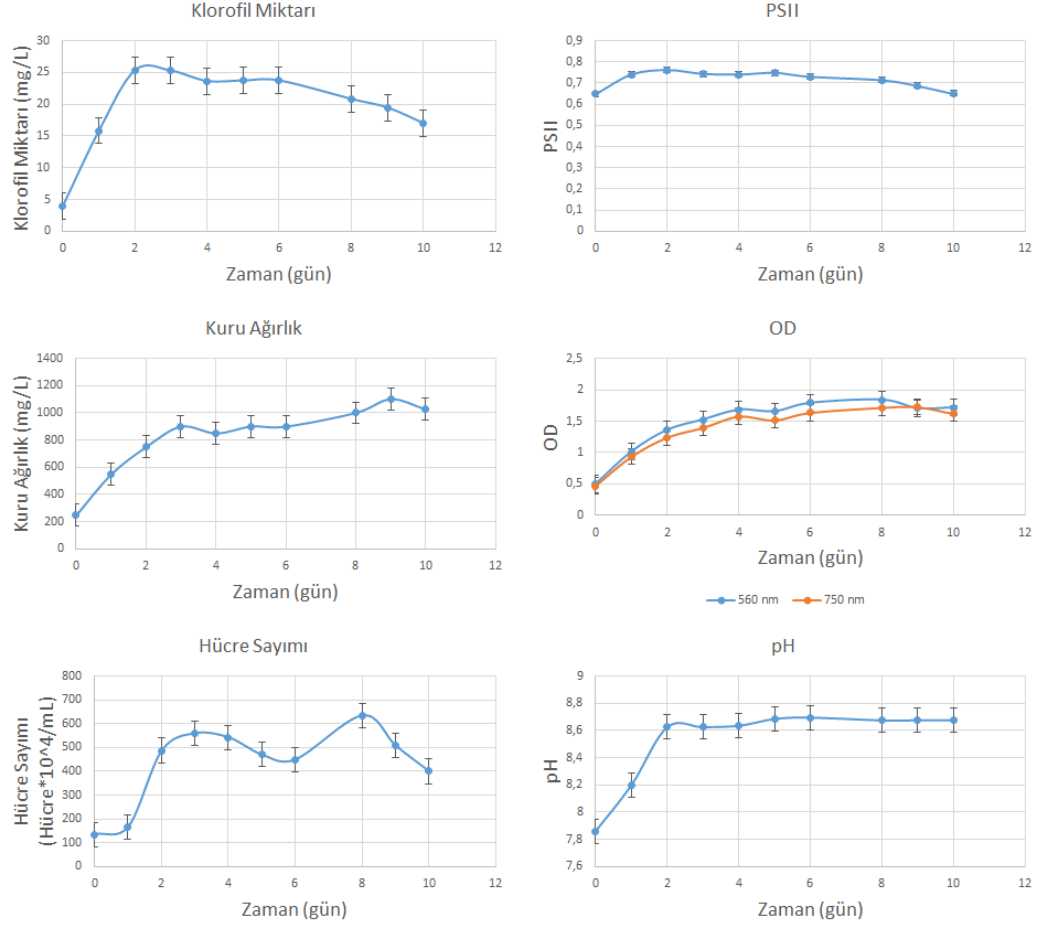
PGRL1 mutasyonu içeren mt (-) tek mutantlardan biridir.  $4\pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonuyla başlatılan kültürlerde 10 gün boyunca üretim devam etmiştir. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür maksimum klorofil miktarına 2. günde 25,8 mg/L klorofile ulaşmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: TAP ortamında mt (-) suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.9 Mt (+)

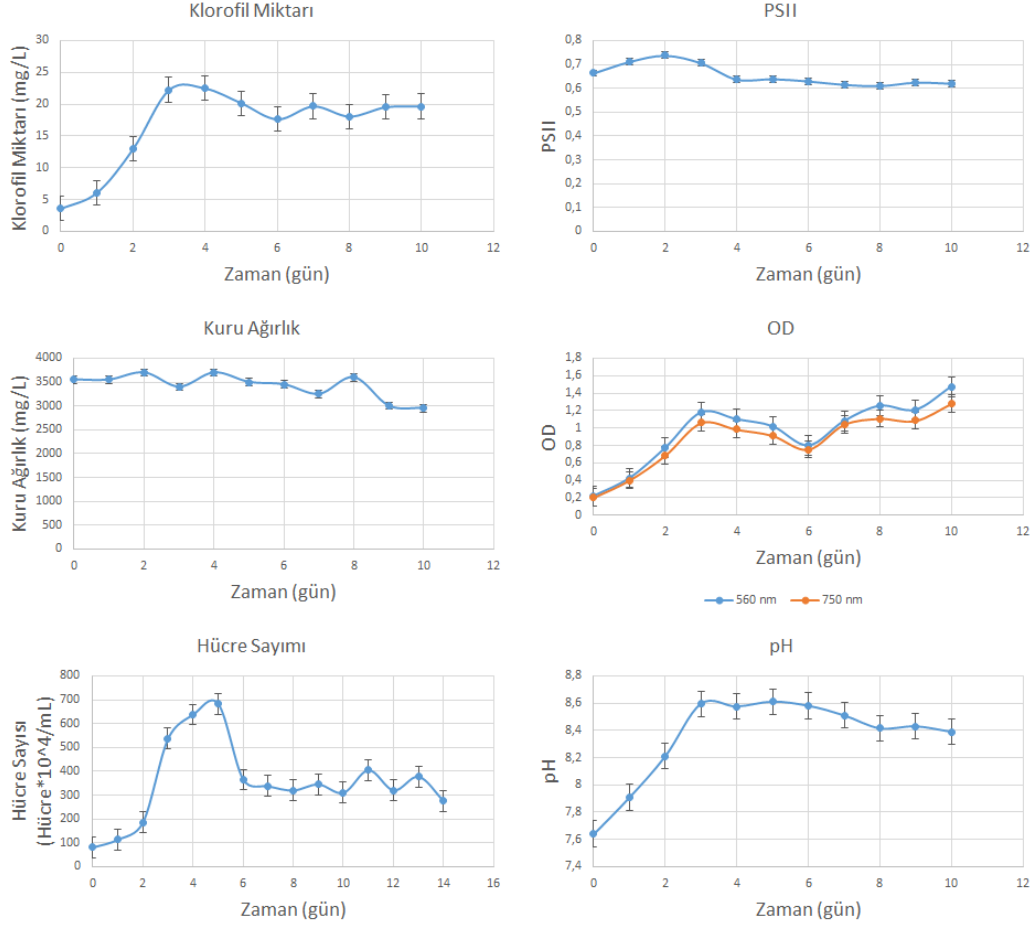
PGRL1 tek mutantlarından bir diğeri olan mt (+) mutantının üretimi gerçekleştirilmiştir.  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda üretimler 10 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü günlük olarak yapılmıştır. Kültür maksimum klorofil miktarına 2. günde ulaşmış, sonrasında stasyoner fazda devam etmiş, 6. günden sonra ölüm fazına girmiştir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** TAP ortamında mt (+) şuşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.10 T-1

AOX şuşu için kontrol şuşu olan T-1,  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda iki paralelli olacak şekilde 10 gün boyunca üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim boyunca günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür maksimum klorofil miktarına 4. günde 22,48 mg/L klorofile ulaşmış, sonrasında stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.10).



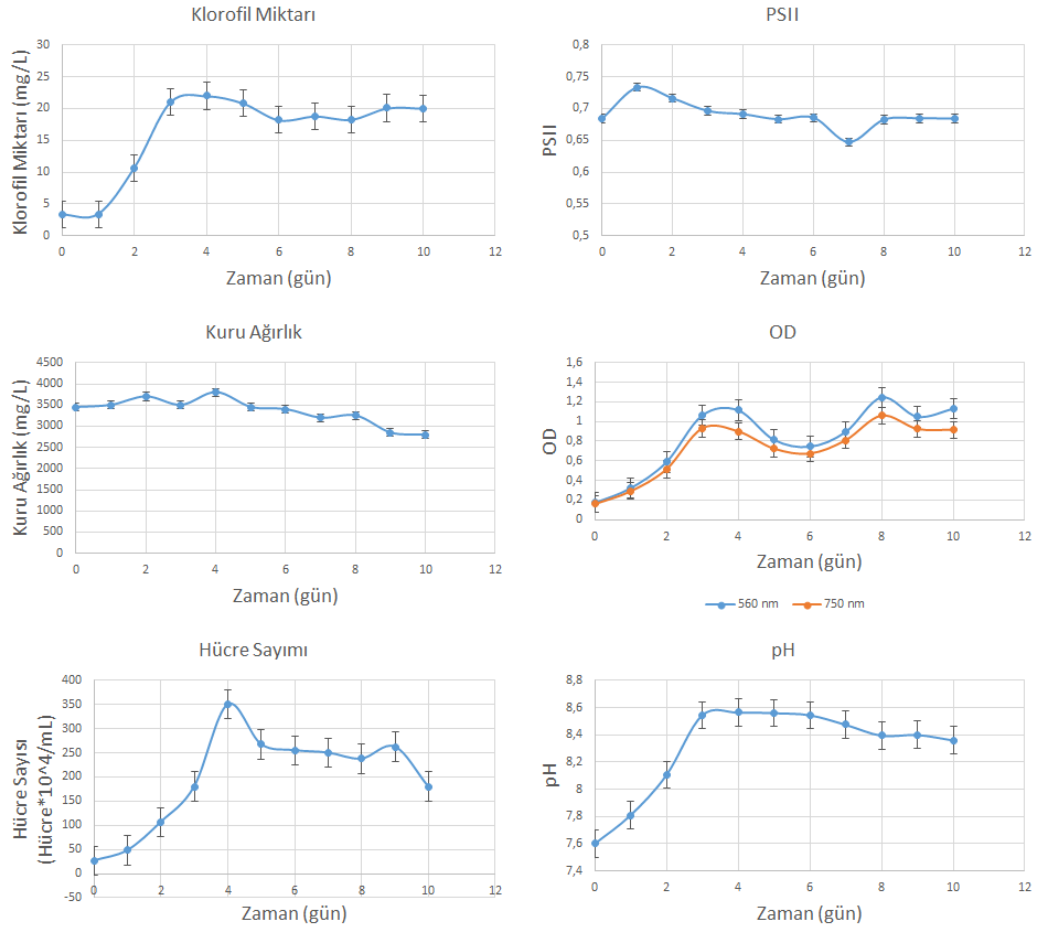
Şekil 4.10: TAP ortamında T-1 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.1.11 AOX

Tek hücreli yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*'de AOX, potansiyel olarak iki gen, AOX1 ve AOX2 tarafından kodlanan monomerik bir proteindir. AOX proteini transkripsiyonu ve AOX protein ekspresyonunun azot kaynağı ile yapılan düzenlemede, AOX proteini, amonyum içeren ortamda yetişen hücrelere kıyasla nitrat içeren ortamda yetiştirilen hücrelerde çok daha fazladır. Ayrıca, bu tek hücreli organizma, belirli bir genin ekspresyonunu seçici olarak inaktive etmek için RNA interferansını kullanma fırsatı sunmaktadır (Mathy et al., 2010).

AOX mutanı, alternatif oksidaz enziminden yoksun olan bir suştur.  $4 \pm 1$  mg/L klorofil miktarında üretimler iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. 10 gün boyunca süren üretimlerde günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum klorofil miktarına 4. günde 22 mg/L klorofile ulaşmış, sonrasında stasyonere faza girmiştir (Şekil 4.11).



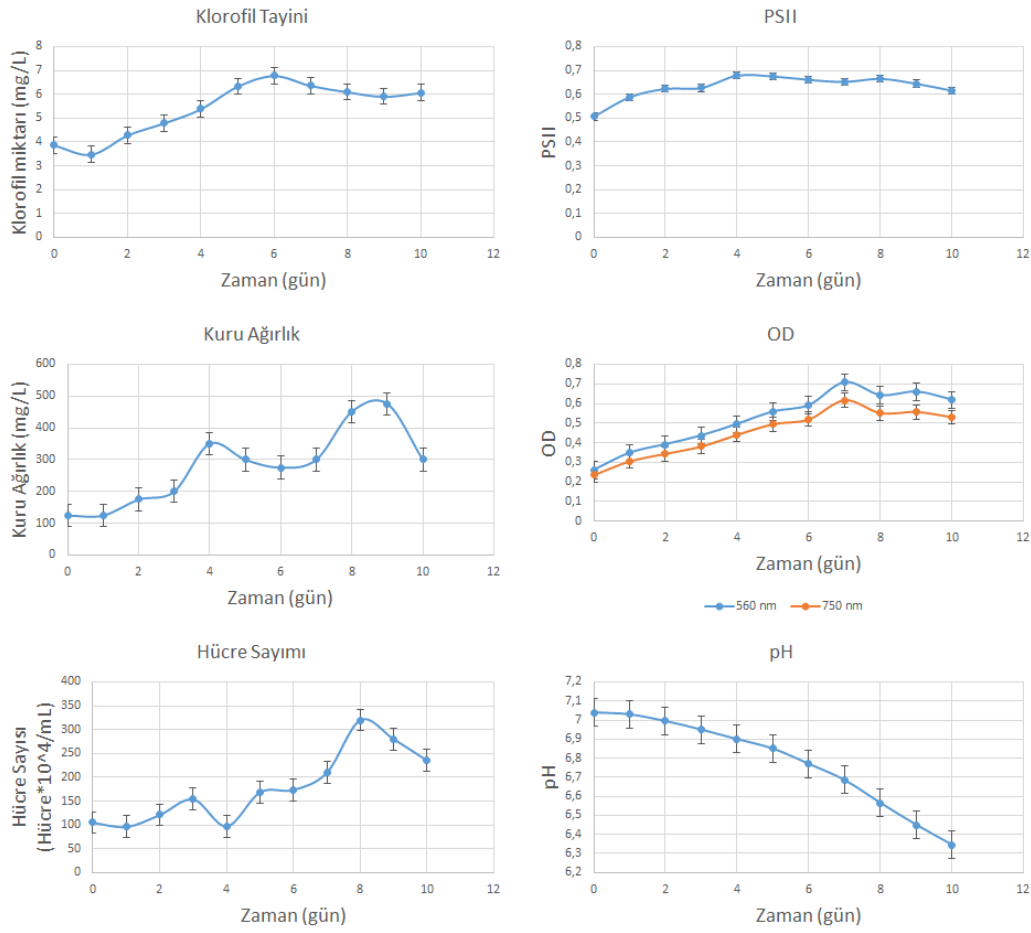


Şekil 4.11: TAP ortamında AOX suşunun büyüme eğrileri

## 4.2 HS Üretimleri

### 4.2.1 CC124

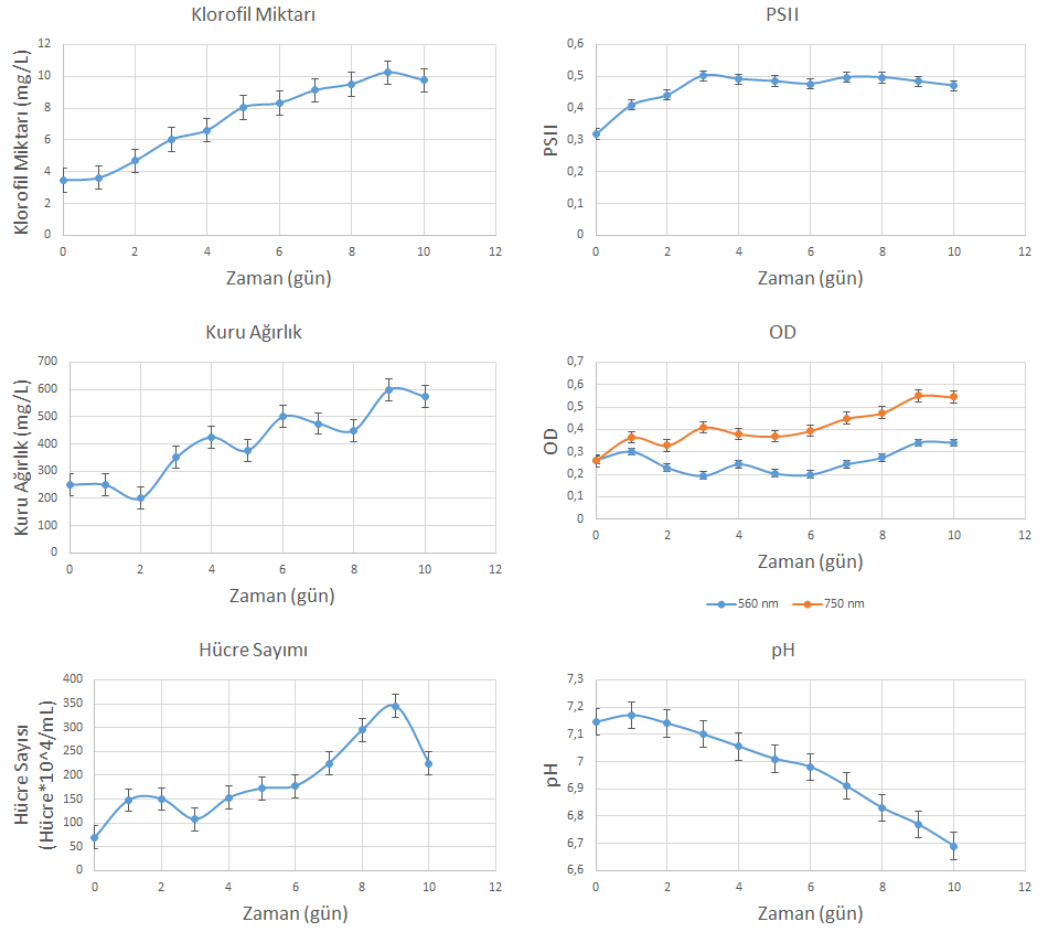
HS üretimlerde organik karbon kaynağı olmadığı için büyüme fazları daha uzun süreli olmuştur. CC124 suşunun üretimleri  $4 \pm 1$  mg/L klorofil miktarı ile başlatılmıştır. İki paralelli gerçekleştirilen üretimler 10 gün boyunca devam etmiştir. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kültür, maksimum klorofil miktarına 6. günde ulaşmış, sonrasında stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: HS ortamında CC124 şuşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.2 D239-40

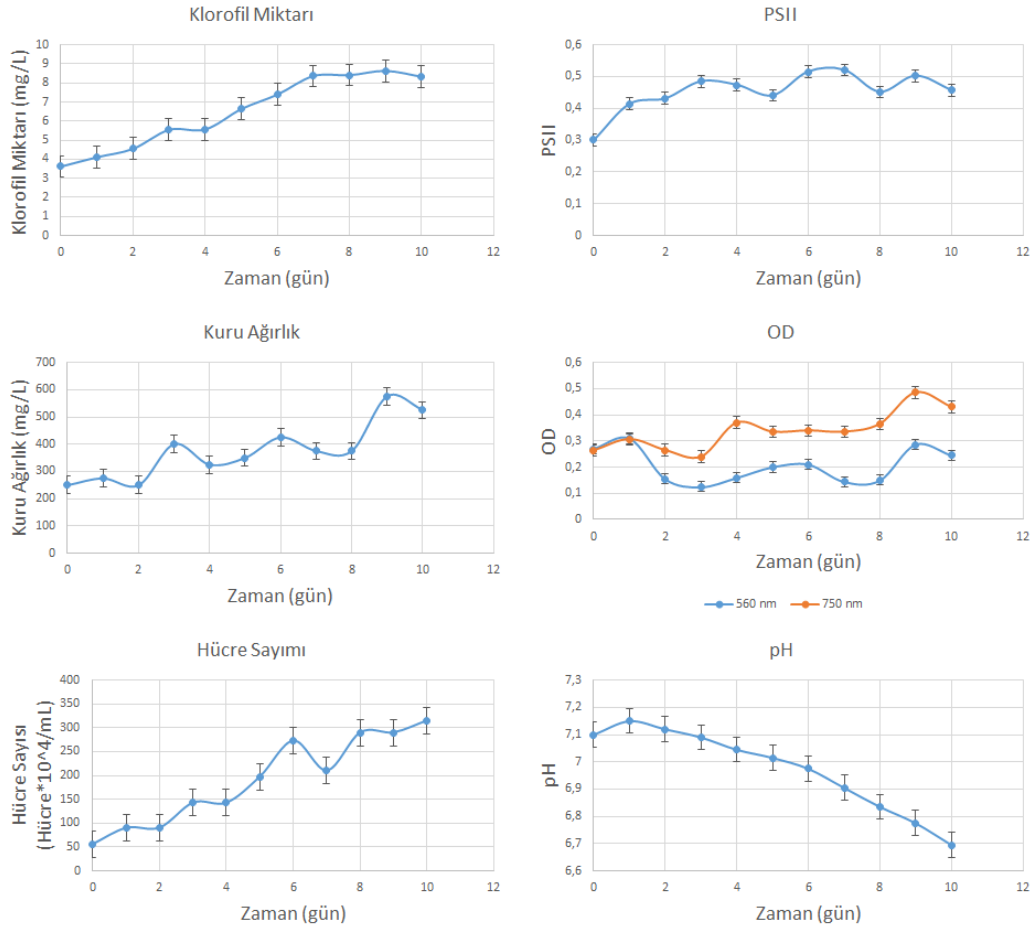
4±1 mg/L klorofil konsantrasyonunda üretimler başlatılmıştır. 10 gün boyunca günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kültür 9. günde maksimum klorofil miktarına ulaşmış sonrasında stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: HS ortamında D239-40 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.3 D240

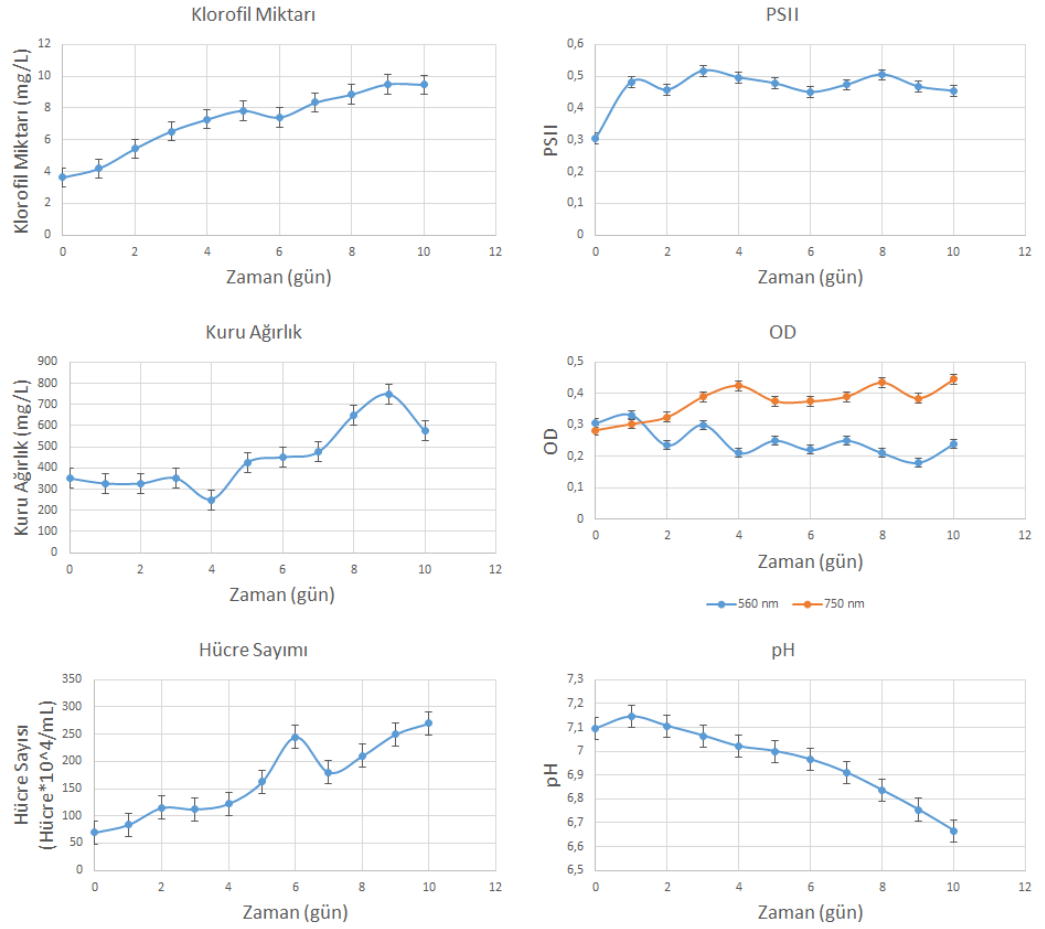
4±1 mg/L klorofil miktarı ile başlatılan kültürün üretimleri 10 gün boyunca devam etmiştir. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, 7. günde logaritmik fazın sonuna gelmiş, sonrasında stasyoner fazda devam etmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: HS ortamında D240 şuşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.4 D240-41

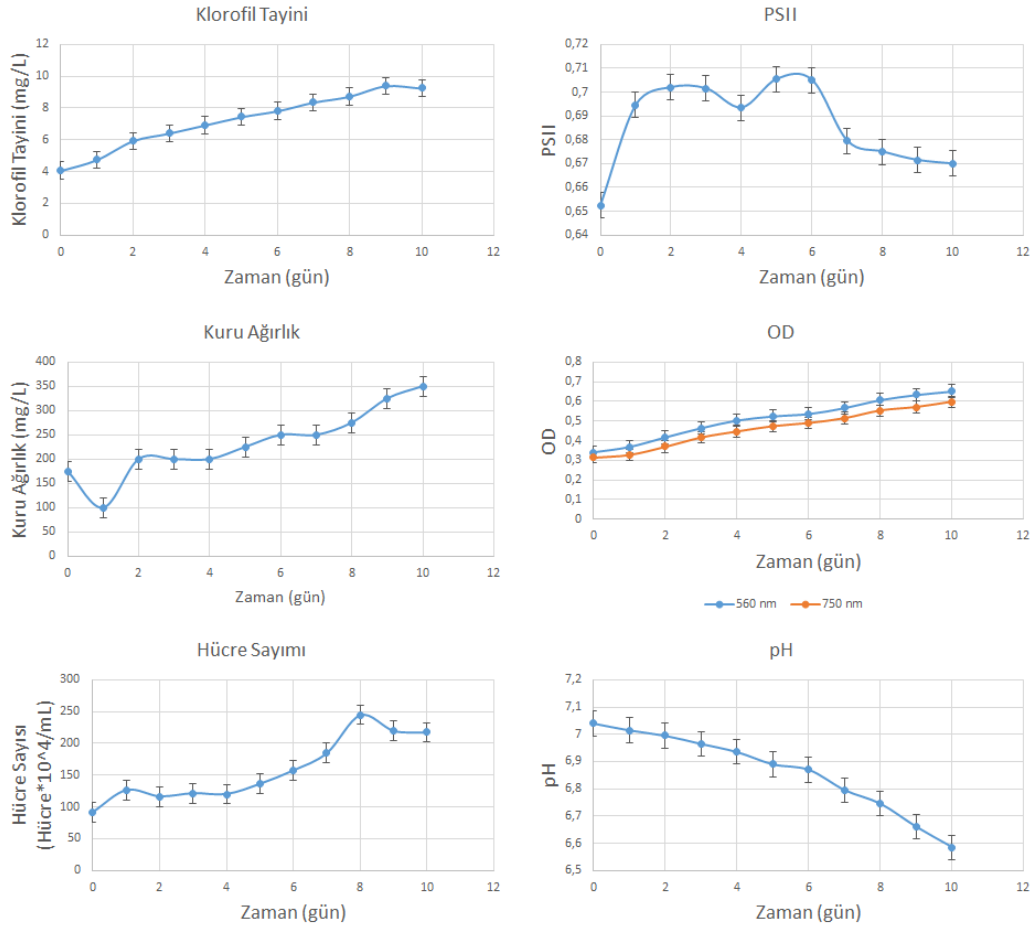
D1 mutantlarından biri olan D240-41 mutantının kültivasyonu  $4 \pm 1$  mg/L klorofil olacak şekilde inokulum yapılarak başlatılmıştır. 10 gün süren üretimde günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kültür, maksimum klorofil miktarına 9. günde ulaşmış, sonrasında stasyoner fazda devam etmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: HS ortamında D240-41 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.5 WT

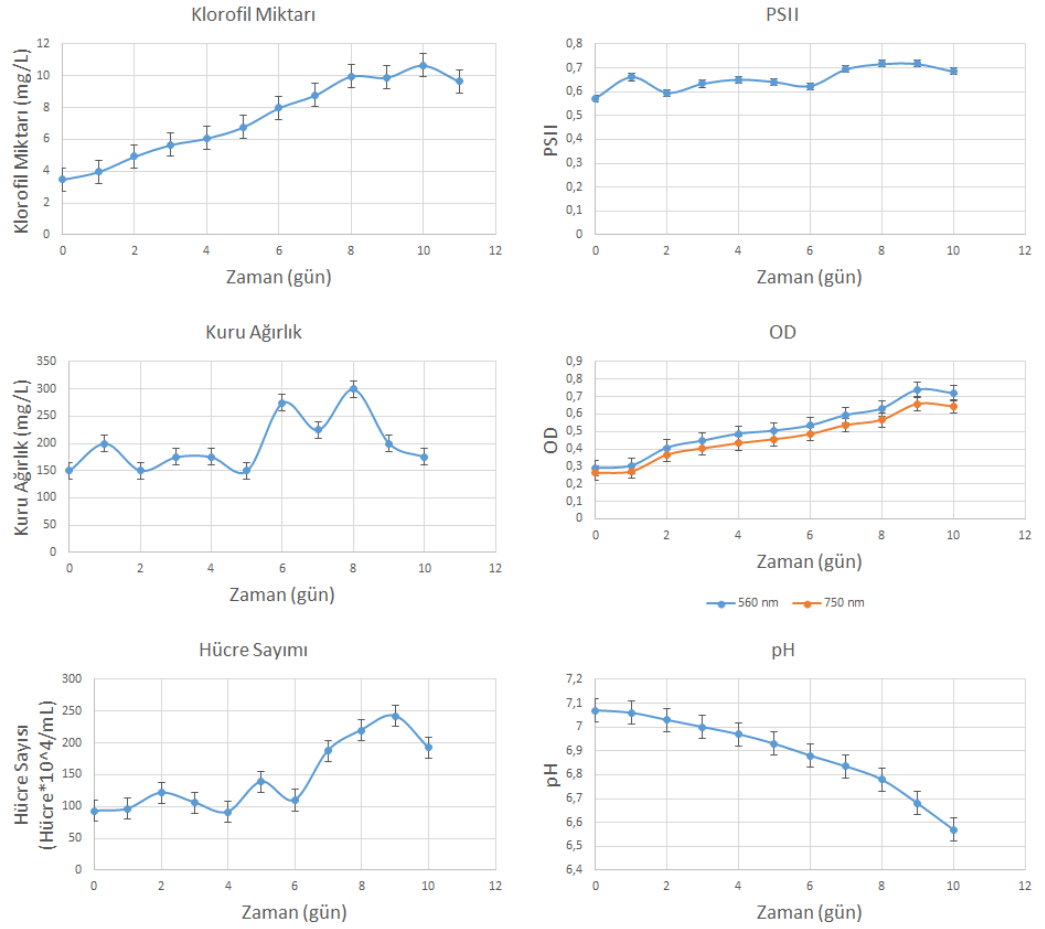
Mitokondriyal mutantların kontrol suşu olan WT,  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda üretimleri iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. 10 gün süren üretimde günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum klorofile 9. günde ulaşmış, sonrasında stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: HS ortamında WT suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.6 Véro

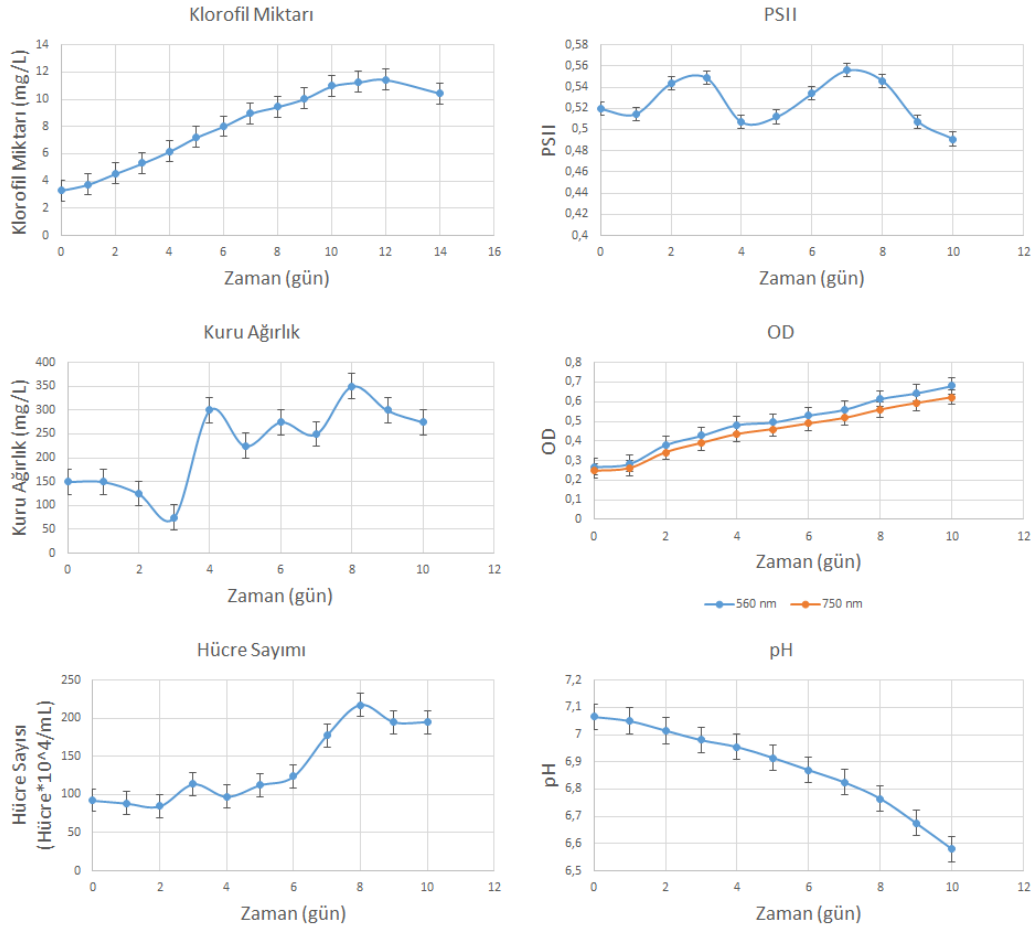
Çift mutantlardan Véro suşunun  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda üretimleri başlatılmıştır. 10 gün süren üretimde klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü günlük olarak gerçekleştirilmiştir. Kültür, maksimum klorofil miktarına 10. günde ulaşmış, sonrasında stasyoner fazda devam etmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: HS ortamında Véro suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.7 1130

Çift mutantlardan 1130 suşu,  $4 \pm 1$  mg/L klorofille başlatılan üretim 10 gün boyunca devam etmiştir. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum klorofil miktarına 10. günde ulaşmış, sonrasında stasyoner faza girmiştir (Şekil 4.18).

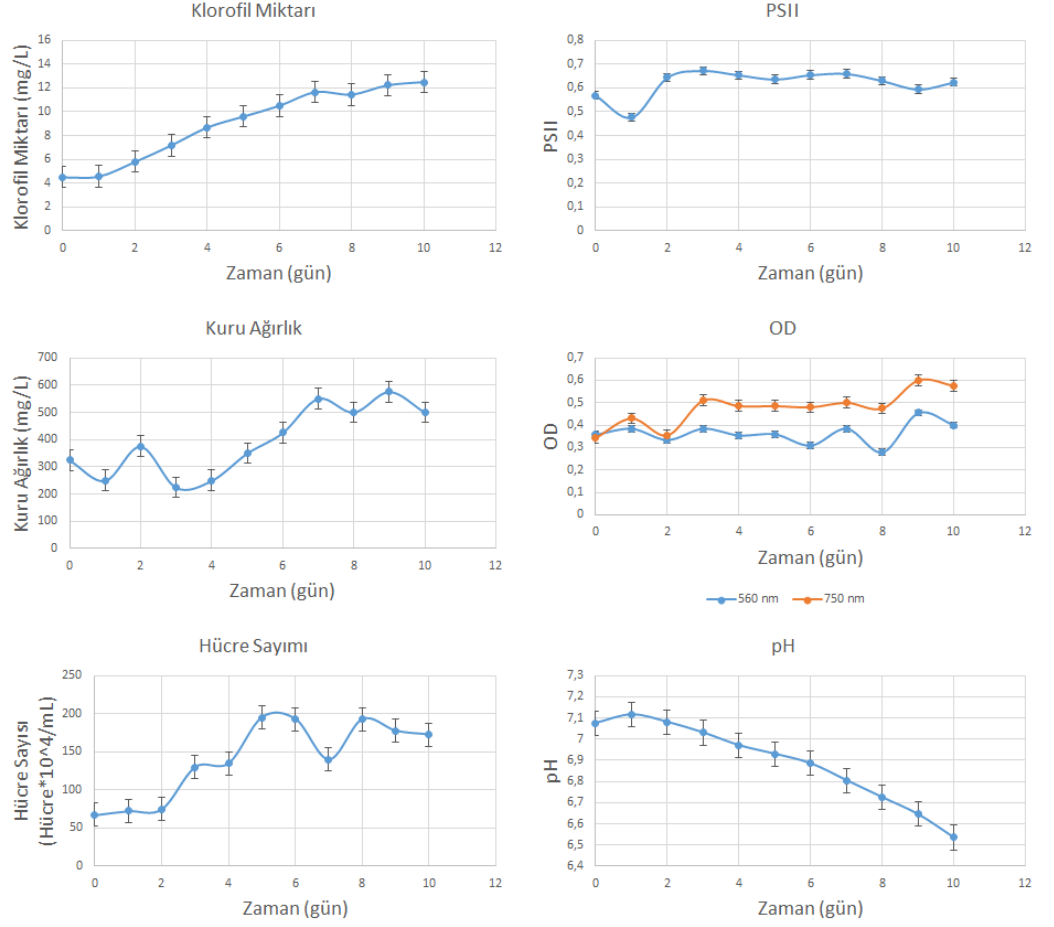


Şekil 4.18: HS ortamında 1130 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.8 Mt (-)

Mitokondriyal mutantlardan mt (-) suşu,  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda üretimleri gerçekleştirilmiştir. 10 gün süren üretim iki paralelli yapılmıştır. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum klorofile 10. günde ulaşmıştır (Şekil 4.19).

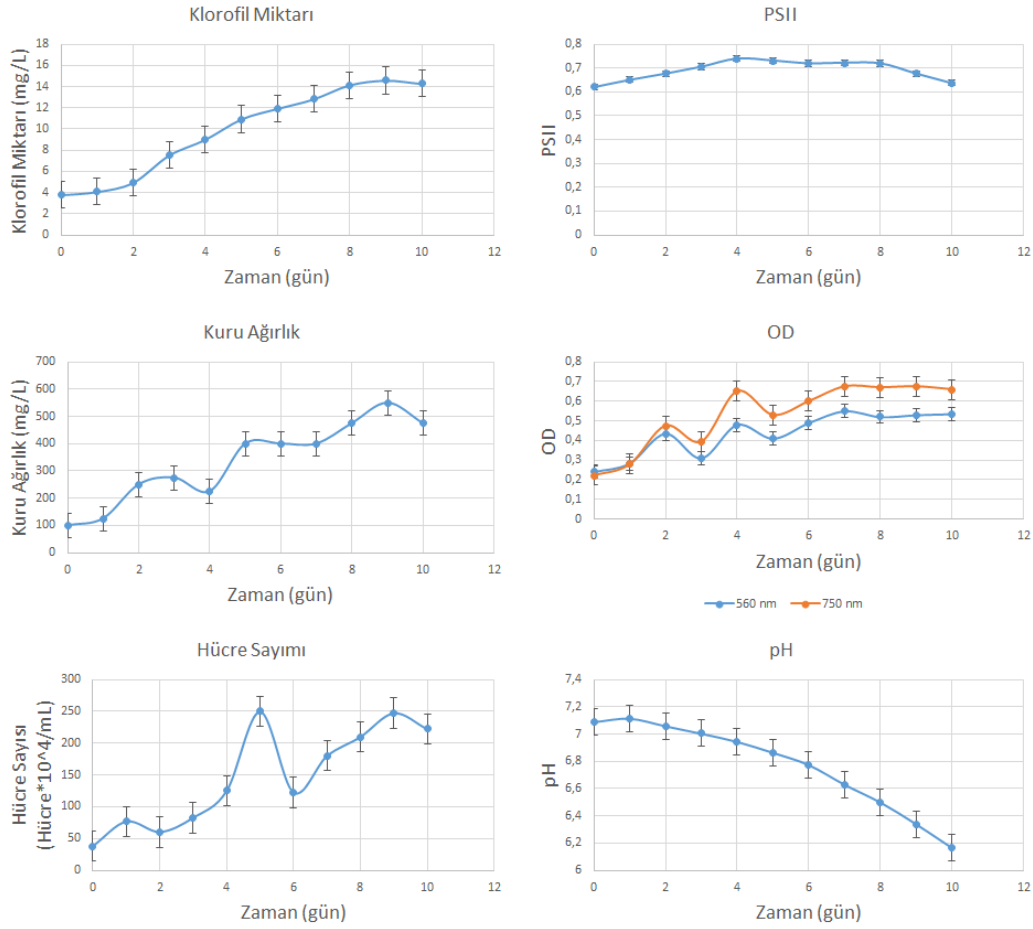




Şekil 4.19: HS ortamında mt (-) suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.9 Mt (+)

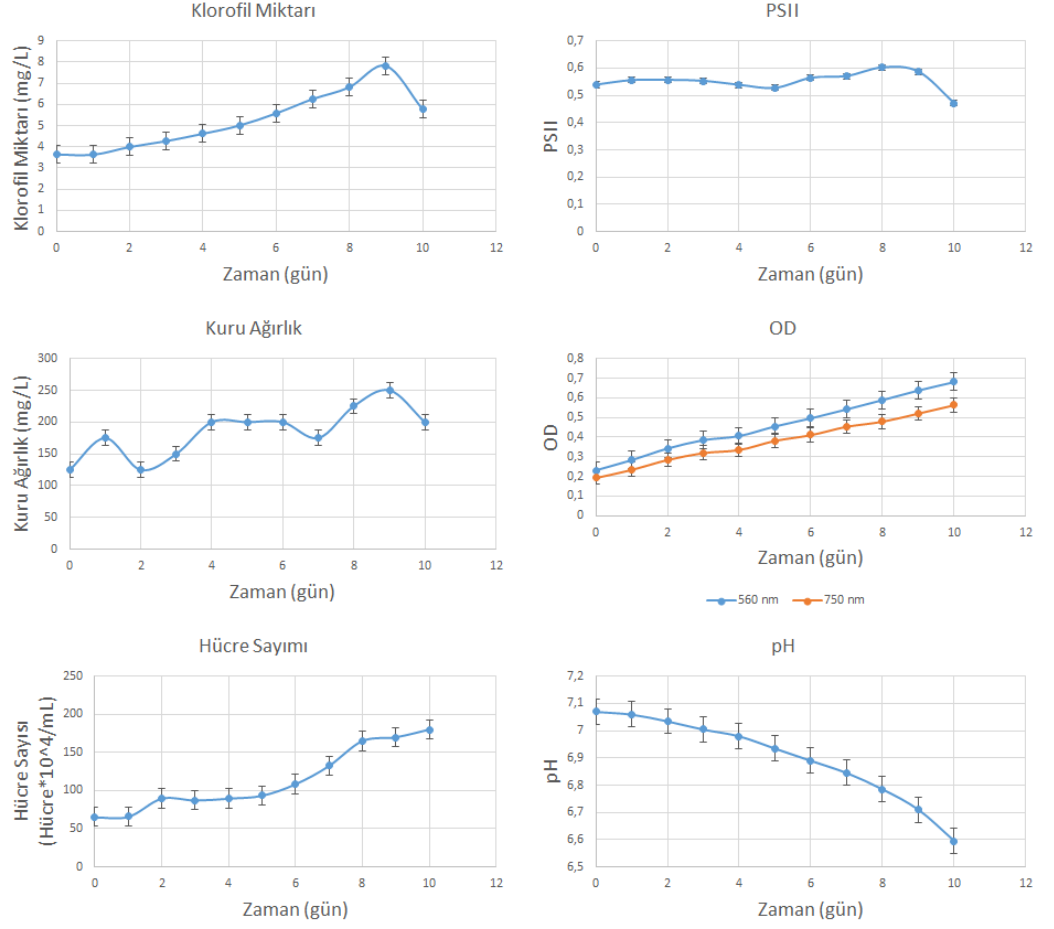
Mitokondriyal mutantlardan bir diğeri olan mt (+) suşu,  $4 \pm 1$  mg/L klorofil miktarında iki paralelli olarak üretimler gerçekleştirilmiştir. 10 gün süren üretimde günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum klorofile 9. günde ulaşmıştır, sonrasında stasyoner fazda devam etmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: HS ortamında mt (+) suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.10 T-1

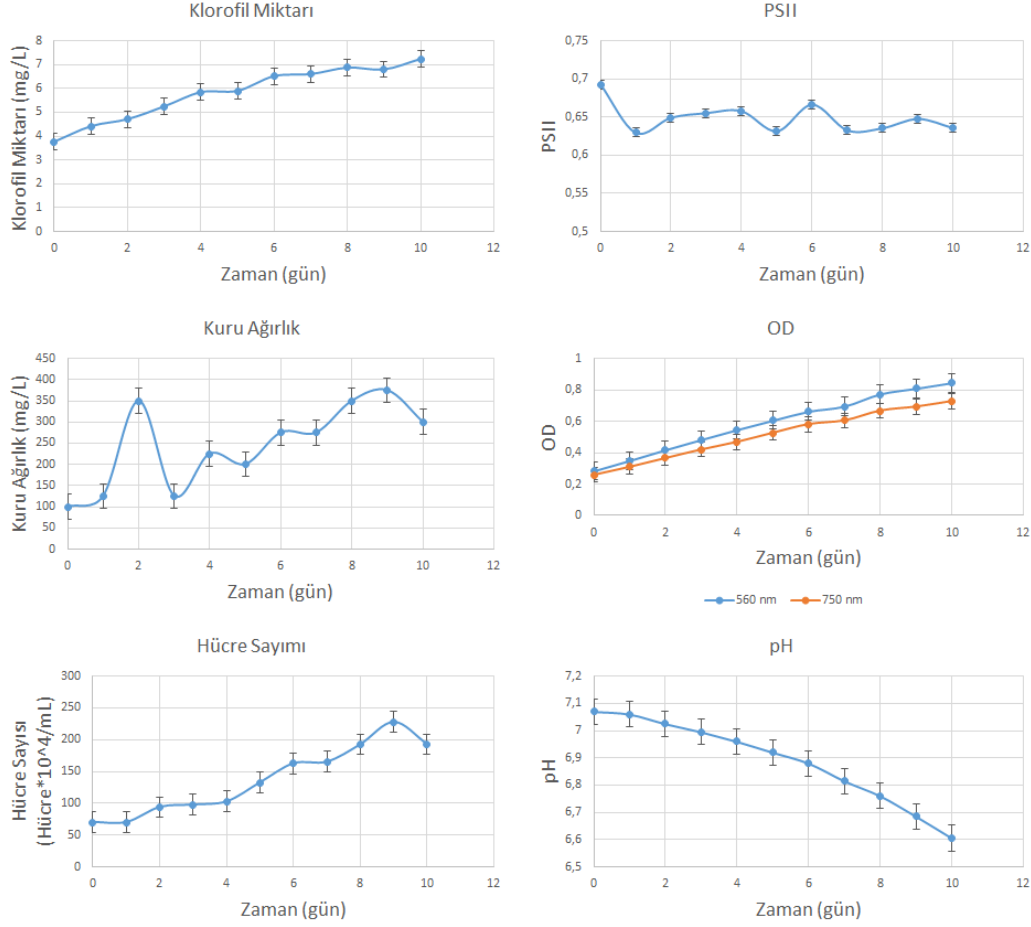
Kontrol suşu olan T-1,  $4 \pm 1$  mg/L klorofil konsantrasyonunda 10 gün boyunca iki paralelli olarak üretimleri gerçekleştirilmiştir. Günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum klorofille 9. günde ulaşmıştır, sonrasında stasyoner fazda devam etmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: HS ortamında T-1 suşunun büyüme eğrileri

#### 4.2.11 AOX

Mitokondriyal mutantlardan biri olan AOX suşu,  $4 \pm 1$  mg/L klorofil miktarında iki paralelli olarak üretimler gerçekleştirilmiştir. 10 gün süren üretimde günlük olarak klorofil tayini, PSII ölçümü, kuru ağırlık, optik yoğunluk, hücre sayımı ve pH ölçümü yapılmıştır. Kültür, maksimum klorofille 10. günde ulaşmıştır, sonrasında stasyoner fazda devam etmiştir (Şekil 4.22).

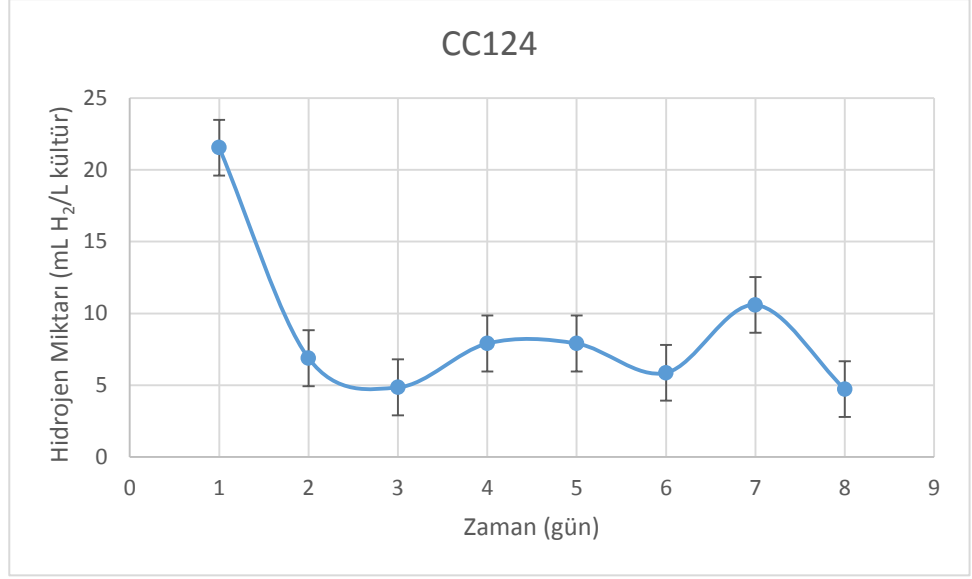


Şekil 4.22: HS ortamında AOX suşunun büyüme eğrileri

### 4.3 TAP-TAP-S metoduyla hidrojen üretimi

#### 4.3.1 CC124

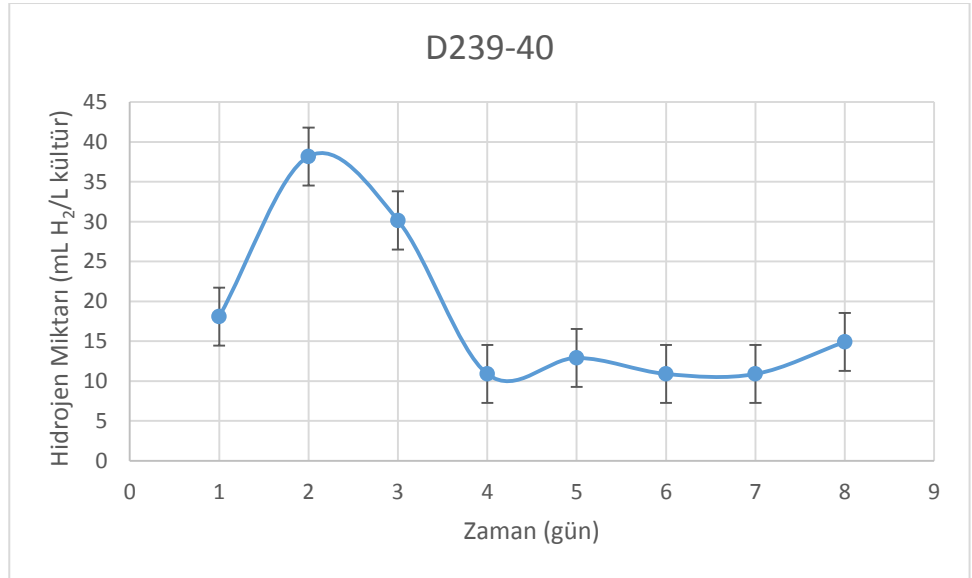
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan CC124 kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 1. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.23). 8 günün sonunda toplam 70,3 mL H<sub>2</sub> üretmiştir.



Şekil 4.23: CC124 suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.2 D239-40

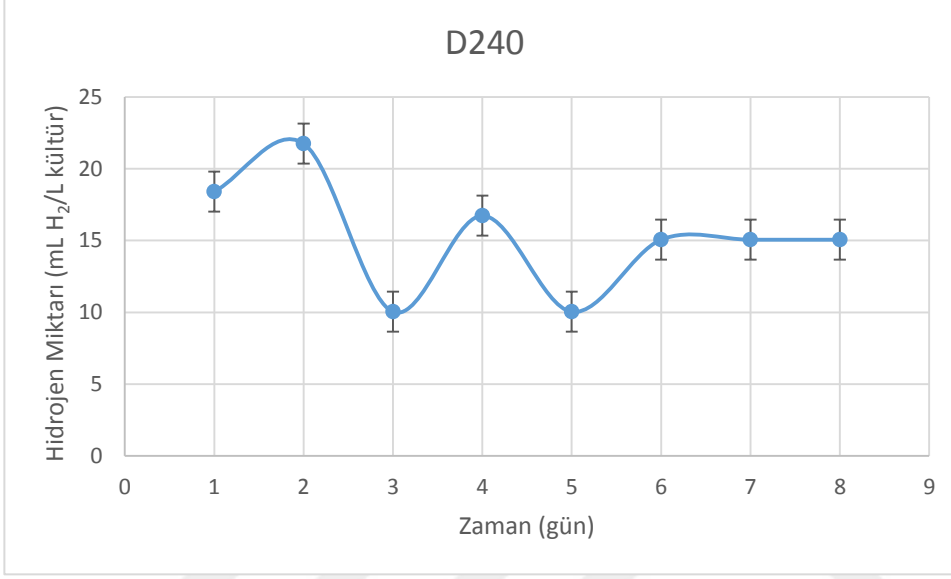
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan D239-40 kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 2. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.24). 8 günün sonunda toplam 146,9 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



Şekil 4.24: D239-40 suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.3 D240

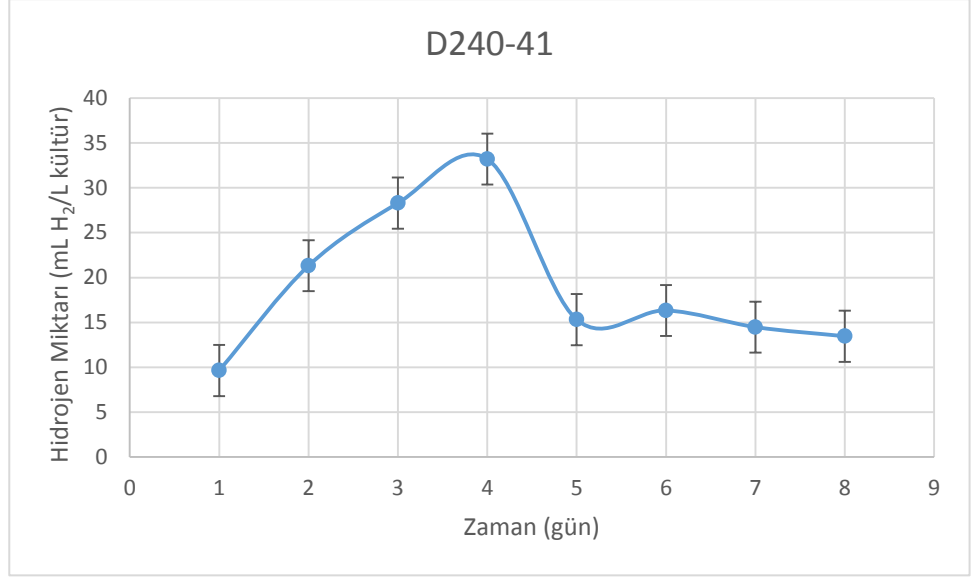
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan D240 kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 2. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.25). 8 günün sonunda toplam 122,1 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



Şekil 4.25: D240 suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.4 D240-41

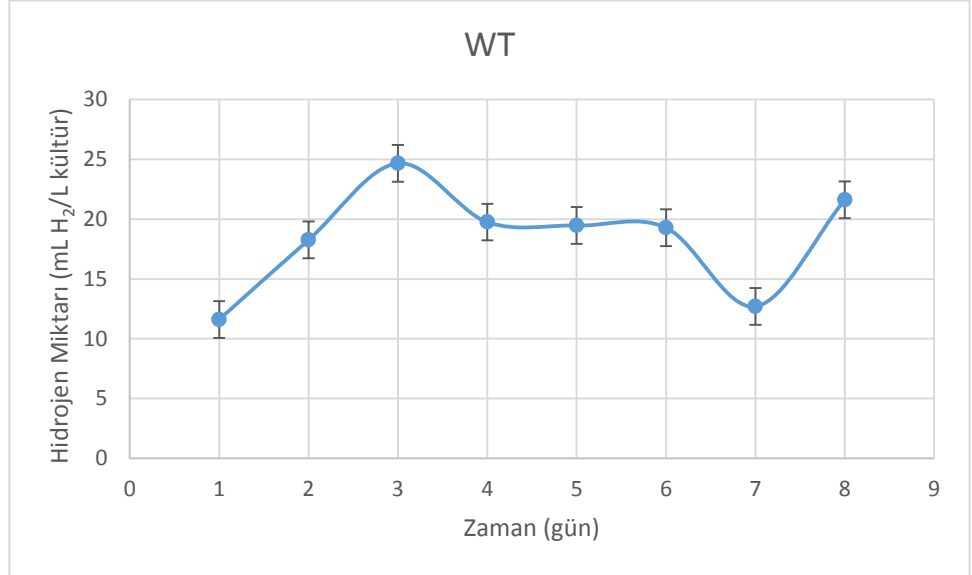
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan D240-41 kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 4. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.26). 8 günün sonunda toplam 152,1 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



Şekil 4.26: D240-41 suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.5 WT

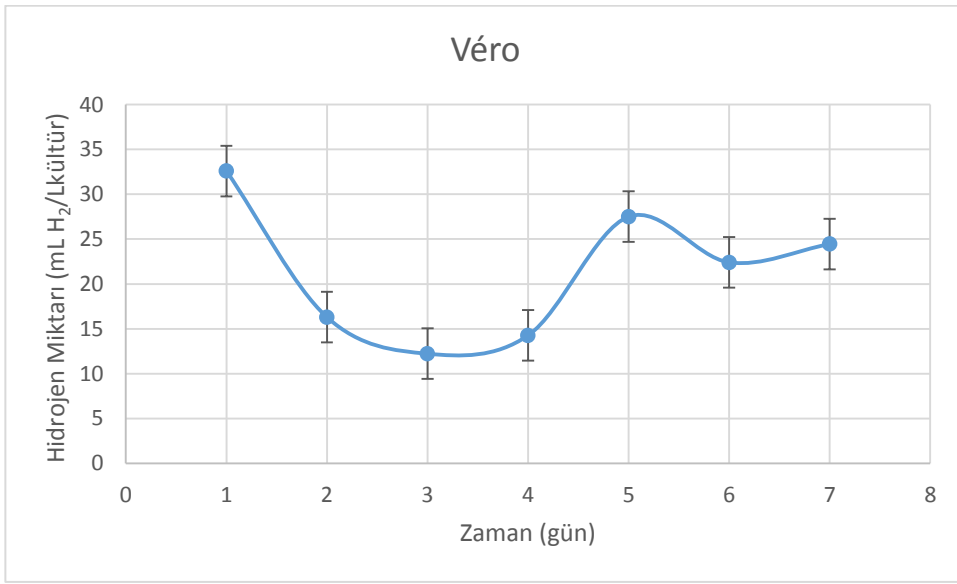
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan WT kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 3. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.27). 8 günün sonunda toplam 147,3 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



Şekil 4.27: WT suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.6 Véro

1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan Véro kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 1. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.28). 8 günün sonunda toplam 170,1 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.

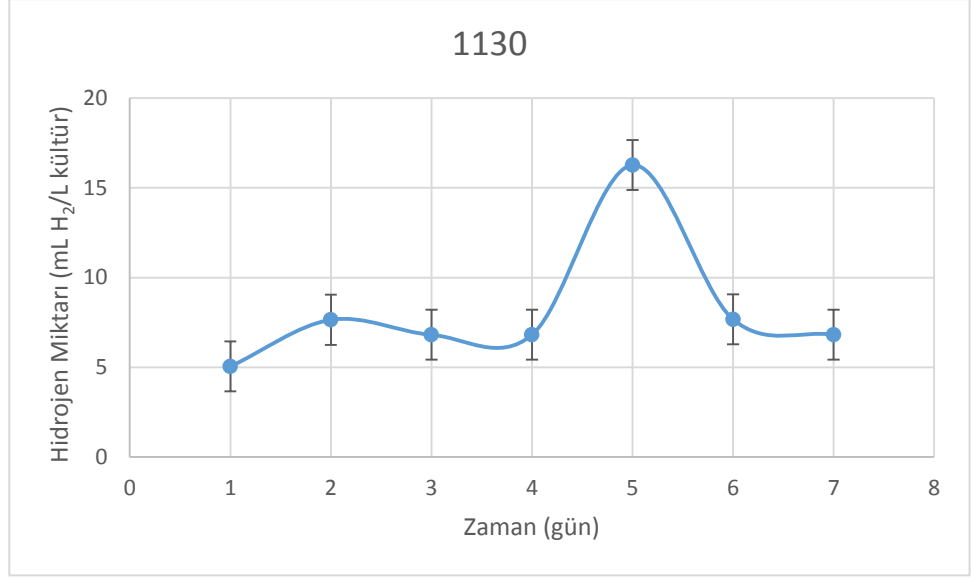


**Şekil 4.28:** Véro suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.7 1130

1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan 1130 kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 5. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.29). 8 günün sonunda toplam 67,3 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.

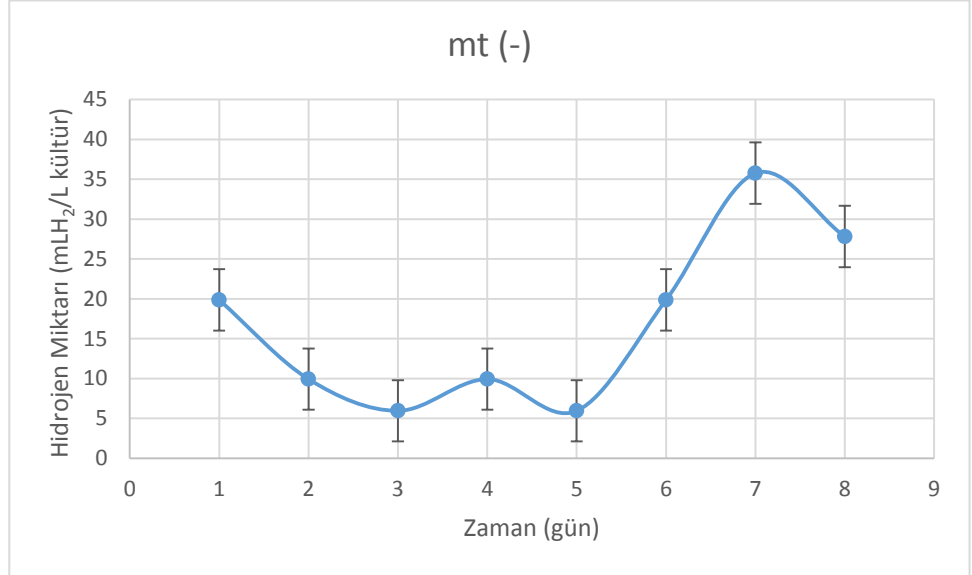




**Şekil 4.29:** 1130 suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.8 Mt (-)

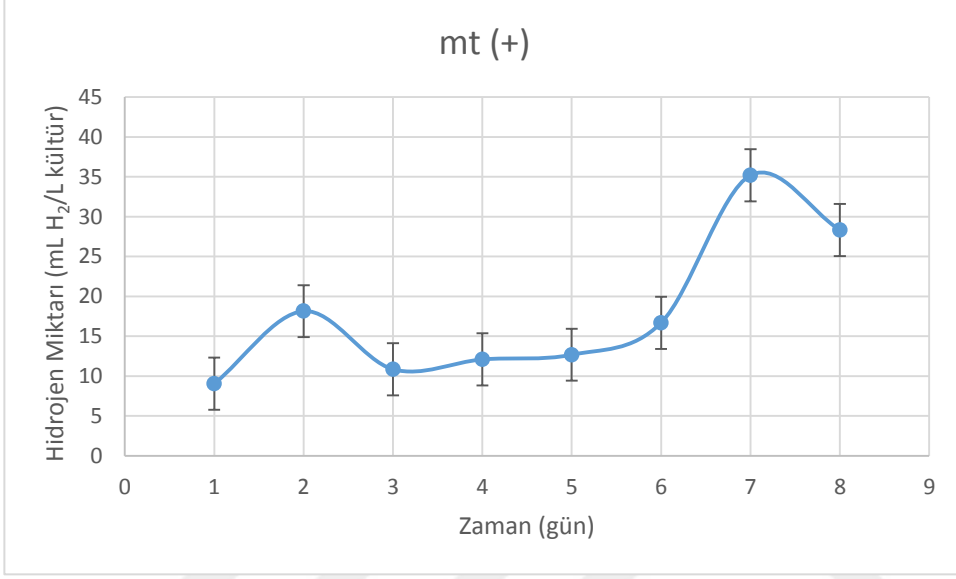
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan mt (-) kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 7. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.30). 8 günün sonunda toplam 135,1 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



**Şekil 4.30:** mt (-) suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.9 Mt (+)

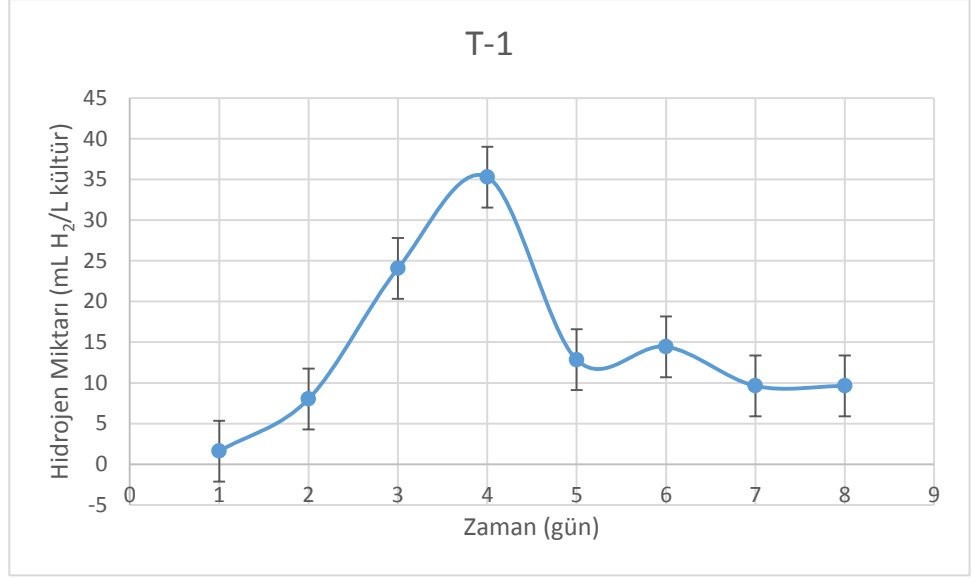
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan mt (+) kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 7. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.31). 8 günün sonunda toplam 143,1 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



Şekil 4.31: mt (+) suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.10 T-1

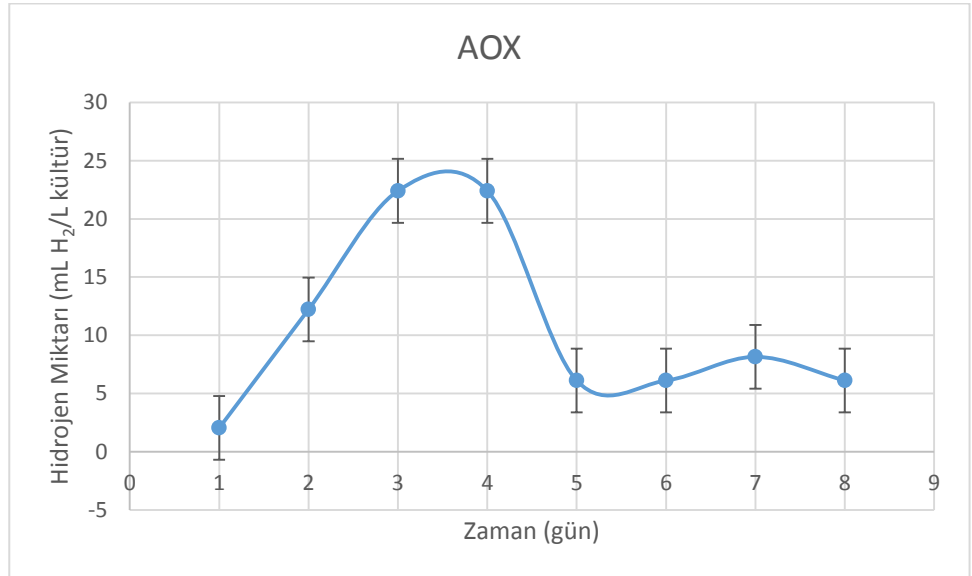
1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan T-1 kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 4. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.32). 8 günün sonunda toplam 115,5 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



Şekil 4.32: T-1 suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

#### 4.3.11 AOX

1L'lik Roux şişelerde üretimi yapılan AOX kültürü, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 8 gün boyunca hidrojen miktarı su kolonlarında günlük olarak takip edilmiştir. 3. gün maksimum hidrojen miktarına ulaşan kültür, sonraki günlerde daha az miktarlarda hidrojen üretmeye devam etmiştir (Şekil 4.33). 8 günün sonunda toplam 85,6 mL H<sub>2</sub> elde edilmiştir.



Şekil 4.33: AOX suşunun 8 günlük H<sub>2</sub> üretimi

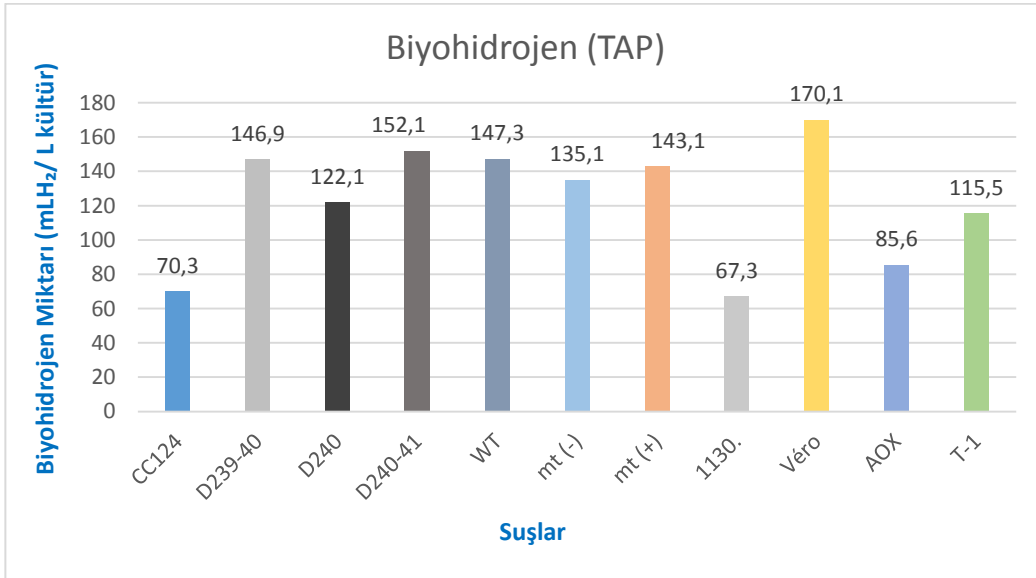
#### 4.4 HS metoduyla hidrojen üretimi

Bu protokol, önceki yöntemlere göre temel avantajlara sahiptir. Bunlar, birkaç saatlik anaerobik karanlık inkübasyonu takiben H<sub>2</sub> üretiminin, aydınlatmadan hemen sonra başlaması, kükürt yoksunluğunun aksine, ortam değişimi gerektirmemesi, nişasta parçalanmasına bağlı olmaması ve asetat kullanımına gerek kalmaması, bu nedenle fotoototrofik bir H<sub>2</sub> üretimi olmasıdır. Ayrıca, organik karbon kaynağı gerekmediği için bakteriyel kontaminasyon riski düşüktür, kültürler H<sub>2</sub> üretim fazı sırasında fotosentetik olarak aktif kalırlar ve daha sonra kolayca geri kazanılabilirler (Nagy et al., 2018).

Ancak yapılan 1L'lik Roux panel tipi fotobiyoreaktörlerdeki denemeler sonucunda bu metotla hidrojen elde edilememiştir. Yapılan GC analizleri sonucunda su kolonunda biriken gazın hidrojen içermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle reaktör üretimleri TAP-TAP-S metoduyla gerçekleştirilmiştir.

#### 4.5 Toplam hidrojen üretimi

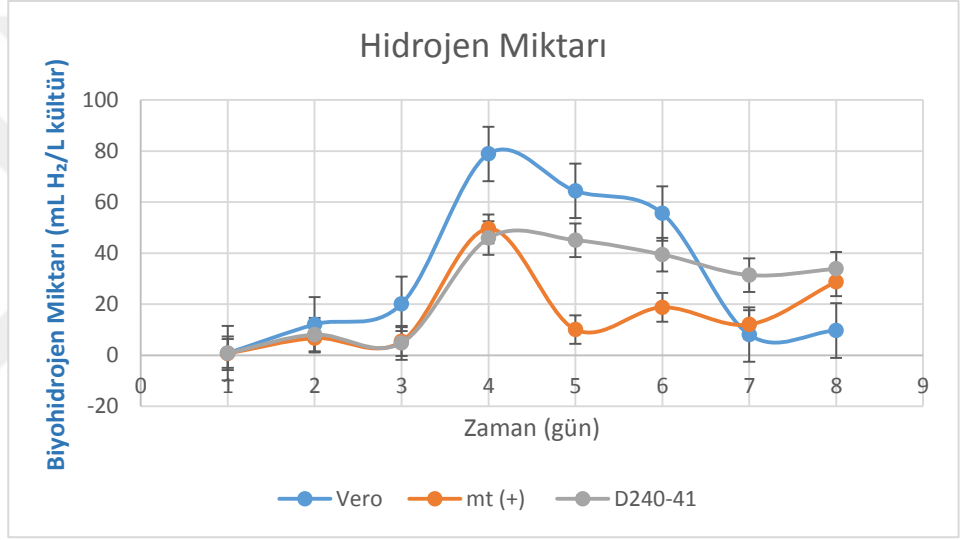
Toplam hidrojen miktarlarına bakıldığında reaktörde üretim yapılacak suşların en çok hidrojen üreten suşlardan 3 suşun üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu suşlar çift mutantlardan Véro, D1 mutantlarından D240-41, tek mutantlardan mt (+) suşlarıdır (Şekil 4.34).



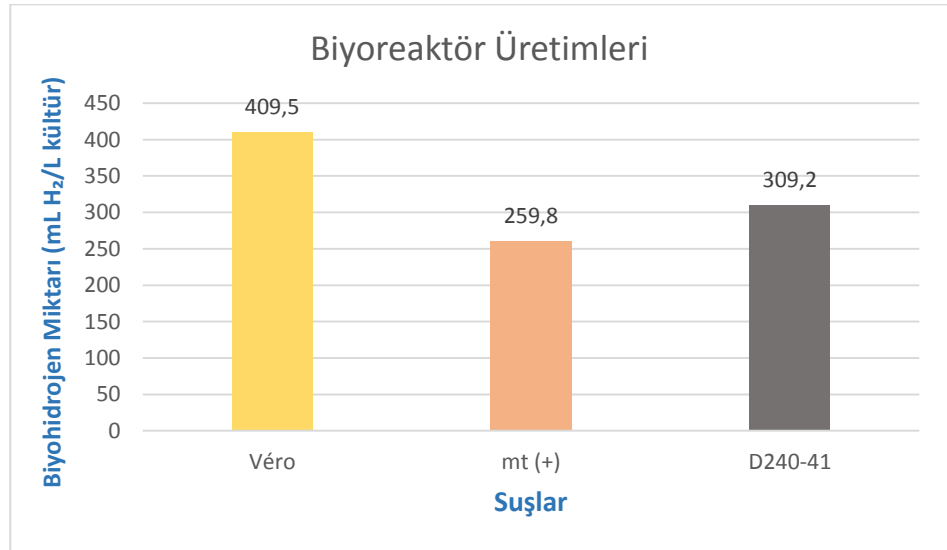
Şekil 4.34: 8 günlük hidrojen üretimi sonunda elde edilen biyohidrojen miktarı

#### 4.6 Biyoreaktörde hidrojen üretimi

Aerobik fazı gerçekleştirilen kültürler, 12 mg/L klorofil konsantrasyonunda anaerobik faza geçirilmiştir. 170 rpm karıştırma hızına sahip reaktörde, 40-45  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde, 2500 mL çalışma hacminde 8 gün hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Kültürler en fazla 4. günde hidrojen üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 4.35). 4. günden sonraki günlerde hidrojen üretim miktarları azalmıştır. 8 günün sonunda Vero, mt (+), D240-41 suşlarının toplam hidrojen miktarları sırasıyla, 1023,7 mL, 649,6 mL, 773,1 mL'dir (Şekil 4.36). Roux şişelerdeki üretimle karşılaştırıldığında toplam hidrojen üretimi yaklaşık 6 kat artmıştır.



Şekil 4.35: Biyoreaktörde günlük olarak elde edilen hidrojen miktarları



Şekil 4.36: 8 günün sonunda elde edilen toplam hidrojen miktarları

## 5. TARTIŞMA

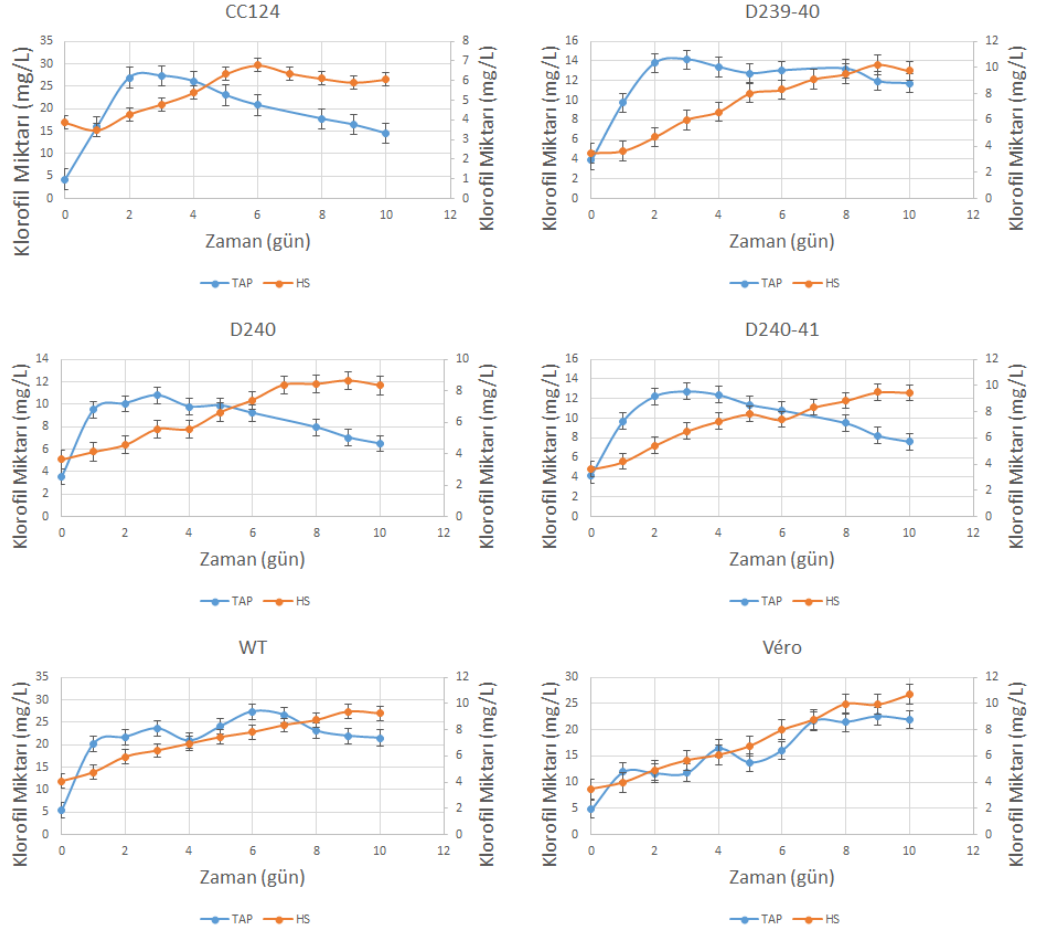
Kloroplastta, elektron akışı doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşebilmektedir. Doğrudan elektron akışı sisteminde PSII, PSI ve sitokrom b6f kompleksi yer almaktadır. Bunun dışında, elektronlar özellikle ışık yoğunluğuna bağlı olarak farklı yolları da tercih edebilmektedirler. Bu alternatif akış yolları arasında Plastid alternatif oksidaz (PTOX), su-su döngüsü ve PSI etrafında siklik elektron akışı bulunmaktadır.

Mitokondride, elektronlar kompleks I, II, III, IV'ten geçerek nihai alıcı oksijene giderler. AOX yoluyla ise kompleks 3 ve 4'ü atlayarak elektronlar hareket eder.

D1 proteini, oksijenli fotosentetik organizmaların çok bileşenli bir pigment-protein kompleksi olan PSII'nin önemli bir alt birimini temsil eder. Bu protein, alglerin ve yüksek bitkilerin kloroplast genomunda genellikle tek bir kopya olarak bulunan *psbA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bunun yanında, siyanobakteri genomunda genellikle bir *psbA* multigen ailesi yer almaktadır (Komenda, 2000). Bahsedilen bölge, transmembran helis IV ve V arasında bir stromal hidrofilik döngü içinde bulunur: D-E halkası olarak bilinir, siyanobakteriler, algler ve daha yüksek bitkiler arasında korunan bir amino asit sekansı içermektedir. Bu döngü, PSII'deki ikinci kararlı kinon alıcısı olan QB'nin bağlanmasında ve QB yerleştirme bölgesinde fotosentetik elektron taşınmasını engelleyen çeşitli herbisit sınıflarıyla ilişkilidir. Ayrıca, uzatılmış D-E döngüsü D1 proteininin hızlı devirinde yer alır: özellikle, amino asit kalıntıları 234 ve 242 arasında birincil bölünme alanının bulunduğu gösterilmiştir ve bu bölgedeki mutasyonların PSII'nin fonksiyonel özelliklerini etkilediğini bildirmiştir. D1 proteininin D-E döngüsündeki 240 veya her ikisi de 239 ve 240 pozisyonları dahil olmak üzere amino asit delesyonlarının, PSII onarımının inhibisyonu sonucu fotoinhibisyona duyarlılığı arttırdığı bulunmuştur (Faraloni and Torzillo, 2010).

Bu çalışmada yer alan mutantlar D1 mutantlarından; D239-40, D240, D240-41 mutantları, mt-, mt+, 1130, Vero ve AOX mutantlarıdır. D239-40, D240-41, 1130 ve Vero, çift mutasyona uğramışlardır. 1130 ve Vero mutantlarında, 1. PGRL1, değiştirilmiş bir CEF ve kloroplast ATP biyosentezine

yol açan nükleer gen, 2. Kompleks 1 aktivitesinin neredeyse tamamen kaybolmasına yol açan mitokondriyal kompleks 1 geni  $\Delta nd4$ .



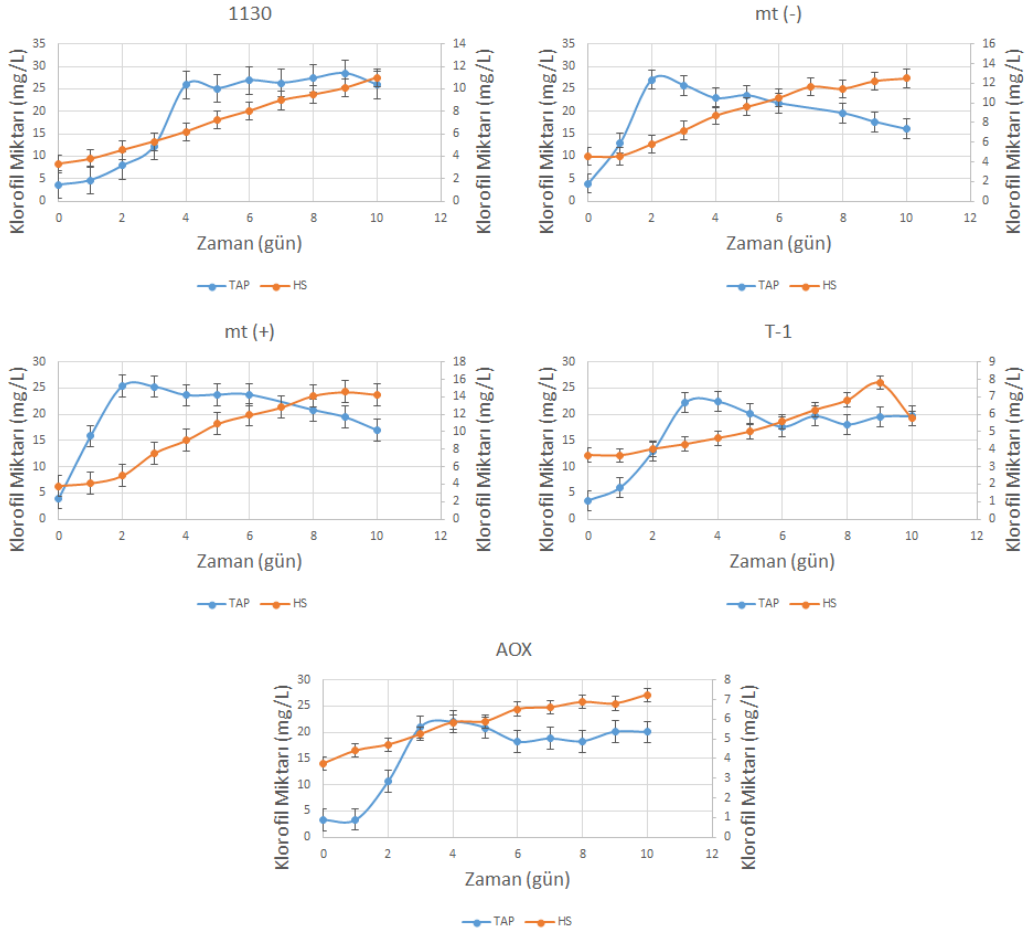
Şekil 5.1: 6 suşun iki farklı büyüme ortamındaki karşılaştırması

D1 mutantları, D1 proteininin D ve E helislerini bağlayan halkada sırasıyla 240, 240-241 ve 239-240 pozisyonlarında tek mutant D240 ve çift mutant D240-41 ve D239-40 amino-asidik delesyonları içererek oluşturulmuştur.

Mt (-) ve mt (+) mutantları, PGRL1 mutantlarıdır. Bu mutantların kontrol suşu olarak WT kullanılmıştır. Bu mutantlarda yapılan değişiklikler organizmaların aşırı ışığa duyarlı olmasına neden olmuştur. Bu nedenle 1130 ve Véro çift mutantları geliştirilmiştir. AOX mutanı ise, mitokondriyal alternatif oksidaz 1 enziminden yoksundur. Bu mutantın kontrol suşu olarak da T-1 suşu kullanılmıştır. Bu nedenle AOX mutantının reaktör üretimi gerçekleştirilmemiştir.

*Chlamydomonas reinhardtii*, tek karbon kaynağı olarak CO<sub>2</sub> kullanarak fotoototrofik veya asetat gibi organik karbonları kullanarak heterotrofik veya

miksotrofik olarak büyüebilir (Ramos-Martinez et al., 2019). İki farklı kültür ortamında büyütülen suşların büyümeleri özellikle klorofil miktarları karşılaştırıldığında organik karbon kaynağı olan asetatı içeren TAP büyüme ortamında tüm suşlar için klorofil miktarları diğer fototrofik büyüme sağlayan HS ortamına göre oldukça yüksektir (Şekil 5.1). Sudaki oksijenli fotosentetik organizmalar, CO<sub>2</sub> fiksasyonunda çeşitli zorluklarla karşılaşır. Birincisi, sudaki CO<sub>2</sub> difüzyonu havadakinden 10.000 kat daha yavaştır. İkinci olarak, CO<sub>2</sub> sabitleyici enzim Rubisco CO<sub>2</sub> için seçici değildir ve aynı zamanda oksijeni bağlayarak fotorespirasyon sürecine neden olur. Üçüncüsü, inorganik karbonun formu pH'a bağlıdır. Bu durum, hücrede CO<sub>2</sub> varlığının azalmasına neden olur (Polukina et al., 2016). Bu nedenle, klorofil miktarlarına bakıldığında HS ortamındaki suşlar daha az miktarda klorofil üretimi gerçekleştirmiştir (Şekil 5.2). Bunun yanında, stasyoner faza daha geç girdikleri ve maksimum klorofil üreten suşların 12-13 mg/L klorofil miktarına ulaşabildiği görülmüştür.



Şekil 5.2: 5 suşun iki farklı büyüme ortamındaki karşılaştırması



Fotobiyolojik H<sub>2</sub> üretimini iyileştirmeye yönelik mevcut yaklaşım, yeşil alglerde bulunan yüksek verimli hidrojenazların nihai fizyolojik rolünden kaynaklanmaktadır. Birincil işlevi, hipoksida fotosentezin indüksiyonu üzerine alternatif elektron alıcıları olarak hizmet etmektir; fotosentetik aygıt tam olarak işlevsel hale geldiğinde, hidrojenazlar gelişen O<sub>2</sub> ile inaktif hale gelir (Nagy et al., 2018). HS metoduyla hidrojen üretiminde, Calvin-Benson-Bassham döngüsünün ışıkta substrat sınırlaması yoluyla aktivasyonunu önleyerek (yani CO<sub>2</sub> veya asetatı çıkararak), fotosentetik elektron taşıma zincirinin büyük ölçüde azalması ve birkaç gün süren düşük O<sub>2</sub> oluşumuna ve yüksek H<sub>2</sub> üretimine neden olması mantığına dayanmaktadır. Ancak bu prosedürde O<sub>2</sub>'nin düşük konsantrasyonu hidrojenazların inaktif olmasına neden olmuş ve H<sub>2</sub> üretimi gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle küçük tıpalı şişelerde anaerobik koşullar sağlanarak 50 mL'lik çalışma hacminde metot yeniden denenmiş ve burada H<sub>2</sub> üretimi gözlemlenmiştir. Bu durum özellikle N<sub>2</sub> gazının kullanımıyla sağlanan düşük O<sub>2</sub> konsantrasyonu küçük hacimlerde gerçekleştirilebilirken, 1L'lik panel fotobiyoreaktörde üretim yapılmaya çalışıldığında bu işlemin geçerliliğini koruyamadığı görülmüştür. Özellikle mikroalgal biyohidrojen üretimleri, maliyet açısından büyük ölçeklerde gerçekleştirilemez iken bu prosedürde yüksek hacimlerde kullanılması gereken N<sub>2</sub> gazı, durumu daha da zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bu prosedürün büyük ölçeğe uygun olmadığı görülmüştür.

TAP-TAP-S metoduyla yapılan H<sub>2</sub> üretimi araştırmalarında ise, en yüksek H<sub>2</sub> üretimi 170,1 mL/L kültür ile Véro suşunda elde edilmiştir (Tablo 5.1). Yapılan üretilere bakıldığında bazı mutantların hidrojen üretimleri ilk gün fazla iken bazı mutantların daha sonraki günlerde H<sub>2</sub> üretimi arttığı görülmüştür. Bu durum suşların anaerobik faza girme durumları ile alakalıdır. Hidrojenazların O<sub>2</sub> varlığında inhibe olduğu bilinmektedir. Bu nedenle anaerobik koşulları sağlama zamanına göre H<sub>2</sub> üretimleri de farklılık göstermiştir. Mutantlar arasında en yüksek üretim yapılan suşun Véro olması, benzer mutasyona sahip 1130 suşunun, Véro suşuna göre daha ışığa duyarlı olmasının bir sonucudur. 1130 suşu sadece 67,3 mL H<sub>2</sub>/L kültür elde edilmiştir. Diğer mutantlara bakıldığında D1 protein mutantlarında çift delesyon içeren D239-40 ve D240-41 suşları daha fazla H<sub>2</sub> üretimi gerçekleştirmiştir. Bu durum D1 proteini üzerindeki çift aminoasit delesyonu D1 proteinin aktivitesinde daha etkili olmuş böylece daha fazla H<sub>2</sub>

üretimine katkı sağlamıştır. Diğer tek mutantlara bakıldığında mt (+) suşunun mt (-) suşuna göre daha fazla H<sub>2</sub> ürettiği, alternatif oksidaz enziminden yoksun AOX suşunun kontrol suşu olan T-1 suşunun daha fazla hidrojen ürettiği görülmüştür.

**Tablo 5.1:** *Chlamydomonas reinhardtii* suşlarının H<sub>2</sub> üretimi karşılaştırması

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> suş adı	Zaman (gün)	Su kolonunda birikim (mL/L)	Ortalama günlük hidrojen üretimi (mL/L gün)
CC124	8	70,6±5	8,8
D239-40	8	146,9±10	18,4
D240	8	122,1±4	15,3
D240-41	8	152,1±7	19
WT	8	147,3±4	18,4
Véro	8	170,1±6	21,3
1130	8	67,3±3	8,4
Mt(-)	8	135,1±10	16,9
Mt(+)	8	143,1±8	17,9
T-1	8	115,5±10	14,4
AOX	8	85,6±7	10,7

Reaktör çalışmalarında ise, tek mutantlardan mt (+), çift mutantlardan ise D1 mutantları arasında en yüksek hidrojen üretimi gerçekleştiren D240-41 mutanı ve mitokondriyal mutantlardan en yüksek hidrojen üreten Véro mutanı denenmiştir. Tüm mutantlar 2,5L'lik karıştırmalı tank fotobiyoreaktörde, 1L'lik panel fotobiyoreaktörde ürettikleri hidrojen miktarından 1L kültürde 2-2,5 kat daha fazla hidrojen üretmişlerdir (Tablo 5.2). 1L'lik panel fotobiyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerde olduğu gibi, karıştırmalı tank fotobiyoreaktöründe gerçekleştirilen üretimlerde 3 mutant arasında en çok hidrojen üreten mutant Véro olmuştur.

**Tablo 5.2:** Farklı reaktördeki H<sub>2</sub> üretimi karşılaştırması

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> suş adı	Zaman (gün)	1L panel fotobiyoreaktördeki üretim (mL/L)	2,5L karıştırmalı tank fotobiyoreaktördeki üretim (mL/L)
Véro	8	170,1±6	409,5±28
D240-41	8	152,1±7	309,2±17
Mt (+)	8	143,1±8	259,8±15

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fosil yakıtların tükenmesi ve küresel ısınma konusundaki ekonomik ve çevresel kaygılar, geleceğe yönelik bir enerji taşıyıcısı olan hidrojenin, temiz ve sürdürülebilir bir teknolojiyle üretimine ilgi önemli ölçüde artmaktadır. Bu bağlamda, bazı fotosentetik mikroorganizmaların, özellikle siyanobakterilerin ve mikroalglerin güneş enerjisini hidrojene dönüştürme kabiliyeti ümit verici olarak kabul edilmektedir (Chochois et al., 2009). Bunun yanında *Chlamydomonas reinhardtii* model organizma olarak kullanılmaktadır. Burada biyohidrojen üretimi için farklı üretim prosesleri veya genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak farklı mutant suşlar geliştirilmektedir. Bu çalışmada, hidrojen üretim miktarı yüksek mutantlar kullanılarak, hidrojen üretimi için TAP-TAP-S metodu ve HS metodu olan iki farklı prosedür denenmiştir. HS hidrojen üretim metodu, 50 mL'lik kültürde başarılı olurken, 1L'lik panel fotobiyoreaktör üretiminde başarılı olamamıştır. Özellikle kültür hacminin artması anaerobik koşulların sağlanması için yüksek hacimde N<sub>2</sub> gazına ihtiyaç duymuş ve bu nedenle hidrojen üretimini zorlaştırmıştır. Bunun yanında TAP-TAP-S metoduyla yapılan hidrojen üretiminde iki farklı fotobiyoreaktör tipinde de en çok üretim yapan çift mutantlardan Véro mutanı olmuştur.

Hidrojen enerjisiyle ilgili olarak önemli durumlardan biri depolama sorunudur. Geleneksel enerji kaynakları, depolama kullanılan ve kullanılmayan olarak ayrılmaktadır. Odun, petrol, doğal gaz veya kömür gibi yakıtlar geleneksel olarak üretimden kullanıma kadar çeşitli aşamalarda depolanmaktadır. Gaz formu nedeniyle, doğal gaz kullanımının ilk yıllarında depolanmadan boru hattıyla dağıtılmıştır. Öte yandan, elektrik büyük ölçüde herhangi bir depolama bileşeni olmadan üretilir, dağıtılır ve kullanılır. Hidrojen de ise, iki durum söz konusudur: biri doğrudan kullanım noktalarına boru hatları ile ulaştırılması, diğeri ise uygun depolama tesislerinde depolanmasıdır. Bunların sıkıştırılmış gaz depoları olması gerekmektedir, çünkü sıvılaştırma önemli ölçüde enerji kaybına neden olmaktadır. Ayrıca, piller, diğer kimyasal depolama gibi depolama türleri büyük ölçekli depolama için uygun değildir. Bir hidrojen iletim boru hattı sistemi mevcut olduğunda, ucuz depolama seçeneği en önemli husustur. Burada çözüm doğal gaz için kullanılan sistemle aynısı, yani uygun jeolojik oluşumlarda yer altı

depolaması önerilebilir. Birçok bölgede, hidrojeni tutmak için uygun oluşumlar bulmak mümkündür (Sørensen, 2005).

Yenilenebilir enerjiye dayalı çeşitli hidrojen üretim süreçlerinde teknik ve ekonomik fizibilite çalışmaları yapılmaktadır. Güneş enerjisi ve biyolojik temelli hidrojen üretim süreçlerinin ekonomik değerlendirmeleri, bu teknolojilerin rekabetçi konumunu iyileştirmek için atılması gereken adımlara odaklanmaktadır (Momirlan and Veziroğlu, 2002). Bu bağlamda, biyokütlenin gazlaştırılması ve pirolizini takiben buhar reformu, fotoelektroliz, yeşil algler tarafından hidrojen üretimi ve immobilize bakteriler tarafından su-gaz geçişini içeren teknolojilerin araştırmaları devam etmektedir.

2000'li yılların ortalarına kadar, küresel hidrojen ekonomisinin iklim değişikliğini hızlandıran sera gazları olmadan güvenli ve sürdürülebilir bir enerji sistemi getirerek 2040 civarında gerçekleşeceği uzmanlar arasında yaygın olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, hidrojen ekonomisi beklendiği kadar hızlı gelişmemektedir. Hidrojen ekonomisi bugün teknik ve ekonomik olarak mümkün olsa bile, karbon bazlı fosil yakıtlar önümüzdeki on yıllarda ekonomiyi beslemeye devam edeceği görülmektedir (Basile and Iulianelli, 2014).

Öte yandan biyohidrojen üretiminin büyük ölçeklerde gerçekleştirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle mikroalglerden biyohidrojen üretimi için organizma üzerinde var olan metabolik kısıtlamalar henüz aşılamamıştır. Biyoproses teknolojisi ve genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler oldukça ilerlemiş olmasına rağmen, teknolojinin ekonomik fizibilitesi hala kanıtlanmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle, biyokimya, genetik mühendisliği, metabolizma mühendisliği gibi önemli alanlarda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abe, I.**, 2008, Energy Carriers and Conversion Systems: Physical and chemical properties of hydrogen, *Encyclopedia of Life Support Systems*.
- Antonacci, A., Lambreva, M.D., Margonelli, A., Sobolev, A.P., Pastorelli, S., Bertalan, I., Udo Johanningmeier, U., Sobolev, V., Samish, I., Edelman, M., Havurinne, V., Tyystjärvi, E., Giardi, M.T., Mattoo, A.K. and Rea, G.**, 2018, Photosystem-II D1 protein mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to metabolic rewiring and remodelling of H-bond network at QB site, *Nature Scientific Reports*, 8:1-14p.
- Basile, A. and Iulianelli, A.**, 2014, Advances in hydrogen production, storage and distribution, Woodhead Publishing Series in Energy, Elsevier, 556p.
- Bičáková, O. and Straka, P.**, 2010, The resources and methods of hydrogen production, *Acta Geodyn. Geomater*, 7(2):175-188p.
- Chochois, V., Dauvillée, D., Beyly, A., Tolleter, D., Cuiné, S., Timpano, H., Ball, S., Cournac, L. and Peltier, G.**, 2009, Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism, *Plant Physiology*, 151:631–640p.
- Das, D. and Veziroglu, T.N.**, 2008, Advances in biological hydrogen production processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:6046-6057p.
- Dincer, I.**, 2012, Green methods for hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37:1954-1971p.
- Dubini, A.**, 2011, Biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii* green energy, *The Biochemical Society*, 20-23p.
- El-Shafie, M., Kambara, S. and Hayakawa, Y.**, 2019, Hydrogen production technologies overview, *Journal of Power and Energy Engineering*, 7:107-154p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Faraloni, C. and Torzillo, G.**, 2010, Phenotypic characterization and hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* Qb-binding D1-protein mutants under sulfur starvation: changes in chl fluorescence and pigment composition, *Journal of Phycology*, 46:788-799p.
- Gibbs, M., Gfeller, R.P. and Chen, C.**, 1986, Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: III. Photoassimilation of acetate, *Plant Physiology*, 82:160–166p.
- Harris, E.H.**, 2009, Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use, Academic Press, Canada, 2030p.
- Hemschemeier, A., Fouchard, S., Cournac, L. and Peltier, G.**, 2008, Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron, *Planta*, 227:397-407p.
- Holladay, J.D., Hu, J., King, D.L. and Wang, Y.**, 2009, An overview of hydrogen production technologies, *Catalysis Today*, 139:244–260p.
- Khatoon, N. and Pal, R.**, 2015, Microalgae in biotechnological application: a commercial approach, 27-47, *Plant Biology and Biotechnology*, Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L. and Krishnamurthy, K.V. (Eds.), Springer India, India, 768p.
- Komenda, J.**, 2000, Role of two forms of the D1 protein in the recovery from photoinhibition of photosystem II in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942, *Biochimica et Biophysica Acta* 1457, 243-252p.
- Larosa, V., Meneghesso, A., La Rocca, N., Steinbeck, J., Hippler, M., Szabò, I. and Morosinotto, T.**, 2018, Mitochondria affects photosynthetic electron transport and photo-sensitivity in a green alga, *Plant Physiology*, 176:2305–2314p.
- Lowe, R.L. and LaLiberte, G.D.**, 2006, Benthic stream algae: distribution and structure, *Methods in Stream Ecology*, 327-339p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Makarova, V.V., Kosourov, S., Krendeleva, T., Semin, B.K., Kukarskikh, G.P., Rubin, A., Sayre, R., Ghirardi, M.L. and Seibert, M., 2007,** Photoproduction of hydrogen by sulfur-deprived *C. reinhardtii* mutants with impaired photosystem II photochemical activity, *Photosynthesis Research*, 94:79–89p.
- Mathy, G., Cardol, P., Dinant, M., Blomme, A., Gérin, S., Cloes, M., Ghysels, B., DePauw, E., Leprince, P., Remacle, C., Sluse-Goffart, C., Franck, F., Matagne, R.F. and Sluse, F.E., 2010,** Proteomic and functional characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1, *Journal of Proteome Research*, 9(6):2825–2838p.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L. and Seibert, M., 2000,** Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiology*, 122:127–136p.
- Metsoviti, M.N., Katsoulas, N., Karapanagiotidis, I.T. and Papapolymerou, G., 2019,** Current and potential applications of microalgae: a mini review, *Oceanography and Fisheries Open Access Journal*, 11(3):1-5p.
- Momirlan, M. and Veziroğlu, T.N., 2002,** Current status of hydrogen energy, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 6:141-179p.
- Nagy, V., Podmaniczki, A., Vidal- Meireles, A., Tengölics, R., Kovács, L., Rákhely, G., Scoma, A. and Tóth, S.Z., 2018,** Water- splitting- based, sustainable and efficient H<sub>2</sub> production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin–Benson–Bassham cycle, *Biotechnology for Biofuels*, 11:69p.
- Naruka, M., Khadka, M., Upadhayay, S. and Kumar, S., 2019,** Potential applications of microalgae in bioproduct production: a review, *Octa Journal of Biosciences*, 7(1):01-05p.
- Naselli-Flores, L. and Barone, R., 2009,** Green Algae, 166-173, Encyclopedia of Inland Waters, Likens, G.E. (Eds.), Academic Press, Oxford, 2250p.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nikolaidis, P. and Poulikkas, A.,** 2017, A comparative overview of hydrogen production processes, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67:597–611p.
- Oncel, S.S., Kose, A., Faraloni, C., Imamoglu, E., Elibol, M., Torzillo, G. and Vardar Sukan, F.,** 2015a, Biohydrogen production from model microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*: A simulation of environmental conditions for outdoor experiments, *International Journal of Hydrogen Energy*, 40:7502-7510p.
- Oncel, S.S., Kose, A., Vardar, F. and Torzillo, G.,** 2015b, From the ancient tribes to modern societies, microalgae evolution from a simple food to an alternative fuel source , *Handbook of Marine Microalgae*, 127-144p.
- Polukhina, I., Fristedt, R., Dinc, E., Cardol, P. and Croce, R.,** 2016, Carbon supply and photoacclimation cross talk in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiology*, 172:1495–1505p.
- Posewitz, M.C., Smolinski, S.L., Kanakagiri, S., Melis, A., Seibert, M. and Ghirardi, M.L.,** 2004, Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell*, 16:2151–2163p.
- Priyadarshani, I. and Rath, B.,** 2012, Commercial and industrial applications of micro algae -a review, *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4): 89–100p.
- Pröschold, T., Harris, E.H. and Coleman, A.W.,** 2005, Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics*, 170:1601–1610p.
- Ramos-Martinez, E.M., Fimognari, L., Maria K. Rasmussen, M.K. and Sakuragi, Y.,** 2019, Secretion of acetylxyylan esterase from *Chlamydomonas reinhardtii* enables utilization of lignocellulosic biomass as a carbon source, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:1-9p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Rochaix, J.D.**, 2013, *Chlamydomonas reinhardtii*, 521-524, Brenner's Encyclopedia of Genetics, Maloy, S. and Hughes, K. (Eds.), Academic Press, Poland, 4368p.
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M. and Grossman, A.R.**, 2018, From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature, *eLife*, 1-14p.
- Scoma, A., Krawietz, D., Faraloni, C., Giannelli, L., Happe, T. and Torzillo, G.**, 2012, Sustained H<sub>2</sub> production in a *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant, *Journal of Biotechnology*, 157:613-619p.
- Sharma, N. and Sharma, P.**, 2017, Industrial and biotechnological applications of algae: a review, *Journal of Advances in Plant Biology*, 1(1):1-25p.
- Singh Chauhan, N.S. and Singh, V.K.**, 2015, Fundamentals and use of hydrogen as a fuel, *Journal of Mechanical Engineering*, 6(1):63-68p.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A.**, 2006, Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2):87-96p.
- Sørensen, B.**, 2005, Hydrogen and fuel cells: emerging technologies and applications, Elsevier Academic Press, Denmark, 465p.
- Tolteker, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroutsos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J.M., Beyly, A., Cuiné, S., Plet, J., Reiter, I.M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M. and Peltiera, G.**, 2011, Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, *The Plant Cell*, 23: 2619–2630p.
- Torzillo, G., Scoma, A., Faraloni, C., Ena, A. and Johanningmeier, U.**, 2008, Increased hydrogen photoproduction by means of a sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10):4529-4536p.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamın oluşumunda, planlanmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL'e, yüksek lisans öğrenimimde burs almama yardım eden, ilgisini ve desteğini eksik etmeyen hocam Prof. Dr. MURAT ELİBOL'a, çalışmalarım sırasında deneyimlerini benden esirgemeyen ve vaktini ayıran her konuda yardımcı olan Dr. Ayşe KÖSE'ye, her türlü problemimde yanında olan ve çalışmalarımındaki yardımları ve destekleri için laboratuvar arkadaşlarım Çağla YARKENT, Ceren GÜRLEK, Yunus ÇELİK, Başak TUĞCU, Tuğçe MUTAF ve Barış ERDOĞAN'a, motivasyonları ve destekleriyle beni hiç yalnız bırakmayan arkadaşlarım Gamze DOĞAN, Şeyma GÖDELEK ve Berçin BARLAS'a ve tüm koşullarda benim yanımda olan ve beni hep destekleyen aileme sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

13 / 08 / 2020

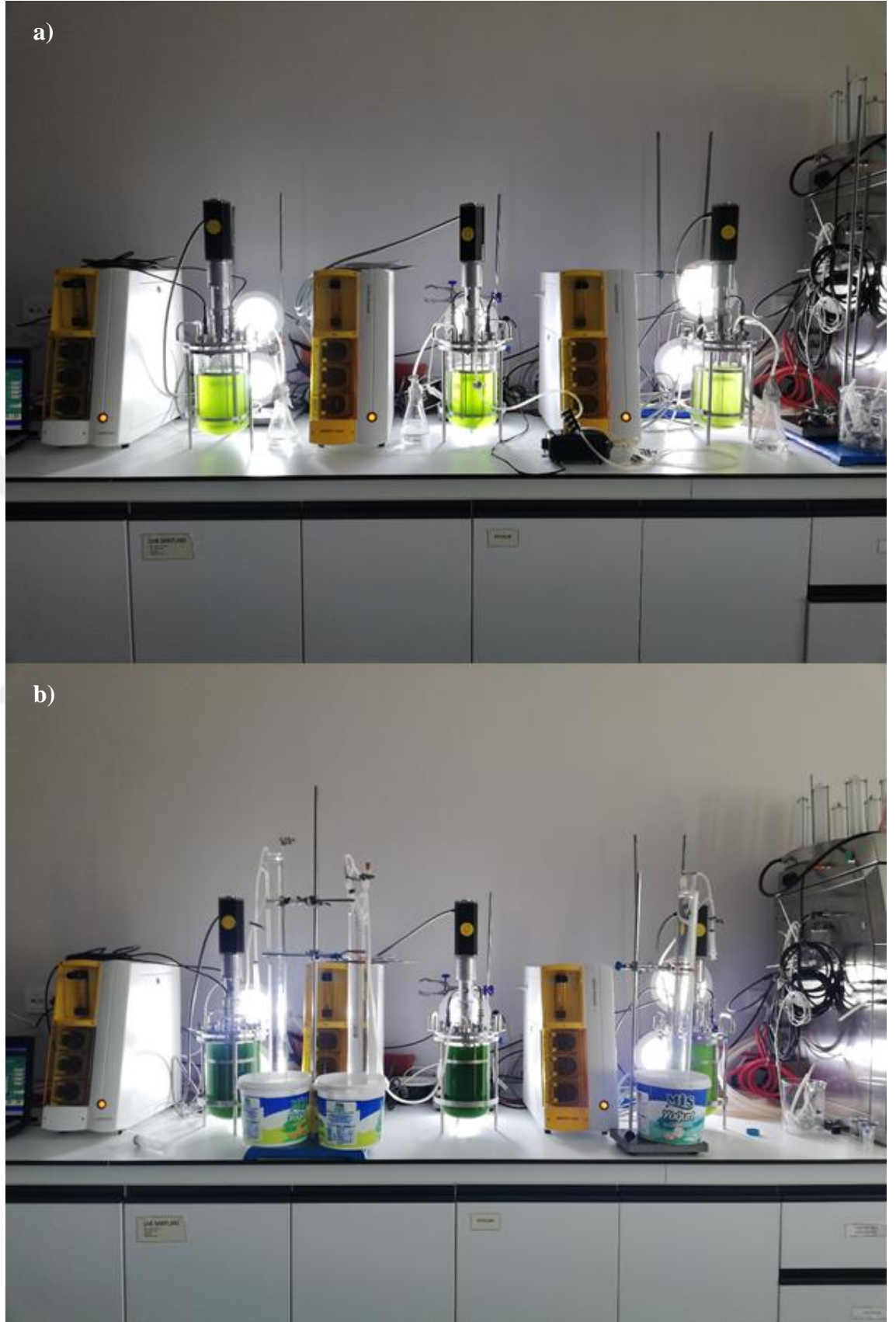


İzel ORAL

## ÖZGEÇMİŞ

İzel Oral, 06/09/1994 tarihinde İzmir’de doğdu. İlköğretimini Yavuz Selim İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini ise Suphi Koyuncuoğlu Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2012 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı. 2016 yılında Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü’nde stajını tamamladı. 2017 yılında Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL danışmanlığında “*Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginden ekzopolisakkarit üretimi” başlıklı bitirme tezini tamamlayarak lisans eğitimini bitirdi. Aynı yılın Eylül ayında, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Doç Dr. Suphi Ş. ÖNCEL danışmanlığındaki “*Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgine ait mutantlarının biyohidrojen üretim potansiyellerinin incelenmesi” konulu yüksek lisans tezini sundu.

## EKLER



**Ek 1:** Biyoreaktörde a) Aerobik fazda kültür üretimi, b) Anaerobik fazda hidrojen üretimi